

## 論文審査の結果の要旨

氏名：山口 亜利彩

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Inflammatory Cytokines Regulate Exosomal MicroRNA and Protein Expressions in Osteoblast-like Saos2 Cells and Human Gingival Fibroblasts.

（炎症性サイトカインは骨芽細胞様 Saos2 細胞およびヒト歯肉線維芽細胞のエクソソーム中のマイクロ RNA およびタンパク質発現を調節する）

審査委員：（主査） 教授 吉垣 純子

（副査） 教授 小方 頼昌

教授 平塚 浩一

歯周炎は、細菌因子、環境因子および宿主因子の相互作用によって引き起こされる慢性炎症性疾患で、歯周組織の破壊と歯の喪失をもたらす。歯周病原菌に対する宿主の免疫応答の結果、腫瘍壊死因子 -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) やインターロイキン -  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) 等の炎症性サイトカインが産生され、歯肉の炎症と歯槽骨吸収が引き起こされる。エクソソームは、細胞が分泌する直径約 40~100 nm の細胞外小胞の一種で、宿主細胞の機能を反映し、細胞間コミュニケーションに関与するとともに、その中にタンパク質、mRNA、microRNA (miRNA) 等の生理活性物質や疾患バイオマーカーを含有する。エクソソーム中には、programmed cell death 6-interacting protein (PDCD6IP, 別名 apoptotic linked-gene-product 2 interacting protein X; ALIX), heat shock protein 70 (HSP70), tumor susceptibility gene 101 protein (TSG101), cluster of differentiation 81 (CD81), CD9, CD63 および complement component 6 等、他の細胞外小胞と区別されるマーカータンパク質が存在する。エクソソーム関連テトラスペニンである CD9 と CD81 の唾液中濃度は、歯周炎患者で減少することが報告された。エクソソーム中の miRNA は、免疫調節や癌の進行等の生理的および病理学的機能を有する。間葉系細胞由来のエクソソーム中の miR-150-5p は、matrix metalloproteinase 14 および vascular endothelial growth factor の抑制により媒介される関節リウマチの治療への応用が期待される。しかし、骨芽細胞および歯肉線維芽細胞からのエクソソーム中の miRNA およびタンパク質の相対量に対する炎症性サイトカインの影響についての報告はない。本研究では、Saos2 骨芽細胞様細胞のエクソソーム中の miRNA およびタンパク質量に対する TNF- $\alpha$  と IL- $1\beta$  の作用、およびヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) のエクソソーム中の miRNA およびタンパク質量に対する TNF- $\alpha$  の作用について解析を行った。

Saos2 細胞のエクソソーム中の miR-150-5p, miR-200b-3p, miR-223-3p および miR-144-5p の相対量は、細胞内の miRNA 発現量と比べ有意に高値であった。Saos2 細胞のエクソソーム中の上記 4 種類の miRNA の相対量は、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) 刺激で有意に増加した。IL- $1\beta$  (1 ng/ml) 刺激では、miR-150-5p と miR-200b-3p の相対量のみが有意に増加した。Saos2 細胞のエクソソーム中の PDCD6IP, HSP70 および TSG101 のタンパク質の相対量は、TNF- $\alpha$  および IL- $1\beta$  刺激で増加した。

HGF のエクソソーム中の miR-150-5p, miR-200b-3p, miR-223-3p および miR-144-5p の相対量は、細胞内の miRNA の発現量と比較して有意に高値であった。TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) は、HGF のエクソソーム中の miR-150-5p, miR-200b-3p および miR-144-5p の相対量を有意に減少させた。HGF のエクソソーム中の PDCD6IP

および CD81 のタンパク質の相対量は、TNF- $\alpha$  刺激により有意に増加した。 $\alpha$ -Tubulin は内部標準として使用され、エクソソーム中では検出されなかった。

本研究の結果、炎症性サイトカイン刺激によるエクソソーム中の miRNA およびタンパク質の相対量の変化は、炎症時のシグナル伝達に関与することが示唆された。Saos2 細胞および HGF のエクソソーム中の miRNA およびタンパク質の相対量は、炎症性サイトカイン刺激で異なる変化を示したことから、歯周炎の進行において骨芽細胞と歯肉線維芽細胞は異なる役割を持つ可能性が考えられ、エクソソーム中の miRNA およびタンパク質は、歯周病の進行や予後を判定する病態解明のマーカーになる可能性が示唆された。これらの研究成果は、歯周病の予防および治療の発展に大きく寄与するものである。

よって本論文の著者は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 5年 1月 26日