

【目的】シェーグレン症候群 (SS) はドライマウスやドライアイを主症状とするため、歯科を初診で来院することも多い。SS の病因・病態についてはいまだ不明な点が多く、治療も対症療法に終始せざるを得ないのが現状である。我々の過去の研究から肝細胞増殖因子 (HGF) やトランスフォーミング因子- $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) が多く含まれている歯髄幹細胞からのエクソソーム (EVs) が SS の病態改善に寄与していることを突き止めた。しかし、歯髄幹細胞 (DPSCs) の状態によってはその効果がでないこともしばしばある。そこで、本研究では、HGF や TGF- $\beta 1$  を多く産生している DPSCs を iPS 細胞化し、それから安定した EVs が取り出せないかと考えて本研究に至った。iPS 細胞化させた後、それらを SS モデルマウスに投与し、治療効果があることの確認とそのメカニズムの解明を行うことを本研究の目的とする。

【方法】まず、*in vitro* において別ロットのヒト歯髄幹細胞から山中らの方法を使って iPS 細胞の作製を行った。樹立した iPS 細胞の特性を調べるために、未分化マーカーである Oct3/4 および SSEA-4 で蛍光免疫組織学的染色を行った。その後、それら細胞の培養上清を採取し、そこに含まれている HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度を ELISA を用いて調べた。HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度が高い iPS 細胞と HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度が低い iPS 細胞からそれぞれ超遠心法を使って EVs を回収した。回収した EVs の表面抗原をウエスタンブロット法を使って確認し、形態をクライオ透過型電子顕微鏡 (Cryo-TEM) を使って確認した。また、それぞれの EVs に含まれているマイクロ RNA を網羅的に調べるためにマイクロ RNA アレイを行った。次に *in vivo* において、SS モデルマウスの尾静脈から EVs を 300  $\mu$ g/ml で 1 回 (100  $\mu$ l の PBS に懸濁) 投与した。4 週後に唾液腺・脾臓における H-E 染色、qPCR、ウエスタンブロットを使って評価した。

【結果】樹立した 3 種類の iPS 細胞は、それぞれ未分化性を保持していた。それらの培養上清の HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度を ELISA で調べたところ、濃度に違いがあった。そこで、HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度が高い iPS 細胞およびそれらが低い iPS 細胞からそれぞれ、EVs を採取しその特性や形状を調べた。表面抗原は、ウエスタンブロットから CD9、CD81 を有しており、Cryo-TEM から大きさは約 200 nm 前後で、二重膜に包まれた構造をしていることが分かった。それらを SS モデルマウスに投与したところ、HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度が高い iPS 細胞からの EVs 投与群において、唾液腺組織における炎症性細胞浸潤が有意に減少し、唾液量の増加、抗 SS-A 抗体・抗 SS-B 抗体の低下を認めた。それらの EVs の差異をマイクロ RNA アレイで網羅的に検索したところ、HGF や TGF- $\beta 1$  の濃度が高い iPS 細胞からの EVs には let-7 family がより多く含まれていることが分かった。そこで、相互に関連すると言われている Toll-like receptor (TLR) の発現を qPCR で調べると、TLR4 の発現低下を認めた。その下流のシグナル経路である MAPK に着目し、マウスマクロファージの培養上清のサイトカイン濃度やマウス脾臓組織のウエスタンブロットを行うと、EVs 投与群において、抗炎症サイトカイン濃度が高くなっており、ウエスタンブロットでは TLR4 および p-MAPK の発現低下を認めた。よって、EVs 中の let-7 family が TLR4 の発現を抑制し、その結果として MAPK を介した炎症性サイトカイン産生抑制に関与している可能性が示唆された。

#### 本実験のアブストラクト

