

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16332

研究課題名(和文) MSCエクソソームと多糖ナノゲルによる骨再生システムの構築

研究課題名(英文) MSC exosome-polysaccharide nanogel hybrid for bone regeneration

研究代表者

下田 麻子 (Shimoda, Asako)

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号：90712042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽、脂肪細胞などあらゆる細胞へ分化する能力を持つ間葉系幹細胞(MSC)を用いた組織再生治療が着目されており、MSCが放出する膜小胞(エクソソーム)も同様の効果があると考えられている。本研究課題ではMSCおよび骨芽細胞へ分化させたMSC由来エクソソームを単離し、機能評価を行った。骨芽細胞が分化後期に分泌する石灰化の核となるエクソソーム様のマトリックスベシクルと呼ばれる小胞も同時に単離したところ発現タンパク質や骨芽細胞の石灰化への影響に違いが見られた。また、エクソソームの表面糖鎖は細胞の種類や分化に伴い変化することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) can differentiate into various cells and have the potential of therapeutic agents. Exosomes are nano-sized vesicles released from cells and play an important role in cellular communication. Recent studies showed that exosomes from MSCs are considered as a substitution of cell-based therapy. In this study, we collected exosomes from MSCs or osteogenic MSCs and compared their functions. In addition, exosome-like vesicles known as matrix vesicles, released by osteoblasts to induce mineralization, were isolated from osteogenic MSCs. We found the different biological functions between exosomes and matrix vesicles, and glycan profiles of exosomes reflect the biogenesis and cell differentiation.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：エクソソーム マトリックスベシクル 間葉系幹細胞 骨再生 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells: MSC) は、骨芽細胞、軟骨細胞、神経細胞、脂肪細胞などの様々な細胞へと分化する能力を持ち、骨髄や脂肪組織、臍帯、歯髄などあらゆる組織から採取できる。MSC が放出する成長因子は細胞増殖能や血管新生促進を促し、さらには障害部位へと自発的に移動して集まるホーミングという効果を持つことが知られている。このことから、組織再生のために MSC そのものを移植する治療法が注目されている。しかし、品質管理が難しいことや MSC の増殖能に限りがあることなど多くの問題も残されている。

細胞が分泌する膜小胞 (エクソソーム) は内部にタンパク質や核酸を保持し、受け手側の細胞へと情報を伝達する役割を担っている。我々はこれまでに、ヘリコバクターピロリ菌が持つ毒素タンパク質 CagA を発現する胃上皮細胞はその生物活性を保持したままエクソソームとして CagA を放出することを報告している。ピロリ菌感染胃がん患者の血清中にも同様に CagA を含むエクソソームが存在することを発見し、血流にのって運ばれることを初めて見出した。この結果はピロリ菌感染と胃関連疾患以外の全身疾患との関連性のメカニズムの解明につながると考えられる (Shimoda *et al.*, Scientific Reports, 6, 2016, 18346.)。このように、エクソソームは由来細胞の情報をコピーして他の細胞へと伝達することから、MSC の分化に伴い、放出されるエクソソームの機能も変化すると考えた。本研究では骨組織において骨形成を行う骨芽細胞へと分化させ、その過程でエクソソームを回収し、分化前後での機能を比較する。また、細胞表面の膜タンパク質や脂質には糖がいくつも連なった構造の糖鎖が結合し、細胞接着や細胞間相互作用に重要な役割を果たしていることが知られている。よって、エクソソーム上の糖鎖解析はエクソソームと細胞との相互作用機構の解明に有用であると考えられる。そこで、糖鎖を認識するタンパク質であるレクチンをスライドガラス上に配置したレクチンアレイを用いて MSC エクソソーム表面の糖鎖解析を行い、由来細胞の細胞膜との比較を行う。

2. 研究の目的

未分化および骨芽分化 MSC (分化開始 7, 14, 21 日後) からエクソソームを回収し、発現タンパク質の確認や粒径測定、透過型電子顕微鏡による形状観察を行う。また、骨芽細胞は分化の後期過程で自身が分泌するコラーゲンにエクソソーム様のマトリックスベシクルと呼ばれる小胞を埋め込み、ここから石灰化を開始することで骨基質が形成されることが知られている。そこで、分化誘導して 21 日後にマトリックスベシクルも回収し、エクソソームとの比較を行う。得られたエクソソームを未分化 MSC に添加し、骨芽細胞分化

誘導培地で培養した際の分化への影響を比較する。さらに、蛍光標識したエクソソームと細胞膜をレクチンアレイへアプライし、エバネッセント波蛍光励起法により発現する糖鎖のパターンを解析する。

3. 研究の方法

(1) MSC からのエクソソームの単離

未分化 MSC エクソソームはヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (Adipose tissue-derived stem cells: ADSC)、ヒト乳歯歯髄由来幹細胞 (stem cells from human exfoliated deciduous teeth: SHED) から超遠心分離法を用いて単離した。ウエスタンブロッティングによるエクソソームマーカータンパク質の CD81 および MSC マーカーの CD73 の発現確認、ナノトラッキング法 (NTA) による粒径測定、透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察を行った。

(2) 骨芽分化誘導 MSC からのエクソソームおよびマトリックスベシクルの単離

骨芽細胞分化培地 (基本培地 + β -Glycerophosphate, L-Ascorbic Acid, Dexamethasone) を用いて ADSC から骨芽細胞へと分化誘導し、7, 14, 21 日目にエクソソームを単離した。また、21 日目の培養上清を回収後に細胞をりん酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、コラーゲナーゼ処理にてマトリックスベシクルを回収した。骨芽細胞分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定およびカルシウム結合タンパク質であるアネキシン の発現を確認した。

(3) 骨芽分化誘導 MSC へのエクソソームおよびマトリックスベシクルの添加

未分化 ADSC を 96 well プレートを用いて骨芽細胞分化誘導培地で培養し、分化誘導 21 日後に単離したエクソソーム又はマトリックスベシクルを添加し、分化に及ぼす影響を石灰化の度合いにより評価した。

(4) レクチンアレイを用いたエクソソーム表面の糖鎖解析

ADSC から得られた未分化 MSC エクソソームおよび細胞膜を蛍光色素 Cy3 で標識し、45 種類のレクチンが固定化されたスライドガラス (LecChip ver.1.0, グライコテクニカ) へアプライした。エバネッセント波蛍光励起法により発現する糖鎖のパターンを解析、比較した。

4. 研究成果

(1) MSC エクソソームの単離

ADSC、SHED から脂質二重膜で囲まれた 180 nm 前後の小胞が単離できた。収量をタンパク定量にて評価したところ、ADSC の方が比較的多くの量が回収できた。また、ウエスタンブロッティングにて CD81, CD73 の発現を確認した。

(2) 骨芽細胞分化誘導 MSC エクソソームおよびマトリックスベシクルの機能評価
 分化誘導 7, 14, 21 日後も同様に 150-180 nm の膜小胞が単離できた。TEM 観察により、マトリックスベシクルもエクソソームと類似の構造であることが確認できた (図 1)。

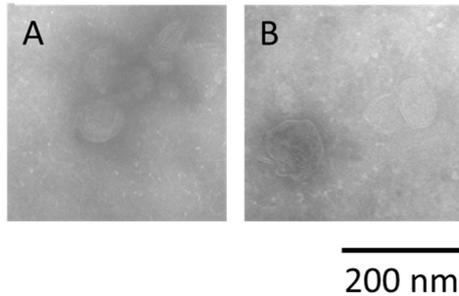


図 1 骨芽細胞分化誘導 21 日後の(A)エクソソームおよび(B)マトリックスベシクルの TEM 画像

また、骨芽細胞分化マーカーの 1 つである ALP 活性の測定を行ったところ、マトリックスベシクルが最も高い活性を示した。また、カルシウム結合タンパク質であるアネキシン V の発現量もマトリックスベシクルが最も多かった (図 2)。

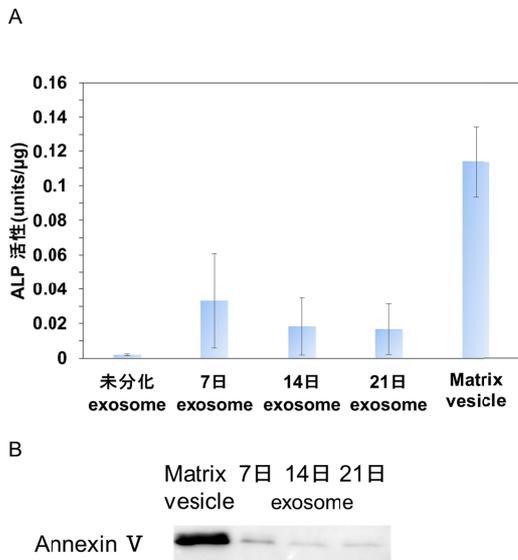


図 2 未分化および分化誘導 7, 14, 21 日後のエクソソーム、マトリックスベシクルの (A)ALP 活性, (B)Annexin V 発現

(3) 骨芽分化誘導 MSC へのエクソソームおよびマトリックスベシクルの添加
 ADSC を骨芽分化誘導培地にて培養する際に骨芽分化誘導 21 日目に単離したエクソソームもしくはマトリックスベシクルを添加し、石灰化への影響を評価した。石灰化結節をアリザリンレッドにて染色した結果を図 3 に示す。



図 3 未添加 (コントロール)、エクソソーム添加、マトリックスベシクル添加後の骨芽細胞誘導 MSC のアリザリンレッド染色

未添加群をコントロールとし、石灰化結節に結合した色素を溶出して吸光度を測定、各サンプルと比較したところ、エクソソーム添加群ではコントロールの 30% に抑制されたのに対し、マトリックスベシクル添加群では約 3 倍促進された。骨芽分化誘導 21 日目の同時期に単離したエクソソームとマトリックスベシクルは異なる機能を持つことが示唆された。

(4) レクチンアレイを用いたエクソソーム表面の糖鎖解析

細胞膜表面にはタンパク質や脂質が多数存在し、それらの多くは糖鎖と呼ばれる糖が鎖状につながった物質が結合している。エクソソーム膜上も多数の糖鎖で覆われているが、その構造特性に関する研究例は少ない。糖鎖は細胞が置かれている環境やがん化、分化の過程で変化することから、エクソソームの機能を明らかにするのに糖鎖解析は重要となる。本研究では、レクチンアレイを用いて未分化 MSC の細胞膜とエクソソームの表面糖鎖を解析、比較を行った。

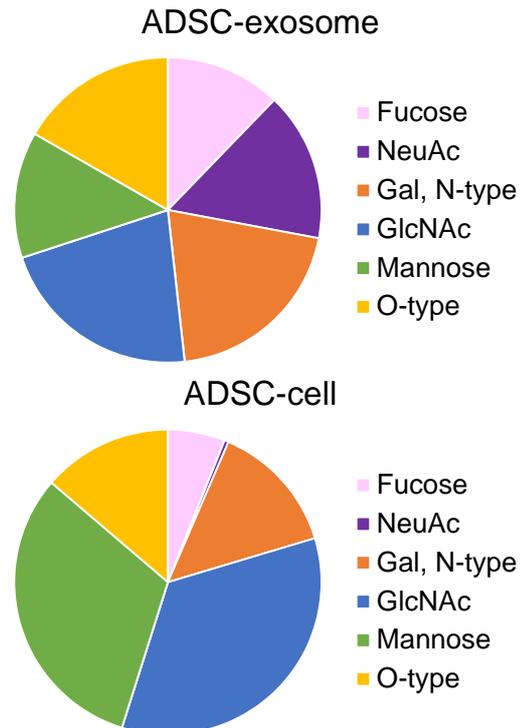


図 4 脂肪由来 MSC (ADSC) の exosome (上) および細胞膜 (下) の糖鎖プロファイル

ル Fucose: フコース、NeuAc: シアル酸、Gal, N-type: ガラクトース、N 結合型分枝構造、GlcNAc: N-アセチルグルコサミン、Mannose: マンノース、O-type: O 結合型

図 4 は脂肪由来の MSC のエクソソームと細胞膜の表面糖鎖を解析した結果を示している。フコース、シアル酸など大きくわけて 6つのカテゴリーに特異的に結合する 45 種類のレクチンが固定化されたアレイを用いてエクソソームをそのままの状態 で解析することができた。シアル酸認識レクチンとの結合性を比較すると、もとの細胞膜に比べ、約 40 倍エクソソームの方が高い信号強度を示した。そこで、シアル酸糖鎖を認識するレクチンの 1つであるシグレックを発現する細胞へのエクソソームの取り込みを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。エクソソームを細胞へ添加する前にシアル酸または抗シグレック抗体を添加した群に関してはエクソソームの細胞内取り込みが抑制されたことから、エクソソーム膜上のシアル酸が細胞内取り込みに関与していることが示唆された。骨芽細胞へ分化した MSC から得られたエクソソームやマトリックスベシクルと未分化 MSC のエクソソームを比較するといくつかのレクチンにおいて差が見られた。由来細胞の違いや分化に伴い、エクソソームの糖鎖構造も変化することが示唆された。

(5) まとめと今後の展望

MSC および骨芽分化誘導した MSC からエクソソームを単離した。また、骨芽分化後期 21 日目にエクソソーム様のマトリックスベシクルを回収したところ、エクソソームと異なる機能を示すことがわかった。また、エクソソーム表面糖鎖をレクチンアレイにて解析したところ、もとの細胞膜との違いや分化に伴う変化が確認できた。

骨芽分化誘導培地で MSC を培養する際にエクソソーム、マトリックスベシクルを添加するとそれぞれ石灰化を抑制、促進することがわかった。今後は骨吸収を担う破骨細胞への影響や、足場材料として我々の研究室で開発された多糖ナノゲルを用いてエクソソーム(マトリックスベシクル)を内包させ、骨欠損部へ埋め込んだ際に骨形成を促すかどうかなどを行う必要がある。また、本研究では未だ報告例の少ないエクソソーム表面糖鎖の網羅的な解析をレクチンアレイにて行った。様々な細胞間での表面糖鎖の解析やエクソソームに特異的な糖鎖の種類を特定することで、細胞との相互作用機構の解明や、超遠心法に代わる新たなエクソソーム単離方法の確立へとつながると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

A. Shimoda, K. Ueda, S. Nishiumi, N. Murata-Kamiya, S. Mukai, S. Sawada, T. Azuma, M. Hatakeyama, K. Akiyoshi, Exosome as nanocarriers for systemic delivery of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA, Scientific Reports, 6, 2016, 18346, 査読あり DOI: 10.1038/srep18346.

〔学会発表〕(計 6 件)

A. Shimoda, S. Mukai, S. Sawada, N. Murata-Kamiya, M. Hatakeyama, K. Akiyoshi, Isolation and Characterization of *Helicobacter pylori* CagA protein-containing exosome, ISEV 2015 Annual Meeting, April 23-26 (2015), Washington DC, USA

下田麻子、向井貞篤、澤田晋一、紙谷尚子、畠山昌則、秋吉一成、*Helicobacter pylori* CagA 含有 Exosome の単離と機能、第 31 回 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 2 日 - 7 月 3 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

下田麻子、植田幸嗣、西海信、紙谷尚子、向井貞篤、澤田晋一、東健、畠山昌則、秋吉一成、Exosome による *Helicobacter pylori* CagA タンパク質デリバリー、第 7 回日本 RNAi 研究会/第 2 回細胞外小胞学会、2015 年 8 月 26 日 - 8 月 28 日、グランドプリンスホテル広島(広島県・広島市)

下田麻子、澤田晋一、秋吉一成、骨芽細胞へ分化誘導した間葉系幹細胞由来 exosome の機能評価、第 8 回日本 RNAi 研究会/第 3 回細胞外小胞学会、2016 年 8 月 31 日 - 9 月 2 日、グランドプリンスホテル広島(広島県・広島市)

A. Shimoda, K. Ueda, S. Nishiumi, N. Murata-Kamiya, S. Mukai, S. Sawada, T. Azuma, M. Hatakeyama, K. Akiyoshi, *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is delivered by exosome through the bloodstream, ASEM 2016, October 20-24 (2016), Pacific Grove (USA)

下田麻子、秋吉一成、間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた骨再生システムの構築、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年 3 月 7 日 - 3 月 9 日、仙台国際センター(宮城県・仙台市)

〔図書〕(計 3 件)

澤田晋一、下田麻子、佐藤祐子、瀬尾尚宏、珠玖洋、秋吉一成、日本膜学会、膜(membrane) 特集 生体膜シンポジウム「細胞外ベシクル・エクソソーム研究の最前線」、2015、79 (254-259)

下田麻子、秋吉一成、ニューサイエンス社、細胞、特集 エクソソームと疾患 - そして臨

床応用へー、2016、52 (9-12)

下田麻子、秋吉一成、(株)エヌ・ティー・エス、パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線～シグナル伝達からがん、免疫、神経疾患との関わり、創薬利用まで～、2017、314 (53-59)

〔その他〕
ホームページ等

JST-ERATO 秋吉バイオナノトランスポータープロジェクトホームページ
<http://www.jst.go.jp/erato/akiyoshi/>

雑誌論文 1 に関して：
・ JST プレスリリース
(<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20160107/>)
・ 日経新聞 2016.01.12
・ 科学新聞 2016.01.22
・ 京都新聞 2016.01.26

6 . 研究組織

(1)研究代表者

下田 麻子 (SHIMODA, Asako)
京都大学・大学院工学研究科・特定研究員
研究者番号： 90712042

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし