

令和元年5月23日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06756

研究課題名（和文）幹細胞が分泌するエクソソームを用いた新たな骨再生治療法の開発

研究課題名（英文）Novel bone regeneration using exosomes derived from mesenchymal stem cells.

研究代表者

坂口 晃平（Sakaguchi, Kohei）

名古屋大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70801455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で、細胞外膜小胞（エクソソーム）の超遠心法を用いた効率的回収法および、最適な保存条件の検証をおこない明らかにした。骨髄由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームは幹細胞や血管内皮細胞の細胞内に取り込まれて遊走能や血管新生能を亢進することを明らかにし、ラット頭蓋骨骨欠損モデルへの投与実験により、骨再生能を有することが明らかとなった。また、エクソソーム中には多数のmiRNAが含まれていることがわかり、骨再生に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯を失った患者の咬合回復治療のひとつとして歯槽骨にチタン製人工歯根を埋入する歯科インプラント治療が行われる。しかし、先天的あるいは後天的に歯槽骨が著しく吸収、欠損した症例では人工歯根埋入に必要な骨量が不足する。歯槽骨を造成すべく自家骨移植が行われているがドナー部位の手術が必要で侵襲が大きい。幹細胞移植は施設限定的で患者限定的な治療法である。近年、幹細胞が分泌する細胞外膜小胞（エクソソーム）などの液性因子による組織再生効果が注目されている。本研究でエクソソームの骨再生能を明らかにすることで、幹細胞による骨再生メカニズムの解明および新たな治療薬の開発につながると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, the effective collection method using ultracentrifugation of exosomes and the suitable condition for the preservation of them were inspected and found. Exosomes derived from mesenchymal stem cells were taken in stem cells and endothelial cells and promoted migration and tube formation. In rat calvarial bone defect model, they promoted bone formation. Many kinds of miRNAs were included in the the exosomes.

研究分野：再生医療

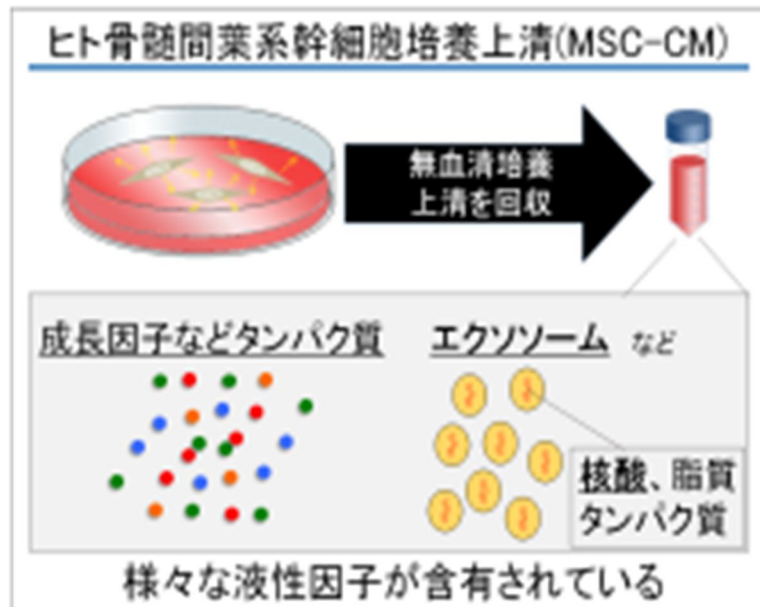
キーワード：骨再生 幹細胞 細胞外膜小胞 エクソソーム 培養上清 パラクライン効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

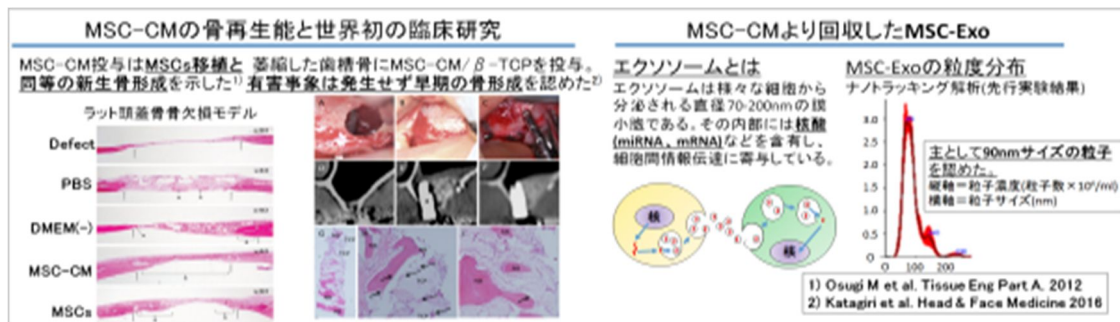
1. 研究開始当初の背景

(1) 歯を喪失した患者が咀嚼障害や審美障害を改善すべく人工歯根を歯槽骨に埋入する歯科インプラント治療を希望するケースは少なくない。しかし、人工歯根埋入のための骨量が不足している症例では歯槽骨の造成が必要となる。多くの施設で幹細胞移植による骨再生が試みられてきたが施設限定的、患者限定的治療法であると考えられる。

(2) 近年、移植された幹細胞が分泌する液性因子が骨再生に大きく寄与していることが明らかとなってきた。研究代表者が所属する研究グループではそれに着目し骨髄間葉系幹細胞(MSCs)の培養上清(MSC-CM)が良好な骨・歯周組織再生能を有することを示し(Osugi, et al. *Tissue Eng Part A*. 2012)、世界に先駆けて臨床研究を行ってきた(Katagiri, et al. *Head Face Med*. 2016)。しかし、MSC-CM中の有効成分の解明は十分におこなわれていない。研究代表者はMSC-CM中にMSCsが分泌するエクソソーム(MSC-Exo)が含有されていることを予備実験で確認した。エクソソームは細胞間情報伝達に寄与する膜小胞と考えられている。MSC-Exoが骨再生における有効成分である可能性が考えられた。



MSC-CMの骨再生能と世界初の臨床研究



2. 研究の目的

(1) MSC-Exoの回収方法と保存方法:

超遠心法の条件を検討し、高い純度、高い回収率が得られるプロトコルを作成する。また、回収したMSC-Exoの保存条件を検討し、生化学的機能が温存される保存のプロトコルを作成する。

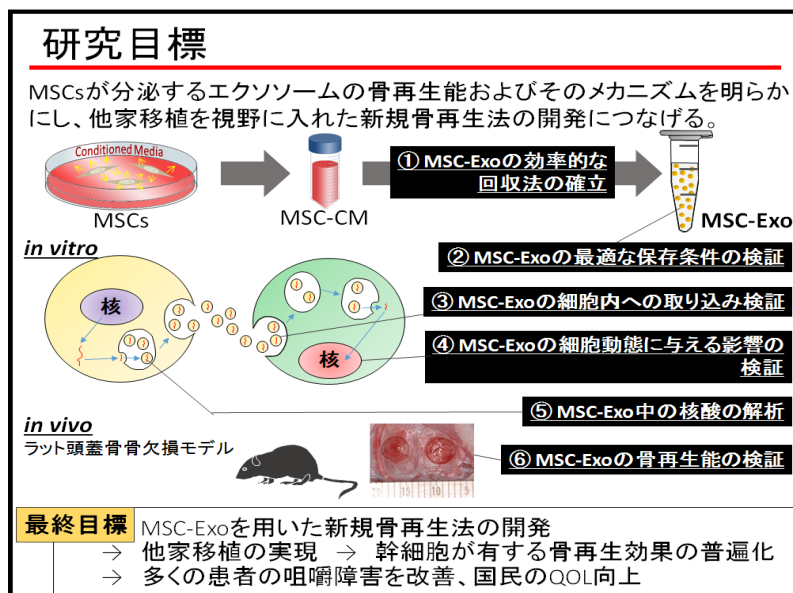
(2) MSC-Exoの骨再生能:

MSC-Exoをラット頭蓋骨骨欠損モデルに投与し骨再生能を評価する。さらにそのメカニズムを免疫組織化学的手法やin vitro細胞培養系の実験で検証する。

3. 研究の方法

(1)MSC-Exo の回収効率を上げるために、超遠心法を用いて複数の条件で回収を行い回収量や純度を評価し、回収の最適条件を検証する。

(2)回収した MSC-Exo を PBS に懸濁して、複数の温度環境下、複数の保存期間を設定して保存を行う。保存していた MSC-Exo をラット MSCs に投与して培養し、細胞増殖能に与える影響の変化を検証する。



(3)細胞膜標識薬(PKH 色素)を培地に添加して MSC-Exo を培養し、MSC-Exo を蛍光標識する。それをラットまたはヒトの MSCs や血管内皮細胞に投与して培養し、蛍光共焦点顕微鏡を用いて観察し、細胞内へ取り込まれる様子を確認する。

(4)MSC-Exo を幹細胞や血管内皮細胞に投与して細胞動態に与える影響を検証する。

(5)MSC-Exo から RNA を回収して microarray を行い、miRNA 発現プロファイリングを行う。

(6)MSC-Exo をラット頭蓋骨欠損モデルに投与し X 線学的、組織学的に骨再生能を評価する。

4. 研究成果

(1)ヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソーム (MSC-Exo) の効率的回収法の検証：
超遠心法によるエクソソーム回収に関して、超遠心の回転数や遠心時間に関して検討をおこなった。100000G 以上であれば、2 倍、3 倍と回転数をあげても回収されるエクソソーム量に有意な差はなかった。また、遠心時間に関しては 60 分とそれ以上で有意な差はなかった。

(2)MSC-Exo の最適保存条件の検証：
回収した MSC-Exo を -80 で凍結保存したところ、MSCs に対する細胞増殖能に関して凍結 4 週間で有意な低下は認めなかった。

(3)MSC-Exo の細胞内への取り込み試験：
MSC-Exo を PKH で標識して骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) を培養した。それぞれの細胞質内に PKH の蛍光が観察され、MSC-Exo が細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。

(4)MSC-Exo の細胞動態に与える影響の検証：
MSC-Exo をラット MSCs に投与したところ、細胞増殖能、遊走能が亢進した。また、MSC-Exo を HUVECs に投与したところ、管腔形成能が亢進した。

(5)MSC-Exo 中の核酸の解析：
Exosome フリーな培地で培養した MSCs の培養上清から MSC-Exo を超遠心法で回収した。MSC-Exo から RNA を回収して microarray を行い、miRNA 発現プロファイリングを行った。MSC-Exo 中には複数の miRNA が含まれていることが明らかとなった。

(6)MSC-Exo の骨再生能の検証：
Wistar/ST ラット 8 週齢雄にトレフィンバーを用いて頭蓋骨欠損を作成した。MSC-Exo をアテロコラーゲンスポンジ(テルダーミス)を足場として欠損作成部位に投与した。対照群には PBS を足場に含ませて投与した PBS 群、何も投与しない Defect 群を設定した。投与後 4 週にて検体を回収し、 μ CT を撮影し X 線学的に、組織切片を作成して組織学的に骨形成量を評価した。MSC-Exo 投与群は Defect 群および PBS 群と比較して新生骨形成率が増大した。また、川本法により凍結切片を作成し、血管新生能に関して免疫組織化学的に評価した。MSC-Exo 投与群では対照群と比較して CD31 陽性細胞の遊走、管腔形成が多かった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Katagiri W, Watanabe J, Toyama N, Osugi M, Sakaguchi K, Hibi H.
Clinical Study of Bone Regeneration by Conditioned Medium From Mesenchymal Stem Cells After Maxillary Sinus Floor Elevation. *Implant Dent*. 査読有, 2017 Aug;26(4):607-612.
doi: 10.1097/ID.0000000000000618.

Katagiri W, Kawai T, Osugi M, Sugimura-Wakayama Y, Sakaguchi K, Kojima T, Kobayashi T. Angiogenesis in newly regenerated bone by secretomes of human mesenchymal stem cells. *Maxillofac Plast Reconstr Surg*. 査読有, 2017 Mar 25;39(1):8.
doi: 10.1186/s40902-017-0106-4.

〔学会発表〕(計3件)

坂口 晃平、酒井 陽、若山 有紀子、鶴田 剛士、渡邊 純奈、片桐 渉、日比 英晴、骨髄間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新規骨再生法、第63回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会、2018
優秀ポスター発表賞(ゴールドリボン賞)を受賞

Kohei Sakaguchi, Kiyoshi Sakai, Wataru Katagiri, Yukiko Sugimura-Wakayama, Takeshi Tsuruta, Hideharu Hibi, Exosomes derived from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration, the 96th General Session of the IADR, 2018

坂口 晃平、酒井 陽、片桐 渉、若山 有紀子、鶴田 剛士、渡邊 純奈、日比 英晴、骨髄由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームによる新たな骨再生、第17回日本再生医療学会総会、2018

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。