

令和 3 年 2 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17214

研究課題名（和文）間葉系幹細胞分泌エクソソームの骨分化・骨再生への役割

研究課題名（英文）The role of exosomes derived from mesenchymal stem cells in bone formation and regeneration

研究代表者

河井 洋祐 (KAWAI, Yosuke)

長崎大学・病院（歯学系）・助教

研究者番号：50423629

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄間葉系幹細胞由来のエクソソームを利用して骨再生、骨分化への影響を調べた。まずラット骨髄由来間葉系幹細胞を培養してエクソソームを回収した。回収したエクソソームの特性解析を行ったところ、間葉系幹細胞に骨分化誘導を行った培地からのエクソソームは骨分化を促進するmRNAおよびmicroRNAの発現が上昇しており、間葉系幹細胞に添加すると無添加群に比べて骨芽細胞分化を有意に促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨粗鬆症治療薬としてビスフォスフォネート製剤の使用が増加している。この薬剤を内服している患者さんで歯科治療で抜歯などの外科的侵襲を加えると、顎骨壊死が引き起こされることが報告されている。高齢化に伴い顎骨壊死の患者数は増加傾向にあり、依然として確立された治療法は存在しない。この研究成果では細胞レベルでは骨髄由来間葉系幹細胞からのエクソソームは骨芽細胞の分化を促進する作用が示唆されており動物実験でこのことが証明できれば、顎骨壊死の発生機序の解明、副作用の回避を実現できる可能性が示唆され、学術的意義、社会的意義は大きいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes were used to examine the effects on bone regeneration and bone differentiation. First, rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells were cultured to isolate exosomes. Characterization of the isolated exosomes showed that the exosomes from the culture medium in which mesenchymal stem cells were induced for bone differentiation had increased expression of mRNA and microRNA that promotes bone differentiation, and when added to mesenchymal stem cells, it was found to promote osteoblast differentiation significantly compared with the non-addition group.

研究分野：口腔外科

キーワード：エクソソーム 間葉系幹細胞 骨再生

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

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は閉経によるホルモンバランスの不均衡、ステロイドの長期内服により引き起こされる。また癌による骨転移においても局所的に骨吸収が促進する。原因は骨芽細胞による骨形成、破骨細胞による骨吸収のバランスが崩れることにある。骨粗鬆症、骨転移において骨吸収抑制のために現在、ビスフォスフォネート製剤や抗 RANKL 抗体 (デノスマブ) が治療薬として使用されている。しかし、顎骨壊死や非定型大腿骨骨折などの副作用が問題となっている。これらは、咀嚼困難、歩行困難をまねき、著しく QOL (生活の質) を低下させる。骨形成を促進する薬剤としては副甲状腺ホルモン (テリパラチド)、活性型ビタミン D があるが骨形成を大きく促進するほどではない。近年、間葉系幹細胞を利用した組織再生療法が注目を浴びている。皮膚の創傷治癒 (Fujita, et al. 2015)、骨再生 (Bruder, et al. 1998) など組織損傷への応用や、GVHD に対してヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (テムセル^R) が薬剤として承認された。このように間葉系幹細胞は再生医療分野で利用され効果をあげている。しかし、実は移植した細胞そのものは定着しておらず、細胞から分泌されたエクソソームに治療効果があることが実験で確認された (Lai RC, et al. 2010, Bruno S, et al. 2009)。エクソソームとは細胞から分泌される直径が約 100nm の脂質二重膜小胞でその内部にはタンパク質や microRNA、mRNA などの核酸を内包している。エクソソーム発見から 30 年近く経った今、新たなステージに突入している。発見当初は、細胞内の不要物を詰め込んで細胞外に排出するゴミ袋の役目と推測されていたが、近年新たにエクソソームが細胞間ないし、個体間で受け渡すことで細胞間コミュニケーションツールとして働くことが見いだされた。つまり、細胞外へ放出されたエクソソームは遠く離れた細胞に取り込まれ、内包されている核酸あるいはタンパク質により、その細胞内部の環境に変化をもたらす。またエクソソームは細胞指向性があり、産生細胞の種類により取り込む細胞の種類が決まっているとの報告もある。このエクソソームを利用して新たな治療法が開発されることにより、顎骨壊死、非定型大腿骨骨折などの副作用を回避できる可能性がある。

2. 研究の目的

近年、細胞が分泌するエクソソーム (細胞外小胞 exosome) に注目が集まっている。エクソソーム内部には microRNA (miRNA)、mRNA、DNA、蛋白質などが内包されており、あらゆる細胞種でエクソソームの分泌が確認されている。また再生医療では骨髄由来間葉系幹細胞あるいは脂肪組織由来間葉系幹細胞が広く用いられており、その特性として骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化、また創傷治癒にも貢献し、組織再生に有用との報告が多くなされている。本研究では、この多様な働きを持つ間葉系幹細胞が分泌するエクソソームに着目して、骨粗鬆症への新たな治療戦略としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 骨髄由来/脂肪細胞由来間葉系幹細胞分泌エクソソーム (BMMSC-exo/ASC-exo) における microRNA 発現解析

骨髄 MSC (BMMSC) の分離・培養: 野生型 C57BL6 (8 週齢) の大腿骨・脛骨より採取した骨髄をフラッシュアウトし、遠心操作により骨髄細胞を採取する。次に、CD45 陰性の細胞群を磁気ビーズにて抽出する。抽出は Mouse Mesenchymal Stem/progenitor Cell Enrichment Kit (STEMCELL 社) にて簡便にできる。抽出した細胞は接着培養 (10%FBS 含有 DMEM 培地) を行い、BMMSC の精製と細胞数確保のため 3 継代し実験に使用する。マウス骨髄 MSC の特性についてはその表現型 (positive; CD29, Sca-1/negative; CD11b, CD45) の発現を Flow cytometry にて解析しておく。

脂肪組織 MSC (ASC) の分離・培養: 野生型 C57BL6 (8 週齢) の鼠径部より脂肪組織を採取し、メスにて裁断し 0.2% コラゲナーゼで 37℃、1 時間振盪する。その後、セルストレーナーで細胞を filtration して ASC を抽出する。抽出した細胞は接着培養 (10%FBS 含有 DMEM 培地) を行い、ASC の精製と細胞数確保のため 3 継代し実験に使用する。マウス骨髄 MSC の特性についてはその表現型 (positive; CD34, CD105 /negative; CD31, CD45) の発現を Flow cytometry にて解析しておく。

BMMSC-exo/ASC-exo の回収と miRNA 発現解析: BMMSC-exo/ASC-exo の回収は 3 継代後、骨分化培地 (ascorbic-acid, -Glycerophosphate, dexamethasone) で分化させ培養上清を回収し、International Society of Extracellular Vesicle (ISEV) が推奨する超遠心法にて行う。回収するエクソソームは分化前、分化途中、分化後期の 3 ポイントで行う。分化の程度は ALP activity を経時的に計測する。骨分化培地を使用する前のエクソソームを分化前、ALP activity がピークのもの、ピークより半減した時点、ピークより半減した時点、ピークより半減した時点を分化後期とする。まず回収した培養上清を超遠心 (100,000g / 70 分間) し、チューブ下層液体を回収する。続いて、0.22um フィルターにて細胞片や微細な浮遊物を除いた上で、再度超遠心を 30% sucrose-D₂O 溶液を用いて行い、上清吸引後に PBS に懸濁して BMMSC-exo/ASC-exo を回収する。通常、1x10⁷ 個の細胞の培養上清から 2-4x10⁹ 個のエクソソームが回収できる。回収後は、エクソソーム特異的 surface antigen (CD9, CD63, CD81) の発現確認を Flow cytometry あるいはウエスタンブロット法で行う。また、透過型電子顕微鏡で形態の観察やナノ粒子解析装置 (NanoSight) で粒径の解析なども適宜行う。

続いて、回収した BMMSC-exo/ASC-exo から miRNA を抽出・精製して miRNA の発現プロファイルを解析する。miRNA の抽出は mirVana miRNA Isolation Kit (Ambion) を用いて行い、miRNA

の発現プロファイルを qPCR array にて網羅的に解析する。

(2) 骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) の確立

C57BL マウス (8 週齢) を用いて SHAM (卵巣摘出偽手術) 群、OVX (卵巣摘出) 群を作製する。術後 2 週間で μ CT による骨密度、骨量解析を行い、OVX 施術マウスでいずれも減少がみられることを確認する。

(3) 骨粗鬆症モデルマウス (OVX マウス) 由来 BMMSC のエクソソーム添加による機能解析

前述の方法で OVX-BMMSC を採取して培養 (10%FBS 含有 DMEM) を行う。24well plate に 5×10^4 cells/well で播種し 90% confluent に達したら、野生型 C57BL6 マウス (8 週齢) から回収した各分化段階 (分化前、分化途中、分化後期) での BMMSC-exo/ASC-exo をそれぞれ濃度を振って培地に添加する。エクソソームの取込は蛍光色素 PKH67 で標識を行い、蛍光顕微鏡にて観察する。BMMSC の骨芽細胞分化を time point を設定して real-time PCR で骨分化マーカー mRNA (Runx2, Osx, Col1a1, Ocn) の発現を、ウエスタンブロット法でタンパク発現 (Runx2, ALP, Ocn) を解析する。また ALP 活性、ALP 染色、Alizarin Red 染色においても分化の程度を観察する。最も骨分化を促進したエクソソームを用いて in vivo 実験に使用する。

(4) 骨粗鬆症モデルマウス (OVX) 頭蓋冠欠損モデルへの移植における機能解析

OVX マウス頭蓋冠欠損モデルによる骨再生への影響を評価する。評価は μ CT、組織染色 (H.E 染色、免疫染色など)、骨分化マーカーの発現 (リアルタイム PCR、ウエスタンブロット法) で行う。頭蓋冠欠損は径 5 mm の円形とし、エクソソームはコラーゲンスポンジ (KOKEN) に含浸させて移植を行う。移植後 4, 8 週のサンプルを使用する。エクソソームの投与量も変えて検討する。組織切片 (CD31 免疫染色)、 μ CT (造影) では血管新生の評価も行う。

(5) エクソソーム由来 miRNA の骨分化への機能解析

最も分化の促進したエクソソームの miRNA の発現プロファイルを qPCR array にて網羅的に解析した結果から発現上昇のみられた上位 3 つの miRNA (最低 2 倍以上) を選択する。選択された miRNA を強制発現用プラスミドベクターへ搭載し、OVX マウス BMMSC にエレクトロポレーションで遺伝子導入を行う。導入後、骨分化マーカー (Runx2, Col1a1, Ocn) の変化を real-time PCR、ウエスタンブロット法で検討する。

(6) miRNA 強制発現由来エクソソームの機能解析

BMMSC へ上位 3 つの中で最も骨分化を促進した miRNA を搭載したプラスミドをエレクトロポレーションで導入し、培養上清からエクソソームを回収する。遺伝子導入していない BMMSC からエクソソームを回収してそれぞれ miRNA を抽出する。Real-time PCR で内包されている発現量を検討し、上昇がみられれば、OVX マウス BMMSC への添加実験を行う。評価は骨分化マーカー (Runx2, Col1a1, Ocn)、の変化を real-time PCR、ウエスタンブロット法で検討する。

4. 研究成果

マウス骨髄由来間葉系幹細胞の培養、増殖が困難であったため、ラットへ動物種を変更して実験を実施した。

(1) エクソソームの抽出

6~8 週齢のラット大腿骨から骨髄由来間葉系幹細胞を採取して培養を行い、その上清を回収して超遠心法でエクソソームの抽出を試みた。回収したエクソソームを透過型電子顕微鏡、およびウエスタンブロット法で CD63 の発現を確認した。

(2) エクソソームの特性解析

ラット骨髄由来間葉系幹細胞 (BMMSC) の骨分化誘導におけるエクソソームの特性解析

BMMSC に rhBMP-2 を添加し骨分化誘導を行い、経時的に細胞数、ALP 活性、Runx2, ALP mRNA の発現を計測した。通常培養と比較して細胞数はやや抑制されるものの 8 日後には同数程度であった。ALP 活性は通常培養と分化誘導培地の比でみると 4 日目以降は 4 倍程度 (図 1) となりそれ以降はほぼ一定となった。また Runx2, ALP mRNA の発現においても 4 日目に最も発現差が生じた (図 2)。そこで分化誘導 4 日目の BMMSC の特性に着目して、その後無血清培地で 2 日間培養してエクソソームを回収しその特性と機能を評価することとした。

まず、通常培養と分化誘導後の BMMSC のエクソソーム内に存在する Runx2, Alp, Bmp2, Ocn mRNA の発現を検討した。いずれにおいても分化誘導後の BMMSC-exo に発現上昇がみられ Alp, Bmp2, Ocn mRNA においては有意差を認めた。

次にエクソソーム内に含有する microRNA の網羅的解析を行った。通常培養と分化誘導後の BMMSC-exo における microRNA の発現量の差が大きい microRNA として 2 倍以上の発現上昇が 5

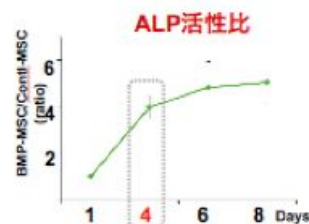


図1 rhBMP-2添加後のALP活性比

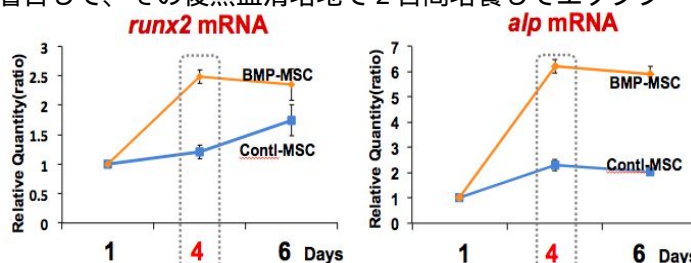


図2 rhBMP-2添加後のrunx2,alp mRNA発現変化

種類、1/2以下の発現低下が5種類認められた。

エクソソーム添加培養による骨芽細胞分化誘導

PKH26(赤色蛍光)標識したエクソソームの細胞への取込を観察した。BMMSC添加後12時間以降でエクソソームの取込が観察された。(図3)

次にBMMSCにエクソソーム添加後5日目のBmp2, Alp mRNAの発現を解析した。エクソソーム無添加群、通常培養からのエクソソームを添加した群、分化誘導4日目からのエクソソームを添加した群で比較を行った。無添加群に対してエクソソーム添加群は有意な発現上昇がみられた。また、通常培養からのエクソソーム添加群と分化誘導後4日目のエクソソーム添加群の比較においても分化誘導後4日目のエクソソーム添加群で有意な発現上昇がみられた。

エクソソームの安定した回収およびその後の様々な解析を実施する上で実験手技の安定に非常に期間を費やしたため、動物への移植実験は現在進行中である。

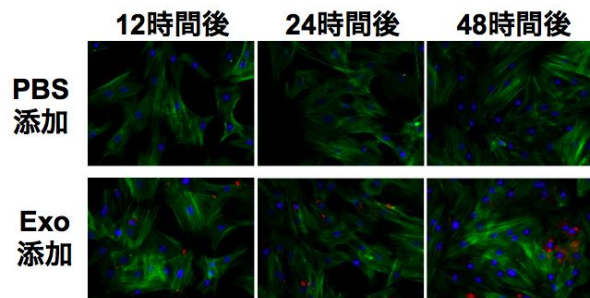


図3 エクソソームの取込(エクソソーム:赤色)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名:朝比奈 泉
ローマ字氏名:ASAHINA, Izumi

研究協力者氏名:小守 壽文
ローマ字氏名:KOMORI, Toshihisa

研究協力者氏名:住田 吉慶
ローマ字氏名:SUMITA, Yoshinori

研究協力者氏名:杉原 考輝
ローマ字氏名:SUGIHARA, Takaki

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。