

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K19050

研究課題名（和文）低酸素環境で刺激された幹細胞由来エクソソームを用いた新たな骨再生

研究課題名（英文）New Bone regeneration using exosomes derived from stem cells stimulated in hypoxia

研究代表者

坂口 晃平（Sakaguchi, Kohei）

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70801455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：低酸素刺激は骨髄間葉系幹細胞が分泌するエクソソームの量と性質を変化させることが明らかとなった。低酸素条件で回収されたエクソソームは、内在性幹細胞の増殖、遊走、骨分化を亢進し血管新生作用を強く発揮した。さらに抗炎症・組織治癒促進に寄与するマクロファージを誘導することで、骨再生を促進する可能性が示唆された。同エクソソーム中には多くのmiRNAが含まれており、それらの中に有効成分がある可能性が考えられ同定解析をすすめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソーム研究がすすむ癌研究の領域では低酸素という過酷な環境で培養することで癌細胞が分泌する液性因子の性状が変化するという報告がある。しかし、間葉系幹細胞が分泌するエクソソームに低酸素環境が与える影響を十分に検証した報告は未だない。幹細胞の高い再生能をひきだす低酸素条件が明らかになれば、現在複数の施設で行われている幹細胞移植の治療効果の水準を引き上げられる可能性がある。骨再生を促進させるエクソソーム中のmiRNAを同定できれば幹細胞による骨再生機序の一端が明らかとなり、将来の幹細胞移植に代わる普遍的な治療法、創薬へつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：It has been revealed that hypoxic stimulation alters the quantity and characteristics of exosomes secreted by bone marrow mesenchymal stem cells. Exosomes collected under hypoxic conditions significantly promoted the proliferation, migration, and osteogenic differentiation of endogenous stem cells, as well as exhibited strong angiogenic effects. Furthermore, it was suggested that these exosomes might enhance bone regeneration by inducing macrophages that contribute to anti-inflammatory and tissue healing processes. These exosomes contain many miRNAs, and it is possible that the active components are among them, prompting further identification and analysis.

研究分野：再生医療

キーワード：骨再生 間葉系幹細胞 サイトカイン 細胞外小胞 エクソソーム 低酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

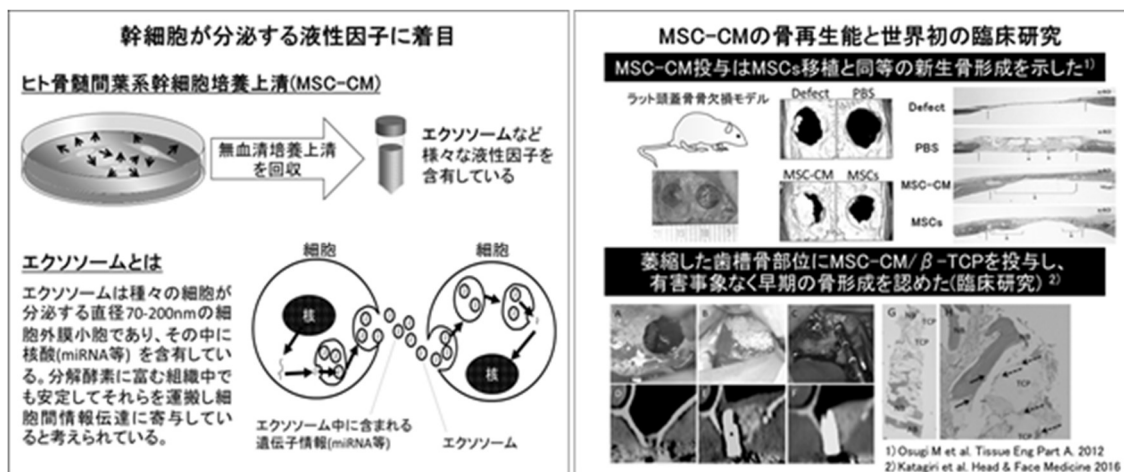
1. 研究開始当初の背景

(1) 虫歯や歯周病、外傷などで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広く行われるがドナー部位の手術が必要で侵襲が大きい。そこで自家骨移植にかわる新たな骨再生療法の開発が望まれている。

(2) われわれの研究室を含め複数の施設で患者の腸骨より採取した骨髄間葉系幹細胞 (MSCs) を患者に移植する臨床研究が行われ良好な治療成績が報告されてきた。しかし、安全性の担保や高い品質管理が必要で膨大なコストがかかることなどが課題で、幹細胞移植は十分に普及していない。また、移植された細胞は移植部位に長く生存していないことや、移植された細胞が分泌する様々な液性因子が再生に大きく寄与していることが近年明らかとなってきた。

(3) 申請者らは幹細胞が分泌する液性因子に着目した。ヒト MSCs の無血清培養上清(MSC-CM)をラット頭蓋骨欠損モデルや歯周組織欠損モデルに投与し、MSC-CM が良好な骨・歯周組織再生能を有することを明らかにした。とくに骨再生に関しては幹細胞移植と同等の再生効果であった。さらに当院生命倫理審査委員会の承認を得て世界で初めて MSC-CM を用いた臨床研究を行い良好な治療成績をおさめている。MSC-CM はエクソソームなどの液性因子群からなる混合物であるが、有効成分の同定および作用機序の解明には至っておらず、製剤化にむけてこれらの解明が求められている。

(4) 癌研究の領域において細胞にとって過酷な環境、とくに低酸素条件下で細胞を培養すると細胞が分泌する液性因子組成が変化し、細胞増殖能などが高まる可能性が近年報告されている。MSCs 分泌するエクソソーム(MSCs-Exo)においても低酸素条件下で培養回収した場合、組織再生効果が高まるのではないかと仮説をたてた。



2. 研究の目的

(1) 低酸素培養条件により再生効果が高まる機序をあきらかにし、MSCs-Exo の再生効果が最も高まる低酸素培養条件を探索する。

(2) 骨再生促進に寄与する miRNA を探索する。

3. 研究の方法

(1) 複数の低酸素培養条件で MSCs-Exo を回収し細胞あたりの MSCs-Exo 分泌量の変化を比較した。エクソソーム量は Qubit® アッセイキットを用いてタンパク質量を測定した。ナノトラッキングアッセイで粒径分布と純度を測定評価した。



(2) 21%酸素条件と1%酸素条件で MSCs を培養しそこから回収した MSCs-Exo 内の核酸の相違を検証すべく、マイクロアレイをして miRNA 発現プロファイリングを行った。

(3) 複数の低酸素培養条件を設定して MSCs-Exo を回収し、細胞に投与して MSCs-Exo の細胞動態に与える影響を比較した。MSCs-Exo をヒトまたはラットの MSCs に投与して、細胞内への取り

込み効率、幹細胞の遊走や増殖に与える影響を調べた。細胞への取り込み効率に関しては、MSCs-Exo を蛍光色素 PKH26 で標識して細胞に投与し共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Transwell chamber migration assay で細胞遊走能を評価した。WST assay で増殖能を評価した。また RNA を回収し Realtime RT-PCR を行い骨形成関連遺伝子、血管新生関連遺伝子の発現を評価した。MSCs-Exo をヒト臍帯静脈内皮細胞に投与して、血管新生能に与える影響を調べた。Tube formation assay を行い、形成された管腔の長さや分岐の数を計測して血管新生能を評価した。

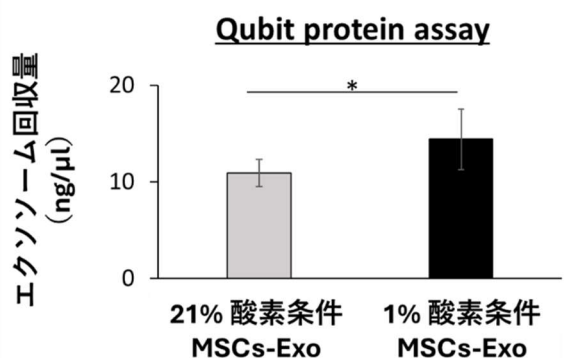
(4) 複数の低酸素培養条件を設定して MSCs-Exo を回収し、ラット頭蓋骨骨欠損モデルへ投与して骨再生能を比較した。

Wistar/ST ラット 8 週齢雄にトレフィンバーを用いて頭蓋骨骨欠損を作成し MSCs-Exo をアテロコラーゲンスポンジ(テルダーミス®)に含浸させて欠損作成部位に投与した。対照群には PBS を足場を含浸させて投与する。投与後 8 週にて検体を回収し評価した。μCT 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。川本法により凍結切片を作成し、骨再生機序に関して免疫組織化学的に評価した。血管内皮細胞のマーカー CD31、ペリサイトのマーカー (NG2)、M2 マクロファージのマーカー (CD163) それぞれの抗体を用いて、血管新生、マクロファージの動態を評価した。

4. 研究成果

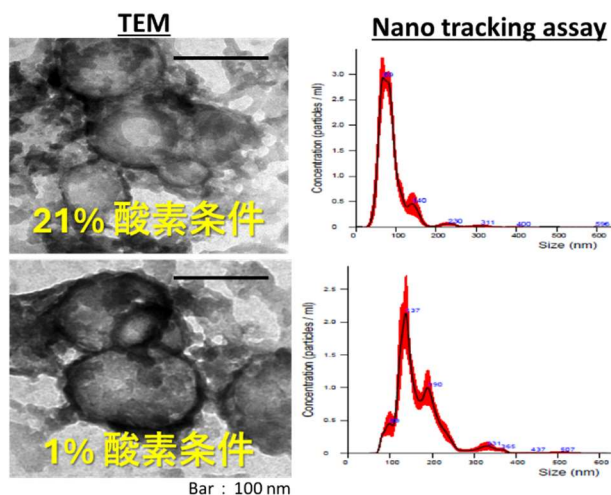
(1) 低酸素で刺激された幹細胞由来のエクソソーム

低酸素が MSCs-Exo へあたえる影響を評価した。21%と 1%の酸素濃度で培養した MSCs からエクソソームを回収したところ、1%で培養した場合の方が有意に回収されるタンパク質量 (エクソソーム量) が多かった。2%酸素や5%酸素の条件も検討したが、1%酸素条件と比べ回収されるタンパク質量 (エクソソーム量) は少なかった。1%で培養した場合、MSCs-Exo は透過型電子顕微鏡で直径 100nm の大きな球体として観察された。ナノトラッキングアッセイを行ったところ、1%条件の方が 21%酸素条件と比べて大きな粒径にピークをむかえる分布を示した。これらの結果から、低酸素で培養した場合、大きな粒径の小胞が分泌されるようになり、分泌量も増加することが明らかとなった。



(2) 低酸素刺激によるエクソソーム中に核酸におよぼす影響

MSCs-Exo 中に含まれる核酸へ低酸素がおよぼす影響を検証した。21%または 1%の酸素条件で培養回収した MSCs-Exo から RNA を抽出しマイクロアレイを行ったところ、小胞内に含有している核酸のプロファイリングが異なっていた。血管新生に対する効果が報告されている miRNA が含まれている一方で、役割が未知な miRNA も多数認められた。



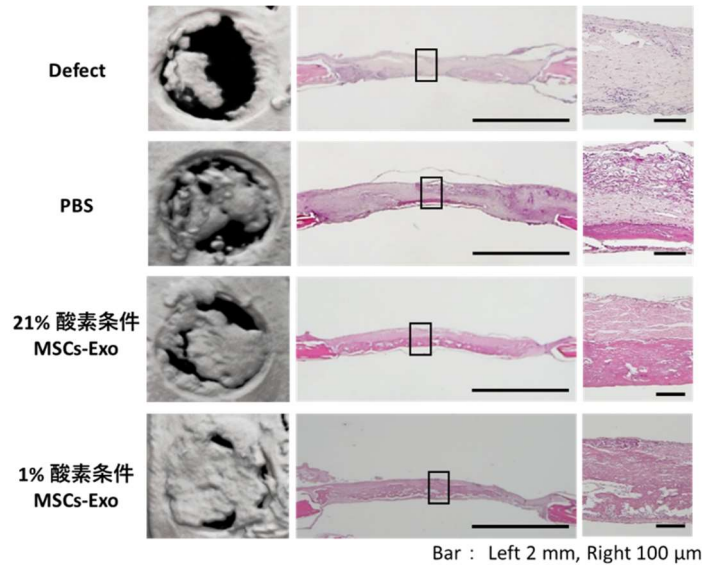
(3) 低酸素刺激エクソソームが細胞動態にあたえる影響

低酸素条件の MSCs-Exo が細胞動態にあたえる影響を検証した。1%と 21%酸素条件で回収した MSCs-Exo を PKH26 で標識しヒト MSCs、ラットの MSCs に投与したが、取り込み効率に有意な差はみられなかった。Transwell migration assay を行い細胞遊走能に与える影響を調べた。21%酸素濃度の場合と比べて、1%酸素濃度の MSCs-Exo の方がラット MSCs およびヒト MSCs の遊走細胞数が多かった。WST assay を行い細胞増殖能を評価したところ、21%酸素濃度の場合と比べて、1%酸素濃度の MSCs-Exo の方がラット MSCs およびヒト MSCs の細胞増殖能を促進した。Tube formation assay では 21%酸素濃度の場合と比べて、1%酸素濃度の MSCs-Exo の方が HUVECs の管腔形成が亢進し、分岐部の数が増加した。2%酸素や 5%酸素の条件も検討したが、1%酸素条件と比べヒト MSCs およびラット MSCs の細胞遊走、増殖能が低く、HUVEC の管腔形成能が低い結果であった。1%酸素条件の MSCs-Exo をラット間葉系幹細胞に投与したところ 21%酸素条件と比

べて *Runx2*、*Osteocalcin*、*Vegf*、*Angiogenin 1* の発現が上昇した。

(4) 低酸素刺激エクソソームが骨再生におよぼす影響

1%酸素濃度および 21%酸素濃度の MSCs-Exo をラット頭蓋骨骨欠損モデルに投与して骨再生能を比較した。Wistar/ST ラット 8 週齢雄にトレフィンバーを用いて直径 5mm の頭蓋骨骨欠損を作成し、アテロコラーゲンスポンジ(テルダームス)を足場としてエクソソームを欠損作成部位に投与した。投与後 4 週または 8 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。得られた μ CT 画像から新生骨形成率を算出したところ、投与後 4 週、8 週いずれにおいても 1%酸素濃度条件の MSCs-Exo の方が新生骨形成率がおおきかった。



2%酸素や 5%酸素の条件も検討したが、1%酸素条件と比べ新生骨形成率が低かった。また、組織学的には 1%酸素濃度条件の群の方が、成熟した骨形成をみとめられ、Von Kossa 染色で石灰化面積がおおきかった。いずれの群においても炎症性細胞浸潤はみられなかった。また、欠損断端において、1%酸素濃度条件では血管内皮のマーカー CD31 による管腔構造をみとめその周囲近傍にペリサイトマーカー NG2 の発現をみとめた。これは比較的成熟した血管が構築されている可能性を示唆するものであった。低酸素条件下で培養された間葉系幹細胞から分泌されたエクソソームは血管新生をうながし、骨再生を促進する可能性が示唆された。また、欠損断端において CD163 陽性マクロファージの集積をみとめた。CD163 陽性マクロファージは抗炎症効果を発揮するマクロファージのサブタイプ M2 として考えられており、同エクソソーム、その中に含有されている miRNA などの核酸は抗炎症マクロファージを誘導する作用を有している可能性が考えられた。低酸素刺激が組織再生、修復に有利な環境を整備する因子の生成分泌を誘導する作用がある可能性が示唆された。

低酸素刺激は骨髄間葉系幹細胞が分泌するエクソソームの量と性質を変化させることが明らかとなった。低酸素条件で回収されたエクソソームは、内在性幹細胞の増殖、遊走、骨分化を亢進し血管新生作用を強く発揮した。さらに抗炎症・組織治癒促進に寄与するマクロファージを誘導することで、骨再生を促進する可能性が示唆された。同エクソソーム中には多くの miRNA が含まれており、それらの中に有効成分がある可能性が考えられ同定解析をすすめている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakaguchi K, Taguchi N, Kobayashi R, Taguchi K, Okada K, Kinoshita F, Hibi H	4. 巻 49
2. 論文標題 Immediate curative effects of exercise therapy in patients with myalgia of the masticatory muscles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 937-943
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/joor.13355. Epub 2022 Jul 16.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jiao Dong, Kiyoshi Sakai, Yoshiro Koma, Junna Watanabe, Kehong Liu, Hiroshi Maruyama, Kohei Sakaguchi, Hideharu Hibi	4. 巻 20
2. 論文標題 Dental pulp stem cell-derived small extracellular vesicle in irradiation-induced senescence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 28-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.08.046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂口晃平, 酒井陽, 梶村有紀子, 小間義朗, 渡邊純奈, 丸山紗季, 丸山裕, 日比英晴
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞が分泌する細胞外小胞による歯周組織再生
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohei SAKAGUCHI, Kiyoshi SAKAI, Yukiko SUGIMURA-WAKAYAMA, Yoshiro KOMA, Junna WATANABE, Hiroshi MARUYAMA, Liu, Kehong, Dong Jiao, Hideharu HIBI
2. 発表標題 Exosomes derived from mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia accelerated osteogenesis
3. 学会等名 The 2021 IADR/AADR/CADR General Session (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohei SAKAGUCHI, Kiyoshi SAKAI, Yukiko SUGIMURAWAKAYAMA, Junna WATANABE, Hideharu HIBI
2. 発表標題 Bone regeneration using exosomes derived from hMSCs stimulated by hypoxia
3. 学会等名 EAO Congress 2019 - 28th Annual Scientific Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丸山紗季, 坂口晃平, Zhang Jingwen, 日比英晴
2. 発表標題 骨髄間葉系幹細胞由来液性因子による骨格筋再生
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------