

令和 5 年 6 月 13 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：2020～2022

課題番号：20K23075

研究課題名（和文）幹細胞由来細胞外小胞に含まれるmiRNAを用いた薬剤性顎骨壊死の予防

研究課題名（英文）Prevention of drug-induced osteonecrosis of the jaw using miRNA contained in stem cell-derived extracellular vesicles

研究代表者

渡邊 純奈（Watanabe, Junna）

名古屋大学・医学系研究科・客員研究者

研究者番号：00877102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨髄由来間葉系幹細胞の細胞外小胞に含まれるmiRNAを網羅的に解析した結果、特異的に含まれるものを幾つか同定した。中でもmiR-Xは細胞の老化を抑制（増殖率の増加、老化関連遺伝子の発現低下）し、ラット骨髄壊死モデルでは創傷治癒効果を認めた。また、miR-Xの一部の配列がGene-Yの一部と相補的であることから、Gene-Yの一部の配列を組み込んだルシフェラーゼベクターを製作した。ルシフェラーゼアッセイによりmiR-XがGene-Yの発現を抑制することが明らかとなった。以上から、幹細胞由来の細胞外小胞に含まれるmiRNAは薬剤性顎骨壊死の予防に効果があることが示唆できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤性顎骨壊死において、幹細胞由来の細胞外小胞（EVs）を治療に用いた研究は現在のところ2報なのだが、さらにEVsの含有物であるmiRNAに着目し、治療に用いているものは報告されていない。MSC由来EVsに含まれるmiR-Xの細胞老化抑制効果の同定は、先端治療における無細胞療法の有用性を考えると、有意な成果である。今後期待されるのは細胞全体を送達することなく治療を達成できるという考え方である。EVsは、そこに含まれる物質（miRNA）を安定して輸送する細胞間通信ツールとして、治療標的細胞への薬物送達に利用が期待できるため、EVsおよびmiRNAについての研究を深める必要がある。

研究成果の概要（英文）：A comprehensive analysis of miRNAs in extracellular vesicles of bone marrow-derived mesenchymal stem cells identified several specific miRNAs. Among them, miR-X suppressed cellular senescence by inducing increased proliferation rate and decreased expression of senescence-related genes. In a rat bone marrow necrosis model, it showed a wound healing effect. Furthermore, because some sequences of miR-X are complementary to some sequences of Gene-Y, we constructed a luciferase vector incorporating some sequences of Gene-Y. Luciferase assays revealed that miR-X suppressed gene-Y expression. These results suggest that miRNAs contained in extracellular vesicles derived from stem cells are effective in preventing drug-induced osteonecrosis of the jaw.

研究分野：薬剤性顎骨壊死

キーワード：薬剤性顎骨壊死 細胞老化 細胞外小胞 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ビスフォスフォネート (BP) 製剤は、癌の骨転移や骨粗鬆症の治療に広く使用されている。BP 製剤を長期間服用すると、稀に、BP 関連顎骨壊死 (BRONJ) が発症し、痛みや腫れ、持続的に膿が出て悪臭などが生じ、患者の生活の質を著しく低下させる。しかし、その病態生理は不明のまま、適切な治療法や予防法は確立されていないのが現状である。

近年、細胞から放出される細胞外小胞 (EVs) は、タンパク質、脂質、および核酸などの情報伝達物質の細胞間移行の手段として機能し、細胞間コミュニケーションにおいて重要な役割を果たすことがわかってきた。間葉系幹細胞 (MSC) 由来の EVs (MSC-EVs) は、MSC の細胞移植と同様の抗炎症作用や創傷の治癒促進効果が報告されているが、未だ不明な点も多い。

研究代表者はこれまでに、EVs を使用した BRONJ の治療を計画した。BP 製剤の一つであるゾレドロン酸により、幹細胞・骨芽細胞・線維芽細胞に老化現象が起こっていることを初めて明らかにした。一方、EVs はこれらの細胞老化を抑制し、正常な創傷治癒と抗炎症、血管新生、骨再生を導いた (Watanabe et al. JDR 2020)。

すると、ゾレドロン酸以外の顎骨壊死が誘発される薬剤でも同様の細胞老化現象を引き起こすのか、EVs がどのようにして老化抑制効果を示したのか、という 2 つの疑問が浮かび上がった。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、

- (1) ゾレドロン酸以外の顎骨壊死が誘発される薬剤 (デノスマブや血管新生抑制作用を持つ抗がん剤) も同様の細胞老化現象を引き起こすのか？
- (2) EVs 中に含まれる物質の中で、核酸の一つであるマイクロ RNA (miRNA) が、老化抑制効果に寄与していないか？

以上に着目して、最終的には、

- (3) 幹細胞由来細胞外小胞に含まれる miRNA を用いて薬剤性顎骨壊死の予防に繋げることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- (1) デノスマブが引き起こす顎骨壊死について

デノスマブ (ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体製剤) を用いて、薬剤性顎骨壊死モデルを作成する。

デノスマブを細胞に投与し、細胞が老化現象を示すか (ガラクトシダーゼ陽性細胞数の変化、細胞増殖率の変化、老化関連遺伝子発現の変化、炎症性サイトカインの発現変化) を調べる。

- (2) miRNA の老化抑制効果について

MSC-EVs に含まれている miRNA の網羅的解析をする。

miRNA を細胞に投与して、細胞が老化現象を改善するか (ガラクトシダーゼ陽性細胞数の変化、細胞増殖率の変化、老化関連遺伝子発現の変化、炎症性サイトカインの発現変化) を調べる。

miRNA を既存のラット BRONJ モデルに投与して、BRONJ を予防するか (抜歯部位の治癒状況、CT による骨の評価)。

### 4. 研究成果

- (1) デノスマブが引き起こす顎骨壊死について

デノスマブ (ヒト型抗 RANKL モノクローナル抗体製剤) を用いての薬剤性顎骨壊死モデルの作成に取り掛かったが、モデル作りは難航した。時間を要したが、抗 RANKL 抗体を投与後に上顎臼歯を抜歯してマウスモデルを作成することに成功した。

デノスマブをマウスの骨髄細胞などに投与し、それらの細胞が老化現象を示すかについて調べる予定であったが、モデル作り時間に時間を要したため検討することが叶わず、課題を残した。

- (2) miRNA の老化抑制効果について

MSC-EVs に含まれている miRNA の網羅的解析の結果、MSC-EVs に特異的に含ま

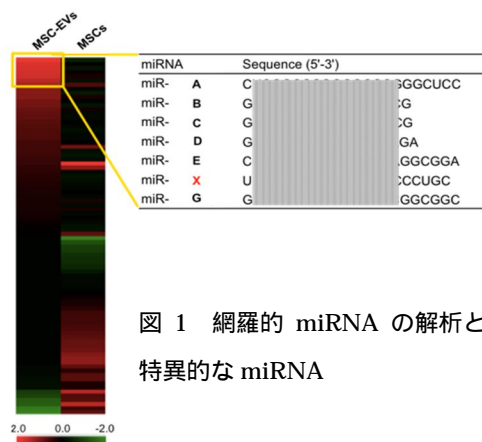


図 1 網羅的 miRNA の解析と特異的な miRNA

れる7つのmiRNAを同定した(図1)。そこで、ラット骨髄細胞に対し、ゾレドロン酸を投与した群(ZOL)に7つのmiRNAをそれぞれ投与した際の増殖率、および投与後の遺伝子発現について評価したところ、miR-Xが老化関連遺伝子(Gene-Y)の発現抑制に参与していることが示された(図2)。

また、そのmiR-XをラットBRONJモデルに投与したところ、以前の研究でEVsを投与した時と同様の創傷治癒効果が得られた(図3)。

さらに、この遺伝子Gene-Yの一部を組み込んだルシフェラーゼベクターを製作し、本当にmiR-XがGene-Yに結合して遺伝子発現に参与しているかを、シフェラーゼアッセイにて調べた。miR-XがGene-Yの発現を抑制することが明らかとなった(図4)。

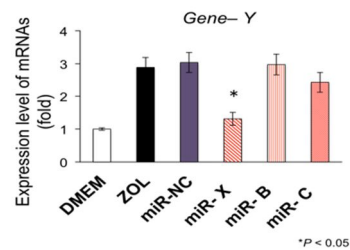


図2 老化関連遺伝子Gene-Yの発現量

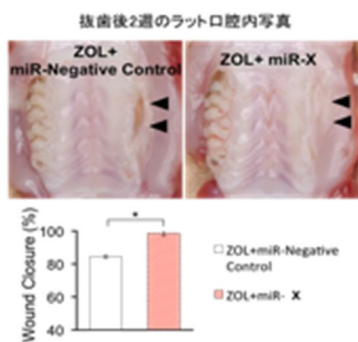


図3 miR-Xを投与したラットBRONJモデルの評価

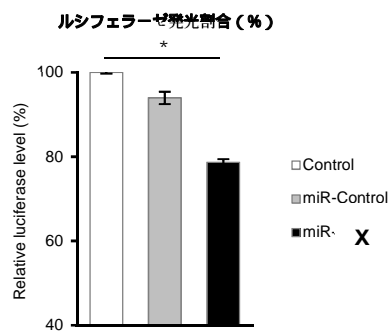


図4 ルシフェラーゼアッセイによるmiR-Xの遺伝子発現抑制効果

### (3) miRNAを用いた薬剤性顎骨壊死の予防法について

以上から、幹細胞由来の細胞外小胞に含まれるmiRNAは薬剤性顎骨壊死の予防に効果があることが示唆された。薬剤性顎骨壊死において、幹細胞由来のEVsを治療に用いた研究は現在のところ2報だけなのだが、さらにEVsの含有物であるmiRNAに着目し、治療に用いているものは報告されていない。そこで、このmiR-Xについては特許出願申請を行なった。出願状況については別に記載する。

MSC由来EVsに含まれるmiR-Xの細胞老化抑制効果の同定は、先端治療における無細胞療法の有用性を考えると、有意な成果である。今後期待されるのは細胞全体を送達することなく治療を達成できるという考え方である。EVsは、そこに含まれる物質(miRNA)を安定して輸送する細胞間通信ツールとして、治療標的細胞への薬物送達に利用が期待できるため、今後もEVsおよびmiRNAについての研究を深める必要がある。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Dong Jiao, Sakai Kiyoshi, Koma Yoshiro, Watanabe Junna, Liu Kehong, Maruyama Hiroshi, Sakaguchi Kohei, Hibi Hideharu	4. 巻 575
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 Biochemical and Biophysical Research Communications	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小間義朗, 酒井陽, 渡邊純奈, 梶村有紀子, 坂口晃平, 丸山裕, 日比英晴
2. 発表標題 シェーグレン症候群の唾液腺細胞老化に幹細胞由来細胞外小胞が与える影響
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 王芸霖, 山口聡, 陳暉, 渡邊純奈, 酒井陽, 日比英晴
2. 発表標題 ヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清が皮弁の生着に与える効果の検討
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 医薬組成物および併用薬	発明者 渡邊純奈, 酒井陽, 日比英晴	権利者 東海国立大学機 構
産業財産権の種類、番号 特許、2023-022331	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------