

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21060

研究課題名（和文）骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームによる新規骨再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of novel bone regeneration therapy using exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

竹内 涼子（TAKEUCHI, Ryoko）

新潟大学・医歯学総合病院・専任助教

研究者番号：00911603

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：In vitroにおいては、ヒト骨髄間葉系幹細胞培養上清(MSC-CM)の採取およびエクソソームの抽出をおこなった。またMSC-CMからマクロファージの極性転換に関わるMCP-1を取り出し、MSC-CMにおける含有量等について検討した。骨形成関連遺伝子やマクロファージ極性に関わる遺伝子の発現についてそれらを実験に供した。In vivoにおいては、ラット頭蓋骨骨欠損モデルを作製し、アテロコラーゲンスポンジを足場として、MSC-CMやエクソソーム、またMCP-1を除去したMSC-CMといった材料を添加し骨形成について組織化学的に評価した。

研究成果については論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでMSC-CMがパラクライン効果により骨再生を促進することは示してきたが、MSC-CMは多くの液性因子を含んでいるためどの因子がどのような役割を担っているのか明らかになっていない部分がある。MSC-CMに含有するマクロファージを中心とした免疫応答や炎症制御にどのような役割を担っているかを解明することが、MSC-CMにおける早期の骨再生を検討する上で学術的意義があるといえる。骨に関わる疾患や外傷などに伴う骨欠損において、この新規骨再生療法の開発は社会的にも大きな役割を担うと考える。

研究成果の概要（英文）：In vitro, conditioned media from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells (MSC-CM) was collected and exosomes were extracted. In addition, MCP-1, which is involved in macrophage polarity conversion, was extracted from MSC-CM and the content in MSC-CM was examined. These were then used in experiments to examine the expression of bone formation-related genes and macrophage polarity-related genes. In vivo, a rat calvaria bone defect model was created and materials such as MSC-CM, exosomes, and MSC-CM with MCP-1 removed were added to an atelocollagen sponge scaffold, and bone formation was evaluated histologically. A paper on the research results is currently being submitted.

研究分野：口腔外科学

キーワード：骨再生 エクソソーム 培養上清 骨髄間葉系幹細胞

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和5年6月21日現在

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域において腫瘍摘出や外傷などの疾患に伴う骨欠損は、機能性はもちろん整容性にも大きく関わり生活の質を著しく低下させる。近年、幹細胞ベースの骨再生療法がめざましく発達しているが、幹細胞が骨再生に寄与するメカニズムは多様で不明な部分が多い。私はこれまでラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いて、細胞移植を用いずに幹細胞の培養上清や細胞外小胞であるエクソソームのみで骨再生が促進されることを報告してきた。その要諦として、組織周囲の微小環境の調節こそが早期の骨再生に深く関与していると考えた。

2. 研究の目的

本研究はより早期に有効な骨再生療法を開発することを目的とし、あらゆる液性因子を含む幹細胞培養上清の中から効率的な細胞間情報伝達機能を有するエクソソームを単離し、免疫調節機能の観点からマクロファージの極性転換に着目して、エクソソームの骨再生に寄与する特異的な働きを解明するものである。

3. 研究の方法

骨髄間葉系幹細胞培養上清 (MSC-CM) 由来のエクソソームによるマクロファージを中心とした免疫調節機能を踏まえた骨再生について、*in vitro* での評価ならびにラット頭蓋骨骨欠損モデルを用いた *in vivo* での評価をおこなうものであった。

1. MSC-CM ならびにエクソソームの採取と遺伝子発現について

ヒト骨髄間葉系幹細胞を 80% コンフルエントまで培養し、無血清培地に交換して 48 時間インキュベートした培養上清を MSC-CM とした。また MSC-CM に含有する単球遊走およびマクロファージ極性転換関連因子 MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1) の含有量を ELISA 法にて測定する。さらに超遠心法を用いて MSC-CM からエクソソームを抽出する。

また、MSC-CM から MCP-1 を除去した MSC-CM(depMSC-CM) を作製する。

それらにおいて、マクロファージ極性に関する遺伝子や骨形成関連遺伝子の発現を比較検討する。

2. ラット頭蓋骨骨欠損モデルについて

10 週齢の雄 Wistar ラットに麻酔を施し、頭頂部に骨膜切開を行って、トレフィンバーにて頭蓋冠に直径 5mm の円形骨欠損を 2 カ所作成しラット頭蓋骨モデルを作製する。アテロコラーゲンスポンジを足場として、実験群の各材料を浸して骨欠損部に移植する。骨形成についてはマイクロCTでの評価や組織学的・免疫組織学的に検討する。

4. 研究成果

今回の研究期間において、MSC-CM の骨形成におけるマクロファージ極性転換の役割

について検討した。

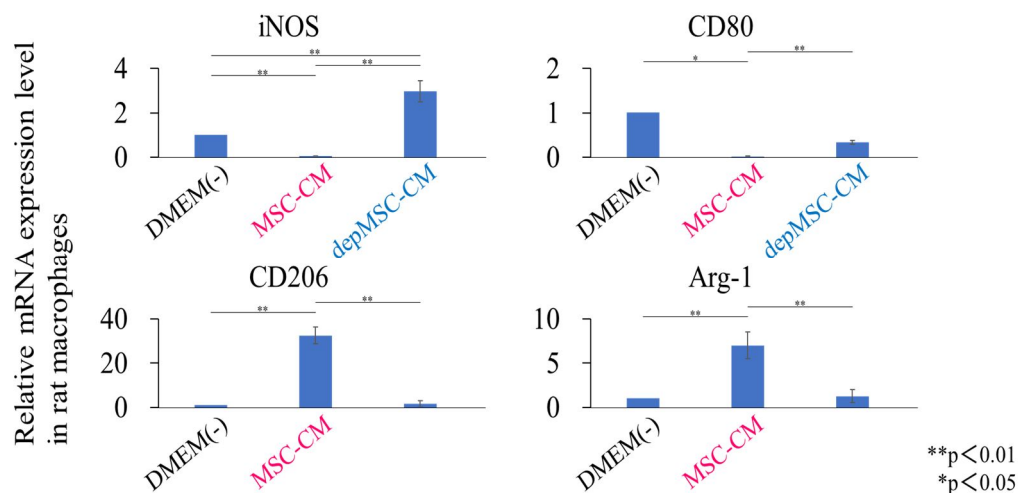
MSC-CM に含まれる単球遊走因子・マクロファージ関連因子(MCP-1) ELISA 法にて MSC-CM には MCP-1 が含まれていることを確認した。また免疫沈降法により MSC-CM から MCP-1 を除去し、ELISA 法にて MCP-1 が有意に除去されていることを確認した。

	MCP-1(pg/ml)
MSC-CM	414.9±138.2
depMSC-CM	11.8±1.3 [#]
DMEM(-)	5.2±2.1 [#]

P<0.01 vs. MSC-CM

MSC-CM、depMSC-CM によるマクロファージ極性に関する遺伝子発現の比較
ラット骨髄由来マクロファージを MSC-CM、depMSC-CM で 48 時間培養し、以下の遺伝子発現量を qRT-PCR 法で比較した。

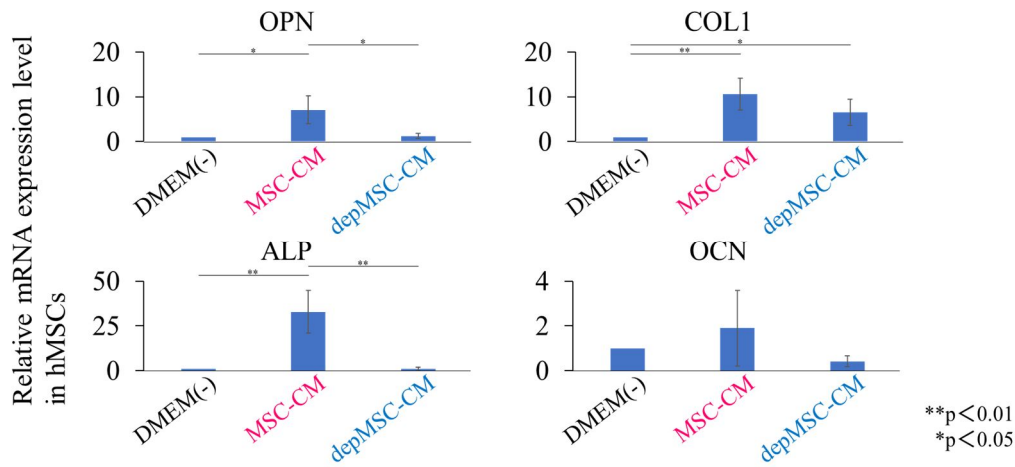
- ・ M1 マクロファージマーカー : iNOS, CD80
- ・ M2 マクロファージマーカー : CD206, arginase 1 (Arg-1)



MSC-CM 群では depMSC-CM 群と比較して M1 マクロファージマーカー(iNOS, CD80)発現量が少ない一方、M2 マクロファージマーカー(CD206, Arg-1)発現量が多かった。

MSC-CM、depMSC-CM による骨形成関連遺伝子発現の比較
ヒト骨髄間葉系幹細胞を MSC-CM、depMSC-CM で 48 時間培養し、以下の遺伝子発現量を qRT-PCR 法で比較した。

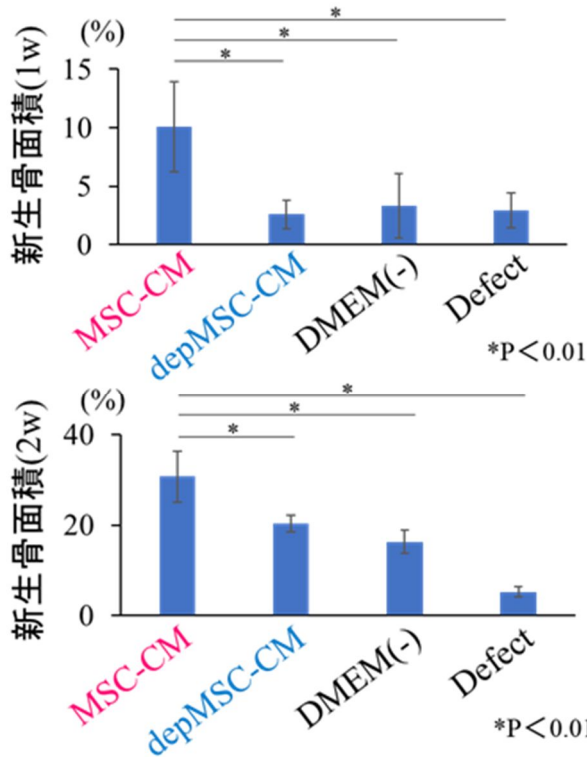
- ・ Osteopontin : OPN
- ・ Alkaline phosphate : ALP
- ・ Osteocalcin : OCN
- ・ Type collagen : COL1



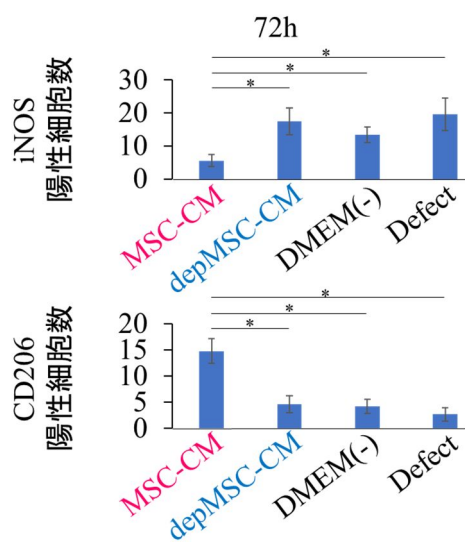
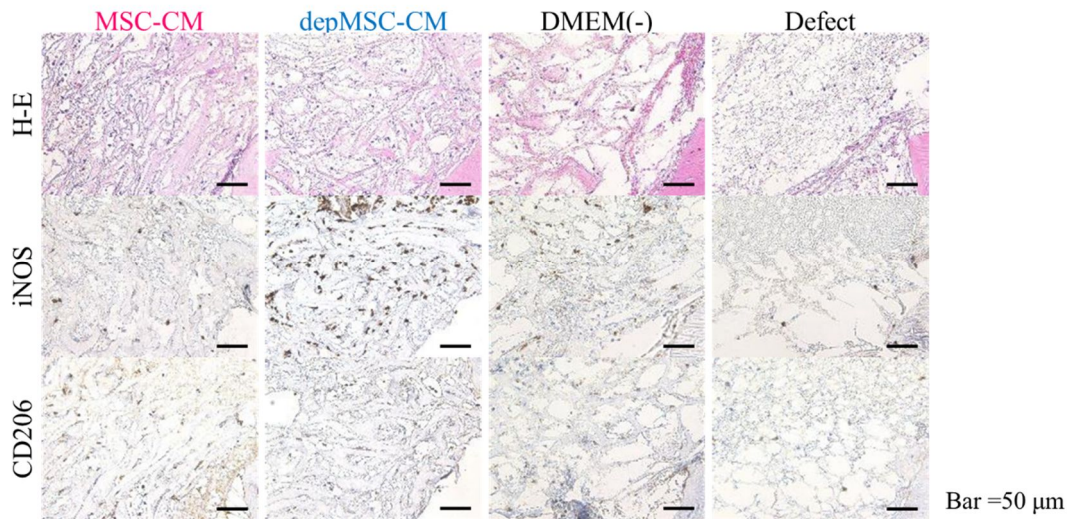
MSC-CM 群では骨形成関連遺伝子の発現量が上昇する一方、depMSC-CM 群では COL1 のみ発現量が上昇した。

ラット頭蓋骨欠損モデルを用いた骨形成に関する検討

ラット頭蓋骨欠損モデルを用い、アテロコラーゲンスポンジを足場として MSC-CM、depMSC-CM を移植し、移植部の骨形成について組織学的、免疫組織化学的に検討した。



1 週、2 週で MSC-CM 群において有意に骨形成が促進された。



組織学的・免疫組織化学的評価：72 時間

MSC-CM および depMSC-CM 群で骨欠損部に遊走細胞を多く認めた。MSC-CM 群で iNOS 陽性細胞が少なく、CD206 陽性細胞が多い一方、depMSC-CM 群では iNOS 陽性細胞が多く、CD206 陽性細胞が少なかった。

まとめ

MSC-CM に含まれる MCP-1 の作用により単球が骨欠損部へ早期に遊走し、M2 マクロファージへの極性転換を促進することで骨形成が促進されたことが示唆された。また、MCP-1 が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化に影響を与える可能性が示唆された。

これらの研究成果については第 67 回日本口腔外科学会学術大会、第 26 回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会、第 22 回日本再生医療学会総会にて発表しており、現在論文作成・投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋爪孝介, 片桐 渉, 竹内涼子, 須田大亮, 小林正治
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清はマクロファージ極性転換により骨形成を促進する
3. 学会等名 第67回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋爪孝介, 片桐 渉, 竹内涼子, 須田大亮, 小林正治
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清はマクロファージ極性転換により骨形成を促進する
3. 学会等名 第26回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋爪孝介, 片桐 渉, 竹内涼子, 須田大亮, 小林正治
2. 発表標題 骨髄由来間葉系幹細胞培養上清による早期骨形成におけるマクロファージ極性転換因子の影響に関する検討
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
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
---------	---------