

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659869

研究課題名(和文) 幹細胞由来エクソソームによる組織再生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of tissue regenerative mechanism caused by MSC derived-exosomes

研究代表者

小牧 基浩 (Komaki, Motohiro)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：30401368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは、タンパク質、脂質ならびにmRNA, miRNAを含有する細胞より分泌される膜小胞であり、近年、幹細胞からもエクソソームが分泌されることが報告された。しかしながら、組織再生におけるエクソソームの役割は十分に理解されていない。

我々は、間葉系幹細胞(MSC)由来エクソソーム(MSC-exo)が線維芽細胞に取り込まれ、細胞分化を促進すること、MSC培養上清による歯周組織再生効果がエクソソーム除去により現弱することを発見した。本研究成果は、MSC-exoにも組織再生効果が期待され、細胞移植を伴わない簡便で安全な組織再生法の確立の可能性を示す重要な知見であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are membrane vesicles which contain protein, lipids, mRNA, and miRNA. It has been reported that exosomes are secreted from stem cells. However, the role of exosomes in tissue regeneration is not elucidated.

In this study we found that exosomes derived from mesenchymal stem cells (MSC-exo) being taken in by cells, and promoted angiogenesis and cell differentiation, and also that periodontal regeneration caused by the MSC culture supernatant was depend on MSC-exo. Although regenerative therapy using stem cells has been considerable promise in preclinical studies, there are several issues to be solved such as tumorigenesis of transplanted stem cells. Our findings indicate the possibility of novel regenerative therapy without cell transplantation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯周組織再生 間葉系幹細胞 エクソソーム 細胞分化

1. 研究開始当初の背景

本邦において高齢者の約半数が歯周炎に罹患している。また、歯周炎は進行すると口腔機能と審美性が著しく損なわれるため効果的な歯周組織再生法の開発が急務である。これまでに骨髄、脂肪、歯根膜等の組織由来の間葉系幹細胞 (MSC) を用いた組織再生研究が行われ一定の効果が報告されている。最近、移植された MSC 自体が分化し標的組織を形成するのではなく、MSC が産生する液性因子が創傷治癒を促すと考えられるようになってきている。しかしながらそのメカニズムは明らかでない。

エクソソームは、血液などの体液や幹細胞の培養上清 (MSC-CM) 中にも存在が確認され、細胞間でタンパク質、mRNA、microRNA (miRNA) など多様な分子を同時に運搬するキャリアとしてその生物学的重要性が示唆されている。しかしながら、間葉系幹細胞による歯周組織再生におけるエクソソームの役割については報告がない。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、エクソソームを介した MSC による歯周組織再生のメカニズムを研究し、細胞移植を伴わない安全、低侵襲、低コスト、簡便な歯周組織再生法の確立であるが、研究期間内に前臨床データの蓄積を行う。具体的には、

- 1) MSC-CM 中からのエクソソームの単離法を確立する。
- 2) 歯周組織欠損モデルにエクソソームを投与し、創傷治癒促進効果を血管新生、骨形成の定量的評価と免疫組織学的評価により確認を行う。
- 3) エクソソームに含まれる成分解析とエクソソームの細胞の形質変化に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

1) 創傷治癒促進効果を有するエクソソームの単離法の確立

エクソソームはヘテロな集団であることが指摘されており、創傷治癒促進効果を有するエクソソームの培養上清中からの抽出法を選定することが研究遂行上不可欠である。まず、当研究室で細胞移植の実績がある幹細胞について電子顕微鏡にて腔内膜小胞を多く有する幹細胞を確認する。つぎにこの幹細胞を通常に従い培養し、80-90%コンフルエントに達した時点で PBS にて洗浄し、無血清培地に交換し 8-12 時間培養、PBS にて洗浄、無血清培地でさらに 72 時間培養後、MSC_{CM} を回収する。MSC_{CM} の創傷治癒促進作用を確認するために各種疾患モデルに投与しその効果を確認する。効果の認められた MSC-CM より 1) 超遠心法、2) CD63 抗体、CD81 抗体を用いる方法、3) フィルター (ExoMir™ キット) を利用する方法でエクソソームを抽出し、各種実験的疾患モデル (マウス下肢虚血

モデル、マウス臀部褥創モデル、マウス頭蓋骨骨欠損モデル) (図 1) に投与することで、オリジナル MSC-CM と同等の創傷治癒促進効果を認めるエクソソーム (MSC-EXO) の単離法を選定する。創傷治癒促進効果の判定には μ CT、レーザー血流測定胞を用いる。

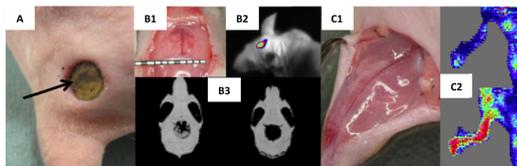


図1 動物疾患モデルA: マウス褥創モデル B1: 頭蓋骨骨欠損 B2: 骨形成バイオイメージング B3: μ CTによる骨形成評価 C1: マウス下肢虚血モデル C2: レーザードップラーによる血流評価

2) エクソソーム投与による歯周組織再生効果の解析

MSC-CM の創傷治癒促進効果は、MSC-CM 投与経路、投与時期、投与間隔により効果が異なることが指摘されている。そこで、当研究室で細胞移植の実績をもつ下顎歯周組織欠損モデルおよびその評価法 (図 2) を用いて MSC-EXO の投与方法と歯周組織再生効果について検討する。

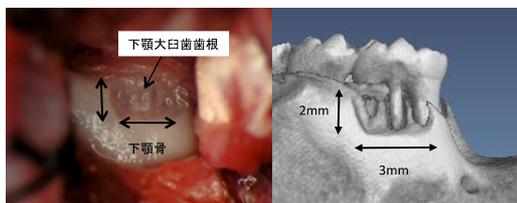


図2 歯周組織欠損モデル 下顎第一臼歯頰側に作製した象牙質に達する欠損 (左) と μ CTによる骨形成評価 (右)

欠損部の血管新生はレーザードップラーを用いた血流測定ならびに AngioSense を静注し in vivo 蛍光・定量トモグラフィ装置で血管分布、血液還流を評価する。骨形成は OsteoSense を尾静注し、in vivo 蛍光・定量トモグラフィ装置でハイロドキシアパタイト形成を定量し、微小石灰化・骨リモデリング・骨形成・骨吸収を定量的にモニタリングするとともに、 μ CT を用いて再生骨形態、骨量を評価する。歯周組織再生は、組織切片を作製し免疫組織学的組織学的評価を行う。

3) 細胞の形質変化に対するエクソソームの効果検討

エクソソームはタンパク質、mRNA、miRNA を内包する、細胞膜断片 (脂質二重膜) であり、細胞に融合し内部情報を伝搬する。MSC-EXO を蛍光色素 PKH67 で標識し、培養細胞に添加し受け手細胞 (血管内皮細胞、骨芽細胞、線維芽細胞) に移動したことを蛍光顕微鏡にて確認する。MSC-EXO の移動が確認された細胞の増殖、遊走、アポトーシスをそれぞれ WST8 アッセイ、wound healing アッセイ、Real-time PCR 法による caspase-3、-8 の定量にて評価する。さらに線維芽細胞 (含む MSC-EXO) において

は骨芽細胞、軟骨芽細胞、脂肪細胞への分化をアリザリン・レッド染色、アルシャンブルー染色、オイルレッド-O染色にてそれぞれ評価する。

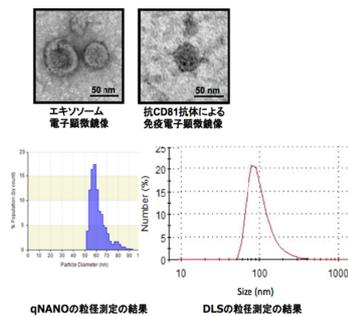
4) エクソソームの成分解析

エクソソームはタンパク質、mRNA、miRNAが含まれており(Nat Cell Biol, 2007)分泌する細胞種やその生理学的状態による異なることが知られている。本研究では、創傷治癒促進効果が認められたMSC-EXOをタンパク質とmiRNAに分けてその成分を解析し、幹細胞創傷治癒促進効果のメカニズムを明らかにするためのデータベースを作成する。まず、MSC_CMを集め、12,000Xg遠心し、フィルター処理(0.22 μm)し細胞のコンタミを除く。つぎに超遠心(100,000Xg、70分、4℃)して沈殿を回収し、ショ糖密度勾配によりエクソソームを分離する。分離されたエクソソームのタンパク質については、二次元電気泳動で分離し、PMF、LC-MS/MS及びWestern blottingによりプロテオーム解析を行う。RNAに関しては、miRNAを回収(miVana miRNA Isolation Kit)し、miRNAマイクロアレイ(TaqMan® Array MicroRNA Cards)にてMSC_EXO中のmicroRNAの網羅的解析を行う。

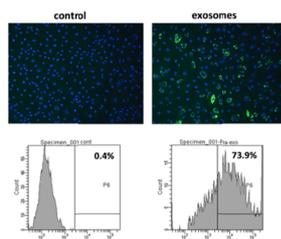
4. 研究成果

平成 24 年度

- 1) 骨髄、臍帯、胎盤由来間葉系幹細胞(MSC)より超遠心法を用いてエクソソームを単離、免疫電子顕微鏡、ウェスタンブロット法によるエクソソームマーカーCD9、CD63、CD81の発現よりエクソソームであることを確認した。また、動的光散乱法ならびに電子抵抗パルス法を用いて粒子径を確認した。



- 2) MSC由来エクソソームを蛍光標識し、線維芽細胞や血管内皮細胞に短時間で取り込まれることを確認した。
- 3) MSCエクソソームは、標的細胞における特定の遺伝子発現を上昇させることを明らかにした。また、この線維芽細胞で上昇が認められた遺伝子の発現がエク



ソソーム内には認められないことから、エクソソームによる直接的なmRNAの伝達ではないことを確認した。

平成 25 年度

- 1) MSCエクソソーム添加後の線維芽細胞において少なくとも2方向への分化が促進されることを確認した。
- 2) 幹細胞エクソソームによる創傷治癒促進効果として血管新生に対する効果を検討し、幹細胞エクソソームが血管内皮細胞に取り込まれ細胞の増殖、遊走、チューブ形成を促進することを確認した。
- 3) ラット歯周組織欠損モデルにおいて幹細胞培養上清が創傷治癒を促進すること、またこの効果が培養上清に含まれるエクソソームに依存することを確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

- Komaki M, Iwasaki K, Morita I. Bone and Stem cells. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. Clin Calcium. 査読なし Apr;24(4):565-73. doi: CliCa1404565573. 2014
- Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Honda I, Kimura Y, Takeda M, Akazawa K, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal regeneration using periodontal ligament stem cell-transferred amnion. Tissue Eng Part A. 査読あり Feb;20(3-4):693-704. doi: 10.1089/ten.TEA.2013.0017. 2014
- Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S, Izumi Y, Morita I. Periodontal Ligament Stem Cells Possess the Characteristics of Pericytes. J Periodontol. 査読あり Oct;84(10):1425-33. doi: 10.1902/jop.2012.120547. 2013
- Taki A, Abe M, Komaki M, Oku K, Iseki S, Mizutani S, Morita I. Expression of angiogenesis-related factors and inflammatory cytokines in placenta and umbilical vessels in pregnancies with preeclampsia and

chorioamnionitis/funisitis.
Congenit Anom (Kyoto). 査読あり
Jun;52(2):97-103. doi:
10.1111/j.1741-4520.2012.00359.x.
2012
Komaki M, Iwasaki K, Arzate H,
Narayanan AS, Izumi Y, Morita I.
Cementum protein 1 (CEMP1) induces
a cementoblastic phenotype and
reduces osteoblastic
differentiation in periodontal
ligament cells.
J Cell Physiol. 査読あり
Feb;227(2):649-57. doi:
10.1002/jcp.22770. 2012

〔学会発表〕(計 13 件)
(海外・国際)

Optimized method for culturing
outgrowth endothelial progenitor
cells from human umbilical cord
blood and adult peripheral blood.
Noriko Oshima-Sudo, Yuko Hoshino,
Motohiro Komaki, Ken-ichi Nakahama,
Toshiro Kubota, Mayumi Abe, Ikuo
Morita
17th IVBM June 2-5, 2012,
Rhein-Main-Hallen, Wiesbaden,
Germany

(国内)

歯根膜幹細胞由来液性因子を用いた
歯周組織再生
岩崎剣吾、小牧基浩、赤澤恵子、横山
尚毅、菖蒲弘人、永田瑞、木村康之、
遠井政行、和泉雄一、森田育男
第 56 回秋季日本歯周病学会学術大会
2013 年 9 月 22 日 群馬県、前橋市
歯根膜幹細胞培養上清を用いたラッ
ト歯周組織の再生
岩崎剣吾、小牧基浩、横山尚毅、菖
蒲弘人、森田育男
第 34 回日本炎症再生医学会 2013 年
7 月 2-3 日 京都府、京都市
歯根膜幹細胞の培養過程における形
態および分化能の変化について
岩崎剣吾、小牧基浩、赤澤恵子、横
山尚毅、菖蒲弘人、木村康之、遠井政
行、和泉雄一、森田育男
第 56 回春季日本歯周病学会学術大会
2013 年 5 月 31 日 タワーホール船橋、
東京都江戸川区
マウス歯周組織欠損への骨髄由来細
胞の動員について
木村康之、小牧基浩、岩崎剣吾、森田
育男、和泉雄一
第 60 回 JADR 総会、2012 年 12 月 14-15
日、朱鷺メッセ、新潟県、新潟市
マウス歯周組織への骨髄由来細胞の
動員について

木村康之、小牧基浩、岩崎剣吾、和
泉雄一、森田育男
第 77 回 口腔病学会学術大会、2012
年 11 月 30 日-12 月 1 日東京医科歯
科大学、東京都、文京区
マウス骨髄細胞は歯周組織欠損へ
動員される
小牧基浩、岩崎剣吾、横山尚毅、森
田育男
第 33 回日本炎症・再生医学会、
2012 年 7 月 5-6 日、ホテル日光福岡、
福岡県、福岡市
歯根膜幹細胞転写羊膜移植による
ラット歯周組織の再生
岩崎剣吾、小牧基浩、滝 敦子、本
多 泉、森田育男
第 33 回日本炎症・再生医学会、
2012 年 7 月 5-6 日、ホテル日光福岡、
福岡県、福岡市
ラット子宮内感染モデルを用いた
新生児脳室周囲白質軟化症及び慢性
肺疾患に対する臍帯由来間質系幹細
胞を用いた治療の検討
本多 泉、滝 敦子、岩崎 剣吾、
小牧 基浩、森田 育男
第 33 回日本炎症・再生医学会、
2012 年 7 月 5-6 日、ホテル日光福岡、
福岡県、福岡市
歯周組織を構成する細胞に対する幹
細胞培養上清の効果
小牧基浩、岩崎剣吾、沼田友理、横
山尚毅、森田育男
第 55 回春期日本歯周病学会学術大
会、2012 年 5 月 17-19 日、札幌コン
ベンションセンター、北海道、札幌
市
ラット臼歯部歯周組織欠損に対す
る歯根膜幹細胞転写羊膜を用いた
歯周組織再生治療について
岩崎剣吾、小牧基浩、木村康之、横
山尚毅、和泉雄一、森田育男
第 55 回春期日本歯周病学会学術大
会、2012 年 5 月 17-19 日、札幌コン
ベンションセンター、北海道、札幌
市

<招待講演>

(海外・国際)

Mesenchymal stem cell therapy for
periodontal regeneration: Cell
transfer technique to paracrine
factors
Motohiro Komaki
Tokyo Medical and Dentai
University Taipei Medical
University Symposium on Advances
of Biomaterials and Regenerative
medicine
, Nov 30th, 2013, Taipei, Taiwan

(国内)

間葉系幹細胞パラクライン因子を用いた新規歯周治療を考える
小牧基浩、岩崎劍吾、森田育男
第34回日本炎症・再生医学会 シンポジウム 2013年7月2-3日 国立京都国際会館 京都府・京都市

〔図書〕(計 1件)

クリニカルカルシウム 特集 骨と幹細胞 間葉系幹細胞と骨再生
小牧基浩、岩崎劍吾、森田育男
クリニカルカルシウム 2014 24(4), p103-111.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称：歯周組織形成用材料
発明者：森田 育男，小牧 基浩，岩崎 劍吾
権利者：東京医科歯科大学，大日本印刷
種類：特許
番号：特願 2013-113756
出願年月日：2013/5/30
国内外の別：国内

名称：細胞のリプログラミングのための組成物
発明者：森田 育男，小牧 基浩，岩崎 劍吾
権利者：東京医科歯科大学，大日本印刷
種類：特許
番号：特願 2013-113297
出願年月日：2013/5/29
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小牧 基浩 (KOMAKI, Motohiro)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授
研究者番号：30401368

(2)研究分担者

岩崎 劍吾 (IWASAKI, Kengo)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師
研究者番号：40401351

(3)連携研究者

()

研究者番号：