

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25253089

研究課題名(和文)新規細胞間コミュニケーション因子であるエクソソームによる組織再生機構の解明

研究課題名(英文)The role of exosomes as a novel communication factor in tissue regeneration

研究代表者

越智 光夫(OCHI, MITSUO)

広島大学・その他部局等・学長

研究者番号：70177244

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、エクソソームが、組織修復および移植治療に効果のある間葉系幹細胞(MSC)から分泌されることが組織再生に重要であるという新たなメカニズムの解明を目的とした。エクソソーム構成分子のKOマウスを用いた損傷モデルでは、組織修復が遅延するが、MSCエクソソームの局所投与によりその遅延から回復することや細胞分化の促進や血管新生を介して目的組織修復を促進させた。このメカニズムの一つとして、組織再生関連のサイトカインだけでなくMSCエクソソーム中のmiRNAの関与が示唆された。以上のことから本研究によりmiRNAを含んだエクソソームによる組織再生の新たな機構の解明と臨床応用への可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Paracrine signaling by bone-marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) plays a major role in tissue repair. We focused on exosomes, which are extracellular vesicles as a novel additional modulator of cell-to-cell communication and tissue regeneration. To address this, we examined the role of exosomes in the healing process in injury models of deficient mice, a strain which is known to reduce levels and/or function of exosomes. The retardation of tissue repair in deficient mice was rescued by the injection of MSC-exosomes. MSC-exosomes promoted cell differentiation such as myogenesis and angiogenesis in vitro, and tissue regeneration in tissue injury models. The levels of the tissue repair related-cytokines in MSC-exosomes were low, suggesting that, tissue repair may be in part mediated by other MSC-exosome components, such as miRNAs. We conclude that MSC-exosomes are a novel factor of MSC paracrine signaling with an important role in the tissue repair process.

研究分野：整形外科学、再生医療

キーワード：組織再生 間葉系幹細胞 エクソソーム microRNA

1. 研究開始当初の背景

これまで幹細胞移植による組織再生機構は、主に目的細胞への直接的な分化を期待してきたが、幹細胞移植による組織再生機構は、未だよく理解されていない。これまでの結果からも移植効果は、目的細胞への直接的な分化というよりも幹細胞からの分泌物(成長因子など)による血管形成、組織幹細胞の誘導や分化促進といった再生環境改善効果によるものが大きいと考えている。興味深いことに、近年、その分泌物の中でも“エクソソームのようなエンドソーム由来の小胞顆粒(30~200nm)”が組織再生に関与していることが示唆されはじめている。これまで小胞顆粒は、不要物の排除などが主な役割であると考えられていた。しかし近年、microRNA(miRNA)が、この“エクソソーム”に包まれて細胞より分泌され、体液中を循環することで標的細胞内へ取り込まれ遺伝子発現を制御するいわば細胞間を行きかい相互作用するサイトカインのような新たな機能があることが明らかになり、種々な生体内現象に関与していることが予想されている。

2. 研究の目的

組織再生には、損傷部位もしくは移植幹細胞などから分泌される新規細胞間コミュニケーション因子として microRNA を含むエクソソームが重要な因子であるという仮説を証明する。そのために 1) エクソソーム分泌不全ノックアウトマウスを用いたエクソソームによる組織再生への関与を明らかにする 2) エクソソームによる血管形成や細胞分化促進などの組織再生能を決定 3) エクソソーム中の miRNA をプロファイルし、その miRNA による効果なのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)テトラスパニンノックアウト(KO)マウスを用いた解析

エクソソームによる幹細胞ホーミング能などを含めた組織再生能への関与を明らかにするために、エクソソームの構成分子であり膜タンパクであるテトラスパニン CD9 ノックアウト(KO)マウスを用いて解析を行った。

KOマウス細胞のエクソソーム解析

野生型と CD9 KO マウス細胞由来のエクソソームをウェスタンブロット法によりエクソソームマーカーを解析した。また、粒子サイズおよび粒子数の解析を行った。

KOマウスにおける骨折治癒過程の解析

野生型マウスと KO マウスを用いて骨折モデルを作製し、自然骨折治癒過程を解析した。

(2) MSC 由来エクソソームの細胞への影響

骨髄由来間葉系幹細胞(MSC)は、軟骨をはじめ多くの細胞に分化することが知られており、細胞移植治療に用いられる細胞である。この移植効果は、細胞分化による組織再生というよりも、MSC より分泌されるサイトカイン

などの因子によると考えられている。そこで MSC より分泌するエクソソームは、治療効果があるのではないかと考えた。

細胞分化への影響

MSC 由来エクソソームが、筋分化に対してどのような効果を示すのかを筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いて評価を行った。同様に軟骨前駆細胞株 ATDC5 を用いて評価を行った。

血管新生への影響

MSC 由来エクソソームが、血管新生に対してどのような効果を示すのかを血管内皮細胞(HUVEC)を用いて遊走能および管腔形成能を評価した。

(3) MSC 由来エクソソームによる組織再生効果

MSC の培養上清よりエクソソームを単離し、筋損傷モデルマウスの損傷部位に局所投与することで筋再生に対する効果を組織学的に評価した。

野生型および KO マウスに骨折モデルを作製し、MSC エクソソームをマウスの骨折部位に局所投与することで組織再生に対する効果をマイクロ CT などによる形態解析および組織学的な評価を行った。

骨肉腫細胞株由来エクソソームによる組織再生効果の検討

(4) MSC 由来エクソソームの解析

エクソソーム中に存在する何が組織再生に関与しているのかを明らかにするために、エクソソーム中のサイトカインおよび miRNA に注目した。

超遠心法より分離したエクソソームの解析

無血清培養液下の MSC の培養上清、培養上清中より超遠心法により沈殿したエクソソーム層、それ以外の上清層中に含まれる粒子を電子顕微鏡やウェスタンブロット法によりエクソソームマーカーを解析した。

エクソソーム中のサイトカインの解析

MSC の培養上清中、培養上清中より超遠心法により沈殿したエクソソーム層、それ以外の上清層中に含まれるサイトカインを BioPlex システム(BioRad)により測定した。

エクソソームに含まれる miRNA

エクソソームは、培養上清より単離し、smallRNA を精製した。エクソソーム中の miRNA は、nCounter システムを用いてプロファイリングを行った。

(5) エクソソームフォーム miRNA

目的 miRNA を過剰に含有するエクソソームはより目的機能を有するエクソソームになると考え以下の実験を行った。

エクソソームフォーム miRNA の取得

目的的合成 miRNA をリポフェクション法により過剰導入し MSC の培養上清を超遠心法によりエクソソーム層とそれ以外の上清に分離し、この3種類のサンプルより small RNA を

精製し、各層における導入 miRNA の量をリアルタイム PCR により測定した。

エクソソームフォーム miRNA の細胞への取り込み

培養上清およびエクソソーム層とエクソソーム除いた上清を各々細胞へ添加し、細胞への取込み及びその機能について解析した。

4. 研究成果

本研究は、分泌 miRNA などを含む“エクソソーム”が、組織修復およびこれまで治療効果のあることが知られている MSC など移植幹細胞による組織再生効果に重要な役割があるという新たなメカニズムの解明を目的とした。

MSC は培養上清中にエクソソームを分泌しており、このエクソソームは筋芽細胞 (C2C12) や軟骨前駆細胞 (ATDC5) の分化を促進したが、エクソソームを除いた培養上清中では分化促進効果を減少させた。また、このエクソソームは、血管内皮細胞において細胞遊走能および管腔形成能を促進させた。筋損傷マウスへの MSC 由来エクソソームの投与は、筋再生を促進させた。このエクソソーム中には、筋再生関連のサイトカインなどはエクソソームを除いた培養上清中比べて極めて低濃度であった。そこで、エクソソーム中の miRNA をプロファイリングした結果、豊富に含まれていた miRNA を C2C12、血管内皮細胞に導入したところ筋分化および血管新生の促進効果を示した。また、野生型マウスとエクソソームの構成分子である CD9 の KO マウスを用いた骨折モデルを作製し、解析を行った。CD9 KO マウスの骨折モデルは、野生型に比べて骨折治癒が遅延するが、MSC エクソソームの局所投与によりその遅延から回復することが明らかになった。CD9 KO マウス細胞由来のエクソソームを解析した結果、エクソソームの分泌低下というよりも CD9 KO によるエクソソームの機能低下によることが示唆された。さらに、野生型マウスへの MSC エクソソームの投与も、骨折治癒を促進することが示された。一方、MSC 以外の骨肉腫細胞株由来エクソソームの投与による回復効果は示さなかった。MSC エクソソームによる治癒促進のメカニズムの一つとして、骨折治癒関連サイトカインとして知られている SDF-1 や MCP-1 などはエクソソーム中に低濃度であるにも関わらず治癒促進効果がみられたことから、サイトカインだけでなくその他の分子の関与が考えられた。実際、関連サイトカインには大きな違いがなかった MSC と骨肉腫細胞株由来エクソソームでは、miRNA のプロファイルに違いがあることから miRNA の関与が示唆された (現在投稿中)。これらの結果から、組織修復・再生には、miRNA を含むエクソソームが新たな組織再生因子として重要であることが示された。

また、MSC へ目的合成 miRNA を導入すると、その培養上清中に目的 miRNA を多く含んだ

エクソソームとして取得できることを明らかにした。そして、このエクソソームフォームの miRNA は、培養細胞に添加するだけで容易に導入され、そして機能した。そこで、この目的 miRNA を過剰に含有する MSC エクソソームを運動器の損傷モデルマウスに局所投与したところ、組織再生効果がさらに高まる結果を得ており、現在詳細を解析中である。以上のことから本研究により MSC 由来のエクソソームによる組織再生機構の新たな解明と目的 miRNA を多く含んだエクソソームによる新たな治療法の可能性が示された。

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) 全て査読有

1. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Transl Med*, In press.
2. Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, Matsuyama S, Nakasa T, Kamei N, Akimoto T, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett*, 589(11):1257-65, 2015. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.03.031.
3. Nakasa T, Yoshizuka M, Andry Usman M, Elbadty Mahmoud E, Ochi M. MicroRNAs and Bone Regeneration. *Curr Genomics*, 6:441-452, 2015. DOI: 10.2174/1389202916666150817213630.
4. Kato T, Miyaki S, Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, Ochi M. Exosomes from IL-1beta stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 16(4): R163, 2014. DOI: 10.1186/ar4679.
5. Shimbo K, Miyaki S, Ishitobi H, Kato Y, Kubo T, Shimose S, Ochi M. Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 445 (2): 381-387, 2014. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.02.007.

[学会発表](計 20 件)

1. 味八木茂、古田太輔、中邑祥博、石飛博之、越智光夫
間葉系幹細胞由来エクソソームは新たな組織再生因子である 第 15 回日本再生医療学会総会 2016 年 3 月 17 日~19 日、大阪国際会議場 (大阪市・北区)

2. 味八木茂
変形性関節症における microRNA を含むエクソソーム 第 29 回日本軟骨代謝学会 2016 年 2 月 19 日・20 日、広島大学 広仁会館 (広島市・南区)
3. 古田太輔、味八木茂、石飛博之、越智光夫
MSC 由来エクソソームによるマウスモデルの骨折治癒の促進検討 第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会 2015 年 10 月 22 日・23 日、富山国際会議場 (富山市大手町)
4. 古田太輔、味八木茂、亀井直輔、石飛博之、越智光夫
MSC 由来エクソソームによるマウスモデルの骨折治癒の促進検討 第 33 回日本骨代謝学会学術集会 2015 年 7 月 23 日～25 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)
5. Sumiyoshi N, Miyaki S, Ishitobi H, Furuta T, Nakasa T, Ochi M. The role of the tetraspanin CD9 in a mouse model of antigen-induced arthritis, Orthopaedic Research Society (ORS), March 28-31, 2015, Las Vegas (USA)
6. Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Kamei N, Ochi M. Mesenchymal stem cells-derived exosomes promote bone repair in mouse model, Orthopaedic Research Society (ORS), March 28-31, 2015, Las Vegas (USA)
7. 加藤智弘、味八木茂、石飛博之、中邑祥博、中佐智幸、Lotz MK、越智光夫
IL-1beta 刺激滑膜細胞由来のエクソソームは軟骨細胞に関節症変化を引き起こす 第 28 回日本軟骨代謝学会 2015 年 3 月 6 日・7 日、東京医科歯科大学 (東京都・文京区)
8. 中邑祥博、味八木茂、石飛博之、中佐智幸、亀井直輔、越智光夫
microRNA を含む間葉系幹細胞由来エクソソームは骨格筋再生を促進する 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日・10 日、城山観光ホテル (鹿児島市新照院町)
9. 住吉範彦、味八木茂、石飛博之、古田太輔、中佐智幸、越智光夫
関節炎におけるテトラスパニン CD9 の役割の解析- 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日・10 日、城山観光ホテル (鹿児島市新照院町)
10. 古田太輔、味八木茂、住吉範彦、石飛博之、越智光夫
MSC 由来エクソソームと骨折治癒の検討 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日・10 日、城山観光ホテル (鹿児島市新照院町)
11. Miyaki S, Nakamura Y, Ishitobi H, Nakasa T, Kamei N, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes containing microRNAs accelerate skeletal muscle regeneration. International Society for Extracellular Vesicles (ISEV), April 30- May 3, 2014, Rotterdam, Nederland.
12. Sumiyoshi N, Miyaki S, Ishitobi H, Nakasa T, Ochi M. The role of tetraspanin CD9 in pathogenesis of osteoarthritis, Osteoarthritis Research Society International (OARSI), April 25- 27, 2014, Paris (France)
13. Nakamura Y, Miyaki S, Ishitobi H, Nakasa T, Kamei N, Ochi M. Exosomes derived from mesenchymal stem cells accelerate skeletal muscle regeneration. Orthopaedic Research Society (ORS), March 15-18, 2014, New Orleans (USA)
14. 味八木茂、中邑祥博、石飛博之、中佐智幸、亀井直輔、越智光夫
間葉系幹細胞由来のエクソソームは骨格筋再生を促進する、第 13 回日本再生医療学会総会 2014 年 3 月 4 日～6 日、国立京都国際会館 (京都市・左京区)
15. 越智光夫
招待講演 運動器の再生医療 -軟骨、骨、筋、靭帯、末しょう神経- 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉市・美浜区)
16. 味八木茂
シンポジウム 軟骨変性病態 変形性関節症における microRNA の役割 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉市・美浜区)
17. 住吉範彦、味八木茂、石飛博之、古田太輔、中佐智幸、越智光夫
変形性関節症におけるテトラスパニン CD9 の役割 -CD9 ノックアウトマウスを用いた OA model の解析- 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉市・美浜区)
18. 中邑祥博、味八木茂、石飛博之、加藤智弘、高田剛志、中佐智幸、越智光夫
間葉系幹細胞由来のエクソソームは筋芽

細胞の筋分化を促進する 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉市・美浜区)

19. 新保慶輔、味八木茂、石飛博之、下瀬省二、久保忠彦、藤森淳、越智光夫
分泌型 microRNA による骨肉腫細胞への抑制効果 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場(千葉市・美浜区)
20. 古田太輔、味八木茂、石飛博之、住吉範彦、越智光夫
CD9KO マウスを用いた骨折治癒の検討 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日・18 日、幕張メッセ国際会議場 (千葉市・美浜区)

6. 研究組織

(1)研究代表者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)
広島大学・その他部局等・学長
研究者番号：70177244

(2)研究分担者

安達 伸生 (ADACHI NOBUO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授
研究者番号：30294383

味八木 茂 (MIYAKI SHIGERU)
広島大学・病院・講師
研究者番号：10392490

亀井 直輔 (KAMEI NAOSUKE)
広島大学・病院・講師
研究者番号：70444685

中佐 智幸 (NAKASA TOMOYUKI)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号：60467769

(平成 25 年度～平成 26 年度)