

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463087

研究課題名(和文) 歯槽骨再生におけるHSPGを介したエクソソーム取り込みのメカニズム

研究課題名(英文) HSPG-dependent internalization of exosomes and alveolar bone regeneration

研究代表者

K A 井上 (Inoue, Katarzyna Anna)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：90302877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)とエクソソームが、骨芽細胞において果たす機能とメカニズムを解明する目的で本研究を行なった。分化誘導の有・無の条件下で培養した骨芽細胞より、密度勾配遠心法によってエクソソームを分離/精製し、キャラクタリゼーションを行った。その結果、前骨芽細胞に特異的に存在するHSPG等のタンパク質を同定した。骨芽細胞由来の蛍光標識エクソソームの細胞内取り込みをリアルタイムで観察できるモデルを確立し、細胞内取り込みにおけるHSPGの役割を評価することができた。本研究で得られた知見により、顎骨・歯槽骨等の効率的な再生治療を成功させる分子基盤の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are secreted by various cell types and proposed to transfer proteins and RNA between cells. Exosomes may also play a role in bone tissue engineering. Biology of exosomes from various cancer cell lines, has been studied, but knowledge about exosomes from osteoblastic cells is sparse. We aimed at characterization of exosomes derived from osteoblastic cells and study a role of HSPG in their uptake. Using ultracentrifugation technique, we successfully isolated and characterized exosomes from various osteoblastic cell lines. The exosomes secreted from differentiated osteoblasts differed in their cargo from exosomes secreted under normal conditions. We also observed time-dependent uptake of fluorescently labeled exosomes by osteoblastic cells and investigated involvement of HSPG in their uptake. Further functional analysis using exosomes isolated from osteoblastic cell lines under various culture conditions will allow a better understanding of the role of HSPGs in exosome biology.

研究分野：生化学

キーワード：エクソソーム プロテオグリカン 骨芽細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、歯科領域において、様々な疾患の理由となって失われた顎骨や歯槽骨の骨再生が重要なテーマとして扱われている。有効な骨再生のためには、骨吸収と骨形成の適切なバランスによる骨リモデリングが重要である。細胞表面および細胞外マトリックスの主要な活性分子の一つであるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、様々な細胞外分子 (ヘパリン結合性成長因子、サイトカインなど) と相互作用することが知られており、その中でも特に骨再構築に関与する多くの分子 (BMP-2, TGF- β など) と相互作用することが知られている。このことから、HSPG は破骨細胞および骨芽細胞、両方に影響を及ぼすということが示唆されている。HSPG は細胞表面から細胞内へのその分子の取り込みにも関与すると言われている。具体的には、増殖因子、サイトカイン、リポタンパク質、核酸、病原体などが HSPG 依存的にエンドサイトーシスされ、これらの細胞に対する作用や細胞内輸送を調節していると考えられている。

(2) エクソソームは脂質二重膜を持つ小胞で、細胞から分泌され、他の細胞に取り込まれる事で、細胞間の情報伝達や分子の転送に重要な役割を果たしている。エクソソームは細胞間でタンパク質や miRNA を転送する働きを持っていると考えられており、組織再生プロセスの過程で重要な役割を果たしている事が報告されている。最近、HSPG がこのエクソソームの取り込みに関与している可能性が示唆された。最近の報告では、エクソソームの持つ情報伝達の機能の一つとして骨形成を促進する働きを持つ可能性が強く示唆されている。

(3) これまでに、様々な細胞や組織から調製されたエクソソームに関するデータベースが構築されており、4,000 以上のタンパク質と 700 種類の miRNA が登録されているが、破骨細胞や骨芽細胞由来のエクソソームに関する情報はまだ存在していなかった。さらに、エクソソームの細胞内への取り込みのメカニズムは未だ解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、近年歯槽骨再生に重要な役割を果たしている事が示唆されているヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) とエクソソームに着目し、それらが骨芽細胞および破骨細胞において果たす機能とメカニズムを解明する事である。まず、最初の手掛かりとして、骨芽細胞由来のエクソソームを探索することが効率的であると判断して、本研究では、以下の2つ具体的目標を設定した。

(1) 骨芽細胞由来のエクソソームのキャラクタリゼーション

(2) 骨芽細胞が発現している HSPG の同定及び、骨芽細胞由来のエクソソームの取り込みにおける HSPG の作用

3. 研究の方法

(1) 密度勾配遠心法に基づいたエクソソーム精製方法を用いて、グリセロリルリン酸及びアスコルビン酸有り・無し (分化誘導有り・無し) の状態で培養した前骨芽細胞 (MC3T3-E1、ST2 及び KUSA-A1 細胞) からエクソソームの調製し、生化学的 (イムノブロット法) を用いて、エクソソームのキャラクタリゼーションを行った。

(2) 密度勾配遠心法を用いて、エクソソームの取り込みときに細胞内に形成される HSPG を含む小胞を調整し、液体クロマトグラフィ質量分析法 (LC/MS 法) を用いて、小胞のタンパク成分の同定を行った。

(3) PHK 蛍光標識法を用いて、通常条件及び分化誘導条件下で培養した前骨芽細胞 (MC3T3-E1) 由来エクソソームの膜を蛍光標識し、蛍光標識エクソソームの取り込みを共焦点顕微鏡で観察した。

(4) 生化学的手法を用いて、骨芽細胞が発現している HSPG を同定した。HSPG の合成酵素に対する siRNA を用いて、HSPG をノックダウンした時の蛍光標識エクソソームの取り込みを共焦点顕微鏡で観察し、エクソソームの取り込みにおける HSPG の役割の評価を行った。

4. 研究成果

(1) 前骨芽細胞由来のエクソソームのキャラクタリゼーションを行うためには、高純度のエクソソームの調整が重要と考えられる。実際、同じ細胞からエクソソームを調整しても、精製方法もしくは細胞培養条件によって、全く異なる解析結果が得られる事が最近の報告によって明らかとなっている。そこで、エクソソームの精製方法の条件検討を行い、OptiPrep 密度勾配遠心法に基づいた前骨芽細胞由来のエクソソームの精製方法を確立した。結果、精度の高いプロトコルを確立することができた。次に、種々の前骨芽細胞 (MC3T3-E1、ST2 及び KUSA-A1 細胞) に分化誘導因子を処置して分化させ、前骨芽細胞由来エクソソームを精製し、生化学的を用いて、エクソソームのキャラクタリゼーションを行った。様々なエクソソームのマーカー分子として CD63、TSG101、ALIX、Hsp70、Annexin2、Flotillin-2 などの検出条件を検討・確立し、各細胞における発現及びエクソソームにおける局在を調べた。結果、前骨芽細胞のエクソソームのマーカータンパク質が明らかになった。さらに、前骨芽細胞のエクソソームに局在している HSPG の同定をおこなった。ま

ずへパラン硫酸鎖を特異的に認識する 3G10 抗体を用いたイムノプロット解析の結果から細胞には複数異なる分子量を持つ HSPG が存在することが示唆された。さらに、分化誘導有り・無し状態で培養した前骨芽細胞由来のエクソソームの HSPG 量が異なった(図 1)。

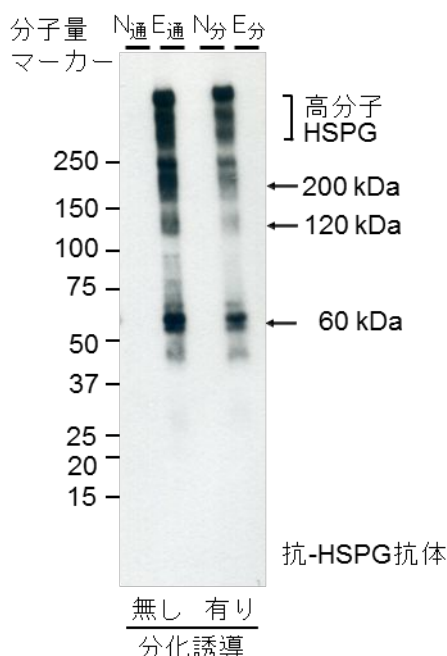


図 1 前骨芽細胞のエクソソームに局在している HSPG の同定。N: ネガティブコントロール、E: エクソソーム、通: 通常条件下で培養した細胞由来のサンプル、分: 分化誘導条件下で培養した細胞由来のサンプル。

よって、通常状態と骨形成因子で活性化させた状態の前骨芽細胞由来のエクソソームの性質が異なることが示唆された。これまでに、様々な細胞から精製されたエクソソームのキャラクター化の報告があったが、前骨芽細胞におけるエクソソームのキャラクター化ははじめてであり、本課題で網羅的に行ったことで、新たなエクソソームに関する基礎知識を得た。

(2) 研究を推進する上で有益な情報として、細胞内に形成される小胞の分離方法を確立し、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS 法)を用いて小胞のキャラクター化を行った。細胞内に形成される HSPG を含む小胞に Rab11、annexin など、30 個以上の小胞輸送に参与するタンパク質を検出することができた。

(3) 通常条件及び分化誘導条件下で培養した前骨芽細胞 (MC3T3-E1) 由来のエクソソ

ーム膜を蛍光標識 (PHK67) することで可視化させた。その蛍光標識されたエクソソームを用いて、細胞内取り込みをリアルタイムで観察を行った。可視化されたエクソソームは時間の依存的に細胞内に取り込まれることを確認された。よって、細胞内取り込みをリアルタイムで観察できるモデルを確立した。そのモデルを用いて、エクソソームの取り込みに及ぼす HSPG の効果を共焦点顕微鏡で観察を行った。評価においては、HSPG の生合成に参与する酵素に対する siRNA を用いることで、細胞へのエクソソームの取り込みに HSPG が与える影響を調べた。HSPG がエクソソームの取り込みの調節に参与している事が示唆された。現在、分子生物学的方法を用いて HSPG が、エクソソームの取り込みの制御に果たしている役割を明らかにする実験を進めている。この関与を解明することで HSPG によるエクソソームの制御メカニズムを見出すことができると考えられる。

(4) 現在、再生医療の領域における骨再生のアプローチとして、自家骨移植や骨誘導再生法などの治療方法が一般に用いられているが、これら手法は患者自身の骨の一部を摘出して利用するため健康面や時間的な負担が大きいことが問題となっている。最近、歯槽骨再生の領域において、患者自身の骨髄由来幹細胞を用いた治療技術が開発されているが、得られる細胞には個体差があり、効果的な処置(治療)をする上で改善の余地がある。近年、エクソソームに関連した研究は、機能の解析などが活発に進められており、潜在的治療薬の開発をする上で注目を浴びている。しかし、その研究は未だ限定的である。エクソソームに関連した研究としては、これまでに癌治療やその診断に焦点が当てられているが、本研究で取り組む歯の移動と骨再生に重要な役割を果たす HSPG によるエクソソームの制御メカニズムを見出すことで、顎骨や歯槽骨を再生に効果的なエクソソームを作成することが可能となり、効率的な新たな治療戦略を提供することが期待される。本研究によってもたらされる知見は、顎骨・歯槽骨等の効率的な再生治療のソリューションを提供することが期待される。

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)

Takashi Ode, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Kazue Terasawa, Jin-Ichi Inokuchi, Toshihide Kobayashi, Tetsuro Watabe, Yuichi Izumi, Miki Hara-Yokoyama, PDMP, a ceramide analogue, acts as an inhibitor of mTORC1 by inducing its translocation from lysosome to endoplasmic reticulum. *Experimental Cell Research*, 査読有, Vol.

350, No.1, 2017, 103–114
DOI: 10.1016/j.yexcr.2016.11.011
Katarzyna A. Podyma-Inoue, Takuya Moriwaki, Anupama R. Rajapakshe, Kazue Terasawa, Miki Hara-Yokoyama, Characterization of heparan sulfate proteoglycan-positive recycling endosomes isolated from glioma cells, *Cancer Genomics and Proteomics*, 査読有, Vol. 13, No. 6, 2016, 443–452,
<http://cgjournals.org/content/13/6/443.1>
ong

Kazue Terasawa, Yuri Tomabeche, Mariko Ikeda, Haruhiko Ehara, Mutsuko Kukimoto-Niino, Motoaki Wakiyama, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Anupama R. Rajapakshe, Tetsuro Watabe, Mikako Shirouzu, Miki Hara-Yokoyama, Lysosome-associated membrane proteins-1 and -2 (LAMP-1 and LAMP-2) assemble via distinct modes, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 査読有, Vol. 479, No. 3, 2016, 489–495,
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.09.093

Kazue Terasawa, Anupama R. Rajapakshe, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Chiemi Mishima-Tsumagari, Masaki Yanagishita, Miki Hara-Yokoyama, Preferential recognition of isocitrate dehydrogenase by a rabbit monoclonal antibody (ab124797) against the C-terminal peptide of RANKL, *Journal of Immunological Methods*, 査読有, Vol. 420, 2015, pp. 1–10
DOI: 10.1016/j.jim.2015.03.006

Anupama R. Rajapakshe, Katarzyna A. Podyma-Inoue, Kazue Terasawa, Katsuya Hasegawa, Toshimitsu Namba, Yasuhiro Kumei, Masaki Yanagishita, Miki Hara-Yokoyama, Lysosome-associated membrane proteins (LAMPs) regulate intracellular positioning of mitochondria in MC3T3-E1 cells, *Experimental Cell Research*, 査読有, Vol. 331, No. 1, 2015, pp. 211–222,
DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.09.014

〔学会発表〕(計3件)

Katarzyna A. Podyma-Inoue, Miki Yokoyama and Tetsuro Watabe, Characterization of extracellular vesicles isolated from osteoblastic cells lines, 第89回日本生化学会大会、2016年9月25–27日、宮城県・仙台市、仙台国際センター／東北大学川内北キャンパス

Katarzyna A. Podyma-Inoue, Anupama R. Rajapakshe, Takuya Moriwaki, Tetsuro Watabe and Miki Yokoyama, Heparan sulfate proteoglycan and intracellular transport; clues from proteomic analysis of transport vesicles. 第88回日本生化学会大

会、2015年12月1–4日、兵庫県・神戸市、神戸ポートアイランド
Katarzyna A. Inoue, Miki Yokoyama, and Masaki Yanagishita, Heparan sulfate proteoglycan and its putative role in trafficking of transglutaminase 2, 第87回日本生化学会大会、2015年10月15–18日、京都府・京都市、国立京都国際会館

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

K A 井上 (INOUE, Katarzyna Anna)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：90302877

(2) 研究分担者

渡一平 (WATARI, Ippei)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教
研究者番号：10431941

横山三紀 (YOKOYAMA, Miki)
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：70191533

桑井康宏 (KUMEI, Yasuhiro)
東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師
研究者番号：30161714