

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03879

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来エクソソームの解析と治療効果の検討

研究課題名(英文) The analysis of the nature of mesenchymal stem cell-derived exosome and its therapeutic effect

研究代表者

古谷野 潔 (KOYANO, Kiyoshi)

九州大学・歯学研究院・特別教員

研究者番号：50195872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：全身投与された間葉系幹細胞(MSC)は炎症局所へ集積し、局所で炎症その他の疾患状態を改善する。本研究ではMSCから放出された物質が損傷した細胞を修復する可能性を探索した。まず健全マウスあるいは薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)モデルマウスからMSC採取、培養、エクソソームの採取を行い、エクソソームに含まれるタンパク質やRNAの質的・量的相違を比較し、MRONJがMSCの治療能力に与える影響を検討したが、明確な差違は認められなかった。

次に、IL-6あるいはTNF- α 存在・非存在下のエクソソームと表現系を比較したが、こちらも顕著な差違は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)は多分化能を有することから、特に再生医療の方面で注目を集めている。しかし、全身投与されたMSCは、炎症がある箇所へ集積し、局所で治療能力を発揮して炎症その他の疾患状態を改善することが報告されるなど、疾患の治療能力を有することが明らかになっている。このとき、MSCは何らかの物質を放出し、損傷した細胞を修復する可能性が考えられる。本研究ではエクソソームに注目し、健全および薬剤関連顎骨壊死(MRONJ)モデルのエクソソームを比較することによってMSCの疾患治療能力の一端を解明することを試みた。本研究では解析手法の蓄積等がなされた。

研究成果の概要(英文)：Systemically administered mesenchymal stem cells (MSCs) accumulate in inflammatory areas and ameliorate inflammation and other disease states locally. In this study, we explored the possibility that substances released from MSCs may repair damaged cells. First, MSCs were collected from healthy mice or medication-related osteonecrosis of the jaw (MRONJ) model mice, cultured, and exosomes were harvested, and qualitative and quantitative differences in proteins and RNAs contained in exosomes were compared to examine the effect of MRONJ on the healing ability of MSCs, but no clear differences were observed.

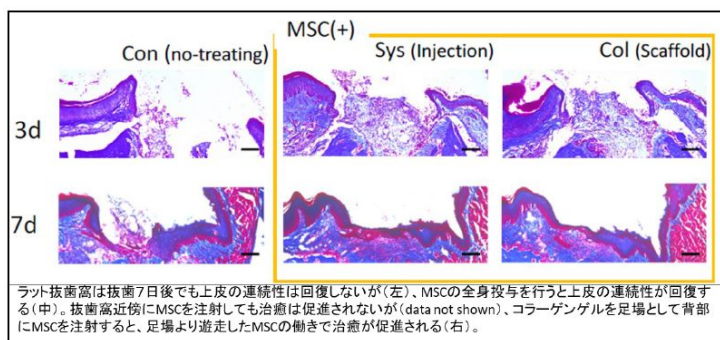
Next, we compared exosomes and phenotypes in the presence or absence of IL-6 or TNF- α , but again, no significant differences were found.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：間葉系幹細胞 エクソソーム 治療効果

1. 研究開始当初の背景

これまで間葉系幹細胞 (MSC) を含む数多くの幹細胞については、組織や臓器の再生の起点となるべく種々の研究が行われてきた。加えて MSC は疾患の治癒能力を有していることが報告されてきている。MSC は静脈注射による全身投与を行うと、障害をうけている局所に集積することが知られている (Takeshita ら、2006)。集積した MSC は、局所で種々の疾患の治癒に役立っている。たとえば肝障害の改善 (Parekkedan ら、2007 ; van Poil ら、2008) や糖尿病 (Urban ら、2010) において全身投与 MSC の効果が報告されている。我々の研究室でも、MSC 全身投与による口腔インプラント周囲軟組織の封鎖性改善 (Kondo et al. PLoS One, 2014、右図) や薬剤関連顎骨壊死 (MRONJ) の症状改善 (Matsuura et al. Stem Cell Res Ther, 2016) を報告してきた。一方で、ラット口腔インプラントモデルにおいて、インプラント近傍への MSC 注射 (局所投与) は高い効果が得られないこと (Kanazawa et al. Int J Implant Dent, 2018) が明らかになった。また、適切な足場材料とともに MSC を皮下注射しておけば、比較的長期間足場内で未分化状態を保ったまま、炎症の惹起とともに足場材料から炎症局所へホーミングすることも明らかにした (Ueda et al. Appl Sci, 2019)。

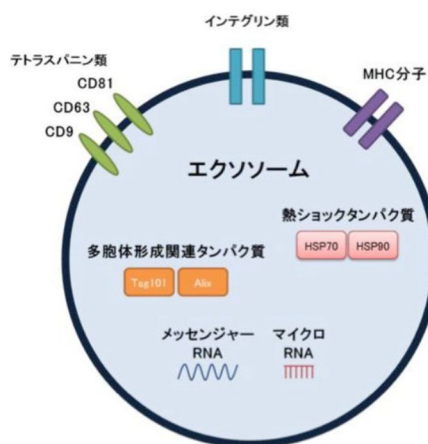


MSC はその名称から明らかなように、

間葉系に分化した細胞であるため、適切な刺激を与えれば脂肪細胞、骨芽細胞、軟骨細胞へ分化するが、さらに胚葉の垣根を越えて肝細胞や神経等へも分化できる、いわゆる「可塑性」が知られている (Banas ら、2006、2007)。全身投与による MSC の疾患治癒能力は、MSC 自体が障害局所において周囲の細胞を治癒させている可能性と、障害局所において対象となる細胞に分化している可能性の二通りが考えられる。しかし、これまでの我々の研究より、GFP 標識した MSC を全身投与して局所に集積したものを観察しても、GFP 陽性細胞が分化して特定の細胞になり、組織や臓器を構成している様子は観察されなかった。つまり、投与された MSC が局所で分化している可能性は排除できないものの、主に MSC 自体が障害局所において周囲の細胞を治癒させている可能性が高いと考えられる。

MSC が周囲の細胞の障害を治療する場合、cell-cell contact によって情報や物質の伝達を行っている可能性と、MSC がなんらかの物質を放出し、能力を発揮している可能性が考えられる。これまでの我々の研究では、MRONJ、インプラント周囲いずれにおいても障害された組織に移行している MSC は、cell-cell contact で周囲の細胞を治癒させるほどの数ではなかった。そのことより、MSC はなんらかの物質を放出し、MSC の極近傍の細胞はもちろん、離れた部位の細胞の治療を行っている可能性の方が高いと考えて差し支えないと思われる。

近年、細胞から放出されるエクソソームが注目されている。エクソソームとは、直径 100 nm 程度の顆粒状物質であり、その表面には細胞膜由来の脂質、タンパク質を含み、内部には核酸 (マイクロ RNA、メッセージ RNA、DNA など) やタンパク質など分泌元の細胞の特徴を反映した物質を含んでいる。また、エクソソームは細胞間の情報伝達に用いられていることが知られており (Valadi ら、2007) 受容する細胞でシグナル伝達や、エクソソームに含まれるタンパク質や核酸等が機能することが考えられている。



2. 研究の目的

本研究計画では、“研究課題の核心をなす学術的「問い」”として MSC が分泌するエクソソームに含まれる物質を解析することによって、MSC の疾患治癒能力のメカニズムを明らかにすること、MSC が放出するエクソソームを解析することによって、MSC を生体に投与することなく疾患治癒能力を獲得するための方策について検討することを当初の目的とした。具体的には、特にこれまで我々が研究を行ってきたモデルであり、手法やデータの蓄積がある MRONJ モデルや、我々が確立した口腔インプラント埋入モデルを用いて、MRONJ 治癒、口腔インプラントのオッセオインテグレーション早期獲得、インプラントの軟組織封鎖性強化を検討することを通して MSC の治癒能力の謎に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) MSC のエクソソーム解析

エクソソーム特異的なタンパク質 CD9 を指標に、培養 MSC からエクソソームを分離する。

(2) MRONJ 由来 MSC、老齢マウス由来 MSC のエクソソーム解析と比較検討

MRONJ 動物、老化促進マウス (SAMP6) より MSC を樹立、実験 1 と同様にエクソソーム解析を行う。

(3) 炎症に反応した MSC のエクソソーム解析

MSC は IL-1、IL-6、TNF- α といった炎症性サイトカインによりホーミング能を発揮する。これらのサイトカインが MSC のエクソソームに何らかの影響を与えていると考えられるため、炎症性サイトカイン存在下の MSC エクソソーム解析を行う。

(4) エクソソーム内包物による疾患制御の検討

疾患治癒効果が高い MSC に (質的・量的に) 特異的に含まれるエクソソーム内容物を用いた疾患治癒の検討を行う。

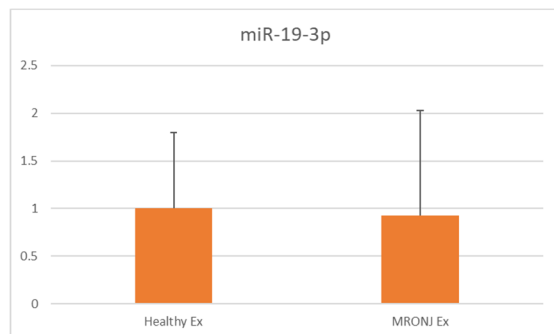
4. 研究成果

(1) MSC のエクソソーム解析

健全マウス骨髄から MSC を採取、培養し、エクソソーム特異的の表面抗原 CD9 を指標にエクソソームを採取した。

(2) MRONJ 由来 MSC のエクソソーム解析と比較検討

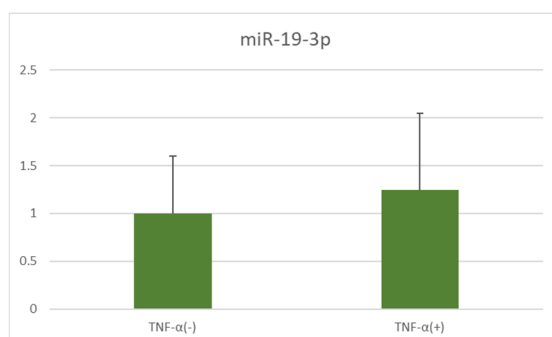
MRONJ を発症させたマウスの骨髄からも (1) と同様に MSC を採取、培養し、エクソソーム特異的の表面抗原 CD9 を指標にエクソソームを採取した。



miRNA(miR-19a-3p)量は健全・MRONJ 群で有意な差は見られなかった。

(3) 炎症に反応した MSC のエクソソーム解析

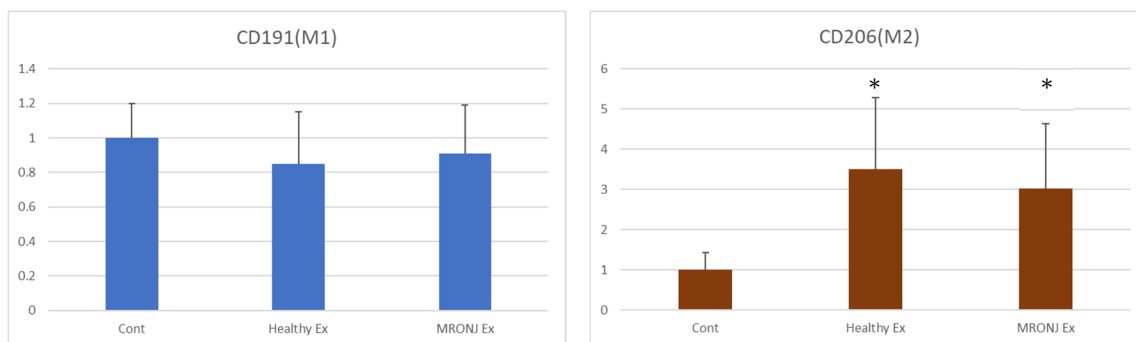
TNF- α 存在下で健全マウスから採取した MSC を培養し、エクソソームを採取した。



TNF- α 刺激はエクソソームの miRNA(miR-19a-3p)量に有意な変化を与えなかった。

(4) エクソソーム内包物による疾患制御の検討

RAW264.7 マクロファージ株細胞に健全マウスから採取したエクソソームを添加すると M1 マクロファージの割合が低減する傾向がみられたが、有意差は認められなかった。一方で M2 マクロファージの割合は有意に増加した。MRONJ マウスから採取したエクソソームを添加しても同様の傾向を示し、両実験群間で有意差は見られなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	熱田 生 (ATSUTA Ikiru) (30423487)	九州大学・歯学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	鮎川 保則 (AYUKAWA Yasunori) (50304697)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

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