

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12714

研究課題名(和文)骨形成関連microRNAを包含したexosomeの開発

研究課題名(英文)Development of exosome including osteogenesis-related microRNA

研究代表者

伊藤 智広(Itoh, Tomohiro)

三重大学・生物資源学研究科・准教授

研究者番号：30435854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨細胞にメカニカルストレスを負荷することで分泌されたエクソソームを骨芽細胞および破骨細胞にそれぞれ添加し、骨形成および骨吸収への影響を検討した。メカニカルストレス処理骨細胞由来のエクソソームの添加は骨芽細胞の分化を誘導せず、破骨細胞様細胞への分化を誘導した。また、メカニカルストレス処理の骨細胞から放出されるエクソソームには、破骨細胞の分化で機能する分子を標的とするmiRNAが多く含まれていた。以上のことから、メカニカルストレスを受けた骨細胞から放出されるエクソソームは、破骨細胞の分化を骨形成よりも優先的にすることが分った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated the effect of exosome (MS-0v) released from mechanical stress-stimulated osteocyte on osteogenesis or osteoclastogenesis. The MS-0v treatment induced osteoclast formation, but had no change in osteoblast differentiation. Moreover, MS-0v contained miRNAs targeting osteoclastogenesis-related molecules. From these results, it was found that MS-0v gives more priority to osteoclastogenesis than to osteogenesis.

研究分野：生化学，食品機能化学，骨代謝化学

キーワード：エクソソーム マイクロRNA 骨細胞 骨芽細胞 分化 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 骨代謝(骨芽細胞分化, 破骨細胞分化など)においてマイクロRNA (microRNA, 以下 miRNA) が機能的に作用し, 代謝調節を行なうことが多々報告されている。著者らも, これまでに強力に骨芽細胞分化を誘導する bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) 誘導における骨芽細胞分化において, miR-NA-141, miRNA-200a, miRNA-208, miRNA-370 の発現低下が, 骨芽細胞分化初期に機能する転写因子 distal-less homeobox 5 (Dlx5), v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (Ets1) の上方発現に寄与していることを報告した(科学研究費補助金, 若手研究(B), 課題番号:21700715)。さらに, 静水圧によるメカニカルストレス負荷による骨芽細胞の分化に寄与する miRNA についても, 骨芽細胞が産生し, 骨形成の促進作用の機能を示す semaphorin 3A (sema3A) を標的遺伝子とする 3 種の miRNAs (miRNA-195a-5p, miRNA-322-5p, miRNA-497a-5p) の発現低下を確認した(学術研究助成基金, 若手研究(B), 課題番号:24700767)。以上のように, 分化シグナルが「ON」になった骨芽細胞内では, その分化プロセスにおいて miRNA が一役を担っていることは間違いのないことがこれまでの研究から確認できた。

(2) 近年, ヒトの体を構成する最小単位である細胞が細胞間のコミュニケーションツールとして膜小胞(以下エクソソーム)を分泌し, 増殖や分化などの生体機能の調節を行っていることが明らかになってきた。著者らもガン細胞や骨芽細胞から分泌されたエクソソームに含まれる miRNA やタンパク質に着目し, 増殖や転移, 分化機構への影響について検討してきた(Akao et al., Mol. Ther. 19, 395-399 (2011))。骨代謝とエクソソームについては, Xu らが骨芽細胞分化の際に放出するエクソソーム中の miRNA のプロフィールが変化することを報告し(PLoS One, 9, e114627.doi:10.1371/journal.pone.0114627.eCollection 2014), 骨芽細胞分化においてもエクソソームを介した分化制御機構が働いていることが分かってきた。メカニカルストレス負荷における骨芽細胞分化には, 骨小腔中の骨細胞が指令役となっていることが考えられており, 国内外の研究から, 傍骨細胞間隙を介した細胞外ネットワークでは, 骨細胞が高発現している液性因子スクレロスタチン(Sost)が Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを下方制御することで骨芽細胞の機能を抑制し, 骨形成が制御されると報告されている(Robling et al., J Biol Chem. ,283, 5866-5875 (2008))。しかし, 骨細胞から分泌されるエクソソームの骨代謝(骨形成)における役割については未だ明らかにされていない。この骨細胞から放出されるエクソソームの骨代謝における機能が明らかにできれば, 創薬の創出に繋げる

ことができると考えられる。

2. 研究の目的

私たちの骨は, 立位状態では常に重力の負荷を受け, 歩行や運動ではさらに荷重負荷を受けている。骨細胞は, メカニカルストレス負荷における骨形成の司令塔の役割を担っており, 骨細胞に発現している液性因子スクレロスタチンを調節することで骨芽細胞の分化を制御している。本研究課題では, メカニカルストレス負荷による骨形成機構において, 未だ検討されていない骨細胞から分泌されるエクソソームを介した骨形成調節機構をエクソソーム中に含まれる miRNA の機能に着目して検証するとともに, ドラッグデリバリーシステム(DDS)として, マクロファージおよびヒト親知らず歯髄細胞から樹立した iPS 細胞から分泌されるエクソソームに骨形成関連 miRNA を包含したエクソソームの開発が可能か検討した。

3. 研究の方法

(1) 骨細胞および骨芽細胞へのメカニカルストレス負荷

静水圧刺激装置(ストレックス株式会社製 SPB-1000)を用いて(図1)加圧ストレスをマウス長骨由来骨細胞様株 MLO-Y4 細胞およびマウス前駆骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞にそれぞれ与え, 分化ステージに移行させた。加圧処理後の各細胞培養液を回収し, エクソソームの単離を行なった。

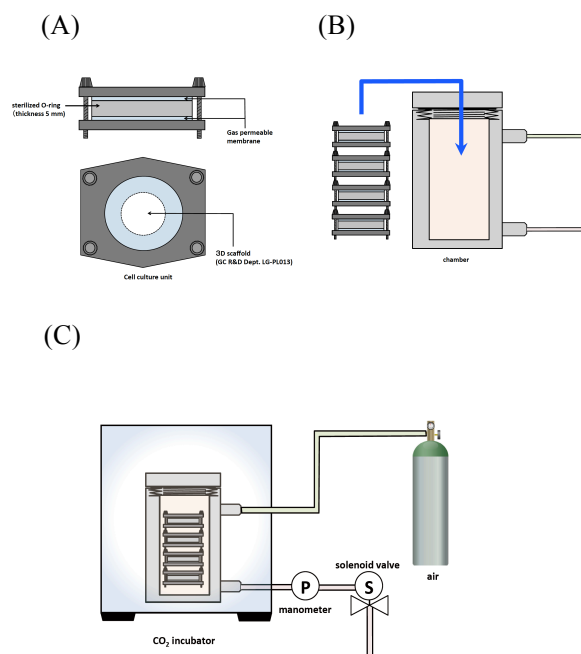


図1. メカニカルストレス負荷装置

(A) 培養ユニット, (B) 加圧チャンバー, (C) 培養システム. チャンバー内に混合空気を満たすことで1.5 MPaのメカニカルストレスを培養細胞に与える。培養細胞はOリ

ングの上下を混合空気透過性のフィルターを挟むことで培養条件を整えている。

#### (2) エクソソームの調製

回収した培地からのエクソソームの回収は超遠心法により行なった。はじめに、回収した培地に含まれる細胞デブリスを7,000×g, 4°C, 30分間遠心処理にて除去した(日立工機(株), CR22GIII)。得られた上澄みをさらに超遠心機(ベックマンコウルター(株), Optima™TLX)により100,000×g, 4°Cにて90分間遠心処理した。沈殿物を回収エクソソームとし、粒子径をナノ粒子解析システム NanoSight (日本カンタム・デザイン(株))により測定した。

#### (3) メカニカルストレス負荷骨細胞および骨芽細胞培養培地から調製したエクソソームによる骨芽細胞分化への影響

NanoSightによりエクソソーム懸濁液1 mLあたりの粒子個数を算出し、滅菌PBSにて $2 \times 10^8$ 個/mLに調製した。調製したエクソソームを24ウェルプレートに播種したMC3T3-E1細胞に50 μL/wellずつ添加し、72時間培養した。分化の評価は、分化度合いの指標となるアルカリホスファターゼ(Alkaline Phosphatase, 以下ALP)活性(タカラバイオ(株), TRACP & ALP Assay kit)を用いて行なった。

#### (4) メカニカルストレス負荷骨細胞および骨芽細胞培養培地から調製したエクソソームに含まれるmiRNAプロファイル解析

回収したエクソソームをmirVana™miRNA isolation kit(サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株))により調製後、東レ株式会社3D-Gene® miRNA arrayに供することで加圧ストレスによるmiRNA発変動プロファイルを解析した。

#### (5) メカニカルストレス負荷骨細胞培養培地から調製したエクソソームによる破骨細胞分化への影響

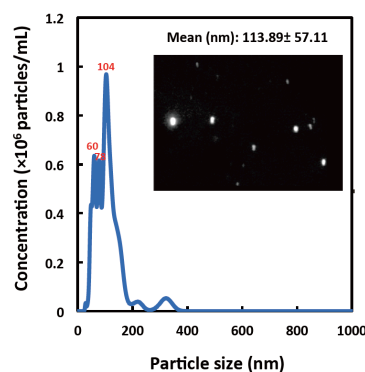
骨芽細胞分化同様に、破骨細胞分化においても調製したエクソソームを24ウェルプレートに播種したマウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞(国立研究開発法人国立長寿医療研究センター池田恭治博士より分与提供)に50 μL/wellとずつ添加し、6日間培養した。陽性対照として、receptor activator of the NF-κB ligand(以下RANKL; 50 ng/mL, オリエンタル酵母(株))により刺激した。分化の評価は、分化度合いの指標となる酒石酸耐性産生ホスファターゼ(Tartrate-resistant Acid Phosphatase, 以下TRACP)活性(タカラバイオ(株), TRACP & ALP Assay kit)を用いて行なった。

## 4. 研究成果

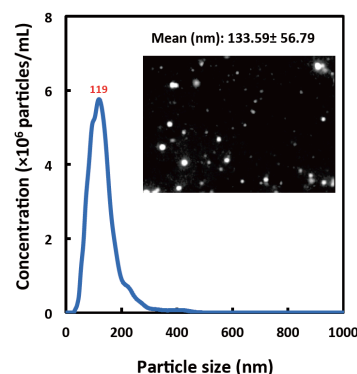
### (1) エクソソームの調製

メカニカルストレス処理および未処理の骨細胞および骨芽細胞から培地中に分泌(放出)されたエクソソームを超遠心法により回収した。回収したエクソソームの粒子径をナノ粒子解析システム NanoSightにより測定したところ、骨細胞由来のエクソソームは、メカニカルストレスを負荷することで粒子径が若干メカニカルストレス未処理の骨細胞が分泌するエクソソームよりも大きくなる傾向が見られた(図2)。

#### (A) メカニカルストレス未処理



#### (B) メカニカルストレス処理



### 図2. メカニカルストレス負荷骨細胞分泌エクソソームの粒径解析

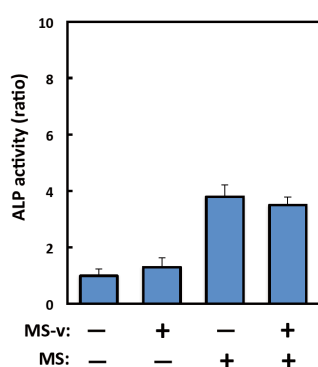
(A) メカニカルストレス未処理, (B) メカニカルストレス処理. メカニカルストレスを負荷することによりエクソソームの粒径分布が若干大きくなる。

#### (2) メカニカルストレス負荷骨細胞および骨芽細胞培養培地から調製したエクソソームによる骨芽細胞分化への影響

メカニカルストレス処理および未処理の骨細胞または骨芽細胞から分泌されたエクソソームをメカニカルストレス処理および未処理のMC3T3-E1細胞のそれぞれ添加し、72時間後の骨芽細胞分化への影響をALP活性を指標に評価した。その結果、メカニカルストレス処理および未処理の骨細胞から調製したエクソソームをメカニカルストレス処理および未処理のMC3T3-E1細胞にそ

れぞれ添加しても、MC3T3-E1 細胞の分化を促進しなかった (図 3 A)。一方、メカニカルストレス処理および未処理の骨芽細胞から調製したエクソソームをメカニカルストレス処理および未処理の MC3T3-E1 細胞にそれぞれ添加すると、メカニカルストレスを与えていない MC3T3-E1 細胞にメカニカルストレス処理および未処理の骨芽細胞から調製したエクソソームを添加しても分化は促進しなかったが、メカニカルストレスを与えた MC3T3-E1 細胞にメカニカルストレス処理の骨芽細胞から調製したエクソソームを添加すると MC3T3-E1 細胞の分化が促進した (図 3 B)。

(A) MLO-Y4 細胞から調製したエクソソームによる MC3T3-E1 細胞の分化への影響



(B) MC3T3-E1 細胞から調製したエクソソームによる MC3T3-E1 細胞の分化への影響

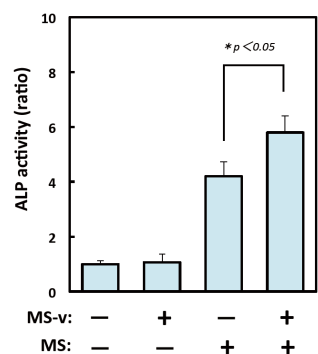


図 3. メカニカルストレス負荷骨細胞および骨芽細胞培養培地から調製したエクソソームによる骨芽細胞分化への影響

MS-v: (-) メカニカルストレス未処理の細胞から回収したエクソソーム処理, (+) メカニカルストレス処理の細胞から回収したエクソソーム処理, MS: (-) メカニカルストレス未処理 MC3T3-E1 細胞, (+) メカニカルストレス処理 MC3T3-E1 細胞をそれぞれ示す。

これらの結果から、骨細胞のエクソソームには骨芽細胞分化を誘導する機能がない (≒エクソソーム内包物に骨芽細胞分化の誘導に資する物質が入っていない) こと、エクソ

ソームを受容する細胞側の状態 (今回の実験では、骨芽細胞の分化スイッチが「ON」になっていること) がエクソソームが機能する上では重要な条件の一つであることが推察された。骨芽細胞の分化においては、細胞膜表面に存在する受容体分子の発現状態が未分化状態とは異なっており、分化の際にエクソソームが受容細胞で効率よく機能するためには、受容細胞に取り込まれやすくなる必要がある。図 3 B の結果は、エクソソームが受容細胞膜表面に存在する受容体分子やその他の接着分子と結合し、細胞内に取り込まれ易くなるためにエクソソーム膜表面分子の構成を定常 (未分化) 状態から変化させたことが影響していることも考えられた。したがって、エクソソームの内包物の変化だけでなく、メカニカルストレス負荷により変化するエクソソームの膜表面分子プロフィールについても検討する必要がある。

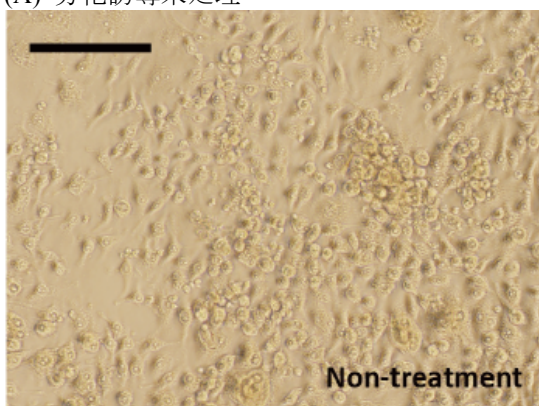
(3) メカニカルストレス負荷骨細胞および骨芽細胞培養培地から調製したエクソソームに含まれる miRNA プロフィール解析

メカニカルストレス未処理または処理の骨細胞および骨芽細胞が分泌するエクソソームに内包される miRNA を東レ株式会社 3D-Gen<sup>®</sup> miRNA array に供することで加圧ストレスによる miRNA 発現変動プロフィールを解析した。メカニカルストレス未処理または処理した骨細胞がそれぞれ分泌するエクソソームに内包される miRNA の発現変動プロフィール解析を行なったところ、破骨細胞の分化に関わる分子を標的とする miRNA の発現がメカニカルストレス負荷により大きく変化することを確認した。現在、その顕著に発現が変化した miRNA と破骨細胞分化との関係について検証を進めている。

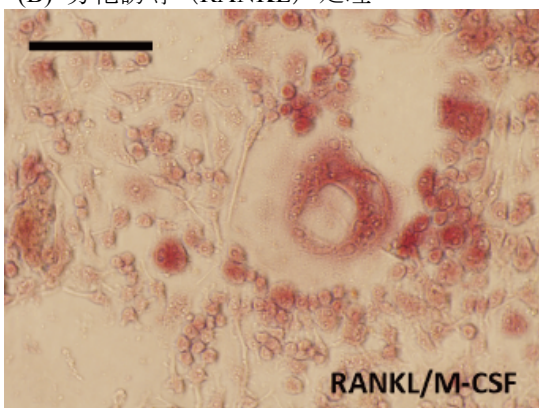
(4) メカニカルストレス負荷骨細胞培養培地から調製したエクソソームによる破骨細胞分化への影響

前述 4-(4) において、骨細胞が分泌するエクソソームでは、メカニカルストレス負荷により破骨細胞の分化に関わる分子を標的とする miRNA の発現に大きな変化が見られたことから、骨細胞が分泌するエクソソームの破骨細胞分化への影響についてマウスマクロファージ RAW264.7 細胞を用いて検証した。その結果、メカニカルストレス処理のエクソソームで処理した細胞は、RANKL 刺激により分化誘導した細胞と比較して分化度合い (図 4 A, 4 B) は弱いものの、破骨細胞の分化を誘導する機能を示した (図 4 C)。一方、メカニカルストレス未処理の骨細胞エクソソームでは、分化誘導を示さなかった (図 4 D)。

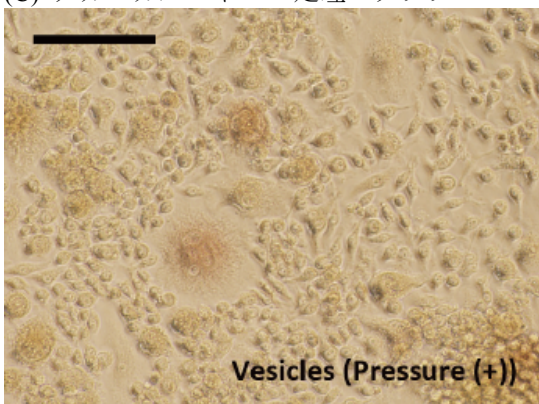
(A) 分化誘導未処理



(B) 分化誘導 (RANKL) 処理



(C) メカニカルストレス処理エクソソーム



(D) メカニカルストレス処理エクソソーム

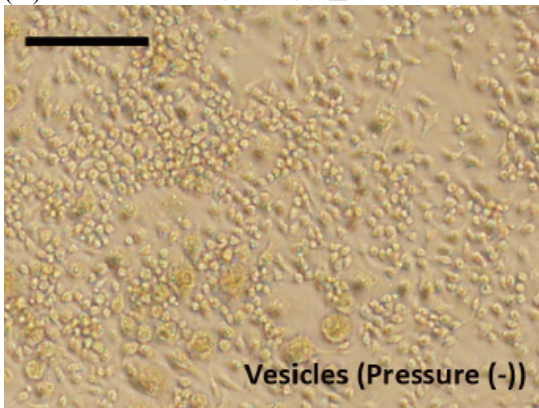


図 4. メカニカルストレス負荷骨細胞培養培地から調製したエクソソームによる

## 破骨細胞分化への影響

スケールは 150  $\mu\text{m}$  を示す.

これら結果から、メカニカルストレスを受した骨細胞が分泌するエクソソームは、骨芽細胞の分化よりも破骨細胞の分化に寄与することが示唆された。これは、骨代謝において、「まず骨が壊され、新しい骨が作られる」というホメオスタシス機構に骨細胞が放出するエクソソームが一部関与することを支持する情報であると考えられた。

### (6) 総括

メカニカルストレス負荷によりエクソソームに包含される miRNA が骨代謝調節に関与することが確認できた。現在、これら miRNA の標的分子については解析中であり、今後明らかになることが期待される。研究計画では、これら骨代謝関連 miRNA を、1 種類で多人数に適合する特殊な白血球型 (HLA ハプロタイプホモ) を持つヒト歯髄細胞 iPS 細胞から分泌されるエクソソームに包含し、医薬への応用を検討する目標であったが、本課題を遂行する中で、エクソソームを活用するには内包物だけではなく、受容する細胞に対するエクソソームの膜分子の条件検討も重ねて進める必要があることが分った。したがって、副作用の面から有用であると考えられたヒト歯髄細胞 iPS 細胞から分泌されるエクソソームの膜性状についても充分検討し、受容細胞への取り込みへの影響を明らかにしなければならない。

### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

#### ① 伊藤智広, 赤尾幸博

メカニカルストレス負荷骨細胞から分泌された exosome は 破骨細胞の分化を誘導する

第 138 回日本薬学会 (石川県音楽堂他, 石川県金沢市, 2018.3.26)

#### ② 伊藤智広, 赤尾幸博

microRNA 発現を利用した骨芽細胞分化評価法の検討

日本農芸化学会 2017 年度大会 (京都女子大学, 京都府京都市, 2017.3.19)

#### ③ 伊藤智広, 赤尾幸博

メカニカルストレス負荷骨芽細胞分化における miRNA の役割

第 80 回日本生化学会中部支部例会 (三重大学, 三重県津市, 2016.5.21)

[図書] (計 0 件)

記載事項なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)  
記載事項なし

○取得状況 (計 0件)  
記載事項なし

[その他]

ホームページ等

<http://tomo-itoh.wixsite.com/mie-uni-mcam>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

伊藤 智広 (ITOHI, Tomohiro)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：30435854

### (2)研究分担者

該当者なし

### (3)連携研究者

赤尾 幸博 (AKAO, Yukihiro)

岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号：00222505

### (4)研究協力者

該当者なし