

令和 元年 6 月 18 日現在

機関番号：27101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01368

研究課題名(和文) エクソソームを基軸とした石灰化形成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of mineralized tissue formation based on cell secreted exosomes

研究代表者

木原 隆典 (Kihara, Takanori)

北九州市立大学・国際環境工学部・准教授

研究者番号：90436535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は細胞が分泌する膜小胞であるエクソソームに着目し、エクソソームと石灰化形成との関係について明らかにした。分泌される細胞自体の石灰化形成能の有無に関わらず、エクソソームには石灰化核形成能があることを生化学的解析と電子顕微鏡観察から明らかにした。さらにエクソソームと骨芽細胞が分泌する基質小胞の類似している点と異なる点を明らかにした。また、ラット間葉系幹細胞を骨分化誘導することで生じる石灰化組織形成にエクソソームが寄与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は骨芽細胞が分泌する基質小胞はエクソソームの1グループであり、両者の違いが石灰化形成能ではなく、アルカリフォスファターゼ活性能であることを見出した。こうしたエクソソームと基質小胞の関係を示すことができた点が本研究の学術的意義である。また本研究の結果は、異所性石灰化形成において様々な細胞のエクソソームが石灰化核になれることを示しており、こうしたプロセスを抑制することが異所性石灰化の発症抑制につながることを示している。

研究成果の概要(英文)：Mineralized tissue formation is highly regulated by osteogenic cells in our body. In this project, we examined whether exosomes, which were secreted from cells, involved the mineralization process of osteogenic cells in vitro. We extracted exosomes from culture media of osteogenic and non-osteogenic cells. We found that exosomes had crystal nucleation ability in simulated body fluid regardless of the type of cells. We further found that exosomes from mesenchymal stem cells contributed mineralized tissue formation. Thus, exosomes are biochemical extracellular regulators for mineralized tissue formation.

研究分野：組織細胞工学

キーワード：石灰化 エクソソーム 骨形成細胞 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

石灰化はリン酸カルシウムであるハイドロキシアパタイトの結晶形成であり、試験管内ではリン酸イオンとカルシウムイオンの過飽和溶液中で容易に形成される。しかしながら、生体内では石灰化は高度に制御された過程であり、通常は発生時や骨リモデリング時といった、限られた場所・タイミングでのみ生じる。ただし生体内であっても、動脈硬化や慢性腎炎、筋ジストロフィーなどの疾患時には、その合併症として血管や骨格筋などの組織で異所性の石灰化(本来生じない組織での石灰化)が生じる。異所性石灰化は組織の炎症や脆弱を引き起こし、症状の悪化に繋がる。こうした異所性石灰化は生体の有する石灰化制御機構の破綻によって生じると考えられる。

生体における骨石灰化の形成は、骨芽細胞によって分泌される基質小胞と呼ばれる細胞外小胞から始まるとされる。基質小胞が起点となって微小な石灰化が形成され、周囲のコラーゲン繊維を基質として石灰化が拡大する。そのため、骨芽細胞による基質小胞の分泌と基質小胞が沈着する細胞外環境の形成が、骨石灰化の重要な工程になる。

研究代表者はこれまで、細胞培養系で形成される石灰化組織の研究を進めてきた。その過程で、骨形成細胞の種類によって生体外で形成する石灰化組織の構造が異なること、特にラット間葉系幹細胞が骨分化過程で形成する石灰化組織が生体内類似の構造を示すことを見出した。

こうした中で研究代表者は、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞とこれまで骨芽細胞が分泌するとされてきた基質小胞の抽出方法が同一であることから、両者の関係性について明らかにする必要があると考えた。エクソソームは細胞から分泌される直径が 100 nm ほどの細胞外小胞であり、その内部はタンパク質だけでなく、mRNA や miRNA といった核酸が含まれる。エクソソームは血液、リンパ液、尿などの体液中に存在し、これら体液を介して離れた組織・器官へと到達する。そのため、エクソソームはホルモンやサイトカインなどのリガンド分子とは異なった細胞間情報伝達の担い手として研究が進められている。予備的に骨形成細胞から分泌されるエクソソームを抽出したところ、エクソソームには基質小胞同様にアルカリフォスファターゼ活性があること、擬似体液中で石灰化を生じることを見出した。このことは、骨形成細胞のエクソソームが基質小胞と同様な機能を持つ可能性を示唆する。

2. 研究の目的

本研究は、骨形成細胞による石灰化形成機構の解明を目的に、特に骨形成細胞およびその他の細胞が分泌するエクソソームが石灰化とどのように関わるのか、細胞外に分泌されたエクソソームはどのように石灰化を制御しているのか、エクソソームは石灰化形成過程でも細胞間情報伝達物質として機能するのかについて明らかにすることを目標とした(図1)。

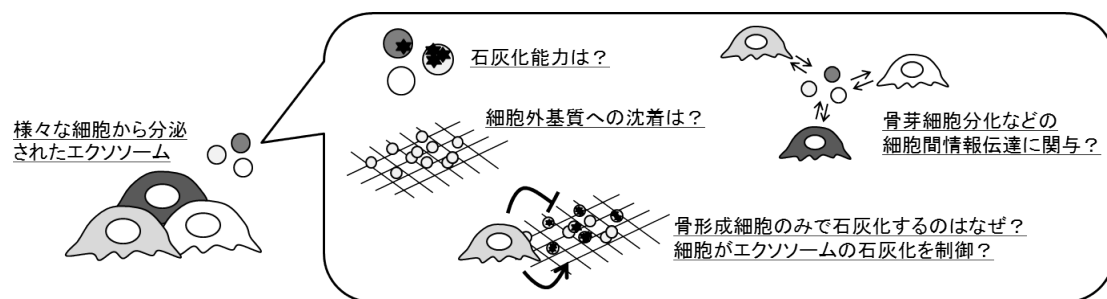


図1 本研究の当初の目的

3. 研究の方法

細胞はヒト骨肉腫細胞 (Human osteosarcoma, HOS)、マウス骨芽前駆細胞 MC3T3-E1、ラット間葉系幹細胞、ヒト子宮頸がん HeLa 細胞を用いた。

エクソソームは細胞の培養上清から回収した。細胞はエクソソームフリーの血清で培養し、その培養上清から市販のエクソソーム抽出キットによって抽出した。抽出されたエクソソームの濃度はタンパク質濃度で規格化した。また実際にエクソソームが抽出できているかは透過型電子顕微鏡 (TEM) で観察することで確認した。

エクソソームの石灰化核形成能は 1.5 倍濃縮の擬似体液中で石灰化が形成されるかで試験を行った。また実際にエクソソームが核となって石灰化しているかは、エクソソームを基盤上に固定し、石灰化したエクソソームを走査型電子顕微鏡 (SEM) で直接観察することで確認した。

非特異的な細胞の石灰化は培養上清中に直接無機リン酸を添加することで誘導した。石灰化の確認は、カルシウムイオンキレート蛍光分子であるカルセインを用いて蛍光顕微鏡で観察することで行った。

4. 研究成果

(1) エクソソームと基質小胞の関係性の解析

はじめに、HOS 細胞を用いてエクソソームと基質小胞の関係性の検証を行った。HOS 細胞

が作るエクソソームを可視化するため、エクソソーム特異的な膜タンパク質 CD63 に GFP を融合させたタンパク質を発現するプラスミドを HOS 細胞に遺伝子導入し、さらにこの CD63-GFP タンパク質を恒常的に発現する HOS-CD63-GFP 細胞を作製した。HOS 細胞において CD63-GFP は細胞内の核近傍に局在していた。また HOS-CD63-GFP を石灰化誘導条件下で培養したところ、石灰化の内部で GFP の蛍光を確認することができ、石灰化とエクソソームが直接関係していることが推察された。そこでこの細胞からエクソソームを抽出したところ、確かにエクソソーム抽出画分中に GFP の蛍光を確認することができた。また TEM による観察では、脂質膜を有する小胞を確認することができた。エクソソームと基質小胞との関係を調べるため、基質小胞特異的に存在するアルカリフォスファターゼの活性を調べたところ、抽出されたエクソソーム画分にはアルカリフォスファターゼ活性があった。さらに、基質小胞の機能的特徴である石灰化核形成能をエクソソームが持つか疑似体液を用いて検証した。その結果、エクソソーム画分にも石灰化核形成能があることがわかった。実際にエクソソームが石灰化核になっているかを、エクソソームを電子顕微鏡観察用の基盤上に固定し、石灰化誘導を行ったところ、確かにエクソソームが石灰化していることを SEM で観察することに成功した。以上より、HOS 細胞から抽出されたエクソソームは、石灰化に対して基質小胞と同様の能力を有することがわかった。

(2) 各種細胞エクソソームの石灰化解析

次に、MC3T3-E1 や HeLa 細胞からエクソソームを抽出し、これらの ALP 活性ならびに石灰化核形成能を調べた。未分化 MC3T3-E1 細胞と HeLa 細胞のいずれにおいても、抽出されたエクソソームで HOS 細胞エクソソームのようなアルカリフォスファターゼ活性は見られなかった。このことは基質小胞を分泌する細胞のみでエクソソームが ALP 活性を持ちうることを示唆する。さらにこれら細胞抽出エクソソームの石灰化核形成能を調べたところ、未分化 MC3T3-E1 細胞、HeLa 細胞のいずれのエクソソームにおいても、石灰化が生じた。さらに、このエクソソームの石灰化は SEM でも直接確認することができた。つまり、これまで基質小胞のみが有すると考えられてきた石灰化核形成能は、実は細胞が分泌するエクソソーム自体が有する機能であり、基質小胞特異的な特徴はアルカリフォスファターゼ活性といった、石灰化の環境形成に作用する酵素活性のみであることが見出された。

(3) 細胞の非特異的石灰化

骨形成細胞に関わらず、細胞が分泌するエクソソームには石灰化核形成能があることが見出されたため、エクソソームが沈着している細胞層には、石灰化核形成能があるのかについて検討を行った。HOS 細胞、未分化 MC3T3-E1 細胞、HeLa 細胞に無機リン酸を添加し、非特異的な石灰化誘導を行った。その結果、HOS 細胞、HeLa 細胞では非特異的な石灰化が形成されること、MC3T3-E1 細胞では非特異的な石灰化が形成されないことが明らかとなった。HOS 細胞、HeLa 細胞のエクソソームのみならず、MC3T3-E1 細胞のエクソソームにも石灰化核形成能はあるため、MC3T3-E1 細胞では積極的に非特異的な石灰化を抑制する機構があることが示唆された。また、HOS 細胞と MC3T3-E1 細胞では形成される石灰化の構造が異なっており、HOS 細胞では非特異的な石灰化同様の球状石灰化が形成されるが、MC3T3-E1 細胞では大型の石灰化物が形成される。非特異的な石灰化の抑制機構はこうした石灰化組織の構造の制御に関与している可能性がある。

(4) ラット間葉系幹細胞が形成する石灰化構造体に対するエクソソームの作用

ラット間葉系幹細胞を骨芽細胞分化誘導条件下で培養すると、生体内の骨組織に類似した大型の石灰化組織を形成する。この石灰化組織形成にエクソソームが関与するか検討を行った。ラット間葉系幹細胞から抽出したエクソソームも他の細胞エクソソームと同様に石灰化核形成能があった。また細胞層で非特異的な石灰化が生じるか検討したところ、非特異的な石灰化は生じるが、HOS 細胞や HeLa 細胞に比べると非特異的な石灰化形成は抑制されていることがわかった。次に、ラット間葉系幹細胞の形成する石灰化組織を SEM によって詳細に解析すると、培養皿との界面にハイドロキシアパタイトの結晶からなる層が形成され、その上にコラーゲン繊維と球状の石灰化からなる石灰化層が形成されていることがわかった。そこで、エクソソームの分泌を阻害することが知られている GW4869 を加えて培養したところ、ラット間葉系幹細胞による石灰化形成は抑制されることがわかった。特に 2 層目のコラーゲン繊維と球状石灰化からなる石灰化層の形成が抑制されており、この球状の石灰化物がエクソソーム由来で生じている可能性が高い。さらに、基質小胞の膜上で無機リン酸の輸送を行うリン酸トランスポーターの阻害を行ったところ、ラット間葉系幹細胞による石灰化が完全に抑制された。このことは、ラット間葉系幹細胞の石灰化にはリン酸トランスポーターが必要であること、またエクソソームは特に 2 層目の石灰化層の形成に寄与することがわかった。

(5) その他の成果

本研究の実施にあたり、こうした成果以外にもその過程でいくつかの派生的な成果が得られたので簡単に紹介する。まず HOS 細胞などの細胞動態をコンピュータ上で再現するためのシミュレーションを構築することができた。さらに、ラット間葉系幹細胞の石灰化形成過程にお

いて、細胞骨格であるアクチン線維が関与することを見出した。また、HOS細胞、HeLa細胞以外のがん細胞の培養も行い、がん細胞の活性を抑制する天然成分の効果を見つけることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Phan, T.K.T., Shahbazzadeh, F., Pham, T.T.H., Kihara, T., Alpha-mangostin inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells, PeerJ, 6, e5027 (2018) 査読有
DOI: 10.7717/peerj.5027

Kihara, T., Sugimoto, Y., Shinohara, S., Takaoka, S., Miyake, J., Cysteine-rich protein 2 accelerates actin filament cluster formation, PLoS One, 12 (8), e0183085 (2017) 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0183085

Kihara, T., Kashitani, K., Miyake, J., In silico characterization of cell-cell interactions using a cellular automata model of cell culture, BMC Res Notes, 10 (1), 283 (2017) 査読有
DOI: 10.1186/s13104-017-2613-x

〔学会発表〕(計18件)

Kuwada, Y., Kihara, T., Mechanism of mineralized tissue formation by rat mesenchymal stem cells, 2018 ASCB EMBO Meeting (2018)

Phan, T.K.T., Shahbazzadeh, F., Kihara, T., Alpha-mangostin inhibits the migration and invasion of A549 lung cancer cells, 2018 ASCB EMBO Meeting (2018)

木原隆典, 桑田裕太, 内山大輝, 細胞による骨石灰化形成機構の解明, 第50回日本結合組織学会学術大会 (2018)

木原隆典, 中橋誉仁, 松本光, 立花宏一, 白血球における細胞接着と機械特性の必要十分な関係, 第41回日本分子生物学会年会 (2018)

高橋尚生, 木原隆典, 骨組織を介した破骨細胞へのエクソソーム伝達, 第54回化学関連支部合同九州大会 (2017)

桑田裕太, 内山大輝, 木原隆典, 骨石灰化形成機構の解明, 2017年度生命科学系合同年次大会 ConBio2017 (2017)

桑田裕太, 内山大輝, 木原隆典, 骨石灰化形成機構の解明, 第54回化学関連支部合同九州大会 (2017)

Takahashi, N., Kihara, T., Exosomes transfer into osteoclasts through bone tissue, ASCB EMBO 2017 meeting (2017)

Phan, T.K.T., Kihara, T., Alpha-mangostin inhibits migration and invasion of cancer cells, 第54回化学関連支部合同九州大会 (2017)

Phan, T.K.T., Shahbazadeh, F., Kihara, T., Alpha-mangostin inhibits migration and invasion of cancer cells, 2017年度生命科学系合同年次大会 ConBio2017 (2017)

山下智子, 出口裕太, 木原隆典, 平滑筋細胞の形質制御を実現する培養基材の開発, 第54回化学関連支部合同九州大会 (2017)

梅津千耶, 木原隆典, 骨形成細胞の石灰化形成におけるリン酸イオン環境の影響, 第53回化学関連支部合同九州大会 (2016)

内山大輝, 木原隆典, 骨形成細胞エクソソームによる石灰化の制御, 第39回日本分子生物学会年会 (2016)

内山大輝, 木原隆典, 骨形成細胞エクソソームによる石灰化の制御, 第53回化学関連支部合同九州大会 (2016)

高橋尚生, 木原隆典, 石灰化を介した破骨細胞へのエクソソームの伝達, 第39回日本分子生物学会年会 (2016)

高橋尚生, 木原隆典, 石灰化を介した破骨細胞へのエクソソームの伝達, 第53回化学関連支部合同九州大会 (2016)

木原隆典, 骨再生におけるバイオマテリアルの効果, 第37回日本炎症・再生医学会 (2016)

Umez, C., Kihara, T., Small mineralized crystals formed by osteogenic cells in 3D collagen gel culture, 2016 ASCB annual meeting (2016)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://takanori-kihara.jimdo.com/>

6 . 研究組織

- (1)研究分担者 なし
- (2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。