

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15812

研究課題名(和文) Exosomeを応用した多面的アプローチによる新規骨再生法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of osteoblastic cell or immature MSC derived exosomes for bone regeneration

研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：50456654

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症抑制や血管新生、あるいは骨分化のそれぞれに機能するexosomeの産生を、各々の機能付加に適した培養刺激を培養中の間葉系幹細胞(MSC)に与えることで誘導し、それらMSC由来のexosome(MSC-ex)を全身や局所にデリバリーすることの有用性について評価した。その結果、骨芽細胞分化誘導後のMSC-exについて骨再生への有用性が一部示唆された。現在、炎症抑制や血管新生への機能に有利と思われる未分化MSC由来のMSC-exの機能と合わせて、生体での有用性について検討を実施している。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to analyze the function of MSC-derived exosomes (MSC-ex) that were harvested from the different stages of differentiation such as immature-, preosteoblastic differentiated-, osteoblastic differentiated-MSCs. In this study, we firstly analyzed the characters of these 3 different MSC-exes, and then evaluated the characteristic changes of MSCs after cultured in medium with these MSC-exes. As results, we found the osteoblastic differentiated-MSC-ex showed the increased expression of osteoblastic genes such as runx2 or alp. Furthermore, we confirmed these MSC-exes are taken into MSCs during 24 hours in culture, and the osteogenic mRNAs were upregulated in MSCs cultured with osteoblastic-differentiated-MSC-ex. In contrast, immature-MSC-ex showed the higher expression levels of mRNAs related to the vasculogenesis such as vegf. We are currently carrying out in vivo analyses for clarifying the actual usefulness of MSC-exes for bone regeneration.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：骨再生 エクソソーム 分化

1. 研究開始当初の背景

近年様々な疾患において、核酸医薬研究が注目されている。特に *miRNA* の生理学的及び疾患における機能の重要性が明らかになって以降、*miRNA* を応用した研究が進展しており、幹細胞研究においても、それをを用いた効率的な多能性細胞作製に関する報告が相次いでいる。例えばヒト脂肪 MSC から iPSC を誘導するのに、従来の初期化因子と比較して、*oct4* や *sox2* をターゲットとする *miR302s* や *200c*、*369s* を使用すると、短期間に 100 倍以上の効率で初期化を達成できる (Miyoshi et al. 2011 etc.)。しかしながら、核酸は血液中の酵素によって容易に分解されるため、その生体への応用にはデリバリー技術の開発が重要である。その中で、分泌型 *miRNA* や機能性タンパク質を内包する exosome が、標的細胞へ *miRNA* をデリバリーするキャリアーとして注目されている。Exosome は、細胞が分泌する 50-100nm 程度の膜小胞体で、細胞間分子輸送に参与するため、消化酵素が存在する血漿・血清中でも安定である。一方で、Exosome の機能は概ねそれを産生した細胞の性質を反映することが知られており (Katuda et al. 2013)、細胞種や培養条件に変化を与えることで多彩な機能を搭載できると考えられる。

顎骨欠損の再生は重要な課題であるが、現在のところ外科的侵襲を要し、採取量に限界がある新鮮自家骨移植に代わる確実で有効な方法は無い。われわれは、従来から人工代用骨に骨誘導能を付与するため、BMP を応用した Tissue Engineering による骨再生を試みてきた。その結果、高齢な高等動物の大きな骨欠損を確実に再生するには、成長因子 (BMP) 単独の移植のみでなく、それに応答する細胞の添加が有効であることを明らかにした。その後、我々は自己骨髄由来培養骨芽細胞様細胞を用いた歯槽骨再生の第 Ⅱ 相臨床研究を行ない、一定の成果を得ることができた。しかしながら、その一方で培養細胞の増殖・分化能に個体差が大きく、培養操作には多大な労力と経費を要するという問題が明らかになった。さらに、我々は初代培養 MSC が高い可塑性を有するものの、移植に必要な細胞数を確保するために培養を続けると、急速に可塑性を失うことも見出した。一方で、細胞そのものでなく MSC が分泌したパラクライン因子を応用した骨再生法の開発が近年進展しており、例えば高い可塑性を有する他家由来の MSC 由来のパラクライン因子や exosome (MSC-ex) などの応用が示唆されている。

MSC-ex に関しては、これまで移植細胞が発揮するパラクライン効果の責任分子はタンパク質とされてきたが、前述したように近年細胞が分泌する exosome が分泌型 *miRNA* や機能性タンパク質を内包し、細胞間伝達物

質として活躍していることが明らかになり、*miRNA* など核酸もその一部を担っていることが分かった (Katuda et al. 2013 etc.)。例えば、心筋梗塞モデルに対する MSC-ex の投与では、培養上清の 1/10 以下のタンパク質量で同程度の治療効果が確認され、MSC-ex に存在する *miRNA* が MSC のパラクライン効果の大部分を担っていることが示唆されている (Lai et al. 2010)。この事実と、MSC が障害部位での刺激に応じて、修復に必要な様々な栄養因子を分泌することを考え合わせると、MSC は標的疾患の刺激に暴露されることで、目的の治療効果を持つ分子を含む exosome を産生すると考えられる。骨再生においても、分化誘導を施された培養 MSC が産生した exosome がホストの細胞に取り込まれ、機能を発揮している可能性がある。骨芽細胞分化を誘導された MSC は、未分化 MSC と比較して、移植後の新生骨誘導に優れる反面、長期に渡り移植局所に存在する細胞は僅かである。そのため、移植の効果はパラクライン作用が主体と考えられる。Exosome の機能は産生細胞の性質を反映するため、培養刺激や遺伝子導入など産生細胞に対して付加的な前処理を与えることで、多彩な機能を搭載できると考えられる。又、exosome は、低免疫原性が期待されることから、非自己の系統的資源化 MSC から安定的に機能を発揮する MSC-ex が供給でき、製品化も図れる可能性がある。

他方で、近年 BMP 投与や細胞移植に伴う局所の炎症反応から産出される TNF- α や IFN- γ などの炎症性サイトカインが、新生骨の形成を阻害することが示されている。そして、これら炎症性サイトカインを阻害すると、骨再生のレベルが改善する (Liu et al. 2011)。実際、マウス頭蓋骨欠損への MSC 移植に、制御性 T 細胞 (Treg) の静脈投与を併用すると、有意に骨形成が促進される。その免疫システムについて、*miRNA* がその調節に深く関わっていることが示唆されている。例えば、Treg で発現が高い *miR146* は TNF- α の抑制因子であるが、実際にコラーゲン誘導性関節炎モデルに全身投与すると、関節炎が改善する (Nakasa et al. 2011)。

さらに、MSC の骨芽細胞分化に関わる *miRNA* についても、PPAR γ など脂肪分化因子の発現を抑制し、Runx2 や Osterix など骨芽細胞分化因子の発現を促進する *miR20a* などの存在が報告されている (Zhang et al. 2011 etc.)。*miRNA* は生体内において複数の遺伝子を標的にしていることから、疾患や組織に特異的な *miRNA* を使用することで、関連ネットワーク上の複数の遺伝子発現を同時に改善すると思われる。そして、実際に免疫細胞を抑制、又は血管新生を促進する *miRNA* が、それぞれ Treg-ex や MSC-ex に存在することが証明されている (Okoye et al. 2014, Eirin et al.

2014)。炎症抑制や血管新生に機能を持つ *miRNA* を内包した MSC-ex の全身や局所へのデリバリーは、骨再生を促進させると推測される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分泌型 micro(*mi*)RNA や機能性タンパク質を内包する間葉系幹細胞 (MSC) 由来の exosome (MSC-ex) を生体内にデリバリーすることで、効果的な新規骨再生法を開発することにある。具体的には、炎症抑制や血管新生、骨分化のそれぞれに機能する exosome の産生を、各々の機能付加に適した培養刺激を MSC に与えることで誘導し、それら MSC 由来の exosome (MSC-ex) を全身や局所にデリバリーすることを企図する。

骨再生における MSC の有用性は周知の事実であるが、生体に投与された未分化 MSC は炎症抑制や血管新生のみならず、障害組織においてパラクライン効果を発揮することが知られている。一方で、近年 MSC-ex が MSC 自身と同様の治療効果を示すことが明らかになっている。MSC-ex は、低免疫原性による同種移植が期待でき、必要な機能を搭載、濃縮することが可能である。そのため、それを主体とした骨再生、もしくは骨形成タンパク質 (BMP) 等を使用した骨誘導のストラテジーに補助的に応用することが考えられる。本研究では、骨再生を促進すると思われる機能を搭載した MSC-ex の産生を、MSC の培養条件に変化を与えることで誘導し、それを応用した治療法の開発を試みる。

MSC が生体において、前述した多様な形で組織再生に寄与することは様々な組織や疾患で明らかになっている。しかしながら、MSC の障害局所におけるパラクライン効果については、その効果発現のメカニズムに不明な部分が多い。本研究の学術的な特色としては、近年細胞間相互作用の媒体として重要な役割を持つことが明らかになった exosome に着目し、その挙動を観察することで、骨欠損部における移植 MSC が果たす役割、特にパラクライン効果発現のメカニズムの解明に新たな知見を得ることが出来ると予想される。又、MSC-ex の機能を培養条件により変化・増幅させることが可能であれば、低抗原性で同種での使用が期待される分子移送体として、exosome が組織再生における有用なツールの 1 つとなり得ると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 骨髄 MSC の分離・培養：

野生型ラット (F344; 8 週齢) の大腿骨より採取した骨髄をフラッシュアウトし、遠心操作より骨髄細胞を採取する。採取した細胞は、接着培養 (bFGF 添加 10%FBS 含有 DMEM 培地) を行ない、MSC の精製と細胞数の確保のため、2-3 継代して実験に使用する。ラッ

ト骨髄 MSC の表現型 (positive; CD99, 105 / negative; CD34, 45) の発現を Flow cytometry にて解析しておく。

(2) 骨芽細胞分化誘導と *miRNA* 発現解析：

骨髄 MSC を 80% confluent になるまで増殖させた後、recombinant human (rh BMP2 を添加した誘導培地にて培養を行なう。誘導培地に交換する直前を Day0 とし、分化が成熟してくる Day15 までの試料について、3 日毎に細胞数と Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の計測を行なうと共に、*miRNA* の抽出・精製を行ない、*miRNA* の発現プロファイルを qPCR Array にて網羅的に解析する。前述したように、これまでの我々の研究から、ALP 活性がピークを示す時期での移植が新生骨の誘導に優れていると思われるため、その時期を中心に *miRNA* の発現の変動を解析する。具体的には、Day0 における発現プロファイルと、Day15 までの 3 日毎の発現を比較し、各時点で発現レベルに 2 倍以上の変動があった *miRNA* を確認する。

(3) 骨芽細胞分化誘導 MSC-ex の回収と *miRNA* 発現解析：

MSC-ex の回収は、上記の Day0 ~ Day15 の骨分化誘導の期間、3 日毎に培養上清を回収し、International Society for Extracellular Vesicle (ISEV) が推奨する超遠心法にて行なう。具体的には、まず回収した培養上清を超遠心 (100,000g・70 分間) し、チューブ下層液体を回収する。続いて、0.22 μ m フィルターにて細胞片や微細な浮遊物を除いた上で、再度超遠心を 30% sucrose-D₂O 溶液を用いて行ない、上清吸引後に PBS に懸濁して MSC-ex を回収する。通常、1x10⁷ 個の細胞の培養上清から 2-4x10⁹ 個の exosome が回収できる。回収後は、懸濁液中の MSC-ex の存在を、exosome 特異的表面抗原 (CD9, 63, 81) の発現によって Flow cytometry を使用して解析を行ない、確認する。又、透過型電子顕微鏡により形態の観察や Western Blot による exosome が内包するタンパク質の解析なども適宜行なう。続いて、回収した各時点の MSC-ex から *miRNA* を抽出・精製し、*miRNA* の発現プロファイルを解析する。*miRNA* の抽出は、骨分化誘導時の細胞中の *miRNA* の抽出時と同じく、mirVana *miRNA* Isolation Kit (Ambion) を用いて行ない、発現プロファイルの解析も上記と同様に行なえる。そして、MSC-ex が内包している *miRNA* の発現プロファイルについて、それぞれの時点での産生細胞のプロファイルと比較し、どの程度近似しているかを検討する。

(4) 骨芽細胞分化誘導 MSC-ex の機能解析：

通常の骨髄 MSC の培養に MSC-ex を添加することで、MSC-ex の *in vitro* における機能

性を調べる。骨髄 MSC を 80% confluent になるまで通常培養した後に、濃度を振って MSC-ex を培地に添加する。MSC の骨芽細胞分化は、ALP 活性の計測や様々な骨形成関連遺伝子や蛋白の発現解析にて評価する。

(5) 未分化 MSC-ex への炎症抑制または血管新生の機能と miRNA 発現解析:

未分化 MSC が免疫抑制能を持つことは良く知られており、静脈経路で全身性に投与された未分化 MSC が、局所への制御性 T 細胞 (Treg) の誘導に寄与することも報告されている (Liu et al. 2011 etc.)。さらに、局所や全身に投与された未分化 MSC は、障害部位の血管新生に貢献することが知られている。そのため、通常培養下の MSC から産生された未分化 MSC-ex の全身投与でも、その機能が期待される。ALP 活性が上昇する前の MSC から回収した未分化 MSC-ex における miRNA の発現プロファイルについて、炎症抑制や血管新生の機能について、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex の特性と比較して、評価する。

(6) 頭蓋骨欠損モデルへの移植における機能解析:

移植は、低用量 rhBMP2 を予め吸着させた β -TCP (20mg) をアテロコラーゲン (60 μ l) と混合して移植することを基本とする。これに、骨芽細胞分化誘導や未分化 MSC-ex (1-2x10⁶ 個の産生細胞から回収) の局所、もしくは全身 (IV) 投与を併用することで、低用量 rhBMP2 による骨再生を促進させることができるか検討する。F344 ラット (8 週齢) の頭蓋に作製した defect (径 5 mm) に対して移植を行ない、骨組織形成能を評価する。

実験群は、未分化 (炎症抑制・血管新生) MSC-ex、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex、通常培養 (骨芽細胞分化誘導を行わずに培養した) MSC-ex の 3 群を IV 投与と局所投与の計 6 群に分ける。IV 投与は尾静脈 (1time/week for 3weeks) に行なうこととし、局所投与はアテロコラーゲンに MSC-ex を混合させた上で、rhBMP2 を吸着させた β -TCP を混ぜ合わせて移植を行なう。又、rBMP2 の用量については、移植後 4 週で僅かに骨形成が認められる 0.5 μ g/20mgTCP を低用量とし、コントロール群の 1 つに、移植後 2 週で低用量の 2-3 倍程度の骨形成が認められる 2 μ g/20mgTCP の高用量群も設定する。移植後は、経時的に高速 μ CT を撮影することで、同一個体での硬組織形成を評価すると共に、試料を 1, 4, 6, 8 週にて回収し、組織学・免疫組織学的に骨形成を評価する。

4. 研究成果

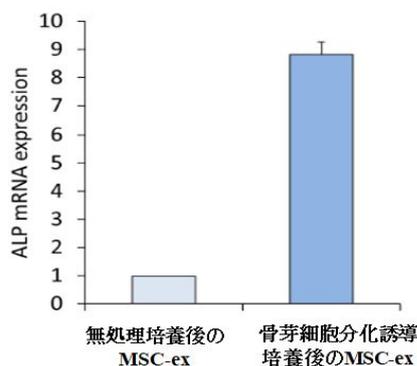
(1) MSC-ex の回収と特性解析:

培養中に rhBMP2 を培地に添加し、骨芽細胞分化を誘導した MSC と、添加を行わずに培養を継続した無処理の MSC のそれぞれの

培養上清から MSC-ex を単離し、それぞれの MSC-ex の特性を比較した。さらに、2 継代目の MSC の培養 2 日後 (ALP 活性が上昇する前) に回収した未分化 MSC を培養上清から回収し、特性を評価した。回収した MSC-ex は、どの群も電顕にて平均粒子径 100nm の粒子であり、CD63 や CD81 の特異的抗体の発現が確認された。

次に、それぞれの MSC-ex の特性を mRNA と miRNA の発現解析にて評価を行なったが、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex では、無処理の MSC から抽出した MSC-ex と比較して、Runx2 や ALP などの骨芽細胞分化に関わる mRNA の発現が上昇していた (図 1)。また、未分化 MSC-ex では、骨芽細胞分化に関わるような mRNA の有意な発現上昇は認められない一方で、VEGF などの発現は、培養を継続した MSC-ex と比較して高いレベルであった。

(図 1) MSC-ex 添加培養後の mRNA 発現



さらに、miRNA の特性解析では、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex では、miR99a や、miR22, miR23b, miR494 などの発現上昇、そして miR375 などの発現低下を認めた。BMP や Runx2 などの発現を制御している miRNA について変動が大きいことが示唆された。

(2) *in vitro* における骨誘導性 MSC-ex の機能解析:

MSC-ex の培養中の MSC への取り込みを確認するため、PKH26 で標識した MSC-ex を添加した培地にて MSC を 12-24 時間培養して評価した。その結果、添加して 24 時間後の MSC の細胞質内への PKH26 で染色された MSC-ex の取り込みが確認された (図 2)。この取り込みについては、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex や無処理 MSC-ex、未分化 MSC-ex のそれぞれについて確認することができた。

(図 2) PKH26 の細胞内への取り込み像



次に、MSC-ex を取り込んだ MSC の特性変化を解析したところ、骨形成関連遺伝子の発現は、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex を取り込んだ MSC では顕著となっていた。それに対して、未分化 MSC-ex を取り込んだ MSC では、それらの発現上昇は明らかでなかった。

(3) 骨芽細胞分化誘導 MSC-ex や未分化 MSC-ex の骨再生効果 :

移植実験は局所投与の群から開始しているが、骨芽細胞分化誘導 MSC-ex や未分化 MSC-ex をアテロコラーゲンに混和した後に、低用量 rhBMP2 を吸着させた TCP 顆粒を混ぜて作製した試料の移植を実施しているところである。研究方法の項にある通りの方法で移植を継続して進めていく予定としている。

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 4 件)

1. Egashira K, Sumita Y*, Zhong W, Takashi I, Ohba S, Nagai K, Asahina I: Bone marrow concentrate promotes the bone regeneration with a suboptimal-dose BMP-2. PLoS ONE. 13(1):e0191099, 2018 (査読有)
2. Minamizato T, Koga T, I T, Nakatani Y, Umebayashi M, Sumita Y, Ikeda T, Asahina I. Clinical application of autologous partially demineralized dentin matrix prepared immediately after extraction for alveolar bone regeneration in implant dentistry: a pilot study. Int J Oral Maxillofac Surg. 47(1):125-132, 2018 (査読有)
3. Bakkar M, Liu Y, Fang D, Stegen C, Su X, Ramamoorthi M, Lin LC, Kawasaki T, Makhoul N, Pham H, Sumita Y, Tran SD. A Simplified and Systematic Method to Isolate, Culture and Characterize Multiple Types of Human Dental Stem Cells from a Single Tooth. Methods Mol Biol. 1553:191-207, 2017 (査読有)
4. 住田吉慶*: 難治性口腔疾患を対象とした再生医療. 長崎県歯科医師会学術誌, 第2巻1号, 37-41, 2017 (査読無)

[学会発表](計 2 件)

1. 住田吉慶: 老化と口の疾患に挑戦する再生医療 -健康長寿のために- 日本口腔インプラント学会第38回中部支部学術大会, 名古屋, 11月 2017.
2. 住田吉慶, 黒嶋伸一郎, 澤瀬隆, 朝比奈泉: 難治性口腔疾患を対象とした再生療法—基礎から臨床研究段階までの長崎大学の取り組み—. 第16回長崎口腔科学フォーラム, 長崎, 8月 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号: 50456654

(2) 研究分担者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
教授
研究者番号: 30221039

各務 秀明 (KAGAMI, Hideaki)
松本歯科大学・総合歯科医学研究所・
教授
研究者番号: 80242866