

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 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：16K15826

研究課題名(和文)骨誘導型exosomeによる遺伝子送達機能を付与した新規人工骨材料の開発

研究課題名(英文)Development of gene-activated matrix with MSC-exosome for bone engineering

研究代表者

朝比奈 泉 (ASAHI, 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

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)：本研究の目的は、MSC、あるいはMSC由来exosome(MSC-ex)自体へ骨形成性遺伝子の導入を試みることで、骨誘導性MSC-exを作製し、それを搭載した遺伝子活性化基質(GAM)による骨再生を検討することにある。現在までに、MSC-exへの遺伝子導入の特性付与条件は明らかでないが、BMP4遺伝子導入MSCの産生するMSC-exの骨芽細胞分化への促進効果がin vitroにて一部示唆されたため、現在、それを搭載したGAMによる骨再生の有効性をin vivoにて評価しているところである。

研究成果の概要(英文)：Therapeutic method for in vivo stem cell or gene delivery has not been established on bone engineering though its potential usefulness has been suggested. In this study, we focused on the exosomes that were derived from osteogenic gene transduced mesenchymal stem cells (MSCs). As experiments, osteogenic MSC-exosomes (MSC-ex) were harvested from cultured mouse bone marrow-MSCs after BMP2/4 gene transfer using plasmid vector. Then, we confirmed the character and the osteogenic induction ability of osteogenic MSC-ex in culture. As results, the expression of BMP2/4 mRNAs in osteogenic MSC-ex was significantly up-regulated, and its osteogenic induction ability was recognized when MSC-ex was added to the MSCs in culture. Therefore, we are currently carrying out in vivo experiments for clarifying the usefulness of GAM combined with osteogenic MSC-ex.

研究分野：口腔外科学・再生医学

キーワード：骨再生 遺伝子導入 エクソソーム 人工骨

1. 研究開始当初の背景

歯槽骨・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、採取量に限界のある自家骨移植に代わる有効な方法は無い。申請者は、現在までに人工骨材料に骨誘導能を付与するために、骨形成蛋白質 (BMP) を応用した骨再生を試みてきた (Yoshida et al. 2013 etc.)。その中で、高齢高等動物の大きな骨欠損を確実に再生するには、成長因子単独の移植ではなく、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 (Seto et al. 2006 etc.)。その後、我々は培養骨芽細胞を用いた歯槽骨再生の第 I 相臨床研究にて、一定の成果を得たものの、培養 MSC の増殖・分化能に個体差が大きく、培養操作に多大な労力と経費を要することを明らかにした (Kagami et al. 2014 etc.)。更に、初代培養 MSC は高い可塑性を有するが、移植の必要細胞数を確保するために培養を重ねると、急速に可塑性を失うことも見出した (Agata et al. 2010)。一方で、最近 MSC の培養上清中に組織再生に寄与する成長因子や exosome 群が含有されることが明らかになり、骨再生においてもその有用性が示唆されている (Osugi et al. 2012 etc.)。そのため、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進展している。

近年癌を始めとした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 micro(mi)RNA 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きてからは、それを応用した核酸医薬研究が進展している。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、標的細胞へ核酸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 2 重脂質膜小胞体で、細胞間分子輸送に関与するため、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し (Katuda et al. 2013)、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、目的とする機能を搭載できる。さらに、最近では exosome そのものに核酸を導入することで、治療目的に応じて機能を改変できることも示唆されている (Alvarez-Erviti et al. 2011 etc.)。

そこで、申請者は、骨再生に機能する MSC の分泌する exosome に着目し、それに元来内包されている骨誘導性の機能分子に加えて、BMP2 遺伝子といった特定の骨形成性遺伝子を搭載させ、それらを生体局所へ送達することを考えた。即ち、申請者が従来から着目してきた骨誘導性を発揮する遺伝子活性化基質 (gen-activated matrix; GAM) の開発において、骨再生局所への遺伝子デリバリー

のベクターとして、exosome が効率的に機能する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨形成性遺伝子を人工的に搭載させた骨誘導性 exosome を人工骨材料に含有させた遺伝子活性化基質 (gene activated matrix; GAM) を作製し、その人工骨としての有用性を評価することにある。即ち、骨形成性遺伝子を生体骨欠損部に直接デリバリーすることで効果的に骨再生を誘導する新規 GAM の開発に、間葉系幹細胞 (MSC) 由来 exosome (MSC-ex) を遺伝子送達体として応用することで、局所における遺伝子導入効率の増幅を図る。

3. 研究の方法

(1) 骨髄 MSC の分離・培養:

野生型 C57BL/6 マウス (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。次に、CD45 陰性の細胞群を磁気ビーズにて抽出する。抽出は、Mouse Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Enrichment Kit (STEMCELL 社) にて、簡便に出来る。抽出した細胞は、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、3 継代して実験に使用する。マウス骨髄 MSC の表現型 (positive; CD29, Sca-1 / negative; CD11b, 45) の発現を Flow cytometry にて解析しておく。

(2) 骨髄 MSC に対する骨芽細胞分化誘導:

骨髄 MSC を 80% confluent になるまで増殖させた後、骨芽細胞分化培地 (ascorbic-acid + β -Glycerophosphate + dexamethasone) に recombinant (r) BMP2 を添加して培養を行なう。誘導培地に交換して、分化が成熟してくる 15 日目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。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、その時期を中心に遺伝子発現の変動を解析する。具体的には、mRNA と miRNA の抽出・精製を行ない、発現プロファイルを qPCR Array にて網羅的に解析する。Day0 における発現プロファイルと比較して、発現レベルに大きな変動のあった mRNA, miRNA 群を確認する。分化誘導後の MSC-ex は、ALP 活性がピークを示す時期の細胞に対して、一度培養上清を除いた上で洗浄後、無血清培地で 48 時間培養を継続した上清から回収する。

(3) 骨髄 MSC に対する BMP2 の遺伝子導入:

BMP2 をコードする pDNA (pAcGFP-

BMP2)を使用して、Neon Transfection System によるエレクトロポレーション法にて遺伝子導入を行なう(20µg pDNA を 5×10^5 cells/ml 懸濁液 100µl に混和)。さらに、その導入効率が低い場合を考慮し、今回は本学で開発された自己組織化ナノデバイスを応用した遺伝子導入も併せて実施した。培養は 10%FBS 含有 DMEM 培地で行なうが、導入の確認は、培養皿における GFP の発現で観察できる。培養は 2~3 日程度で 80% confluent になる密度で細胞を播種し、confluent に達した細胞について、前項と同様の方法で mRNA と miRNA の発現プロファイルを確認する。遺伝子導入後の骨誘導性 MSC-ex は、導入後の細胞が 80% confluent に達した後、一度培養上清を除いた上で洗浄後、無血清培地で 48 時間培養を継続した上清から回収する。

(4) MSC-ex の回収とその特性解析：

MSC-ex の単離は、上記 2-3) で回収した培養上清から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、0.22µm 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、 1×10^7 個の細胞培養上清から $2-4 \times 10^9$ 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、単離した骨誘導性 MSC-ex から mRNA や miRNA を抽出・精製し、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 が内包している遺伝子発現プロファイルについて、回収時点での産生細胞のプロファイルと比較し、確認しておく。

(5) 骨髄 MSC-ex に対する BMP2 の直接遺伝子導入：

3 継代目の細胞が 80% confluent になるまで増殖させた後、一度培養上清を除いた上で洗浄後、無血清培地で 48 時間培養を継続した上清から骨髄 MSC-ex を単離する。その後、骨髄 MSC-ex に BMP2 をコードする pDNA (pAcGFP-BMP2) を使用して、exosome 用導入試薬 Exo-Fect™ Exosome Transfection Reagent にて導入を行なう(5~10µg pDNA を 1×10^6 exosome 懸濁液 150µl に混和)。導入効率については、混和する pDNA 濃度を振って検討する。導入後の骨誘導性 MSC-ex は、上記と同様に内包される mRNA や miRNA の発

現プロファイル解析を行なう。

(6) 骨分化誘導性 MSC-ex の機能解析：

通常の骨髄 MSC の培養に骨分化誘導 MSC-ex、あるいは 2 種の骨誘導性 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。具体的には、骨髄 MSC を 60% confluent になるまで通常培養した後、濃度を振って MSC-ex を培地に添加する。添加 12~48 時間後に細胞の MSC-ex の取り込み効率を確認し、その後培養を継続した後、ALP 活性や Osteocalcin 産生量の計測により骨芽細胞分化の程度を評価する。

(7) GAM の作製：

骨誘導性 MSC-ex (1×10^6 , 1×10^7 , or 1×10^8 exosomes) と β -TCP 顆粒 (20mg) をコラーゲン溶液 (200µl) に混和し、凍結乾燥することを基質作製の基本とする。コラーゲンについては、*in vivo* への核酸導入用の atelocollagen を使用する。凍結乾燥後の exosome については、4 週で長期間機能を維持したまま保存できることが知られている。GAM に搭載する exosome 量については、まず上記の 3 つの量で骨再生効果を評価した後、それに含有される pDNA 量の相対的な量も考慮して、最適化していく。

(8) 頭蓋骨欠損モデルへの移植：

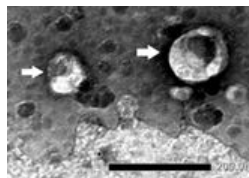
野生型マウス (C57BL/6)、及びラット (F344) の頭蓋に作製した critical defect (径 5 mm) に対して GAM の移植を行ない、遺伝子送達効率と骨組織形成能を評価する。移植後は、経時的に高速 μ CT を撮影することで、同一個体での硬組織形成を評価すると共に、試料を 1, 4, 6, 8 週にて回収し、組織学・免疫組織学的に骨形成を評価する。尚、Exosome は GAM 作製直前に PHK26 で標識し、移植後 1 週での宿主細胞への取り込みを移植標本全層にわたり共焦点レーザーを使用して蛍光発色を観察する。又、BMP2 遺伝子を産生細胞や exosome に導入した試料については、細胞への遺伝子送達効率を GFP の抗体染色により観察できる。又、標本から塩酸グアニジンを用いて GFP を含む蛋白質を抽出し、蛍光分光光度計により遺伝子導入効率を定量的に評価する。

4. 研究成果

(1) MSC-ex の回収と特性解析：

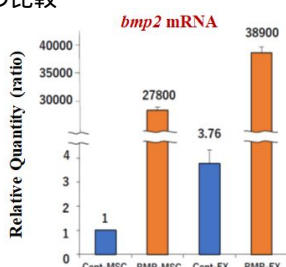
培養中に rBMP2 を培地に添加、もしくは BMP2 遺伝子の導入を行なった MSC の培養上清から骨誘導性 MSC-ex を単離し、それぞれの特性を無処理の MSC の上清由来 MSC-ex と比較した。回収した exosome の電顕による粒子確認像を下図(図 1)に示す。さらに、回収された exosome は、CD63, CD81 の発現解析にて陽性が確認された。

(図 1) $\phi 50 \sim 100$ nm の Exosome 電顕像



次に、BMP2/4 (pAcGFP-BMP2) を遺伝子導入し、80% confluent に達するまで培養した MSC から回収した骨誘導性 MSC-ex の特性解析を実施したところ、導入した BMP2/4 の mRNA の発現は、コントロールベクター (pAcGFP) を導入した MSC-ex における発現と比較して顕著に上昇をしていた (図 2)。この発現上昇率は、骨分化誘導培養による誘導後の MSC から回収した MSC-ex と比較しても顕著であった。培養中に導入した遺伝子の特性が産生された exosome に反映されていることが示唆された。さらに、MSC を 80% confluent に達するまで通常培養を行なった後に回収した MSC-ex に直接遺伝子導入を試みた。しかしながら、現在までに遺伝子導入の条件設定の最適化にまで至っておらず、直接導入を施すことによる MSC-ex の特性変化は明確でない。そのため、今後は引き続き、この条件設定を試みていく予定である。

(図 2) 導入後に培養した MSC と、その上清から回収された MSC-ex における BMP2 mRNA 発現の比較



(2) *in vitro* における骨誘導性 MSC-ex の機能解析 :

MSC に BMP4 遺伝子を導入後に回収した骨誘導性 MSC-ex を添加した培地を 60% confluent に達した MSC に添加し、継続培養したところ、培養後 5 日後の時点で通常の培養 MSC から回収した MSC-ex を添加した場合と比較して、Alkaline Phosphatase の活性や骨芽細胞分化関連遺伝子 (*osteocalcin* など) の発現上昇を認めた。 *in vitro* においては MSC の骨芽細胞分化に関して、骨誘導性 MSC-ex の添加による一定の誘導促進効果が示唆された。そのため、この骨誘導性 MSC を搭載した GAM の骨誘導効果について、生体局所にて観察することとした。

(3) 骨誘導性 MSC-ex を搭載した GAM の骨再生効果 :

MSC に BMP4 遺伝子を導入後に回収した骨誘導性 MSC-ex を搭載した GAM を作製後、マウスの頭蓋骨欠損部に移植を試みた。また、

異種動物への移植モデルとしてラットへの移植も一部試みた。その結果、マウス移植後 4 週の時点にて、GAM 基質内に新生骨の形成が一部見出された。そのため、現在さらに詳細に条件設定を行うべく、まず搭載する MSC-ex の用量について検討を実施しているところである。

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 6 件)

1. Noda S, Sumita Y, Ohba S, Yamamoto H, Asahina I: Soft tissue engineering with micronized-gingival connective tissues. *J Cell Physiol.* 233(1):249-258, 2018 (査読有)
2. Suehiro F, Ishii M, Asahina I, Murata H, Nishimura M: Low-serum culture with novel medium promotes maxillary/mandibular bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation ability. *Clin Oral Investig.* 16.P1-11, 2017 (査読有)
3. Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I*. Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. *Arch Oral Biol.* 73:172-178, 2017 (査読有)
4. Koga T, Minamizato T, Kawai Y, Miura K, I T, Nakatani Y, Sumita Y, Asahina I*. Bone regeneration using dentin matrix depends on the degree of demineralization and particle size. *PLoS ONE.* 11(1): e0147235, 2016 (査読有)
5. Miura K, Yoshida M, Yamaguchi K, Yoshida R, Asahina I*. Sonographic evaluation of bone formation after sagittal split ramus osteotomy. *J Ultrasound Med.* 35(2):395-400, 2016 (査読有)
6. Ohba S, Sumita Y, Umebayashi M, Yoshimura H, Yoshida H, Mastuda S, Kimura H, Asahina I, Sano K. Onlay bone augmentation on mouse calvarial bone using a hydroxyapatite/collagen composite material with total blood or platelet-rich plasma. *Arch Oral Biol.* 61:23-27, 2016 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Shun Narahara, Eiko Sakai, Tomoko Kadowaki, Yu Yamaguchi, Haruna Narahara, Kuniaki Okamoto, Yoshinori Sumita, Izumi Asahina, Takayuki Tsukuba. KBTBD11, a novel BTB-Kelch protein, is a negative regulator of osteoclastogenesis through controlling Cullin3-mediated ubiquitination. *ASCB|EMBO Meeting*, 2017. Philadelphia (USA).
2. 朝比奈泉. 口腔インプラント治療における再生医療. 第 16 回日本再生医療学会総

- 会,2017年(平成29年)3月7日-9日,仙台国際センター(仙台).
3. 四道玲奈,住田吉慶,河井洋祐,榎原峻,朝比奈泉. 機能性micro(mi)RNAを搭載した遺伝子活性化基質(GAM)による骨再生の試み. 第62回(公社)日本口腔外科学会総会・学術大会,2017年(平成29年)10月20日-22日,国立京都国際会館(京都).
 4. 岩竹真弓,住田吉慶,長村登紀子,縣秀樹,朝比奈泉. ヒト臍帯由来管葉系幹細胞による骨芽細胞分化に関する3D培養の促進効果. 第16回日本再生医療学会総会,2017年(平成29年)3月7日-9日,仙台国際センター(仙台).
 5. 大場誠悟,中谷佑哉,江頭寿洋,住田吉慶,朝比奈泉. 家兎上顎洞底挙上術で適用したhydroxyapatite/collagen compositematerialによる骨造成の評価. 第71回NPO法人日本口腔科学会学術集会,2017年(平成29年)4月26日-28日,ひめぎんホール(松山).

6. 研究組織

(1)研究代表者

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

(2)研究分担者

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