

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K19746

研究課題名（和文）細胞周期制御性エクソソームを介した新規骨代謝カップリング因子の探索

研究課題名（英文）Identification of novel osteoclast-osteoblast coupling factors in exosomes involving cell cycle machinery

研究代表者

小笠原 徹（Ogasawara, Toru）

東京大学・保健・健康推進本部・講師

研究者番号：20359623

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、エクソソームを介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の存在確認と細胞周期制御ならびに細胞分化への関与を検討した。しかしながら、明確にエクソソームを介した骨芽細胞・破骨細胞間情報伝達機構の存在を示す結果は得られなかった。そのため、small RNAシーケンスなどの網羅的な解析手法を用いて、マウス骨芽細胞由来のエクソソームに含まれるマイクロRNAで候補分子となるものを検索し、骨形成抑制に関わる可能性を持つマイクロRNAとしては、mmu-miR-26a-5pなどを、骨形成促進に関わる可能性を持つマイクロRNAとしては、mmu-miR-214-3pなどを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、骨形成抑制に関わる可能性を持つマイクロRNAとしては、mmu-miR-26a-5pなどの2分子を、骨形成促進に関わる可能性を持つマイクロRNAとしては、mmu-miR-214-3pなどの3分子を同定することが出来た。本研究の成果は、将来的には新たな骨再生医療法開発につながる可能性がある。

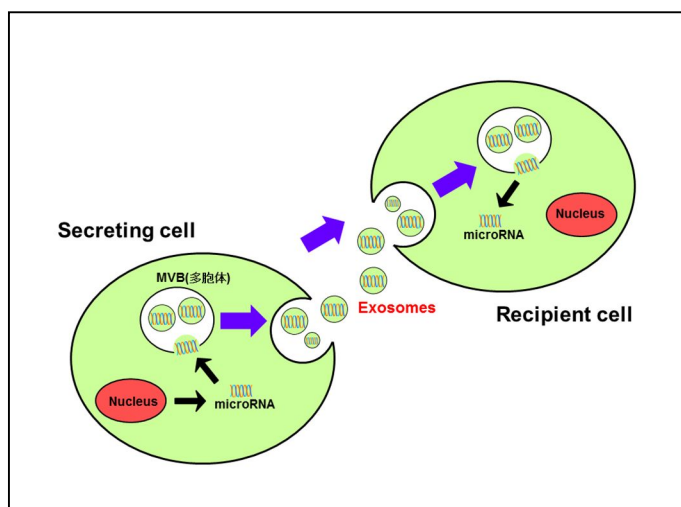
研究成果の概要（英文）：In the present study, we investigated the existence of an exosome-mediated signaling mechanism between osteoclasts and osteoblasts and its involvement in cell cycle regulation and cell differentiation. However, we could not clearly demonstrate the existence of an exosome-mediated signaling mechanism between osteoblasts and osteoclasts. Therefore, we searched for candidate microRNAs in mouse osteoblast-derived exosomes using small RNA sequencing. We identified mmu-miR-26a-5p as a microRNA that may be involved in the inhibition of osteogenesis, and mmu-miR-214-3p as a microRNA that may be involved in the promotion of osteogenesis.

研究分野：口腔外科学・再生医学・骨代謝学

キーワード：シグナル伝達 再生医学 発生・分化 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

従来、骨代謝研究の世界では、破骨細胞分化を制御する因子あるいは骨芽細胞分化を制御する因子、それぞれについて別々に研究が行われてきた。そして、破骨細胞分化に関しては RANKL や NFATc1 等の重要分子が、骨芽細胞分化に関しては Runx2 や Osterix 等の重要分子が発見され、骨代謝研究の大きなブレイクスルーとなった。その中でも、特に抗 RANKL 抗体デノスマブは既に臨床応用され、骨粗鬆症治療などに大きな成果を挙げている。しかし、その一方で、デノスマブには、Medication-related Osteonecrosis of the Jaw (MRONJ) という重大な副作用が報告されており、この問題を解決することが望まれていた。また、デノスマブが MRONJ を惹起する大きな理由としては、デノスマブが破骨細胞に選択的に作用して骨吸収を抑制すると同時に正常な骨リモデリングも阻害することが指摘されていた。そのため、正常な骨リモデリングを阻害しない薬剤の開発が待たれていた。しかしながら、そうした薬剤を開発するために必要な骨吸収・骨形成の両者を制御する因子に関する研究はあまり進んでおらず、代表的な成果として、Semaphorin 3A が骨吸収・骨形成の両者を制御していることが報告されていた程度に過ぎなかった (Hayashi M, Takayanagi H et al. Nature 2012)。ところで、エクソソームは直径 50 nm から 150nm 程度の大きさの膜小胞であり、さまざまな細胞から分泌され、その内部に様々なタンパクや microRNA などの分子を含んでおり、これらの分子がエクソソームを介して細胞間を移動して他の細胞内でも機能する (すなわち細胞間情報伝達を行う) ことが明らかとなっていた (左下図)。



このように、エクソソームを介した細胞間情報伝達機構は様々な分野で注目を集めていたが、本研究計画の開始当初には、骨代謝に関わる研究成果も報告され始めていた (Gross et al. Nat Cell Biol 2012, Li et al. Nat Commun 2016 など)。また、申請者は過去の研究で、細胞周期制御に関わる分子が複数の細胞を制御することを明らかとしており、細胞周期を介して破骨細胞分化と骨芽細胞分化が統合的に制御されている可能性を指摘していた。他の研究グループからも、われわれのグループ同様に細胞周期関連分子が骨吸収・骨形成に関わることを示す知見が続々と報告されており、

神経・血液の分野では我々の研究内容に追従した研究成果が報告されていた (Slomiany et al. J Cell Biochem 2006, Fujimoto et al. EMBO J 2007 など)。これらの事実から、細胞周期関連分子による細胞分化制御機構は細胞種を越えた普遍性の高い制御メカニズムであり、細胞周期制御に関わる分子の中に骨吸収・骨形成の両者を統合的に制御する因子が存在する可能性が高いと想定された。そこで、申請者はエクソソームによる破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構が細胞周期制御を介して骨吸収・骨形成を統合的にコントロールしているという仮説を持つに至り、本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

骨代謝は、「破骨細胞による骨吸収」と「骨芽細胞による骨形成」のバランスによって成立している。そのため、単一の分子で骨吸収・骨形成を同時にコントロールして骨形成に有利な骨代謝条件をもたらす分子の同定に成功すれば、その分子を利用した治療法の開発が可能となり、骨再生が必要な口腔疾患の治療において優れた効果が期待できる。本研究では、エクソソームを介した細胞間情報伝達機構と細胞周期制御機構に着目して、破骨細胞ならびに骨芽細胞分化を統合的に制御する分子、すなわち、「新規骨代謝カップリング因子」の探索を行い、骨代謝メカニズムの理解を深めるとともに、その結果を利用した新規骨再生治療法開発に向けた基礎的検討を行うことを目的として計画された。

3. 研究の方法

(1) エクソソームを介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の解析

最初にマウス由来骨芽細胞と破骨細胞を用いて、エクソソームを介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の存在確認と細胞周期制御ならびに細胞分化への関与を検討した。骨芽細胞につ

いては、通常培養ならびに分化誘導後 14 日以内の様々な時期に細胞培養上清からエクソソームを抽出した。破骨細胞については、破骨細胞前駆細胞通常培養ならびに分化誘導後 7 日以内の様々な時期に細胞培養上清からエクソソームを抽出した。そして、骨芽細胞由来のエクソソームは各分化段階の破骨細胞へ、破骨細胞由来のエクソソームは各分化段階の骨芽細胞へ、それぞれ導入した。本実験の大前提となる「必要十分量のエクソソームを抽出する」という段階で実験が難航し、抽出方法そのものについても様々な条件検討が必要であった。なお、エクソソーム抽出に当たり、複数のエクソソーム抽出キット (PureExom® Exosome Isolation kit、MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2、ExoIsolator Exosome Isolation Kit) を用いた。エクソソーム導入細胞における各種分化マーカーの発現と細胞周期制御分子の発現は Real time RT-PCR で解析するとともに ALP 染色、TRAP 染色で確認した。また、細胞増殖能評価は WST アッセイで評価し、ALP 染色、TRAP 染色など各種染色を施した細胞の細胞形態等を顕微鏡で観察することによって、エクソソーム導入が細胞に与える影響を評価した。

(2)細胞培養上清を介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の解析

エクソソーム抽出とエクソソーム導入による実験に難航したことから、純粋なエクソソームの作用とは言えないものの、エクソソームの作用機序の一部を説明可能な系を併用した。細胞培養上清にはエクソソームが含まれていることから、細胞の培養上清からエクソソームを抽出するステップを省略し、骨芽細胞の培養上清を破骨細胞前駆細胞と各分化段階の破骨細胞へ、破骨細胞前駆細胞・破骨細胞培養上清を各分化段階の骨芽細胞へ、それぞれ添加し、上記(1)エクソソームを介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の解析と同様の解析を行った。

(3)骨芽細胞由来エクソソームに含まれるマイクロ RNA の網羅的解析

細胞周期制御と細胞分化に関わる遺伝子の遺伝子操作マウスから初代骨芽細胞を採取し、この骨芽細胞由来のエクソソームに含まれるマイクロ RNA で候補分子となるものを検索するために、smallRNA シーケンスを実施し、発現パターンを確認するとともにバイオインフォマティクス解析を行った。

4. 研究成果

(1)エクソソームを介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の解析

さまざまな時期の骨芽細胞および破骨細胞前駆細胞・破骨細胞から、様々な条件でエクソソームを抽出して、骨芽細胞由来のエクソソームが破骨細胞に及ぼす効果、および、破骨細胞由来のエクソソームが骨芽細胞に及ぼす効果、をそれぞれ検討したが、明確に細胞周期の変化をもたらすと同時に細胞分化を制御する条件を特定することは出来なかった。

(2)細胞培養上清を介した破骨細胞・骨芽細胞間情報伝達機構の解析

エクソソームの効果の一部を検証する目的で、さまざまな時期の骨芽細胞および破骨細胞前駆細胞・破骨細胞由来の細胞上清が細胞に与える影響を検討した。骨芽細胞由来の細胞上清については、細胞継代数が少ない細胞由来の細胞培養上清が破骨細胞前駆細胞の増殖能を向上させる可能性が示唆されたが、その条件で採取した細胞上清が、細胞周期制御と細胞分化の両者を明確に制御していることを示す結果は得られなかった。また、破骨細胞前駆細胞・破骨細胞の培養上清が骨芽細胞の細胞特性に影響を与えるかについては結論を得ることが出来なかった。

(3)骨芽細胞由来エクソソームに含まれるマイクロ RNA の網羅的解析

smallRNA シーケンスの結果とバイオインフォマティクス解析とを統合して、骨形成抑制に関わる可能性を持つマイクロ RNA としては、mmu-miR-26a-5p などの分子を、骨形成促進に関わる可能性を持つマイクロ RNA としては、mmu-miR-214-3p などの分子を同定した。今後はこれらのマイクロ RNA が破骨細胞分化と破骨細胞の細胞周期に及ぼす影響を検討するために、さらなる機能解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ogasawara Toru, Ko Edward Chengchuan, Yu Jiashing	4. 巻 2020
2. 論文標題 Application of Stem Cells in the Oral and Maxillofacial Region	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2020/2421453	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hatori Ayano, Fujii Yasuyuki, Chikazu Daichi , Ogasawara Toru	4. 巻 2023
2. 論文標題 Application of Dental Pulp Stem Cells for Bone and Neural Tissue Regeneration in Oral and Maxillofacial Region.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 2026572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2023/2026572.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小笠原 徹
2. 発表標題 ホメオボックス転写因子Nanogは間葉系細胞の骨軟骨分化において重要である
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kanno Y, Ogasawara T et al.
2. 発表標題 Highly efficient differentiation of chondrocytes from human dental pulp stem cells using a thienindazole derivative small compound TD-198946.
3. 学会等名 ASBMR 2022 Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hatori A, Ogasawara T et al.
2. 発表標題 VCAM-1 and GFPT-2: Predictive markers of osteoblast differentiation in human dental pulp stem cells.
3. 学会等名 ASBMR 2022 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医学部附属病院 口腔顎顔面外科・矯正歯科ホームページ
<http://plaza.umin.ac.jp/~oralsurg/>

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	筑田 博隆 (Chikuda Hirotaka) (30345219)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	
研究分担者	茂呂 徹 (Moro Toru) (20302698)	東京大学・医学部附属病院・特任教授 (12601)	
研究分担者	阿部 雅修 (Abe Masanobu) (10392333)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	

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
---------	---------