

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16995

研究課題名（和文）エクソソームによる間葉系幹細胞の情報伝達の解明と新たな骨再生技術の開発

研究課題名（英文）Elucidation of mesenchymal stem cell signaling by exosomes and development of new bone regeneration technology

研究代表者

熊澤 憲一（Kumazawa, Kenichi）

北里大学・医学部・講師

研究者番号：60383618

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト骨組織由来間葉系細胞におけるエクソソームに関して様々な報告がされており、とくに骨組織再生においてどのような役割を担うのかについて研究を行った。ヒト骨組織由来間葉系細胞を骨分化誘導群と非分化誘導群の2群にわけて培養上清からエクソソームを採取、内包されるmiRNAの解析を行った。1500種類以上のmiRNAが同定されたが、優位差があるのは10種類程度であり、骨形成における重要な役割を担う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から分泌されるエクソソームを含む細胞外小胞については診断学、創薬などで多くの報告がされている。細胞外小胞は、細胞間情報伝達をおこなっているが不明な点も多く、骨形成における細胞外小胞の働きを解明することにより、効率的な骨形成が行えるようになるとともに、細胞の増殖など細胞外小胞の他の働きも解明できる可能性がある。これにより効率的で、細胞を用いない安全な再生医療を行える可能性がある。

研究成果の概要（英文）：There have been various reports on exosomes derived from human bone tissue-derived mesenchymal cells. We investigated the role of exosomes in bone regeneration. Exosomes were collected from the culture supernatant of human bone tissue-derived mesenchymal cells in two groups, bone differentiation-induced and non-differentiation-induced, and the miRNAs contained in the exosomes were analyzed. The results suggested that miRNAs may play an important role in bone morphogenesis.

研究分野：形成外科学、再建外科学、再生医療

キーワード：骨組織再生 細胞外小胞 エクソソーム miRNA

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、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

北里大学医学部形成外科・美容外科学では、骨移植時に自家骨を採取するという患者への負担を軽減するために自家骨に変わる代替骨組織の研究を行ってきた。これまでの研究で骨組織に由来する間葉系細胞を10年以上の長期間凍結保存を行なっても、間葉系細胞の骨形性能、多分化能が保持できていることを確認し、長期間凍結保存した骨組織由来間葉系細胞が、組織再生における細胞供給源になりうることを報告した。しかし、臨床応用には、組織再生効率、安全性など多くの課題が残されている。一方、エクソソームを含む細胞外小胞は、内部にDNA, RNA, たんぱく質など多くの物質が内包され、この細胞外小胞により細胞間情報伝達がされていることが解明されて以来、より活発な研究が行われている。これまでにエクソソームを含む細胞外小胞は、がんの転移、疾病の発症など生体内での多くの事象に関連することが報告されている。間葉系幹細胞由来のエクソソームに関しても多く報告されているが、骨組織再生においてはどのような役割をになっているのかは不明な点も多い。エクソソームに関しては、凍結された骨組織由来間葉系細胞から得られるエクソソームの分離生成を行い、エクソソームの機能解析を試みていたが、エクソソームの添加のみでは骨形成の促進が行われないこと、間葉系細胞から骨分化がすすむにつれエクソソームの分泌量が減少していくことを確認した。

2. 研究の目的

研究の目的は、エクソソームを含む細胞外小胞を用いて、より効率的な骨再生を行うことである。これまでの研究では、骨組織由来間葉系細胞にエクソソームを添加するだけでは、骨形成の促進はされず血管新生が促進されただけであった。このことからエクソソームを含む細胞外小胞に含まれている物質がさまざまな作用を持つものと推測された。そこで、エクソソームに含まれるmiRNAに着目し機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 研究に用いた検体

北里大学医学部 形成外科・美容外科学では、自家骨移植時に生じた余剰の骨組織より、培養・分離した細胞群をヒト骨組織由来間葉系細胞として凍結保存をおこなっている。この凍結された骨組織由来間葉系細胞を3検体用い研究を行った。

(2) 解凍と再培養

凍結保存された間葉系細胞を解凍し T75 フラスコにて培養を行った。サブコンフルエントの時点で T25 フラスコ6枚にて培養を行い3枚を骨分化誘導群(dif(+))群、3枚を非分化誘導群(dif(-))群とした。

(3) 培養上清の採取とmiRNAの精製

骨分化誘導群と非分化誘導群は3-4日に1回培地交換を行い、培地交換の際に培養上清を採取した。通常の培地、骨分化誘導培地はエクソソーム除去キットをもちいてFBS由来のエクソソームを除去し作成した。採取した培養上清はexoRNeasy Maxi Kit (Quiagen社)を用い培養上清からエクソソームを採取し、内包されるmiRNAを分離して凍結保存を行った。

(4) miRNAの解析

1週間で得られる2本のmiRNA検体を一つにまとめ、3週間まで採取を行った。骨分化誘導群、非分化誘導群の2群から計6検体としてsmall RNA-seqによる解析を行った。解析は株式会社ダナフォーム(神奈川県横浜市)に依頼した。

4. 研究成果

- (1) すべてのサンプルにおいて解析に十分なmiRNAを採取することができた。
- (2) dif(+))群: 1週目、2週目、3週目(それぞれ、dif(+))1w, dif(+))2w, dif(+))3wとする)とdif(-))群: 1週目、2週目、3週目(それぞれ、dif(-))1w, dif(-))2w, dif(-))3wとする)の6群で2群間比較を施行した。解析にはDESeq2を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。
- (3) 600種類程度のmiRNAの変化を認めたと有意差を認めた増減は多くても10程度であった。それぞれにおいて2群間比較を施行したが、比較対象として意義があると考えられるものを示す。
 - (a) dif(+))1w と dif(+))2w, dif(+))1w と dif(+))3w の2群間比較では有意な増減を認めなかった。これは骨分化誘導を行った際には、miRNAに変化がないことを示していることが考えられた。
 - (b) dif(-))1w と dif(-))2w の2群間比較では、dif(-))1w に対して dif(-))2w においてmiRNA122の有意な減少を認めた。また、dif(-))1w と dif(-))3w の2群間比較では dif(-))1w に対して dif(-))3w でmiRNA122とmiRNA126の減少が見られた。これらにおいて有意に増加しているmiRNAはなかった。
 - (c) dif(-))1w と dif(+))1w の2群間比較ではmiRNA483, miRNA486-1, miRNA486-2, miRNA126, miRNA133A1, miRNA133A2, miRNA29Cの有意な増加が見られた。

また miRNA146A,miRNA146B,miRNA190A の有意な減少を認めた。

- (d) dif(-)2w と dif(+)2w の 2 群間比較では、miRNA483, miRNA122, miRNA126, miRNA486-1, miRNA486-2, miRNA142, miRNA223 の有意な増加がみられ、miRNA146B,miRNA31,miRNA125B1, miRNA125B2, miRNA125B2 の有意な減少がみられた。
- (e) dif(-)3w と dif(+)3w の 2 群間比較では、miRNA483, miRNA122, miRNA126, miRNA223, miRNA4516, miRNA206 の有意な増加をみとめ、miRNA146A, miRNA16-1, miRNA16-2 の有意な減少を認めた。
- (4) miRNA122 と miRNA126 は、それぞれの 2 群間比較において有意な減少及び増加がみられた。miRNA122 は「大腿骨頭壊死における骨芽細胞の増殖を促進する」「RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制する」という報告があり骨形成を促進する働きがあると考えられる。今回の研究で用いた細胞はヒト骨組織由来間葉系細胞であり、間葉系幹細胞のみでなく、骨芽細胞の前駆細胞など骨分化の傾向をしめす細胞群であるが、非骨分化誘導群では有意に減少していたことから、in vitro では骨分化を自ら抑制すべく miRNA122 の分泌を減少させている可能性が考えられた。骨分化誘導群では有意な増加を認めたことから、in vitro においても骨芽細胞への分化を促進させている可能性がある。miRNA126 は骨分化誘導群で有意な増加を認めており、骨形成を促進する可能性が考えられた。しかし骨形成を阻害、抑制するという報告もあり、今回の結果とは異なるものであった。なんらかのターゲットを介して骨形成を促進、または複数の miRNA の複合的な作用で骨形成を促進している可能性があり、さらなる解析を要する。
- (5) 骨分化誘導群では miRNA483, と miRNA486 が複数の 2 群間比較で有意差を示しており、これらの作用について文献的に考察を行った。miRNA483 においては骨形成に関わる文献は渉猟し得なかったが、「インスリン様成長因子 2 の調節を行う」「悪性腫瘍における循環腫瘍細胞数と相関がある」という報告があり、細胞の増殖に関わる可能性がある。miRNA486 は骨形成にかかわる報告は渉猟し得なかったが、「血管石灰化のバイオマーカーとなる」「miRNA486 が、結果として Runx2, Osterix を上昇させる」などの報告から石灰化を促進する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 熊澤憲一、森山和の、杉本孝之、杉本佳香、馬場香子、山崎安晴、武田啓
2. 発表標題 ヒト骨組織由来間葉系細胞より分泌されるエクソソームに含まれるmiRNAの網羅的解析
3. 学会等名 第32回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 熊澤 憲一, 杉本 孝之, 杉本 佳香, 森山 和の, 馬場 香子, 加藤 由起子, 山崎 安晴, 武田 啓
2. 発表標題 ヒト骨組織由来エクソソームに含まれるmiRNAの機能解析
3. 学会等名 第23回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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