

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17015

研究課題名(和文)人工エクソソームを応用した骨形成促進剤の開発

研究課題名(英文)The development of medicine accelerating bone formation to apply artificial exosomes

研究代表者

菅森 泰隆 (Sugamori, Yasutaka)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：60814902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨芽細胞膜上RANKLに骨形成シグナルを入れる、RANKを発現した人工エクソソームの創製を目指し、細胞内ドメインを欠失させたRANK(minimal RANK)をリン脂質DOPCを構成材料としたエクソソームに組み込んだ。minimal RANKを発現したエクソソームの機能を確かめる為に、骨髄細胞をM-CSFと可溶性RANKLで刺激して、破骨細胞に誘導する実験系を用いて検討した。その結果は、RANK発現の有無ではなく、脂質成分であるDOPC濃度依存的に破骨細胞形成を抑制したことが示唆されるものであり、minimal RANKエクソソームに発現したRANKのRANKL結合能は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、破骨細胞が分泌するRANKを発現した膜小胞に骨形成能がある事が見出されたことから、RANKを発現した人工分エクソソームの創製は新たな骨形成促進剤の候補になり得る。本研究では、RANKL結合能を有するRANKを発現エクソソームの開発には至らなかったが、DOPCは構成材料として不適切であり、別のリン脂質を用いる必要があることが分かった。また、生理的に活性化したRANKは三量体化することが知られている。その為、機能的なRANKL-RANK結合を誘導するにはエクソソーム上に三量体構造を模したRANKを発現させる必要があると考える。以上が今後の研究の方向性として見出されたことは学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Towards the development of artificial exosomes expressing RANK, which induce bone formation signal, we incorporated RANK lacking intracellular domain (minimal RANK) into exosomes made from phospholipid, DOPC. we investigated the function of exosomes expressing minimal RANK, using experiments in which bone marrow cells were stimulated with M-CSF and soluble RANKL to induce osteoclasts. The results suggest that the formation of osteoclasts was suppressed depending on the concentration of DOPC, rather than the presence or absence of RANK expression, and the RANKL-binding ability of RANK expressed in minimal RANK exosomes was not confirmed.

研究分野：口腔基礎工学

キーワード：骨形成促進剤 RANKL RANK 分泌小胞 エクソソーム

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

局所の骨形成を増やす代表的な薬剤として bone morphogenetic protein (BMP)-2 が知られているが、一方で、BMP-2 によるがん化を示唆する報告もある (Feeley BT et al., *Bone*, 2006; Carragee EJ et al., *J Bone Joint Surg Am*, 2013)。これらの報告を打ち消す論文も報告されてはいるが、ヒトに対しては高用量を必要とし、必ず腫脹を伴うことを考えると、BMP-2 に代わる局所の骨形成促進薬を開発する必要性は高い。

新規骨形成促進剤候補のひとつとして receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 結合ペプチドが挙げられる (Kato et al., *Arthritis Res Ther*, 2015)。RANKL 結合ペプチドは破骨細胞形成に重要な受容体 RANK のリガンドである RANKL と結合し、破骨細胞形成を抑制することは明らかになっていたが (Aoki K et al., *J Clin Invest*, 2006)、骨芽細胞分化促進作用も有することが明らかとなっている (Furuya Y et al., *J Biol Chem*, 2012; Sugamori et al., *BioEssays*, 2016)。しかし、この RANKL 結合ペプチドの骨芽細胞分化促進作用は、50 μ M 以上の高濃度でのみ発現される。高濃度のペプチドは凝集を起こしやすいことから、臨床応用への展開を鑑みると、低濃度・低用量で RANKL に骨形成シグナルを入れる新規の RANKL 結合ペプチドを開発する必要がある。

我々は、Nature 誌に成熟した破骨細胞から分泌される RANK を発現する膜小胞(エクソソーム)に骨形成促進作用があることを報告した (Ikebuchi et al., *Nature*, 2018)。このエクソソームに可溶性 RANKL と混和する前処置を施すと骨形成活性は抑えられた。この結果は、エクソソーム上に RANK が存在し、可溶性 RANKL が結合することで骨形成活性が抑えられたことを示唆しており、エクソソーム上の RANK が骨形成活性に重要であることを示している。つまり、破骨細胞由来のエクソソームの骨形成促進メカニズムは、エクソソーム上の RANK が骨芽細胞膜上の RANKL に結合し、骨芽細胞内に骨形成促進シグナルを伝える分子機構と考えられる。すなわち、骨芽細胞内への骨形成促進シグナルは、RANKL が骨芽細胞膜上の受容体として働くことによる、RANK から RANKL への逆シグナルと想定している。

一方で、人工的に DNA 配列から脂質二重膜に目的とする膜タンパク質を発現させる系が立ち上がっている。

2. 研究の目的

本研究の目的は骨芽細胞膜上 RANKL に骨形成シグナルを入れる、RANK を搭載した人工分泌小胞(人工エクソソーム)の創製である。

3. 研究の方法

(1) RANK 発現エクソソームの RANKL 結合能

京大大学生体機能高分子分野・秋吉研究室に、RANK を発現した人工エクソソームの供与を依頼した。頂いた人工エクソソームを構成するリン脂質には、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) を用いた。DOPC はリポソーム、リン脂質二重層及び生体膜の研究にて頻繁に用いられている材料である。作製して頂いたエクソソーム上に発現した RANK が機能的に働くか否かを明らかにする目的で、RANKL 結合能を確認することにした。そのため、マウス骨髄細胞を M-CSF と可溶性 RANKL (sRANKL) にて刺激して、破骨細胞に分化誘導する *in vitro* の実験系を用いた。sRANKL 刺激時に、RANK 発現エクソソームを添加することで、RANK 発現エクソソームが RANKL 結合能を十分に有していれば、sRANKL と RANK 発現エクソソームは結合し、骨髄細胞の

破骨細胞への分化誘導は抑制される。

(2) TRAP 染色及び TRAP アッセイ

RANK 発現エクソソームの破骨細胞分化抑制の評価方法として、TRAP 染色及び TRAP アッセイを用いた。TRAP 染色後の 1 視野あたりの平均の破骨細胞数、TRAP アッセイにより TRAP Activity (n mol pNP / min / mg protein) を計測した。

4. 研究成果

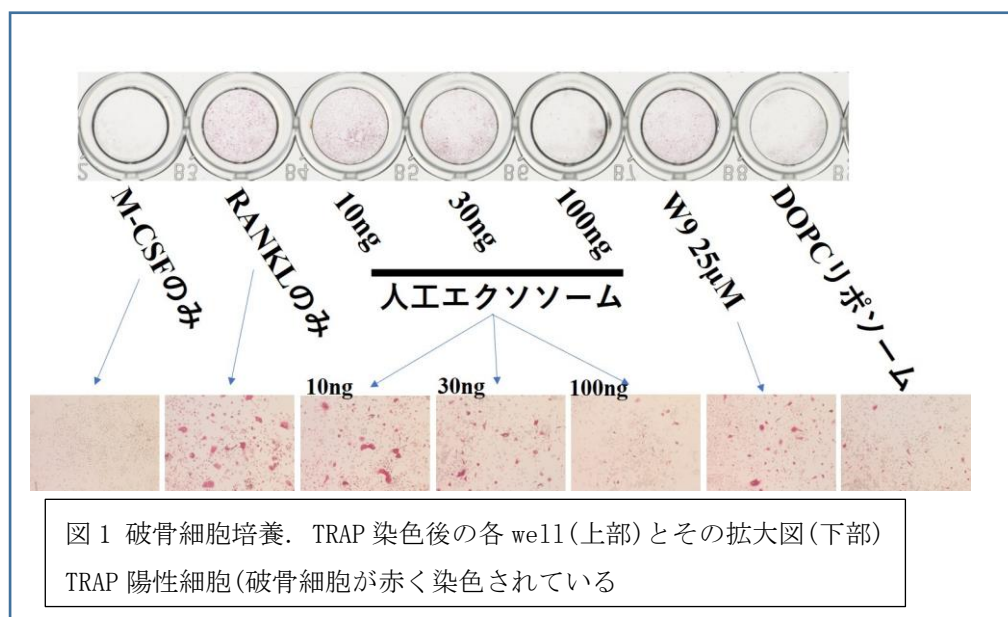
(1) 主な研究結果

研究開始当初、RANK 全長を発現した人工エクソソームを作製して頂いたが、sRANKL 誘導の破骨細胞形成を抑制することができず、RANKL と結合する機能は確認できなかった。その理由として、RANK 全長を正しい立体構造で組み込む事が難しい為と考えた。そこで、RANK の細胞内ドメインを欠失させた RANK (minimal RANK) を発現するエクソソームを作製して頂き、実験を行った。下記に主な実験・研究成果を示す。

図 1 上のパネルはマウス骨髄細胞を sRANKL にて刺激し破骨細胞に分化誘導する実験系を行った際に、人工エクソソーム (RANK 発現エクソソーム)、W9 (RANKL 結合ペプチド)、DOPC リポソーム (negative control) をそれぞれ添加した well の比較、図 1 下のパネルは各 well の拡大図である。図 2 は破骨細胞数を計測したものである。人工エクソソームは、タンパク質濃度 (13.7 ng/ μ l) が培地 100 μ l にそれぞれ 10 ng, 30 ng, 100 ng になるよう添加した。なお、RANK を発現させていない DOPC リポソームは人工エクソソーム 100 ng の時とリン脂質濃度が同じになるようにした。

実験にて得られた結果は以下の通りとなる。

- ① 人工エクソソームは破骨細胞形成を濃度依存的に抑制した
- ② 人工エクソソームは W9 25 μ M よりも破骨細胞形成を抑制した
- ③ 人工エクソソームの破骨細胞形成抑制効果は negative control とした DOPC リポソームを加えた実験群の破骨細胞形成抑制効果と近似した結果を示した



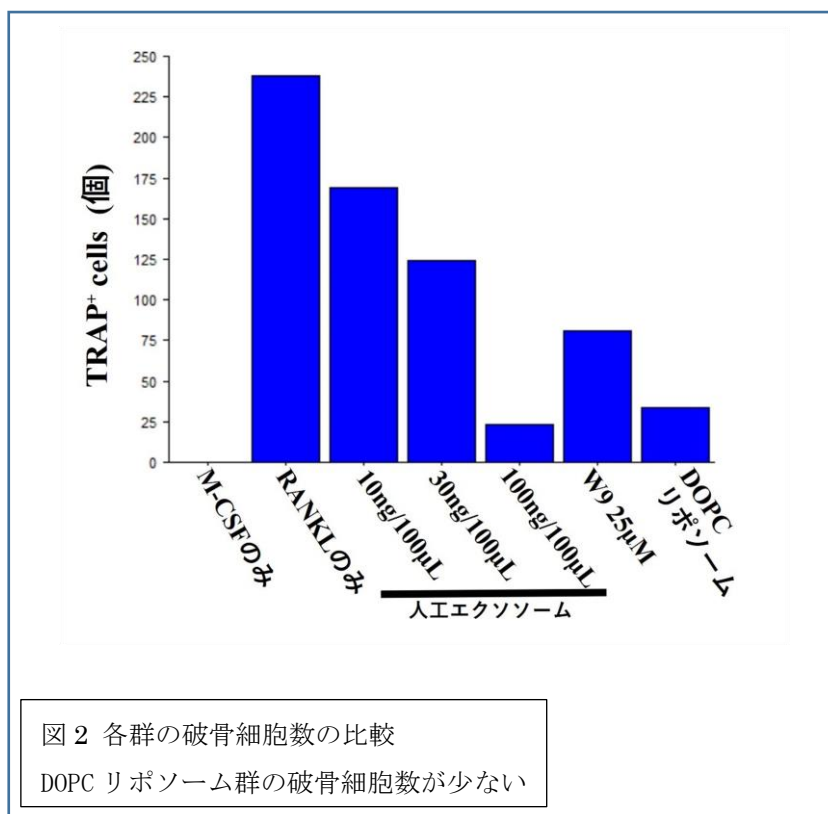
上記の結果は、人工エクソソームの構成材料であるリン脂質 DOPC 自体が破骨細胞形成を抑制することを示唆するものである。さらに検討を重ねた結果、培地の DOPC 濃度が 30 μ M 以上となると、DOPC による破骨細胞形成の阻害が起こることが分かってきた。

そこで、人工エクソソーム上の RANK の量を増やし、相対的にリン脂質である DOPC 濃度を低値とした RANK 発現エクソソームを新たに作製していただき、新たに実験をした結果が図 3 と図 4 である。新たに作製した RANK 発現エクソソームの DOPC 濃度は $3.3\sim 26\ \mu\text{M}$ と前実験と比較して可及的に低濃度にした。前の実験では、positive control を置いていなかったため、RANK-Fc 添加群を実験群に加え、アッセイ系が正常に動いているかを確認するように実験を組んだ。

実験にて得られた結果は以下の通りである。

- ① RANK 発現エクソソームは RANKL に対して十分量添加したが、RANK-Fc (positive control) と比較して破骨細胞形成を十分に抑制したとは言えない
- ② RANKL で破骨細胞分化誘導を行った well と比較して、RANK エクソソームは濃度依存的に破骨細胞形成を抑制したが、同じように DOPC リポソーム (RANK が発現していないエクソソーム: negative control) もまた濃度依存的に破骨細胞形成を抑制した
- ③ DOPC は濃度 $30\ \mu\text{M}$ 未満であっても破骨細胞形成に対して抑制的働いた事が示唆された

本研究では、図 1～図 4 の結果以外にもエクソソーム上に発現する RANK 濃度を適宜変更し、検討を重ねたが、機能的な RANK-RANKL 結合を確認できなかった (RANKL 結合能を有する RANK 発現エクソソームの作製に至らなかった)。

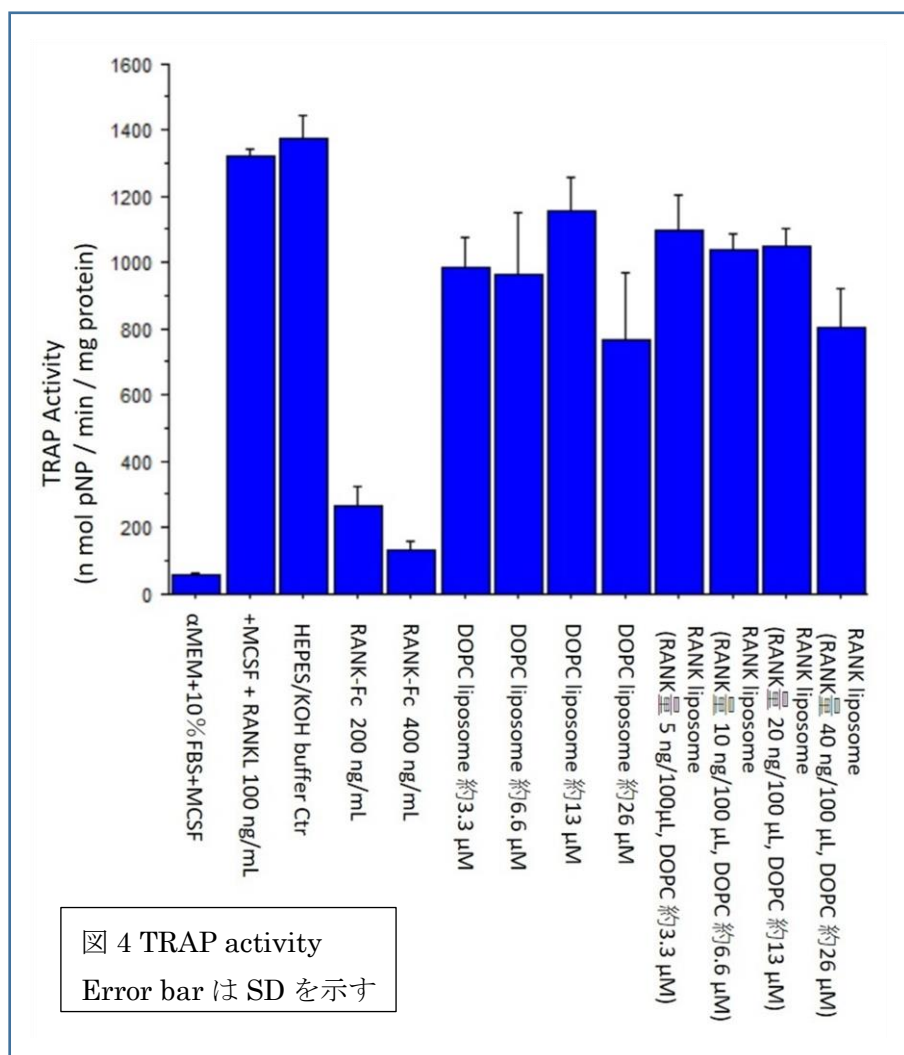
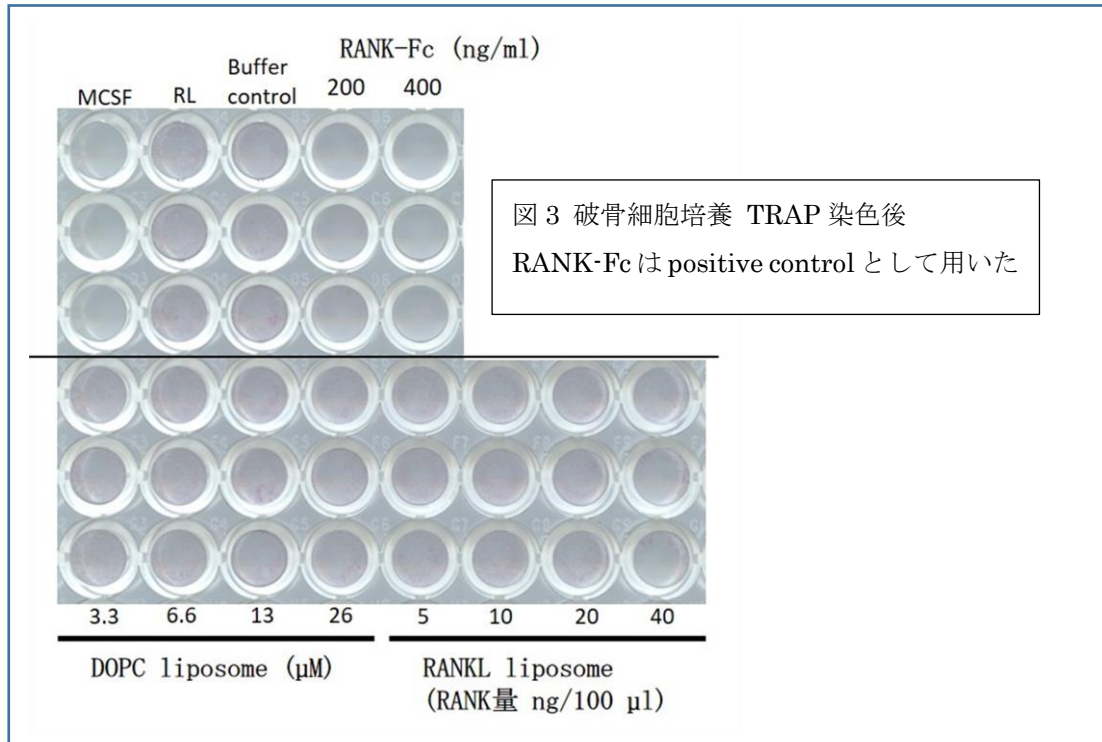


(2) 今後の展望と課題

本研究の結果から、リン脂質 DOPC はエクソソームの構成材料として不適切であり、異なるリン脂質の使用を検討する必要があることが分かった。また、研究開始当初は、適切な量(もしくは濃度)の RANK を組み込む事で、RANKL 結合能を有する RANK 発現エクソソームが作製可能であると考えていたが奏功しなかった。その理由として、生理的に、RANKL 刺激により活性化した RANK は三量体化することで下流にシグナル伝達する事が知られていることから、機能的な RANK-RANKL 結合を誘導するには、人工エクソソーム上に三量体構造を模した RANK を発現させる工夫が必要と考える。以上 2 点が、今後の研究の方向性として見出された。

(3) 謝辞

本研究において、京都大学 安藤 満先生、東京医科歯科大学 清水 優里様には多くのご協力いただきましたことをここに感謝いたします。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| 1. 著者名 Sato Tsuyoshi, Iwata Takanori, Usui Michihiko, Kokabu Shoichiro, Sugamori Yasutaka, Takaku Yuki, Kobayashi Takashi, Ito Ko, Matsumoto Masahito, Takeda Shu, Xu Ren, Chida Dai | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Bone phenotype in melanocortin 2 receptor-deficient mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Bone Reports | 6. 最初と最後の頁 100713 ~ 100713 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bonr.2020.100713 | 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 - |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 1. 著者名 Ikebuchi Yuki, Aoki Shigeki, Honma Masashi, Hayashi Madoka, Sugamori Yasutaka, Khan Masud, Kariya Yoshiaki, Kato Genki, Tabata Yasuhiko, Penninger Josef M., Udagawa Nobuyuki, Aoki Kazuhiro, Suzuki Hiroshi | 4. 巻 561 |
| 2. 論文標題 Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nature | 6. 最初と最後の頁 195 ~ 200 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41586-018-0482-7 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|
| 1. 著者名 Rashed Fatma, Kamijyo Shingo, Shimizu Yuri, Hirohashi Yuna, Khan Masud, Sugamori Yasutaka, Murali Ramachandran, Aoki Kazuhiro | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 The Effects of Receptor Activator of NF- B Ligand-Binding Peptides on Bone Resorption and Bone Formation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 648084 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.648084 | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1. 発表者名 青木和広、清水優里、Lu Wei、廣橋優奈、曽根絵梨、池淵祐樹、Masud Khan、Fatma Rashed、田村幸彦、菅森泰隆、寺坂尚紘、宇田川信之、依田哲也、本間雅、菅裕明 |
| 2. 発表標題 膜型RANKLを標的にした骨形成促進薬の開発 |
| 3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|