

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07269

研究課題名(和文)メカニカルストレス高反応性間葉系幹細胞由来のエクソソームと糖鎖による骨再生制御

研究課題名(英文) Regulation of bone regeneration by exosomes and sugar chains derived from mechanical stress highly reactive mesenchymal stem cells

研究代表者

池亀 美華 (Ikegame, Mika)

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：70282986

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、細胞外分泌小胞(エクソソーム)を再生医療に応用する方法が注目されている。本研究では若い骨芽細胞である前骨芽細胞から分泌されるエクソソームの、骨芽細胞分化への作用と、その作用に及ぼすメカニカルストレスの影響を検討した。前骨芽細胞様細胞株(MC3T3-E1)の培養上清から得られたエクソソームを、骨芽細胞分化培養系に加えた結果、骨芽細胞分化マーカーの発現は抑制され、さらに伸展刺激を加えた場合には、その抑制効果はやや強まった。以上から、前骨芽細胞から産生されるエクソソームには、骨芽細胞分化抑制作用があること、その抑制効果はメカニカルストレスによって強められることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、メカニカルストレスにより骨細胞由来のエクソソームが増加し、それらは骨形成を促進すると報告されている(Morreil, 2018)。しかし、前骨芽細胞を用いた本研究では、メカニカルストレスを与えた細胞のエクソソームは骨芽細胞分化を促進しなかった。前骨芽細胞は、これから骨形成を盛んに行う細胞であり、周囲の細胞に対して分化を促進するシグナルを送る必要がなく、むしろネガティブフィードバックをかけているのかもしれない。この研究結果は、若い骨芽細胞から産生される、骨芽細胞分化に抑制的な作用をもつエクソソームの作用をブロックすることで、骨形成を促進できる可能性を提示したものとして意義深い。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of exosomes secreted from preosteoblasts, on osteoblast differentiation and the effect of mechanical stress on the effect. As a result of adding exosomes obtained from the culture supernatant of the preosteoblast-like cell line (MC3T3-E1) to the osteoblast differentiation culture system, the expression of the osteoblast differentiation marker was suppressed. This effect was slightly strengthened in the exosomes from tensile-stressed cells. Therefore, it was suggested that exosomes produced from preosteoblasts have an osteoblast differentiation inhibitory effect, and that the inhibitory effect is enhanced by mechanical stress.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：メカニカルストレス 間葉系細胞 骨芽細胞分化 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

近年、間葉系幹細胞 (MSCs) の細胞外分泌小胞 (エクソソーム) を、再生医療に応用する方法が注目されている。エクソソームは膜に囲まれた小胞でタンパク質や核酸を含有し、細胞間における生物学的活性因子の受け渡しに利用される。最近では、メカニカルストレスにより増加する骨細胞由来のエクソソームが骨形成を促進することが報告されている (Morrell et al, Bone Res, 2018)。また、エクソソーム表面に存在する糖鎖は、細胞外基質や細胞表面糖鎖との相互作用により、組織内での保持や、細胞への取込みに重要な役割を果たしていると考えられている。従って、MSCs のエクソソームやその表面糖鎖は骨組織の形成・修復に重要な役割をもつと考えられるが、その分子メカニズムは未知の点が多く、また、強力な骨形成促進因子であるメカニカルストレスとの関係はほとんど知られていない。

メカニカルストレスは MSCs から骨芽細胞への分化を強力に促進する重要な環境因子である。我々は、メカニカルストレスによる MSCs の分化促進メカニズムを解析するため、独自の実験系 (頭蓋冠縫合部器官培養系) を開発した。そして組織中の MSC に、メカニカルストレスに対して高い応答性を示す系譜が存在することを見出した。これらの細胞は骨芽細胞分化を促進する能力が高いと考えられ、その系譜や性質を明らかにすることはより効率的な骨誘導を行うための MSCs 選定に重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、メカニカルストレスに反応して骨芽細胞分化に寄与する組織内間葉系細胞の同定、それらの細胞から分泌されるエクソソームやその糖鎖の、メカニカルストレスによる変化、ならびに骨修復過程への関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 頭蓋冠縫合部器官培養系で縫合部にメカニカルストレスとして伸展刺激を加え、その培養上清から得られたエクソソームの骨芽細胞分化への影響

生後 4 日齢マウスから得られた頭蓋冠を用いた器官培養系において、矢状縫合部にばね装置を用いて持続的伸展刺激を加えた。対照群には伸展力を生じないように固定したばね装置を装着した。

24 時間培養後、培養上清からフィルター法 (Amicon Ultra, Millipore) により細胞外小胞を回収し、ネガティブ染色法により透過型電子顕微鏡で小胞のサイズを観察した。

これらのエクソソーム (刺激なし: 0-EVs, 伸展刺激あり: 0.2-EVs) を、前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の培養液に添加し、また、エクソソームを添加しない群 (Blank) を作成した。

5 日間培養後、RNA を抽出しリアルタイム PCR によって骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現を検討した。

(2) 前骨芽細胞系細胞株、MC3T3-E1 の異なる培養時間の培養上清から得られたエクソソームの骨芽細胞分化への影響

間葉系細胞の一つとして、MC3T3-E1 細胞が産生するエクソソームについて検討した。

MC3T3-E1 細胞を 3, 5, 7 日間培養し、それぞれの培養時間の培養上清から (1) と同様の方法により細胞外小胞回収し、ネガティブ染色法により透過型電子顕微鏡で小胞のサイズを観察した。

各エクソソーム (3d-EV, 5d-EV, 7d-EV) を、新たな MC3T3-E1 細胞の培養液に添加し、また、エクソソームを添加しない群 (Blank) を作成した。

5 日間培養後、RNA を抽出しリアルタイム PCR によって骨芽細胞分化マーカー遺伝子発現を検討した。また、一部の細胞については固定してアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性染色を、さらに ALP 活性定量を行った。

(3) 伸展刺激を加えた前骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞の培養上清から得られたエクソソームの骨芽細胞分化への影響

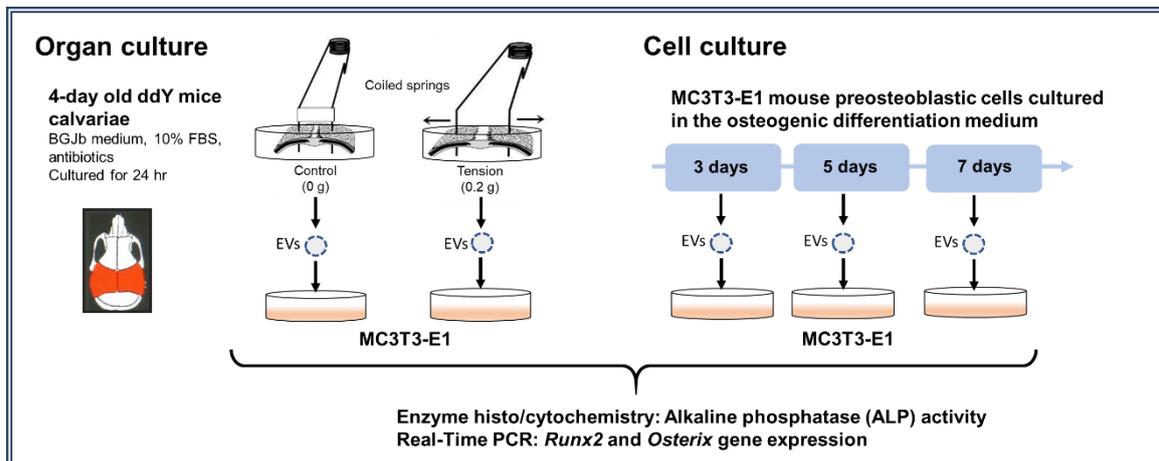
伸展刺激がエクソソームの性質に影響するかどうかを調べるために、伸展刺激を加えない細胞と加えた細胞の培養上清から得られたエクソソームを用いて検討した。

MC3T3-E1 細胞をストレッチチャンバー中で培養し、そのチャンバーにシェルパプロ (メニコン) を用いて一軸性、伸展率 10% の反復性伸展刺激または持続的伸展刺激を与えた。

刺激 6 時間後、培養上清からエクソソームを回収した (S-EV)。伸展刺激を加えない群からもエクソソームを抽出した (C-EV)。

各エクソソームを新たな MC3T3-E1 細胞の培養液に添加し、また、エクソソームを添加しない群 (Blank) を作成した。

5 日間培養後、骨芽細胞分化について (2) と同様の解析を行った。

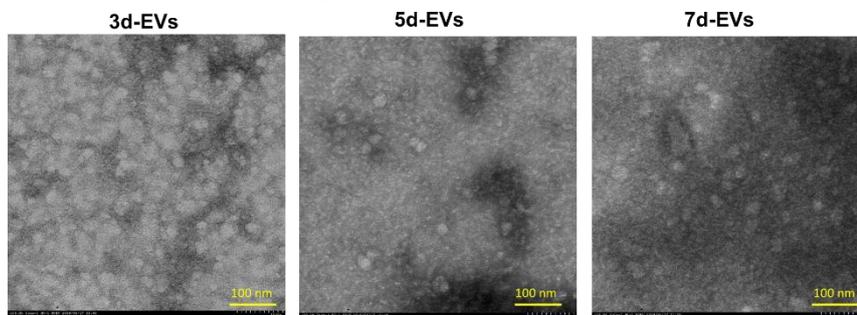


4. 研究成果

(1) 培養上清から得られた小胞のサイズについて

器官培養、細胞培養、いずれの培養上清からも、約 100nm の直径をもつ膜に囲まれたエクソソームと考えられる小胞が確認された。

Electron microscopy of EVs from MC3T3-E1 culture medium

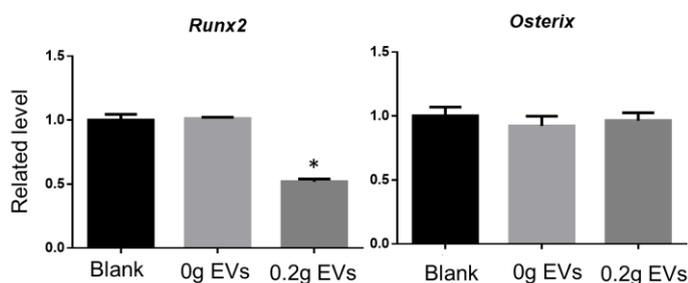


(2) 伸展刺激を加えた頭蓋冠縫合部のエクソソームの作用

骨芽細胞分化指標となる転写因子のうち、Osterix については差がなかったが、Runx2 については Blank に比較して伸展刺激を加えた頭蓋冠から得られたエクソソーム (0.2-EVs) を加えた群で有意に減少した。

従って、メカニカルストレスを加えた骨組織から産生されるエクソソームは、骨芽細胞分化に対して抑制的な効果を示すと考えられた。縫合部では伸展刺激によって前骨芽細胞の数が急速に増加することから、その効果は前骨芽細胞に由来する可能性が考えられた。

Osteogenic gene expression of MC3T3-E1 cells incubated with EVs from organ culture with or without tension



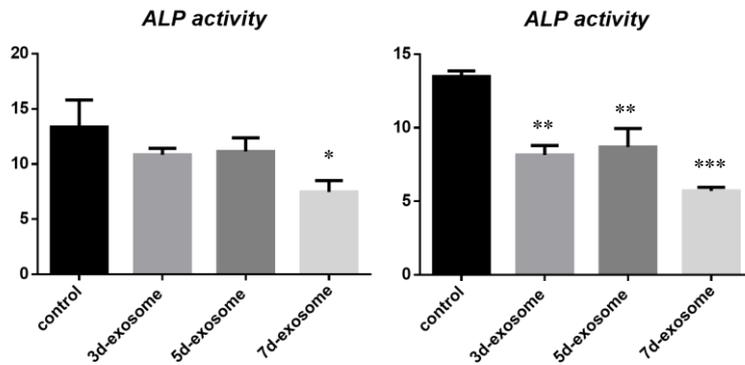
(3) 分化段階の異なる前骨芽細胞様細胞のエクソソームの作用

頭蓋冠には様々な種類の間葉系細胞が混在しているため、次に培養細胞を用いていくつかの分化段階の細胞から得られるエクソソームについて検討した。

①骨芽細胞分化指標となる転写因子 Runx2 について、培養 3、7 日の前骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞から得られたエクソソームは抑制的な作用を示した。

②ALP 活性について、7 日のエクソソームは抑制的な作用を示した。さらに、エクソソームの添加量を増やしたところ、いずれの培養日数のエクソソームも、さらに強い抑制作用を示した。

従って、前骨芽細胞にまで分化した細胞では、そのエクソソームは骨芽細胞分化に抑制的に作用し、培養日数が多いほど、すなわち分化が進むほど、その抑制効果は強くなると考えられた。

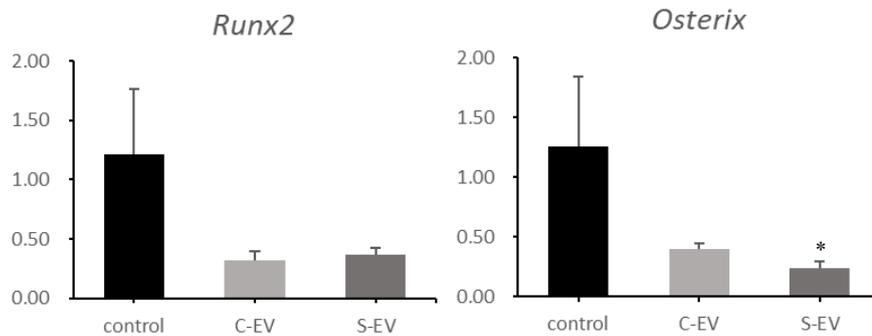


(4) 伸展刺激を加えた前骨芽細胞様細胞のエクソソームの作用

持続的伸展刺激よりも、間欠的伸展刺激のほうが骨芽細胞分化に対して最終的には促進的である可能性が示された。しかしながら、間欠的伸展刺激の初期では骨芽細胞分化はむしろ抑制されていた。従って、刺激後、どのような時期のエクソソームについて解析するかについて検討が必要ではないかと考えられた。今回は、間欠的伸展刺激を与えた細胞から得られたエクソソームを用いた。①骨芽細胞分化指標となる転写因子、Runx2 と Osterix の発現について、C-EV, S-EV いずれも抑制的に作用した。Osterix については、C-EV に比べて S-EV のほうが抑制作用が強かった。

②ALP 活性については、有意な差は見いだせなかった。

従って、メカニカルストレスを加えた前骨芽細胞から産生されるエクソソームは、ストレスを加えていない細胞から得られるエクソソームに比べて、骨芽細胞分化に対してわずかに抑制的な効果を示す可能性が示された。



以上から、骨組織内にみられる間葉系細胞の中でも、前骨芽細胞まで分化が進んだ細胞から産生されるエクソソームには、骨芽細胞分化に対して抑制的に作用することが示唆された。さらに、骨芽細胞分化が進むほどその抑制効果は高まること、メカニカルストレスによってその抑制効果が強められる可能性も明らかになった。このような間葉系細胞由来エクソソームの骨芽細胞分化に対する抑制的な作用についてはこれまで報告されていない。よって、再生医療にエクソソームを利用するには、その由来について十分に検討する必要があると考えられた。

今回、組織内から間葉系幹細胞を分離し、そのエクソソームの効果を検討したかったが、単離が想像以上に困難で、実験に十分な細胞数が得られないこと、さらに単離培養したとたんにそれらの細胞は性質を変えてしまうことがわかり、この実験は断念した。また、結果が当初予測していたのとは反対に、メカニカルストレスを与えた細胞のエクソソームは骨芽細胞分化を促進しなかった。これは一つには細胞による違いではないかと考えられた。今回検討した前骨芽細胞様細胞は、骨形成を盛んに行う段階に入ろうとしている細胞であり、周囲の間葉系細胞に対しては分化を促進するシグナルを送る必要がなく、むしろネガティブフィードバックをかけているのかもしれない。今後、再生医療に役立つ情報を得るためには、これから骨形成に参与しようとするような、もっと分化度の低い細胞、あるいは次のリモデリングに向けて準備をしているような、分化の終点にあるような間葉系細胞を用いた検討をすべきと考えられる。さらに今回の研究結果は、若い骨芽細胞から産生される、骨芽細胞分化に抑制的な作用をもつエクソソームの作用をブロックすることで、骨形成を促進できる可能性を提示したものと興味深い。

さらに、伸展刺激を加える実験系を行う中で、メカニカルストレスに応答して著しく変化する因子の一つとして転写共因子 Vgl13 を見出し、その骨芽細胞分化への影響を明らかにした (Calcif Tissue Int, in press)。この因子とエクソソームの関係については今後の課題である。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|--|------------------------|
| 1. 著者名 Haoze Yuan, Mika Ikegame*, Yoko Fukuhara, Fumiko Takemoto, Yaqiong Yu, Jumpei Teramachi, Yao Weng, Jiajie Guo, Daisuke Yamada, Takeshi Takarada, Ying Li, Hirohiko Okamura and Bin Zhang | 4. 巻 in press |
| 2. 論文標題 Vestigial-like 3 plays an important role in osteoblast differentiation by regulating the expression of osteogenic transcription factors and BMP signaling | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Calcif Tissue Int | 6. 最初と最後の頁 in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 該当する |

〔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 Hauze Y, Weng Y, He Y, Yu Y, Okamura H, Ikegame M |
| 2. 発表標題 The role of extracellular vesicles in osteoblast differentiation under the tension |
| 3. 学会等名 第5回外国人留学生研究発表会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------|
| 1. 発表者名 池亀美華, 内部健太, 岡村裕彦 |
| 2. 発表標題 骨芽細胞分化におけるVgll3の発現 |
| 3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会総会 |
| 4. 発表年 2019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 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 岡村 裕彦 (Okamura Hirohiko) (20380024) | 岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 内部 健太 (Uchibe Kenta) (20584618) | 広島大学・医系科学研究科(歯)・准教授 (15401) | 削除：2020年3月9日 |
| 研究分担者 | 宝田 剛志 (Takarada Takeshi) (30377428) | 岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301) | |
| 研究分担者 | 江尻 貞一 (Ejiri Sadakazu) (40160361) | 朝日大学・歯学部・教授 (33703) | |
| 研究分担者 | 河邊 憲司 (Kawabe Kenji) (60803856) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301) | 削除：2019年7月24日 |

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 | | |
|---------|---------|---------------------------|--------------------------|
| | 中国 | Harbin Medical University | China Medical University |