

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10195

研究課題名(和文) 脱分化脂肪細胞由来エクソソームが拓く広域下顎骨骨欠損の再建

研究課題名(英文) Reconstruction of extensive mandibular bone defects using dedifferentiated adipocyte-derived exosomes.

研究代表者

窪 寛仁 (KUBO, Hirohito)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：70388362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：作製した細胞のフローサイトメトリーを行い、細胞マーカーCD28、血管上皮マーカーCD140共に陰性であった。幹細胞マーカーであるCD90の陽性を認めた。その結果、天井培養を用いて作製した細胞は、脱分化脂肪細胞であることが明らかとなった。ナノサイト解析の結果は平均粒子径122～140nmであり、検体中の濃度は4.30～4.74 (10<sup>9</sup> particles/ml)であった。TEMにて脂質二重膜をもつ直径約100nmの粒子を確認した。DFAT-Evは、ナノフローサイトメトリーにてCD9、CD81陽性であった。RT-PCR法でDFAT-Evを添加した骨芽細胞分化マーカーの発現に差を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、我々は細胞移植による広域の骨欠損治療のハードルとなっている二つの原因、純度の高い(homogeneousな)細胞集団の確保、および移植局所の血管新生の改善を研究ターゲットとした新規広域骨組織再建法の開発を目的とした研究を計画した。すなわち、骨の再建に必須となる大量の間葉系幹細胞の確保のために脂肪を細胞供給源としたDFATsを作製し、さらに移植局所の血管新生の改善にはDFATsエクソソームを用いる。以上、これまでの細胞移植の問題点を解決し、大型の骨再生を誘導する方法を見出すことを本研究課題によって可能となった。

研究成果の概要(英文)：Flow cytometry of the generated cells was performed and was negative for both the Th ligand marker CD28 and the vascular epithelial marker CD140. The stem cell marker CD90 was positive. The results showed that the cells prepared using ceiling culture were dedifferentiated adipocytes. Nanocytometric results showed an average particle size of 122-140 nm and a concentration in the specimen of 4.30-4.74 (10<sup>9</sup> particles/ml). TEM showed particles with a lipid bilayer of approximately 100 nm in diameter. DFAT-Ev was found to be nanoflow cytometry RT-PCR showed differential expression of osteoblast differentiation markers with DFAT-Ev.

研究分野：再生歯学

キーワード：エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域における下顎骨組織欠損は先天性のほか、外傷、感染、腫瘍の切除によって生じ、これに対して、従来は金属プレート、骨移植、または仮骨延長による骨の再建が行われてきた。しかし、侵襲性の点から、今後は細胞を用いた再生医療による安全で確実な骨増生が望まれている。再生医療に用いる再生組織をあらかじめ工業的に大量生産して、必要時にいつでも利用可能にするには、培養系を用いた *in vitro* 組織再生が望ましい。しかし、細胞治療において、骨髄間葉系幹細胞 (BMSCs) を使用するには疼痛を伴う骨髄穿刺が必要であると言った問題点がある。さらに BMSCs は非常に heterogeneous (純度の高い) 細胞集団であり (J Cell Physiol. 2008; 215: 210-222.) 臨床応用における安全性を考慮した場合、より純度の高い幹細胞が必要である。脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells : DFATs) はすべての年齢層から少ない侵襲で採取可能で、天井培養法を用いて作製されるため、非常に純度の高い細胞集団である。また高い増殖性、骨、軟骨、脂肪などの組織に分化する多能性を有し、再生医療用ドナー細胞として期待されている (J Cell Physiol. 2008; 215: 210-222.)。

BMSCs の移植によるさまざまな治療効果が報告される中で、BMSCs エクソソームを用いた組織再生での応用については、Qi ら (Int J Biol Sci 12: 836-849, 2016) が BMSCs 由来エクソソームがラットの頭蓋骨欠損の骨を治癒させ、Zhang ら (Biomaterials 156: 16-27, 2018) は関節内への度重なる注射によって軟骨形成、骨軟骨欠損を修復することを報告している。また、間葉系幹細胞はさまざまな血管新生因子を産生することが知られているが、エクソソームにもその作用があることが示されている。BMSCs エクソソームは、さまざまな病態モデルにおいて局所に投与すると新生血管化をもたらすことが報告されている。一方で、最近になって、DFATs から Exosome が分泌され、免疫制御作用などの治療効果が明らかになってきたものの、組織再生への基礎的研究も始まっていない。

## 2. 研究の目的

今回、我々は細胞移植による広域の骨欠損治療のハードルとなっている二つの原因、純度の高い (homogeneous な) 細胞集団の確保、および移植局所の血管新生の改善を研究ターゲットとした新規広域骨組織再建法の開発を目的とした研究を計画した。すなわち、骨の再建に必須となる、大量の間葉系幹細胞の確保のために脂肪を細胞供給源とした DFATs を作製し、さらに移植局所の血管新生の改善には DFATs エクソソームを用いる。また、エクソソームは脂質二重膜によって内容物をさまざまな酵素から保護し、免疫細胞による貪食作用を回避することから、長時間、血液循環にとどまれる理想的なドラッグデリバリーベークルとしての特徴を持っている。以上、これまでの細胞移植の問題点を解決し、大型の骨再生を誘導する方法を見出すことを本研究課題の目的とした。さらに、DFATs の作製および細胞移植までのステップの全てを、動物由来成分を排除したプロトコール (Xeno-Free 条件) で行うことで、本研究結果をより早期に現実的な臨床応用へ生かせるように工夫した。

## 3. 研究の方法

生後 8 週齢 SD 系雄性ラットの鼠径部より脂肪組織を採取し、コラゲナーゼ溶液中処理する。得られた成熟脂肪細胞をゼノフリー培地で完全に満たされた 25cm<sup>2</sup> フラスコに播種し、脂肪細胞がフラスコ内側の天井表面に接着するようフラスコの接着面を上方にして、培養する。7 日後、培地を除去し、細胞がフラスコ底面に位置するようにフラスコを反対にし、通常培養を開始する。作製した細胞をフローサイトメトリー解析にて評価した。DFAT の培養上清よりサイズ排除クロマトグラフィー法にて Ev の抽出を行った。透過電子顕微鏡 (TEM) による画像解析、ナノサイト測定、ナノフローサイトメトリー解析を行った。また、骨分化培地に DFAT-Ev を添加した際の骨分化マーカーの発現の差を RT-PCR 法にて評価した。

単離した細胞外小胞を体内で徐放化する担体の作製にも取り組んだ。細胞外小胞の表面が負に帯電していることに着目し、正電荷を付与したゼラチンハイドロゲル担体 (カチオン化ゼラチンハイドロゲル) を作製した。まず、ゼラチンのカルボキシ基に対してエチレンジアミンを縮合剤にて化学導入したカチオン化ゼラチンを作製した。添加する縮合剤を変化させて、カチオン化率の異なる 3 種類のカチオン化ゼラチンを作製した。得られたカチオン化ゼラチン水溶液をバランスディッシュに流延、ゲル化させた後、凍結乾燥した。凍結乾燥した未架橋カチオンゼラチンハイドロゲルシートを真空オープンヘー一定時間静置することでカチオン化ゼラチンハイドロゲルシートを熟架橋した。得られた架橋カチオン化ゼラチンハイドロゲルシートの分解性を調べた。架橋カチオン化ゼラチンハイドロゲルシートをリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) へ浸漬した。経時的に上清を回収した。24 時間後、コラゲナーゼを含む PBS へ交換し、さらに経時的に上清を回収した。回収した上清に含まれるカチオン化ゼラチンをピシンコニン酸試薬にて定量した。

## 4. 研究成果

細胞は紡錘形に伸展しており、線維芽細胞様である (図 1)。作製した細胞のフローサイトメ

トリーを行い Th リガンドマーカーCD28、血管上皮マーカーCD140 共に陰性であった。幹細胞マーカーである CD90 の陽性を認めた ( 図 2 )。その結果、天井培養を用いて作製した細胞は、脱分化脂肪細胞であることが明らかとなった。ナノサイト解析の結果は平均粒子径 122 ~ 140nm であり、検体中の濃度は 4.30 ~ 4.74 (  $10^9$  particles/ml ) であった。TEM にて脂質二重膜をもつ直径約 100nm の粒子を確認した ( 図 3 )。DFAT-Ev は、ナノフローサイトメトリーにて CD9、CD81 陽性であった ( 図 4 )。RT-PCR 法で DFAT-Ev を添加した骨芽細胞分化マーカーの発現に差を認めた。

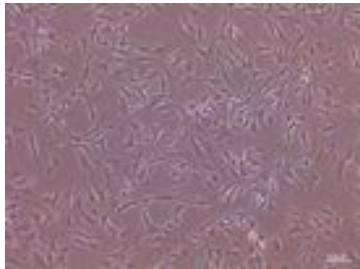


図 1 樹立した DFAT 細胞

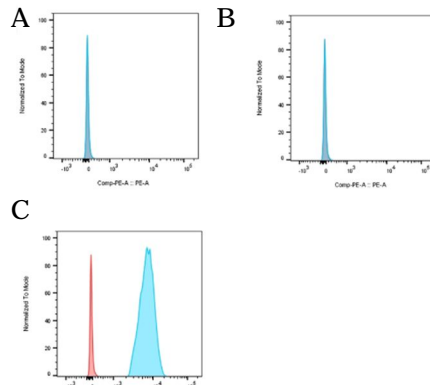


図 2 DFAT の A.CD28 B.CD140 C.CD90 発現

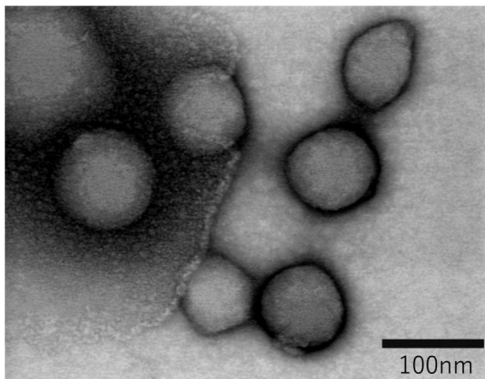


図 3.DFAT エクソソームの TEM 観察像

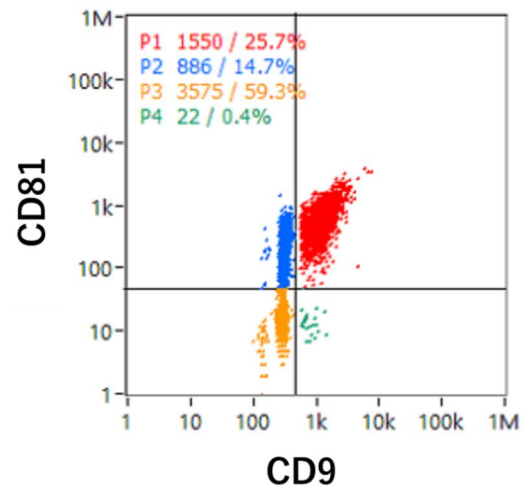


図 4. ナノサイトを用いたエクソソームの発現

図 5 は、カチオン化率の異なる架橋カチオン化ゼラチンハイドロゲルシートの分解性である。本研究で実施した熱架橋条件では、カチオン化率によらず、ほぼ同じ分解挙動を示した。PBS 浸漬後 24 時間までに約 20% のハイドロゲルが分解した。これは、熱架橋に関与しなかったカチオン化ゼラチン鎖が溶出したためと考えられる。コラゲナーゼに浸漬後は、ハイドロゲルの分解は加速された。現在、このカチオン化ゼラチンハイドロゲルへ細胞外小胞を含浸し、細胞外小胞の担持および放出挙動の評価を行っているところである。

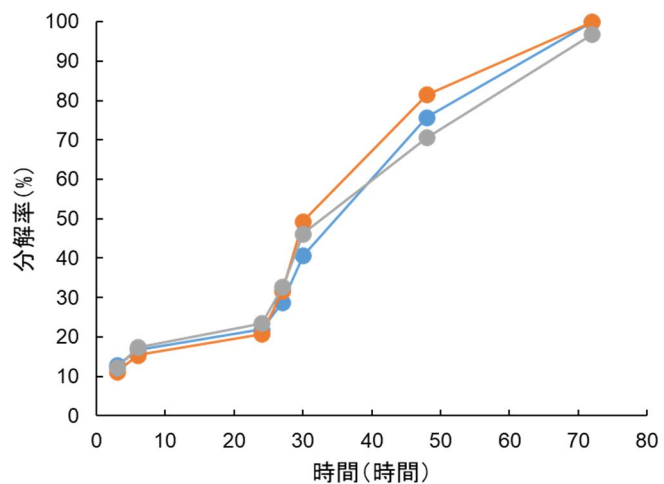


図 5. カチオン化率の異なる架橋カチオン化ゼラチンハイドロゲルシートの分解性

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Deng Wenqi, Jo Jun ichiro, Tanaka Tomonari, Morikuni Hidetoshi, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki, Honda Yoshitomo	4. 巻 0
2. 論文標題 A Senomorphic Conjugated Scaffold for Application of Senescent Cells in Regenerative Medicine	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Therapeutics	6. 最初と最後の頁 2200276 ~ 2200276
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/adtp.202200276	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 Tsumano Nobuhito, Kubo Hirohito, Imataki Rie, Honda Yoshitomo, Hashimoto Yoshiya, Nakajima Masahiro	4. 巻 11
2. 論文標題 Bone Regeneration by Dedifferentiated Fat Cells Using Composite Sponge of Alfa-Tricalcium Phosphate and Gelatin in a Rat Calvarial Defect Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 11941 ~ 11941
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app112411941	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 Wang Xinchun, Honda Yoshitomo, Zhao Jianxin, Morikuni Hidetoshi, Nishiura Aki, Hashimoto Yoshiya, Matsumoto Naoyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 Enhancement of Bone-Forming Ability on Beta-Tricalcium Phosphate by Modulating Cellular Senescence Mechanisms Using Senolytics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12415 ~ 12415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212415	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 Kosuke Nakano, Hirohito Kubo, Masahiro Nakajima, Yoshitomo Honda, Yoshiya Hashimoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Bone Regeneration Using Rat-Derived Dedifferentiated Fat Cells Combined with Activated Platelet-Rich Plasma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13225097	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Nishiguchi, Mamoru Ueda, Hirohito Kubo, Yoshiya Hashimoto
2. 発表標題 Characterization of extracellular vesicles isolated from dedifferentiated fat cell 's conditioned media
3. 学会等名 国際歯科材料会議 2022 第80回 学術講演会（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 妻野誠仁, 中野宏祐, 上田 衛, 西口雄祐, 窪 寛仁, 中嶋正博
2. 発表標題 TCP/ゼラチンスポンジ複合体を足場とした脱分化脂肪細胞による骨再生の試み
3. 学会等名 第66回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 妻野誠仁, 窪 寛仁, 今滝梨江, 本田義知, 橋本典也, 中嶋正博
2. 発表標題 ラット頭蓋冠欠損モデルにおけるアルファリン酸三カルシウムとゼラチンの複合スポンジを用いた脱分化脂肪細胞による骨再生
3. 学会等名 第19回日本再生歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野宏祐, 窪 寛仁, 上田 衛, 妻野誠仁, 中嶋正博
2. 発表標題 ラット脱分化脂肪細胞(DFATs)と活性化多血小板血漿(aPRP)を用いた骨芽細胞分化能と骨再生
3. 学会等名 第65回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 妻野誠仁, 中野宏祐, 本橋具和, 長谷小町、窪 寛仁, 中嶋正博
2. 発表標題 ビーグル犬脂肪組織からの脱分化脂肪細胞作製の試み
3. 学会等名 第65回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中野宏祐, 窪 寛仁, 本田義知, 橋本典也, 中嶋正博
2. 発表標題 ラット由来脱分化脂肪細胞と活性化多血小板血漿を用いた骨再生
3. 学会等名 第567回 大阪歯科学会例会
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
研究 分担者	橋本 典也  (HASHIMOTO Yoshiya)  (20228430)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	
研究 分担者	本田 義知  (HONDA Yoshitomo)  (90547259)	大阪歯科大学・歯学部・教授   (34408)	

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