

令和 6 年 4 月 5 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K16755

研究課題名（和文）基質小胞を介する新しい骨代謝制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of bone regeneration and bone remodeling mediated by matrix vesicles

研究代表者

水上 優哉（Mizukami, Yuya）

近畿大学・医学部・助教

研究者番号：20881163

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、骨芽細胞が分泌する基質小胞の骨・軟骨再生過程、骨代謝調節における作用を明らかにすることを目的に行われた。本研究結果により、骨芽細胞由来の基質小胞の局所投与により骨・軟骨形成の活性化を介して骨修復・再生を促進すること、および全身投与によりエストロゲン欠乏性の骨脆弱化を抑制する可能性が示された。これらの成果は生体内における基質小胞の新たな生理的な役割の存在を示唆するとともに、基質小胞を利用した新規の骨修復・再生治療法および骨代謝異常治療薬の創出において重要な知見を供するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会の進行を背景に骨代謝性疾患や骨再生能の低下を起因とした運動機能障害の改善が健康寿命延伸のための課題となっている。本研究により初めて明らかとなった基質小胞の骨修復・再生作用や骨脆弱化を抑制する作用は、これらの問題を解決するための糸口になる可能性がある。今後のさらなる研究により、基質小胞が有する骨再生メカニズムを明らかにすることで、同メカニズムを利用した新規骨再生治療法および骨粗鬆症薬の開発による健康長寿な社会の実現に貢献できると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to elucidate the effects of matrix vesicles derived from osteoblasts on bone regeneration and the regulation of bone remodeling. The study revealed two therapeutic possibilities of matrix vesicles in bone regeneration. Firstly, local administration of matrix vesicles promoted bone regeneration by activating osteogenesis and chondrogenesis. Secondly, systemic administration of matrix vesicles restored bone fragility caused by estrogen deficiency. This study highlights the novel role of matrix vesicles in bone physiology and provides important insights for the development of medications for bone disorders and bone regeneration.

研究分野：骨代謝学

キーワード：基質小胞 細胞外小胞 骨代謝 骨再生 骨粗鬆症

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の進行を背景に、健康寿命の延伸が重要課題となっている。加齢や糖尿病、ステロイド治療を起因とした骨の脆弱化は、骨折を誘発するとともに骨再生能を低下させ、著しく運動機能を低下させる。そのため、骨代謝疾患や骨障害において、骨再生を促進する治療法が求められているが、現在骨形成を画期的に刺激できる治療法は数少ない。

細胞外小胞 (EVs) は、細胞から分泌される脂質膜小胞であり、産生細胞由来の脂質、タンパク質、核酸により構成される。分泌された EVs は、他の細胞に送達されることで細胞間情報伝達に関与し、細胞の恒常性維持や病態の発生に関与することが明らかとなっている。

骨代謝・骨再生において、骨の石灰化は重要な過程の一つである。骨の石灰化を担う細胞は骨芽細胞であるが、石灰化の実態は骨芽細胞が骨基質中に分泌する EVs の一種である基質小胞 (Matrix vesicles, MtVs) が担うと考えられている。MtVs は基質中に分泌されたのち、局所にとどまり、その内部でハイドロキシアパタイト結晶を形成することで石灰化の起点となるとされる。

骨芽細胞が分泌する EVs の骨代謝制御を介した生理的役割については、EVs の一種であるエクソソームの研究が多数報告されている。エクソソームと MtVs は、脂質二重膜の外殻を有する点、miRNA を内包する点で類似した特徴を有する一方で、「同細胞由来の MtVs とエクソソームの膜表面タンパク質の組成が異なること」、「MtVs は骨基質との親和性が高い一方で、エクソソームは骨基質との親和性が低いこと」、「エクソソームの粒子径 (50~200 nm) と比較して MtVs は幅広い粒子径 (20~2000 nm) を示すこと」など異なる点も多い。これらの違いから MtVs は、骨芽細胞が産生するエクソソームとは異なる生理的作用を有する可能性が考えられる。しかし、MtVs の石灰化過程以外における生理的、病態的役割は不明である。そのため、MtVs の未知の生理的、病態的役割を明らかにすることができれば、MtVs を介する新しい骨代謝制御機構の発見や MtVs を用いた新たな骨再生治療の創出につながる事が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、マウスによる *in vivo* 実験と培養細胞による *in vitro* の実験を組み合わせ、骨芽細胞が分泌する MtVs が骨代謝、骨欠損後の骨・軟骨修復・再生過程に及ぼす影響を明らかにすることである。そして、MtVs を介する新しい骨代謝制御機構の提唱および本機構を標的とした革新的な骨再生治療戦略の創出を目指す。

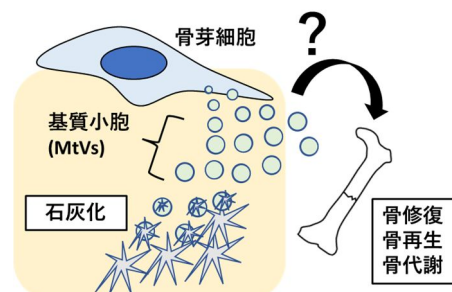


図1. MtVsの新たな生理作用の可能性

3. 研究の方法

(1) MtVs(CREVs)の単離

マウス初代骨芽細胞またはマウス頭蓋骨由来骨芽細胞株 MC3T3-E1 をアスコルビン酸と - グリセロリン酸にて刺激することで細胞外基質内への MtVs の分泌を誘導した。コラゲナーゼ処理により細胞外基質内から MtVs を分散し、得られた MtVs 含有液から段階遠心法により細胞や Debris を取り除いた。0.22 μm フィルター処理したのち、超遠心法により MtVs を単離した。さらに MC3T3-E1 の MtVs は、密度勾配遠心を行うことで精製を行った。尚、本法により精製された MtVs サンプルは、MtVs 以外の EVs が混在する可能性が排除できないことから Collagenase-released EVs (CREVs) と称する。

(2) CREVs の特性評価

マウス初代骨芽細胞、および同細胞由来の CREVs よりタンパク質を抽出し、Western blot 法により KDM1/LSD1、-actin、CD9、Annexin 5A の発現評価を行った。また、Nanosight を用いて NTA 法を利用した粒子径評価および ALP 活性の測定を行った。

(3) 骨修復に対する CREVs 局所投与効果の評価

12 週齢の雄マウスの大腿骨に直径 0.8 mm の骨欠損を作製した。10 μg タンパク質相当量のマウス初代骨芽細胞由来 CREVs を含浸した直径 1 mm のゼラチンハイドロゲルを骨欠損部局所に移植した。7 日後、骨欠損部の欠損部面積および新生骨量をマイクロ-CT 装置を使用して評価した。さらに、骨修復メカニズムの解析として、CREVs 移植 7 日後の骨組織を回収し、骨欠損部の組織切片を作製し、HE 染色、アルシアンブルー染色、ALP、TRAP、F4/80、CD31、PDGFR、SDF-1 の免疫染色を行った。

(4) エストロゲン欠乏性骨粗鬆症に対する CREVs 全身投与効果の評価

エストロゲン欠乏性の骨粗鬆症モデルマウスとして 8 週齢の雌マウスより両側の卵巣を摘出した。卵巣摘出 4 週間後より、60 µg/200 µL の MC3T3-E1 由来 CREVs を週に 1 回尾静脈投与した。4 週間の投与を行ったのち、マイクロ-CT 装置を使用して大腿骨の海綿骨密度、骨形態指標を測定した。

(5) CREVs の骨形成系細胞への作用評価

CREVs 添加時の BMP-2 刺激したマウス間葉系幹細胞株 (ST-2) およびマウス初代骨芽細胞の骨芽細胞分化関連因子 (ALP、Osterix、osteocalcin、Type I collagen) の遺伝子発現量を qRT-PCR 法により評価した。初代骨芽細胞においては、ALP 活性および石灰化能を評価した。

(6) CREVs の骨吸収系細胞への作用評価

骨髄細胞を CREVs 存在下で破骨細胞誘導し、TRAP 染色後に TRAP 陽性の多核細胞の形成数を測定した。

4. 研究成果

(1) CREVs の特性評価

単離した初代骨芽細胞由来 CREVs の粒子径は 50-200 nm であった。CREVs は、核および細胞質マーカーである KDM1/LSD1、 α -actin を発現しない一方で、EVs および MtVs マーカーである CD9、Annexin A5 を発現していた。また、CREVs は細胞ライセートと比較して有意に高い ALP 活性を示しており、単離した CREVs は基質小胞を含むことが示唆された。

(2) 骨修復に対する CREVs 局所投与の効果

マイクロ-CT を用いて CREVs 局所投与 7 日後の骨欠損部を観察した結果、CREVs 投与群では Vehicle 投与群と比較して有意に骨欠損部面積が低下し、骨欠損領域の BV/TV が増加した。これより、CREVs の局所投与は骨修復を促進することが明らかとなった。(図 2)

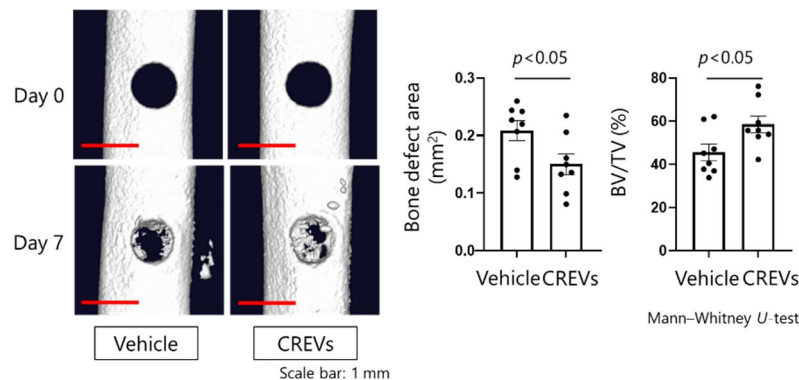


図2 骨修復に対する CREVs 局所投与の効果

(3) CREVs の骨修復促進メカニズム

ALP の免疫染色により骨欠損部の ALP 陽性細胞数を評価した結果、CREVs 投与 7 日後の骨欠損部では、Vehicle 投与群と比較して ALP 陽性細胞数が有意に増加していた。アルシアンブルー染色により骨欠損部の軟骨形成を評価した結果、CREVs 投与 7 日後の骨欠損部では、Vehicle 投与群と比較してアルシアンブルー染色エリアが有意に増加していた。CREVs 投与 7 日後の骨欠損部における TRAP、F4/80、CD31 免疫染色による TRAP 陽性細胞数、F4/80 陽性細胞数、CD31 陽性管腔数評価においては、CREVs 投与群と Vehicle 投与群の間に有意な差は見られなかった。以上の結果から、CREVs 投与による骨修復促進作用は、骨・軟骨形成の促進によるものであることが示唆された。(図 3)

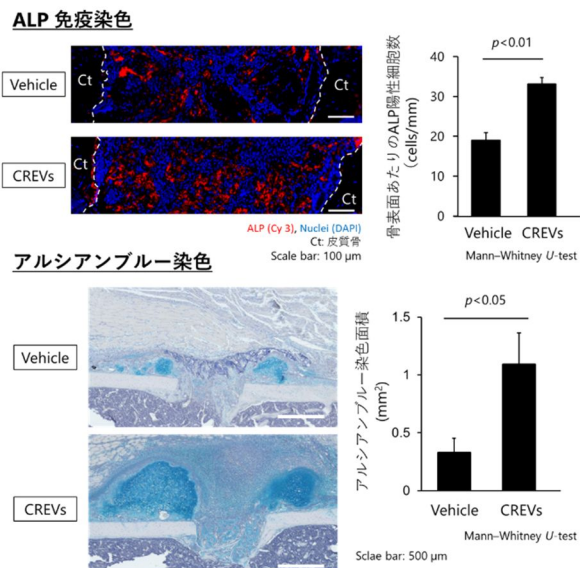


図3 CREVs の骨修復促進メカニズム(1)

また、骨欠損部周囲の HE 染色では、CREVs 投与部位に Vehicle 群では見られない特徴的な細胞集積が観察された。間葉系幹細胞に発現する PDGFR および SDF-1 により免疫染色を行った結果、集積した細胞の多くが PDGFR および SDF-1 陽性であった。以上の結果から、CREVs の骨・軟骨形成促進作用には、骨欠損部付近への間葉系幹細胞の集積が関与していることが示唆された。(図 4)

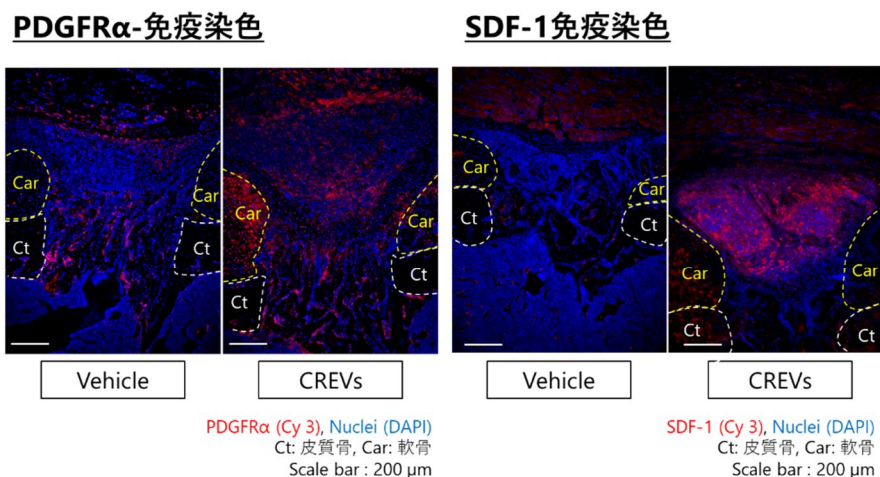


図4 CREVsの骨修復促進メカニズム(2)

(4) エストロゲン欠乏性骨粗鬆症に対する CREVs 局所投与の効果

MC3T3-E1 細胞由来 CREVs を投与したエストロゲン欠乏性の骨粗鬆症モデルマウスでは、Vehicle 投与群と比較して有意に骨密度、骨量、骨梁数が増加していた。これより CREVs の全身投与は、エストロゲン欠乏性の骨脆弱化を抑制することが示された。

(5) CREVs の骨形成系細胞への作用

マウス間葉系細胞株 ST-2 細胞の BMP-2 による骨芽細胞分化誘導に対する初代骨芽細胞由来 CREVs の影響を、骨芽細胞分化マーカーの発現により評価した結果、CREVs の添加により BMP-2 添加による Osterix、Osteocalcin の発現上昇が有意に抑制された。これより、Mts は骨芽細胞分化を抑制することが示された。また、CREVs がマウス初代骨芽細胞の ALP 活性および石灰化に与える影響を評価した結果、CREVs の添加は ALP 活性および石灰化に影響を与えなかった。これらの結果より、in vivo における CREVs の骨形成促進作用は、CREVs の骨芽細胞系細胞に対する直接的な作用でないことが示された。

(6) CREVs の骨吸収系細胞への作用

マウス骨髄細胞の RANKL により破骨細胞分化誘導に対する MC3T3-E1 細胞由来 CREVs の影響を、TRAP 陽性多核細胞の形成数により評価した結果、CREVs の添加により TRAP 陽性多核細胞数が有意に減少した。この結果より、CREVs は直接的に破骨細胞の形成を抑制することが示された。

<引用文献>

Mizukami Y, Kawao N, Takafuji Y, Ohira T, Okada K, Jo JI, Tabata Y, Kaji H. Matrix vesicles promote bone repair after a femoral bone defect in mice. PLoS One. 2023 Apr 7;18(4):e0284258.

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mizukami Yuya, Kawao Naoyuki, Ohira Takashi, Hashimoto Daiki, Okada Kiyotaka, Matsuo Osamu, Kaji Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Roles of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Heterotopic Ossification Induced by Achilles Tenotomy in Thermal Injured Mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Calcified Tissue International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-024-01193-5	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 Mizukami Yuya, Kawao Naoyuki, Takafuji Yoshimasa, Ohira Takashi, Okada Kiyotaka, Jo Jun-Ichiro, Tabata Yasuhiko, Kaji Hiroshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Matrix vesicles promote bone repair after a femoral bone defect in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284258	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水上優哉、河尾直之、高藤義正、大平宇志、岡田清孝、城 潤一郎、田畑泰彦、梶 博史.
2. 発表標題 骨芽細胞由来の基質小胞は大腿骨欠損後の骨修復・再生を促進する
3. 学会等名 第41回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 水上優哉、高藤義正、河尾直之、大平宇志、岡田清孝、城潤一郎、田畑泰彦、梶博史
2. 発表標題 骨芽細胞由来の基質小胞はマウス大腿骨欠損モデルにおいて骨修復・再生を促進する
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年～2023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
---------	---------