博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏　　名　竹内　涼子
学　　位　博　士（歯学）
学位記番号　新大院博（歯）第464号
学位授与の日付　令和2年3月23日
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
博士論文名　Exosomes from conditioned media of bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote bone regeneration by enhancing angiogenesis
骨髄間葉系幹細胞培養上清由来エクソソームは血管新生を介した骨再生を促進する

論文審査委員　主査　教　授　小林　正治
副査　教　授　佐伯　万騎男
副査　教　授　照沼　美穂

博士論文の要旨

【背景】
近年、間葉系幹細胞(MSCs)による組織再生において細胞からパラクラインに分泌される液性因子が深く関与していることが明らかにされている。われわれのグループはこれまでに間葉系幹細胞の培養上清(Mesenchymal Stem Cell-Conditioned Media; MSC-CM)が組織再生に有効であることを報告してきた。骨再生において、血管新生を介した血流・運搬システムの構築が細胞遊走や骨組織の石灰化に重要であり、その過程は MSCs が分泌するあらゆる因子によって制御されている。その中でわれわれは MSC-CM にも含まれる血管内皮細胞増殖因子(VEGF)に着目し、VEGF を中心とする血管新生を介した骨再生に焦点を当てた。エクソソームは細胞が分泌する細胞外小胞で microRNA を介した細胞間情報伝達に重要な役割を担い、組織の修復や再生に寄与することが報告されている。細胞間のパラクライン作用におけるコミュニケーションメカニズムは不明な部分が多いが、本研究では MSC-CM の構成因子の一つであるエクソソームに着目し、エクソソームによる骨形成効果を血管新生の観点から検討した。
【材料・方法】
ヒト MSCs を 10%ウシ胎児血清+ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)にて培養し、80%コンフルエントで無血清 DMEM に交換して 48 時間インキュベートした後、培養上清を回収しこれを MSC-CM とした。エクソソームの回収においては、MSC-CM を超遠心機で遠心分離処理して細胞外小胞を回収し、透過型電子顕微鏡による形態観察、ウエスタンブロットによるエクソソーム表面マーカー(CD9、CD63、CD81)の検出、ナノ粒子トラッキング解析を行ってエクソソームであることを確認し、MSC-Exo とした。MSC-Exo による細胞遊走、血管新生、骨形成について、in vitro では細胞遊走試験、アリザリンレッド S 染色、ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)による遺伝子発現解析を行った。in vivo では、ラット頭蓋骨に直径 5mm の骨欠損を作成しアテロコラーゲンスポンジに浸した各実験材料を移植し、microCT にて 1 週毎の経時的な骨形成評価を、2 週および 4 週時で組織学的評価を行った。実験群として MSC-Exo 群、エクソソームによる VEGF の影響の検討するために MSC-Exo に antiVEGF を投与する群(Exo-antiVEGF 群)を用意し、対照群として DMEM 群(in vitro)、PBS 群(in vivo)、MSC-CM 群を設定した。
【結果】
回収した細胞外小胞は MSC-Exo と確認された(Fig 1)。MSC-Exo は細胞の遊走や石灰化を亢進させたが、Exo-antiVEGF 群ではそれらは低い結果となった(Fig 2, 3a)。qPCR では、MSC-Exo 群で骨形成関連遺伝子であるコラゲン 1、アルカリフォスファターゼ、オステオカルシン、オステオポンチン、血管新生関連遺伝子である VEGF、アンジオテンシン 1、アンジオテンシン 2

の発現を亢進させた一方、Exo-antiVEGF 群ではそれらの発現は有意に減少した(Fig 3b-h)。in vivo における microCT での骨形成評価では、MSC-Exo 群で早期からの骨形成が確認され、Exo-antiVEGF 群や PBS 群と比較し経時的に有意に新生骨面積が大きい結果であった(Fig 4)。H-E 染色では、MSC-Exo 群で 2 週時には骨断端から幼弱な新生骨梁が形成され始め、4 週時には厚みをもった新生骨が確認された(Fig 5)。また、免疫組織化学では骨芽細胞マーカーであるオステオカルシン、血管新生マーカーである VEGF が MSC-Exo 群で強く発現された(Fig 6a-b)。免疫蛍光染色では、骨断端部付近で幹細胞を示す CD44 陽性細胞や血管内皮細胞を示す CD31 陽性細胞の集積が MSC-Exo 群で観察された一方、Exo-antiVEGF 群や PBS 群ではそれらの所見に乏しかった(Fig 6c-d)。

【考察】

MSC-Exo は VEGF を中心とする血管新生を介した早期からの骨形成を促進させたことが確認された。エクソソームは microRNA を含む膜小胞で、受容細胞の液性因子を調節することで細胞周辺環境を整えることから、MSC-Exo には VEGF 関連 microRNA が含まれ血管新生を介した骨形成の関連経路に一翼を担い、効率的な骨形成に寄与していると示唆される。MSC-Exo は、MSC-CM からその他の液性因子を除いた単独の因子としても十分な骨形成能を有しており、MSC-CM における骨再生においてエクソソームが重要な役割を担っている可能性がある。エクソソームによる骨再生は、骨補填剤や細胞移植など従来の骨再生医療に代わる新たな方法として有効な可能性を有すると考えられる。

審査結果の要旨

間葉系幹細胞（MSCs）による組織再生において、細胞からパラクラインに分泌される因子が大きく関与していることが明らかになっており、ヒト骨髄間葉系幹細胞の培養上清（MSC-CM）に含まれる液性因子が組織再生に有効であることが報告されているが、MSC-CM の構成因子の一つであるエクソソームの関与による骨再生メカニズムについては、十分に解明されていない。エクソソームはあらゆる細胞に含まれる細胞外小胞でその小胞内に microRNA やタンパク質を内包し、別の細胞に運搬されることで生理的変化や機能的変化を引き起こすとされており、細胞間情報伝達に重要な役割を持っている。本研究では、MSC-CM 由来のエクソソーム MSC-Exo による骨再生メカニズムについて、骨再生の過程で重要なステップである血管新生の観点から in vitro ならびにラットを用いた in vivo の実験系を用いて検討をおこなっている。

その結果、MSC-Exo は VEGF を中心とする血管新生を介した早期からの骨形成を促進させたことが確認されたとしている。MSC-Exo が骨形成に影響するメカニズムについては、MSC-Exo が内包している microRNA に VEGF 発現に関与するものが含まれており、MSC-Exo の添加により局所の細胞が VEGF の発現を亢進し、VEGF が骨形成関連経路に影響を与えることで間接的に骨分化に寄与しているという考察をしている。また、今回採取した MSC-Exo は MSC-CM から単一の構成因子として取り出したものであり、MSC-CM から他のあらゆる分泌因子を取り除いても MSC-Exo は十分な骨形成能を示したことで、幹細胞移植に替わるセルフリーの治療法の選択肢や、創薬等の研究基盤となる可能性を有していると考察している。今後の方向性として、本研究では MSC-Exo が血管新生の亢進を介して骨再生を促進することを示したが、MSC-Exo が内包する情報について詳細は分かっていないため、どのような microRNA を内包されており、その中でもどの microRNA が血管新生および骨形成に効果的なものなのか網羅的な解析を含め検討したいとの展望が示されている。

本審査では、本研究を実施するに至った背景、MSC-Exo が骨形成に影響するメカニズム、MSC-Exo と VEGF の関連ならびに各実験それぞれの考察について質問したところ、いずれにおいても満足のいく回答が得られた。本研究で示された内容は、血管新生に関わる MSC-Exo と VEGF や microRNA とを関連付けて十分な考察がなされており、MSC-Exo の臨床応用における利点を踏まえ今後の研究の方向性についても提示していることから、本研究を学位論文として価値のあるものと判断した。