

# 論文内容要旨

Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model

(間葉系幹細胞由来のエクソソームはマウス骨折モデルの骨折治癒を促進させる)

Stem Cells Translational Medicine, 2016, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

副指導教員：久保 忠彦准教授

(統合健康科学部門 整形外科学)

古田 太輔

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

論文題目

## Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model

(間葉系幹細胞由来のエクソソームはマウス骨折モデルの骨折治癒を促進させる)

骨折の多くは自然治癒することが多いが、治癒遅延や偽関節となり治療に難渋することもあり、改善策として超音波治療や自家骨移植が行われているが不十分なこともある。近年、組織修復においてサイトカインなどの微粒因子の影響が多数報告されており、その微粒因子のうちの一つであるエクソソームに注目が集まっている。エクソソームは 30-100nm の微小胞体であり、タンパク質、DNA、miRNA を含み、周囲の酵素などから保護しながら、細胞から細胞へと内容物を運搬する細胞間コミュニケーションに関与していると考えられている。これまでに骨折治癒とエクソソームとの関連性を示す論文はない。一方でエクソソームの構成成分であるテトラスパニン CD9 は、欠失させたマウスはエクソソーム分泌不全であることが報告されている。我々はエクソソーム分泌不全マウスであるテトラスパニン CD9 ノックアウトマウス (CD9<sup>-/-</sup>マウス) を用いて、骨折モデルを作成しエクソソームと骨折治癒との関連性を追求した。

17-18 週齢の C57BL6J:野生型マウス(WT)15 匹、CD9<sup>-/-</sup>マウス 15 匹の大腿骨骨折モデルを作成し、骨折治癒過程を X 線およびマイクロ CT、組織学的に解析を行った。その結果、WT マウスは術後 3 週間で 13/15 骨癒合するのに対し、CD9<sup>-/-</sup>マウスは術後 3 週間で 4/15 であり、骨癒合遅延を認めた。CD9<sup>-/-</sup>マウスは WT マウスと比較して骨癒合が遅延し骨折治癒遅延の原因にエクソソームが関与しているかを検討した

方法は CD9<sup>-/-</sup>マウスの骨折モデルにエクソソームを投与し、骨折治癒が改善するかを検討した。1×10<sup>5</sup> 個の間葉系細胞 MSC を 48 時間無血清培地で培養し、MSC が培養液に放出したサイトカインやエクソソームを含んだ培養上清液を採取した。培養上清液 (CM) は、180,000 G で超遠心し、沈殿層にあるエクソソーム(Exo)とエクソソームを取り除いた上清液(CM-Exo)に分離した。分離した CM,CM-Exo は 100μl に遠心機で濃縮し、Exo は 100μl の PBS に溶解した。さらに CM,Exo にはエクソソームマーカーであるテトラスパニン CD9、CD81 と Flotillin-1 が陽性であるが、CM-Exo にはエクソソームマーカーがほぼ陰性であることをウエスタンブロットで確認した。CD9<sup>-/-</sup>マウスの骨折モデルを作製し、術後 1 日目、8 日目に CM,CM-Exo,Exo を骨折部に局所投与し、術後骨折治癒過程を X 線およびマイクロ CT、組織学的に解析を行った。続いてエクソソームが WT マウスの骨折を促進するかどうかを確かめるために WT マウスの骨折モデルを作成し、術後 1 日目、8 日目に CM,CM-Exo,Exo を骨折部に局所投与し、術後骨折治癒過程を X 線およびマイクロ CT、組織学的に解析を行った。

そして MSC 以外の細胞から抽出したエクソソームでも骨折治癒に影響を及ぼすのかを検討するため、ヒト骨肉腫細胞 (HOS) から上記と同様に抽出したエクソソームを骨折治癒モデルに投与し、MSC 由来のエクソソームとの骨折治癒を比較検討した。

最後にエクソソームに含まれるサイトカインや miRNA を解析し、骨折治癒過程に及ぼす因子を比較検討した。

結果として CD9<sup>-/-</sup>マウスの骨折治癒はエクソソームを含まない CM-Exo 群は骨癒合期間が改善しないが、エクソソームを含む CM,Exo 投与群は骨折治癒期間が改善され WT マウスの骨折治癒モデルと同等の骨折治癒過程をたどった。さらに CD9<sup>-/-</sup>マウス骨折モデルに HOS 由来のエクソソーム投与群と MSC 由来エクソソームを投与群の術後 10 日目の組織学的解析にて HOS 由来のエクソソーム投与群は明らかに仮骨形成が少ないのに対して、MSC 由来エクソソーム投与群は豊富な仮骨形成を確認した。さらに WT マウスの骨折治癒は CM、Exo を投与すると骨折治癒期間の短縮傾向を認め、特に Exo 群は術後 2 週での骨癒合率が有意差をもって上昇した。最後にサイトカインと miRNA の解析を行い、VEGf などの血管新生因子は CM、CM-Exo に比較して Exo は低く、骨折治癒に必要とされる MCP-1,MCP-3,SDF-1 も CM,CM-Exo と比較して Exo は低かった。miRNA においては、MSC 由来 Exo と HOS 由来 Exo の miRNA 高値の TOP30、MSC 由来 Exo/HOS 由来 Exo の比が 3 倍以上のものを列挙した。miR-4532, miR-125b-5p、miR-4516 は MSC 由来 Exo/HOS 由来 Exo の比も高く、MSC 由来 Exo の TOP30 に含まれていた。そして miR-338-3p、miR-548aa は CM-Exo よりも Exo に 3 倍以上含まれていた。

これまで CD9<sup>-/-</sup>マウスは血管新生能低下、細胞融合の阻害、細胞遊走能の低下、エクソソーム分泌不全が報告されている。我々はエクソソーム分泌不全であることに注目し、WT マウスと比較して骨折治癒が遅延する CD9<sup>-/-</sup>マウスにエクソソームを補充することにより、骨折治癒が改善されることが分かった。血管新生などが関与の可能性もあるが、骨折治癒を改善させた Exo には CM-Exo と比較しても血管新生因子が少なかった。さらに軟骨内骨化を促進する因子として報告されている MCP-1,MCP-3,SDF-1 についても Exo は CM-Exo より少なかった。MSC 由来のエクソソームは含まれているどの因子が骨折治癒を促進させているのかは解明できていない miRNA などが骨折治癒を改善もしくは促進させているのではないかと推測する。少なくとも MSC 由来のエクソソームは組織修復や治療における新たな因子となる可能性があると考えられた。