

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18480

研究課題名（和文）骨粗鬆症における筋・骨・血管連関を担うエクソソームの役割の解明

研究課題名（英文）Roles of exosomes in muscle-bone-vascular linkage in osteoporosis

研究代表者

高藤 義正（TAKAFUJI, YOSHIMASA）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90734864

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）：本研究では、骨格筋が分泌するエクソソーム(Myo-exo)に着目し、筋・骨・血管連関における役割を検討した。Myo-exoは骨吸収を担う破骨細胞の形成を抑制するなど、骨に対する作用を示した。一方、血管の石灰化に対しては有効性を示さなかった。骨格筋は生体内で様々な力学的負荷を受け、骨格筋の性質にも影響をおよぼす。そこで力学的負荷を与えた筋細胞からMyo-exoを単離したところ、破骨細胞の形成抑制作用が増強された。また、Myo-exoに内包されるmiRNAを網羅的に解析し、見出された複数のmiRNAの作用を検討した結果、miR196がMyo-exoの破骨細胞抑制作用に重要である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは生体内のあらゆる細胞が分泌し、その中にはmiRNAなどの核酸が内包されている。エクソソームは遠隔的に他の組織や細胞に生理作用を示し、血液や尿中のエクソソームは病気を診断するバイオマーカーとしても注目されている。

本研究では、筋由来エクソソーム(Myo-exo)が、骨吸収を担う破骨細胞の形成を抑制することを明らかにした。また、その機序としてMyo-exoに内包される重要なmiRNAを見出した。骨組織は骨形成と骨吸収のバランスによって維持され、骨吸収が過剰になると骨粗鬆症を引き起こす。本研究で得られた知見は、骨粗鬆症の診断や、核酸医薬品の開発に発展することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：We focused on exosomes secreted by skeletal muscle and investigated their roles in muscle-bone-vascular relationship. Exosomes secreted by muscle cells (Myo-exo) showed suppressive effects on formation of osteoclasts responsible for bone resorption, but were not effective against calcification of vascular smooth muscle cells. Mechanical stress is the critical extrinsic factor for skeletal muscle. Applying mechanical stress to muscle cells enhanced suppressive effect of Myo-exo on osteoclast formation. In addition, it was revealed that Myo-exo contains multiple miRNAs that suppress osteoclast formation by small RNA-seq-analysis. Among these miRNAs, miR196 may be important for the osteoclast inhibitory effect of Myo-exo.

研究分野：生理学

キーワード：エクソソーム miRNA 筋 骨粗鬆症 筋・骨連関

1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症とサルコペニアは相互に関連することが知られており、さらに最近、サルコペニアと心血管疾患の関連が明らかとなった。骨粗鬆症と心血管疾患・血管石灰化は併発することが多く、これらの知見から、筋・骨・血管の間には生理的にも病態においても相互関連が存在すると推測される。

骨格筋は体内で最も多くの重量を占める器官であり、運動や代謝状態によってその機能を劇的に変化させる特徴をもつ。近年、骨格筋と骨の相互関連（筋・骨連関）において、骨格筋が産生する体液性因子（マイオカイン）が遠隔的に骨代謝や骨修復に影響をおよぼす知見が国内外で増加しているが、筋・骨連関におけるエクソソームの関与は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、筋・骨・血管連関において、骨格筋より産生されるエクソソームに着目し、その生理作用を解明することを目的とする。

具体的には、筋細胞の培養上清からエクソソーム(Myo-exo)を回収し、骨や血管におよぼす影響を *in vitro*、*in vivo* で詳細に解析する。さらに、網羅的解析を用いて Myo-exo に内包される miRNA の中から重要な因子を同定し、その因子の作用機序や病態における役割の解明を目指す。また、骨格筋の機能に影響するメカニカルストレスを負荷した筋細胞からも Myo-exo を回収し、性質の違いについて検討する。

3. 研究の方法

(1) Myo-exo の単離

C2C12 細胞(マウス筋芽細胞株)および C2C12 細胞から誘導した筋管細胞の培養上清を回収し、0.22 μm フィルター濾過の後、超遠心法で Myo-exo を単離した。また、振盪培養によってメカニカルストレス(Fluid flow shear stress: FFSS)を負荷し続けた C2C12 細胞の培養上清からも同様に Myo-exo (FFSS-Myo-exo)を単離した。得られた Myo-exo は BCAassay 法によって蛋白量を定量した。また、エクソソーム特異的な抗原(CD9, CD81)について Western blotting にて解析するとともに、Nanosight を用いた粒径、粒子数解析を行った。

(2) Myo-exo の骨吸収系への作用

マウス骨髄細胞やマクロファージ様細胞株 (Raw264.7)を Myo-exo 存在下で破骨細胞誘導し、破骨細胞形成数 (TRAP 陽性多核細胞: TRAP-positive MNCs)、破骨細胞関連因子の発現レベルを解析するとともに、細胞外フラックスアナライザーを用いて培地中の酸素消費速度(OCR)を経時的に計測し、ミトコンドリア活性を解析した。また、蛍光標識した Myo-exo を Raw264.7 に添加して培養し、細胞内取り込みを観察した。

(3) Myo-exo の骨芽細胞への作用

マウス初代培養骨芽細胞や骨芽前駆細胞株 (MC3T3-E1)を Myo-exo 存在下で培養し、骨芽細胞分化関連因子の発現レベル、ALP 活性、石灰化能を解析した。

(4) Myo-exo の血管系細胞への作用

血管平滑筋細胞株(MOVAS-1)を Myo-exo 存在下で培養し、石灰化能を解析した。

(5) Myo-exo に内包される miRNA の解析

Myo-exo、FFSS-Myo-exo に内包される miRNA について small RNA シークエンス解析を行った。比較のため、マウス初代培養骨芽細胞、骨髄細胞からも RNA を単離して同様に解析した。また、シークエンス解析によって同定された miRNA について、細胞内の miRNA 発現を Taqman リアルタイム PCR によって測定した。

(6) miRNA の作用解析

miRNA と同じ配列をもつ人工 RNA (miRNA mimic)を Raw264.7 細胞に導入し、TRAP 染色、遺伝子発現解析を行うことで miRNA の作用を検討した。

4. 研究成果

(1) Myo-exo の解析

筋芽細胞、筋管細胞から産生された Myo-exo および FFSS-Myo-exo について、いずれもエクソソーム特異抗原(CD9、CD81)が陽性であり、平均粒子径は 200 nm 以下であったことからエクソソームとしての性質を備えていることが確認された。

(2) Myo-exo の骨・血管系への作用

赤色蛍光標識した Myo-exo を Raw264.7 細胞に添加し、4 時間培養後蛍光顕微鏡にて観察したところ、Myo-exo は細胞に取り込まれ、細胞質に局在していることが確認された(図 1)。

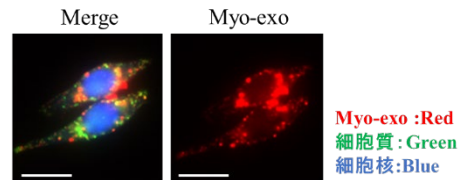


図 1

次に、骨吸収を司る破骨細胞形成・分化への Myo-exo の影響を検討したところ、筋芽細胞由来 Myo-exo は濃度依存的にマウス骨髄細胞から誘導される破骨細胞の形成を抑制した(図 2)。さらに、Myo-exo 添加によって破骨細胞特異的因子(NFATc1、TRAP、カテプシン K、DC-STAMP)の発現も有意に抑制された。筋管細胞から産生された Myo-exo も同様に破骨細胞の形成を有意に抑制したが、筋芽細胞由来 Myo-exo との有意な効果の違いは認められなかった。

また、骨髄細胞由来破骨細胞のミトコンドリア活性を解析したところ、Myo-exo 添加によって OCR が抑制された(図 3)。また、ミトコンドリアエネルギー代謝関連因子(PGC1 β 、ND4、シトクロム C)の発現も有意に抑制された。

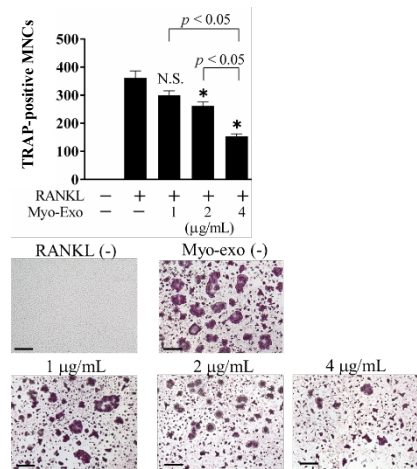


図 2

骨芽細胞分化への Myo-exo の影響を検討したところ、筋芽細胞由来 Myo-exo は、BMP-2 によって誘導される MC3T3-E1 の骨芽細胞分化をより増強する作用を示した。一方、マウス初代培養骨芽細胞に Myo-exo のみを添加して培養した結果、骨分化関連遺伝子の発現や ALP 活性、石灰化に対しては有意な作用を示さなかった。

血管への作用を検証するため、マウス血管平滑筋細胞株(MOVAS-1)に Myo-exo を添加し、石灰化誘導培地で培養した後、石灰化関連遺伝子の発現を解析したが、有意な変動は認められなかった。

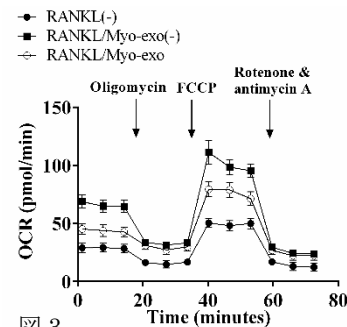


図 3

(3) Myo-exo の作用因子の解析

(2)の結果から、Myo-exo は特に破骨細胞の分化・形成に対して強い抑制作用を示した。そこで、Myo-exo に内包される miRNA を解析し、作用因子の同定を目指した。Small RNA シークエンス解析によって得られた結果から、骨組織細胞(初代培養骨芽細胞、骨髄細胞)での発現が低く、Myo-exo に多く含まれる miRNA を抽出したところ、7 種の miRNA(miR30、miR143、miR145、miR155、miR196、miR365、miR881)が同定された。

次に、7 種の miRNA に対する miRNA mimic を Raw264.7 細胞に導入し、破骨細胞の形成を誘導したところ、miR30、miR143、miR155、miR196 の miRNA mimic 導入によって有意に破骨細胞の形成が抑制された(図 4)。特に、miR196 はこれまでに破骨細胞形成に対する報告が無く、骨芽細胞、骨髄細胞での発現が極めて低いことから筋・骨連関におけるエクソソームを介した機序に重要であると考えられた。

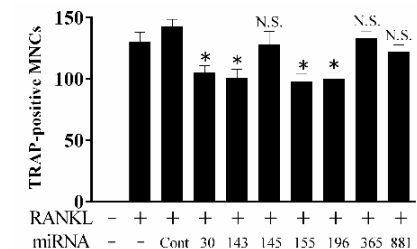


図 4

そこで、miR196 の作用をさらに検討したところ、miR196 の導入によって、破骨細胞特異的因子の発現および OCR が有意に抑制されていた。さらに miR196 の導入によって、MC3T3-E1 細胞における骨芽細胞関連因子(Osterix、ALP、オステオカルシン)の発現および ALP 活性が有意に上昇した。これらの結果から、miR196 は筋から骨へエクソソームを介して送達されることで骨形成に促進的に寄与する可能性が示された。

(4) メカニカルストレスが Myo-exo の性質に与える影響の検討

骨髄細胞由来破骨細胞の形成に対する Myo-exo および FFSS-Myo-exo の作用を比較したところ、FFSS-Myo-exo は Myo-exo より有意に破骨細胞形成を抑制した(図 5)。さらに、各 Myo-exo に内包される miRNA を定量したところ、破骨細胞抑制作用を有する miR155 および miR196 の内包量は FFSS-Myo-exo で有意に高かった。これらの結果から、筋細胞へのメカニカルストレス負荷は、Myo-exo に内包される miRNA の組成に影響し、破骨細胞抑制作用を増強した可能性が示された。

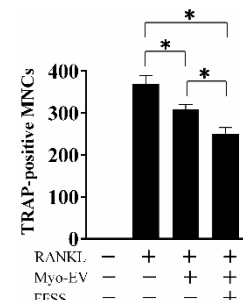


図 5

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yoshimasa Takafuji, Kohei Tatsumi, Masayoshi Ishida, Naoyuki Kawao, Kiyotaka Okada, Hiroshi Kaji	4. 巻 134
2. 論文標題 Extracellular vesicles secreted from mouse muscle cells suppress osteoclast formation: Roles of mitochondrial energy metabolism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bone	6. 最初と最後の頁 115298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bone.2020.115298	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 Yoshimasa Takafuji, Kohei Tatsumi, Naoyuki Kawao, Kiyotaka Okada, Muratani Masafumi, Kaji Hiroshi	4. 巻 108
2. 論文標題 Micro RNA 196a-5p in extracellular vesicles secreted from myoblasts suppresses osteoclast-like cell formation in mouse cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Calcif Tissue Int	6. 最初と最後の頁 364-376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00223-020-00772-6	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 Yoshimasa Takafuji, Kohei Tatsumi, Naoyuki Kawao, Kiyotaka Okada, Muratani Masafumi, Kaji Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Effects of fluid flow shear stress to mouse muscle cells on the bone actions of muscle cell-derived extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0250741
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0250741	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5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高藤義正、辰巳公平、石田昌義、河尾直之、岡田清孝、梶博史	
2. 発表標題 メカニカルストレスの筋・骨連関への作用におけるエクソソームの役割	
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会学術集会	
4. 発表年 2019年	

1．発表者名 高藤義正、辰巳公平、石田昌義、河尾直之、岡田清孝、梶博史
2．発表標題 筋・骨連関における細胞外小胞の役割
3．学会等名 第6回日本細胞外小胞学会学術集会
4．発表年 2019年

1．発表者名 Takafuji Y, Tatsumi K, Ishida M, Kawao N, Okada K, Kaji H.
2．発表標題 Roles of extracellular vesicles secreted from mouse muscle cells in muscle-bone interactions.
3．学会等名 The 97th Annual Meeting of the Physiological Society of Japan
4．発表年 2020年

1．発表者名 高藤義正、辰巳公平、石田昌義、河尾直之、岡田清孝、梶博史
2．発表標題 骨修復関連細胞に対する筋芽細胞由来 細胞外小胞の作用
3．学会等名 第19回 日本再生医療学会総会
4．発表年 2020年

1．発表者名 高藤 義正、辰巳 公平、石田 昌義、河尾 直之、岡田 清孝、梶 博史
2．発表標題 骨組織再生に関わる細胞に対する筋芽細胞由来細胞外小胞に含まれるmiRNAの解析
3．学会等名 第20回 日本再生医療学会総会
4．発表年 2021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
---------	---------