

## 令和3年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input checked="" type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 国際共同研究推進助成金
研究課題名	三次元培養法の利用による基質小胞を介した新規骨代謝システムの解析	
研究者所属・氏名	研究代表者： 医学部 再生機能医学教室 水上 優哉 共同研究者：	

### 1. 研究目的・内容

健康寿命の延伸に向けて、骨再生治療の新たな戦略が求められている。骨芽細胞が細胞外基質中に分泌する基質小胞 (MtVs) は、石灰化過程を担う重要な細胞外小胞 (EVs) の一種であるが、MtVs を介した骨代謝制御機構に関する情報はほとんどない。そこで本研究では、最初に単層培養時の骨芽細胞由来の MtVs に着目し、MtVs を介した新規骨代謝制御メカニズムの解明を目的に研究を行った。

### 2. 研究経過及び成果

- EVs の回収  
 マウス新生児頭蓋骨由来初代骨芽細胞 (pOB) またはマウス頭蓋骨由来細胞 (MC3T3-E1) をアスコルビン酸およびβ-グリセロリン酸を含有した培地中で培養することにより石灰化を誘導した。骨結節の形成を確認後、培養上清およびコラゲナーゼにより消化した細胞外基質溶解液から超遠心法により EVs を回収した。培養上清から得られた EVs を suspended EVs (SuEVs)、細胞外基質溶解液から得られた EVs を MtVs とした。また、超遠心の前に 0.22 μm フィルター処理を行い得られた MtVs を small MtVs (sMtVs) とした。本法によって回収された MtVs は細胞と比較して ALP の活性が十分に高く、EVs マーカーである CD9 陽性であり、また MtVs のみで基質の石灰化を誘導できたことから MtVs としての特性を有していることを確認した。
  
- MtVs の骨修復・再生効果の評価  
 12 週齢の雌性マウスの大腿骨に 0.8 mm の骨欠損を作製し、正電荷を有するゼラチンスポンジシートに搭載した pOB 由来の MtVs および sMtVs を骨欠損部後に移植した。7 日後、骨欠損部の面積をマイクロ-CT にて解析した。その結果、MtVs では Vehicle 投与群と比較し骨欠損部の面積に変化はなかった一方で、sMtVs では有意に骨欠損部面積が低下した。これより、sMtVs には骨修復・再生を促進する効果があることが示唆された。
  
- MtVs の骨芽細胞分化に与える影響評価 (in vitro)  
 マウス骨髄由来間質細胞 (ST-2) に BMP-2 と pOB から回収した MtVs、sMtVs をそれぞれ同時添加し、72 時間後の骨芽細胞マーカー (ALP、Osterix、Osteocalcin、Collagen I) の mRNA 発現量を RT-PCR 法にて解析した。その結果、MtVs の添加により ALP の発現量が有意に増加したが sMtVs では変化が見られなかった。一方で sMtVs の添加により Osterix の発現量が有意に低下したが MtVs では変化が見られなかった。また、Osteocalcin と Collagen I についてはいずれも発現量に有意な差はみられなかった。続いて同実験を MC3T3-E1 から回収した MtVs、sMtVs、SuEVs を用いて行った。その結果、SuEVs の添加により ALP、Osteocalcin の発現量が有意に増加した。一方で、sMtVs の添加により Osteocalcin の発現量は有意に低下した。MtVs はいずれの遺伝子発現にも影響を及ぼさなかった。以上より、sMtVs は骨芽細胞の分化を抑制することが示唆された。また、sMtVs の骨修復・再生の促進効果は骨芽細胞分化によるものではないことが示唆された。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

今後は組織学的解析と細胞添加実験により sMtVs の骨修復・再生メカニズムの解明を行う。sMtVs を移植した 7 日後の大腿骨欠損部より組織切片を作製し、HE 染色、ALP 染色、アルシアンブルー染色、TRAP 染色により、骨組織修復部の骨芽細胞、軟骨細胞、破骨細胞数を評価する。また、細胞添加実験により成熟骨芽細胞の ALP 活性、および石灰化に与える影響、軟骨細胞分化に与える影響、破骨細胞分化に与える影響を評価する。以上の解析により、sMtVs が骨修復・再生を促進するメカニズムを明らかにする。さらには、シーケンス解析により sMtVs、MtVs、SuEVs 中の miRNA を網羅的に解析することにより同メカニズムに寄与する責任因子を同定する予定である。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
一般社団法人日本再生医療学会	口頭	2023年3月23日～25日