

脱分化脂肪細胞（DFAT）に由来するエクソソームの
解析と椎間板髄核細胞に対する作用（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程
外科系整形外科学専攻

富塚 孔明

修了年 2017 年

指導教員 徳橋 泰明

【緒言】

腰痛の原因の 1 つに椎間板変性症があり、世界中の人々のヘルスケアや医療経済に影響を及ぼしている¹⁾。椎間板変性症は椎間板髄核細胞(Nucleus pulposus cell: NP cell)の不可逆的な変化が原因であり、現時点では根本的な治療は存在しない。近年、椎間板変性症に対する再生医学的なアプローチを用いた研究が行われてきている。近年、種々の細胞から分泌される細胞外小胞であるエクソソームが、細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていることが明らかになった²⁾。エクソソームは間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell: MSC)や脂肪組織由来幹細胞(Adipose-derived stem cell: ASC)からも分泌され、種々の組織傷害に対して治療効果が確認されている³⁻⁴⁾。脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は、成熟脂肪細胞に由来する細胞で、高い増殖能と MSC と同等の多分化能を示す⁵⁾。DFAT は低侵襲的に採取でき、簡便に大量調製が可能であることから実用的な治療用細胞として期待できる。一方 DFAT から分泌されるエクソソームについては今まで報告がなく、その作用も明らかにされてはいない。

【目的】

DFAT からも MSC や ASC と同様にエクソソームが豊富に分泌され、種々の細胞に作用し、治療効果を示す可能性がある。一方で、DFAT のエクソソームに関する研究は今まで報告されていない。本研究は、同一患者の皮下脂肪組織から調製した DFAT と ASC を用いて、それぞれの細胞培養上清からエクソソームの抽出を試み、その形質解析を行った。また DFAT および ASC エクソソームに含まれる miRNA を網羅的に比較解析した。さらに DFAT および ASC 由来エクソソームが NP cell の増殖活性や遺伝子発現に対してどのような作用を及ぼすのか検討した。

【材料と方法】

1. NP cell

NP cell は日本大学医学部細胞再生・移植医学分野研究室で調製・保存されている日本白色家兎(10 週齢、雄性)由来の NP cell(継代数 5 代以内)を用い、実験に使用した。

2. DFAT、ASC の調整

日本大学医学部附属板橋病院整形外科で行われる人工股関節全置換術の手術中に廃棄される皮下脂肪組織(1~2g)を採取した。DFAT は既報⁵⁾に従い、採取した脂肪組織を細切後にコラゲナーゼ処理し、遠心分離した後、最上層に浮遊した成熟脂肪細胞を採取した。得られた細胞を洗浄後、20%FBS 含有 DMEM に満たされた T-12.5 細胞培養フラスコ内に播種し、天井培養することで調整した。ASC は既報⁵⁾に従い、コラゲナーゼ処理した皮下脂肪組織を遠心分離後、沈降する stromal vascular fraction (SVF)分画を付着培養し ASC を調製した。

3. エクソソームの抽出

DFAT、ASC を 10cm ディッシュにそれぞれ 3 枚ずつ播種し、70~80%コンフルエント程度まで培養した。それぞれ、10% Exo-FBS Exosome-Depleted FBS (SBI) 含有 DMEM に培地交換をした。2 日間培養し、培養上清を回収し、エクソソーム回収試薬である Exo-Quick TC (SBI) を添加した。よく転倒混和した後、一晩静置した。遠心分離し、エクソソームのペレットを得た。

4. 電子顕微鏡による観察

DFAT および ASC に由来するエクソソームのペレットに PBS を加え混和した。エクソソーム溶液を固定後、透過電子顕微鏡 (TEM-1200EX、JEOL) で観察した。

5. ウェスタンブロット解析

DFAT、ASC の細胞溶解液と DFAT、ASC 由来のエクソソーム溶液から泳動用サンプルを調整した。サンプルは電気泳動終了後、ブロッキングを行い一次抗体としてウサギ抗ヒト CD63 抗体(1:1000, SBI)を一晩反応させた。翌日、メンブレンを洗浄後、二次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1:2000, Amersham) を反応させた。また、他のメンブレンはコントロールとして一次抗体としてマウス抗ヒト β catenin 抗体(1:200, Abcam)を反応させ、続いて二次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (1:2000, Amersham) を反応させた。メンブレンを洗浄後、バンドの検出を行った。

6. マイクロアレイ法による miRNA の網羅的解析

3 ドナーから調製した DFAT および ASC のエクソソームから SeraMirTM Exosome RNA Amplification Kit (SBI, SeraMir) を用いて total RNA を抽出し、バイオアナライザで total RNA の解析を行った。その後、Agilent Technology 社製のオリゴ DNA マイクロアレイを用いて miRNA の網羅的解析を行った。

7. エクソソームの標識と NP cell への取り込み

PKH67GL (Sigma-Aldrich) と付属の Diluent C を混和し、4 μ M の PKH 溶液を作製した。PKH 溶液とエクソソーム溶液を混和し、遠心式限外濾過フィルターユニットに添加後、遠心分離した。PBS をフィルターユニットに添加し、よくピペッティングすることでメンブレンに吸着したエクソソームを洗浄した後、遠心分離した。10%FBS 含有 DMEM をフィルターユニットに添加してよくピペッティングし DFAT と ASC の標識済みエクソソーム溶液を得た。NP cell を glass dish に播種し、培養上清に標識済みエクソソーム溶液を添加した。24 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。

8. WST-1 アッセイによる NP cell の細胞増殖評価

5 つの実験区を用意し、WST-1 assay による NP cell の細胞増殖評価を行った。1 区 (Control) :10%FBS 含有 DMEM、2 区 : 10%FBS 含有 DMEM + DFAT 由来エクソソーム、3 区 : 10%FBS 含有 DMEM + ASC 由来エクソソーム、4

区:10%FBS 含有 DMEM + エクソソーム抽出後 DFAT 培養上清、5 区:10%FBS 含有 DMEM + エクソソーム抽出後 ASC 培養上清とした。24well プレート (BD Falcon) に 1well あたり 2,500 個の NP cell を播種後 500 μ l の培地を添加し 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞増殖活性は、培養 1 日後、3 日後に評価した。各実験区は Quadruplicate で測定した。24well プレート上の培養上清を全て吸引し、それぞれに 110 μ l ずつ WST-1 試薬を添加した。37°C、5%CO₂ 条件下で 1 時間培養した。培養後の上清を 100 μ l ずつ、96well マイクロプレート (BD Falcon) に添加し、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で吸光度(420 ~480 nm)を測定した。

9. リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法

NP cell の mRNA 発現の変化は、TaqMan プロブを用いたリアルタイム RT-PCR 法を用いて評価した。60mm デイッシュに NP cell を播種した。WST-1 アッセイによる NP cell の細胞増殖評価実験と同様に 5 つの培養条件を準備し、培養 3 日目に各群の細胞を回収し、細胞から total RNA を抽出した。High capacity cDNA Reverse Transcription kits (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い cDNA を得た。TaqMan プライマー/プロブとして、Versican、Collagen type I、Sox 9 (Applied Biosystems) を用いた。PCR 反応はリアルタイム定量 PCR システム ABI Prism 7300 (Applied Biosystems) を用いて行った。PPIA の発現を同様に測定し、内部標準とした。各サンプルは triplicate で測定し、PPIA mRNA に対する相対的定量解析 (Comparative CT 法) を行った。

10. 統計処理

定量結果は、mean \pm SD で表した。5 群間の比較は、One-way analysis of variance (ANOVA) および post hoc analysis として Turkey-Kramer multiple comparison test により有意差検定を行った。P<0.05 を有意水準とした。統計解析は GraphPad Prism ソフトウェア (Ver5.0a) を用いた。

【結果】

1. 抽出したエクソソームの確認

走査電子顕微鏡による観察の結果、DFAT、ASC 培養上清ともに直径 100~150nm の小胞が確認された。ウェスタンブロット解析では、DFAT、ASC の細胞溶解液、DFAT、ASC 由来エクソソーム溶液すべての検体において、エクソソームマーカーである CD63 の発現を確認することができた。内在性コントロールとして細胞に豊富に発現する β catenin の発現を検討した結果、DFAT と ASC の細胞溶解液からは β catenin が検出されたが、DFAT、ASC 由来エクソソーム溶液からは β catenin は検出されなかった。これら結果より、DFAT、ASC 由来エクソソーム溶液には細胞成分は含まれず、エクソソームが含まれていることが確認できた。

2. エクソソームに含有する small RNA の同定

ドナー#1、#2、#3 の DFAT、ASC の培養上清からそれぞれエクソソームを回収後、total RNA を抽出しバイオアナライザで RNA の品質分析を行った。その結果、すべての検体で低分子の RNA 領域に高いピークが認められた。

3. マイクロアレイ法による miRNA の網羅的解析

DFAT 由来エクソソームと ASC 由来エクソソームとの間で 1.5 倍以上発現が変動している miRNA は 38 個あり、そのうち 37 遺伝子は ASC 由来エクソソームに比べ DFAT 由来エクソソームで高発現していた。さらにこの中の 6 遺伝子 (hsa-miR-769-3p、hsa-miR-208a-5p、hsa-miR-4291、hsa-miR-4653-3p、hsa-miR-130b-3p、hsa-miR-4685-5p) は DFAT 由来エクソソームのみ発現し、ASC 由来エクソソームでは発現していなかった。また、DFAT 由来エクソソームに比べ ASC 由来エクソソームで 1.5 倍以上発現がみられた miRNA は 1 遺伝子 (hsa-miR-4433a-5p) のみであった。NP cell に対し作用を及ぼすことが報告されている miRNA が 7 遺伝子あった (hsa-miR-7、hsa-miR-21-5p、hsa-miR-27a-3p、hsa-miR-27b-3p、hsa-miR-100-5p、hsa-miR-494-3p、hsa-miR-93-5p)。この中で ASC 由来エクソソームに比べ DFAT 由来エクソソームで有意に発現が高く、NP cell に対して細胞外基質産生促進作用が報告されている miRNA として hsa-miR-93-5p が抽出された。

4. エクソソームの NP cell への取り込み

DFAT および ASC 由来のエクソソームで、NP cell の細胞質内にエクソソームが取り込まれている所見が認められた。この結果より、DFAT および ASC 由来エクソソームは NP cell に取り込まれることが明らかになった。

5. 各種培養条件における NP cell の細胞増殖評価

Day1 では、コントロールに比べて、DFAT-exo 群、ASC-exo 群で有意に NP cell の増殖が確認できた。また、DFAT-exo 群と ASC-exo 群はそれぞれ DFAT-CM (exo-) 群、ASC-CM (exo-) 群と比較しても有意な増殖が確認できた。Day3 では、コントロールに比べて、すべての培養条件下で有意な増殖が確認できた。また、DFAT-exo 群は DFAT-CM (exo-) 群、ASC-CM (exo-) 群と比較しても有意な増殖が確認できたが、ASC-exo 群は ASC-CM (exo-) 群との比較でのみ有意な増殖が確認できた。

6. 各種培養条件における NP cell の遺伝子発現変化

NP cell はすべての培養条件下で、Versican、Collagen type I、Sox 9 の遺伝子発現がみられた。群間比較では、Versican の発現が DFAT-exo 群、ASC-exo 群で有意に高値を示した。Collagen type I の発現は、コントロールに比べて、すべての培養条件下で有意に高値を示した。DFAT-exo 群では、DFAT-CM (exo-) 群、ASC-CM (exo-) 群と比較して有意に発現が低かった。ASC-exo 群は、DFAT-CM (exo-) 群と比較して有意に発現が高値を示した。DFAT-CM (exo-) 群は、ASC-CM (exo-) 群と比較して有意に発現が低値を示した。Sox 9 の遺伝

子発現は、コントロールに比べて、すべての培養条件下で有意に高値を示した。

【考察】

DFAT および ASC 由来のエクソソームから抽出された miRNA のうち、NP cell に直接作用し、細胞増殖、細胞外マトリックス産生、アポトーシスに影響すると報告されている miRNA が 7 遺伝子同定された。この中で特に、miRNA-93-5p は、変性椎間板でその発現が低いことが知られており、細胞外マトリックス(Collagen type II)を増加させることが報告されている⁶⁾。本研究にて miRNA-93-5p は DFAT 由来エクソソーム、ASC 由来エクソソーム共に発現しているが、特に DFAT 由来エクソソームで発現が高いことが明らかになった。したがって DFAT 由来のエクソソームは ASC 由来エクソソームに比べ椎間板変性を抑制する作用がより強い可能性がある。

WST-1 アッセイの結果からは DFAT および ASC 由来のエクソソームを NP cell に添加することにより、NP cell の増殖能が有意に高まることが示された。この作用は、エクソソームを含まない培養上清に比べ有意に高かったことから、DFAT および ASC 由来エクソソームには培養上清中に含まれる液性因子より強力な増殖刺激因子が含まれていると推測される。これには、両細胞のエクソソームにその存在が確認された miRNA-21 が関与している可能性がある。miRNA-21 は、PDCD4 や PTEN を標的遺伝子とする miRNA であり、NP cell の増殖を促進する作用が報告されている⁷⁻⁸⁾。

リアルタイム RT-PCR 法による遺伝子発現解析では、DFAT および ASC 由来のエクソソームを添加することにより NP cell における Versican、Collagen type I、Sox9 の遺伝子発現が有意に増加していた。Versican は、椎間板の細胞マトリックスを構成する主要なプロテオグリカンである。また Sox9 は、軟骨細胞の初期分化に係わる重要な転写因子であり、NP cell においても Collagen type II や Aggrecan の発現を増加させ、椎間板変性を抑制させることが報告されている⁹⁾。このように、DFAT および ASC 由来エクソソームは、NP cell からの遺伝子発現調節を介して、髄核細胞からの細胞外マトリックスを増加させる可能性が示された。

椎間板変性症に対し、細胞を椎間板腔に局所投与して治療を行おうとした場合、移植細胞が長期間生存できないといった問題点がある。一方、エクソソームは体液中でも安定で、半減期も長く、細胞に比べ免疫原性が低いことが知られている。本研究で使用した NP cell は日本白色家兎に由来する正常な機能を有する細胞である。今後、エクソソームの椎間板変性症に対する治療効果を明らかにしていくためには、椎間板変性症患者から採取した NP cell を用いた検討や、椎間板変性モデル動物を用いた in vivo 実験を行う必要があり、今後の検討課題としたい。

【引用文献】

- 1) Li Z, Yu X, Shen J *et al.* MicroRNA in intervertebral disc degeneration. *Cell Prolif* 2015; 48:278-283.
- 2) Valadi H, Ekstrom K, Bossios A *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9:654-659.
- 3) Lai RC, Arslan F, Lee MM *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4:214-222.
- 4) Bruno S, Grange C, Deregibus MC *et al.* Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20:1053-1067.
- 5) Matsumoto T, Kano K, Kondo D *et al.* Mature adipocyte-derived dedifferentiated fat cells exhibit multilineage potential. *J Cell Physiol* 2008; 215:210-222.
- 6) Jing W, Jiang W. MicroRNA-93 regulates collagen loss by targeting MMP3 in human nucleus pulposus cells. *Cell Prolif* 2015; 48:284-292.
- 7) Liu H, Huang X, Liu X *et al.* miR-21 promotes human nucleus pulposus cell proliferation through PTEN/AKT signaling. *Int J Mol Sci* 2014; 15:4007-4018.
- 8) Chen B, Huang SG, Ju L *et al.* Effect of microRNA-21 on the proliferation of human degenerated nucleus pulposus by targeting programmed cell death 4. *Braz J Med Biol Res* 2016; 49.
- 9) Ren S, Liu Y, Ma J *et al.* Treatment of rabbit intervertebral disc degeneration with co-transfection by adeno-associated virus-mediated SOX9 and osteogenic protein-1 double genes in vivo. *Int J Mol Med* 2013; 32:1063-1068.