

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 ( 医学 )	氏名	古田 太輔
学位授与の条件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
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)			
論文審査担当者			
主査	教授	今泉 和則	
審査委員	准教授	仲 一仁	
審査委員	教授	木村 浩彰	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>骨折はしばしば自然治癒することが多いが、治癒遅延や偽関節など治療に難渋することもある。治療として自家骨移植が行われることが多いが、治療困難例もある。一方で近年、組織修復にサイトカインなどの液性因子が影響していることが報告されている。我々はその液性因子の一つであるエクソソームに注目した。エクソソームは 30-200nm の微小胞体であり、核酸 (miRNA など)、タンパク質 (血管新生因子、成長因子) を含み、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注目が集まっている。いくつかエクソソームと組織修復の報告は散見されるが、エクソソームと骨折の関連性について報告はない。我々はエクソソーム分泌不全マウスとして知られているテトラスパニン CD9 を欠失させたマウス (CD9<sup>-/-</sup>マウス) の骨折モデルを作成し、エクソソームと骨折との関連性について調べた。</p> <p>方法として 17-18 週齢の C57BL6J:野生型 (WT) マウスと CD9<sup>-/-</sup>マウス大腿骨骨折モデルを作成し、骨折治癒過程を X 線, マイクロ CT, および組織学的に解析を行った。続いてエクソソームが骨折治癒に関与しているかを調べるため、MSC 由来のエクソソームを精製し、骨折部に投与後、骨折治癒を比較検討した。</p> <p>エクソソームは以下のような方法で抽出した。1×10<sup>6</sup>個の Mesenchymal stem cells (MSC) を 48 時間無血清培地で培養し、液性因子が放出された上清液 Conditioned medium (CM) を採取した。この CM を 180,000 G で超遠心し、沈殿したものをエクソソーム Exosome (Exo) とした。エクソソームを取り除いた上清液を Exosome depleted CM (CM-Exo) として実験に供した。CM, Exo, あるいは CM-Exo を CD9<sup>-/-</sup>マウスまたは</p>			

WT マウスの骨折部に局所投与し、術後骨折治癒過程を X 線、マイクロ CT および組織学的に解析を行った。そして MSC 以外の細胞として Human Osteosarcoma Cell (HOS) を使用し、エクソソームを抽出して同様の実験を行い、細胞種による効果の違いを検討した。さらに MSC 由来および HOS 由来の CM, Exo, あるいは CM-Exo に含まれる核酸 (miRNA) およびタンパク質 (血管新生因子, 成長因子) 成分を解析した。

WT マウスは術後 3 週間で 15 匹中 13 匹が骨癒合したが、CD9<sup>+</sup>マウスでは 15 匹中 4 匹に骨癒合が観察されるにとどまり、骨癒合の遅延が認められた。しかし、CD9<sup>+</sup>マウスにおいても最終的には全てのマウスで骨癒合していた。CD9<sup>+</sup>マウスの骨折モデルに、エクソソームを含まない CM-Exo を投与したマウスは骨癒合期間の短縮は認めないが、エクソソームを含む CM あるいは Exo を投与したマウスにおいては骨折治癒期間が短縮され、術後 3 週での骨癒合したマウスは 9 匹中 8 匹で、WT マウスの骨癒合と同等になった。続いて WT マウスに CM, Exo, あるいは CM-Exo を投与した場合は、Exo 投与群は術後 2 週での骨癒合率が上昇し癒合期間が有意に短縮した。しかし CD9<sup>+</sup>マウス骨折モデルに HOS 由来エクソソーム投与した場合、骨折治癒は促進されなかった。

CM, Exo, および CM-Exo 内に含まれるタンパク質成分のうち、血管新生因子, 成長因子, 骨折治癒関連因子 (SDF1, MCP-1, MCP-3) はいずれも CM-Exo よりも Exo の方が少なかった。次に MSC と HOS 由来エクソソームの miRNA をそれぞれ多いものから 30 種を選び比較した。含まれる miRNA の種類は類似していたが、miR125b-5p, miR-338-3p, および miR4532 が、HOS 由来 Exo よりも MSC 由来 Exo 内に豊富に存在していた。

これまで CD9<sup>+</sup>マウスは血管新生能低下, 細胞融合低下, 細胞遊走能低下, エクソソーム分泌不全の報告がある。テトラスパニン CD9 自体の影響も考えられるが、WT マウスよりも骨折治癒遅延する CD9<sup>+</sup>マウスに MSC 由来エクソソームの投与により、骨折遅延が改善した。このことは少なくともエクソソームが骨折治癒に関与する因子であることが考えられた。さらに MSC とは細胞腫の異なる HOS 由来エクソソームの投与では骨折治癒遅延は改善されないことから、MSC 由来であることが重要であると推測された。しかし骨折治癒を最も促進させた Exo 内のタンパク質 (血管新生因子, 成長因子, 骨折治癒関連因子 SDF1, MCP-1, MCP-3) はいずれも骨折治癒改善しない CM-Exo よりも少なく、関連性を見つけれなかった。一方で miRNA の解析では miR125b-5p, miR-338-3p, および miR4532 は MSC 由来 Exo 内に比較的豊富であり、単独またはセットで骨折治癒に関与していることが推測された。以上より MSC 由来エクソソームは骨折治癒に関与し、組織修復の新たな因子となる可能性があると考えられる。

以上の結果から、本論文は MSC 由来のエクソソームが骨折治癒過程における重要な因子であることを示唆した。臨床における骨折治癒遅延や偽関節に対する新たな治療戦略となる可能性を示しており、整形外科学領域の発展に資すること大である。

よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士 (医学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。