

## 筋萎縮がエクソソームを介して骨組織に及ぼす生理作用の解明

近畿大学医学部 再生機能医学講座

高藤 義正

### 1. 緒言

近年、高齢者の急増とともに心身が脆弱になる概念であるフレイルが注目されている。フレイルは、廃用性筋萎縮（サルコペニア）や骨粗鬆症の原因となる。複数の臨床研究にて、筋量低下が骨密度低下や骨折リスク増加と関連することが報告され<sup>1)</sup>、サルコペニアと骨粗鬆症には密接な関連があり、骨格筋と骨組織との間には何らかの相互関連（筋・骨連関）が存在すると推察される。また、筋ジストロフィー患者が骨代謝異常を併発することも知られているが、その機序は不明である。

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。最近、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ことから、骨格筋は運動器官としてだけでなく内分泌器官としても注目されている。申請者らのグループは、早くから筋・骨連関に着目した研究を進めてきており、これまでに骨格筋から分泌され、骨に作用するマイオカインとして *Osteoglycin* や *FAM5C* を新たに見出した<sup>2)</sup>。そこで申請者は、筋・骨連関に関わる新たな因子として、“エクソソーム”に着目した。

エクソソームは細胞が分泌する細胞外小胞で、*miRNA* などの核酸や蛋白質を内包している。エクソソームは受け手側の細胞に核酸や蛋白質を伝達し、離れた組織に対して生理作用を示すことから、異なる組織・細胞間の情報伝達ツールとしての役割を果たしている。しかし、骨格筋が産生するエクソソームの病態における役割は未だ報告が無い。申請者はこれまでに幹細胞由来エクソソームの血管内皮細胞に対する炎症抑制効果について報告しており<sup>3)</sup>、その経験から骨格筋由来エクソソーム (*Myo-exo*) の生理的役割に着目した。

本研究では、筋芽細胞の培養上清から *Myo-exo* を単離し、筋・骨連関における *Myo-exo* の関わりについて *in vitro*、*in vivo* での検討を行った。さらに、筋芽細胞に対して、筋萎縮誘発因子（グルココルチコイド）や筋増強因子（テストステロンなど）の添加、メカニカルスト

レスの負荷を与え、これらの刺激を受けた筋芽細胞から単離した Myo-exo の生理作用について検討を行うことで、筋組織の状態がエクソソームを介して骨組織に及ぼす生理作用の解明を目指した。

## 2.方法

### 2-1) Myo-exo の単離、解析

マウス筋芽細胞株 (C2C12 細胞) の培養上清から超遠心法で Myo-exo を単離し、各試験に用いた。筋増強因子として、テストステロン、活性型ビタミン D を、筋萎縮誘発因子として、デキサメタゾン、マイオスタチンを培養液に添加し、刺激を与えた C2C12 細胞から Myo-exo を単離した。メカニカルストレスの影響を検討するため、C2C12 細胞を培養したプレートを振盪培養することで Fluid Flow Shear Stress (FFSS) を負荷し、その培養上清から Myo-exo を単離した。ナノ粒子のサイズ、数を計測する装置 (Nanosight) を用いて、単離した Myo-exo の粒子径、粒子数を解析した。

### 2-2) Myo-exo の骨吸収系への作用・分子機序の解析

マウス骨髄細胞を Myo-exo 存在下で破骨細胞へと誘導し、破骨細胞形成数 (TRAP 染色)、破骨細胞関連因子 (TRAP、カテプシン K、NFATc1 など) の発現レベルを解析した。また、細胞外フラックスアナライザー (XFe96) を用いて、Myo-exo の細胞毒性や破骨細胞の代謝・ミトコンドリア機能への影響を解析した。

### 2-3) Myo-exo の in vivo 骨修復作用の解析

マウス頭蓋骨に自然治癒が起こらない 3~4mm 径の骨欠損を作製し、Myo-exo を含浸したゼラチンハイドロゲルを欠損部へ移植した。皮質骨、海綿骨密度を X 線 CT 装置を用いて経時的に測定し、骨修復過程を解析した。対照群では PBS を含浸したハイドロゲルを移植した。

### 2-4) RNA シークエンス解析による責任因子の探索

Myo-exo に内包される RNA を抽出し、miRNA アレイ解析を行った。比較のため、マウス骨髄細胞、骨芽細胞からも RNA を抽出し、同様の解析を行った。解析データから、骨髄細胞や骨芽細胞での発現が少なく、Myo-exo に多く内包される miRNA を候補因子として抽出した。

## 3.結果

単離した Myo-exo を Nanosight で解析した結果、平均粒子径は 200 nm 以下で、一般的にエ

クソソームと定義されるサイズであった<sup>4)</sup> (図1)。

破骨細胞は、単球系前駆細胞から分化、成熟し、骨組織における骨吸収を司る唯一の細胞である。Myo-exo はマウス骨髄細胞の破骨細胞分化を濃度依存的に抑制し<sup>4)</sup> (図2)、さらに破骨細胞分化のマスター因子である NFATc1 などの破骨細胞分化関連遺伝子の発現も有意に抑制した<sup>4)</sup>。さらに、XFe96 を用いた解析によって、Myo-exo は破骨細胞分化により上昇するミトコンドリア活性も抑制することが明らかとなった<sup>4)</sup>。

次に、筋に作用する液性因子もしくは FFSS による刺激を与えた C2C12 細胞から単離した Myo-exo の作用を検証した結果、筋増強因子および筋抑制因子の添加は Myo-exo の破骨細胞抑制作用に影響を与えなかった。一方、FFSS 負荷を与えた C2C12 由来 Myo-exo (FFSS-Myo-exo) は、より強い破骨細胞形成抑制作用を示した。

そこで、Myo-exo の骨修復作用を in vivo で検証するため、マウス頭蓋骨欠損部への移植試験を行ったが、移植後 4 週間までの解析で Myo-exo 移植による明確な骨修復促進作用は認められなかった (図3)。

一方で、Myo-exo に内包される miRNA についてアレイ解析を行った結果、骨髄細胞や骨芽細胞での発現が少なく、Myo-exo に多く内包される miRNA として、7 種の miRNA が候補因子として見出された。

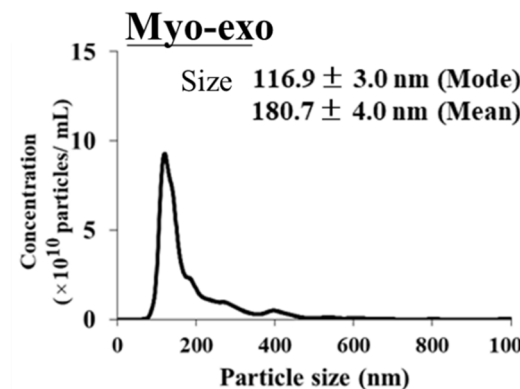


図1 Myo-exo の粒子径、粒子数測定

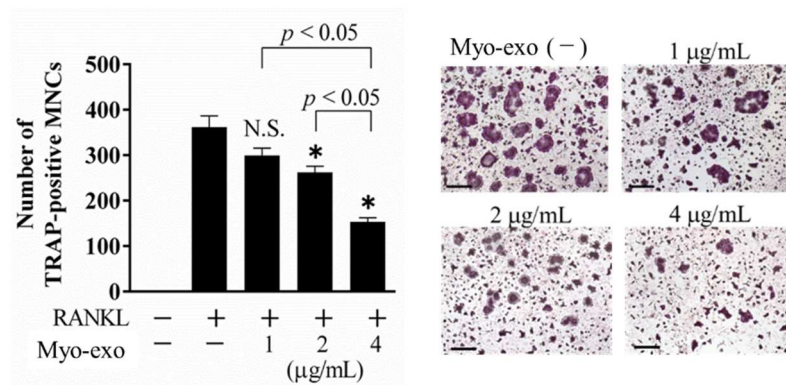


図2 Myo-exo の破骨細胞形成抑制作用

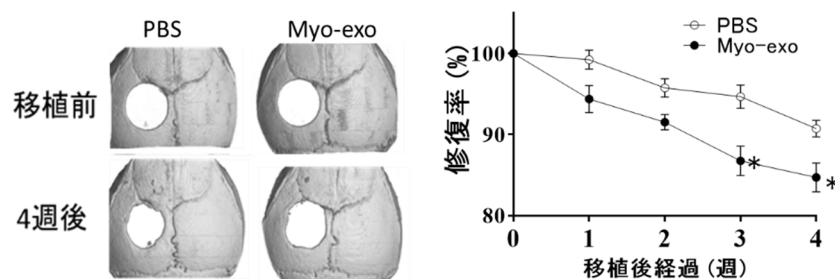


図3 マウス頭蓋骨欠損部への Myo-exo 移植による骨修復過程の解析

#### 4.考察

本研究の遂行によって、筋芽細胞が産生するエクソソームが破骨細胞抑制作用を示すことが明らかとなった。破骨細胞の抑制は骨量増加につながることから、筋・骨連関において、筋由来のエクソソームは重要なメディエーターとして機能している可能性が示された。

また、筋芽細胞への FFSS の負荷によって、筋芽細胞から産生されるエクソソームの破骨細胞形成抑制作用が増強されたことから、メカニカルストレスの負荷は Myo-exo の性質を変化させ、より骨代謝活性が高いエクソソームの産生に寄与する可能性が示された。

一方、今回行った *in vivo* での頭蓋骨欠損部への Myo-exo 移植試験では、Myo-exo 移植群では対照群よりも有意に骨修復が促進したものの、その効果は小さかった。今後は、大腿骨への骨欠損モデルを用いて、Myo-exo 移植による骨修復過程の検討を予定している。

Myo-exo に内包される miRNA の解析を行った結果、骨組織の細胞での発現が低く、Myo-exo に多く含まれる miRNA が同定された。これらの miRNA は Myo-exo を介して骨へと送達されることで筋・骨連関において重要な役割を担う可能性がある。今後は、今回同定した miRNA の生理作用についての検討を予定している。

## 5.結語

今回得られた結果から、筋・骨連関において筋由来のエクソソームの関与が明らかになった。また、メカニカルストレスの負荷が Myo-exo の性質を変化させることが明らかとなり、筋組織の性質変化がエクソソームを介して遠隔的に骨組織に影響を及ぼす可能性が示された。

本研究助成によって行った研究内容の一部は、学術誌にて発表した<sup>4)</sup>。また、本研究助成を受けて研究を遂行した旨を論文中に記載した。

## 6.文献

- 1) Kaji H. Linkage between muscle and bone: common catabolic signals resulting in osteoporosis and sarcopenia, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 2013, 16 (3) 272–277.
- 2) Kaji H. Effects of myokines on bone, *Bonekey Rep.* 2016, 5, 826.
- 3) Takafuji Y, Hori M, Mizuno T, Harada-Shiba M. Humoral factors secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells ameliorate atherosclerosis in Ldlr deficient mice, *Cardiovasc. Res.* 2019, 115 (6), 1041–1051.
- 4) Takafuji Y, Tatsumi K, Ishida M, Kawao N, Okada K, Kaji H. Extracellular vesicles secreted from mouse muscle cells suppress osteoclast formation: Roles of mitochondrial energy metabolism. *Bone.* 2020, 134:115298.