

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2017

課題番号：15KK0308

研究課題名（和文）新規情報伝達因子エクソソームによる変形性関節症治療と診断への展開とその機能解析
（国際共同研究強化）研究課題名（英文）Analysis of novel communication factor exosomes for the treatment and diagnosis
of osteoarthritis(Fostering Joint International Research)

研究代表者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院（医）・講師

研究者番号：10392490

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,000,000円

渡航期間： 13ヶ月

研究成果の概要（和文）：本研究は、ヒト膝関節の病理組織学的解析および遺伝子発現解析より、正常関節軟骨と初期OA、後期OAに分類し、軟骨細胞また培養上清中のエクソソーム中のmiRNAの発現解析を行った。正常関節軟骨細胞内で高発現および高分泌していた数種のmiRNAは、OA軟骨内および分泌型miRNAともに低下していた。この中の1つのmiRNAについて軟骨特異的に過剰発現させるマウスを作製し、OAに対する影響について解析中である。また、このmiRNAの発現は、老化関連転写因子やSOX9によって制御されており、またいくつかの標的候補遺伝子も同定した。

研究成果の概要（英文）：This study has focused on novel communication factor exosomes including microRNA (miRNA) in osteoarthritis (OA). We classified OA grade and performed miRNA expression profiling in human chondrocytes and exosomes using normal- and OA-derived chondrocytes. Several miRNAs were highly expressed in normal chondrocytes and chondrocytes-derived exosomes. These miRNAs were decreased in OA chondrocytes and OA chondrocytes-derived exosomes. Thus, we newly generated cartilage-specific miRNA transgenic mice and have examined the effect of prevention by miRNA on OA. Furthermore, aging-related transcriptional factor and SOX9 regulated the miRNA and host gene, and miRNA regulated several target genes.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 エクソソーム マイクロRNA 軟骨細胞

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、関節軟骨の破壊により患者の生活の質を著しく低下させ、要支援から要介護の原因第一位である運動器疾患の中で最も代表的なものであり、その患者数は約 2000 万人といわれている。しかし、主な OA 治療は、痛みに対する対処療法や人工関節置換術など最終的には外科的手術によるものであり、原因療法はもちろんのこと進行抑制法や早期診断法の確立にも至っていない。OA は軟骨だけでなく関節組織全体そして肥満や筋力低下など全身の変化を伴う OA 発症機構を理解することがより重要だと考えている。そこで OA 発症の分子機構をより理解することで、新たな OA 治療法や早期診断法の開発につながる標的分子を同定していくことが先制医療を行う上でも必要である。研究代表者は、遺伝子発現の新たな制御分子としてノンコーディング RNA である microRNA (miRNA) に注目している。これまでに、正常軟骨に比べ OA 患者でその発現が低下している miRNA、miR-140 が関節軟骨の恒常性を制御することで OA 発症に関与していることを明らかにした (Miyaki S et al. *Gene Dev*, 2010)。さらに最近、miRNA はエクソソームといった小胞顆粒に包まれ細胞外に分泌し、細胞間、組織間を行きかい相互作用するサイトカインのような機能があることが明らかになってきた。研究代表者は、OA 様の滑膜細胞はエクソソームの分泌数を増加させ、そのエクソソームは、軟骨細胞に対して OA 様変化を誘導することを明らかにした。そして、このエクソソーム中に含まれている miRNA の関与を *Arthritis Res Ther*, 2014 に報告した。これらのデータは、研究代表者の仮説である「miRNA を含むエクソソームは、疾患特異的な機能を持ち、関節組織間ネットワークの新たなコミュニケーション因子として OA 発症に関与する」の一部を支持するものである。また、分泌因子であることから miRNA を含むエクソソームは、患者の血液を用いた診断マーカーとしての可能性も示されはじめており OA の分野においても早期診

断マーカーとしての可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、変形性関節症(OA)における分子機構の解明と臨床応用に向けた基盤となる技術の開発のために分泌 microRNA (miRNA) を含むエクソソームに注目したものである。miRNA を含むエクソソームは、疾患特異的なプロファイルにより特徴づけることができ、関節組織間ネットワークの新たなコミュニケーション因子として OA 発症に関与するという仮説を立て、以下のような課題を実施した。

- (1) ヒト軟骨細胞を用いて miRNA を含むエクソソームの解析を行う。
- (2) ヒト軟骨細胞由来 miRNA の制御メカニズムおよびその機能を解明する。

3. 研究の方法

本研究の特徴の一つとしては、我が国では取り扱うことが困難である正常および様々な OA グレードの老若男女のヒトサンプルを用いて解析を行うことである。

- (1) ヒト軟骨細胞を用いて miRNA を含むエクソソームの解析

研究代表者は、OA 様の滑膜細胞から分泌するエクソソームは増加し、エクソソーム内の miRNA プロファイルが変化すること、そして、このエクソソームの軟骨細胞への添加は OA 様変化を誘導することを報告した (*Arthritis Res Ther*, 2014)。エクソソームの機能は、分泌された細胞を反映した細胞表面分子や miRNA などの内容物によると考えられる。しかし、分泌細胞の違いや正常や疾患状態によってエクソソーム表面や内容物に違いがあるのかは明らかになっていない。そこで、エクソソーム内の miRNA や表面の糖鎖に注目し、miRNA を含むエクソソーム分泌細胞とそのエクソソームの表面の糖鎖パターンを解析する。さらに、細胞由来ごとにエクソソームを濃縮可能となればエクソソームの性質および機能をより明らかにできると同時により効果的な診断マーカーとして

利用できるのではないかと考えた。

(2) ヒト軟骨細胞由来 miRNA の制御メカニズム およびその機能解析

miRNA を含むエクソソームは、どのように放出され、標的細胞に受容されて、そして病態生理学的に機能しているかはほとんど理解されていない。

① miRNA の制御メカニズムの解析

軟骨細胞由来のエクソソーム中に豊富に存在する miRNA に注目し、その発現制御メカニズムを解析する。

② 遺伝子改変マウスを用いた解析

(1) で同定された miRNA の機能をマウス個体レベルで解析するために miRNA 過剰発現マウスを解析する。

③ CRISPR/Cas9 技術などによる miRNA ノックアウトマウスの作製

(1) で同定された miRNA の機能をマウス個体レベルで解析するために、CRISPR/Cas9 技術による miRNA ノックアウトマウスを作製する。作製は筑波大学生命科学動物資源センターに依頼し、広島大学でマウスの解析を行う。

4. 研究成果

(1) ヒト膝関節より関節軟骨を採取し、病理組織学的解析および遺伝子発現解析の結果より、正常関節軟骨と初期 OA、後期 OA 関節軟骨に分類し、各々の関節軟骨組織より軟骨細胞を単離・培養し、初代細胞および継代細胞、またこれらの各培養上清よりエクソソームを収集した。各エクソソーム中の miRNA の発現解析を行った結果、エクソソーム中における miRNA プロファイル解析を行った結果、正常と OA 由来で miRNA プロファイルに顕著な違いが認められた。正常関節軟骨細胞内で高発現および高分泌している数種の miRNA に注目した。そして、これら miRNA は、OA 関節軟骨細胞内において発現が低下してだけでなく、分泌型 miRNA としても低下していた。そこで、その中でも miR-26a に注

目した。糖鎖解析については、上記のように様々なグレードのエクソソームサンプルを収集し終えたので、今後糖鎖解析について進める予定である。

(2) ヒト軟骨細胞由来 miRNA の制御メカニズム およびその機能解析

① miRNA の制御メカニズムの解析

miR-26a は 2 つの染色体上から最終的に同じ配列を持った成熟型 miR-26a が生成されるパラログ miRNA である。miR-26a は *CTDSPL* と *CTDSP2* 遺伝子のイントロン部に位置しているが、これらホスト遺伝子と発現制御機構を共有しているか否かの解析を進めており、ChIP-seq データや KO マウスを用いたデータより miR-26a の周辺領域には FoxO1 や Sox9 結合領域があり、これら転写因子によって制御されていることが示唆された。さらに、転写因子によってホスト遺伝子や前駆体 miRNA の発現制御とは別に成熟型 miRNA の生成に関与するデータを得た。今後さらにこの制御メカニズムを明らかにするだけでなく、miRNA のエクソソームへの取込まれ機構や分泌機構について解析を進める。さらに、この miRNA は、細胞周期や炎症などに重要な役割を示すことが示されており、この miRNA の標的遺伝子の探索も行い、標的候補遺伝子を同定した。

② 遺伝子改変マウスを用いた解析

miR-26a を組織特異的に過剰発現させる miR-26a Tg マウスをシテリオブホープ研究所 Prof. Wendong Huang よりスクリプス研究所に移譲して、2 種類の軟骨特異的 Cre マウス (*Col2-Cre*, *Acan-Cre ERT*) との交配により軟骨特異的に miR-26a を過剰発現するマウスを作製した軟骨特異的 miR-26a Tg マウスは、マイルドな体長の差異を認めるが、膝関節等には異常なく、miR-26a Tg マウスの培養関節軟骨細胞における内在型および分泌型 miR-26a は、野生型 (Wild) に比べて内在型および分泌型ともに

発現が約6倍増加していた。現在、成長および OA に対する影響について靭帯切離による OA 誘導モデルを作製し、OA を軽減するかどうか解析中である。

またマウス OA の新たな評価システムとして、加齢による自然発症モデルと靭帯切離による OA 誘導モデルの2つの OA モデルマウスを用いて OA 発症に関連がある軟骨下骨の組織学的変化を評価するための新たなスコアリングシステムを開発した。

③ CRISPR/Cas9 技術などによる miRNA ノックアウトマウスの作製

miR-26a KO マウスと全身および軟骨特異的 miR-23a/b KO マウス、タモキシフェン誘導性軟骨特異的 Dicer KO マウス(多くの miRNA の生成が減少)を作製し、現在広島大学の動物実験施設で飼育・解析中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ishitobi H, Sanada Y, Kato Y, Ikuta Y, Shibata S, Yamasaki S, Lotz MK, Matsubara K, Miyaki S, Adachi N. Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of heme oxygenase-1 in human articular chondrocytes. *Eur J Pharmacol.* 830, 1-8, 2018. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.04.018. 査読有

- ② Miyaki S, Lotz MK. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1, 129-135, 2018. doi: 10.1097/BOR.0000000000000454. 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① Sanada Y, Miyaki S, Adachi N. Articular chondrocytes-derived EVs regulate osteoclastogenesis, but not osteogenesis. International Society for Extracellular Vesicles, 3-6 May. 2018. Barcelona, Spain.
- ② Sanada Y, Miyaki S, Ikuta Y, Ishitobi H, Shinohara M, Nagira K, Ishikawa M, Nakasa T, Matsubara K, Lotz MK, Adachi N.

Senescence accelerated mice as a new mouse model for spontaneous osteoarthritis. Osteoarthritis Research Society International, 26-29 Apr. 2018. Liverpool, UK.

- ③ Nagira K, Miyaki S, Ikuta Y, Lotz MK. Histological scoring system for periarticular bone changes in mouse models of osteoarthritis. Osteoarthritis Research Society International, 26-29 Apr. 2018. Liverpool, UK.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院・講師

研究者番号：10392490

(2) 研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

Martin Lotz

スクリプス研究所・分子医学部門・教授