

令和元年6月6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10905

研究課題名(和文) microRNAとエクソソーム解析によるメカニカルストレスの関節軟骨への作用解明

研究課題名(英文) Analysis of cartilage protection by mechanical stress -miRNA and extracellular vesicles functions in osteoarthritis-

研究代表者

大月 孝志(Ohtsuki, Takashi)

岡山大学・保健学研究科・非常勤研究員

研究者番号：10534802

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：関節液を遠心、酵素処理しエクソソーム(EVs)の精製する方法を確立した。更に軟骨細胞へのEVs添加試験系を確立しマトリックス成分、マトリックス分解酵素、ヒアルロン酸分解酵素mRNAの発現変化をRT-PCR法を用いて解析した。軟骨細胞のEVs取り込み機構を解析し、クラスリンの関与するエンドサイトーシスであることを明らかにした。

軟骨細胞に対しメカニカルストレスを与え、炎症性サイトカインで誘導されるマトリックス分解酵素発現を抑制する可能性のあるmicro RNAを複数同定した。これらmicro RNAのタンパクレベルでのプロテオグリカン分解酵素産生抑制、ヒアルロン酸分解因子産生抑制を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節液からエクソソーム(EVs)の精製する方法を確立し、軟骨細胞へのEVs添加試験系を用いて滑液中EVsが周辺組織に作用するかを解析可能にした。また軟骨細胞のEVs取り込み機構を解明したことでEVsが変形性関節症(OA)にどのように関与するか、EVsの内包する成分(mRNA、miRNA、タンパク)が作用するのかという解析を行うことができるようになった。また、本研究でマトリックス分解酵素発現を抑制する可能性のあるmiRNAを同定し、これらmiRNAのタンパクレベルでのマトリックス分解因子産生抑制を確認した。OA治療薬としてのmiRNAの可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We established the method how to purify Extracellular vesicles (EVs) from synovial fluid. Furthermore, we analyzed the effects of adding EVs in culture medium in mRNA expressions (matrix components and matrix degradative enzymes) by RT-PCR method. Using fluorescence labelled EVs and some inhibitors, we revealed EVs were up-taken by clathrin mediated endocytosis in chondrocyte.

We isolated several miRNAs that reduced inflammatory cytokine induced matrix degradative enzyme protein expression.

研究分野：マトリックスバイオロジー

キーワード：エクソソーム miRNA マトリックス ADAMTS アグリカン ヒアルロン酸 コラーゲン 変形性関節症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、整形外科領域で最も頻度の高い骨・関節疾患であり、加齢に伴い有病率が大きく上昇する。本邦では1000万人以上が自覚症状を有し、潜在的患者数は3000万人と推定されている。その発症・進行にはメカニカルストレスや外傷・加齢など様々な要素が関与していると考えられている。

OAでは関節に豊富に存在しその機能維持・形態保持に関わっている細胞外マトリックス(プロテオグリカン)であるアグリカンが分解され、断片が関節液中に認められる。細胞の産生するmiRNAは標的となるmRNAと結合しタンパク発現を翻訳レベルでコントロールする。OAの病態とmiRNAの関わりについてはほとんど報告がなかった。

2. 研究の目的

メカニカルストレス(MS)は変形性関節症(OA)の進行に重要な役割を担っている。本研究はMSがもたらす軟骨細胞外マトリックスへの作用の複雑な分子メカニズムをmiRNAやエクソソームの観点から解明して新たなOAの治療ターゲットを探索することを目的とする。

3. 研究の方法

軟骨細胞に炎症性サイトカイン存在下でMSを与えることでマトリックス分解酵素の発現抑制が誘導出来る。細胞からmiRNAを回収し、miRNAアレイ解析を行い発現抑制に関与する可能性の高いmiRNAを選抜する。選抜は段階的に行った。

サイトカイン単独、炎症性サイトカイン・MS併用での発現量変化を比較する。

アルゴリズムの異なるmiRNAの標的予測ソフトを用いて、マトリックス産生・分解に関連する因子(マトリックス分解酵素、マトリックス成分、転写因子、サイトカイン、炎症、チャンネル、)を制御するmiRNAを選抜する。

選抜したmiRNA特異的阻害剤、miRNA発現ベクターを用いて標的タンパクの発現レベルを測定する。

滑液よりエクソソームを回収し、細胞に添加し細胞の産生するマトリックス関連遺伝子の発現を解析する。

4. 研究成果

軟骨細胞に対しMSを与え、炎症性サイトカインで誘導されるマトリックス分解酵素発現を抑制する可能性のあるmiRNAを複数同定した。これらmiRNAのアナログ、阻害剤、miRNA発現ベクターで軟骨細胞を処理し、タンパクレベルでマトリックスのメジャーな成分であるプロテオグリカン分解酵素産生抑制、ヒアルロン酸分解因子産生抑制を確認している。

軟骨細胞の培養上清から回収したエクソソームを用いて軟骨細胞への添加試験を行い、必要な培養上清量、添加時間を検討しエクソソーム添加試験系を確立した。サイトカイン処理した培養軟骨細胞の培養上清から回収したエクソソームを軟骨細胞に添加し、マトリックス成分(アグリカン、2型コラーゲン)、マトリックス分解酵素(ADAMTS4、5、9、MMP-13)、ヒアルロン酸分解酵素(KIAA1199)mRNAの発現変化をRT-PCR法を用いて解析した。

軟骨細胞OUMS-27に対しMSを負荷し培養上清中に産生されるエクソソームを超遠心法、カラム法で回収し比較した。超遠心法は収量が少なく、逆に行程数、時間も多い為カラム法での回収が適していると判断した。

関節液を遠心(低速、高速)酵素処理することにより滑液からエクソソームを精製する方法を検討・確立した。精製した粒子については粒子径分布分析をおこない直径が30-100nmであること、電子顕微鏡観察を行い脂質2重膜構造を持つ球状構造であること、マーカータンパクをウェスタンブロット分析を行いCD9を含有すること、RNA含量測定を行いRNAを含有することを確認した。軟骨細胞培養上清からも同様にエクソソーム回収を行った。既報の情報と比較・検討し精製された粒子がエクソソームであることを確認した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

A High-Fat and High-Cholesterol Diet Induces Cardiac Fibrosis, Vascular Endothelial, and Left Ventricular Diastolic Dysfunction in SHRSP5/Dmcr Rats.

Watanabe S, Kumazaki S, Kusunoki K, Inoue T, Maeda Y, Usui S, Shinohata R, Ohtsuki T, Hirohata S, Kusachi S, Kitamori K, Mori M, Yamori Y, Oka H.

J Atheroscler Thromb. 2018 25 (5) 439-453 査読あり

Host-produced ADAMTS4 inhibited early stage of tumor growth.

Asano K, Edamatsu M, Hatipoglu O F, Cilek M Z, Inagaki J, Ohtsuki T, Oohashi T, Hirohata S.

Acta Med Okayama. 2018 Jun; 72(3):257-266. 査読あり

High molecular weight hyaluronan protects cartilage from degradation by inhibiting aggrecanase expression.

Ohtsuki T, Asano K, Inagaki J, Shinaoka A, Kumagishi-Shinaoka K, Cilek MZ, Hatipoglu OF, Oohashi T, Nishida K, Komatsubara I, Hirohata S.

J Orthop Res. 2018 36(12):3247-3255. 査読あり

Stromal Versican Regulates Tumor Growth by Promoting Angiogenesis.

Asano K, Nelson CM, Nandadasa S, Aramaki-Hattori N, Lindner DJ, Alban T, Inagaki J, Ohtsuki T, Oohashi T, Apte SS, Hirohata S.

Sci Rep. 2017 Dec 8; 7(1):17225 査読あり

Diverse Functions of a Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif-1

Satoshi Hirohata, Junko Inagaki, and Takashi Ohtsuki

YAKUGAKU ZASSHI 137(7) 811-814 (2017) 査読あり

[学会発表](計 18 件)

Name The 32th Annual meeting of the Japanese Society of Cartilage metabolism

Date 2019/03/03/01-02

Place Osaka (Life Science Center)

Title Mechanical stress attenuated inflammatory cytokine induced HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) expression

Person Takashi Ohtsuki, Liu Guole, Takuto Nishimura, Miho Tahchiki, Masumi Okada, Akira Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Omer Faruk Hatipoglu, Junko Inagaki, Takayuki Furumatsu, Masayuki Shimoda, Keiichiro Nishida, Yasunori Okada, Satoshi Hirohata

Name The 41st Annual Meeting of the molecular Biology Society of Japan

Date 2018/11/28-30

Place Yokohama (Pacifico Yokohama)

Title Isolation and characterization of extracellular microvesicles in osteoarthritis

Person Liu Guole, Takashi Ohtsuki, Akira Shinaoka, Kana Komatsu, Yurika Notsu, Omer Faruk Hatipoglu, Takuto Nishimura, Miho Tatii, Junko Inagaki, Hiroshi Yamada, Keiichiro Nishida, Sun Liankun, Satoshi Hirohata

Name American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2018

Date 2018/10/14-17

Place Red Rock (Las Vegas, NV)

Title Mechanical stress attenuated inflammatory cytokines induced matrix degradative enzymes expression in chondrocyte by inhibition of NF-kB translocation

Person Takashi Ohtsuki, Omer Faruk Hatipoglu, Guole Liu, Akira Shinaoka, Keiichi Asano, Takuto Nishimura, Junko Inagaki, Keiichiro Nishida, Toshitaka Oohashi, Satoshi Hirohata

Name Brainstorming 2018

Date 2018/9/15-16

Place Okayama (Ushimado Carillon House)

Title Purification and characterization of exosome from chondrocyte conditioned medium and analysis of exosome up-taking mechanism in chondrocyte

Person Liu Guole, Takashi Ohtsuki, Akira Shinaoka, Kana Komatsu, Yurika Notsu, Omer Faruk Hatipoglu, Takuto Nishimura, Miho Tatiki, Junko Inagaki, Hiroshi Yamada, Keiichiro Nishida, Sun Liankun, Satoshi Hirohata

Name Brainstorming 2018

Date 2018/9/15-16

Place Okayama (Ushimado Carillon House)

Title Analysis of cartilage matrix degradation and regeneration mechanism

Person Takashi Ohtsuki, Liu Guole, Omer Faruk Hatipoglu, Akira Shinaoka, Junko Inagaki, Ken Takahashi, Hiroshi Yamada, Toshitaka Ohashi, Keiichiro Nishida, Yasunori

Okada, Suneel S, Apte, Satoshi Hirohata

Name 10th Annual Meeting of the Japan CCN family study group
Date 2018/8/25
Place Okayama (Okayama University MUSCAT CUBE)
Title Isolation and characterization of matrix degradative miRNA
Person Takashi Ohtsuki, Omer Faruk Hatipoglu, Akira Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Takuto Nishimura, Keiichi Asano, Junko Inagaki, Toshitaka Oohashi, Keiichiro Nishida, Yasunori Okada, Satoshi Hirohata

Name The 13th JAPANESE ASSOCIATION OF MEDICAL TECHNOLOGY EDUCATION
Date 2018/08/17-19
Place Hokkaido university (Hokkaido)
Title Eosinophyl derived cationic protein purification and cardiomyoblast protection activity
Person Takuto Nishimura, Miho Tachiki, Junko Inagaki, Omer faruk Hatipogl, Takashi Ohtsuki, Kentaro Ikemura, Liu Guole, Satoshi Hirohata

Name Joint Conference of 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR)
Date 2018/06/29-30
Place Fukuoka Fukuoka University hospital medical hole)
Title Silencing of Important Molecules in Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis via RNA interference
Person OF Hatipoglu, E Uctepe, E. Gunduz, M. Gunduz, M. Aca, T Ohtsuki, J Inagaki, S Hirohata

Name Joint Conference of 50th Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR)
Date 2018/06/29-30
Place Fukuoka (Fukuoka University hospital medical hole)
Title Isolation and characterization of Osteoarthritis concerning miRNA
Person Takashi Ohtsuki, Omer Faruk Hatipoglu, Akira Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Takuto Nishimura, Keiichi Asano, Junko Inagaki, Toshitaka Oohashi, Keiichiro Nishida, Yasunori Okada, Satoshi Hirohata

Name ConBio 2017 Joint Conference of 40th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, and 90th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society
Date 2017/12/06-09
Place Kobe (Kobe Conbention Center)
Title Inflammatory cytokine-induced matrix degrading enzymes expression were attenuated by mechanical stress through transient receptor potential cation channel
Person Takashi Ohtsuki, Akira Shinaoka, Kanae Kumagishi-Shinaoka, Omer Faruk Hatipoglu, Nao Yamanokuchi, Masumi Okada, Takuto Nishimura, Junko Inagaki, Keiichiro Nishida, Satoshi Hirohata

Name Joint Conference of 49th Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR)
Date 2017/06/16-17
Place Mie (Mie Center For the Arts)
Title Localization of ADAMTS in the tumor microenvironment and the meaningful distribution of versican in the tumor vasculature.
Person Keiichi Asano, Satoshi Hirohata, Takashi Ohtsuki, Omer Faruk Hatipoglu, Junko Inagaki, Toshitaka Oohashi

Name Joint Conference of 49th Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR)
Date 2017/06/16-17
Place Mie (Mie Center For the Arts)
Title Mechanical stress has multi-functions on chondrocytes -Matrix component synthesis promotion and inflammatory cytokine induced matrix degrading enzymes attenuation

Person Takashi Ohtsuki, Akira Shinaoka, Kanae Kumagishi-Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Omer Faruk Hatipoglu, Junko Inagaki, Keiichiro Nishida, Satoshi Hirohata

Name HYALRONAN 2017
Date 2017/06/11-15
Place Cleave land, Ohio (U.S.A.)
Title INFLAMMATORY CYTOKINE INDUCED HYBID (HYALURONAN-BINDING PROTEIN INVOLVED IN HYALURONAN DEPOLYMERAZATION) -EXPRESSION MECHANISM-
Person Takashi Ohtsuki, Lyu Chen, Hiroyuki Yoshida, Akira Shinaoka, Kanae Kumagishi-Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Omer Faruk Hatipoglu, Junko Inagaki, Keiichiro Nishida, Yasunori Okada, Satoshi Hirohata

Name The 30th Annual meeting of the Japanese Society of Cartilage metabolism
Date 2017/03/03-04
Place Kyoto (Miyakomesse)
Title HYBID (HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization) mRNA expression was increased by cytokine stimulation in chondrocyte-like cells
Person Takashi Ohtsuki, Hiroyuki Yoshida, Akira Shinaoka, Kanae Kumagishi-Shinaoka, Mehmet Zeynel Cilek, Omer Faruk Hatipoglu, Junko Inagaki, Keiichiro Nishida, Yasunori Okada, Satoshi Hirohata

Name American Society for Matrix Biology Biennial Meeting 2016
Date 2016/11/13-16
Place Hilton St. Petersburg Bayfront (Florida, USA)
Title Expression and proteolysis of the proteoglycan versican in the tumor microenvironment
Person Keiichi Asano, Tyler Alban, Courtney Nelson, Junko Inagaki, Takashi Ohtsuki, Shozo Kusachi, Yoshifumi Ninomiya, Toshitaka Oohashi, Suneel Apte, Satoshi Hirohata

Name The 11th JAPANESE ASSOCIATION OF MEDICAL TECHONOLOGY EDUCATION
Date 2016/08/31-09/02
Place Kobe tokiwa unoversity (Kobe)
Title New western analysis technique-siRNA application-
Person Mayumi Kono, Maho Shinohara, Miki Sato, Takashi Ohtsuki, Nao Yamanokuti, Keiichi Asano, Junko Inagaki, Toshitaka Oohashi, Kazumasa Komatsubara, Satoshi Hirohata

Name The 29th annual meeting of the Japanese Clinical Orthopaedic Association
Date 2016/7/17-18
Place Hokkaido (Roiton sapporo)
Title Biochemical analysis of osteoarthritis conservative therapy Rat OA model
Person Kanae Kumagishi-Shinaoka, Akira Shinaoka, Takashi Ohtsuki, Takafumi Sakai, Satoshi Hirohata, Tetsuhiro Watanabe, Kenji Kawamura, Aiji Otsuki, Syunsuke Sakata

Name Joint Conference of 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Connective Tissue Research (JSCTR)
Date 2016/06/24-25
Place Nagasaki (Nagasaki Univ.)
Title The timing for hyaluronan administration in rat OA cartilage.
Person Takashi Ohtsuki, Akira Shinaoka, Kanae Kumagishi, Mayumi Kono, Maho Shinohara, Keiichi Asano, Junko Inagaki, Toshitaka Oohashi, Keiichiro Nishida, Satoshi Hirohata

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：古松毅之

ローマ字氏名：Takayuki Furumatsu

所属研究機関名：岡山大学

部局名：岡山大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：20432651

研究分担者氏名：西田圭一郎

ローマ字氏名：Keiichiro Nishida

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：80284058

研究分担者氏名：廣畑聡

ローマ字氏名：Satoshi Hirohata

所属研究機関名：岡山大学

部局名：保健学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：90332791

研究分担者氏名：品岡玲

ローマ字氏名：Akira Shinaoka

所属研究機関名：岡山大学

部局名：医歯薬学総合研究科

職名：助教

研究者番号（8桁）：90724500

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。