

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09021

研究課題名(和文) 関節軟骨修復に寄与するマイクロRNAの探索

研究課題名(英文) The investigation of the micro RNAs to contribute cartilage repair.

研究代表者

目良 恒 (Mera, Hisashi)

新潟大学・医歯学総合病院・特任講師

研究者番号：70650381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：自家脂肪由来細胞(ADSC)の軟骨分化能維持の機序解明のために、ADSC由来の分泌小胞体であるエクソソームに内包されるmiRNAの解析を行った。
ADSCのbFGF添加による細胞の増殖促進作用および軟骨分化能維持を確認し、その過程で得られる軟骨分化誘導前の培養上清から、超遠心機を用いてエクソソームを回収した。エクソソーム中のmiRNAを抽出し、miRNA-Seqにて、3ドナーの2群間比較を行い、bFGF添加の有無で有意に変動する($p<0.05$) miRNAが14種類選別された。さらに公開データベースを用いて、これらの選別したmiRNAの標的遺伝子の予測をin silicoで行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の再生治療の進歩により、整形外科領域では変形性関節症および脊髄損傷に対する間葉系幹細胞治療が行われているが、それらの作用機序については不明な点が多い。本研究では細胞間伝達物質として認識の高まっている分泌小胞体のエクソソームに着目し、それらに内包されるmiRNAが上記作用機序解明につながると仮説を立て、ADSCの分泌エクソソーム中のmiRNA解析を行った。
一連の研究成果は、幹細胞治療の作用機序解明に発展するのみならず、これらを応用した核酸創薬に発展する可能性があると考えている。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the mechanism of chondrogenic differentiation of autologous adipose-derived cells (ADSCs), we analyzed miRNAs in exosomes, which are secretory extracellular vesicles derived from ADSCs.
While confirming the enhancement of proliferation and maintenance of chondrogenic differentiation capacity of ADSCs with or without bFGF, the exosomes from ADSCs were collected from the culture supernatant obtained in the process just before the induction of chondrogenic differentiation experiment using an ultracentrifuge. Furthermore, miRNAs in these exosomes were extracted, miRNA-Seq was performed, and a comparison between two groups of three donors was made to select miRNAs that varied with or without bFGF. 14 miRNAs that varied significantly ($p<0.05$) were selected. In addition, the target genes of these selected miRNAs were predicted in silico using a public database.

研究分野：整形外科

キーワード：幹細胞 脂肪由来幹細胞 軟骨修復・再生 組織修復・再生 マイクロRNA エクソソーム

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

関節軟骨治療は様々な問題から、根本的な組織治癒を期待できる方法は存在していない。本邦では2013年4月の自家培養軟骨細胞治療(ジャック:J-TEC)の保険収載および、同時期の再生医療推進法(厚労省)の法整備により、細胞治療が関節治療の新たな選択肢となった。研究開始当初、変形性膝関節症に対して、保険外診療で自家脂肪由来細胞(以下、ADSC)移植治療が普及しつつあった。本治療は間葉系幹細胞(MSC)であるADSCが関節の恒常性維持に主要な役割を果たしていると考えられるが、その作用機序は現在も不明な点が多い。

また、申請者は先行研究において、骨髄細胞(以下、BMSCs)から作成される再生軟骨を治療に用いることを想定し、他家移植や細胞の品質管理上の観点から、BMSCsの個体による軟骨分化度を定量予測する因子としてmicroRNA(miRNA)を標的に検討した。その一つにmiR708-5pが抽出されたが、他のmiRNAによる関与も示唆され、さらなる解析を要すると考えられた。また、これらの遺伝子群はドナー間で異なる間葉系細胞の潜在的な軟骨分化能を規定するほか、内在性の細胞を介した関節内の恒常性維持や軟骨組織の修復促進に寄与すると考えていた。

既に全身性の疾患マーカーや核酸医薬としてのmiRNAの可能性については、それまでに多くの報告があり、細胞外のmiRNAを内包する因子として、50-150umの細胞外小胞であるエクソソームが注目されていた。そこで、上記miRNAのさらなる検討に、細胞から分泌されるエクソソーム中のmiRNAについて解析を行うこととした。

また、これら分泌エクソソーム中のmiRNAの解析には、当時研究手法の主軸となりつつあった次世代シーケンズを用いたRNA-Seqの網羅的解析およびin silicoでのバイオインフォマティクス分析を用いることとした。

2. 研究の目的

本研究では、幹細胞であるADSCの分泌エクソソーム中のmiRNA解析を行い、軟骨を含めた組織再生や、関節内の組織恒常性維持および組織修復に寄与する上記miRNA遺伝子群のさらなる絞り込みを行うことを目的とした。

3. 研究の方法

ADSCはLONZA社から購入し専用の培地にて培養した。購入時、凍結されたP1の細胞を解凍しT150フラスコで生着・増殖を確認した後10ng/ml bFGF添加の有無で、さらに細胞を増殖させた。その後、ペレットカルチャーによる軟骨分化誘導実験を行い、各群の組織塊の組織学的および分子生物学的解析を行った。分子生物学的解析にはSox9、2型コラーゲン、アグリカンなどの遺伝子発現量をRT-PCRにて定量解析を行った。

軟骨分化誘導前の細胞外分泌エクソソーム解析用サンプルを培養上清から得た。分化誘導実験の36時間前に、無血清培地(Advanced DMEM: Thermo Fisher scientific)に交換し、分化誘導実験の直前にその上清を回収し、遠心分離にて余剰細胞を除去したのち、0.2umフィルターに通した後、-80°Cで保存した。後日解凍し、超遠心機でエクソソームを抽出した。qNanoによる粒度分布(粒子径・粒子数)解析をおこなった。さらに、分泌エクソソーム中のmiRNAを抽出し、miRNA-Seqを用いてFGF添加の有無で変動するmiRNAの選別を試みた。

3ドナーのADSCからFGF添加の有無による2群間の比較については、RNA-Seqで得られたリードカウントのデータをDESeq2で処理・解析を用いて行い、有意に変動する($p < 0.05$) miRNAを選別した。さらに、これら変動したmiRNAについてTargetscan(Release 7.2)およびDIANA_microT-CDS(web server v5.0)やmirTarBase(Release 8.0)の公開データベースを用いたin silicoでの標的遺伝子の予測をおこなった。

4. 研究成果

申請者がこれまで骨髄細胞で行ったbFGF添加による実験と同様に、ADSCでもbFGF添

加による細胞の縮小紡錘形への形態的变化が顕微肉眼的に観察された。さらに増殖促進作用についても、bFGF 添加による増殖速度は 0.35 PD/d で非添加の 2-3 倍という骨髄細胞とほぼ同等 (0.36 ± 0.13 PD/d) の結果を得た。さらに軟骨分化誘導実験での bFGF 添加による未分化能維持を確認した。

培養上清中のエクソソームの qNano による粒度分布解析では、粒径が約 100nm であることが確認された。

これら分泌エクソソームの RNA-Seq ~ DESeq2 での処理・解析により、有意に変動する ($p < 0.05$) miRNA として、14 種類の miRNA が選別された。

これら変動した miRNA について Targetscan (Release 7.2) および DIANA_microT-CDS (web server v5.0) や mirTarBase (Release 8.0) の公開データベースを用いた in silico での標的遺伝子の予測では、各 miRNA が重複して標的となる可能性のあるものや、標的遺伝子の相互作用の観点から、機能的に重要なものを抽出し、6 ~ 31 の標的遺伝子が絞り込まれた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Hisashi Mera |
| 2. 発表標題 Identification of micro-RNA associated with the chondrogenic ability of human bone marrow mesenchymal stem cells. |
| 3. 学会等名 TERMIS-kyoto (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 目良 恒 |
| 2. 発表標題 骨髄間葉系細胞の軟骨分化能の個体差を規定するマイクロRNAの検討 |
| 3. 学会等名 第32回 日本軟骨代謝学会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 目良 恒 |
| 2. 発表標題 骨髄間葉系細胞における 軟骨分化能に関するマイクロRNAの検討 |
| 3. 学会等名 第18回 日本再生医療学会総会 |
| 4. 発表年 2018年～2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|--------------------------------|----|
| 研究分担者 | 望月 友晴 (Mochizuki Tomoharu) (00773607) | 新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 谷藤 理 (Tanifuji Osamu) (30748348) | 新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101) | |
| 研究分担者 | 石橋 宰 (Ishibashi Osamu) (70293214) | 大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授 (24403) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |