

令和 5 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09738

研究課題名(和文) 組織再生を誘導する生体シグナルにおけるマクロファージ・エクソソームの役割

研究課題名(英文) Roles of macrophage exosomes in biological signals that induce tissue regeneration

研究代表者

藤原 夕子 (Fujihara, Yuko)

東京大学・医学部附属病院・客員研究員

研究者番号：50466744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、再生軟骨移植におけるエクソソームの役割を明らかにし、軟骨細胞とマクロファージの相互作用から組織成熟過程を解明することを目的として行った。ヒト耳介軟骨細胞およびマウスマクロファージ様細胞RAW264の培養液から、エクソソーム単離した。得られたエクソソームを、それぞれ軟骨細胞やマクロファージの培養液に添加し、遺伝子発現の変化を解析した。軟骨細胞由来のエクソソームは、M1、M2いずれのマクロファージもM2傾向に誘導し、軟骨細胞では、マクロファージ由来のエクソソームにより軟骨分化が促進される可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

再生医療において、移植後の組織成熟や安定化を実現するためには、再生組織に対する組織反応を把握し制御していく必要がある。われわれはこれまでの検討で、ポリ乳酸足場素材と耳介軟骨細胞で構成される再生軟骨組織をマウスへ移植し、移植後の再生軟骨組織に局在するホスト由来細胞がマクロファージであること、再生軟骨の成熟が進行する移植後1-2週にかけて、マクロファージの局在が増加することなどを明らかにした。本研究では、軟骨細胞とマクロファージそれぞれが分泌するエクソソームが互いの細胞特性に影響を与えつつ組織成熟が進行していく可能性が示され、生体に移植された再生軟骨組織の組織形成過程解明の一助となったと考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the role of exosomes in transplantation of tissue-engineered cartilage and to elucidate the process of tissue maturation from the interaction between chondrocytes and macrophages. Exosomes were isolated from the culture medium of human auricular chondrocytes and mouse macrophage-like cell, RAW264. The obtained exosomes were added to culture media of chondrocytes and RAW264, respectively. Gene expressions in chondrocytes and RAW264 were analyzed by real-time RT-PCR. It was suggested that chondrocyte-derived exosomes induced both M1 and M2 macrophages toward M2, and macrophage-derived exosomes promoted chondrocyte differentiation.

研究分野：軟骨再生医療

キーワード：組織再生 マクロファージ エクソソーム 軟骨再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

生活の質(Quality of life: QOL)がますます重要視される現代社会で、医療においても、より低侵襲に優れた効果を発揮する治療法の開発が望まれる。口腔顎顔面領域においても、先天異常や外傷、腫瘍切除後に生じる組織欠損に対する再建術として、再生医療に基づく新たな治療法の導入も期待される。

再生医療において、移植後の組織成熟や安定化を実現するためには、再生組織に対する組織反応を把握し制御していく必要がある。われわれはこれまでの検討で、ポリ乳酸足場素材と耳介軟骨細胞で構成される再生軟骨組織をグリーンマウスへ移植する検討を行い、移植後の再生軟骨組織に局在するホスト由来細胞がF4/80陽性マクロファージであること、そして、再生軟骨の成熟が進行する移植後1-2週にかけて、マクロファージの局在が増加することなどを明らかにした[Fujihara, Hoshi et al. Tissue Eng Part A 2009; Biomaterials 2010; Stem cells 2014](図1)。

再生軟骨移植におけるマクロファージの特性については、移植後早期には炎症性マクロファージ(M1)が増加するが、軟骨基質の成熟が進行する移植後1-2週にかけて組織修復性マクロファージ(M2)が優位になることが観察された。さらに、マクロファージとの共培養により、軟骨細胞における軟骨基質タンパクのII型コラーゲンなどの発現が上昇することから[Fujihara, Hoshi et al. J cell Physiol 2017]、再生軟骨の成熟過程は、マクロファージと軟骨細胞の相互作用により進行していくことが推察された。しかし、マクロファージと軟骨細胞の共培養上清をプロテオームアレイで網羅的に解析しても、移植後に生体内で観察されるような組織成熟を誘導する因子は同定されなかった。従って、生体内で観察される再生軟骨の組織成熟は、一つの液性因子による単純なシグナルにより誘導されるのではなく、エクソソームなど、強力な複合化したメカニズムで媒介されている可能性が考えられる。

再生軟骨移植におけるマクロファージの特性については、移植後早期には炎症性マクロファージ(M1)が増加するが、軟骨基質の成熟が進行する移植後1-2週にかけて組織修復性マクロファージ(M2)が優位になることが観察された。さらに、マクロファージとの共培養により、軟骨細胞における軟骨基質タンパクのII型コラーゲンなどの発現が上昇することから[Fujihara, Hoshi et al. J cell Physiol 2017]、再生軟骨の成熟過程は、マクロファージと軟骨細胞の相互作用により進行していくことが推察された。しかし、マクロファージと軟骨細胞の共培養上清をプロテオームアレイで網羅的に解析しても、移植後に生体内で観察されるような組織成熟を誘導する因子は同定されなかった。従って、生体内で観察される再生軟骨の組織成熟は、一つの液性因子による単純なシグナルにより誘導されるのではなく、エクソソームなど、強力な複合化したメカニズムで媒介されている可能性が考えられる。

## 2. 研究の目的

組織から単離された軟骨細胞はユニークな特性を有し、増殖培養中に軟骨特性を失って基質産生能を喪失するが(von der Mark et al. Nature 1977)、生体内に移植されると基質産生を再開し、組織成熟が進行する。現行の軟骨再生医療はそのような軟骨細胞の特性を活用して行われているが、その過程の詳細な分子メカニズムは不明である。

エクソソームは、直径30~100 nm程度の腔内に宿主細胞由来のRNAやタンパク質などを内包し、細胞間コミュニケーションを介して抗原提示、アポトーシス、血管形成、炎症、凝固などの生物学的プロセスに深く関与することが知られている。本研究では、再生軟骨移植において組織成熟過程を媒介していると考えられるエクソソームを解析することにより、軟骨細胞とマクロファージの相互作用の観点から組織成熟過程を解明し、軟骨再生医療の発展に貢献することを目的とする。

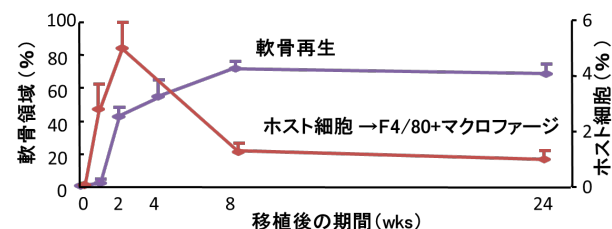
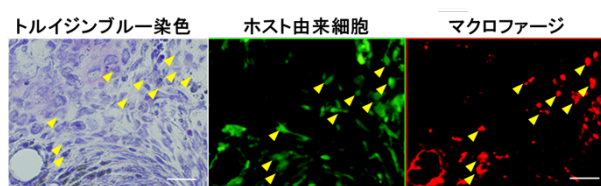


図1 再生軟骨移植におけるマクロファージの局在

### 3. 研究の方法

- ・ 軟骨細胞とマクロファージの共培養における遺伝子発現の検討

軟骨細胞とマクロファージの相互作用を検討するため、インフォームドコンセントのもと得られたヒト耳介軟骨細胞とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 を 100:0, 99:1, 90:10, 0:100 の比率で混和して、monolayer で培養した。培養 3 日後に Isogen (NIPPON GENE CO., LTD.) で回収し、M1, M2 マクロファージの発現を評価した。

- ・ ヒト耳介軟骨細胞の培養とエクソソームの単離

ヒト耳介軟骨組織から単離した軟骨細胞を、増殖培地にて培養した。COL1-coated 10cm dish にて継代し、P2 でコンフルエントに達した後、増殖培地を吸引して PBS で洗浄した。DMEM/F12 の培養液を添加した後、48 時間後に培養上清を回収し、エクソソームを単離し、収量を計測した。

- ・ マクロファージの培養・分化とエクソソームの単離

RAW264 を 10cm dish にて増殖培養させた後、IFN (2uL/10mL)+LPS (1uL/10mL)あるいは IL4 (2uL/10mL)を添加して M1, M2 マクロファージを誘導した。24 時間後に培養皿を PBS で洗浄後、MEM- $\alpha$ を 4mL 添加した。48 時間後に培養上清を回収し、エクソソームを単離し収量を計測した。RAW264 については Isogen で回収して RNA を精製し、realtime RT PCR にて M1, M2 マクロファージが誘導されているかを確認した。

- ・ 軟骨細胞由来エクソソームがマクロファージの特性に与える影響

RAW264 細胞を増殖させ 6-well plate に播種した後、上記方法用いて M1, M2 マクロファージを誘導した。24 時間後に培養液を吸引して PBS で洗浄した後、軟骨細胞由来のエクソソームを培養液に添加して培養した。培養 1 日後に細胞を Isogen で回収して RNA を精製し、M1, M2 マクロファージの特性を評価した。

- ・ マクロファージ由来エクソソームが軟骨細胞分化に与える影響

軟骨細胞を増殖させ、COL1-coated 6-well plate に播種した。培養液を吸引して PBS で洗浄した後、上記で記載した RAW264 由来のエクソソームを DMEM/F12 に添加して、軟骨細胞を培養した。培養後 3 日で Isogen を用いて回収し、RNA を精製した。COL1, COL2 などの遺伝子発現を評価し、軟骨特性を評価した。

### 4. 研究成果

- ・ 軟骨細胞とマクロファージの共培養における遺伝子発現の検討

ヒト耳介軟骨細胞とマウスマクロファージ様細胞 RAW264 を 100:0, 99:1, 90:10, 0:100 の比率で混和して培養したところ、99:1 では 90:10 に比較して RAW264 における IL-1 $\beta$ の発現が有意に低下する一方、Ym1 の発現は上昇した。このことから、共培養において軟骨細胞の比率が高くなると、マクロファージでは M1 傾向が抑制され、M2 傾向となる可能性が示唆された。

- ・ エクソソームの単離と収量の測定

エクソソームの単離にはいくつかの方法を比較検討し、安定して単離可能な PureExo® エクソソーム単離キット (101Bio 社) を選択した。収量の測定には EXOCET Exosome Quantitation Kit (System Biosciences, LLC) を使用した。

- ・ 軟骨細胞由来エクソソームがマクロファージの特性に与える影響

M1, M2 に誘導した RAW264 に、軟骨細胞の培養上清由来のエクソソームを添加すると、IL-1 $\beta$ や IL-6 などの M1 マーカーの発現は抑制された。発現抑制効果は、添加するエクソソーム

が  $1 \times 10^5$  /mL あたりで顕著であった。一方で、*Arginase* や *Ym1* などの M2 マーカーの発現は、軟骨細胞由来のエクソソームの添加により上昇した。以上から、軟骨細胞由来のエクソソームは、M1, M2 いずれのマクロファージも M2 傾向に誘導する可能性が示唆された。

- ・ マクロファージ由来エクソソームが軟骨細胞分化に与える影響

ヒト耳介軟骨細胞に M1, M2 に誘導した RAW264 由来のエクソソームを添加して培養したところ、M1, M2 いずれも軟骨細胞における II 型コラーゲン (*COL2*) の発現を増加させた。軟骨細胞では、マクロファージ由来のエクソソームにより軟骨分化が促進する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanda Kengo, Asawa Yukiyo, Inaki Ryoko, Fujihara Yuko, Hoshi Kazuto, Hikita Atsuhiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Requirement of direct contact between chondrocytes and macrophages for the maturation of regenerative cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22476
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-01437-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara Yuko, Abe Takahiro, Hoshi Kazuto	4. 巻 26
2. 論文標題 Controlling the Phenotype of Macrophages Promotes Maturation of Tissue-Engineered Cartilage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1005 ~ 1013
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2019.0190	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujihara Yuko, Abe Takahiro, Asawa Yukiyo, Nishizawa Satoru, Saijo Hideto, Hikita Atsuhiko, Hoshi Kazuto	4. 巻 27
2. 論文標題 Influence of Damage-Associated Molecular Patterns from Chondrocytes in Tissue-Engineered Cartilage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Engineering Part A	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/ten.TEA.2019.0185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤原夕子, 疋田温彦, 星和人.
2. 発表標題 再生軟骨移植におけるダメージ関連分子パターン(DAMPs)の影響.
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤原夕子、西條英人、倉林くみ子、末永英之、稲木涼子、杉山円、米永一理、高戸毅、星和人
2. 発表標題 唇裂鼻変形の患者に対する再生軟骨移植の画像診断を用いた有効性評価
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018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	石橋 牧子  (Ishibashi Makiko)  (60802395)	東京大学・医学部附属病院・客員研究員   (12601)	
研究分担者	星 和人  (Hoshi Kazuto)  (30344451)	東京大学・医学部附属病院・教授   (12601)	

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
---------	---------