

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：32644
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：19K18509
研究課題名（和文）軟骨細胞シート分泌エクソソーム内包miRNAの軟骨修復メカニズムへの関与の解明

研究課題名（英文）Involvement of exosomal miRNAs released from chondrocyte cell sheets in cartilage repair mechanisms.

研究代表者
前原 美樹（Maehara, Miki）
東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：40794102
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々はこれまでに、多指症由来軟骨細胞シート(PDシート)が放出するエクソソームに内包されるmiRNAのうち、特に軟骨修復能の高いPDシートに特徴的に発現するmiRNA(PD-Exo-miR)を3種類同定している。本研究では、この3種類のPD-Exo-miRの関節内環境での作用について明らかにし、PDシートの特性・有効性との関与の解明を目的とした。3種類のPD-Exo-miRは、関節内の軟骨、滑膜、免疫細胞等を標的として作用する可能性があり、炎症の抑制などによる関節内環境の改善や軟骨修復に寄与することで、PDシートの特性や有効性に関与してい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

我々が特定した3種類のPD-Exo-miRは、培養上清ExosomeよりPCR等で検出することができるため、細胞シート自体を犠牲にすることなく、作製したシートの特性・有効性の非侵襲的な事前評価指標として使用できる可能性がある。また、PD-Exo-miRはPDシートの特性や有効性の本質を反映している可能性が高いことから、OAKをはじめとする関節疾患に対する新たな治療薬として利用できる可能性がある。PD-Exo-miRによる低侵襲かつセルフリーなポイントオブケア治療につながる可能性があり、根治的な治療法のないIOAKをはじめとする関節疾患の新たな治療法となる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We have previously identified three types of miRNAs that are characteristically expressed in exosomes released by polydactyly-derived chondrocyte sheets (PD sheets), which have particularly high cartilage regeneration capacity. The aim of this study was to identify the actions of these three types of miRNAs in the intra-articular environment and to elucidate their involvement in the characteristics and efficacy of the PD sheet. The three miRNAs may act on cartilage, synovium, and immune cells to improve the intra-articular environment by suppressing inflammation and the release of catabolic factors.

研究分野：整形外科学

キーワード：Exosome 関節疾患 細胞シート 軟骨再生 再生医療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、変形性膝関節症(OAK)をはじめとする関節疾患に対する根治的な治療法の開発を目指し、多指症手術時廃棄組織由来軟骨細胞をセルソースとして用いた、軟骨細胞シート(PDシート)による再生医療研究を行ってきた。PDシートは、作用機序の一つとして自身がサイトカイン等の持続的供給源として働き、軟骨再生に寄与すると考えられている。また、軟骨細胞は培養や継代により脱分化し、軟骨形質を消失することが知られるため、PDシートを臨床で用いる際には、作製したシートの特性や有効性を事前に、非侵襲的に検査できることが望ましい。

(2) エクソソームはあらゆる細胞がエンドサイトーシス経路を介して形成し放出する直径約100nmの膜小胞体で、タンパク質や脂質、核酸等の、元の細胞に由来する様々な機能性分子を内包している。申請者はこれまでに、PDシートが培養液中に放出するエクソソームの中に特定のmiRNAが選択的に内包されていることを明らかにした。さらに、特に軟骨修復能の高いPDシートにおいて特徴的にエクソソーム内にパッケージングされるmiRNA(PD-Exo-miR)を3種類同定している。これらのmiRNAはPDシートの特性や有効性に関与する何らかの作用を有している可能性があるが、実際の機能については解明されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、3種類のPD-Exo-miRの関節内環境における作用を明らかにし、PDシートの特性・有効性との関与の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) PDシート放出エクソソームの標的細胞への取り込みの確認：

多指症由来軟骨細胞を培養し、既報に従ってPDシートを作成した。培養11日目に無血清培地に交換し、72時間後(培養開始14日目)のシート完成時に、培養上清の回収を行った。ExoQuick-TCを使用し、プロトコルに従ってエクソソームを抽出した。抽出したエクソソームをPKH67 Green Fluorescent Cell Linker Kitで染色したのち、Exosome Spin Columnsを用いて未反応色素の除去を行った。実験前日に8wellチャンバースライドに、 1×10^4 cells/wellでHuman Bone chondrosarcoma cell line SW1353もしくはhuman bone marrow-derived mesenchymal stem cells (hBM-MSC)を播種し、標識エクソソームを細胞に添加した。37°C遮光下で3時間インキュベートしたのち、培地を除き、4%PFAを添加して細胞を固定した。Alexa Fluor 594 Phalloidin Conjugateで細胞骨格を染色し、DAPI含封入剤でサンプルを封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

(2) PD-Exo-miRのターゲット遺伝子予測：

これまでの研究で同定したPD-Exo-miRのターゲット遺伝子を、以下の公的データベースを用いて検索した。4種類のデータベースを用いて、3種類以上のデータベースに共通して検出される遺伝子を、下記の条件で検索した。

Target scan (v.7.2)、cut off条件：Cumulative weighted context++ score > -0.1

Micro-T CDS (v.5)、cut off条件：miTGscore > 0.8

miRDB (v.6.0, MicroRNA Source: miRBase v22)、cut off条件：cut offなし

miRmap (v.1.1)、cut off条件：miRmap score > 90.0

(3) PD-Exo-miRの軟骨異化および炎症関連遺伝子に対するサイレンシング効果の検証：

PD-Exo-miRの標的細胞内での軟骨異化および炎症関連遺伝子に対する機能を調査した。Human Bone chondrosarcoma cell line SW1353 (n=4)もしくはHuman Synovial sarcoma cell line SW982 (n=4)に対し、各miRNAを単独もしくは3種類MixしてTransfectionした。細胞播種24時間後に、hsa-miR-1199-5p, 1246, 1290 mimic (mirVana™ miRNA Mimics)を、Lipofectamine™ RNAiMAX Transfection Reagentを用いてTransfectionした。その24時間後、Inflammation, Angiogenesis, Cartilage degradationなどを促進する既知の遺伝子の発現を惹起することを目的とし、IL-1bを添加した。さらに24時間後に、軟骨異化および炎症関連遺伝子の発現抑制効果をqPCRにより確認し、標的遺伝子を持たないNegative control miRNA mimicをTransfectionした群と比較した。

4. 研究成果

(1) PDシート放出エクソソームの標的細胞への取り込みの確認：

PDシートが放出したエクソソームは、軟骨細胞やhBM-MSC等に取り込まれることが示された。エクソソームは関節内に投与された場合、これらの細胞に取り込まれ、作用する可能性があることが明らかとなった。

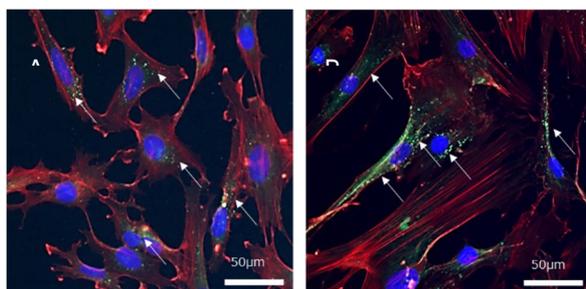
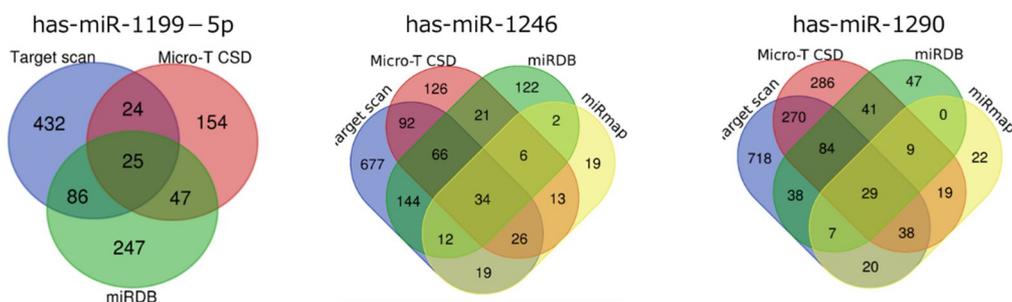


図 1. PKH67 で標識された PD シート放出エクソソームの標的細胞内への取り込み
(A) Human Bone chondrosarcoma cell line, (B) hBM-MSC

(2) PD-Exo-miR のターゲット遺伝子予測：

In silico 解析の結果、hsa-miR-1199-5p, 1246, 1290 は、それぞれ 25、34、29 個の遺伝子を抑制する可能性が高いことが示された (図 2)。また、これらの標的遺伝子候補の機能を調査したところ、など、関節内の炎症や軟骨変性の誘導に与ることが知られる遺伝子が散見された (表 1)。



hsa-miR-Aは、miRmapに登録がなかったため、3種類のデータベースにより解析を実施した。

図 2. *In silico* 解析による標的遺伝子の機能予測結果

表 1. 関節内の炎症や軟骨変性の誘導に関する報告がある遺伝子

| miRNA No. | 予測された標的遺伝子 | 文献において報告のある機能 |
|-----------------|------------|-------------------------|
| has-miR-1199-5p | Gene A | 炎症反応の誘導 |
| | Gene B | 軟骨変性の誘導と促進 |
| | Gene C | OA病態の促進 |
| | Gene D | 免疫細胞の調節 |
| has-miR-1246 | Gene E | 免疫細胞の調節 |
| | Gene F | 炎症反応の誘導 |
| | Gene G | 血管新生 |
| has-miR-1290 | Gene H | 免疫細胞の調節 |
| | | 軟骨のミネラル化・石灰化 OA病態に関与 |

(3) PD-Exo-miR の軟骨異化および炎症関連遺伝子に対するサイレンシング効果の検証：

hsa-miR-1199-5p は滑膜細胞における IL-1b, IL-6, TNFa の発現を有意に抑制した (表 2)。hsa-miR-1290 は軟骨細胞及び滑膜細胞における MMP3 の発現を有意に抑制した (表 2)。hsa-miR-1246, 1290 は、軟骨細胞における RUNX2 の発現を抑制した。hsa-miR-1199-5p, 1246, 1290 の 3 種の miRNA の組み合わせることにより、軟骨細胞における MMP3 に対する遺伝子のサイレンシングは、miRNA 単独の作用と比べ、増強される可能性が示された (表 2)。

表 2. PD-Exo-miR によって有意に発現が抑制された標的細胞内の遺伝子とその有意確率

| Target Cell | Gene | p-value | | |
|-------------|---------------|-----------------|--------------|--------------|
| | | hsa-miR-1199-5p | hsa-miR-1246 | hsa-miR-1290 |
| SW1353 | MMP-3 | | | 0.048 |
| | RUNX2 | | 0.001 | 0.009 |
| SW982 | MMP-3 | | | 0.003 |
| | IL-1 β | 0.009 | 0.002 | |
| | IL-6 | 0.023 | | |
| | TNF- α | 0.036 | | |

以上の結果より、3種類のPD-Exo-miRは、関節内の軟骨、滑膜、免疫細胞等を標的として作用する可能性があり、炎症の抑制などによる関節内環境の改善や軟骨修復に寄与することで、PDシートの特性や有効性に関与している可能性が示唆された。PD-Exo-miRは、培養上清 Exosome より PCR 等で検出することができるため、細胞シート自体を犠牲にすることなく、作製したシートの特性・有効性の非侵襲的な事前評価指標として使用できる可能性がある。

また、PD-Exo-miR は PD シートの特性や有効性の本質を反映している可能性が高いことから、OAK をはじめとする関節疾患に対する新たな治療薬として利用できる可能性がある。今後は PD-Exo-miR がサイレンシングする直接のターゲット遺伝子を特定することや、miRNA が Exosome カargo として取り込まれた際にも目的細胞へ同様の治療効果を示すことなどを明らかにし、PD-Exo-miR による低侵襲かつセルフリーなポイントオブケア治療確立に向けた研究を進めたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Maehara Miki, Toyoda Eriko, Takahashi Takumi, Watanabe Masahiko, Sato Masato | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 Potential of Exosomes for Diagnosis and Treatment of Joint Disease: Towards a Point-of-Care Therapy for Osteoarthritis of the Knee | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 2666 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22052666 | 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 - |

〔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 前原美樹、豊田恵利子、高橋匠、野中謙、飯島寛、的場亮、赤松正、渡辺雅彦、佐藤正人 |
| 2. 発表標題 多指症軟骨細胞シートの有効性に関するexosomal miRNAの機能の探索 |
| 3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 前原 美樹、豊田 恵利子、高橋 匠、岡田 恵里、渡部 綾子、内山 綾香、赤松 正、渡辺 雅彦、佐藤 正人 |
| 2. 発表標題 Exosomeを用いた関節治療の可能性－軟骨細胞シートの有効性に関するExosomal miRNAの探索－ |
| 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 M. Maehara, M. Sato, E. Toyoda, T. Takahashi, R. Uchiyama, R. Matoba, K. Nonaka, H. Iijima and M. Watanabe |
| 2. 発表標題 EXOSOMAL MIRNAS INVOLVED IN CARTILAGE REPAIR MECHANISM OF POLYDACTYLY-DERIVED CHONDROCYTE SHEETS |
| 3. 学会等名 2022 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--|------------------|-----------------|
| 産業財産権の名称 関節疾患の治療及び／又は予防のための剤及び医薬組成物 | 発明者 前原美樹、佐藤正人 | 権利者 学校法人東海大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-017120 | 出願年 2022年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|