

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22740

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来エクソソームの腱修復に関する分子細胞学的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular cytological mechanism by which mesenchymal stem cell-derived exosomes promote tendon repair

研究代表者

林 悠太 (Hayashi, Yuta)

広島大学・医系科学研究科(医)・寄附講座助教

研究者番号：20881296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：正常間葉系幹細胞由来の細胞外小胞は腱線維芽細胞への増殖促進能や遊走促進能を有することが明らかとなり、モデルマウスを用いた検証でもアキレス腱修復を促進することが明らかとなった。一方で老化した間葉系幹細胞由来の細胞外小胞は正常細胞由来のものと比較し、これらの修復促進能が低下していた。そこでレクチンアレイを用いて小胞表面の糖鎖を評価したところ、フコース特異的糖鎖であるTJA-Ⅱが正常細胞由来細胞外小胞で有意に高発現していた。つまり、表面糖鎖を指標として細胞外小胞の治療促進能が評価でき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

細胞外小胞の臨床応用へ向けての大きな課題が、細胞外小胞の組織修復促進能(いわゆる質)を評価する方法と、高い質を持つ細胞外小胞を単離する方法である。本研究では小胞表面の糖鎖を評価することで小胞の質を評価できる可能性を示唆した。本法は内容物ではなく小胞表面の糖鎖を測定することで質を直接評価する点に優位性がある。さらに糖鎖を利用したカラムなどを開発することで、効率的に高品質な細胞外小胞のみを単離できる方法を確立でき、細胞外小胞の臨床応用に向けて貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It was clarified that extracellular vesicles derived from normal mesenchymal stem cells have the ability to promote proliferation and migration to tendon fibroblasts, and verification using model mice also revealed that they promote Achilles tendon repair. On the other hand, extracellular vesicles derived from senescence mesenchymal stem cells had lower ability to promote repair than those derived from normal cells. Therefore, when the glycans on the surface of the vesicles were evaluated using a lectin array, TJA-II, which is a fucose-specific glycans, was significantly highly expressed in extracellular vesicles derived from normal cells. In other words, it was suggested that the quality of extracellular vesicles could be evaluated using surface glycans.

研究分野：整形外科

キーワード：間葉系幹細胞 細胞外小胞 腱修復 細胞老化 糖鎖

1. 研究開始当初の背景

腱損傷はスポーツ外傷の一つであるアキレス腱断裂、膝蓋腱断裂や、加齢性の関節変形に起因する手指伸筋腱断裂、外傷性手指屈筋腱断裂など、患者年齢や受傷機転は多岐にわたる、非常に頻度の多い運動器疾患である。治療はギプス等による外固定と、腱縫合等による手術に大別される。腱損傷治療の主な合併症は修復腱の初期強度不足による再断裂、腱の異所性骨化や腱と周囲組織間の癒着である。再断裂を起こした腱は初回手術より侵襲度や難易度の高い手術を必要とする。一方再断裂を避けるため長期間固定を行うと腱の癒着を生じ、十分な可動域が得られず機能障害が遺残することがある。この相反する二つの合併症を克服するため、無理な力がかからないよう細心の注意を払いながらできるだけ早期にリハビリテーションを開始することが必要となる。その結果、腱損傷治療は長期のリハビリテーション入院を必要とし、多くのコストを必要とするだけでなく多大な社会的損失を生み出している。そのため、腱の修復を促進させるような革新的な治療が望まれている。

近年、幹細胞が分泌する液性因子の中の細胞外小胞が、新たな組織再生因子として注目されている。細胞外小胞にはサイトカインなどのタンパクに加えて micro RNA や messenger RNA などの核酸が内包されており、細胞間の情報伝達因子と考えられている。これまでに幹細胞由来の細胞外小胞による肝臓、腎臓、血管修復促進効果が報告されており、運動器領域でも骨癒合促進や軟骨修復促進効果が報告されている。申請者らもこれまで間葉系幹細胞由来の細胞外小胞による骨癒合促進効果や筋修復促進効果を報告し、さらに標的 micro RNA の内包化技術に関して報告してきた。

臨床応用に向けては、これまでに MSC 移植治療が様々な疾患に対して効果を示しているが、一方で使用する MSC によって治療効果 (MSC の質) がばらつくことが問題となっており、MSC 表面に発現している糖鎖を指標とすることで修復能を評価できる方法が報告された (*Glycobiology, 2006*)。細胞外小胞の臨床応用に関しても同様に質を評価する方法が必要とされている。

2. 研究の目的

本研究は間葉系幹細胞由来の細胞外小胞が腱修復を促進するか、そして老化した幹細胞由来の細胞外小胞も同様に腱修復を促進するか、さらに腱修復促進効果の違いを小胞表面の糖鎖発現で評価できるか、を目的とした。

3. 研究の方法

ヒト間葉系幹細胞 (MSC) の継代数 5 (P5 MSC)、継代数 12 (P12 MSC) とそれぞれから超遠心法により回収した細胞外小胞 (P5 EV, P12 EV) を使用した。まず使用した MSC の性質を確認後、MSC-EV) の粒子数と粒子径を測定した。マウス尾腱、アキレス腱、膝蓋腱から採取した腱線維芽細胞を使用して、腱線維芽細胞への細胞外小胞の取り込み、腱線維芽細胞の遊走試験、増殖試験を行った。さらにマウスアキレス腱切離モデルを使用して細胞外小胞の腱修復促進能を評価した。

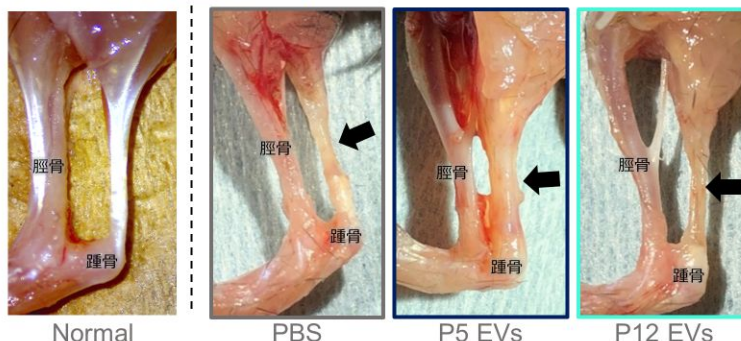
最後に、それぞれの MSC と EV の表面に発現している糖鎖パターンを評価し、EV の組織修復促進能との関連性を調査した。

4. 研究成果

はじめに P5 MSC と P12 MSC の特性を調べたところ、P12 MSC は P5 MSC と比較して増殖能が低下していた。さらに細胞老化試験を行った結果、SA-gal 陽性細胞を P12 MSC で多く認め、老化マーカーである CKDN1aA、CKDN2A の発現が多かった。以上より P12 MSC は細胞老化が進んだ細胞であることが明らかになった。

そこで正常細胞である P5 MSC と老化細胞である P12 MSC から分泌される EV を調べたところ、分泌された粒子数や粒子径に差はなかった。さらに、腱線維芽細胞への取り込み効率も、両 EV で差はなかった。以上より正常細胞と老化細胞で分泌される EV と、腱線維芽細胞への取り込みに差が無いことが明らかになったが、取り込まれた後の機能に差があるかを確かめるため、腱線維芽細胞に P5 EV と P12 EV をそれぞれ添加したところ、P5 EV は腱線維芽細胞への増殖促進能と遊走促進能があることが明らか

肉眼所見 (術後4W)



になった。一方で P12 EV はそれらの促進能が低下していた。

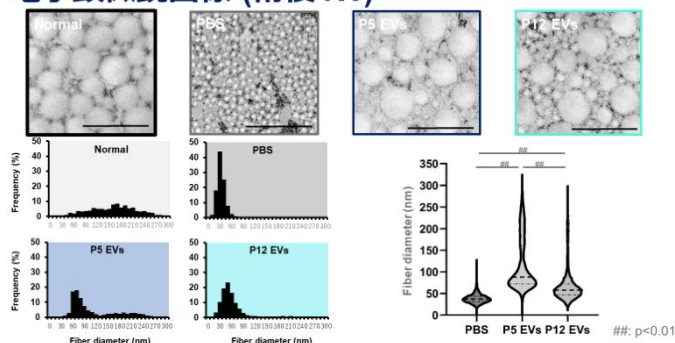
以上より、EV は細胞増殖能、遊走能を促進することで腱修復を促進することが示唆されたが、実際に腱修復を促進するのか、マウスアキレス腱切離モデルを用いて検証した。アキレス腱切離翌日に、切離部に P5 EV、P12 EV、P5 MSC、P12 MSC と対象群として PBS を経皮的に局所注射し、さらに切離後 1 週で再投与を行った。その結果、P5 MSC、P5 EV 投与群は切離後 4 週で外観上太

い組織で修復されていた。さらに切離後 1 週では組織染色でコラーゲン沈着量が多く、切離後 4 週の組織染色による腱修復スコアも有意に高かった。一方で修復組織周囲の軟骨化は抑制されていた。さらに詳細な評価をすべく切離後 4 週で透過型電子顕微鏡による修復組織評価を行ったところ、より太い線維で修復されていることが明らかになった。一方で P12 MSC、P12 EV 投与群はこれらの修復が進んでいなかっただけでなく、修復組織周囲の軟骨化も抑制できていなかった。以上より、正常細胞 (P5 MSC) とそこから分泌される細胞外小胞 (P5 EV) は軟骨化抑制を含めた良好なアキレス腱修復を促進するが、老化細胞 (P12 MSC) と細胞外小胞 (P12 EV) は修復促進能が低下していることが明らかになった。

最後に、これらの組織修復能の差を評価できないか、使用した P5 MSC、P12 MSC、P5 EV、P12 EV の表面糖鎖をレクチンアレイにより評価した。その結果、継代数に比例して発現量が変化する糖鎖 (TJA-) があることが明らかになった。一方で P5 MSC と P5 EV、P12 MSC と P12 EV では糖鎖発現パターンが異なることが明らかになった。つまり、EV の質を評価するには分泌元の細胞ではなく、糖鎖そのものを評価する必要性が示唆された。

以上の結果から、骨髄間葉系幹細胞由来の細胞外小胞は腱修復を促進するが、一方で老化した骨髄間葉系幹細胞由来の細胞外小胞は修復促進能が低下していることが明らかとなり、その修復促進能 (いわゆる質) は細胞外小胞表面に発現している糖鎖で評価することができる可能性が示唆された。

電子顕微鏡画像 (術後4W)



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 0件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yuta Hayashi, Dilimulati Yimiti, Yohei Sanada, Chenyang Ding, Takenori Omoto, Toshihiko Ogura, Tomoyuki Nakasa, Masakazu Ishikawa, Keiko Hiemori, Hiroaki Tateno, Shigeru Miyaki, Nobuo Adachi | 4. 巻 596 |
| 2. 論文標題 The therapeutic capacity of bone marrow MSC-derived extracellular vesicles in Achilles tendon healing is passage-dependent and indicated by specific glycans | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 FEBS letters | 6. 最初と最後の頁 1047/1058 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.14333. | 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 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 林悠太、味八木茂、眞田洋平、館野博明、亀井直輔、石川正和、中佐智幸、安達伸生 |
| 2. 発表標題 MSC由来エクソソームによるアキレス腱修復促進効果と、エクソソームの品質による修復促進効果の違い |
| 3. 学会等名 第19回 日本再生医療学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuta Hayashi, Shigeru Miyaki, Youhei Sanada, Hiroaki Tateno, Naosuke Kamei, Masakazu Ishikawa, Tomoyuki Nakasa, Nobuo Adachi |
| 2. 発表標題 Mesenchymal stem cells-derived exosomes in Achilles tendon repair and its quality evaluation by glycan epitopes |
| 3. 学会等名 Orthopaedic Research Society（国際学会） |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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