

平成30年6月18日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04959

研究課題名(和文)新規情報伝達因子エクソソームによる変形性関節症治療と診断への展開とその機能解析

研究課題名(英文) Analysis of novel communication factor exosomes for the treatment and diagnosis of osteoarthritis

研究代表者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院(医)・講師

研究者番号：10392490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、変形性関節症(OA)におけるmicroRNA(miRNA)を含むエクソソームに注目した。OAモデルマウスへの目的miRNAを過剰導入したMSCエクソソームの投与は、OA抑制効果を示した。また、間葉系幹細胞、軟骨細胞(正常とOA)細胞およびエクソソーム中のmiRNAプロファイルや糖鎖は、細胞種および正常と疾患由来で顕著な違いが認められた。そして、正常軟骨細胞内で高発現および高分泌している数種のmiRNAは、OA軟骨細胞内および分泌型miRNAとしても低下していた。さらに、この軟骨細胞より分泌しているエクソソームは、関節組織を構成している細胞に影響を及ぼすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study has focused on novel communication factor exosomes including microRNA(miRNA) in osteoarthritis(OA). We performed miRNA expression profiling in chondrocytes and exosomes using mesenchymal stem cells(MSC), normal- and OA-derived chondrocytes, and also performed glycan profiling using these samples. Several miRNAs were highly expressed in normal chondrocytes and chondrocytes-derived exosomes. These miRNAs were decreased in OA chondrocytes and OA chondrocytes-derived exosomes. Furthermore, MSC-derived exosome-formed miRNA reduced severity of OA in OA model mice. Thus, we newly generated these miRNAs knockout and cartilage specific transgenic mice. To examine the effects of chondrocytes-derived exosomes, pre-osteoclasts, pre-osteoblasts and pre-adipocytes were treated with chondrocytes-derived exosomes. Chondrocytes-derived exosomes inhibited osteoclastogenesis. These data suggest that exosomes including miRNA may play an important role in the pathogenesis and treatment of OA.

研究分野：整形外科学

キーワード：変形性関節症 エクソソーム マイクロRNA 軟骨細胞 糖鎖

## 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症(OA)は、我が国でもその患者数は約1-2000万人ともいわれている一般的な疾患である。OAは、主に加齢、メカニカルストレスの蓄積、肥満、炎症といった様々な因子による関節環境の変化から軟骨代謝バランスの破綻をきたし、関節軟骨の変性・破壊を引き起こす。しかし、現在までOAに対する原因療法や早期診断法の確立には至っていない。これらの問題を解決するためには、OA発症の分子機構をより明らかにすることで、新たなOA治療法や早期診断法の開発につながる標的分子を解明していくことが必要である。研究代表者は、遺伝子発現の新たな制御分子としてmicroRNA(miRNA)に注目し研究を行っている。全ゲノム中でタンパク質をコードする領域はわずか数%であり、これまでは“がらくた”と考えられてきたmiRNAなどのノンコーディングRNAが、組織や疾患特異的な発現様式を示し、発生から疾患まで生命現象に深く関与することが明らかになってきた。これまでに研究代表者は、関節炎における滑膜や軟骨で発現が亢進しているmiR-146を報告した(Nakasa T, Miyaki S et al. *Arthritis Rheum*, 2008, Yamasaki K et al. *Arthritis Rheum* 2009)。そして、miR-146は間葉系幹細胞(MSC)に比べ軟骨特異的に高発現しており、正常軟骨に比べ、OA患者の軟骨でその発現が低下していること(Miyaki S et al. *Arthritis Rheum*, 2009)、そして、軟骨特異的遺伝子と同じようにSox9、Sox5、Sox6によってその発現が制御されていることを明らかにした(Yamashita S, Miyaki S et al. *JBC*, 2012)。これらの結果をもとに、miR-146の遺伝子改変マウスを作製し解析したところ、miR-146が軟骨破壊の重要な軟骨基質分解酵素を標的とし、関節軟骨の恒常性を制御することで、OA発症に関与していることを明らかにした(Miyaki S et al. *Gene Dev*, 2010)。しかし、miRNAなどによるOA発症機構は未だ理解された訳ではなく、その治療への応用においても、軟骨は無血管であり、豊富な細胞外基質に覆われていることからmiRNAの補充療法は、軟骨細胞内へのデリバリーの問題などが予想される。

これまでmiRNAは、細胞内で機能し、速やかに分解されると考えられていた。しかし、最近miRNAは、エクソソームといったエンドソーム由来の小胞顆粒に包まれ細胞外に分泌し、血清など様々な体液中に存在していることが明らかになってきた。そして、興味深いことに細胞より分泌されたmiRNAは、標的細胞内へと移動し、標的遺伝子の発現を制御することで細胞機能に関与していることが報告された。このことは、分泌miRNAが細胞間、組織間を行きかい相互作用するサイトカインのような機能があると考えられる。ある種のmiRNAは、がんやリウマチ患者の血清中で高発現していることから診断マーカーとしての可能性も示されている。また、幹細胞移植治療による効果は、目的細胞への分化というよりも幹細胞から放出されるサイトカインのような分泌因子による効果が大きいといった報告があり、組

織再生・修復にもエクソソームが関与していることが考えられる。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、IL-1 $\beta$ 刺激は、ヒト滑膜細胞におけるエクソソームの分泌数を増加させ、そのエクソソームは、軟骨細胞に対してOA様変化を誘導することや血管新生を促進させることを明らかにした。そして、このエクソソーム中に含まれているmiRNAは、IL-1 $\beta$ 刺激によりそのプロファイルが変化していることを示した(Kato T, Miyaki S et al. *Arthritis Res Ther*, 2014)。これらのデータは、研究代表者の仮説である「miRNAを含むエクソソームは、疾患特異的なプロファイルにより特徴づけることができ、関節組織間ネットワークの新たなコミュニケーション因子としてOA発症に関与する」の一部を支持するものである。また、MSCに過剰導入された合成miRNAは、エクソソームフォームとして培養上清中に分泌させることができ、添加するだけで容易にしかも細胞毒性なく他細胞に取込まれ機能することからmiRNAなどのキャリアとして応用できることを示した(Shinbo K, Miyaki S et al. *BBRC*, 2014)。そこで本研究は、以下の課題を明らかにすることを目的とする。

- (1) microRNAを含むエクソソーム利用したOA治療効果の検討
- (2) microRNAを含むエクソソームに注目したOA診断マーカーの探索
- (3) OA由来エクソソームの性質およびその機能の解明

## 3. 研究の方法

(1) miRNAを含むエクソソームを利用したOA治療効果の検討  
研究代表者は、これまでの研究から軟骨におけるmiR-146の発現維持はOA進行を抑制することを示した(*Arthritis Rheum* 2009, *Gene Dev*, 2010)。また、MSCに過剰導入された合成miRNAは、エクソソームフォームとして培養上清中に分泌させることができ、容易に細胞に取込まれ機能することを示した(*BBRC*, 2014)。MSCの関節内投与は、軟骨損傷などに対して修復促進効果を示す多くの報告があり、miRNA以外にも効果のある様々な分子を分泌していると考えられることから本研究においてもエクソソームを放出させる細胞としてMSCを用いた。

① miR-146導入によるMSCより分泌するサイトカインや分泌miRNAへの影響  
エクソソームフォームmiR-146による直接的なOA抑制効果なのかMSCにmiR-146を導入したことによるサイトカインやその他のmiRNAの分泌量やパターン変化によるのかを明らかにするために、MSCに合成miR-146およびコントロールmiRNAをリポフェクション法により50 nM, 100 nM導入し、24時間後に培養上清から超遠心法によりmiR-146を含むエクソソームを精製する。

培養上清およびエクソソーム中のサイトカインは、Proteome profiler (R&D) および BioPlex システム (BioRad) により網羅的に測定する。エクソソーム中の miRNA プロファイリングは、我々がすでに報告している nCounter システム (NanoString) を用いて解析する。

## ② 関節内投与した miRNA を含むエクソソームの関節組織中の局在解析

投与したエクソソームがどこで機能しているのかを明らかにするために、その局在を解析する。TAMRA 蛍光標識した合成 miR-140 と PKH67 Green (Sigma) 蛍光色素で標識したエクソソーム (すなわち miR-140 を赤、それを包んでいるエクソソームを緑で標識) を膝関節内に投与する。1 日後膝関節を採取し、川本法による非脱灰凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡により観察することでエクソソームフォーム miR-140 の膝関節内での局在を決定する。

## ③ エクソソームフォーム miR-140 による OA 抑制効果の決定

靭帯切除モデルがマウス OA モデルとして汎用され確立されているが、二次性 OA モデルであることや発症程度が一定でないことなどから治療効果を正確に評価するのに問題もある。そこで、老化促進マウスが一次性 OA モデルとして、そして治療効果を正確に評価するのに有用なマウスであるかを調べた。そして、このモデルマウスにエクソソームフォームの miR-140 を週一回膝関節内に投与し、サフラニン O 染色により膝関節を病理組織学的に解析し、OARSI 評価法による OA スコアや滑膜スコア、軟骨下骨の評価により OA の程度を評価することで、エクソソームフォーム miR-140 の OA 治療効果を決定する。

## (2) miRNA を含むエクソソームに注目した OA 診断マーカーの探索

### ① エクソソーム表面タンパク質あるいは糖脂質の糖鎖修飾の解析

エクソソームは、分泌された細胞を反映していると考えられている。そこで、ヒト MSC、ヒト軟骨細胞やヒト滑膜細胞およびそれら由来エクソソーム表面の糖鎖プロファイリングを行った。このことより、正常と OA サンプル由来の細胞およびエクソソームについて解析を行うことで糖鎖を指標としてエクソソームの由来が決定できるのか、正常と疾患の状態の違いがあるのかを明らかにする。

### ② 軟骨細胞由来エクソソームに含む miRNA プロファイルの解析

MSC、正常軟骨、OA 軟骨細胞およびこれら細胞由来エクソソームの収集と miRNA プロファイルの解析を実施した。

### (3) 軟骨細胞由来エクソソームの性質およびその機能の解明

#### ① 軟骨細胞由来エクソソームの性質および機

能

培養軟骨細胞の培養上清を用いて超遠心法によりエクソソームを分離する過程で、前遠心層と超遠心後の上清とエクソソーム層の3層をウェスタンブロットによりエクソソームマーカーを検出した。また、各々の層の機能を前破骨細胞と前骨芽細胞、前脂肪細胞系の分化誘導系における影響を調べた。

## ② CRISPR/Cas9 技術による miRNA ノックアウトマウスの作製

注目した miRNA についてノックアウトを作製する。また、エクソソームが機能するのはやはり miRNA が重要なのかを検討するために miRNA の生成に重要な酵素である Dicer に注目し、軟骨特異的誘導性 Dicer KO を作製し、このマウスの培養軟骨細胞由来エクソソームを用いて解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) miRNA を含むエクソソームを利用した OA 治療効果の検討

MSC 由来エクソソームは、骨折モデルマウスの治癒を促進することが示された。MSC エクソソームによる治癒促進のメカニズムの一つとして、骨折治癒関連サイトカインとして知られている SDF-1 や MCP-1 などはエクソソーム中に低濃度であるにも関わらず治癒促進効果がみられたことから、サイトカインだけでなく、miRNA の関与が示唆された (*Stem Cells Transl Med*, 2016)。これらの結果から、組織修復・再生には、miRNA を含むエクソソームが新たな組織再生因子として重要であることが示された。そこで、miR-140 は関節軟骨の恒常性を維持し、OA 発症に関与していることを明らかにしたので、MSC に miR-140 を導入後培養液中にエクソソーム型として分泌された miR-140 が、OA 治療に対して効果があるかを検討した。その結果、このエクソソームは miR-140 を豊富に含んでおり、miR-140 導入によるエクソソーム中のサイトカインには変化はなかった。そして、このエクソソームは、培養軟骨細胞に添加することで容易に細胞内に導入された。さらに、老化促進マウスへのエクソソーム投与による効果を検討した。老化促進マウスの 3, 4, 6, 7.5 ヶ月齢の両膝関節を組織学的に観察した結果、特に内側で6週齢より軟骨下骨の変化、そして、4ヶ月齢から軽微な軟骨変性が観察され、6, 7.5ヶ月齢と加齢にともない軟骨破壊を伴う重篤な OA を発症していた。それゆえ、老化促進マウスは、OA 自然発症マウスモデルとして有用であることが明らかになった(投稿準備中)。軟骨下骨の評価のためにサフラニン O 染色による新たなスコアリングシステムも開発した(投稿準備中)。この 5 ヶ月齢マウスへエクソソーム-miR-140、エクソソーム-Control miRNA、PBS 各々の膝関節内投与による OA 抑制効果を検討した結果、エクソソーム-Control miRNA や PBS に比べてエクソソーム-miR-140 投与群は、有意に OA 抑制効果を示した。この結果、miR-140 を豊富に含むエクソソームをマウス OA モデルの膝関節に投

与することで OA 進行を抑制する可能性が示された(投稿準備中)。しかし、投与したエクソソーム型 miRNA が関節組織のどこに導入されたのかは検出することは難しく、関節組織中のどの細胞に導入された結果なのかの詳細を明らかにすることはできなかった。

(2) miRNA を含むエクソソームに注目した OA 診断マーカーの探索

細胞種および正常と OA 由来のエクソソームで顕著な違いのある糖鎖が認められた。今後、さらなる糖鎖解析を通じて由来細胞および疾患特異的なエクソソームの同定・濃縮を試みることでエクソソームの機能をより明らかにする可能性を示唆するデータであった。また、間葉系幹細胞、正常軟骨、OA 軟骨細胞およびこれら細胞由来エクソソームの収集と miRNA プロファイルの解析を実施した。間葉系幹細胞、軟骨細胞(正常と OA)、滑膜細胞(正常と OA)およびそれら細胞由来のエクソソーム中における miRNA プロファイルは、多くの共通している miRNA が存在していたが、細胞による違いなど特徴的な miRNA がエクソソーム中に存在していた。

(3) 軟骨細胞由来エクソソームの性質およびその機能の解明

超遠心法により分離する過程で、前遠心層と超遠心後の上清とエクソソーム層の3層をウェスタンブロットによりエクソソームマーカーを検出したところ、10万 G で遠心した層でより多くのエクソソームマーカーが認められた。しかし、miRNA は各層で検出された。正常関節軟骨細胞内で高発現および高分泌している数種の miRNA に注目したところ、これら miRNA は OA 関節軟骨細胞内において発現が低下し、分泌型 miRNA としても低下していた。さらに、この軟骨細胞より分泌しているエクソソームは、関節組織を構成している細胞に影響を及ぼすことが明らかになったので、軟骨細胞由来エクソソームに豊富に存在する2種類の miRNA についてノックアウトマウスの作製および解析を行った。これらノックアウトマウス由来の関節軟骨細胞では細胞内および分泌型 miRNA ノックアウトされていることが確認された。現在、これらマウスの解析を続けている。また、エクソソームが機能するのはやはり miRNA が重要なのかを検討するために軟骨特異的誘導性 Dicer KO を作製し、このマウス由来軟骨細胞由来のエクソソームを用いても実験を継続している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Ishitobi H, Sanada Y, Kato Y, Ikuta Y, Shibata S, Yamasaki S, Lotz MK, Matsubara K, Miyaki S, Adachi N. Carnosic acid attenuates cartilage degeneration through induction of

heme oxygenase-1 in human articular chondrocytes. *Eur J Pharmacol.* 830, 1-8, 2018. doi: 10.1016/j.ejphar.2018.04.018.査読有

- ② Miyaki S, Lotz MK. Extracellular vesicles in cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 1, 129-135, 2018. doi: 10.1097/BOR.0000000000000454.査読有
- ③ Furuta T, Miyaki S, Ishitobi H, Ogura T, Kato Y, Kamei N, Miyado K, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote fracture healing in a mouse model. *Stem Cells Transl Med.* (12):1620-1630, 2016. 査読有
- ④ Sumiyoshi N, Ishitobi H, Miyaki S, Miyado K, Adachi N, Ochi M. The role of tetraspanin CD9 in osteoarthritis using three different mouse models. *Biomed Res.* 37(5):283-291, 2016. 査読有

- ⑤ 味八木 茂 制御因子からみた軟骨変性機構  
変形性関節症の診断と治療 別冊整形外科 67, 2-7, 2015. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

- ① Sanada Y, Miyaki S, Adachi N. Articular chondrocytes-derived EVs regulate osteoclastogenesis, but not osteogenesis. International Society for Extracellular Vesicles, 3-6 May. 2018. Barcelona, Spain.
- ② Sanada Y, Miyaki S, Ikuta Y, Ishitobi H, Shinohara M, Nagira K, Ishikawa M, Nakasa T, Matsubara K, Lotz MK, Adachi N. Senescence accelerated mice as a new mouse model for spontaneous osteoarthritis. Osteoarthritis Research Society International, 26-29 Apr. 2018. Liverpool, UK.
- ③ Nagira K, Miyaki S, Ikuta Y, Lotz MK. Histological scoring system for periarticular bone changes in mouse models of osteoarthritis. Osteoarthritis Research Society International, 26-29 Apr. 2018. Liverpool, UK.

- ④ 味八木 茂  
「OA 治療標的分子としての HO-1 と microRNA の可能性」第 31 回日本整形外科基礎学術集会 シンポジウム 福岡国際会議場(福岡市) 2016 年 10 月 13-14 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計0件）

6. 研究組織

(1)研究代表者

味八木 茂 (MIYAKI, Shigeru)

広島大学・病院・講師

研究者番号：10392490

(2)研究分担者

加藤 義雄 (KATO, Yoshio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命  
工学領域・主任研究員

研究者番号：20415657

石川 正和 (ISHIKAWA, masakazu)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・助教

研究者番号：60372158