

令和元年5月30日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05455

研究課題名(和文)網羅的タンパク質解析法を用いた硝子軟骨再生因子の同定

研究課題名(英文)A comprehensive proteomic analysis for the Identification of factors contributing to hyaline cartilage regeneration

研究代表者

佐藤 正人 (SATO, Masato)

東海大学・医学部・教授

研究者番号：10056335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：軟骨細胞シートが硝子軟骨を再生させるメカニズムと軟骨同化作用に寄与する因子の探索を行い、培養条件の異なる軟骨細胞シートで軟骨修復作用と連動して変動する因子をタンパク質解析(SOMAscan)で26因子同定した。修復作用が低下する細胞シート作製条件下での遺伝子発現、産生量の変化等を解析し、Wntシグナル抑制因子、炎症反応制御因子、増殖因子で、軟骨修復作用と関連した変化を示すものを確認した。また、培養上清中のエクソソーム中のmiRNAをマイクロアレイで解析し、軟骨修復作用と連動して変動するmiRNAを抽出した。RT-PCRによる検証から4つのmiRNAが軟骨修復作用と連動することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨細胞シートは、損傷した軟骨からのプロテオグリカンの流出の阻止や、関節液中の軟骨分解因子からの軟骨の保護に働き、軟骨成長因子の持続的な供給や、軟骨下骨から誘導される骨髄由来幹細胞に対する軟骨分化促進イニシエーターとしての機能等を介して軟骨修復を促進していると考えられるが、これらの作用にかかわる因子やメカニズムについては不明な点も多い。

自然には修復しない関節軟骨の再生に有用な因子の一端を明らかにした本研究成果は、軟骨細胞シートが軟骨修復を促進するメカニズムの解明に繋がるものである。

研究成果の概要(英文)：To identify the mechanisms and anabolic factors that contribute to the hyaline cartilage regenerative properties of chondrocyte sheets, we performed a proteomic analysis (SOMAscan) of factors that vary in correlation with the cartilage regenerative properties of chondrocyte sheets fabricated under different culture conditions and identified 26 such factors. Through the analysis of the change in levels of gene expression and secreted factors of chondrocyte sheets with varying cartilage regenerative properties, regulators of Wnt signaling, regulators of inflammation, and growth factors were found to correlate with the cartilage regenerative properties. Furthermore, through the microarray analysis of exosomal miRNAs in culture supernatants, miRNAs that correlate with the cartilage regenerative properties were identified. Validation through RT-PCR revealed 4 such miRNAs.

研究分野：整形外科学

キーワード：タンパク質 miRNA マイクロアレイ解析 細胞シート

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は、従来修復困難と考えられてきた関節軟骨部分損傷（軟骨下骨に達しない軟骨内損傷）に対して、温度応答性培養皿で作製した積層化軟骨細胞シートによる関節軟骨修復再生効果を明らかにし、これを基にヒト幹細胞臨床研究を行った。自己の膝軟骨から作製した細胞シートを軟骨損傷を有した変形性膝関節症の患者8名に移植し、術後1年の生検による組織学的検査により細胞シート移植部に硝子軟骨の再生を確認した。従来の関節軟骨損傷治療では、損傷部は癒痕組織か線維軟骨で置換されてしまうが、長期的に潤滑性、粘弾性が劣るため、予後問題となることが多い。これに対し、細胞シートによる関節治療では硝子軟骨による再生が確認されており、優れた治療法であることが示された。しかしながら、自己の軟骨組織を用いた細胞シートの作製では、オーダーメイド医療となるため一般的な治療法としての普及には問題点が多い。そこで、細胞シートによる関節軟骨の修復・再生を、同種細胞を用いてレディメイドな方法として実現するために、多指症由来軟骨から作製した同種細胞シートを用いて臨床研究を実施している。

(2) 軟骨細胞シートは、損傷した軟骨からのプロテオグリカンの流出の阻止や、関節液中のカタボリックファクターからの軟骨の保護に働き、TGF- $\beta$ をはじめとした軟骨成長因子の持続的な供給や、軟骨下骨から誘導される骨髄由来幹細胞に対する軟骨分化促進イニシエーターとしての機能等を介して軟骨修復を促進していると考えられるが、これらの作用にかかわる因子やメカニズムについては不明な点も多い。

(3) 成人の膝軟骨細胞から作製された細胞シートの機能を代替するためには、成人膝軟骨細胞シートが軟骨修復を促進するメカニズムを明らかにし、同種細胞シートに必要な機能を同定する必要がある。また、細胞シートの軟骨修復メカニズムを明らかにすることで、自然には修復しないといわれている関節軟骨の再生に有用な因子の同定が期待できる。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞シートが硝子軟骨を再生させるメカニズムとパラクライン効果に寄与する因子を同定することを最終目的とし、本研究期間において以下を明らかにする。

- (1) 成人膝軟骨細胞シート、多指症由来軟骨細胞シートの有効性評価を異種同所性移植モデルにより実施し、細胞シートの有効性が低下する培養条件や原料細胞ドナー等を明らかにする。
- (2) 動物モデルにおける有効性評価で優劣を示した細胞シートの培養上清中の因子について、網羅的な解析を行い、有効性と関連した変動を示す因子を同定する。
- (3) 同定された因子について、軟骨修復・再生メカニズムへの関与を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞シートの作製と培養上清の収集

人工関節置換術廃棄組織由来軟骨細胞、多指症由来軟骨細胞等から温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製し、培養上清を収集する。人工関節置換術時の廃棄組織から得られる軟骨細胞から作製した細胞シートは、臨床研究で硝子軟骨再生作用を示した軟骨細胞シートとほぼ等しい特性を持つと考えられる。一方、これまでに多指症由来軟骨細胞から作製したシートは、培養条件やドナーにより特性が異なり、家兎軟骨損傷モデルで軟骨損傷に対する効果にも差が認められている。硝子軟骨再生作用を示す細胞シートとその作用を示さない細胞シートの培養上清を各6例以上収集することを目標とする。硝子軟骨再生作用を示す細胞シートで特徴的に産生されている因子を同定することが可能となる。

#### (2) 家兎軟骨全層欠損モデルにおける各細胞シートの軟骨修復作用の検討

(1)で作製した人工関節置換術廃棄組織由来軟骨細胞、多指症由来軟骨細胞等から作製した細胞シートを、免疫抑制剤投与下で家兎軟骨全層欠損モデル（直径5mm、深さ3mmの自然修復しない大きさの骨軟骨欠損を作製する）に移植し、軟骨損傷修復作用を確認する。有効性の評価としては、患肢荷重配分比の推移、ICRS grading systemによる組織学的評価を行う。このモデルでin vivoにおける軟骨修復促進作用を評価するとともに、(1)で収集する培養上清中の因子との関連を解析する。

#### (3) 細胞シート培養上清中因子のアプタマー法による網羅的解析

SOMAscanは1000種類以上のタンパク質濃度を網羅的に解析するアプタマーアレイである。これを用いて細胞シートの培養上清中のタンパク質を網羅的に解析し、硝子軟骨再生作用が優れた細胞シートとその作用が劣る細胞シート間で培養上清中の量に有意な差が認められるタンパク質因子を抽出する。

#### (4) 細胞シートの培養上清中エクソソーム含有 miRNA のマイクロアレイ解析

軟骨細胞シートの培養上清中のエクソソームから miRNA の抽出を行い、マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。硝子軟骨再生作用を示す細胞シートとその作用を示さない細胞シートの miRNA 発現を比較解析することで、硝子軟骨再生作用を示す細胞シートで特徴的に分泌されているエクソソーム含有 miRNA を同定する。

(5) SOMAscan により軟骨再生作用を示す細胞シートに特徴的に見出されたタンパク質について、産生量を確認し、軟骨保護作用や軟骨分化誘導作用を解析し、細胞シートの作用メカニズムに重要な因子の解明を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) 臨床研究でヒトにおける関節軟骨の修復が認められた軟骨細胞シートと、ほぼ同等の特性を持つと考えられる人工関節置換術時に採取される軟骨細胞から作製された軟骨細胞シート (TKA シート) は、同所性異種移植モデルによる軟骨修復能が確認された。(Takahashi T et al. J Tissue Eng Regen Med. 2018) 同モデルにおいて、多指症由来軟骨から作製した軟骨細胞シート (PD シート) は、PD シートは特定の因子を含む培地を用いて作製した場合、細胞シートの表面マーカーや細胞数、遺伝子発現の変化とともに、軟骨修復作用が低下することが明らかとなった。また、軟骨修復作用が低いドナーを同定した。

(2) 同所性異種移植モデルにより軟骨修復能が確認された TKA シートおよび PD シートについて、分泌する因子のアプタマー法による網羅的解析 (SOMAscan) を実施し、軟骨分化に関与すると推定される GO:Cartilage development にアノテーションされるタンパク質 236 個では、39 個が SOMAscan で解析可能であり、CTGF、TGFBI、GREM1、GDF5、PTHLH、WNT7A、MMP13 は共通してほぼ同等の産生量であることが示唆された。一方、sFRP、BMP10、bFGF が TKA 細胞シートで有意に高く、PD シートでは DKK1 などの Wnt シグナル抑制因子の産生が示唆された。

(3) 培養条件の異なる PD シートで軟骨修復作用と連動して変動する因子を SOMAscan による解析で 26 因子同定した。これらの中から GO:Cartilage development に含まれるたんぱく質の他、関連が未知の因子についても ELISA 法により上清中への産生量を確認した。細胞シートからの産生が確認できた因子について、修復作用が低下する細胞シートの作製条件下での mRNA の発現変化、産生量の変化等を解析した結果、Wnt シグナル抑制因子、炎症反応制御にかかわる因子、増殖因子に、軟骨修復作用と関連した変化を示すものを確認した。

(4) 培養条件の異なる PD シートの培養上清中のエクソソーム中の miRNA をマイクロアレイで解析し、軟骨修復作用と連動して変動する miRNA を抽出した。軟骨修復作用を認めた細胞シートのエクソソームに特徴的な miRNA の予測標的遺伝子は、カドヘリンシグナル経路と Wnt シグナル経路の遺伝子が含まれ、これらの経路を修飾する可能性が考えられた。変動をみとめた miRNA のバリデーションを行い、4 つの miRNA が軟骨修復作用と連動することを確認した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sato M, Yamato M, Mitani G, Takagaki T, Hamahashi K, Nakamura Y, Ishihara M, Matoba R, Kobayashi H, Okano T, Mochida J, Watanabe M. Combined surgery and chondrocyte cell-sheet transplantation improves clinical and structural outcomes in knee osteoarthritis. NPJ Regen Med. 4:4. 2019 査読有  
doi: 10.1038/s41536-019-0069-4.
- ② Takahashi T, Sato M, Toyoda E, Maehara M, Takizawa D, Maruki H, Tominaga A, Okada E, Okazaki K, Watanabe M. Rabbit xenogeneic transplantation model for evaluating human chondrocyte sheets used in articular cartilage repair. J Tissue Eng Regen Med, 12(10), 2067-2076, 2018 査読有  
doi: 10.1002/term.2741
- ③ Maehara M, Sato M, Toyoda E, Takahashi T, Okada E, Kotoku T, Watanabe M, Characterization of polydactyly-derived chondrocyte sheets versus adult chondrocyte sheets for articular cartilage repair, Inflammation and Regeneration. 37:22 2017 査読有  
doi: 10.1186/s41232-017-0053-6

[学会発表] (計 9 件)

- ① 豊田恵利子, 佐藤正人, 前原美樹, 高橋匠, 野中謙, 飯島寛, 的場亮, 川口佑加, 佐藤千香子, 高木岳彦, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 赤松正, 渡辺雅彦. 多指症由来軟骨細胞シ

一トの拡大培養と特性変化の解析. 第 32 回日本軟骨代謝学会, 2019

- ② Toyoda E, Sato M, Maehara M, Takahashi, T, Takagi T, Kotoku T, Sato C, Nonaka K, Matoba R, Akutsu H, Umezawa A, Akamatsu T, Watanabe M. Identification of altered gene expression in the expansion polydactyly-derived chondrocytes. 5th TERMIS World Congress 2018
- ③ Maehara M, Sato M, Toyoda E, Takahashi, T, Okada E, Takagi T, Akamatsu T, Akutsu H, Watanabe M. Exploration of humoral factors related to cartilage regeneration produced by polydactyly-derived chondrocyte sheets and adult chondrocyte sheets. 5th TERMIS World Congress 2018
- ④ 鷹取直希, 佐藤正人, 三谷玄弥, 高垣智紀, 浜橋恒介, 芹ヶ野健司, 十河泰之, 渡辺雅彦. 多指症由来軟骨細胞シートと成人軟骨細胞シートの特性の比較研究. 第 10 回日本関節鏡・膝・スポーツ整形外科学会 (JOSKAS), 2018
- ⑤ Toyoda E, Sato M, Maehara M, Takahashi T, Takagi T, Nonaka K, Iijima H, Matoba R, Akutsu H, Umezawa A, Akamatsu T, Watanabe M. ポスター発表. Analysis of micro-RNAs in exosomes secreted by human polydactyly-derived chondrocyte sheets. The 2018 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress, 2018
- ⑥ Takahashi T, Sato M, Toyoda E, Maehara M, Sogo Y, Tominaga A, Takagi T, Akamatsu T, Okazaki K, Watanabe M. Humoral Factors Produced by Polydactyly-derived Chondrocyte Sheets in Articular Cartilage Repair. The 2018 Osteoarthritis Research Society International (OARSI) World Congress, 2018
- ⑦ 高橋匠, 佐藤正人, 豊田恵利子, 前原美樹, 滝澤大智, 十河泰之, 富永絢子, 岡田恵里, 渡辺雅彦 SOMAscan を用いた多指症由来同種軟骨細胞シートの液性因子解析: 培養条件の影響. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017
- ⑧ 豊田恵利子, 佐藤正人, 高橋匠, 前原美樹, 高垣智紀, 濱橋恒介, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 渡辺雅彦. アプタマーアレイを用いた軟骨細胞シートが産生する因子の網羅的解析. 第 35 回日本運動器移植・再生医学研究会 2016
- ⑨ 豊田恵利子, 佐藤正人, 高橋匠, 前原美樹, 高垣智紀, 浜橋恒介, 幸得友美, 岡田恵里, 渡部綾子, 佐藤千香子, 滝澤大智, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 持田讓治. ヒト軟骨細胞シートが産生するタンパク質の網羅的解析. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 豊田 恵利子

ローマ字氏名: TOYODA, Eriko

所属研究機関名：東海大学

部局名：医学部

職名：特定研究員

研究者番号（8桁）：90749269

※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、研究者個人に帰属されます。