

令和元年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16705

研究課題名(和文)軟骨細胞シート分泌エクソソーム中の軟骨形質マーカーとなるmiRNAの解析

研究課題名(英文) Analysis of exosomal miRNAs as markers for the cartilage regenerative capacity of polydactyly derived-chondrocyte sheets.

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)：多指症手術時廃棄組織由来軟骨細胞シート(PDシート)の分泌エクソソーム内包miRNAのうち、軟骨形質マーカーとなりうるmiRNAを同定した。細胞シートが培養上清中エクソソームに有意に濃縮し、かつ軟骨修復能の高い細胞シートにて有意に発現する共通のmiRNA 16種をマイクロアレイ実験により絞り込んだ。Pathway解析の結果、これらのmiRNAのターゲット遺伝子は、軟骨基質分解関連や血管新生関連Pathwayに有意に濃縮されることが明らかとなった。またこのうち3種のmiRNAは、PCRによるバリデーション試験にてマイクロアレイの結果との相関を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟骨細胞シートの培養上清中のmiRNAを軟骨形質の指標とすることが可能になることで、PDシートによる関節治療に際し、貴重なドナー細胞や作製されたPDシートを犠牲にすることなく、軟骨形質の非侵襲的で簡便な確認方法として応用できる可能性がある。エクソソームは細胞間シグナル伝達物質としての役割を担っており、それ自身が細胞の分化などに関与するとの報告もあるため、エクソソームそのもの、もしくは内包されるmiRNAそのものが細胞シートと同様の機能・効果を有する可能性があり、新規の関節軟骨治療法や治療薬の開発への応用・貢献も期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have identified exosomal miRNAs that may act as markers for the cartilage regenerative capacity of polydactyly derived-chondrocyte sheets (PD sheets). Through microarray analysis, we identified exosomal miRNAs significantly enriched in culture supernatants of PD sheets and those significantly expressed by PD sheets with high efficacy, and found 16 exosomal miRNAs common to both. As a result of pathway analysis, target genes of these miRNAs were shown to be significantly enriched in cartilage matrix degradation-related and angiogenesis-related pathways. Validation through quantitative PCR revealed 3 miRNAs that have a positive correlation with the microarray results.

研究分野：整形外科学

キーワード：エクソソーム 軟骨細胞 再生医療 細胞シート miRNA

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、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) による関節治療を目指した再生医療研究を行っている。軟骨細胞シートの作用機序は、関節液中のカタボリック因子からの損傷部の防護、損傷部からのプロテオグリカンの流出阻止などの働きのほか、自身がサイトカインなどの持続的供給源として働くことで軟骨再生に寄与すると考えられている。

(2) 軟骨細胞は培養や継代により脱分化し、急速に軟骨形質を消失することが知られている。そのため、培養した軟骨細胞を再生医療に用いる臨床研究の実施にあたっては、製品の軟骨形質発現を確認する検査の実施が必須となる。我々は現在、移植用に作製した軟骨細胞シートの一部を検査用として犠牲にし、規格試験を実施しており、作製した軟骨細胞シートの軟骨形質発現を非侵襲的に検査する方法の確立が望まれている。

(3) 近年、細胞が放出するエクソソームが様々な研究において注目されている。エクソソームは細胞のエンドサイトーシス経路を介して形成され放出される直径 30-100nm の膜小胞体で、元の細胞に由来する様々な特徴を反映しており、タンパク質や脂質、核酸等を内包している。近年の研究では、エクソソームに内包される miRNA サブセットが分泌細胞によって異なることなどが示され、情報伝達物質として働くことから、バイオマーカーとしての可能性が注目されている。細胞シートの培養上清から得られるエクソソームは細胞シートの軟骨形質発現と相関することが予想され、軟骨形質発現を非侵襲的に検査可能なマーカーとして利用できる可能性がある。

## 2. 研究の目的

- (1) PD シートが培養液中に放出するエクソソームに内包される miRNA をマイクロアレイにより解析し、軟骨形質発現のマーカーとなる miRNA を同定すること。
- (2) 同定された miRNA がターゲットとする遺伝子を確認し、細胞シートの軟骨修復効果への寄与の可能性について調査すること。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞シート培養上清中に放出されるエクソソームのプロパティ確認

多指症手術時廃棄組織由来多指症軟骨細胞を用いて、温度応答性培養インサート上で細胞シートを作製した。完成後無血清培地にて培養し、細胞シート培養上清を回収した。エクソソーム市販の抽出キットを使用してエクソソームを抽出し、金コロイド免疫電顕によるエクソソームマーカーの確認と、ナノ粒子解析システムによるパーティクルカウントを実施した。

### (2) 多指症軟骨細胞シートおよび培養上清中エクソソーム内包 mRNA のマイクロアレイ解析

7 ドナーの多指症患者由来軟骨細胞から作製した多指症細胞シートおよびその培養上清中エクソソームに内包される miRNA を抽出し、培養上清中エクソソームで有意に変動する miRNA をマイクロアレイ解析により絞り込んだ ( $p < 0.05$ , Fold Change  $> 10$ )。 (= 実験 1)

6 ドナーの多指症患者由来軟骨細胞から、異なる培養条件 (培養条件 A および B) 下にて 2 種類の細胞シートを作製した。この 2 種類の培養条件で作成された細胞シートは、異種同所性モデル動物を用いた in vivo 実験にて軟骨組織修復能が大きく異なることを我々は既に確認し

ている。これらの細胞シート培養上清中エクソソームに内包される miRNA を抽出し、軟骨修復能の優れた培養条件 A にて有意に変動する miRNA をマイクロアレイ解析により絞り込んだ ( $p < 0.05$ 、Fold Change  $> 2$ )。(=実験 2)

実験 1 および 2 のマイクロアレイ解析には、Agilent Human miRNA microarray (2549probe) を使用した。マイクロアレイ解析後、実験 1 および 2 それぞれで絞り込んだ miRNA のなかで共通の変動 miRNA を抽出した。また、同定した miRNA に関して、Target scan を用いて標的遺伝子の予測を行い、制御される可能性のあるターゲット遺伝子群に関して、Panther Classification System による Pathway 解析を実施した。

### (3) q-PCR による miRNA 発現の確認およびターゲット遺伝子予測

(2) で絞り込まれた軟骨形質発現マーカー候補となる複数種の miRNA について、qPCR によるバリデーション試験を実施した。プローブごとにマイクロアレイの結果との相関を確認し、高い相関の得られた miRNA を軟骨形質発現のマーカーの候補として同定した。

## 4. 研究成果

(1) 細胞シート培養上清より、エクソソーム抽出キットを用いて抽出された膜小胞体は、既知の Exosome marker 陽性の小胞体であることが確認された。また、パーティクルカウントの結果、およそ 100nm をピークとする小胞体集団が抽出されていることが明らかとなった。

(2) マイクロアレイ解析の結果、152miRNA が PD シート分泌エクソソーム内に有意にパッケージングされ、200miRNA が軟骨修復能の優れた培養条件 A で有意に発現した。両者に共通の発現変動 miRNA は 16 種抽出され、その中でも軟骨修復能の得られない培養条件 B においては発現しない miRNA は 9 種に限定された。

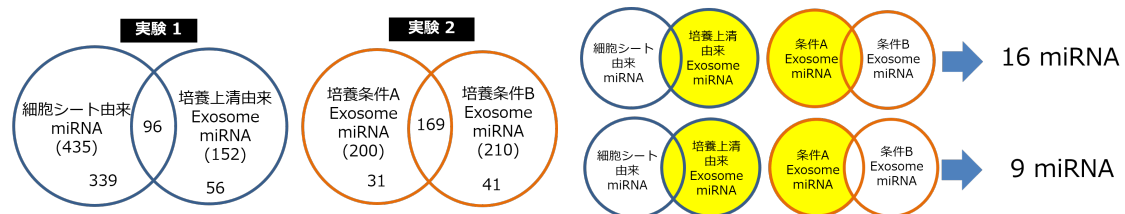


図 1. マイクロアレイ解析による軟骨形質関連 miRNA 抽出結果

(3) ここまでに絞り込まれた 16 種類の miRNA に関し、Target scan を用いて標的遺伝子の予測を行い、3 つ以上の miRNA により制御される可能性のあるターゲット遺伝子 1777 個に関して Pathway 解析を実施した。この結果、軟骨基質分解 (Fold enrichment = 2.72,  $p$  value =  $2.43E-04$ ) や血管新生 (Fold enrichment = 2.08,  $p$  Value =  $5.77E-04$ ) などに関連する Pathway に多くの標的遺伝子がエンリッチされることが明らかとなった。

(4) qPCR による miRNA 発現のバリデーションを実施した結果、16 miRNA 中 6 miRNA において、細胞シートと比較し培養上清中 Exosome における miRNA の発現が Fold change 2 倍以上での変動をもって検出された。また、16miRNA 中 6 miRNA において、高い軟骨修復能を有する培養条件 A のグループにて Fold change 2 倍以上の変動が認められた。マイクロアレイの解析結果その相関解析を実施した結果、3 miRNA において、マイクロアレイの結果との正の相関を認めた(相

関係数(R) = 0.40~0.91)。

本研究で抽出された PD シート分泌エクソソーム内包 miRNA は、PD シートの有効性指標や品質マーカーとして利用できる可能性がある。今後は miRNA の機能解析や、これらの miRNA が実際に Exosome を介して軟骨修復に寄与するかを検証し、軟骨分化・再生への作用メカニズムの解明に向けた研究を行う。

## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

前原美樹, 佐藤正人, 豊田恵利子, 高橋匠, 野中謙, 飯島寛, 的場亮, 高木岳彦, 赤松正, 渡辺雅彦、多指症軟骨細胞シートの軟骨修復能に關与するエクソソーム内包 miRNA の探索、第 33 回日本整形外科学会基礎学術集会、2018 年

E. TOYODA, M. SATO, M. MAEHARA, T. TAKAHASHI, T. TAKAGI, K. NONAKA, H. IIJIMA, R. MATOBA, H. AKUTSU, A. UMEZAWA, T. AKAMATSU, M. WATANABE. ANALYSIS OF MICRO-RNAs IN EXOSOMES SECRETED BY HUMAN POLYDACTYLY-DERIVED CHONDROCYTE SHEETS. 2018 World Congress on Osteoarthritis (国際学会)、2018 年

豊田恵利子, 佐藤正人, 前原美樹, 高橋匠, 高木岳彦, 野中謙, 飯島寛, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 赤松正, 渡辺雅彦、軟骨細胞シート分泌エクソソームに含まれる miRNA の解析、第 31 回日本軟骨代謝学会、2018 年

豊田恵利子, 佐藤正人, 高橋匠, 前原美樹, 高木岳彦, 岡田恵里, 渡部綾子, 野中謙, 的場亮, 阿久津英憲, 梅澤明弘, 赤松正, 渡辺雅彦、軟骨細胞シート分泌エクソソーム含有 miRNA の解析、第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会 2017 年

## 6 . 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：豊田 恵利子

ローマ字氏名：TOYODA, Eriko

研究協力者氏名：岡田 恵里

ローマ字氏名：OKADA, Eri

研究協力者氏名：渡部 綾子

ローマ字氏名：WATANABE, Ayako

研究協力者氏名：白砂 沙織

ローマ字氏名：SHIRASUNA, Saori

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。