

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17085

研究課題名(和文)エクソソームの顎関節関節円板の再生に対する有効性の証明と再生機構の解明

研究課題名(英文)Proof of effectiveness of exosomes for regeneration of temporomandibular joint disc and elucidation of regeneration mechanism

研究代表者

中村 香織(Nakamura, Kaori)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：50817632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：筋肉、脂肪、滑膜、骨髄からMSCsを単離し各組織由来の細胞外微粒子を精製できた。軟骨細胞、間葉系幹細胞の増殖能は筋肉、脂肪、滑膜、骨髄由来の間葉系幹細胞の細胞外微粒子投与群のいずれにおいてもコントロール群に比較し有意に上昇( $P < 0.05$ )していた。各細胞外微粒子投与群間での有意な差は認めなかった。軟骨細胞の遊走能も同様に全ての細胞外微粒子投与群で有意に上昇( $P < 0.05$ )を認めたが、各細胞外微粒子投与群間での有意な差はなかった。軟骨分化能に関しては細胞外微粒子による変化はなかった。マウス軟骨欠損モデルの組織学的評価においては細胞外微粒子群においてコントロールに比較し有意に向上していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

硬組織の再生能を示した細胞外微粒子はMSCsから多く分泌され由来細胞により内容物が異なり、再生能が異なること示唆された。本研究では筋肉、脂肪、滑膜、骨髄からMSCsを単離し培養上清から各組織由来の細胞外微粒子を精製できた。初めて間葉系幹細胞と軟骨細胞に各細胞外微粒子を添加した群と、PBSを添加した群をコントロール群を比較した。いずれの細胞外微粒子も軟骨細胞と間葉系幹細胞の増殖能と遊走能を向上させた。一方、各細胞外微粒子投与群間での有意な差は認めなかった。軟骨分化能に関しては細胞外微粒子による変化はなかった。マウス軟骨再生能は細胞外微粒子群においてコントロールに比較し有意に向上していた。

研究成果の概要(英文)：MSCs could be isolated from muscle, fat, synovium, and bone marrow, and extracellular microparticles derived from each tissue could be purified. The proliferative capacity of chondrocytes and mesenchymal stem cells was significantly increased ( $P < 0.05$ ) in all of the extracellular microparticle administration group of muscle, adipose, synovial membrane, and bone marrow-derived mesenchymal stem cells as compared with the control group. No significant difference was observed between the extracellular microparticle administration groups. The migration ability of chondrocytes was also significantly increased ( $P < 0.05$ ) in all extracellular particle-administered groups. There was no change in cartilage differentiation potential due to extracellular microparticles. In the histological evaluation of the mouse cartilage defect model, there was a significant improvement in the extracellular microparticle group compared with the control.

研究分野：組織再生

キーワード：細胞外微粒子

## 1. 研究開始当初の背景

顎関節症は開口時痛、開口障害、咀嚼困難、また頭痛等を惹起する。病態としては咀嚼筋障害、関節包・靭帯障害、関節円板障害、変形性関節症が挙げられる。疫学的調査により東京都内就労者では約 20%に治療を要する開口時痛を認めた(口腔保健協会 2007)。そして、診察を受けた方の 40%が関節円板損傷、30%が変形性関節症を呈する(Manfredini et al *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007 12(4):E292-8.)。しかしながら、治療法としては NSAIDs 或いはマウスピースを含めた対処療法しかなく、再生医療を含めた新たな治療法の開発が急務とされている。関節円板と同様の線維軟骨より構成されている組織として膝半月板が挙げられる。我々は MSCs 移植により、世界で初めて膝半月板の再生に成功した(Muneta et al *Stem Cells*. 2009 Apr;27(4):878-87, Katagiri et al *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jun 14;435(4):603-9.)。これらの知見の積み重ねを基に、膝半月板損傷患者に対する MSCs 移植治療の臨床試験をおこなっている。一方、顎関節では組織にかかる単位面積当たりの圧力が膝半月板よりも 1 桁大きく、MSCs を用いた顎関節関節円板の再生の動物実験の試みが報告されているが、当教室を含め良好な結果を得られていなかった。

細胞外微粒子は microRNA、mRNA、タンパクを含む核酸物質を内包し、細胞間情報伝達において重要な役割を果たす事が知られている。再生医療においても移植 MSCs の分泌する細胞外微粒子が組織再生において、レシピエント側の組織再生能力の活性化に重要なファクターとなっていると認識されだしている(Phinney DG et al. *Stem Cells*. 2017 35(4):851-858)。これは我々の分泌された液性因子の重要性を示した知見と適合する。しかし、細胞外微粒子を用いた顎関節再生の報告は無く、顎関節円板の再生が可能かは不明である。また滑膜、歯肉、歯周靭帯、歯髄、骨髄由来の MSCs において分化能、軟骨再生能が異なる事を示した(Otobe et al *Cell Med*. 2012 Aug 10;4(1):13-21)。一方細胞外微粒子中には、その分泌細胞の違いにより異なる核酸物質が含有されているが、その異なる含有物によるレシピエントの再生に関わる作用の差異の報告はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は異なる組織由来の MSC の細胞外微粒子の宿主細胞への効果の比較検討する事と評価方法の確立しているマウス軟骨欠損モデルに対し、週一回の細胞外微粒子関節内注射した群を細胞外微粒子群、PBS を注射した群をコントロール群として術後 3 週における組織学的な比較検討する事である。

## 3. 研究の方法

滑膜、筋肉、脂肪、骨髄 MSCs 由来の細胞外微粒子に対する宿主細胞の応答の評価(増殖補助能、遊走補助能、分化補助能)を以下の方法で評価した。

骨髄 MSCs、軟骨細胞に対し、異なる細胞由来 MSCs 細胞外微粒子を一定濃度でそれぞれ添加し、

増殖補助能、遊走補助能、分化補助能を評価する。

□ 増殖補助能の検討

細胞外微粒子フリーのメディウムまた  $2 \times 10^{10}$  個/mL となるように各細胞外微粒子を添加したメディウムを用いて、MSCs、軟骨細胞の培養を行い、細胞数を Cell Counting Kit-8 assay (CCK-8; Dojindo, Kyushu Island, Japan)を用いて経時的に計測した。

□ 遊走補助能の検討

トランスウェル、インサート上面に MSCs、軟骨細胞をまき、プレートウェルに各細胞外微粒子添加メディウムを満たす。4 時間後フォルマリンで固定し、DAPI で核染色し遊走した細胞数をカウントした。

□ 軟骨分化補助能の検討

MSCs を軟骨分化溶液で満たした 15ml チューブにいれ 15 分遠心、各細胞外微粒子を添加、3 週間培養。軟骨分化溶液と各細胞外微粒子は 5 日ごとに変える。3 週後検体採取、組織を作成。サフラニン O 染色、コラーゲン type1 免疫染色にて軟骨分化を評価する。

期待される結果は軟骨分化補助能が有意に優れているエクソソームを同定する事である。

#### 4 . 研究成果

軟骨細胞、間葉系幹細胞の増殖能は筋肉、脂肪、滑膜、骨髄由来の間葉系幹細胞の細胞外微粒子投与群のいずれにおいてもコントロール群に比較し有意に上昇( $P < 0.05$ )していた。各細胞外微粒子投与群間での有意な差は認めなかった。軟骨細胞の遊走能も同様に全ての細胞外微粒子投与群で有意に上昇( $P < 0.05$ )を認めたが、各細胞外微粒子投与群間での有意な差はなかった。一方、間葉系幹細胞の遊走能は Control 群に比較し向上する傾向はあったが有意な差は認めなかった。軟骨分化能に関しては細胞外微粒子による変化はなかった。マウス軟骨欠損モデルの組織学的評価においては細胞外微粒子群においてコントロールに比較し有意に向上していた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katakura Mai, Nakamura Kaori, Watanabe Toshifumi, Horie Masafumi, Nakamura Tomomasa, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Nakagawa Yusuke, Ohara Toshiyuki, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Risk factors for residual anterolateral rotational instability after double bundle anterior cruciate ligament reconstruction: Evaluation by quantitative assessment of the pivot shift phenomenon using triaxial accelerometer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Knee	6. 最初と最後の頁 95 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.knee.2019.09.016	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 該当する
1. 著者名 Nakamura Kaori, Nakamura Tomomasa, Horie Masafumi, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Nakagawa Yusuke, Amemiya Masaki, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Anatomic femoral tunnel placement is difficult by the transtibial technique: comparison of three different femoral tunnel drilling techniques in double-bundle anterior cruciate ligament reconstructions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 584 ~ 593
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-019-05740-8	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 該当する
1. 著者名 Katakura Mai, Horie Masafumi, Watanabe Toshifumi, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Ohara Toshiyuki, Nakamura Kaori, Katagiri Kenta, Ueki Hiroko, Zaffagnini Stefano, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 Effect of meniscus repair on pivot-shift during anterior cruciate ligament reconstruction: Objective evaluation using triaxial accelerometer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Knee	6. 最初と最後の頁 124 ~ 131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.knee.2018.11.016	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 該当する

1. 著者名 Nakamura Kaori, Tsuji Kunikazu, Mizuno Mitsuru, Koga Hideyuki, Muneta Takeshi, Sekiya Ichiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Initial cell plating density affects properties of human primary synovial mesenchymal stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 1358 ~ 1367
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24112	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 該当する

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hayashi M., Yoshimura H., Ogiuchi T., Takahashi T., Matsumura E., Nakamura K., Uomizu M., Hasegawa S., Seki R., Hoshino A.
2. 発表標題 Is a grafted tendon flattened at the tunnel aperture after anatomical flat anterior cruciate ligament reconstruction using hamstring autograft?
3. 学会等名 ESSKA Speciality Days (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura K., Hayashi M., Ogiuchi T., Yoshimura H., Takahashi T., Matsumura E., Uomizu M., Hasegawa S., Seki R., Hoshino A.
2. 発表標題 The effect of tight medial patellofemoral ligament fixation
3. 学会等名 ESSKA Speciality Days (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村 香織
2. 発表標題 人工膝関節置換術 (TKA) での組織軟部バランスが術後の関節可動域に与える影響
3. 学会等名 日本人工関節学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mai Katakura, Hideyuki Koga, Ichiro Sekiya, Toshifumi Watanabe, Masafumi Horie, Hiroki Katagiri, Koji Otabe, Toshiyuki Ohara, Kaori Nakamura, Kenta Katagiri, Hiroko Ueki, Takeshi Muneta.
2. 発表標題 Effect of ACL Reconstruction and Meniscus Repair on Anterolateral Rotational Instability of the ACL Injured Knee: Quantitative Assessment of the Pivot Shift Phenomenon Using Triaxial Accelerometer.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society 2018 Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川田 和正 片桐 洋樹 宮武 和正 辻 邦和 中村香織 大川 淳 関矢 一郎 古賀 英之
2. 発表標題 滑膜間葉系幹細胞由来の細胞外小胞はCXCR2を介して細胞の増殖能、遊走能を向上し、マウス半月板修復を促進する
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎
4. 発表年 2021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
---------	---------