

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18490

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞による軟骨再生におけるエクソソームの作用機構の解明と軟骨再生能の増強

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of action of exosomes in cartilage regeneration by mesenchymal stem cells and enhancement of cartilage regeneration ability

研究代表者

片桐 洋樹 (Katagiri, Hiroki)

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：50795028

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)：エクソソームはMSCs、軟骨細胞の増殖能、遊走能を共に増強した。エクソソームは半月板の再生を認めた。さらにエクソソーム移植早期で関節内でMSCsの分裂がエクソソームにより増加していた。以上について日本整形外科学会2019にて報告した。MSCsと軟骨細胞の2種の細胞に対しエクソソームを投与し、RNAを抽出し、RNAシーケンスにより非投与群と比較してRNA発現を解析した。2つのRNAシーケンスの結果に対しバイオインフォマティクス解析を行い、エクソソームの組織再生に恒常的に強く作用する可能性のある候補因子を細胞内発現変動因子として同定した。以上について、現在国際誌に論文投稿中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、半月板や軟骨を病態の主体とする変形性膝関節症に罹患者数は非常に多く、幹細胞を用いた再生治療は急速に発展している。一方で、その作用機序に関しては不明な点が多く、更なる、再生医療の発展の障壁となっている。今回我々はその作用機序の一旦として、細胞から分泌されるエクソソームがホスト細胞の増殖能、走化性を向上する事とその機序を証明し、国際学会発表、国際研究雑誌に成果を報告した。これらの知見は今後、変形性膝関節症等で摩耗した軟骨、半月板を再生させる、幹細胞治療を増強するターゲットとなりうる。一方で、今後の更なる研究が必要と考え、今後の重要な継続研究課題である。

研究成果の概要(英文)：Exosomes enhanced MSCs, chondrocyte proliferation and migration. Exosomes showed meniscal regeneration. In addition, exosomes increased MSCs division in joints early in exosome transplantation. The above was reported at the Japan Orthopedic Association 2019. Exosomes were administered to MSCs and chondrocytes, and RNA expression was analyzed by RNA sequencing compared with the non-administered group. Bioinformatics analysis was performed on the results of the two RNA sequences, and candidate factors that may constitutively and strongly act on exosome tissue regeneration were identified as intracellular expression variability factors. The above is currently being submitted to an international journal.

研究分野：幹細胞治療

キーワード：半月板再生 幹細胞治療

1. 研究開始当初の背景

現在、体性幹細胞、特に MSCs を使用した再生医療は急速に発展している。一方で、軟骨、半月板は極めて再生能の低い組織として知られていたが、私たちは MSCs をもちいて世界ではじめて軟骨と半月板を再生させることに成功した。以来、軟骨再生と半月板再生に対する基礎的研究を報告してきた【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.】(図1)。これらの知見の積み重ねにより、昨年8月から膝半月板損傷患者に対する MSCs 移植による再生治療の臨床試験を開始した【UMIN 000026383】。しかし、MSCs 移植は免疫応答の観点から自家移植で行われているため、自家 MSCs の組織再生能の個体差による成績不良例があることが課題となっている。

近年、我々の報告を含め、MSCs からのパラクリン作用によるレシピエント細胞の組織再生能力の活性化が組織再生において重要なファクターであると認識されている。そこで私は microRNA 等を内包して、細胞間のパラクリン作用において重要な役割を果たし、生物製剤として使用可能なエクソソームに着目し先行実験をおこなった。MSCs からエクソソームを抽出し、軟骨欠損部へ移植したところ、エクソソームにより軟骨組織は再生した。(図2) この結果は MSCs による軟骨再生へのエクソソームの寄与を示唆した【日本整形外科基礎学会 2018】。そこで MSCs の個体差による成績不良例を根絶するために、MSCs による軟骨再生におけるエクソソームの作用機序を解明し、その作用を増強する事により MSCs による軟骨再生を増強できるかは本領域の解明すべき核心的「問い」である

2. 研究の目的

本研究の目的は現在行われている間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells: MSCs)をもちいた軟骨再生医療におけるエクソソームの作用機構を解明し、エクソソームの作用を増強する事により MSCs をもちいた再生医療での個体差による成績不良例を根絶する事である。私たちの過去の研究では同一個体の MSCs でも由来組織(骨髄・滑膜・筋肉・脂肪)が異なると、移植後の組織再生能が異なっていた【Cell Tissue Res.2008 Sekiya et al.】。また、エクソソームは由来細胞の違いにより異なる microRNA が含有されている事が知られている。しかし、エクソソームの含有物の差異に着目してレシピエントの再生に関わる作用を解析した報告はない。上述のように本研究は我々の MSCs を用いた半月板再生の成功と自家 MSCs の個体差による成績不良例という負の経験を原点としている。その実験中に得られた、移植 MSCs のパラクリン作用の重要性、由来細胞の差異による MSCs の軟骨再生能の差異という、我々独自の知見を基盤とし、現在の由来細胞の差異によるエクソソームの含有物の差異という知見を併せた研究課題である。

3. 研究の方法

滑膜由来 MSCs の培養液上清から Amicon Ultra Filter Unit を用いて MSC-EVs を精製した。マウス半月板前節切除モデルを作成し、MSC-EVs または PBS 関節内注射を施行し術後1週、3週における組織学的な検討を行った。軟骨細胞と MSCs に対し MSC-EVs または PBS を添加し、増殖能を CCK-8、遊走能を Trans well、発現変動遺伝子(DEG)を RNA-seq を用いて評価した。RNA-seq により同定された CXCL5/6 の主要な受容体である

CXCR2 のアンタゴニスト(SB265610)を用いて軟骨細胞における増殖能、遊走能の MSC-EVs 作用阻害実験を行った。

4 . 研究成果

マウス半月板切除モデルでは MSC-EVs 群で 1 週の PCNA 陽性細胞が増加し、3 週の Modified Pauli's Score で有意な半月板修復を認めた。軟骨細胞、MSCs の増殖能、遊走能は MSC-EVs 群において有意に上昇を認めた。RNA-seq では MSC-EVs 投与によって軟骨細胞で 168 個、MSCs で 43 個の DEG が同定され、軟骨細胞の DEG について KEGG 解析を行うとケモカインに関係する遺伝子セットが最も有意に上昇を認めた。この遺伝子セットと軟骨細胞、MSCs と共通する DEG を比較すると CXCL5/6 が MSC-EVs の作用として特異的に上昇していた。CXCR2 アンタゴニスト投与によって MSC-EVs による軟骨細胞の増殖および遊走能の上昇は阻害された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 An J.-S., Tsuji K., Onuma H., Araya N., Isono M., Hoshino T., Inomata K., Hino J., Miyazato M., Hosoda H., Kangawa K., Nakagawa Y., Katagiri H., Miyatake K., Sekiya I., Muneta T., Koga H.	4. 巻 29
2. 論文標題 Inhibition of fibrotic changes in infrapatellar fat pad alleviates persistent pain and articular cartilage degeneration in monoiodoacetic acid-induced rat arthritis model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Osteoarthritis and Cartilage	6. 最初と最後の頁 380 ~ 388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2020.12.014	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 -
1. 著者名 Koga Hideyuki, Nakamura Tomomasa, Katagiri Hiroki, Nakagawa Yusuke, Ozeki Nobutake, Ohara Toshiyuki, Shioda Mikio, Kohno Yuji, Amemiya Masaki, Sekiya Ichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Two-Year Outcomes After Meniscoplasty by Capsular Advancement With the Application of Arthroscopic Centralization Technique for Lateral Compartment Knee Osteoarthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 3154 ~ 3162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546520957367	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 -
1. 著者名 Ueki Hiroko, Katagiri Hiroki, Tsuji Kunikazu, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshifumi, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Effect of transplanted mesenchymal stem cell number on the prevention of cartilage degeneration and pain reduction in a posttraumatic osteoarthritis rat model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 30205 ~ 30210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.06.011	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 -
1. 著者名 Araya Naoko, Miyatake Kazumasa, Tsuji Kunikazu, Katagiri Hiroki, Nakagawa Yusuke, Hoshino Takashi, Onuma Hiroaki, An Saisei, Nishio Hirofumi, Saita Yoshitomo, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Intra-articular Injection of Pure Platelet-Rich Plasma Is the Most Effective Treatment for Joint Pain by Modulating Synovial Inflammation and Calcitonin Gene-Related Peptide Expression in a Rat Arthritis Model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 2004 ~ 2012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0363546520924011	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 -

1. 著者名 Cui Weiding, Nakagawa Yusuke, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Ohara Toshiyuki, Shioda Mikio, Kohno Yuji, Hoshino Takashi, Yoshihara Aritoshi, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Knee laxity, lateral meniscus tear and distal femur morphology influence pivot shift test grade in ACL injury patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy	6. 最初と最後の頁 633 ~ 640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00167-020-05994-7	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 -

1. 著者名 Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshifumi, Horie Masafumi, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Validity of intraoperative observation of graft length change pattern for medial patellofemoral ligament reconstruction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedics	6. 最初と最後の頁 131 ~ 136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jor.2020.03.007	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 -

1. 著者名 Seki Yoshie, Katagiri Hiroki, Otabe Koji, Nakagawa Yusuke, Miyatake Kazumasa, Sekiya Ichiro, Koga Hideyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Investigation of association between the preoperative intra-articular anesthetic test and persistent pain after total knee arthroplasty	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Science	6. 最初と最後の頁 1055 ~ 1060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2020.01.013	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 -

1. 著者名 Onuma Hiroaki, Tsuji Kunikazu, Hoshino Takashi, Inomata Kei, Udo Mio, Nakagawa Yusuke, Katagiri Hiroki, Miyatake Kazumasa, Watanabe Toshifumi, Sekiya Ichiro, Muneta Takeshi, Koga Hideyuki	4. 巻 38
2. 論文標題 Fibrotic changes in the infrapatellar fat pad induce new vessel formation and sensory nerve fiber endings that associate prolonged pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research	6. 最初と最後の頁 1296 ~ 1306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jor.24580	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 川田和正, 片桐洋樹, 宮武和正, 辻邦和, 中川裕介, 大川淳, 関矢一郎, 古賀英之.
2. 発表標題 軟骨細胞、間葉系幹細胞の増殖能、遊走能に対する各組織間由来の滑膜間葉系幹細胞由来エクソソームの比較
3. 学会等名 第34 回日本整形 外科学会基礎学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazumasa Kawata, Hiroki Katagiri, Kunikazu Tsuji, Kazumasa Miyatake, Yusuke Nakagawa, Ichiro Sekiya, Hideyuki Koga.
2. 発表標題 Enhancement Of Proliferation And Migration Abilities Of Mesenchymal Stem Cells And Chondrocytes By Exosomes Derived From Mesenchymal Stem Cells From Four Different Tissues.
3. 学会等名 Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazumasa Kawata ¹ , Hiroki Katagiri ^{1,4} , Kunikazu Tsuji ² , Kazumasa Miyatake ¹ , Yusuke Nakagawa ² , Ichiro Sekiya ³ , Hideyuki Koga ¹
2. 発表標題 Exosomes derived from MSCs mediate endogenous cell proliferation and migration via CXCL5 and CXCL6/CXCR2 axes and repair menisci
3. 学会等名 OARSI (国際学会)
4. 発表年 2021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
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
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
---------	---------