

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03055

研究課題名（和文）分泌型シアル酸認識レクチンによる関節再生メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of joint regeneration mechanism by secretory sialic acid recognition lectin

研究代表者

山本 朗仁（YAMAMOTO, Akihito）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・教授

研究者番号：50244083

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスRAおよびOAモデル発症後にSHED-CMやsSiglec-9を静脈内投与すると、抗炎症性滑膜M2マクロファージ（M2M）を誘導し、関節再生を促進した。M2Mの細胞培養上清（M2-CM）をマウス関節炎モデルに静脈内投与すると、損傷関節が再生した。M2-CMの網羅的プロテオーム解析により、関節再生因子としてWntシグナルの抑制因子であるsFRP-1を同定した。sFRP-1は損傷軟骨の破壊環境を再生環境に変換することで、関節再生を促進した。本研究は、シアル酸認識レクチンを介した関節再生メカニズムを明らかにしただけでなく、末梢血マクロファージを用いた新たな関節再生療法の可能性も示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

関節再生メカニズムは多くが不明である。本研究は、SHED-CMやsSiglec-9による関節再生メカニズムの解析を通して、抗炎症性滑膜M2マクロファージの誘導が関節再生に大きく寄与することを明らかにした。さらにM2の中核的治療効果因子としてWntシグナルの抑制因子sFRP-1を同定した。かつてよりM2Mによる関節治療は注目されてきたが、M2がいかにして関節再生を促すかは不明であった。本研究は正解に先駆け、M2由来関節再生因子を同定し発表した。本研究の学術的意義は極めて高い。関節再生医薬品は開発されていないが、今後本研究成果をもとに新規医薬品の開発が期待される。本研究の社会的意義は極めて高い。

研究成果の概要（英文）：Here we show that intravenous administration of SHED-CM or sSiglec-9 after the onset of RA and OA in mouse models induces anti-inflammatory synovial M2 macrophages (M2M), promoting joint regeneration. Furthermore, it was found that intravenous administration of the cell culture supernatant from the induced M2M (M2-CM) to a mouse arthritis model leads to the regeneration of damaged joints. Comprehensive proteome analysis of M2-CM identified sFRP-1 as a joint regeneration factor. sFRP-1, an inhibitor of Wnt signaling, promotes joint regeneration by transforming the inflammatory tissue-destructive environment of damaged cartilage into an anti-inflammatory tissue-regenerative environment. This study not only elucidates the mechanism of joint regeneration mediated by sialic acid-recognizing lectins but also reveals the potential of a novel joint regeneration therapy using peripheral blood macrophages.

研究分野：再生医学

キーワード：関節リウマチ 変形性関節症 滑膜マクロファージ 幹細胞培養上清 シアル酸認識レクチン 関節再生

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ (RA) は多発性関節炎を主徴とする原因不明の自己免疫疾患である。約 7 割の患者にメトトレキサート (MTX) が使用され、約 2.5 割の患者に生物学的製剤が使用されている。RA 薬の国家支出は 4 千億円と高額である。約 1 割の患者は現在の治療が奏効しないとされる。近年、生物学的製剤により RA の治療成績は改善したが、関節破壊や機能障害を改善する効果は大きくなく、より強く関節の再生を促す治療法の開発が望まれる。

変形性関節炎 (OA) では機械的刺激などにより関節軟骨の変性・磨耗を生じ、関節軟骨・骨が変形する。運動機能障害や激しい疼痛によって患者の QOL は著しく低下する。自覚症状を有する国内患者は 1,000 万人と推定されている。現在は疼痛制御などの対処療法のみが選択肢であり、軟骨再生を促す治療薬はない。

近年、間葉系幹細胞を用いた関節再生療法が注目されているが、高額な治療費や治療効果の不安定さなど課題が山積している (Levy O, et al. Sci Adv. 2020;6(30):eaba6884)。一方、再生効果の多くは幹細胞が産生する液性因子によることが明らかとなってきた。このような背景から、細胞移植を伴わない、幹細胞が分泌する再生因子のみの投与による次世代再生医療の開発が望まれている (Baraniak PR, et al. Regen Med. 2010;5(1):121-43.)。

2. 研究の目的

我々は間葉系幹細胞であるヒト歯髄幹細胞の無血清培養上清 (SHED-CM) の多面的な組織再生効果を明らかにしてきた。さらに歯髄幹細胞 CM のセクレトーム解析によって新規再生因子である分泌型シアル酸認識レクチン sSiglec-9 を同定した。関節破壊後期の RA モデルマウスや TMJOA マウスに SHED-CM、あるいはリコンビナント sSiglec-9 を静脈内投与すると、破壊した関節軟骨や骨が再生することを見出した。本研究では関節軟骨および骨の治療・再生過程における、SHED-CM や Siglec-9 の治療メカニズムの解明を目指す。研究成果は、破壊された関節軟骨や骨の再生システムの一部を明らかにするとともに、新規な関節再生医薬品の開発に資する知見を提供する。

3. 研究の方法

SHED-CM および sSiglec-9 による関節軟骨や骨の再生メカニズムを解明するために、以下の 4 つの研究課題を設定した。

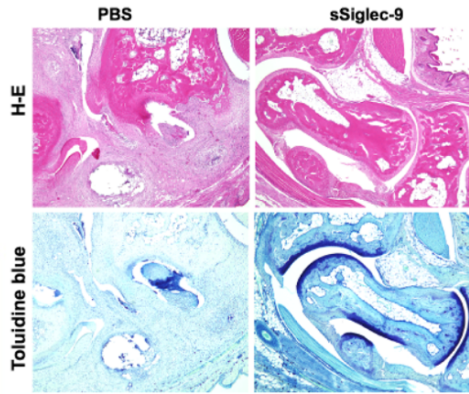
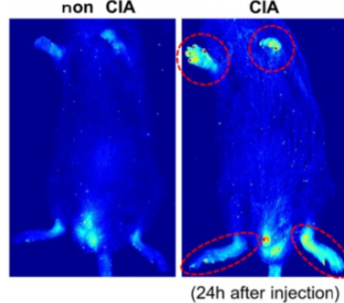
- (1) マウス RA モデルを用いて sSiglec-9 の治療効果と治療メカニズムを解析する。
- (2) sSiglec-9 の標的細胞を *in vivo* 関節炎で同定する。さらに *in vitro* 培養系を用いて標的細胞を分離し性状解析する
- (3) 標的細胞に対する sSiglec-9 の薬理活性・作用機序の解析
- (4) sSiglec-9 特異的受容体の同定、および関節再生課程における発現解析、機能解析

4. 研究成果

(1) CAIA マウスでは、炎症状態が最高値で7日間連続すると関節破壊が進行する。関節破壊後期から、歯髄幹細胞 CM あるいは sSiglec-9 を2回尾静脈投与、あるいは既存の RA 治療薬 JAKi (15mg/Kg) を6日間連続経口投与した。関節炎スコアの抑

【本研究の特色】

炎症性サイトカインを標的とした分子標的治療は病態の進行を抑制するが、損傷組織を再生する効果はない。本研究は破壊した関節の軟骨や骨の再生を促進する医薬品の開発と、関節組織の再生メカニズムの解明を目指す。

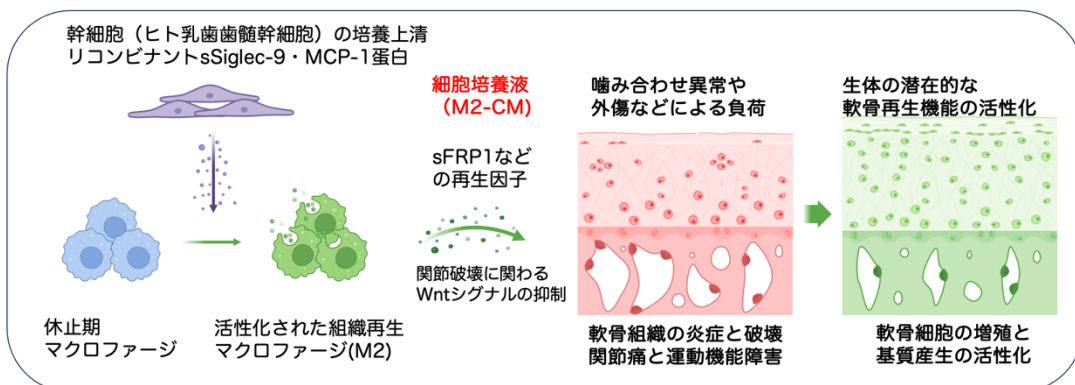


データの考察

(左) 蛍光ラベルしたsSiglec-9をマウスRAモデルにivすると関節炎に集積する。
(上) PBS投与群では炎症性細胞浸潤と関節破壊が激しい。sSiglec-9投与群では関節形態が著しく改善した。関節炎スコアも有意に改善した。

図1

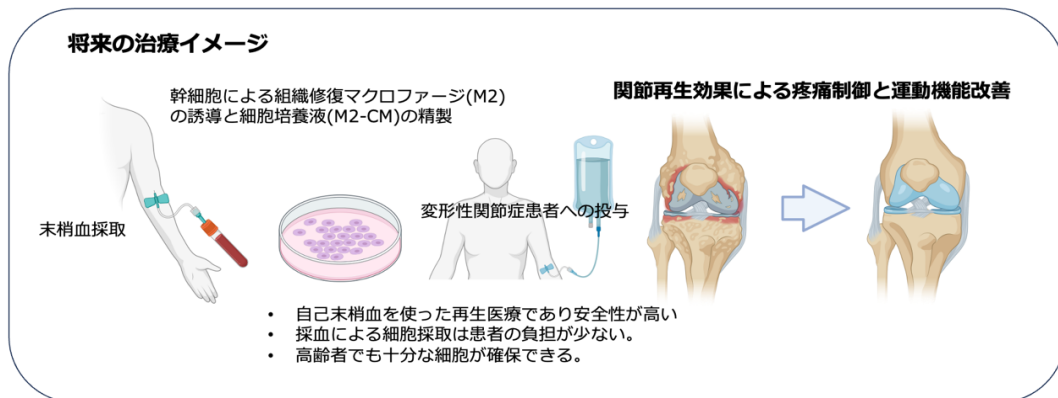
制効果は、歯髄幹細胞 CM 群、sSiglec-9 群と JAKi 群で同等であった。歯髄幹細胞 CM 及び sSiglec-9 を投与した CAIA マウス関節では抗炎症性滑膜 M2MΦ が優位に増加した(図1参照)。
(2) TMJOA マウスの関節損傷後に SHED-CM あるいは sSiglec-9/MCP-1 を2回尾静脈投与すると損傷した関節が再生することを見出した。RA モデルと同様に歯髄幹細胞 CM 及び sSiglec-9/MCP-1 を投与した TMJOA マウス関節では抗炎症性滑膜 M2 マクロファージ (MΦ) が優位に増加した。クロドロネート含有マンノース被覆型リポソーム (m-Clo) の全身投与によって、M2MΦ に細胞死を誘導し除去すると関節再生効果が消失した。クロドロネート非含有マンノース被覆型リポソーム (m-Enc) は、関節再生効果に影響しなかった。この結果から、SHED-CM 及び sSiglec-9/MCP-1 は、抗炎症性滑膜 M2MΦ の誘導を介して RA 及び OA 関節の再生を促すことが示唆された。
(3) SHED-CM 及び sSiglec-9/MCP-1 は、ナイーブな骨髄 MΦ 及び LPS で誘導した iNOS 陽性 M1MΦ を、in vitro において直接的に作用し Arg+M2MΦ に分化誘導した。M2MΦ の培養上清 (M2-CM) を TMJOA モデルに静脈内投与すると損傷した骨軟骨が再生することを見出した。
(4) 網羅的プロテオーム解析によって、M2-CM の軟骨再生因子として Wnt シグナル抑制因子である sFRP-1 を同定した。本研究では分泌型シアル酸認識レクチン sSiglec-9 が、抗炎症性滑膜 M2MΦ を誘導することで関節再生を促すことを明らかにした。M2MΦ は sFRP-1 を分泌し損傷軟骨の炎症性組織破壊環境を抗炎症性組織再生環境に変換するにによって関節再生を促すことが明らかになった。



一方、今回の研究で M2-CM を使った再生医療の可能性が明らかとなった。標準的な自家移植された骨髄間葉系幹細胞(MSC)移植と比べての利点を以下に示す。

- ・ MSC を取り出すには手術が必要だが、マクロファージは末梢血から採取できる (低侵襲)。
- ・ MSC の数や分化能は年齢とともに低下するが、末梢血中のマクロファージの数や活性は大幅に変化しない (リソース安定性)。
- ・ MSC は若い個体から取り出して細胞バンクに保管する必要がある、管理には費用がかかる (低コスト)。
- ・ 炎症環境に移植した MSC やマクロファージは生存率が低く、治療効果が不安定。細胞培養施設で生産された M2-CM は安定した治療効果を発揮する (治療効果の安定性)。

本研究により、末梢血から得られるマクロファージによる関節再生医療の可能性が示唆された。安全で低コストの再生医療の実現が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Liu Yao, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Xia Linze, Zhou Qiao, Feng Xingmei, Hibi Hideharu, Miyazaki Aya, Iwamoto Tsutomu, Matsuka Yoshizo, Zhang Zhijun, Tanaka Eiji, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Conditioned Medium From the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Neuropathic Pain in a Partial Sciatic Nerve Ligation Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.745020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Ueda Tomoyuki, Ito Taisei, Inden Masatoshi, Kurita Hisaka, Yamamoto Akihito, Hozumi Isao	4. 巻 13
2. 論文標題 Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth-Conditioned Medium (SHED-CM) is a Promising Treatment for Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.805379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Narwidina Anrizandy, Miyazaki Aya, Iwata Kokoro, Yamakawa Yoshihito, Akazawa Yuki, Kitamura Takamasa, Hasegawa Tomokazu, Yoshizaki Keigo, Fukumoto Satoshi, Yamamoto Akihito, Ishimaru Naozumi, Iwasaki Tomonori, Iwamoto Tsutomu	4. 巻 650
2. 論文標題 Iroquois homeobox 3 regulates odontoblast proliferation and differentiation mediated by Wnt5a expression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.02.004	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 Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Liu Yao, Xia Linze, Nishihara Takaaki, Oki Wakana, Kawarabayashi Keita, Mizusawa Noriko, Aota Keiko, Sakai Takayoshi, Azuma Masayuki, Hibi Hideharu, Iwasaki Tomonori, Iwamoto Tsutomu, Horimai Nobuyasu, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Therapeutic benefits of factors derived from stem cells from human exfoliated deciduous teeth for radiation-induced mouse xerostomia	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29176-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Waskitho Arief, Yamamoto Yumiko, Raman Swarnalakshmi, Kano Fumiya, Yan Huijiao, Raju Resni, Afroz Shaista, Morita Tsuyoshi, Ikutame Daisuke, Okura Kazuo, Oshima Masamitsu, Yamamoto Akihito, Baba Otto, Matsuka Yoshizo	4. 巻 13
2. 論文標題 Peripherally Administered Botulinum Toxin Type A Localizes Bilaterally in Trigeminal Ganglia of Animal Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 704 ~ 704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins13100704	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 Liu Yao, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Xia Linze, Zhou Qiao, Feng Xingmei, Hibi Hideharu, Miyazaki Aya, Iwamoto Tsutomu, Matsuka Yoshizo, Zhang Zhijun, Tanaka Eiji, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Conditioned Medium From the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Neuropathic Pain in a Partial Sciatic Nerve Ligation Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.745020	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 Iwata Kokoro, Kawarabayashi Keita, Yoshizaki Keigo, Tian Tian, Saito Kan, Sugimoto Asuna, Kurogoushi Rika, Yamada Aya, Yamamoto Akihito, Kudo Yasuei, Ishimaru Naozumi, Fukumoto Satoshi, Iwamoto Tsutomu	4. 巻 237
2. 論文標題 von Willebrand factor D and EGF domains regulate ameloblast differentiation and enamel formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Physiology	6. 最初と最後の頁 1964 ~ 1979
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcp.30667	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 Ueda Tomoyuki, Ito Taisei, Inden Masatoshi, Kurita Hisaka, Yamamoto Akihito, Hozumi Isao	4. 巻 13
2. 論文標題 Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth-Conditioned Medium (SHED-CM) is a Promising Treatment for Amyotrophic Lateral Sclerosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2022.805379	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 Xia Linze, Kano Fumiya, Hashimoto Noboru, Liu Yao, Khurel-Ochir Tsendsuren, Ogasawara Naoko, Ding Cheng, Xu Yang, Hibi Hideharu, Iwasaki Tomonori, Tanaka Eiji, Yamamoto Akihito	4. 巻 13
2. 論文標題 Conditioned Medium From Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Alleviates Mouse Osteoarthritis by Inducing sFRP1-Expressing M2 Macrophages	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cells Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 399 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/stcltm/szae006	査読の有無 無
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0件

〔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
研究分担者	高橋 伸典 (TAKAHASHI Nobunori) (20570196)	愛知医科大学・医学部・教授 (33920)	
研究分担者	加納 史也 (KANO Fumiya) (40801626)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	
研究分担者	橋本 登 (HASHIMOTO Noboru) (90712365)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・助教 (16101)	

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
---------	---------