

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20937

研究課題名（和文）サイトカイン刺激したMSC由来細胞外小胞の肩腱板断裂に対する骨腱部修復効果の解明

研究課題名（英文）Effects of cytokine-stimulated MSC-derived extracellular vesicles on bone-tendon healing of shoulder rotator cuff tears.

研究代表者

花井 洋人（Hanai, Hiroto）

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90964437

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 200,000円

研究成果の概要（和文）：間葉系間質細胞(mesenchymal stroma cell, MSC)は、エクソソームを主体とする細胞外小胞(small extracellular vesicles, sEVs)を分泌し、細胞間の情報伝達を行うことで、組織修復に寄与することが知られており、腱板断裂などの運動器組織に対する再生医療としても注目を集めている。本分野において、MSCの培養条件の違いによって分泌された異なるsEVsの評価はなされていない。本研究にて、IFN- γ でプレコンディショニングされたMSCが分泌するsEVsは、通常のsEVsに比べて分泌量や発現するタンパク質の組成が変化していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肩腱板断裂に対して、関節鏡を用いた修復術の発展により低侵襲治療が可能となってきたが、実際には20%程度の頻度で再断裂を合併し、術後の肩安静固定期間が数ヶ月に及んでいる現状がある。本研究で得られた研究成果は、今後臨床現場においても質の良い腱板の短期的な修復の新たな知見になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mesenchymal stromal cells (MSCs) secrete small extracellular vesicles (sEVs), mainly exosomes, and are known to contribute to tissue repair by transmitting information between cells. MSCs have attracted attention as a regenerative medicine for musculoskeletal tissues such as rotator cuff tears. In this field, different sEVs secreted by MSCs under different culture conditions have not been evaluated. In this study, it was revealed that sEVs secreted by MSCs preconditioned with IFN- γ had altered secretion amount and protein composition compared to normal sEVs.

研究分野：整形外科

キーワード：エクソソーム 間葉系間質細胞 肩腱板断裂

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系間質細胞(mesenchymal stroma cell, MSC)は、直径 50~200nm 程度のエクソソームを主とする細胞外小胞(small extracellular vesicles, sEVs)を分泌し、内包されている miRNA 等を介して損傷組織に対して免疫調整効果を示すことが知られている。MSC 由来 sEVs を用いたセルフリーセラピーは、細胞治療の免疫反応の問題を解決し、同等の有効性を持つことから、運動器組織に対する再生医療として注目されている(Wu, et al. *Cytherapy*. 2018)。自然治癒しない肩腱板断裂においても、修復手術への補助としての sEVs の治療促進効果が報告され、新たな治療法の可能性が示唆されている(Connor, et al. *J Bone Miner. Metab.* 2019)。

腱板断裂は骨と腱の境界部で発生するため、異なる結合組織間での組織修復が必要である。修復過程における詳細なメカニズムの全貌は未だ解明されていないが、一般に、修復初期において、新生血管の減少や炎症性マクロファージによる炎症環境の長期化が骨-腱の治癒を遅らせ脆弱な癒痕組織形成を来すと考えられている(Sunwoo, et al. *J Orthop. Res.* 2020)。MSC 由来 sEVs は骨-腱部において、血管増生やマクロファージの極性変化に重要な役割を担い、強固な組織へ修復促進すると報告されている(Huang, et al. *Stem Cell Res. Ther.* 2020)。

一方で、MSC は培養中に IFN- γ などで炎症環境を一定期間惹起させることで、より高い治療特性を有する性質へと変化することが知られている(Saparov, et al. *Stem Cells Int.* 2016)。そのため、IFN- γ プレコンディショニング MSC (pcMSC) 由来の sEVs も、従来の MSC 由来 sEVs より高い治療効果が期待され、肝線維症や腸炎疾患において検証がなされている(Yang, et al. *Cell Death Dis.* 2020, Takeuchi, et al. *NPJ Regen. Med.* 2021)。現在、腱板断裂の治療効果検証に用いられている sEVs は、通常条件で培養された MSC 由来であり、pcMSC 由来など質の異なる sEVs を用いて治療効果を比較した研究はない。

2. 研究の目的

MSC 由来の sEVs が骨-腱修復に与える影響がプレコンディショニングによっていかに変化するのかという命題は明らかにされていない。骨-腱修復において、より高い治療効果を有する sEVs 調製のための MSC プレコンディショニング条件の確立が望まれる。

本研究の目的は、pcMSC から得られた sEVs が骨-腱修復に与える影響がいかに変化するかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

刺激薬剤を IFN- γ に選定し、濃度(1, 10, 100 ng/ml)を振り分け、48 時間の事前刺激を与え、各条件における MSC の生存率や MSC 特性を評価した。MSC の起源は脂肪組織由来を用いて検討した。ExoScreen 法(Yoshioka, et al. *Nat. Commun.* 2014)を用いて各条件において MSC より分泌される CD9/CD63 陽性 sEVs を定量した。また、培養上清中のサイトカイン量を測定した。通常培養 sEV(N-sEV)と指摘と考えられる濃度条件で得られた pc-sEV(P-sEV)を回収し、培養マクロファージに添加することで、炎症性マクロファージの細胞比率を評価した。

4. 研究成果

細胞生存率はいずれの条件でも 95%以上を維持することができ、増殖能は濃度の上昇とともに漸減することが判明した(図 1)。また、一般的な MSC 陽性/陰性マーカーは刺激にかかわらず変動を認めなかった一方で、PDL-1 や HLA-DR などのタンパク質は、刺激濃度とともに発現陽性細胞率が増加した。同様に PDL-1, CCL2, IDO1 などの炎症調整に関与する遺伝子発現は濃度依存的に上昇した(図 2)。IL6, TGF β 1 は刺激無しのコントロール群と比較していずれの濃度においても発現の上昇を認めた。

また、細胞から分泌される CD9 または CD63 陽性 sEVs 定量評価を行ったが、CD9 陽性 sEVs は

刺激により減少したが、CD63 陽性 sEVs は低濃度刺激では減少するものの、濃度依存的に増加する結果となった。IFN- 刺激により MSC から種々のサイトカインが培養上清中に放出されたが、sEVs を回収する工程（限外ろ過）により sEVs 溶液中からはサイトカインは wash out されることが確認できた。その一方で、P-sEV に内包される IDO1 タンパク質の発現が上昇することも判明した（図3）。

LPS で刺激させたマウス由来マクロファージ様細胞に P-sEVs を添加することで、N-sEVs と比較し炎症性マクロファージの細胞の比率が減少する事象が確認できた。

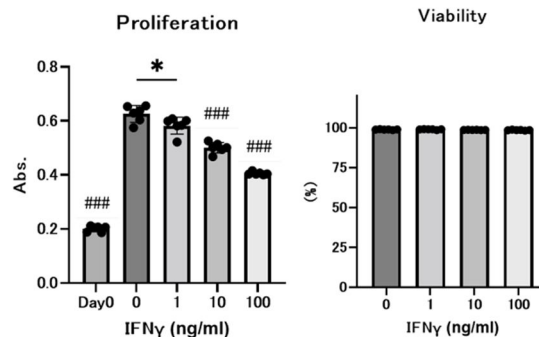


図1 IFN- 刺激に対する ASC 細胞増殖能、生存率。

IFN- 刺激により ASC の細胞増殖が抑制された。

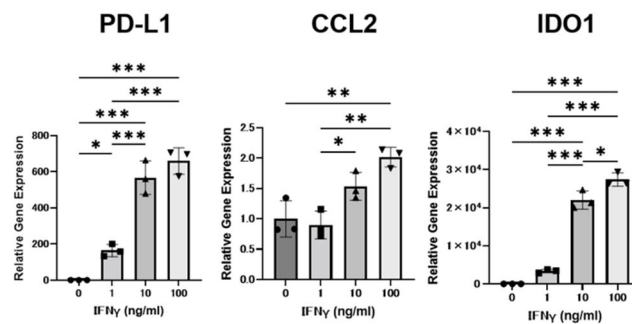


図2 IFN- 刺激に対する ASC の以前肢発現変動。

IFN- 刺激により ASC の炎症調整に関する遺伝子発現が変動した。

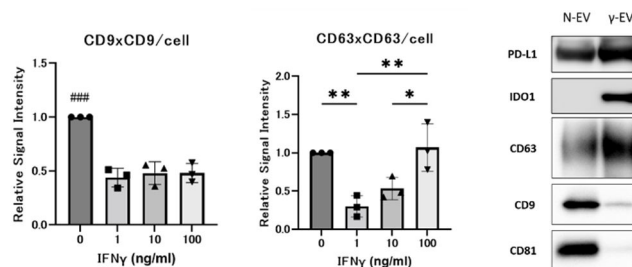


図3 IFN- 刺激に対する ASC 由来 sEVs の分泌量と組成。

IFN- 刺激により ASC 由来 sEVs の分泌量や表面マーカー、内包物が変動した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hanai Hiroto, Hart David A., Jacob George, Shimomura Kazunori, Ando Wataru, Yoshioka Yusuke, Ochiya Takahiro, Nakagawa Shinichi, Nakamura Masato, Okada Seiji, Nakamura Norimasa	4. 巻 12
2. 論文標題 Small extracellular vesicles derived from human adipose derived mesenchymal stromal cells cultured in a new chemically defined contaminate free media exhibit enhanced biological and therapeutic effects on human chondrocytes in vitro and in a mouse osteoarthritis model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	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） 10.1002/jev2.12337	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 Yokota Naomasa, Lyman Stephen, Hanai Hiroto, Shimomura Kazunori, Ando Wataru, Nakamura Norimasa	4. 巻 50
2. 論文標題 Clinical Safety and Effectiveness of Adipose-Derived Stromal Cell vs Stromal Vascular Fraction Injection for Treatment of Knee Osteoarthritis: 2-Year Results of Parallel Single-Arm Trials	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 2659 ~ 2668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03635465221107364	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 花井洋人
2. 発表標題 変形性関節症に対する治療効果を有する高純度脂肪由来間葉系間質細胞由来 細胞外小胞の回収法の確立
3. 学会等名 第38回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花井洋人
2. 発表標題 Extracellular vesicles with high purity derived from ASC cultured in a new medium suppresses progression of osteoarthritis in a mouse model
3. 学会等名 17th ICRS World Congress 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 花井洋人
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来細胞外小胞(エクソソーム)を用いた変形性膝関節症治への臨床応用
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2023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
---------	---------