

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689057

研究課題名(和文)変形性関節症における新規関節内コミュニケーション因子としての分泌マイクロRNA

研究課題名(英文) Exosomes including microRNA as a new mediators of communication among joint cells in OA pathogenesis

研究代表者

味八木 茂 (Miyaki, Shigeru)

広島大学・大学病院・講師

研究者番号：10392490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円

研究成果の概要(和文)：IL-1 刺激により滑膜細胞由来のエクソソームは、その分泌量を増加させ、関節軟骨細胞に対して変形性関節症様の変化や血管新生を誘導した。そして、IL-1 刺激によりエクソソーム内のmiRNAの種類や量が変化していたことから、サイトカインのような確立された細胞間伝達機構だけでなくmiRNAを含むエクソソームが新たな組織間コミュニケーション因子として異なる細胞間や組織間に作用してOA発症に関わっている可能性が示唆された。また、間葉系幹細胞由来のエクソソームは組織修復を促進することから、miRNAを含むエクソソームは変形性関節症の治療や組織再生への応用につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes from IL-1 stimulated synovial fibroblasts induce OA-like changes both in vitro and in ex vivo models. Exosomes represent a novel mechanism by which pathogenic signals are communicated among different cell types in OA-affected joints. Our observations suggest that not only established signaling molecules, such as cytokines and hormones, but also exosomes including microRNA, as mediators of communication among different joint cells and tissues play an important role in osteoarthritis pathogenesis as a new regulatory mechanism. Furthermore, exosomes including miRNAs from mesenchymal stem cells promote tissue repair from injury. These results may explain the mechanism of tissue repair, in addition to their secretion of cytokines, or growth factors and may be a new therapeutic tool.

研究分野：整形外科 軟骨代謝

キーワード：microRNA エクソソーム 変形性関節症 組織再生 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

変形性関節症 (OA) は、多くの人が罹患する一般的な疾患であり、我が国においてもその患者数は約 1000 万人ともいわれている。しかし、現在まで OA に対する治療は、痛みに対する対処療法および最終的に人工関節への置換によるものであり、その原因療法や早期診断法の確立には至っていない。これらの問題を解決するためには、OA 発症の分子機構をより明らかにすることで、OA 治療や早期診断につながる原因療法を目指した標的分子を解明していくことが必要である。我々は、遺伝子発現の新たな制御分子である microRNA (miRNA) に注目して研究を行っている。そして、miR-140 が軟骨特異的に発現することを明らかにし、正常軟骨に比べ、OA 患者の軟骨でその発現が低下し、遺伝子発現の異常に関与していた (Miyaki S et al. *Arthritis Rheum*, 2009)。この結果をもとに、miR-140 の遺伝子改変マウスを作製し解析したところ、miRNA が軟骨基質分解酵素である *Adams-5* を直接的に制御することで関節軟骨の恒常性を維持し、OA 発症に関与していることを明らかにした (Miyaki S et al. *Gene Dev*, 2010)。しかし、軟骨は無血管であり、豊富な細胞外マトリックスに囲まれていることからこの miR-140 を標的とした合成 miRNA の補充療法などは、軟骨内への核酸デリバリーの問題なども予想される。そこで新たな治療ターゲットやバイオマーカーによる早期診断法の確立のためにも画期的な細胞外シグナルとしての新しい分子ターゲットが必要であると考えた。

これまで miRNA は、細胞内で機能し、速やかに分解されると考えられていた。しかし、最近 miRNA は、エクソソームといったエンドソーム由来の小胞顆粒に包まれた形で細胞外に分泌し、血漿など体液中に存在し、循環していることが明らかになってきた。そして、がん患者で高発現している分泌 miRNA が報告され、診断マーカーとしての可能性も示されている。さらに興味深いことは、細胞より分泌された miRNA は、標的細胞内へ移動し、標的遺伝子の発現を制御することで細胞機能を制御していることが報告された。このことは、分泌 RNA が細胞間、組織間を行きかい相互作用するサイトカインのような機能があると考えられる。また、細胞療法としての幹細胞移植効果は、幹細胞による目的細胞への分化というよりも移植した幹細胞から分泌するエクソソームにその修復効果があるといった報告もある。以上のことから新たな細胞間コミュニケーション因子としてエクソソームに含まれる分泌 miRNA に注目した。しかし、分泌 miRNA は、どのように放出され、細胞に受容されて、そして病態生理学的に機能しているのか未だほとんど理解されていない。そこで、「OA は、疾患時期特異的な分泌 miRNA のプロファイルにより特徴づけることができ、これら分泌 miRNA は関節組織間ネ

ットワークの新たなコミュニケーション因子として機能し、OA 発症に関与する」という仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究は、  
(1) 関節構成細胞および関節液における分泌 miRNAs を含むエクソソームの関節内機能を解明  
(2) OA 患者由来の関節液および軟骨細胞、滑膜細胞より分泌するエクソソーム中の miRNAs 発現プロファイルを決定  
(3) 分泌 miRNAs を含むエクソソームを標的とした OA 治療と診断法への応用

これらを通じて新たな細胞間コミュニケーション因子である分泌 miRNA を含むエクソソームが、OA 発症に関与することを明らかにし、そのエクソソーム中の分泌 miRNA を同定する。そして、新たな OA 発症ネットワークを提唱し、新規治療ターゲットおよび診断マーカーとしての可能性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト滑膜細胞由来のエクソソームの *in vitro* 解析

① 滑膜細胞への IL-1 $\beta$  刺激によるエクソソーム分泌量の解析: ヒト滑膜細胞への IL-1 $\beta$  刺激が、エクソソームの分泌量に影響があるかどうかを明らかにするために、培養上清中のエクソソームを含む微粒子数や粒子径を qNano システムおよびエクソソームマーカーをウェスタンブロット法により解析した。

② 滑膜細胞より分泌したエクソソームの軟骨細胞への影響

IL-1 $\beta$  刺激および OA 患者滑膜細胞由来の OA 様エクソソームが軟骨細胞にどのような影響を及ぼすのかを検討した。OA 様エクソソームが、軟骨細胞において軟骨分解酵素である *MMP-13* や *ADAMTS5* や軟骨基質である *COL2A1* や *AGGREAN* の遺伝子発現に影響を及ぼすのかリアルタイム PCR により解析した。さらに、マウス関節軟骨 *ex vivo* 培養モデルを用いてエクソソーム添加による軟骨基質であるグリコサミノグリカン放出量を定量した。

③ 血管新生への影響

OA 様エクソソームが、血管新生に対してどのような効果を示すのかを血管内皮細胞を用いて遊走能および管腔形成能を評価した。

(2) OA 様エクソソームに含まれるサイトカインや miRNA の解析

① エクソソームに含まれるサイトカイン IL-1 $\beta$  刺激した滑膜細胞と刺激なしの滑膜細胞の培養上清中、培養上清中よりエクソソームを除いた上清そしてエクソソームに含

まれるサイトカインを BioPlex システム (BioRad)により測定した。

② エクソソームに含まれる miRNA

エクソソーム中に存在する何が OA 発症に重要なのか、またどのような状況下でどの miRNA を含むエクソソームが分泌してくるのかを明らかにするために、miRNA に注目した。エクソソームは、培養上清より単離し、smallRNA を精製した。エクソソーム中の miRNA は、nCounter システムを用いてプロファイリングした。

(3) エクソソーム構成分子である CD9, CD9/81 ノックアウトマウスを用いた解析

① CD9, CD9/81 ノックアウトマウスを用いた OA モデル

CD9およびCD9/81 ノックアウトマウスに加齢、靭帯切除、一過性の炎症誘導モデルの3つのモデルにより OA を誘導した。サフラニン O 染色により膝関節を病理組織学的に解析し、OA スコアや滑膜スコアを用いて OA 発症の程度を評価した。

② CD9, CD9/81 ノックアウトマウス軟骨細胞由来の培養上清中のエクソソーム解析

エクソソーム構成分子である CD9 や CD81 のノックアウトは、エクソソームの形成不全などに伴い分泌不全を起こるのではないかと考えた。そこで、CD9 および CD9/81 ノックアウトマウスより軟骨細胞を採取し、培養上清中のエクソソームや粒子数を解析した。また、血清よりエクソソームを単離し、同様に解析を行った。

(4) 分泌型 miRNA による OA 治療への応用  
骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) は、軟骨をはじめ多くの細胞に分化することが知られており、細胞移植治療に用いられる細胞である。この移植効果は、細胞分化による組織再生というよりも、MSC より分泌されるサイトカインなどの因子によると考えられている。そこで MSC より分泌するエクソソームは、治療効果があるのではないかと考えた。

① MSC 由来エクソソームの組織再生に対する効果

MSC の培養上清よりエクソソームを単離し、筋損傷マウスの損傷部位に局所投与することで組織再生に対する効果を解析した。

② エクソソームフォーム miRNA の取得

miRNA をリポフェクション法により過剰導入し間葉系幹細胞 (MSC) の培養上清を超遠心法によりエクソソーム層とそれ以外の上清に分離し、この3種類のサンプルより small RNA を精製し、各層における miR-140 の量をリアルタイム PCR により測定した。

③ エクソソームフォーム miRNA の細胞への取り込み

培養上清およびエクソソーム層とエクソソーム除いた上清を各々軟骨細胞へ添加し、細胞への取り込みについて miR-140 量をリアルタイム PCR により解析することで決定した。

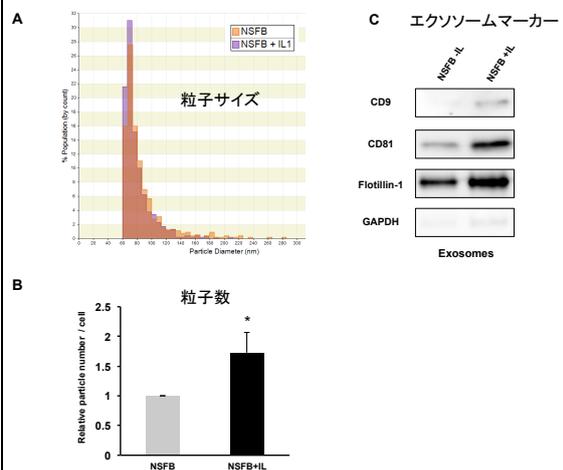
4. 研究成果

(1) ヒト滑膜細胞由来エクソソームの *in vitro* 解析

① 滑膜細胞への IL-1b 刺激によるエクソソーム分泌量の解析

滑膜細胞より分泌する微小胞は、直径 60~120nm ほどのサイズであり、IL-1b 刺激によりその分泌数は増加していた (図 1A, B)。そして、エクソソームの構成成分であるマーカーは、培養上清中で増加していた (図 1C)。

図1. 滑膜細胞より分泌する微小胞の解析

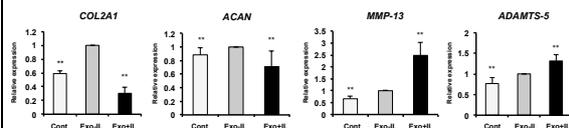


② 滑膜細胞より分泌したエクソソームの軟骨細胞への影響

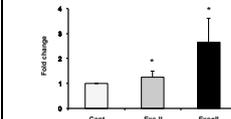
IL-1b 刺激滑膜細胞由来の OA 様エクソソームが軟骨細胞にどのような影響を及ぼすのかを検討した。OA 様エクソソームは、軟骨細胞において軟骨分解酵素である MMP-13 や ADAMTS5 の発現を増加させ、軟骨基質である COL2A1 や AGGREAN の発現を減少させた (図 2A)。そして、軟骨 *ex vivo* 培養においても OA 様エクソソームの添加は、軟骨基質の分解を誘導した (図 2B)。

図2. OA様エクソソームの軟骨への影響

A: OA様エクソソームによる OA関連遺伝子の発現変化



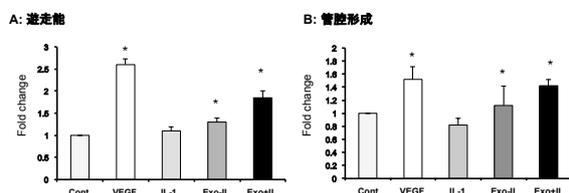
B: OA様エクソソームによる軟骨基質分解



### ③ 滑膜細胞由来エクソソームによる血管新生への影響

OA 様エクソソームは、血管内皮細胞の遊走能 (図 3A) や管腔形成能 (図 3B) を促進することから、血管新生能があり OA の病態発症や進行に関与している可能性が示唆された。

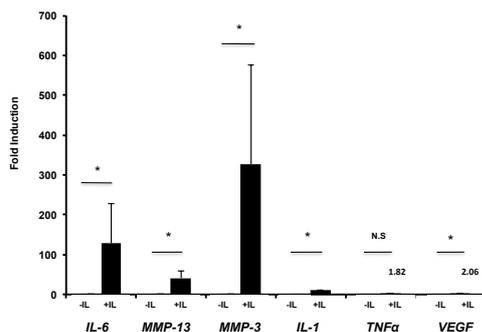
図3. OA様エクソソームの血管新生への影響



### (2) OA 様エクソソームに含まれる miRNA やタンパク質の解析

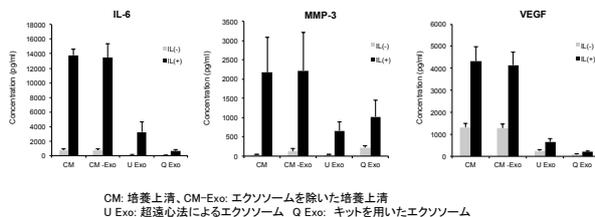
IL-1 $\beta$  刺激は、滑膜細胞内の炎症性サイトカインや軟骨基質分解酵素の遺伝子発現を増加させる (図 4)。

図4. IL-1 $\beta$ 刺激による滑膜細胞における遺伝子発現の変化



① エクソソームに含まれるサイトカイン 炎症性サイトカインである IL-6、軟骨分解酵素である MMP-3、血管新生因子である VEGF は培養上清中および培養上清中よりエクソソームを除いた上清には多く含まれていたが、エクソソームではそれらに比べて低濃度であった (図 5)。

図5. 培養上清中とエクソソームにおけるOA関連サイトカインの濃度



### ② エクソソームに含まれる miRNA

エクソソームに含まれる miRNA のプロファイルを行った。その結果、無刺激と比べて IL-1 $\beta$  刺激した滑膜細胞内で2倍以上増加している miRNA は 340 種類、減少している miRNA

は 24 種類認められた。そして、OA 様エクソソーム内で増加した miRNA が 11 種あり、そのうち 6 種類がエクソソーム内のみで増加していた。減少した miRNA は 39 種類だった。上記に示した OA 様エクソソームの作用は、これら増加もしくは減少した miRNA によるかもしれない。今後、健常者および OA 患者由来の関節液中に含まれるエクソソーム数を測定し、軟骨細胞など関節組織に影響を与えるか、そして、エクソソーム内の鍵分子や miRNA について同定していく必要がある。

以上の結果より、サイトカインのような確立されたシグナル伝達機構だけでなく miRNA を含むエクソソームが新たなコミュニケーション因子として異なる細胞間や組織間に作用して OA 発症に関与している可能性が示唆された。

### (3) エクソソーム構成分子である CD9, CD9/81 ノックアウトマウスを用いた解析

① CD9, CD9/81 ノックアウトマウスを用いた OA モデル

CD9, CD9/81 ノックアウトマウスを用いて加齢マウス (6, 12, 22 ヶ月齢)、靭帯切除モデル、antigen induced arthritis (AIA) の3つのモデルを作製し、膝関節の病理組織学的な検討を行った。この結果、CD9 および CD9/81 ノックアウトマウスは、軟骨変性や炎症などを抑制する傾向を示しているが、結論を出すにはさらなる検討が必要である。

② CD9, CD9/81 ノックアウトマウス軟骨細胞由来の培養上清中のエクソソーム解析

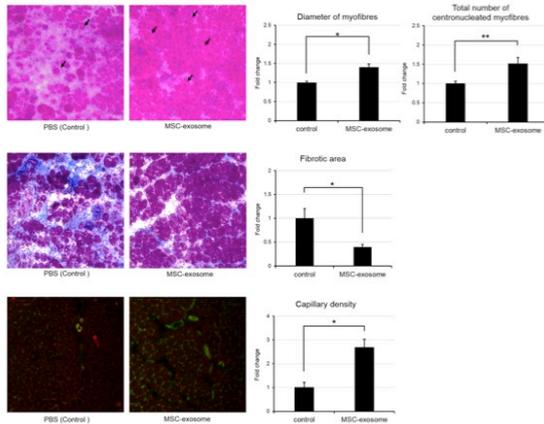
CD9 および CD9/81 ノックアウトマウスより軟骨細胞を採取し、培養上清中や血清の粒子数およびエクソソームマーカーを解析したが、ばらつきが多く CD9, CD9/81 ノックアウトにより顕著なエクソソームの分泌低下はみられなかった。解析方法を検討するなど引き続きさらなる解析を行う予定である。

### (4) 分泌型 miRNA による OA 治療への応用

① MSC 由来エクソソームの組織再生に対する効果

筋損傷マウスへの MSC 由来エクソソームの投与は、筋分化や血管新生の促進を介して筋再生を促進させた (図 6)。このエクソソーム中には、筋再生関連のサイトカインなどはエクソソームを除いた培養上清中比べて極めて低濃度であった。そこで、エクソソーム中の miRNA をプロファイリングした結果、豊富に含まれていた miRNA を筋芽細胞である C2C12 や血管内皮細胞に導入したところ筋分化および血管新生の促進効果を示した。

図6. MSC由来エクソソームは筋再生を促進する



② エクソソームフォーム miRNA の取得  
目的の合成 miRNA を MSC に過剰導入することで、培養上清中にエクソソームフォームの miRNA として放出された。

③ エクソソームフォーム miRNA の細胞への取り込み  
エクソソームフォーム miRNA は、他細胞に添加するだけで、細胞に取込まれ、目的 miRNA を容易に導入できた。

これらの結果は、MSC 由来のエクソソームは、組織再生を促す機能があり、さらに目的 miRNA を豊富に含むキャリアとしても新たな治療方法の開発などへ応用可能であるかもしれない。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文 査読有] (計 3 件)

1. Nakamura Y\*, Miyaki S\* (co-first author), Ishitobi H, Matsuyama S, Nakasa T, Kamei N, Akimoto T, Higashi Y, Ochi M. Mesenchymal-stem-cell-derived exosomes accelerate skeletal muscle regeneration. *FEBS Lett*, 589(11):1257-65, 2015.
2. Kato T\*, Miyaki S\* (co-first author), Ishitobi H, Nakamura Y, Nakasa T, Lotz MK, Ochi M. Exosomes from IL-1beta stimulated synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular chondrocytes. *Arthritis Res Ther*, 16(4): R163, 2014.
3. Shimbo K, Miyaki S\* (co-first author), Ishitobi H, Kato Y, Kubo T, Shimose S, Ochi M. Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem Biophys Res Commun*, 445 (2): 381-387, 2014.

[和文総説 査読無]

4. 味八木 茂、「制御因子からみた軟骨変性機構」、変形性関節症の診断と治療 別冊整形外科 67, 2015
5. 味八木 茂、「変形性関節症における microRNA の役割」臨床雑誌 整形外科 VoL. 66 No. 4 2015
6. 味八木 茂、「新たな細胞間コミュニケーション因子としての分泌 microRNA」臨床整形外科 Vol. 47 No. 11 2012
7. 味八木 茂、「関節疾患における microRNA の役割」メディカルサイエンスダイジェスト Vol. 38 No. 3 2012

[学会発表] (計 14 件)

1. N. Sumiyoshi, The role of the tetraspanin CD9 in a mouse model of antigen-induced arthritis, Orthopaedic Research Society (ORS), March 28-31, 2015, Las Vegas (USA)
2. 加藤智弘、IL-1beta 刺激滑膜細胞由来のエクソソームは軟骨細胞に関節症変化を引き起こす 第 28 回日本軟骨代謝学会 2015 年 3 月 6 日・7 日、東京医科歯科大学 (東京・文京区)
3. 中邑祥博、microRNA を含む間葉系幹細胞由来エクソソームは骨格筋再生を促進する、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日、10 日 城山観光ホテル (鹿児島市)
4. 住吉範彦、関節炎におけるテトラスパニン CD9 の役割の解析-、第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 年 10 月 9 日、10 日 城山観光ホテル (鹿児島市)
5. N. Sumiyoshi, The role of tetraspanin CD9 in pathogenesis of osteoarthritis, Osteoarthritis Research Society International (OARSI), April 25- 27, 2014, Paris (France)
6. 味八木茂 シンポジウム 軟骨変性病態変形性関節症における microRNA の役割、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日、18 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉市)
7. 住吉範彦、変形性関節症におけるテトラスパニン CD9 の役割 -CD9 ノックアウトマウスを用いた OA model の解析-、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日、18 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉市)

8. 加藤智弘、尿中 microRNA の変形性関節症バイオマーカーとしての可能性、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日, 18 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉市)
9. 中邑祥博、間葉系幹細胞由来のエクソソームは筋芽細胞の筋分化を促進する、第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日, 18 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉市)
10. 新保慶輔、分泌型 microRNA による骨肉腫細胞への抑制効果 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 2013 年 10 月 17 日, 18 日 幕張メッセ国際会議場 (千葉市)
11. Kato Tomohiro, Exosomes derived from osteoarthritis synovial fibroblasts induce osteoarthritic changes in articular cartilage. ORS (Orthopaedic Research Society), 2013 年 1 月 26-29 日, San Antonio (USA)
12. 加藤智弘、変形性関節症 (OA) 滑膜細胞由来エクソソームは関節軟骨に OA 様変化を引き起こす 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 26-27 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
13. 中邑祥博、OA 様の滑膜線維芽細胞から分泌されるエクソソームは血管新生を促進する、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012 年 10 月 26-27 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
14. Nakamura Yoshihiro. Exosomes from osteoarthritic synovial fibroblasts promote angiogenesis. OARSI (Osteoarthritis Research Society International), 2012 年 4 月 26-29 日, Barcelona (Spain)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

味八木 茂 (Miyaki Shigeru)

広島大学・病院・講師

研究者番号：10392490