

Bone marrow-derived humoral factors suppress oxidative phosphorylation, upregulate TSG-6, and improve therapeutic effects on liver injury of mesenchymal stem cells

(骨髄由来液性因子は間葉系幹細胞の酸化リン酸化を抑制、TSG-6産生を亢進し、肝障害に対する治療能を向上させる)

氏名 宮地 隆史

所属 山口大学大学院医学系研究科

医学専攻 消化器内科学分野

令和2年 1月

目 次

1.	要旨	1
2.	背景	2
3.	方法	3
4.	結果	1 1
5.	考察	1 5
6.	結語	1 8
7.	謝辞	1 8
8.	文献	1 9
9.	脚注	2 6
10.	図表	2 9

1. 要旨

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) は各種再生療法への応用が期待される一方、その品質向上が求められている。我々は骨髄微小環境を再現して培養骨髄 MSC (Bone marrow-derived MSC : BM-MSC) の幹細胞性 (stemness) を維持すべく、全骨髄細胞による調整培地 (BM cells-conditioned medium : BMC-CM) を作成し、その BM-MSC への効果を評価した。BMC-CM は、長期培養ラット BM-MSC の細胞形態の変容や増殖能の低下を抑制するとともに、ミトコンドリア酸化的リン酸化 (OXPHOS) 活性を抑制し、OXPHOS 抑制因子である hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) や Sirtuin 3, 4, 5 (Sirt3, Sirt4, Sirt5) の mRNA 発現を亢進した。BMC-CM はさらに培養 BM-MSC の TNF-stimulated gene 6 (TSG-6) 産生能を亢進させるとともに、四塩化炭素腹腔内反復投与ラットの肝障害に対する治療能を向上させた。BMC-CM から 20~220nm の粒子を除去することによってこれらの効果が減弱することから、我々は骨髄由来エクソソーム miRNA の解析を加えた。BMC-CM 作成過程で増加する 49 の miRNA のうち、OXPHOS 抑制や TSG-6 発現亢進に関与する複数の miRNA がみいだされるとともに、その多くが肝疾患との関与が報告されるものであった。骨髄由来の液性因子は、肝再生療法に用いる培養 BM-MSC の品質を向上させ得る。

キーワード : 間葉系幹細胞、酸化的リン酸化、TNF-stimulated gene 6、microRNA、肝再生

2. 背景

間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell : MSC) は、肝を含む各種臓器の再生療法における有望な細胞源として期待されており、その臨床応用も広く進められている [1]。また MSC は多分化能以外にも多くの治療機序を有することが知られるに至り [2-4]、現在では急性期疾患や免疫異常等を含むより多くの疾患に対する MSC 投与療法が開発されている [5-7]。

我々は以前から骨髄細胞を用いた肝再生療法を開発しており、自己骨髄細胞投与療法 (autologous bone marrow infusion : ABMI) の有効性を報告してきた [8, 9]。現在我々はより低侵襲な肝再生療法として、培養自己骨髄間葉系細胞 (BM-MSC) 投与療法を開発中であり、並行して培養 BM-MSC の高品質化に取り組んでいる。

培養 MSC を用いた再生療法の開発にあたって最も重要な問題のひとつに、培養過程における細胞の品質低下がある。ヒト BM-MSC は骨髄液から得られる接着細胞として比較的容易に培養可能であるが、長期の継代培養によって細胞の大型化、形態異常、増殖能低下などの劣化をきたすことが知られている [10-12]。マウスやラット由来の BM-MSC もヒトと同様の方法で培養可能であるが [13-15]、これらの質的変容はより顕著である。

本研究で我々は、骨髄微小環境を再現するためにラット全骨髄細胞調整培地 (BM cells-conditioned medium : BMC-CM) を作成した。この BMC-CM で培養することによるラット BM-MSC の質的変化を、幹細胞性 (stemness) の指標とされるミトコンドリア酸化的リン酸化 (oxidative phosphorylation : OXPHOS) 活性や、OXPHOS 抑制因子として知られる hypoxia-

inducible factor 1-alpha (HIF-1 α) と Sirtuin 3-5 (Sirt3、Sirt4、Sirt5) の mRNA 発現状態を用いて評価した。さらに MSC による治療機序の中心的役割を担うとされる TNF-stimulated gene 6 protein (TSG-6) タンパクの発現状態を評価するとともに、四塩化炭素 (CCl₄) 肝障害モデルラットに対する治療能の変化を評価した。また、各種疾患の病態生理に対する microRNA (miRNA) の関与が数多く報告されていることを背景に[16-18]、全骨髄細胞由来エクソソーム miRNA の解析を加えた。

3. 方法

3.1. ラット BM-MSC の初代培養と BMC-CM の作成

6 週齢の雄性 Wistar ラットを日本 SLC (Shizuoka, Japan) より購入し、ラット BM-MSC を既報に従って作成した (図 1a) [15]。10%の fetal bovine serum (FBS) (172012; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えた Dulbecco 調整 Eagle 培地 (DMEM) (11885-084; Gibco, Waltham, MA, USA) を基礎培地 (basal medium) として用いた。8-10 週齢のラットから大腿骨と脛骨を摘出し、髄内腔を basal medium で洗浄した。得られた緻密骨を乳鉢内で粉砕して微小骨片としたうえでリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline:PBS) (14190-144; Gibco) で洗浄し、2%のコラゲナーゼ (038-22363; Wako, Osaka, Japan) と 2.5% の 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) (17514-15;

NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan) を加えた DMEM 内で 37°C、1 時間処理し、骨片に付着した細胞を遊離させた。得られた細胞懸濁液を 70 μ m セルストレーナー (352350; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) に通し、330g で 5 分間遠心したうえで、分離した細胞ペレットを basal medium に再懸濁してプラスチック培養皿 (353046; Corning, Corning, NY, USA) に播種し、37°C、5%CO₂ で培養した。最初の 3 日間は 8 時間毎に培地交換を行うことによって非接着細胞を除去し、播種 96 時間後にトリプシン (0.25% Trypsin-EDTA, 25200-072; Gibco) を用いて接着細胞を剥離、継代した。継代細胞は basal medium、BMC-CM、ならびに市販のエクソソーム抽出キット (ExoMir™ PLUS; Bioo Scientific, Austin, TX, USA) に含まれる 20nm フィルターで処理した BMC-CM (filtered BMC-CM : 図 4a) に再懸濁して播種した。以後は 2 日毎に培地交換を行い、100%コンフルエントで継代を反復した。

BMC-CM は骨髓内腔を basal medium で洗浄した際に得られた全骨髓細胞懸濁液から作成した。10⁸ 個/100mL に調整し、T175 フラスコ (353112; Corning) 内で 37°C、5%CO₂ で 72 時間培養し、得られた培養上清を 330g で 5 分間遠心し、220nm フィルター (MILLEX®GP; Merck, Kenilworth, NJ, USA) 処理を加えて BMC-CM とした (図 1a)。

3.2. 細胞形態と増殖能、分化能の評価

各培地による第 1、3、及び 5 継代の培養 BM-MSC を 96 ウェルプレート (351172; Corning) に 1000 個/ウェルで播種し、生細胞イメージングシステム (IncuCyte® ZOOM; Essen

Bioscience, Tokyo, Japan) 内で 37°C、5%CO₂ 下に 4 日間培養し観察したのちに、蛍光プレートリーダー (infinite M200 PRO; TECAN, Mannedorf, Switzerland) を用いて CyQUANT® 細胞増殖アッセイ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) による細胞数の評価を行った。さらに各培養細胞を 100mm 培養皿 (353003; Corning) に 100 個/枚で播種し、37°C、5%CO₂ 下に 7 日間培養したうえで 10%ホルマリン固定 (11-0705-7; Sigma-Aldrich)、ギムザ染色を行い、線維芽細胞様コロニー数を評価した (colony-forming unit fibroblast assay; CFU-f assay)。

また各培地による第 1 継代の培養 BM-MSC を、市販の MSC 分化誘導キット (SC020; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) のプロトコルに従って培養し、脂肪分化、骨分化、ならびに軟骨分化能を評価した。

3.3. フローサイトメトリー (FCM)

トリプシン法で剥離した培養 BM-MSC を 4%ホルマリンで 15 分間固定し、1%の各蛍光標識抗体を含む PBS 内で反応させたのち、フローサイトメーター (Gallios™; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) および FlowJo™ソフトウェア (BD Biosciences) を用いて表面抗原の解析を行った。蛍光標識抗体として、Phycoerythrin (PE) 標識マウス抗ラット CD11b 抗体 (562105; BD Biosciences)、PE 標識マウス抗ラット CD34 抗体 (ab187284; Abcam, Cambridge, UK)、PE 標識マウス抗ラット CD45 抗体 (554878; BD Biosciences)、PE 標識マウス抗ラット CD54

抗体 (554970; BD Biosciences)、PE 標識マウス抗ラット CD90 (Thy-1) 抗体 (554898; BD Biosciences) を用いた。

3. 4. OXPHOS 活性の評価

OXPHOS 活性の評価のため、細胞外フラックスアナライザー (XF96; Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA) を用いて各培養細胞の酸素消費速度 (Oxygen consumption rate: OCR) の測定を行った。各培地で第 1 継代の培養 BM-MSC を 1000 個/ウェルとして専用 96 穴プレート (XF96 microplates; Seahorse Biosciences) に播種し、37°C、5%CO₂ 下に 72 時間培養したのち、培地を 25mM のグルコースを加えた XF アッセイ培地 (Seahorse Biosciences) に交換した。1 μg/mL の oligomycin、300nM の carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP)、2 μM の rotenone を各 3 分間かけて順に添加し、各試薬添加後に 5 分間の OCR 測定を 3 回ずつ行った。OCR 値を細胞数で補正し、機器マニュアルに従って予備呼吸能 (spare respiratory capacity) と最大呼吸能 (maximal respiration) を算定した。

3. 5. mRNA の定量的リアルタイム PCR (RT-qPCR) とマイクロアレイ解析

市販の total RNA 抽出キット (RNeasy Mini Kit®; QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて第 1、3、5 継代の培養細胞から total RNA を抽出し、逆転写キット (ReverTra Ace® qPCR RT

Kit; Toyobo, Osaka, Japan) を用いて cDNA への逆転写反応を行った。その後、SYBR® Green プレミックス PCR 試薬 (THUNDERBIRD®; Toyobo) を加え、リアルタイム PCR システム StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いて、95°C、10 分間の初期変性ののち、40 サイクルにわたって、95°C、15 秒の変性と 60°C、1 分間のアニーリングを行った。プライマーとして、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*)、hypoxia-inducible factor 1-alpha (*Hif1a*)、Sirtuin 3 (*Sirt3*)、Sirtuin 4 (*Sirt4*)、Sirtuin 5 (*Sirt5*)、vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*)、hexokinase 2 (*Hk2*)、TNF α -stimulated gene 6 (*Tsg6* または *Tnfaip6*) を用いた (表 1)。*Gapdh* を内因性コントロールとして標準化した C_T 値をもとに発現比を算出した。

また、BMC-CM と filtered BMC-CM を用いて培養した第 1 継代の BM-MSc から抽出したそれぞれの total RNA を、mRNA マイクロアレイチップ (3D-Gene®; TORAY, Tokyo, Japan) を用いたマイクロアレイ解析で比較した。解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (QIAGEN) を用いて行った。

3.6. ウェスタンブロット法

各培地で培養した第 1 継代の細胞ペレットを、プロテアーゼ阻害剤 (cOmplete Mini; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を加えた市販の細胞溶解バッファー (9803S; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) で溶解してタンパク溶液を作成し、ドデ

シル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate : SDS) を含むサンプルバッファー (161-0737; BIO-RAD, Hercules, CA, USA) と 1:1 (v/v) で混合し、5 分間煮沸しポリアクリルアミドゲル (Mini-PROTEAN® TGX™, BIO-RAD) 電気泳動に供した。得られたゲルを Trans-Blot Turbo®システム (BIO-RAD) を用いてメンブレンに転写し、1000 倍希釈ウサギ抗ラット TSG-6 抗体 (PA5-76008; Invitrogen) と 5000 倍希釈マウス抗 β -actin 抗体 (A5316; Sigma-Aldrich) を一次抗体として 4°Cで一晩、次いで 5000 倍希釈のロバ抗ウサギ IgG (NA934; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) ないしヒツジ抗マウス IgG (NA931; GE Healthcare) 西洋ワサビペルオキシダーゼ結合二次抗体を用いて 20°Cで 1 時間反応させた。0.1% tween (160-21211; Wako) を溶解した PBS を基礎バッファーとし、1%のブロッキング試薬 (I-Block™; Invitrogen) を溶解した基礎バッファーをブロッキングバッファーとした。イメージングと解析は ChemiDoc™システム (BIORAD) と Image Lab™ソフトウェア (BIO-RAD) を用いて行った。

3.7. 動物モデル

全ての動物実験は山口大学の動物実験ガイドラインならびに各規則・基準、ならびに申請・許可された動物使用計画 (No. 21-044) に従って行った。1 週間の馴化ののち、24 頭の 8 週齢雄性 Wistar ラットに対し、コーン油で 2 倍希釈した 0.5 mL/体重 (kg) の CCl₄を週 2 回、8 週間にわたって腹腔内投与した。ラットを 3 群 (control 群、basal 群、BMC-CM 群)

に分け、control 群には 1mL の PBS を、basal 群と BMC-CM 群にはそれぞれ basal medium と BMC-CM で培養した 10^6 個の第 1 継代 BM-MSC を懸濁した 1mL の PBS を、第 5、6、7 週に尾静脈投与した。8 週時点で 4% イソフルラン麻酔下にラットを解剖し、下大静脈から血液サンプルを採取し、肝を摘出した。

血清アルブミン (albumin:ALB)、アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase:ALP)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase:AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (alanine aminotransferase:ALT) 値を、乾式臨床化学分析装置 (SpotChem™ D-02; Arkley, Kyoto, Japan) を用いて測定した。肝組織は 10%ホルマリン固定ののちパラフィン包埋、 $3\mu\text{m}$ に薄切ののち脱パラフィン化し、霜仁会 (Yamaguchi, Japan) に委託してヘマトキシリン・エオジン (Hematoxylin-eosin:H-E) 染色を行った。29:1(v/v)で混合した 1% シリウスレッド (Sirius-red) 溶液 (3306-1; MUTO PURE CHEMICALS, Tokyo, Japan) と Van Gieson Solution P (224-01405; Wako) を用いて、シリウスレッド染色を行った。また市販の染色キット (ApopTag®; Merck) を用いて、terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP (deoxyuridine triphosphate nucleotide) nick-end labeling (TUNEL) 解析を行った。組織学的評価は複合型顕微鏡システム (BZ-9000; Keyence, Osaka, Japan) を用いて行い、空胞化肝細胞 (vacuolation) 数、TUNEL 陽性細胞数、またシリウスレッド陽性面積比を評価した。

3.8. BMC-CM の効果に関連した miRNA の同定

BMC-CM 作成過程 (3、12、72 時間) において含まれるエクソソーム miRNA を、市販の複合フィルター式エクソソーム miRNA 抽出キット (ExoMir™ PLUS) を用いて抽出した。得られたエクソソーム miRNA に対し、miRNA マイクロアレイチップ (3D-Gene®; TORAY) を用いたマイクロアレイ解析で比較したところ、49 種の miRNA が BMC-CM 作成過程で 1.5 倍以上増加し、ラット BMC によって産生されたものと考えられた (表 2)。IPA を用いた統合解析 (microRNA Target Filter) により、これらの miRNA のうち BMC-CM の OXPHOS 制御に寄与している可能性が疑われる 7 種を選定した (表 3) [19, 20]。それらに対するアゴニストないし陰性コントロール (mirVana™; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) を購入し、トランスフェクション試薬 (Lipofectamine RNAiMAX; Invitrogen) とともに 37°C、5%CO₂ 下に 72 時間培養することで、第 1 継代 (basal medium 培養) の BM-MSC にトランスフェクションした。それらの培養細胞から前述の方法で mRNA 抽出を行い、RT-qPCR で解析した。

3.9. 統計解析

すべての結果は平均値±標準誤差で表示した。統計解析は JMP Pro ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行った。Student の *t* 検定および一元配置分散分析 (one-way analysis of variance : one-way ANOVA) に加え、事後分析として Turkey-Kramer 法による多群間比較を行い、*p* 値<0.05 をもって有意差ありとした。mRNA および miRNA マイ

クロアレイを除き、提示したすべての結果は同条件での独立した実験を 3 回以上行って得た。

4. 結果

4.1. BMC-CM は培養 BM-MSC の viability を向上させる

第 1 継代時点の接着細胞において、白血球共通抗原 CD45、造血系肝細胞マーカーCD34、単球系マーカーCD11b 陽性の細胞はほぼ認められなかった一方、MSC マーカーである CD54 と CD90 はほぼ全ての細胞に発現していた (図 1B)。さらに脂肪、骨、軟骨系すべての系統への分化能を示したことから (図 1C)、第 1 継代の接着細胞は検証に足る十分な純度の MSC であると判断した。表面抗原の発現パターンと分化能について、basal medium 培養細胞と BMC-CM 培養細胞の間に有意な差異はみいだされなかった。

培養細胞は初期には小型で紡錘形の形態を呈したが、basal medium 下では継代培養に伴い、速やかに大型で扁平な形態へと変容したのに対し、BMC-CM 培養細胞の形態は長期にわたって保たれた (図 1F)。いずれの培地においても増殖能は第 3 継代をピークに減少に転じたが、その減少は basal medium 培養においてより顕著であった (図 1D-F)。CFU-f アッセイの結果、basal medium 培養細胞は次第にコロニー形成能が低下し、第 5 継代にはほぼコロニーがみられなくなったのに対し、BMC-CM 培養細胞のコロニー形成数と大きさは長期にわ

たって保たれた (図 1G)。

4.2. BMC-CM は培養 BM-MSC の OXPHOS 活性を抑制し TSG-6 産生を亢進させる

続いて我々は培養 BM-MSC の幹細胞性の指標とされるミトコンドリア OXPHOS 活性を評価した。細胞外フラックスアナライザーを用いた OCR 測定では、BMC-CM 培養細胞において最大呼吸能 (0.52-fold, $p < 0.001$) と予備呼吸能 ($p < 0.001$) が有意に低下していた (図 2A)。

我々はさらに OXPHOS 活性の調整に関わる各種タンパクの mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した。*Hif1a* 発現は basal medium 培養下で継代に伴って次第に低下したのに対し、BMC-CM 培養細胞では継代培養に従って発現が亢進した。HIF-1 α タンパクは酸素存在化で速やかに分解されることからその定量は困難であったが、BMC-CM 下の継代培養に伴って Hif-1 の下流シグナルにあたる *Vegfa* や *Hk2* の mRNA 発現が同様に亢進していたことは、BMC-CM 培養によって Hif-1 シグナル伝達経路が活性化したことを示すものと考えられた。我々はさらに、ミトコンドリアに局在して OXPHOS 制御に関わるとされる *Sirt3*、*Sirt4*、*Sirt5*[21] についてもその発現を評価した。*Sirt3*、*Sirt4*、*Sirt5* は basal medium 培養下では第 3 継代をピークに減少した一方、BMC-CM 培養では亢進が持続していた (図 2B)。

さらに我々は、肝障害に対する治療機序の観点から MSC の品質指標と目される TSG-6 についての評価を加えた。RT-PCR で評価した *Tsg6* 発現はいずれの培地においても第 3 継代をピークに減少したが、第 1、第 3 継代においては BMC-CM 培養細胞で有意に発現亢進してい

た(図 2B)。ウエスタンブロット法で評価した第 1 継代細胞の TSG-6 産生能は、basal medium 培養細胞に比して BMC-CM 培養細胞で有意に増加していた (4.08-fold, $p=0.013$) (図 4D)。

4.3. BMC-CM で培養した BM-MSC は肝障害に対しより高い治療能を有する

CCl₄肝障害に対する *in vivo* 治療実験において、BMC-CM 培養 BM-MSC はより高い治療能を示した。血清 AST (0.62-fold, $p=0.038$) ならびに ALT (0.65-fold, $p=0.048$) 値は、basal 群に比して BMC-CM 群で有意に低下していた (図 3B)。シリウスレッド染色で評価した線維化面積 (0.72 fold, $p=0.017$) は、basal 群に比して BMC-CM 群で有意に縮小しており、空胞化肝細胞数 (0.31 fold, $p=0.006$) ならびに TUNEL 陽性細胞数 (0.18 fold, $p=0.016$) も、basal 群に比して BMC-CM 群で有意に減少した (図 3C)。

4.4. BMC-CM の品質改善効果にはエクソソーム miRNA が関与している

20nm フィルターによってエクソソームを含む 20~220nm の粒子を除去することによって (filtered BMC-CM) (図 4A)、培養 BM-MSC の OXPHOS 活性は亢進し、*Hif1a*、*Sirt3*、*Sirt4*、*Sirt5*の発現は低下し、また TSG-6 産生能も低下した (図 4B-D)。BMC-CM と filtered BMC-CM によって培養した BM-MSC を比較した mRNA マイクロアレイにおけるパスウェイ解析では、BMC-CM 中の 20~220nm の粒子による OXPHOS パスウェイのほか、Sirtuin シグナル伝達経路、mammalian target of rapamycin (mTOR) /phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /protein

kinase B (AKT) シグナル伝達経路、insulin-like growth factor 1 (IGF-1) シグナル伝達経路等、複数のシグナル伝達経路への関与が伺われた (図 4E)。またミトコンドリア OXPHOS パスウェイマッピングにおいて、BMC-CM 中の 20~220nm の粒子により、すべてのミトコンドリア複合体 (I~V) が抑制されている可能性が示された (図 4F)。

BMC-CM には FBS 由来のエクソソーム miRNA が含まれることから、我々はそれらの中からラット BMC 由来のものと同定を行った。BMC-CM 作成過程 (3 時間、12 時間、72 時間) における miRNA 発現量の変化をマイクロアレイ解析の結果から評価し、3 時間時点に比して 12 時間ないし 72 時間時点で 1.5 倍以上に増加する miRNA が 49 種同定され、これらはラット BMC によって産生されたものと考えられた (表 2)。これらのうち、BMC-CM と filtered BMC-CM で培養した BM-MSC を比較した mRNA マイクロアレイ解析における OXPHOS 関連の変動 mRNA の多くを標的遺伝子とする miRNA を、IPA の Target filter 機能で抽出した結果、miR-1247-3p、miR-204-3p、miR-128-1-5p、miR-92b-3p、miR-23b-3p、miR-326-5p、miR-145-5p の 7 種が選定された (表 3)。

これらの miRNA の培養 BM-MSC に対するトランスフェクションの結果、miR-92b-3p (1.82 fold, $p=0.002$)、miR-23b-3p (1.20 fold, $p=0.029$)、miR-204-3p (1.29 fold, $p=0.007$)、miR-1247-3p (1.33 fold, $p=0.038$) は *Hif1a* を、miR-92b-3p (1.71 fold, $p<0.001$)、miR-23b-3p (1.30 fold, $p=1.049$)、miR-204-3p (1.70 fold, $p=0.002$) は *Sirt3* を、miR-92b-3p (1.64 fold, $p=0.002$)、miR-23b-3p (1.53 fold, $p=0.021$) miR-204-3p (1.60 fold,

$p=0.022$)は *Sirt4*を、miR-92b-3p(1.68 fold, $p=0.001$)と miR-23b-3p(1.18 fold, $p=0.048$)は *Sirt5*を、そして miR-23b-3p(1.34 fold, $p=0.0197$)、miR-204-3p(5.25 fold, $p<0.001$)、miR-1247-3p (4.77 fold, $p=0.002$)、miR-326-5p (3.92 fold, $p=0.003$) は *Tsg6*を、それぞれ発現亢進した (図 5A)。

5. 考察

本研究において、我々はまず培養 BM-MSC の治療品質向上のため、BM-MSC の幹細胞性維持に関わる骨髄微小環境を培養環境中に再現することを試みた結果、BMC-CM による OXPHOS 抑制効果をみいだした。一般に幹細胞性の保たれた高品質な幹細胞はミトコンドリア OXPHOS が抑制され、その ATP 産生の多くを嫌氣的解糖系に依存していることが知られている [22]。幹細胞におけるこのような代謝リモデリングの中心的役割を担うタンパクとして知られるのが、骨髄のような低酸素環境下に活性が亢進する HIF-1 α であり、HIF-1 α はミトコンドリア OXPHOS を抑制するとともに嫌氣的解糖系を亢進する [23, 24]。HIF-1 α はさらに、細胞増殖や血管新生、さらに免疫調整等の多岐にわたる細胞機能に関与することが報告されており、現在では“幹細胞性”をつかさどる最も中心的な因子のひとつと理解されている [25-27]。

本研究では、通常酸素濃度下の BMC-CM 培養で HIF-1 α 発現が亢進することが確認された。

低酸素下での HIF-1 α 活性亢進はその分解酵素の酸素依存性に起因するものであり、HIF-1 α 産生の増加によるものではないと一般に理解されている[28, 29]。一方で IGF-1 シグナル伝達経路や mTOR シグナル伝達経路など、酸素濃度に依らず HIF-1 α の発現亢進をきたす複数の因子も報告されている[30-34]。本研究のパスウェイ解析でも、BMC-CM 中の 20~220nm 粒子による mTOR/Akt/PI3K 経路や IGF-1 経路の活性化がみられており、BMC-CM 培養における HIF-1 α 活性化は液性因子による産生亢進によるものであったことが示唆される。

TSG-6 は各種の炎症性刺激に応じて産生されるタンパクであり、複数のパスウェイを介して抗炎症作用を発揮する[35]。本研究では、BMC-CM 培養によって BM-MSc の TSG-6 産生も亢進することが明らかとなった。TSG-6 を高発現した BM-MSc がより高い抗炎症作用を有することや[36]、TSG-6 自体がメチオニン・コリン欠乏食投与マウスの肝障害を軽快させること[37]などが報告されており、現在 TSG-6 は MSc の抗炎症作用の中心的役割を担うタンパクであるとともに、MSc の抗炎症的な治療能を示す有用なバイオマーカーとしても注目されている。さらに、TSG-6 欠損 MSc は、老化・劣化した MSc に類似した大型で扁平な形態を呈するとともに、増殖能や分化能が低下することが報告されており[38]、MSc が産生する TSG-6 は MSc 自身の幹細胞性の維持にも寄与している可能性がある。

胎生期のみならず、骨髄と肝は成体においても密接に相関しているが[39, 40]、それぞれの幹/前駆細胞ニッチにはいくつかの類似点がある。MSc が骨髄造血幹細胞 (hematopoietic stem cell : HSC) を維持する重要な役割を有していることが広く知られる一方[41]、肝前駆

細胞ニッチの構成に際しても骨髄由来の MSC が関与している可能性が報告されている [42, 43]。本研究で骨髄細胞由来の液性因子は培養 BM-MSC の品質低下を抑制したが、これは MSC が骨髄細胞のニッチとして重要である一方、骨髄細胞もまた MSC の健全性維持のために必要な役割を担っていることを示している。さらに肝微小環境と MSC の関係が明らかとなれば、肝と骨髄の臓器相関は MSC を介した文脈で説明される可能性がある。

タンパクや DNA 等、エクソソーム中の他の因子が同様に関与している可能性は否定できないが、本研究で我々は、*Hif1a* を発現亢進する 4 種と *Tsg6* を発現亢進する 4 種の骨髄細胞由来エクソソーム miRNA を同定した。病態生理に MSC が関与する複数の疾患が既に知られているが、その背景に miRNA の変化が関わっている疾患も報告されはじめている [16-18]。我々が今回同定した *Hif1a* ないし *Tsg6* を亢進する 5 種の miRNA のうち、3 種は肝疾患と関連している可能性が報告されているものであった (図 5B)。miR-204 と miR-92b は、外科的切除された肝組織中の miRNA 発現の検討において硬変肝での減少が報告された 44 種の primary miRNA に含まれており [44]、また miR-1247-3p と miR-92b-3p は、HepG2 細胞の脂肪化モデルにおいて減少するとともに、同モデルのリラグリチド投与による治療実験において増加することが報告された 87 種の mature miRNA に含まれている [45]。

このように骨髄由来の液性因子は、OXPHOS 抑制や TSG-6 発現亢進を介して BM-MSC の品質維持に関わる複数の miRNA を含んでおり、その一部は肝にも存在するとともに肝疾患で減少する。MSC が肝と骨髄双方にとって重要な幹/前駆細胞ニッチであることを踏まえれば、

この一連の事実は、MSC と miRNA 等の液性因子が肝疾患の病態生理や肝の恒常性維持、さらには肝と骨髄の臓器相関にも関与している可能性を示唆するものである。このような液性因子による MSC の変容機序には不明な点も多いが、その解明は肝再生療法に用いる MSC の品質向上に寄与する可能性がある。

6. 結語

miRNA を含む骨髄由来の液性因子は、ミトコンドリア OXPHOS を抑制し、TSG-6 発現を亢進し、培養 BM-MSC の肝疾患に対する治療能を向上させる。またこれらの miRNA は、肝疾患の病態生理に関与している可能性がある。これらを応用することで、再生療法に用いる MSC の品質を向上できる可能性がある。

7. 謝辞

まず本研究にあたり、終始暖かくご指導下さった坂井田功教授に深く感謝いたします。また一連の研究すべての面において適切な助言を賜り、また丁寧に指導して下さいました高見太郎先生に感謝します。藤澤浩一先生は特に本研究におけるミトコンドリア OXPHOS 解析法について、松本俊彦先生は特に microRNA 解析法について、多大なご教示を与えてくださいま

した。山本直樹先生には研究内容のみならず、大学院生活の細部まで暖かくご指導いただきました。最後に技術補佐員の山田磨理子さん、大田久美江さん、望月里紗さん、その他本研究に関わるすべての方々に厚く御礼を申し上げます。

本研究は山口県再生医療研究開発拠点機能強化事業と、JSPS 科研費 JP17H04162、JP17K09428 の助成を受けたものです。

8. 文献

1. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update. *Cell Transplant*. 2016;25:829-48.
2. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*. 2011;9:11-5.
3. Lee RH, Pulin AA, Seo MJ, et al. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009;5:54-63.
4. Krasnodembskaya A, Song Y, Fang X, et al. Antibacterial effect of human mesenchymal stem cells is mediated in part from secretion of the antimicrobial peptide L-37. *Stem Cells*. 2010;28:2229-38.

5. Young PP, Schäfer R. Cell-based therapies for cardiac disease: a cellular therapist's perspective. *Transfusion*. 2015;55:441-51
6. Peired AJ, Sisti A, Romagnani P. Mesenchymal stem cell-based therapy for kidney disease: a review of clinical evidence. *Stem Cells Int*. 2016;2016:4798639.
7. Liu KD, Wilson JG, Zhuo H, et al. Design and implementation of the START (STem cells for ARDS Treatment) trial, a phase 1/2 trial of human mesenchymal stem/stromal cells for the treatment of moderate-severe acute respiratory distress syndrome. *Ann Intensive Care*. 2014;4:22
8. Terai S, Ishikawa T, Omori K, et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells*. 2006;24:2292-8.
9. Takami T, Terai S, Sakaida I. Advanced therapies using autologous bone marrow cells for chronic liver disease. *Discov Med*. 2012;14:7-12.
10. Shin TH, Lee S, Choi KR, et al. Quality and freshness of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells decrease over time after trypsinization and storage in phosphate-buffered saline. *Sci Rep*. 2017;7:1106.
11. Agata H, Asahina I, Watanabe N, et al. Characteristic change and loss of in vivo osteogenic abilities of human bone marrow stromal cells during passage.

- Tissue Eng Part A. 2010;16:663-73.
12. Block TJ, Marinkovic M, Tran ON, et al. Restoring the quantity and quality of elderly human mesenchymal stem cells for autologous cell-based therapies. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8:239.
 13. Soleimani M, Nadri S. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Nat Protoc.* 2009;4:102-6.
 14. Wang J, Ju B, Pan C, et al. Application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of intrauterine adhesions in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39:1553-60.
 15. Zhu H, Guo ZK, Jiang XX, et al. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Protoc.* 2010;5:550-60.
 16. Guo Q, Chen Y, Guo L, Jiang T, Lin Z. miR-23a/b regulates the balance between osteoblast and adipocyte differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells. *Bone Res.* 2016;4:16022.
 17. Yeung DK, Griffith JF, Antonio GE, Lee FK, Woo J, Leung PC. Osteoporosis is associated with increased marrow fat content and decreased marrow fat unsaturation: a proton MR spectroscopy study. *J Magn Reson Imaging.* 2005;22:279-85.

18. Cordes C, Baum T, Dieckmeyer M, et al. MR-based assessment of bone marrow fat in osteoporosis, diabetes, and obesity. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:74.
19. Ramani R, Megason G, Schallheim J, et al. Integrative analysis of microRNA-mediated gene signatures and pathways modulating white blood cell Count in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Biomark Insights*. 2017;12:1177271917702895.
20. Kilpinen L, Parmar A, Greco D, et al. Expansion induced microRNA changes in bone marrow mesenchymal stromal cells reveals interplay between immune regulation and cell cycle. *Aging (Albany NY)*. 2016;8:2799–813.
21. Verdin E, Hirschey MD, Finley LW, Haigis MC. Sirtuin regulation of mitochondria – Energy production, apoptosis, and signaling. *Trends Biochem Sci*. 2010;35:669–75.
22. Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*. 2011;14:264–71.
23. Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 2006;3:177–85.

24. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell*. 2010;40:294-309.
25. Soni S, Padwad YS. HIF-1 in cancer therapy: two decade long story of a transcription factor. *Acta Oncol*. 2017;56:503-15.
26. Murielle M, Surinder KB. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *J Cell Mol Med*. 2013;17:30-54.
27. Martinez VG, Ontoria-Oviedo I, Ricardo CP, et al. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha improves immunomodulation by dental mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8:208.
28. Iwai K, Yamanaka K, Kamura T, et al. Identification of the von Hippel-lindau tumor-suppressor protein as part of an active E3 ubiquitin ligase complex. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999;96:12436-41.
29. Lisztwan J, Imbert G, Wirbelauer C, Gstaiger M, Krek W. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity. *Genes Dev*. 1999;13:1822-33.
30. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational

- change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:5667-72.
31. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, et al. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*. 2004;18:2893-904.
32. Hudson CC, Liu M, Chiang GG, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7004-14.
33. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2002;277:38205-11.
34. Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, Lu Z, Hunter T, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. *Cell Growth Differ*. 2001;12:363-9.
35. Milner CM, Day AJ. TSG-6: a multifunctional protein associated with inflammation. *J Cell Sci*. 2003;116:1863-73.

36. Lee RH, Yu JM, Foskett AM, et al. TSG-6 as a biomarker to predict efficacy of human mesenchymal stem/progenitor cells (hMSCs) in modulating sterile inflammation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:16766-71.
37. Wang S, Lee C, Kim J, et al. Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein ameliorates chronic liver damage by promoting autophagy formation in mice. *Exp Mol Med*. 2017;49:e380.
38. Romano B, Elangovan S, Erreni M, et al. TNF-stimulated gene-6 (TSG-6) is a key regulator in switching stemness and biological properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2019;37:973-87
39. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*. 2000;32:11-6.
40. Bihari C, Anand L, Rooge S, et al. Bone marrow stem cells and their niche components are adversely affected in advanced cirrhosis of the liver. *Hepatology*. 2016;64:1273-88.
41. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466:829-34.
42. Takase HM, Itoh T, Ino S, et al. FGF7 is a functional niche signal required for stimulation of adult liver progenitor cells that support liver regeneration.

Genes Dev. 2013;27:169-81.

43. Katsumata LW, Miyajima A, Itoh T. Portal fibroblasts marked by the surface antigen Thyl contribute to fibrosis in mouse models of cholestatic liver injury.

Hepatol Commun. 2017;1:198-214.

44. Du H, Yu H, Yang Y, et al. Computational identification of microRNAs and their targets in liver cirrhosis. Oncol Lett. 2017;14:7691-8.

45. Shen Y, Liu M, Chen C, Lai X, Zhang M. MicroRNA profile changes in liraglutide treated steatotic HepG2 cells. Int J Clin Exp Med. 2017;10:4856-64.

9. 脚注

図 1. ラット BM-MSC の培養と BMC-CM の作成

洗浄したラット骨片をコラゲナーゼ処理して得られた細胞懸濁液を培地に再懸濁して、BM-MSC を得た。同時に得られた全骨髄細胞を basal medium に播種して 3 日間培養し、その上清から BMC-CM を作成し、BM-MSC を basal medium ないし BMC-CM 中で継代培養した (A)。それぞれの培地中で、第 1 継代時点ではほぼ全ての接着細胞は MSC に合致する表面抗原発現パターンを示し (B)、脂肪、骨、軟骨系への分化能を有していた (C)。培養細胞の表面抗原発現パターンと分化能に関し、それぞれの培地に有意な差異はみられなかった。IncuCyte®

ZOOM で評価した第 1 継代細胞の増殖曲線と (D)、Infinite® TECAN で評価した各継代での細胞数は (E)、いずれも BMC-CM 培養細胞がより高い増殖能を有していることを示した。BMC-CM 培養細胞はまた、長期にわたってその細胞形態とコロニー形成能を維持した (F, G)。

図 2. ミトコンドリア呼吸動態

Seahorse®細胞外フラックスアナライザーによる OCR 測定では、BMC-CM 培養細胞で基礎呼吸能と予備呼吸能が低下しており、OXPHOS 活性が抑制されていることが示された (A)。*Hif1a* とその下流シグナルである *Vegfa* と *Hk2*、さらにミトコンドリア局在サーチュインの *Sirt3*、*Sirt4*、*Sirt5*はいずれも BMC-CM 培養細胞で発現亢進した (B)。

図 3. CCl₄肝障害ラットに対する BM-MSC 投与

8 週齢の雄性 Wistar ラットに 0.5mL/体重 kg の CCl₄を週 2 回、8 週間にわたって腹腔内投与し、第 5、6、7 週に basal medium ないし BMC-CM で培養した BM-MSC を尾静脈投与した (A)。血液生化学検査で、basal 群に比して BMC-CM 群は血清 AST 値と ALT 値の有意な低下を示した (B)。シリウスレッド陽性線維化面積比と、空胞化肝細胞数、TUNEL 陽性細胞数も、basal 群に比して BMC-CM 群で有意に減少した (C)。

図 4. BMC-CM から 20nm 以上の粒子を除去した変化

ExoMir™ PLUS キット付属のフィルターを用いて、エクソソーム miRNA を含む BMC-CM 中の 20nm 以上の粒子を除去した (filtered BMC-CM) (A)。filtered BMC-CM 培養細胞は BMC-CM 培養細胞に比してミトコンドリア予備呼吸能が有意に亢進しており (B)、*Hif1a* 発現の亢進傾向を認めたほか、*Sirt3*、*Sirt4*、*Sirt5* 発現は有意に亢進したほか (C)、TSG-6 産生能も低下傾向であった (D)。BMC-CM 培養細胞と filtered BMC-CM 培養細胞を比較した mRNA マイクロアレイによるパスウェイ解析で、BMC-CM 中の 20~220nm の粒子の有無による OXPHOS 経路、Sirtuin シグナル伝達経路、mTOR/PI3K/AKT シグナル伝達経路、IGF-1 シグナル伝達経路等、複数のシグナル伝達経路の変化が認められた (E) ほか、20~220nm の粒子がすべてのミトコンドリア複合体 (I~V) を抑制することが示唆された (F)。

図 5. 全骨髄細胞由来 miRNA による BM-MSC 品質指標の変化

選択した 7 種の miRNA のうち、miR-23b-3p、miR-92b-3p、miR-204b-3p、miR-326b-5p、miR-1247b-3p の 5 種は、*Hif1a*、*Sirt3*、*Sirt4*、*Sirt5*、*Tsg6* のいずれかまたは複数の発現を亢進した (A)。OXPHOS 抑制関連遺伝子を活性化する miRNA と *Tsg6* を亢進する miRNA は多くが共通するとともに、うち 3 種は肝硬変症や脂肪肝において肝で減少する可能性が報告されたものであった (B)。

10. 図表

表 1. 使用したプライマー

Gene name	NCBI reference		Primer sequence (5' – 3')	Product size (bp)
<i>Gapdh</i>	NM_017008	Forward	GGCAAGTTCAACGGCACAGTC	96
		Reverse	AGCACCAGCATCACCCATTT	
<i>Hif1a</i>	NM_024359.1	Forward	TCTAGTGAACAGGATGGAATGGAG	96
		Reverse	TCGTAACCTGGTCAGCTGTGGTAA	
<i>Sirt3</i>	NM_001106313.2	Forward	TGCACGGTCTGTCTGAAGGTC	83
		Reverse	ATGTCAGGTTTCACAACGCCAGTA	
<i>Sirt4</i>	NM_001107147.1	Forward	CTGCTGCCCTTAATAGACCCACA	117
		Reverse	GATGCAGACAGTAAGCTTCCACCA	
<i>Sirt5</i>	NM_001004256.1	Forward	GCAGACGGGTTGTGGTCATC	106
		Reverse	CAGCAACATTGCCACACGAG	
<i>Vegfa</i>	NM_001110333.2	Forward	TCCTGCAGCATAGCAGATGTGA	103
		Reverse	CCAGGATTTAAACCGGGATTTC	
<i>Hk2</i>	NM_012735.2	Forward	TCGATGGCTCCGTCTACAAGAA	65
		Reverse	ACATCACAGTCGGGCACCAG	
<i>Tsg6</i> (<i>Tnfaip6</i>)	NM_053382.1	Forward	CGTCTTGCAACCTACAAGCAGCTA	100
		Reverse	ACAGTTGGGCCAGTTTCA	

表 2. BMC-CM 作成過程で増加する miRNA

miRbase ID	12 h vs 3 h (fold)	72 h vs 3 h (fold)
rno-miR-666-5p	4.26	29.79
<u>rno-miR-92b-3p</u> ^{†‡}	2.15	17.94
rno-miR-92a-3p	1.57	12.45
rno-miR-291a-5p	2.26	8.24
rno-miR-25-5p	1.22	6.69
rno-miR-486	1.47	6.00
rno-miR-375-5p [†]	2.71	5.58
rno-let-7d-3p ^{†‡}	1.74	4.61
rno-miR-23a-3p	0.95	3.39
rno-miR-128-3p	0.95	3.01
rno-miR-221-3p	1.07	2.99
<u>rno-miR-23b-3p</u>	0.99	2.98
rno-miR-294	1.56	2.94
rno-miR-181b-5p [†]	1.75	2.90
rno-miR-25-3p	1.06	2.80
rno-miR-3473	1.24	2.74
rno-miR-290	2.15	2.71
rno-miR-505-3p [‡]	2.10	2.66
rno-miR-212-3p	1.33	2.40
rno-miR-874-3p	2.11	2.34
rno-miR-702-5p	1.34	2.20
<u>rno-miR-326-5p</u>	1.99	2.20
<u>rno-miR-145-5p</u>	0.90	2.18
rno-miR-378a-5p	1.72	2.11
rno-miR-10a-5p	0.80	2.03
rno-miR-339-5p	1.36	2.02
rno-miR-22-3p [†]	0.86	1.97
rno-miR-1188-3p	1.51	1.93
rno-miR-328a-3p	1.07	1.89
rno-miR-328b-3p	1.07	1.83
rno-miR-99b-5p ^{†‡}	0.92	1.80
rno-miR-532-3p	1.68	1.77

rno-miR-99a-5p [†]	0.77	1.77
rno-miR-3594-3p	1.56	1.72
rno-miR-27a-3p	0.83	1.68
rno-miR-425-5p	0.70	1.66
rno-miR-598-5p	3.55	1.56
rno-miR-484	1.38	1.54
rno-miR-551b-3p	0.69	1.53
rno-miR-100-5p [‡]	0.71	1.51
<u>rno-miR-1247-3p[‡]</u>	2.81	1.46
rno-miR-3085	1.75	1.46
<u>rno-miR-204-3p[†]</u>	1.68	1.37
rno-miR-3593-3p	1.90	1.12
<u>rno-miR-128-1-5p^{†‡}</u>	3.59	1.08
rno-miR-6318	2.21	0.94
rno-miR-350	1.65	0.92
rno-miR-128-2-5p [†]	2.32	0.74
rno-miR-652-5p	1.55	0.68

下線：BM-MSC へのトランスフェクションに使用した miRNA

†：硬変肝組織での減少が報告される miRNA[44]

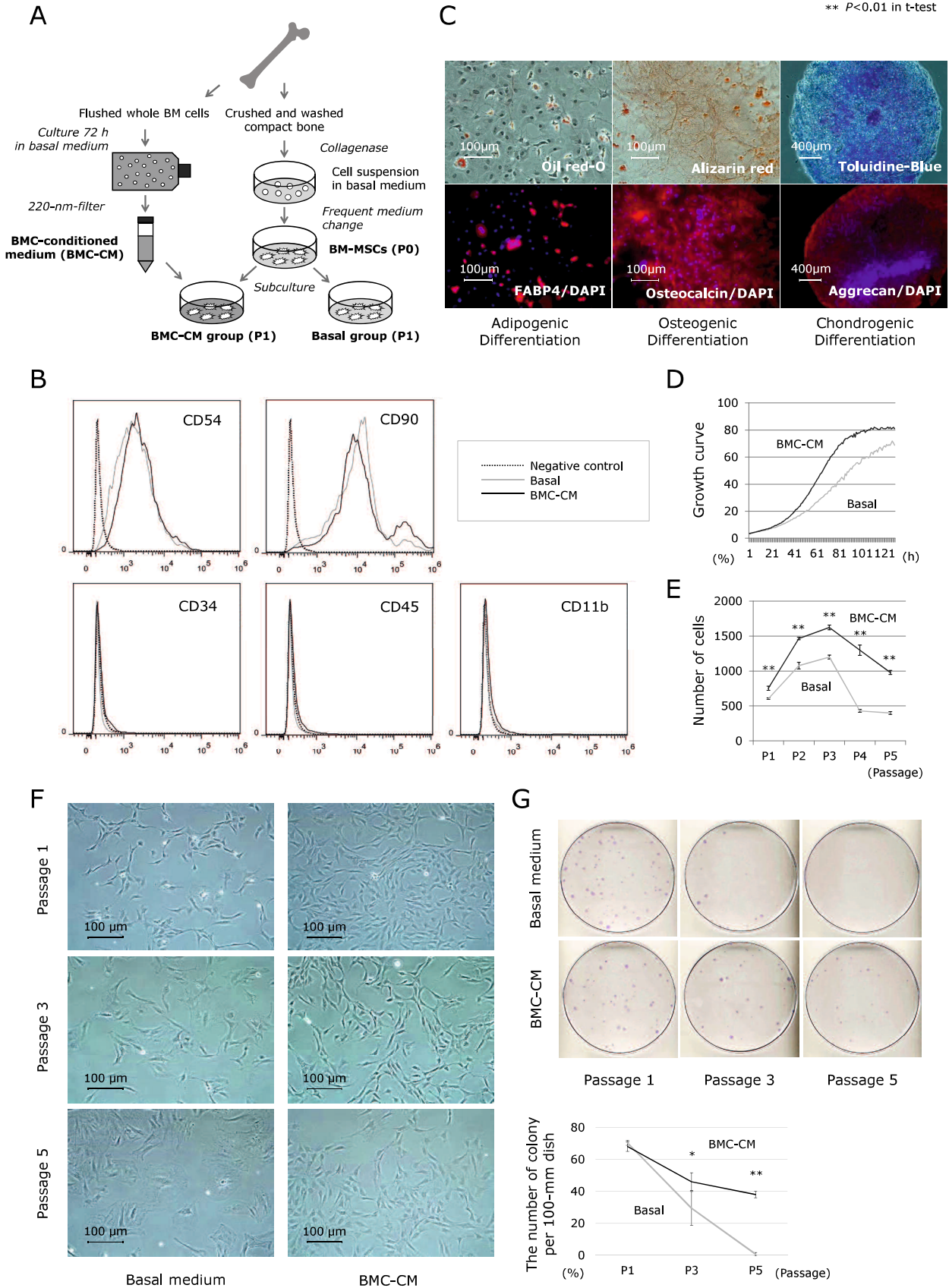
‡：HepG2 細胞の脂肪化にともなう減少が報告される miRNA[45]

表 3. BM-MSC の OXPHOS 制御への関与が疑われた BMC 由来 miRNA

miRbase ID	Mature miRNA sequence	Target genes related to the suppression of mitochondrial OXPHOS in BM-MSCs (mRNA expression ratio: BMC-CM vs 20-nm-filtered BMC-CM)
rno-miR-1247-3p	CGGGAACGUCGAGACUGGAGC	<i>Ndufb10</i> (-1.730), <i>Psen2</i> (-1.232), <i>Vdac1</i> (-1.055)
rno-miR-128-1-5p	CGGGGCCGUAGCACUGUCUGA	<i>Casp9</i> (-1.085), <i>Cox4i1</i> (-1.210), <i>Cox4i2</i> (-1.827), <i>Furin</i> (-1.306), <i>Ndufa3</i> (-3.689), <i>Ndufa4l2</i> (-1.029), <i>Ndufs2</i> (-1.019), <i>Psenen</i> (-1.986)
rno-miR-326-5p	GGGGGCAGGGCCUUGUGAA	<i>Casp9</i> (-1.085), <i>Cox4i1</i> (-1.210), <i>Fis1</i> (-1.192), <i>Psen1</i> (-1.213)
rno-miR-204-3p	GCUGGGAAGGCAAAGGGACGUU	<i>Ndufb10</i> (-1.730), <i>LOC100361934</i> (-3.052), <i>Uqcrc2</i> (-1.096)
rno-miR-92b-3p	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC	<i>Map2k4</i> (-1.266), <i>Prdx5</i> (1.479)
rno-miR-145-5p	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	<i>Aph1a</i> (1.292), <i>Cox7b</i> (-2.448), <i>Ndufa4</i> (-2.520), <i>Ndufb5</i> (-1.617)
rno-miR-23b-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUACC	<i>Aco1</i> (-1.301), <i>Casp3</i> (-1.127), <i>Cycs</i> (-1.625), <i>Ndufa2</i> (-2.862), <i>Ndufa3</i> (-3.689), <i>Ndufa5</i> (-2.739), <i>Prdx3</i> (1.150), <i>Sdhd</i> (-1.036), <i>Uqcrfs1</i> (1.195)

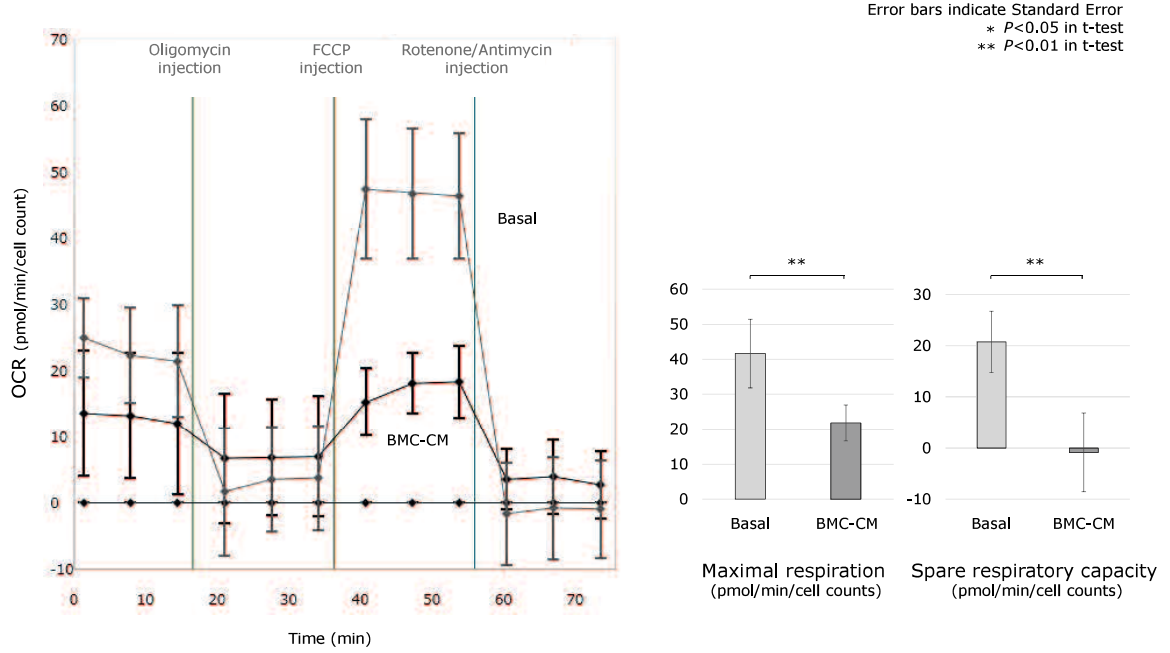
1

Error bars indicate Standard Error
 * $P < 0.05$ in t-test
 ** $P < 0.01$ in t-test



2

A



B

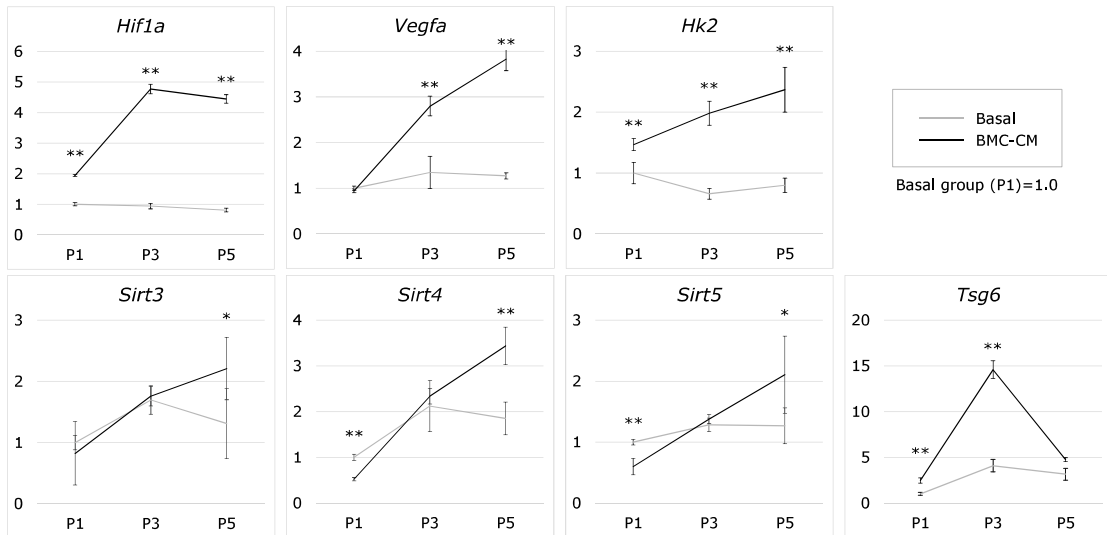


Figure 3

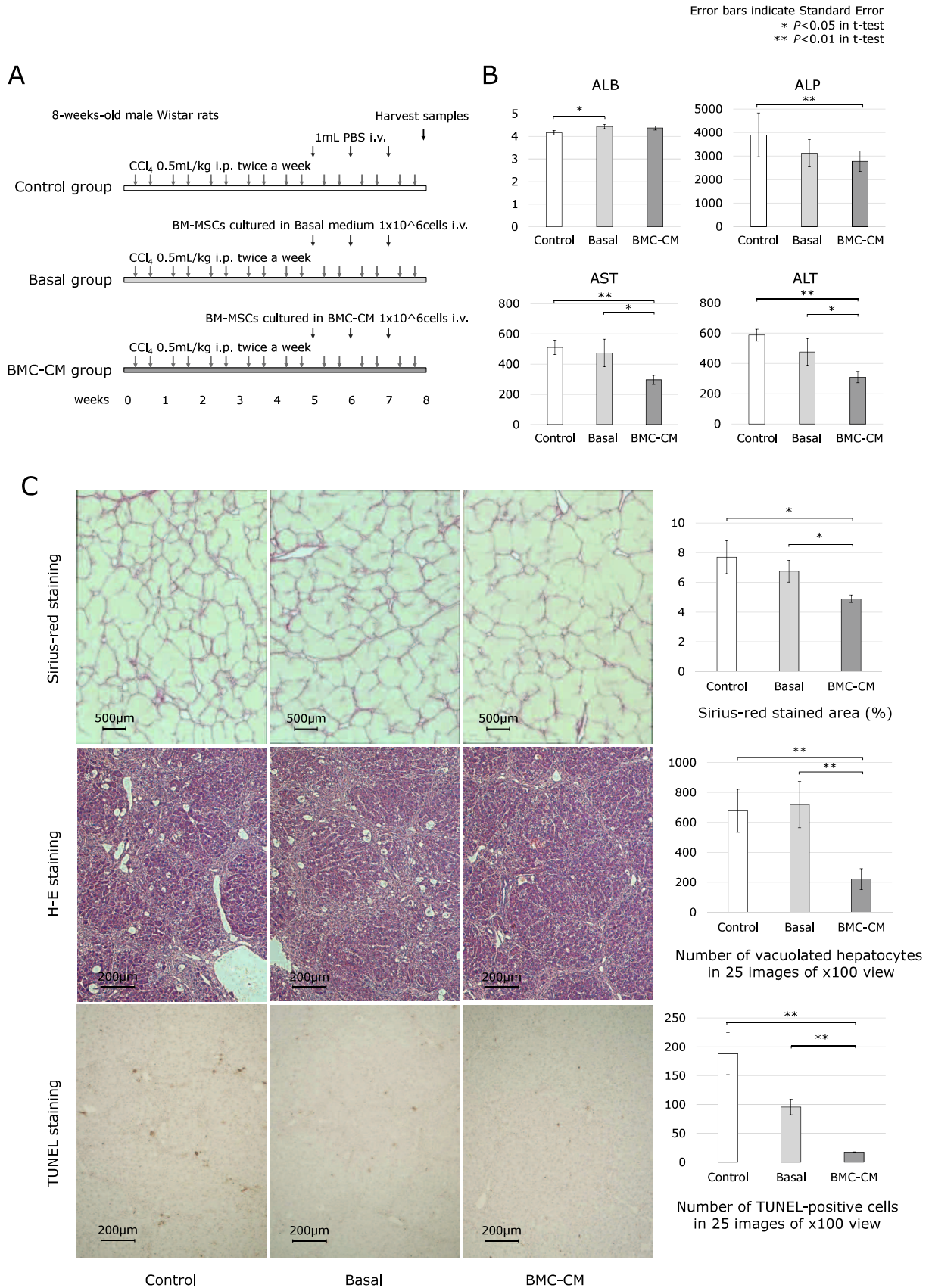
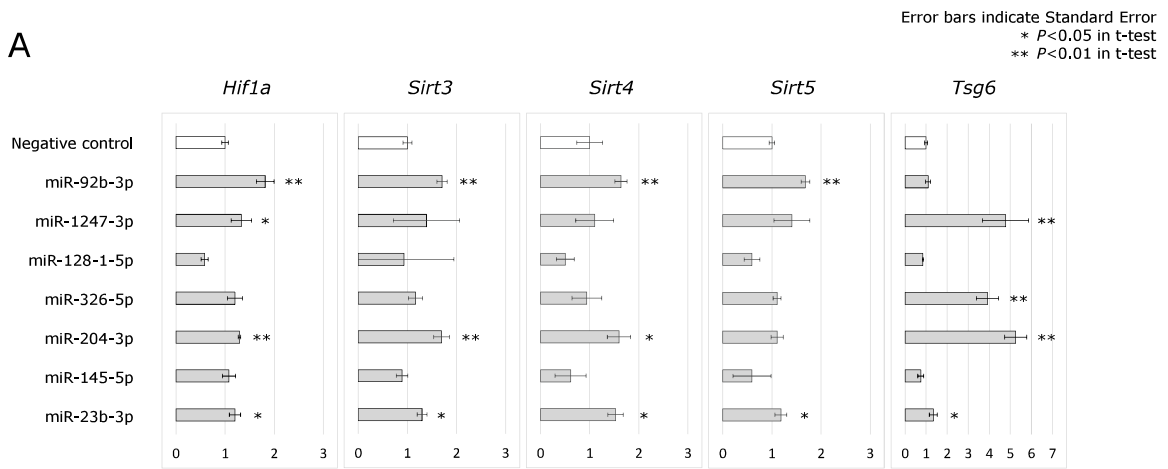


图5

A



B

