

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成30年 5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06617

研究課題名(和文)エクソソーム解析を用いた再生医療等製品の安全性評価方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Safety evaluation method for regenerative medicine using exosome analysis

研究代表者

沖田 ひとみ (OKITA, Hitomi)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：30400451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームとマイクロパーティクル(MP)の発現を解析することで、再生医療等製品の安全性評価が可能であるか検討した。まず、血管内皮細胞へLPSを加えて4時間培養した後、培養細胞よりCD9陽性反応を確認した結果、0.5ug/mlの濃度で添加した際に発現が強く見られた。次に、TNF- α を添加した培養上清から内皮特異的マーカーとmicroRNAの解析を行った。その結果、刺激開始24時間後にMCAM CD146の発現の増強が確認された。また、qRT-PCRではmir-126が確認された。以上より細胞中のエクソソームとMPの増加、減少を24時間以内で観察することができ、迅速な評価方法となりえると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the expression of intracellular exosome and microparticle (MP) and examined whether it is possible to evaluate the safety of regenerative medicine products. First, after adding LPS to vascular endothelial cells and culturing for 4 hours, CD9 positive reaction was confirmed from the cultured cells. Furthermore, when added at a concentration of 0.5 μ g / ml, expression was strongly observed. Endothelial specific markers and microRNAs were then analyzed from culture supernatants supplemented with TNF- α . As a result, it was confirmed that the expression of MCAM CD146 was enhanced after 24 hours. In addition, there was expression of mir-126. From these facts, increases and decreases in intracellular exosomes and MP can be observed within 24 hours, which can be a rapid evaluation method.

研究分野：再生医療

キーワード：生体機能利用 生体材料 再生医療等製品

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から分泌される脂質膜構造を持つ 40~100nm ほどの粒子である。その膜上および小胞内には様々なたんぱく質、核酸、脂質を含んでいることが報告されている。発見当初は不要な物質を排除する機構と考えられていたが、分泌されたエクソソームが他の細胞を刺激することが確認されており、細胞間のコミュニケーションツールとして注目されている。また、繊維芽細胞、内皮細胞、血液細胞などを含む正常細胞やがん細胞などの異常な細胞からも分泌され、分泌された細胞情報を反映することからバイオマーカーとして期待され病態との関連の解析が進んでいる。

現在、再生医療等製品に含まれてくる細菌やウイルス等の安全性評価は、エンドトキシン、マイコプラズマ否定試験、無菌性試験、PCR によるウイルスの検出等、感染性微生物自体の検出あるいは微生物が産生する毒素の検出を目的とする試験で行われている。しなしながらこれらの検査方法には一長一短がある。無菌性試験は真菌、好気性細菌および嫌気性細菌など幅広く検出可能であるが判定までに 14 日間の日数が必要であり最終製品の安全性の確認には適さない。エンドトキシンは短時間でグラム陰性菌の感染を検出することができるが、エンドトキシンを保有しないグラム陽性菌の感染の場合、検出には適さないなどである。ウイルスの検出においても PCR 等で同時に検出できるウイルスは限定されている。このように、現状では製品出荷時に全感染性微生物の感染を否定することができないのが現状である。

その為、エクソソームを解析することで、感染性微生物側の検出をするのではなく、感染性微生物に対する生体側の反応を評価するという全く逆の発想から生まれた新たな再生医療等製品の安全性評価方法を確立することが出来ないか検討した。この評価方法が確立すれば、感染性物質のみならず、生体に影響を与える物質も検出できる汎用性のある評価方法となり得る可能性があることが予想される。尚且つ、この評価法を導入することにより、感染性微生物の種類を問わず感染の有無を簡便かつ的確に確認できることが期待され、再生医療等製品に含まれている感染性物質の安全性確認における新たなスタンダードを構築し得ることが出来ると考える。また、再生医療等製品の培養工程に含まれるペニシリン等の残存が生体側にア

ナフィラキシーを起こす場合があり、現行の再生医療には感染性物質以外にも製品内の薬剤や試薬等の残存が、生体に影響を及ぼすリスクが一定割合で存在する。この評価法を確立することができれば、*in vitro* で生体側の反応を観察することが可能となるため、感染性物質にとどまらず生体側に影響を及ぼすあらゆる薬剤の検出にも応用できる可能性がある。検討する感染性物質、細胞株の組み合わせによりエクソソームの分泌に量的、質的变化が起こる可能性もあり、そのエクソソームの詳細を解析することは、感染やアナフィラキシーの病態の理解に役立つことが期待され、本研究内容が感染性物質の安全性評価方法の確立にとどまらず、感染性物質に対する生体の反応や病態形成にいたる機序を明らかにするうえで有用な結果をもたらすことが期待される。

2. 研究の目的

感染症などによりエクソソームの分泌が増加することは知られているが、感染性物質によるエクソソームの分泌、抑制の詳細については不明な点が多い。本研究では *in vitro* で感染性物質により刺激される宿主側の変化をエクソソームの量的、質的及び経時的变化から解析することで、再生医療等製品の安全性評価が可能であるかを検討することを目的とする。また、血管内皮細胞が障害された場合にはエクソソームに加えて、micro particle (MP) が分泌されることが報告されている。さらに 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子である microRNA が細胞内や細胞から分泌されるエクソソーム内に含まれることから、内皮細胞特異的な microRNA である mir-126-5p の検出もあわせて試みた。

3. 研究の方法

(1) 血管内皮細胞への LPS 添加による CD9 発現量の確認

① 血管内皮細胞 (HUVEC) を 10cmdish に 1×10^6 cells /dish で培養し、confluence に達した状態にした後、DPBS で洗浄し、LPS を種々の濃度で添加し、37°C、5%CO₂ 下で一定時間の培養を行い、刺激する。

② 培養終了後、各上清は回収し、HUVEC 上清として、また上清除去後の各細胞は DPBS で洗浄後 RIPA buffer を用いて溶解し、HUVEC lysate としてサンプル調製を行う。

③ 調製後,サンプル中のエクソソーム発現量をウェスタンブロッティングにて確認した。

(2) 血管内皮細胞への TNF- α 添加による micro particle (MP) および micro-RNA 発現の確認

① 血管内皮細胞 (H U V E C) を 24wellplate に 2×10^5 cells /dish で培養し、confluence に達した状態にした後、TNF- α を種々の濃度で添加し、LPS と同様に一定時間培養を行う。

② 培養終了後、培養上清を回収し、micro particle を flow cytometry で、microRNA を qRT-PCR にて解析した。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞へ LPS を加えて刺激した後に CD9 抗体を用いて CD9 陽性エクソソームの検出を行った結果、HUVEC lysate にて、LPS の濃度と時間での発現量の変化が見られた。LPS を 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1ug/ml の濃度で添加し、4 時間培養した cell lysate より CD9 陽性反応を確認した結果、0.5ug/ml の濃度で添加した際に発現が強く見られた。

(図 1) また、LPS 添加後の培養時間の継時的観察を行った結果、4 時間で反応が大きく見られ、24 時間後には減少していることが確認された。(図 2)

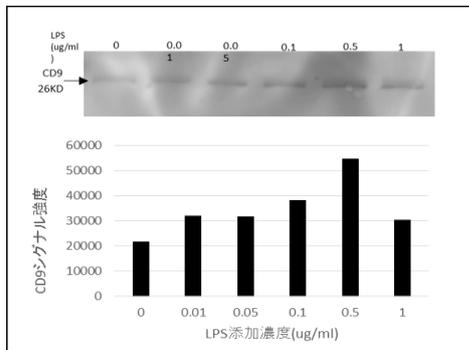


図1 LPS添加後のCD9陽性反応

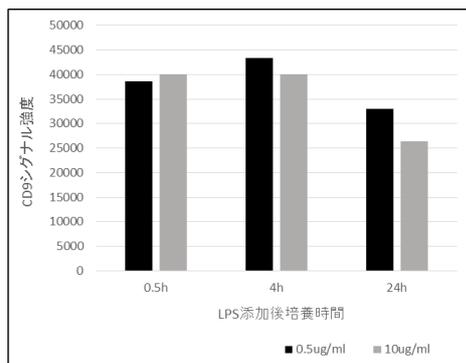


図2 CD9陽性反応の時間的変化

2) LPS を添加刺激することで、カスパーゼ 11, カスパーゼ 1 の活性化により、IL-1 β や TNF 等の炎症系サイトカインが活性化される。TNF- α は好中球からエラストラーゼを産生させ、血管内皮細胞を障害し、血管内皮の透過性が亢進し、血漿の漏出、血液の濃縮による微小循環障害を起こすことから、LPS よりも強力に細胞への障害を誘発させることが可能であると考え、培養血管内皮細胞へ TNF- α を 10ng/ml の濃度で添加し、培養上清より microparticle (MP) を抽出し、flow cytometry で内皮特異的マーカーの解析を行った。

その結果、刺激開始 24 時間で MCAM CD146 の発現の増強が確認された。CD146 は膜貫通型糖蛋白であり、中間型栄養膜細胞マーカーとして利用できるほかに活性化 T 細胞サブセットへの発現を確認することが出来ることから、TNF- α 添加により、T 細胞が活性化され IL-2 等の炎症サイトカインが産生されていることが示唆される。(図 3)

しかしながら、E-selectin CD62E が減少傾向になることや、その他内皮特異的マーカーの発現傾向に差が見られないことから、MP 分子が細胞外への放出されるのではなく、内在されてしまう可能性もあると考えられる。

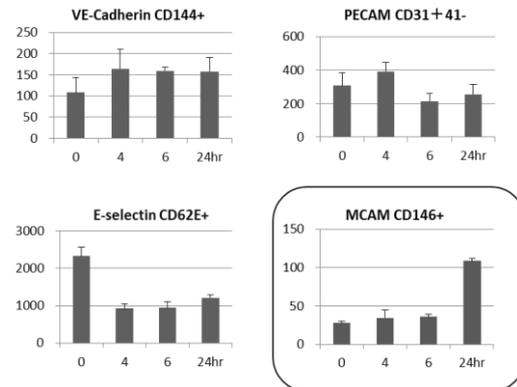


図3 TNF- α activation (flow cytometry)

また、qRT-PCR でも同時間で mir-126-5p の発現増幅がみられた。mir-126 は VEGF シグナルを抑制し、血管内皮細胞の遊走性が亢進し生存率が上昇する。また、内皮細胞のアポトーシス小体に多く含まれており、血管新生が促進されていることが報告されている。(図 4)

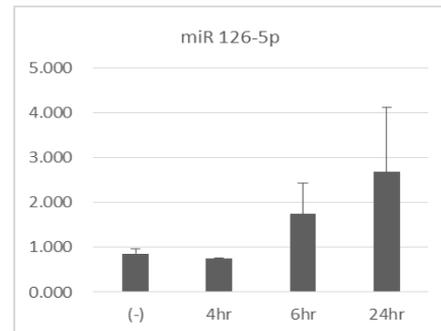


図4 TNF- α activation(qRT-PCR)

これらの結果より、培養細胞中のエクソソーム、microparticle、microRNA の増加、減少は 24 時間で観察することが可能であり、迅速な解析方法として有効であると考えられる。しかしながら、エクソソームやMPは刺激による抑制や放出の機構は様々であり、培養細胞中や生体内での動態も異なることがありうる。今後、分泌されたエクソソームの同定を行っていくことで感染性物質に対する生体の反応や病態形成にいたる機序を明らかにすることができれば有用な結果をもたらすことが期待されていくと考える。

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)

[学会発表] (計 2 件)

① 沖田 ひとみ

パスボックスを用いた物品搬入出における汚染リスク回避方法の検討
第 17 回日本再生医療学会総会
2018 年 3 月 22 日 パシフィコ横浜(横浜市)

② 沖田 ひとみ

多点微粒子測定による塵埃発生ワーストポイントにおける環境菌採取箇所の検討
第 16 回日本再生医療学会総会
2017 年 3 月 7 日 国際センター(仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖田 ひとみ (OKITA, Hitomi)
東北大学・大学病院・助手
研究者番号 : 30400451