

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究(B) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17H04264
 研究課題名(和文)細胞外小胞を介した幹細胞相互作用による組織修復機構の解明と被ばく医療への応用

 研究課題名(英文) Repairing of radiation-induced tissue damage by extracellular vesicles that mediate interaction of tissue-specific stem cells

 研究代表者
 一戸 辰夫 (ICHINOHE, TATSUO)

 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

 研究者番号：80314219
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、放射線損傷を受けた組織幹細胞に対する間葉系幹細胞(MSC)の生物学的作用を解明するとともに、種々の放射線惹起性臓器障害に対するMSCを用いた新たな組織再生治療法を開発するための基盤となる科学的根拠の確立を目指した。全身放射線照射(TBI)を前処置に用いたマウスモデルでの検討により、骨髄由来のMSCに由来する細胞外小胞(EVs)が造血細胞移植後の移植片対宿主病の改善に寄与するとともに、全身放射線照射後に発症する消化管の粘膜障害を修復し得ることが確認された。また骨髄MSC由来EVsの組織保護作用を担う候補分子としてmiR-125a-3pを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チェルノブイリ原子力発電所事故、東海村JCO臨界事故、福島第一原子力発電所事故等、現代社会は急性放射線障害が発生するリスクとの共存を求められている。また、放射線は、各種のX線検査、悪性腫瘍の治療など日常的な医療に汎用されているが、一部の患者に起こり得る医療用放射線使用に関連する組織障害への根本的な治療法は開発されていない。したがって、本研究の成果により、骨髄や脂肪組織に由来する間葉系幹細胞を放射線障害の細胞治療医薬品として開発する道筋が得られたことの意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at establishing the scientific foundation of novel cellular treatment of radiation-induced organ damage as well as acute radiation syndrome by use of mesenchymal stromal/stem cells (MSCs) and MSC-derived extracellular vesicles (EVs). Using appropriate mouse hematopoietic cell transplantation models conditioned with total-body irradiation (TBI), we have revealed that systemic infusion of human bone marrow-MSC-derived nanovesicles prolonged the survival of mice with acute graft-versus-host disease (GVHD) and reduced the pathologic damage in multiple GVHD/TBI-targeted organs, particularly that of the gastrointestinal system. This effect was not reproducible when we used fibroblast-derived EVs, suggesting the special characteristics of MSC-derived EVs. Also by using microarrays of microRNA, we found that predominant presence of miR-125a-3p in BM-MSC-derived EVs as compared with fibroblast-derived EVs.

研究分野：細胞移植学 血液免疫学

キーワード：被ばく医療 組織再生治療 間葉系幹細胞 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

現代社会は常に重大な放射線事故のリスクにさらされているが、高線量被ばくによる急性放射線症候群(acute radiation syndrome, ARS)が発生した際の医学的救済方法は現在でも確立していない。ARS では、良く知られている造血免疫系に対する障害のみならず、消化管や皮膚、中枢神経系等にも不可逆的な組織障害が惹起され、最終的には致死的な多臓器不全に至る。これまで試みられてきたほぼ唯一の医学的治療は同種造血幹細胞移植であるが、ドナー造血細胞の持続的着生が確認された事例はほとんどなく、非造血系組織の修復にも寄与しないことから、その有用性はきわめて限定的と考えられている。間葉系幹細胞(mesenchymal stromal/stem cells, MSC)は、骨髄や全身諸組織の血管周囲に分布する中胚葉由来の成体幹細胞であり、近年、MSCの有する組織修復作用と抗炎症作用が、高線量被ばく後に発生する組織損傷と炎症の沈静化にも有効である可能性が示唆されている。しかしながら、MSCがGVHDや放射線による組織障害をどのような機序によって修復に導くかは不明であり、臨床効果も細胞ロット間・個人間で大きく相違している点に課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究においては、放射線損傷を受けた特定の組織幹細胞の機能をMSCあるいはMSC-EVsが賦活化する分子機序を解明するとともに、ARSを含むさまざまな急性および晩発性の放射線惹起性臓器障害に対する医学的救済手段として、体外で調整したMSCあるいはMSC-EVsの局所あるいは全身への投与による組織再生治療法を開発するための proof-of-principle を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 骨髄由来 MSC の調整

Human MSCs (mesenchymal stromal/stem cell)はAllCellsから購入したBM(bone marrow) sampleから分離した。コロニー形成細胞を分散させるために、初めの培養液は継代培養に使用した (passage1)。Passage3の細胞をこの実験ではBM-MSCsとして使用した。

2) EV の分離と調製

BM-MSCs (2×10^5 cells)を培養し、7日後に上清を10 mlのserum-free medium (SFM)に移した。調整後のSFMを24時間後に収集し2000gで30分遠心分離した後、上澄み液を0.2 μ mのフィルターで濾し、total exosome isolation reagentと混ぜ、4°Cで一晩インキュベートし1時間10000gでEVを遠心分離した。調製したEVの平均タンパク量や粒子量はそれぞれ4.48 mg/ml、 $4.23 \text{ mg} \times 10^9$ particle/mlであった。

3) 全身放射線照射・造血細胞移植によるマウス急性GVHDモデル

7~9週のC57BL/6 (B6)マウス、DBA/2 (D2) マウスとB6D2F1 (BDF1) マウスを入手し、GVHDを誘導するため、B6マウスから採取した 1×10^7 脾細胞を移植前に8 Gyの全身照射を行ったBDF1マウスの尾から経静脈的に注入した。GVHDを発症したマウスは移植5日後に二つのグループにランダムに分けられた。コントロールグループには200 μ Lのsaline、EV治療グループには200 μ Lのsalineと 2×10^6 human BM-MSCs/kg由来のEVを注入した。

4) 網羅的マイクロ RNA 解析

RNA は miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて、human BM-MSC-または NHDF-derived EVs から抽出した。マイクロ RNA 発現プロファイルは 3D-Gene miRNA microarray analysis system (Toray Industries)を使用して評価した。全部のマイクロアレイデータは NCBI Gene Expression Omnibus から入手できる。(microarray accession number is GSE99082)

4 . 研究成果

BM-MSC-derived EVs を aGVHD マウスに注入すると、対照群と比較し、生存期間の延長が観察され、GVHD の標的となる多臓器損傷が減少した。EV 治療 GVHD マウスでは、CD62-CD44+ effector T cell 値が低下、CD62+CD44- naïve T cell 値が上昇し、BM-MSC-derived EVs の投与により、T cell を naïve phenotype から effector phenotype に変える機能が抑制されていることが示唆された。MicroRNA のマイクロアレイ解析では、BM-MSC-derived EVs の microRNA profile は normal human dermal fibroblasts(NHDFs)-derived EVs と異なり、miR-253a-3p の upregulation、細胞増殖プロセスの downregulation がみられた。また、この効果はヒト繊維芽細胞由来の EV では再現されず、EV に含まれるマイクロ RNA の網羅的比較解析の結果、MSC-EV に含有される特定のマイクロ RNA がこれらの作用に関連している可能性を示唆する新知見が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sugino N, Ichinohe T, Takaori-Kondo A, Maekawa T, Miura Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 Pharmacological targeting of bone marrow mesenchymal stromal/stem cells for the treatment of hematological disorders.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-017-0038-5.	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 Iwasa M, Miura Y, Fujishiro A, Fujii S, Sugino N, Yoshioka S, Yokota A, Hishita T, Hirai H, Andoh A, Ichinohe T, Maekawa T.	4. 巻 105
2. 論文標題 Bortezomib interferes with adhesion of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia cells through SPARC up-regulation in human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Hematol.	6. 最初と最後の頁 587-597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-016-2169-x.	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 Fujii S, Miura Y, Iwasa M, Yoshioka S, Fujishiro A, Sugino N, Kaneko H, Nakagawa Y, Hirai H, Takaori-Kondo A, Ichinohe T, Maekawa T.	4. 巻 57
2. 論文標題 Isolation of mesenchymal stromal/stem cells from cryopreserved umbilical cord blood cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Clin Exp Hematop.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3960/jslrt.16019.	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 Fujishiro A, Miura Y, Iwasa M, Fujii S, Sugino N, Andoh A, Hirai H, Maekawa T, Ichinohe T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Effects of acute exposure to low-dose radiation on the characteristics of human bone marrow mesenchymal stromal/stem cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-017-0049-2.	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 Fujii S, Miura Y, Fujishiro A, Shindo T, Shimazu Y, Hirai H, Tahara H, Takaori-Kondo A, Ichinohe T*, Maekawa T*.(*co-senior author)	4. 巻 36
2. 論文標題 Graft-versus-host disease amelioration by human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles is associated with peripheral preservation of naive T Cell populations.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells.	6. 最初と最後の頁 434-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/stem.2759.	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 Masuda J, Takayama E, Ichinohe T, Strober W, Mizuno-Kamiya M, Ikawa T, Kitani A, Kawaki H, Fuss I, Kawamoto H, Seno A, Vaidyanath A, Umemura N, Mizutani A, Kasai T, Honjo Y, Satoh A, Murakami H, Katsura Y, Kondoh N, Seno M.	4. 巻 16
2. 論文標題 Suppression effect on IFN- of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells isolated from 2-microglobulin-deficient mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Ther Med.	6. 最初と最後の頁 4277-4282
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2018.6689.	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 Honjo Y, Ichinohe T.	4. 巻 43
2. 論文標題 Cellular responses to ionizing radiation change quickly over time during early development in zebrafish.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Biol Int.	6. 最初と最後の頁 516-527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbin.11117.	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 一戸辰夫	4. 巻 108
2. 論文標題 Editorial: 細胞創薬の発展と細胞治療の展望.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本内科学会雑誌.	6. 最初と最後の頁 1355-1358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Fujii Sumie, Yasuo Miura, Aya Fujishiro, Takero Shindo, Yutaka Shimazu, Hideyo Hirai, Akifumi Takaori-Kondo, Tatsuo Ichinohe, Taira Maekawa.
2. 発表標題 Human BM-MSC derived extracellular vesicles modulate hematopoietic cells in GVHD mice.
3. 学会等名 第80回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Honjo Y, Ichinohe T.
2. 発表標題 Effects of ionizing radiation on zebrafish early embryogenesis.
3. 学会等名 3rd International symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sumie Fujii, Yasuo Miura, Aya Fujishiro, Takero Shindo, Yutaka Shimazu, Hideyo Hirai, Akifumi-Takaori-Kondo, Tatsuo Ichinohe, Taira Maekawa.
2. 発表標題 Human bone marrow mesenchymal stromal/stem cell-derived extracellular vesicles ameliorate graft-versus-host diseases-related manifestations.
3. 学会等名 59th Annual Meeting of the American Society of Hematology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki Iwasa, Yasuo Miura, Aya Fujishiro, Sumie Fujii, Noriko Sugino, Satoshi Yoshioka, Hideyo Hirai, Akira Andoh, Tatsuo Ichinohe, Taira Maekawa.
2. 発表標題 Bortezomib contributes to the elimination of B-ALL cells through SPARC upregulation in BM-MSCs.
3. 学会等名 第79回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 藤井紀恵, 三浦康生, 藤城綾, 進藤岳郎, 島津裕, 平位英世, 高折晃史, 一戸辰夫, 前川平.
2. 発表標題 ヒト骨髓間葉系幹細胞由来細胞外小胞はナイーブ制御性T細胞を保持し、急性移植片対宿主病を緩和する.
3. 学会等名 第40回日本造血細胞移植学会総会.
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>間葉系幹細胞由来の生体ナノ粒子が造血幹細胞移植後の免疫異常を修復することを明らかにしました https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/43091 Hiroshima University UPDATE February 2018 https://www.hiroshima-u.ac.jp/en/koho_press/kohoshi/HUUpdate 広島大学原爆放射線医科学研究所 研究成果に係る報道発表・記者説明会 https://www.hiroshima-u.ac.jp/rbm/research/press 間葉系幹細胞由来の生体ナノ粒子が造血幹細胞移植後の免疫異常を修復することを明らかにしました https://www.hiroshima-u.ac.jp/news/43091 HIROSHIMA UNIVERSITY UPDATE February 2018 https://www.hiroshima-u.ac.jp/en/koho_press/kohoshi/HUUpdate 広島大学原爆放射線医科学研究所 研究成果に係る報道発表・記者説明会 https://www.hiroshima-u.ac.jp/rbm/research/press</p>

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	高山 英次 (Takayama Eiji) (70533446)	朝日大学・歯学部・准教授 (33703)	
研究分担者	三浦 康生 (Miura Yasuo) (70605146)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	削除：2019年1月10日
研究分担者	前川 平 (Maekawa Taira) (80229286)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	