

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17007

研究課題名(和文) DFAT exosomeの難治性炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new treatment for intractable inflammatory bowel disease using exosome derived from DFAT

研究代表者

川島 弘之 (KAWASHIMA, Hiroyuki)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：60645703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell, DFAT)およびASC由来のエクソソームからRNAを抽出し、miRNAの発現解析を行った結果、T細胞の増殖制御に係わるmiRNA、ナイーブT細胞から制御性T細胞への分化制御に係わるmiRNA、Th17細胞への分化を制御に係わるmiRNAの発現が確認された。DFATとASC、それぞれに由来するエクソソームのヒトT細胞の増殖と分化への影響に関して検討した結果、いずれも用量依存性にT細胞の増殖を抑制し、また制御性T細胞への分化を促進することで、Th17細胞への分化を抑制することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は脂肪を脱分化して作製した脱分化脂肪細胞(DFAT)が、間葉系幹細胞と同様の免疫抑制能をもつことを示し、炎症性腸疾患を念頭に新規治療法の開発を行ってきた。しかしDFATを静脈投与することで、炎症性腸疾患の改善は見られたものの、投与した細胞の大半は肺でトラップされ、target部位への細胞輸送はわずかとなってしまっただけでなく、しばしば肺塞栓によって呼吸停止を引き起こすこともあった。今回DFATの免疫抑制能の一部が、exosomeによりもたらされることが証明されたことで、今後細胞を直接使用せずにエクソソーム単体で炎症性腸疾患に対する新規治療法を開発することが期待される。

研究成果の概要(英文)：We extracted RNA from DFAT- and ASC-derived exosomes and analyzed miRNA expression. We confirmed the expression of miRNAs that regulate T cell proliferation, and we also confirmed the expression of miRNAs that differentiation of naive T cells to regulatory T cells, or differentiation of Th17 cells.

We examined the effect of exosomes derived from DFAT and ASC on proliferation and differentiation of human T cells. It was confirmed that both of them suppressed the proliferation of T cells, promoted the differentiation into regulatory T cells, and suppressed the differentiation into Th17 cells in a dose-dependent manner.

研究分野：小児外科

キーワード：DFAT 炎症性腸疾患 エクソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、生体を構成するすべてに脂質小胞体(exosome)が含まれ、細胞間情報伝達の重要な役割を担うことが報告されている。Exosome は、抗炎症作用や抗腫瘍効果をもたらすため、様々な疾患に対して研究が行われており、中でも exosome の持つ免疫抑制能に注目が集まっている。我々は、脂肪を脱分化して作製した脱分化脂肪細胞(DFAT)が、間葉系幹細胞と同様の免疫抑制能をもつことを示し、炎症性腸疾患を念頭に新規治療法の開発を行ってきた。しかしながら、免疫抑制能を目的とした細胞治療には至っていないのが現状である。そこで我々は、DFAT から抽出した exosome に着目した。DFAT の免疫抑制能の一部が、exosome によりもたらされることが証明できれば、細胞を使用せずに exosome 単体で炎症性腸疾患に対する新規治療法の開発が期待できると考える。

2. 研究の目的

本研究での主たる目的は、hDFAT exosome の免疫抑制能を証明することである。すでに hDFAT exosome の存在は確認済みである。そこで、ヒトリンパ球に対して増殖刺激を行い、exosome を添加することで、リンパ球の増殖抑制がみられることを確認する。また、当教室に保存されている臍帯血を用いて naïve T 細胞に対する exosome の分化誘導能を検討し、hDFAT exosome の IBD に対する有用性を検証する。更に、既に報告されている免疫抑制に関与する miRNA を用い、exosome の機能解析を行う。また、IBD モデルマウスに hDFAT exosome を投与し、腸管炎症の改善を検討する。これらの実験を通じて、hDFAT exosome を用いた再生医療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) Exosome の抽出

DFAT および ASC は既報に従い調製した。

DFAT、ASC を 10cm ディッシュにそれぞれ 3 枚ずつ播種し、70~80%コンフルエント程度まで培養した。それぞれ、FBS が添加されていない培地である Advanced DMEM 5ml/dish に培地交換をした。37℃、5%CO₂条件下で 2 日間培養し、培養上清を回収した。3,000 × g で 15 分間遠心分離し、細胞や細胞破片を沈殿させた。DFAT、ASC の培養上清を 10ml ずつ 15ml コニカルチューブに回収し、Exosome 回収試薬である Exo-Quick TC (SBI) を 2ml ずつ添加した。よく転倒混和した後、4℃下で、一晚静置した。室温下、13,000rpm で 30 分間遠心分離した後、上清を 10ml 吸引し、さらに 13,000rpm で 5 分間遠心分離し、Exosome のペレットを得た。得られたペレットの定量評価として Micro BCA™ Protein Assay Kit(Thermo scientific)を用いて蛋白濃度測定を行った。得られたペレットは適切なバッファー、培地に懸濁後、実験に使用した。

(2) マイクロアレイ法による miRNA の網羅的解析

同一ドナー (n = 3) から調製した DFAT、ASC 由来 Exosome から SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit(SBI、SeraMir)を用いて total RNA を抽出し、バイオアナライザ(Bioanalyzer RNA6000 Pico)で total RNA の解析を行った。その後、Agilent Technology 社製のオリゴ DNA マイクロアレイを用いて miRNA の網羅的解析を行った。マイクロアレイ法の実験開始量は total RNA 30 ng とした。RNA は miRNA Complete Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) を用いて cyanine (cy3) でラベリングした。ラベリング後、Agilent SurePrint G3 Human miRNA 8x60K Rel.21 (design ID: 070156) array で、55℃、20 時間ハイブリダイゼーションした。洗浄後、Agilent DNA microarray scanner でスキャンした。発現解析は Agilent GeneSpring GX version 13.1 (Per chip: Normalization to 95 percentile shift or None ; Per gene: None) で行い、human miRNA のプローブ(SurePrint G3 Human miRNA 8x60K Rel.21 (design ID: 070156)) は合計 2,549 個とした。

(3) リアルタイム reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)法

TaqMan プローブを用いたリアルタイム RT-PCR 法を用いて DFAT、ASC 由来 Exosome の miRNA の発現を評価した。DFAT、ASC 由来 Exosome から SeraMir™ Exosome RNA Amplification Kit(SBI、SeraMir)を用いて total RNA を抽出し、バイオアナライザ(Bioanalyzer RNA6000 Pico)で total RNA を評価した。TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を得た。TaqMan プライマー/プローブとして、T リンパ球の増殖を制御する作用⁴³⁻⁴⁵が報告されている miRNA-20a-5p、miRNA-17、ナイーブ T 細胞から制御性 T 細胞に分化を誘導する作用が報告されている miRNA-26a-5p、miRNA-100-5p、ナイーブ T 細胞から Th17 細胞への分化を制御する作用が報告されている miRNA-20b-5p を用いた。Exosome の内部標準遺伝子として U6 (NR_004394) の発現を同様に測定した。

(4) T 細胞増殖に対する作用の評価

フローサイトメーターによるヒト末梢血 T 細胞の増殖の定量評価は、CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (Life technologies) を用い、添付のプロトコールに従って行った。Carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester (CFDA-SE)で蛍光標識したヒト末梢血単核球(1x10⁵/well)を Tissue culture plate 96 well に播種し、1x10⁵個の Dynabeads™ Human T-activator CD3/CD28, 30 U/ml IL-2, 10%FBS 含有 RPMI1690 を用いて培養し、T 細胞の増殖刺激

を行った。DFAT, ASC との共培養実験では、マイトマイシン C 処理したヒト DFAT, ASC を 1 well あたり 5×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 , 1×10^3 の細胞密度で末梢血単核球播種 1 日前に事前播種した。DFAT, ASC 由来 Exosome の添加実験では、1 well あたり 1, 0.1, 0.01 ペレットの Exosome を末梢血単核球播種 1 時間後に添加した。増殖刺激 4 日目に非付着細胞を回収し、FITC 標識 CFDA-SE、PE 標識 抗ヒト CD4 (BD Pharmingen™) APC 標識マウス抗ヒト CD45 抗体 (MiltenyiBiotec) を用いて染色を行った。フローサイトメトリー (FACS Aria, Becton Dickinson) を用いて T 細胞分画 ($CD45^+CD4^+$) の CFDA-SE の蛍光強度を測定した。CFDA-SE 蛍光強度のヒストグラムから FlowJo 解析ソフトウェア (FlowJo, LLC) を用いて Proliferation Index (PI) を算出した。末梢血単核球単独でリンパ球増殖刺激を行った陽性コントロールの PI に対する比 (Ratio of proliferation index) を算出し各群の比較を行った。

(5) 制御性 T 細胞分化に対する作用の評価

ヒト臍帯血 CD4 陽性細胞から制御性 T 細胞への分化誘導実験は既報⁵⁹に従い実施した。ヒト臍帯血 CD4 陽性細胞 (1×10^5 /well) を Tissue culture plate 96 well (VIOLAMO) に播種し、抗 CD3/CD28 抗体 (Dynabeads™ Human T-activator CD3/CD28, Thermo Fisher Scientific), 30 U/ml リコンビナント IL-2 (PeproTech) 含有 RPMI1640 (Life technologies) を用いて培養し、制御性 T 細胞への分化誘導を行った。DFAT, ASC との共培養実験では、マイトマイシン C 処理したヒト DFAT, ASC を 1 well あたり 5×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 , 1×10^3 の細胞密度で末梢血単核球播種 1 日前に事前播種した。DFAT, ASC 由来 Exosome の添加実験では、1 well あたり 1, 0.1, 0.01 ペレットの Exosome を末梢血単核球播種 1 時間後に添加した。分化誘導 4 日目に非付着細胞を回収し、FITC 標識マウス抗ヒト CD4 (BD Pharmingen) PE 標識マウス抗ヒト CD25 (BD Pharmingen) APC 標識マウス抗ヒト FoxP3 抗体 (MiltenyiBiotec) にて染色を行った。フローサイトメトリー (FACS Aria) を用いて $CD4^+$ T 細胞分画における制御性 T リンパ球分画 ($CD25^+FoxP3^+$) の割合を測定した。

(6) Th17 細胞分化に対する作用の評価

ヒト臍帯血 CD4 陽性細胞から Th17 細胞への分化誘導は CellXVivo Human Th17 Cell Differentiation Kit (R&D systems) を用いて行った。ヒト臍帯血 CD4 陽性細胞 (1×10^5 /well) を Tissue culture plate 96 well (VIOLAMO) に播種し、上記キット添付のプロトコールに従い制御性 T 細胞への分化誘導を行った。分化誘導用基礎培地として XVIVO15 (Lonza) を使用した。DFAT, ASC との共培養実験では、マイトマイシン C 処理したヒト DFAT, ASC を 1 well あたり 5×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 , 1×10^3 (それぞれ末梢血単核球に対して 1/2, 1/5, 1/10, 1/100) の細胞密度で末梢血単核球播種 1 日前に事前播種した。DFAT, ASC 由来 Exosome の添加実験では、1 well あたり 1, 0.1, 0.01 ペレットの Exosome を末梢血単核球播種 1 時間後に添加した。分化誘導 10 日目に非付着細胞を回収し、FITC 標識マウス抗ヒト CD4 (BD Pharmingen) PE 標識マウス抗ヒト CD25 (BD Pharmingen) APC 標識マウス抗ヒト IL17A 抗体 (IL17 Secretion assay detection kit, MiltenyiBiotec) にて染色を行った。フローサイトメトリー (FACS Aria) を用いて $CD4^+$ T 細胞分画における Th17 細胞分画 ($CD25^+IL17A^+$) の割合を測定した。

4. 研究成果

(1) Exosome に含有する small RNA の発現解析

3名のドナーに由来する DFAT, ASC の培養上清からそれぞれ Exosome を回収後、total RNA を抽出しバイオアナライザで RNA の品質分析を行ったところ、DFAT-Exo、ASC-Exo 内には高純度の small RNA が含まれていることを確認した。

次に miRNA マイクロアレイ法を用いて同一ドナーに由来する DFAT-Exo および ASC-Exo から抽出した miRNA の発現プロファイルを解析した。T 細胞の増殖や分化に関わることが報告されている miRNA を文献的に検索し、合計 12 個の miRNA をリストアップした。リストアップされた miRNA がそれぞれ DFAT-Exo、ASC-Exo で発現しているか検討した結果、T 細胞の活性化・増殖抑制作用が示されている miRNA-20a-5p や miRNA-17-5p、Treg 細胞の分化制御作用が報告されている miRNA-26a-5p や miRNA-100-5p、Th17 細胞の分化抑制作用が報告されている miRNA-20b-5p、Th17 細胞の分化促進作用が報告されている miRNA-21-5p が、検討したすべての DFAT-Exo、ASC-Exo で発現していることが明らかになった。また miRNA-99a-5p および miRNA-155-5p は約半数のドナーで発現が検出された。一方、T 細胞の活性化・増殖促進作用が示されている miRNA-19b や miRNA-182-5p、Th17 細胞の分化促進作用が示されている miRNA-301 や miRNA-326 は DFAT-Exo、ASC-Exo とともに発現が認められなかった。またリストアップした miRNA の中で、DFAT-Exo または ASC-Exo どちらかのみで発現がみとめられる miRNA は同定されなかった。また DFAT-Exo、ASC-Exo 両方に発現が確認された miRNA の発現強度も両者間に明らかな差はなかった。

更にマイクロアレイ解析で発現を認めた T 細胞の増殖・分化に関わる miRNA (miRNA-20a-5p, miRNA-17, miRNA-26a-5p, miRNA-100-5p, miRNA-20b-5p) に関して、リアルタイム RT-PCR 法を用いてその発現を確認した。その結果、DFAT-Exo、ASC-Exo 共に解析した 5 種の miRNA の発現が 35 サイクル以内に確認された。また Exosome の内部標準遺伝子である U6 も DFAT-Exo、ASC-Exo 両者で同程度の発現が確認された。以上の結果から DFAT-Exo、ASC-Exo は T 細胞の増殖やサブセット分化に係わる複数の miRNA を同程度に含有していることが明らかになった。

(2) ヒト DFAT、ASC の T 細胞増殖に対する効果

ヒト DFAT、ASC の T 細胞増殖に対する効果を、ヒト末梢血単核球との共培養系を用いて検討した。ヒト末梢血単核球に抗 CD3/CD28 抗体と IL-2 で 4 日間、T 細胞増殖刺激を加えた結果、増殖刺激なし(Negative control)に比べ刺激あり(Positive control)では、PI が約 2 倍増加した(図 1)。各種細胞密度のヒト DFAT、ASC を事前に播種した実験区では、DFAT、ASC 共に細胞密度依存性に PI の抑制が認められた。有意差検定を行った結果、DFAT では末梢血単核球との細胞比 1/2, 1/5 で、ASC では細胞比 1/2, 1/5 で Positive Control に比べ有意に PI が低かった。DFAT,ASC 共に細胞比 1/2 の高密度条件では、Negative Control とほぼ同程度まで PI の低下が認められた。同じ細胞密度における DFAT と ASC の比較では、末梢血単核球との細胞比 1/5 で、DFAT は ASC に比べ有意に PI が低かった。以上の結果より、DFAT、ASC 共に T 細胞増殖抑制作用を示すことが明らかになった。

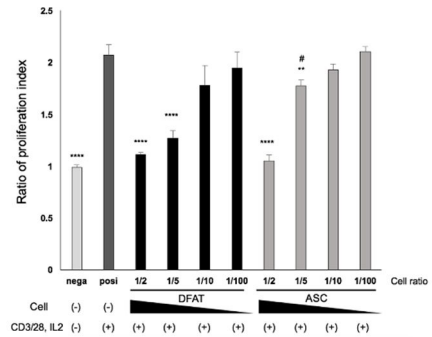


図1. ヒトT細胞増殖に対するDFAT及びASC共培養の影響

(3) ヒト DFAT、ASC 由来 Exosome の T 細胞増殖に対する効果

ヒト DFAT、ASC 由来 Exosome の T 細胞増殖に対する効果を同様に検討した。その結果、T 細胞増殖刺激による PI の増加は、DFAT-Exo、ASC-Exo 添加により用量依存性に抑制された(図 2)。統計学的解析の結果、DFAT-Exo、ASC-Exo 共に 1 pellet を添加した実験区で、Positive Control に比べ有意に PI が低かった。一方、同じ濃度における DFAT-Exo、ASC-Exo 間の比較では両者に明らかな差は認められなかった。以上の結果より DFAT-Exo、ASC-Exo 共に T 細胞増殖抑制作用を示すことが明らかになった。

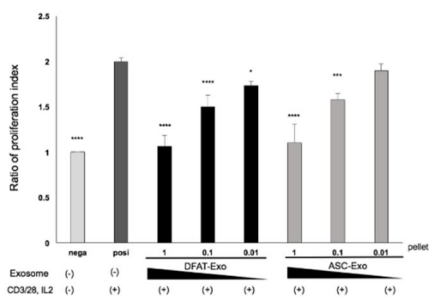


図2. ヒトT細胞増殖に対するDFAT-Exo及びASC-Exo添加の影響

(4) ヒト DFAT、ASC の制御性 T 細胞への分化能に対する効果

ヒト DFAT、ASC とヒト臍帯血 CD4 陽性細胞との共培養を行い、制御性 T 細胞への分化能に対する効果を検討した。ヒト臍帯血 CD4 陽性細胞に CD3/CD28 抗体と IL-2 で 4 日間刺激を加えた結果、制御性 T 細胞サブセット (CD25⁺FoxP3⁺細胞) の割合が、刺激なし(Negative control)では 3.0%であったのに対し、刺激あり(Positive control)では、10.0%と増加した(図 3)。ヒト DFAT、ASC を事前に播種した実験区では、刺激後の制御性 T 細胞サブセットの割合が、DFAT で 22.1%、ASC で 22.6%と Positive control (10.0%) に比べ 2 倍以上の増加を認めた。DFAT および ASC を種々の細胞密度(1/2~1/100)でヒト臍帯血 CD4 陽性細胞と共培養を行った結果、DFAT、ASC と臍帯血 CD4 陽性細胞との細胞比 1/2 の実験区で、Positive control に比べ有意に制御性 T 細胞サブセットの割合が増加した(図 4)。一方、同一細胞密度における DFAT と ASC の比較では、両細胞間に明らかな差は認められなかった。

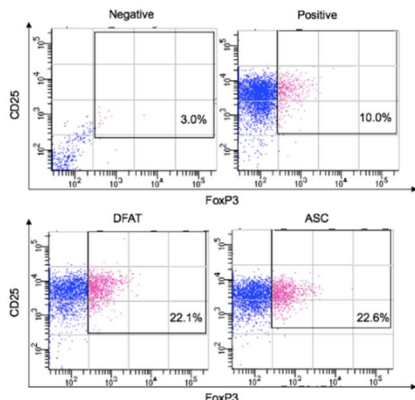


図3. ヒト制御性T細胞分化に対するDFAT及びASC共培養の影響

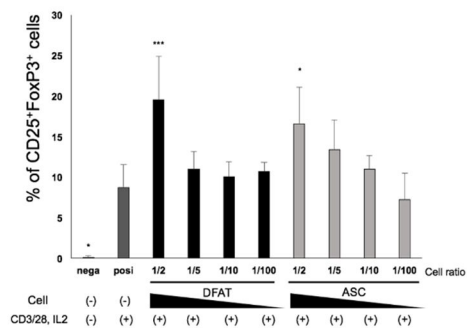


図4. ヒト制御性T細胞分化に対するDFAT及びASC共培養の影響

(5) ヒト DFAT、ASC 由来 Exosome の制御性 T 細胞への分化能に対する効果

次にヒト DFAT-Exo、ASC-Exo のヒト臍帯血 CD4 陽性細胞から制御性 T 細胞への分化誘能に対する効果を同様に検討した。DFAT-Exo、ASC-Exo を添加した実験区では、刺激後の制御性 T 細胞サブセットの割合が、DFAT-Exo で 22.8%、ASC-Exo で 18.2%と Positive control (10.0%) に比べ明らかな増加を認めた(図 5)。DFAT-Exo および ASC-Exo の濃度別検討では、DFAT-Exo、ASC-Exo 共に 1 pellet の実験区において、Positive control に比べ有意(P<0.05)に制御性 T 細胞サブセットの割合が増加した(図 6)。一方、同一細胞濃度における DFAT-Exo と ASC-Exo の比較では、

両細胞間に明らかな差は認められなかった。

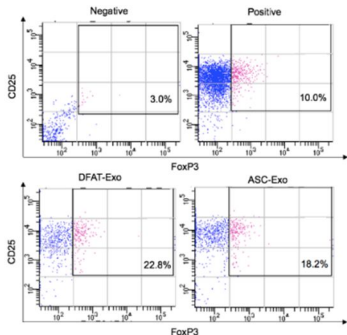


図5. ヒト制御性T細胞分化に対するDFAT-Exo及びASC-Exoの影響

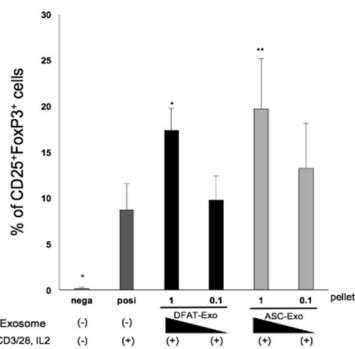


図6. ヒト制御性T細胞分化に対するDFAT-Exo及びASC-Exoの影響

(6) ヒト DFAT、ASC のヒト臍帯血 CD4 陽性細胞の Th17 細胞への分化誘導能に対する効果

ヒト DFAT、ASC とヒト臍帯血 CD4 陽性細胞との共培養を行い、Th17 細胞への分化能に対する効果を検討した。ヒト臍帯血 CD4 陽性細胞に Th17 細胞への分化誘導刺激を 10 日間加えた結果、Th17 細胞サブセット (CD25⁺IL-17A⁺細胞) の割合が、刺激なし(Negative control)では 11.8%であったのに対し、刺激あり(Positive control)では、89.4%と増加した(図7)。ヒト DFAT、ASC を事前に細胞比 1/2 で播種した実験区では、刺激後の Th17 細胞サブセットの割合が、DFAT で 34.2%、ASC で 53.7%と Positive control (89.4%) に比べ明らかな減少を認めた(図7)。DFAT およびASC を種々の細胞密度(1/2~1/100)でヒト臍帯血 CD4 陽性細胞と共培養を行った結果、DFAT、

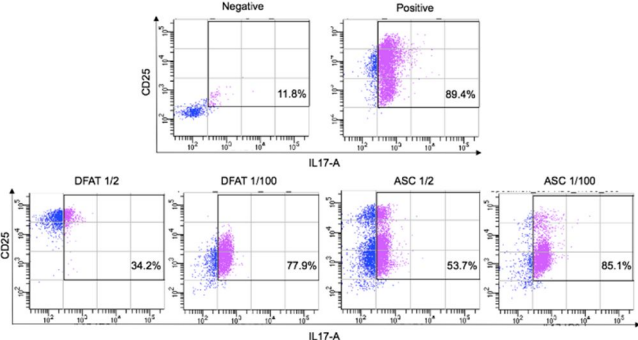


図7. ヒトTh17細胞分化に対するDFAT及びASC共培養の影響

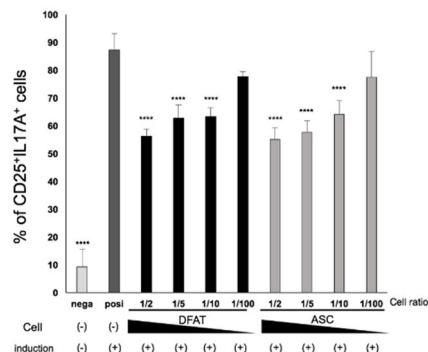


図8. ヒトTh17細胞分化に対するDFAT及びASC共培養の影響

ASC とも臍帯血 CD4 陽性細胞との細胞比 1/2、1/5、1/10 の実験区で、Positive control に比べ有意(P<0.0001)に Th17 サブセットの割合が減少した(図8)。一方、同一細胞密度における DFAT と ASC の比較では、両細胞間に明らかな差は認められなかった。

(7) ヒト DFAT、ASC 由来 Exosome の Th17 細胞への分化能に対する効果

次にヒト DFAT-Exo、ASC-Exo のヒト臍帯血 CD4 陽性細胞から Th17 細胞への分化誘導能に対する効果を検討した。DFAT-Exo、ASC-Exo を添加した実験区では、刺激後の Th17 細胞サブセットの割合が、DFAT-Exo で 31.0%、ASC-Exo で 32.9%と Positive control (89.4%) に比べ明らかな減少を認めた(図9)。DFAT-Exo および ASC-Exo の濃度別検討では、DFAT-Exo、ASC-Exo 共に 1 pellet および 0.1 pellet の実験区において、Positive control に比べ有意(P<0.0001)に Th17 細胞サブセットの割合が現象した(図10)。一方、同一細胞濃度における DFAT-Exo と ASC-Exo の比較では、両細胞間に明らかな差は認められなかった。

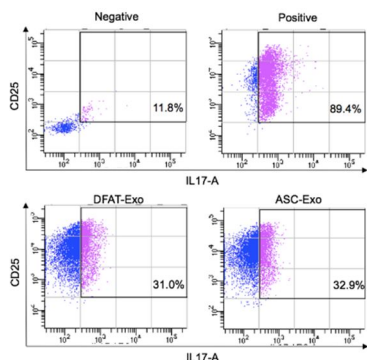


図9. ヒトTh17細胞分化に対するDFAT-Exo及びASC-Exoの影響

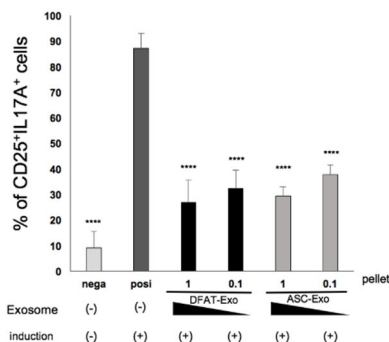


図10. ヒトTh17細胞分化に対するDFAT-Exo及びASC-Exoの影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|