

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06005

研究課題名(和文) 犬脂肪由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームの免疫調節機能に関する解析

研究課題名(英文) The effects of adipose tissue-derived mesenchymal stem cell-derived exosomes on immune function

研究代表者

手嶋 隆洋 (TESHIMA, TAKAHIRO)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授

研究者番号：80610708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：様々な疾患に対する幹細胞療法の研究が進むにつれ、間葉系幹細胞の分泌因子がもつ抗炎症効果および免疫調整効果が注目されている。そこで、本研究では脂肪由来間葉系幹細胞が分泌するエクソソームの免疫調整機能を解析した。異なる状態下の間葉系幹細胞から分離したエクソソームを用いて、末梢血単核球に与える影響を検討した結果、エクソソームはT細胞の増殖抑制、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。また、自己免疫性疾患や慢性炎症の抑制につながる効果が示唆された。今後は分泌母体である間葉系幹細胞の状態に応じたエクソソームの機能について明らかにすることが重要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、犬の脂肪由来間葉系幹細胞のエクソソームは免疫担当細胞であるT細胞に影響を与えることが明らかとなった。慢性炎症や自己免疫性疾患の発症機序に係るT細胞系の免疫担当細胞を中心に解析した結果、エクソソームによって誘導された個々のT細胞の発現割合の変化は、病態の改善につながる可能性が示唆された。本研究成果は、幹細胞療法の適用および効果に関する情報をもたらすだけでなく、cell-freeな幹細胞療法の実現にも貢献する知見を見出した。

研究成果の概要(英文)：Soluble factors, such as cytokines, exosomes, and microvesicles, secreted from adipose tissue-derived mesenchymal stem cell (AT-MSC) have potent anti-inflammatory and immunomodulatory effects. The purpose of this study was to investigate the immunomodulatory effects of exosomes secreted from canine AT-MSC. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were cultured with exosomes isolated from AT-MSC under naive and primed conditions. Increasing concentrations of exosomes, proliferation of PBMC and CD4 positive T cells were inhibited, and apoptosis of PBMC was promoted. Exosomes have changed the expression ratio of helper T cells and regulatory T cells. These alteration of T cells induced by exosomes suggested that exosomes secreted from AT-MSC contributed to improvement of chronic inflammatory and autoimmune diseases. Identification of function of exosomes under various conditions could be important for establishment of cell-free stem cells therapy using exosomes secreted from AT-MSC.

研究分野：獣医内科学

キーワード：間葉系幹細胞 エクソソーム 犬 免疫調整 T細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞から分泌される液性因子は、抗炎症作用や免疫調整作用を有している。そのため、炎症性疾患や自己免疫性疾患に対する新たな治療選択肢として、幹細胞療法に期待が高まっている。間葉系幹細胞の研究が進むにつれて、細胞自体ではなく分泌因子の投与によって同等の効果が得られるという知見も数多く報告されており、液性因子に含まれるエクソソームの機能に注目が集まっている。

2. 研究の目的

本研究では、犬の間葉系幹細胞から分泌されるエクソソーム（微小小胞体を含む）が T 細胞を中心とした免疫担当細胞に与える効果を解析した。また、分泌母体である間葉系幹細胞の状態によって、エクソソームの性状に変化が生じるのかを検討した。

3. 研究の方法

エクソソームの単離と解析

間葉系幹細胞の培養上清から PS アフィニティー法を用いてエクソソームを単離した。また、単離したエクソソームは CD9 タンパク発現を確認し、ナノサイト解析と電子顕微鏡解析を実施した。

培養条件の違いによるエクソソームの性状変化

TNF + IFN 刺激によって炎症を惹起した間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームについて、含有する microRNA の変化を PCR Array を用いて解析した。

末梢血単核球に対するエクソソームの機能解析

コンカナバリン A (ConA) によって刺激した健全な犬の末梢血単核球 (PBMC) に対するエクソソームの効果を解析した。

a. 増殖アッセイおよびアポトーシス解析

エクソソーム添加後の PBMC および CD4 陽性 T 細胞について、CFSE 色素を用いた増殖アッセイおよび Annexin V を用いたアポトーシス解析を実施した。

b. T リンパ球サブセット解析

エクソソーム添加後の CD3 陽性細胞、CD4 陽性細胞、および CD8 陽性細胞の割合をフローサイトメトリーによって解析した。

c. ヘルパー T 細胞の発現解析

エクソソーム添加後の Th1, Th2, および Th17 の割合を、フローサイトメトリーによって細胞内 IFN γ , IL-4, IL-17 を検出することで解析した。

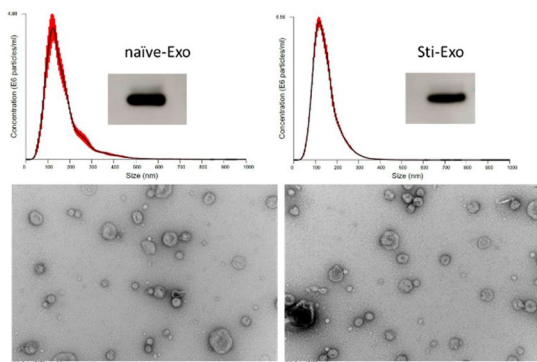
d. 制御性 T 細胞の発現解析

エクソソーム添加後の制御性 T 細胞 (Treg; CD4+CD25+Foxp3+細胞) の発現変化をフローサイトメトリーによって解析した。

4. 研究成果

間葉系幹細胞の培養上清から単離したエクソソームの解析

ナイーブな状態と TNF + IFN (それぞれ 20ng/ml) によって炎症を惹起した間葉系幹細胞 72 時間培養後の培養上清から PS アフィニティー法によってエクソソームを単離した (naïve-Exo, Sti-Exo)。ウエスタンブロットによってタンパク発現を解析した結果、naïve-Exo, Sti-Exo とともにエクソソームマーカである CD9 の発現が確認された。また、ナノサイト解析による粒子径 (naïve-Exo: 平均 166nm, Sti-Exo: 145nm) の結果からも、犬の間葉系幹細胞培養上清中から PS アフィニティー法によって、エクソソームが単離可能であることが実証された (右図)。



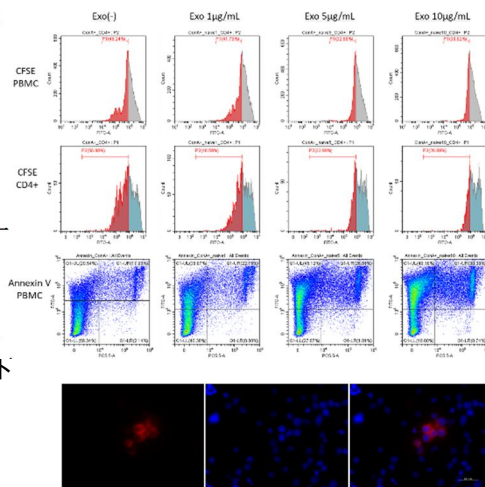
間葉系幹細胞の培養条件によるエクソソーム含有 micro RNA の解析

naïve-Exo, Sti-Exo それぞれから RNA を抽出し、PCR Array を用いて microRNA の発現を比較した。炎症刺激を加えた間葉系幹細胞から分泌されたエクソソームでは naïve な状態のものと microRNA の発現に変化が生じることが確認された。発現量の増加がみられた microRNA の中には、これまでに免疫系や T 細胞への影響が報告されているものも含まれていることから、分泌母体である間葉系幹細胞の状態によって、エクソソームの性状が変化することが示唆された。

エクソソームによる増殖およびアポトーシス誘導の解析

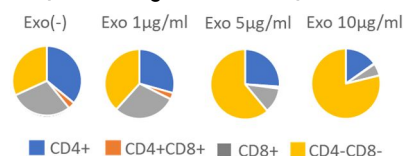
エクソソーム 1, 5, 10 μ g/mL 存在下で 72 時間培養した PBMC (ConA 5 μ g/mL で刺激) の増殖およびアポトーシス誘導について解析した。CFSE を利用した増殖アッセイでは、naïve-Exo, Sti-Exo とともに用量依存的に PBMC および CD4+T 細胞の増殖は抑制された。Annexin V を利用したアポトーシスアッセイにおいては、naïve-Exo, Sti-Exo とともに用量依存的にアポトーシス誘導割合は増加した (右図)。

また、トラッキングダイによって標識したエクソソーム添加後の CD3+細胞を観察した結果、細胞内にエクソソームが取り込まれていることを確認した (右図: Red; エクソソーム, Blue; DAPI)。



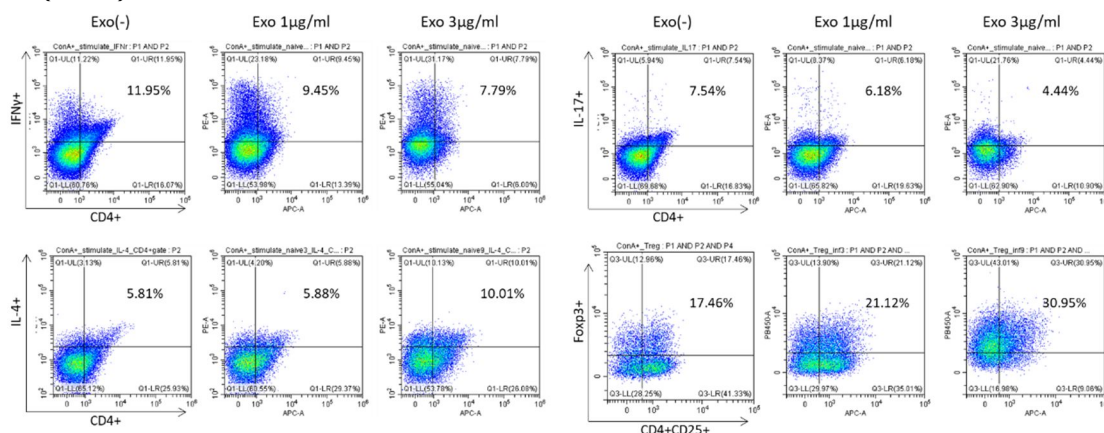
エクソソームによる T リンパ球サブセットの変化

エクソソーム 1, 5, 10 μ g/mL 存在下で 72 時間培養した PBMC (ConA 5 μ g/mL で刺激) の CD3+細胞における CD4+, CD8+細胞の発現割合を解析した。その結果、エクソソームの用量増加に伴い、CD4+, CD8+細胞ともに発現割合は低下が認められた (右図)。



エクソソームによるヘルパー T 細胞および Treg の発現変化

エクソソーム 1 μ g/mL, または 3 μ g/mL 存在下で 72 時間培養した PBMC (ConA 5 μ g/mL で刺激) の CD3+細胞における Th1, Th2, Th17 の割合を IFN γ , IL-4, IL-17 の細胞内発現によって解析した。その結果、Th1 および Th17 の発現割合は低下したのに対して、Th2 の発現は増加が認められた。また、同様にエクソソーム存在下で培養した PBMC に含まれる Treg の割合は増加が認められた (下図)。



これらの結果から、脂肪由来間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームは T 細胞に大きな影響を与えることが示された。また、分泌母体である間葉系幹細胞の状態によってエクソソームの性状に変化が生じることが明らかとなった。今回の結果から、脂肪由来間葉系幹細胞のエクソソームは慢性炎症や自己免疫性疾患における免疫調整に有効であり、臨床応用への展開も十分に期待できると考えられた。今後は、分泌母体である間葉系幹細胞の状態の違いにおけるエクソソームの性状をさらに解析するとともに、疾患モデルを対象とした in vivo 解析へと展開していきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Teshima Takahiro, Matsuoka Akito, Shiba Maika, Dairaku Kazuho, Matsumoto Hiroataka, Suzuki Ryohei, Koyama Hidekazu	4. 巻 2019
2. 論文標題 Comparison of Properties of Stem Cells Isolated from Adipose Tissue and Lipomas in Dogs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/1609876	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 -

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------