

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08760

研究課題名(和文) cell-free再生医療の幹細胞エクソソームによる脊髄虚血再灌流障害軽減法開発

研究課題名(英文) Development of methods to reduce spinal cord ischemia-reperfusion disorder by exosomes

研究代表者

森景 則保 (MORIKAGE, Noriyasu)

山口大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50335741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームとは、細胞から分泌される直径20～100nm 膜小胞である。また、エクソソームは、そのエクソソームが分泌される細胞の形質を持っていると考えられており、細胞治療に代わる可能性がある。本研究では、マウス脊髄虚血再灌流障害モデルに対して、尾静脈投与したエクソソームが、腰椎に到達する可能性があることを示した。この結果は、エクソソーム投与が、胸部大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術で生じる脊髄虚血再灌流障害を軽減させる方法の一つになる可能性を示したものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソーム、細胞から分泌される直径20～100 nmの膜小胞であり、エクソソームを分泌する細胞の形質を持つと言われている。そのため、幹細胞由来のエクソソームは、新しい治療法になる可能性がある。本研究結果では、静脈投与したエクソソームが、腰椎に到達することを示した。この結果は、エクソソーム投与が、脊髄虚血再灌流障害を軽減させる方法の一つになる可能性を示す足掛かりとなるものである。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are 20-100 nm membrane vesicles secreted from cells. It is thought that exosomes have the characteristics of the parent cell. there is a possibility of new treatment instead of cell therapy.

This study showed that exosomes administered in the tail vein may reach the lumbar spine for mice model of spinal cord ischemia-reperfusion disorder.

This result suggested that administration of exosomes might be one of methods to reduce spinal cord ischemia-reperfusion disorder occurred by stent graft for thoracic aortic aneurysm.

研究分野：血管外科

キーワード：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

胸部大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術は、脊髄虚血再灌流障害の為に約 3-8%の患者に一過性または永久的な下肢麻痺が生じる。

近年、cell-free 再生医療として、間葉系幹細胞および CD34 陽性幹細胞が分泌するエクソソームを用いた血管新生に関する研究が報告されている。エクソソームは全ての細胞から分泌される直径 20 ~ 100 nm の膜小胞であり、タンパク、mRNA、microRNA を内包しており、エクソソームを分泌する親の細胞の形質を受け継いでいると言われている。

これまでに、動物モデルにおいて脊髄虚血再灌流障害に対する虚血プレコンディショニングの有用性が報告されており、虚血プレコンディショニングでは、血中に動員される CD34 陽性幹細胞が増加し、脊髄虚血再灌流障害を軽減させると考えられている。

そのため、研究代表者は、虚血プレコンディショニングで CD34 陽性幹細胞を血中に動員する代わりに、CD34 陽性幹細胞が分泌するエクソソームを投与することで、脊髄虚血再灌流障害に対して、CD34 陽性幹細胞由来エクソソーム投与が、虚血プレコンディショニングと同等の効果を持つ可能性があるのではないかと考えた。

しかし、研究開始当初、投与したエクソソームが、脊髄に到達するか否かということが未解明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、投与したエクソソームが、脊髄に到達するか否かを、マウス脊髄虚血再灌流障害モデルで証明することである。

本研究で、投与したエクソソームが、脊髄に到達することが証明されれば、エクソソーム投与が、脊髄虚血再灌流障害を予防する画期的な方法に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼが内包されたエクソソームの作製

293T 細胞にルシフェラーゼをエクソソームに特異的に取り込ませるペプチド配列である "XPack" を持つ XPack MSCV-XP-Luciferase-EF1-Puro Expression Lentivector (SBI 社、#XPAK732PA-1)、ウイルス粒子を作製する pPACKH1 Packaging Plasmid Mix (SBI 社、#LV500A-1) を導入し、レンチウイルス液が作製された。

作製したウイルス液を 293T 細胞に与えて培養し、ルシフェラーゼが内包されたエクソソームを分泌する細胞株が作製された。

作製された細胞株が無血清培地で培養され、その培養上製を回収し、エクソソーム単離カラムを使用して、エクソソームが単離された。

作製された細胞株が、ルシフェラーゼ発光することを確認するために、24-well plate に播種された細胞株にルシフェリンを添加し、IVIS imaging system でルシフェラーゼ発光が観察された。

(2) エクソソームの濃度測定

単離されたエクソソームの濃度は、CD9 / CD63 ELISA キット (ヒト由来エクソソーム定量用) (コスモバイオ社、#EXH0102EL) を用いて測定された。

(3) 電子顕微鏡によるエクソソーム観察

単離されたエクソソームは、最終濃度が 2%パラフォルムアルデヒド + 2.5%グルタルアルデヒド in リン酸バッファーで固定された。固定されたエクソソームはカラムを使用して洗浄された。試料台にカーボンテープを貼り、そのカーボンテープ上に洗浄後のエクソソームを含む溶液を載せ、溶液が蒸発するまで乾燥させた。更に、その試料台を真空状態に設置して、サンプルを完全に乾燥させた。試料台を電子顕微鏡 FEI Quanta3D FEG に設置して、エクソソームの形態が観察された。

(4) マウス脊髄虚血再灌流障害モデルに対するルシフェラーゼ内包エクソソームの投与

脊髄虚血再灌流障害モデルは、Ba1b/c マウスを気管内挿管、人工呼吸管理下に左開胸し、下行大動脈を 10 分間の結紮により作製された。閉胸後、ルシフェラーゼ内包エクソソーム 1ng/100 μ l が、尾静脈から投与された。尾静脈投与して、10 分後および 30 分後に、犠牲死させて、脊髄の腰髄を摘出し、腰髄 L3 を PBS 0.5mL が入っている 24-well plate に浸した。そして、腰髄 L3 が入っているウェルに 30 mg/mL ルシフェリンを 0.5mL 加え、IVIS imaging system でルシフェラーゼ発光が観察された。

4. 研究成果

図1は、ルシフェラーゼを内包したエクソソームを電子顕微鏡で観察したものである。

また、黒色 bar のスケールは、500 nm である。細胞株の培養上清からエクソソーム単離カラムを使用して、単離されたエクソソームは、直径約 20 ~ 100 nm であることが確認された。

図2は、IVIS imaging system による細胞株、および、ルシフェラーゼ内包エクソソームを投与されたマウス脊髄虚血再灌流障害モデルの腰椎を観察したものである。

図2Aは、ルシフェラーゼが内包されたエクソソームを分泌する細胞株を PBS に懸濁して播種したウェルに、ルシフェリンを添加してルシフェラーゼを発光させたものである。また、図2Bは、ルシフェラー

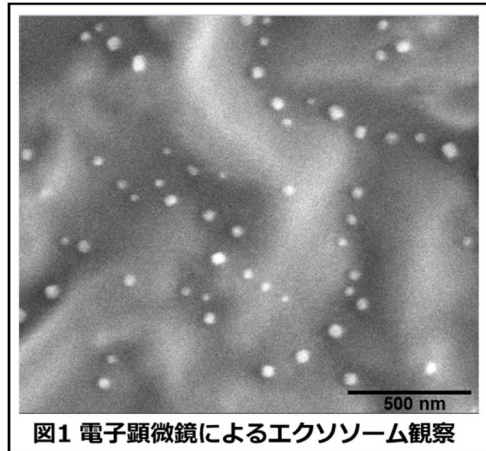
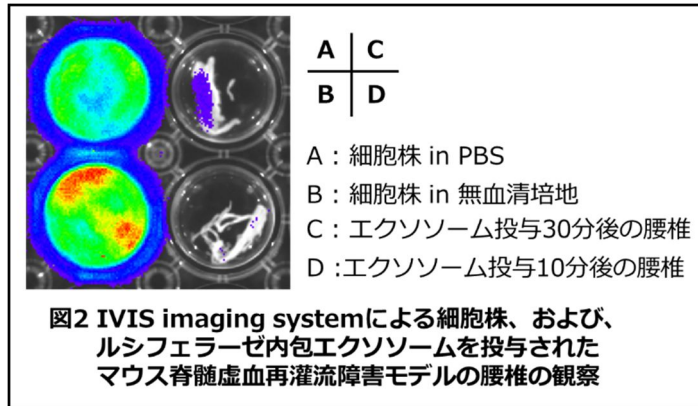


図1 電子顕微鏡によるエクソソーム観察

ゼが内包されたエクソソームを分泌する細胞株を無血清培地に懸濁して播種したウェルに、ルシフェリンを添加してルシフェラーゼを発光させたものである。図2Cは、マウス脊髄虚血再灌流障害モデルに対してルシフェラーゼ内包エクソソームを投与して30分後に摘出した腰椎L3に、ルシフェリンを添加してルシフェラーゼを発光させたものである。図2Dは、マウス脊髄虚血再灌流障害モデルに対してルシフェラーゼ内包エクソソームを投与して10分後に摘出した腰椎L3



に、ルシフェリンを添加してルシフェラーゼを発光させたものである。

この図2の結果は、マウス脊髄虚血再灌流障害モデルに投与されたエクソソームが、腰椎に到達していることを示唆している。

本研究結果は、静脈投与したエクソソームが脊髄に到達する可能性を示したものである。しかし、今後、静脈投与したエクソソームが、脊髄虚血再灌流障害を軽減させるか否かを検討する必要がある。今後の検討から、静脈投与したエクソソームが、脊髄虚血再灌流障害を軽減させる結果を得ることが出来れば、胸部大動脈瘤に対するステントグラフト内挿術により生じる脊髄虚血再灌流障害を軽減させるための方法の一つになる可能性がある。

<引用文献>

- Ueno K, Samura M, Nakamura T, Tanaka Y, Takeuchi Y, Kawamura D, Takahashi M, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K. Increased plasma VEGF levels following ischemic preconditioning are associated with downregulation of miRNA-762 and miR-3072-5p. *Sci Rep*. 2016 Dec 1;6:36758. doi: 10.1038/srep36758.
- Kamota T, Li TS, Morikage N, Murakami M, Ohshima M, Kubo M, Kobayashi T, Mikamo A, Ikeda Y, Matsuzaki M, Hamano K. Ischemic pre-conditioning enhances the mobilization and recruitment of bone marrow stem cells to protect against ischemia/reperfusion injury in the late phase. *J Am Coll Cardiol*. 2009 May 12;53(19):1814-22. doi: 10.1016/j.jacc.2009.02.015.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Samura Makoto, Morikage Noriyasu, Otsuka Ryo, Mizoguchi Takahiro, Takeuchi Yuriko, Nagase Takashi, Harada Takasuke, Yamashita Osamu, Suehiro Kotaro, Hamano Kimikazu	4. 巻 271
2. 論文標題 Endovascular Aneurysm Repair With Inferior Mesenteric Artery Embolization for Preventing Type II Endoleak	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 238 ~ 244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003299	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 Suehiro Kotaro, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Hamano Kimikazu	4. 巻 62
2. 論文標題 Regular Compression Therapy May Not Be Necessary for Lymphedema in Arms without a Subcutaneous Echo-Free Space	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 258 ~ 262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2019.04.020	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 Suehiro Kotaro, Yamamoto Shigeru, Honda Saiko, Morikage Noriyasu, Harada Eijiro, Takemoto Yoshihiro, Nagano Hiroaki, Hamano Kimikazu	4. 巻 7
2. 論文標題 Perioperative variations in indices derived from noninvasive assessments to detect postmastectomy lymphedema	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Surgery: Venous and Lymphatic Disorders	6. 最初と最後の頁 562 ~ 569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvsv.2019.02.012	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 Morikage Noriyasu, Nishimura Junichi, Mizoguchi Takahiro, Takeuchi Yuriko, Nagase Takashi, Samura Makoto, Harada Takasuke, Aga Kenichiro, Masuda Munetaka, Hamano Kimikazu	4. 巻 5
2. 論文標題 Reverse slider technique using the Endurant stent graft for accurate proximal sealing in hostile neck endovascular aneurysm repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Vascular Surgery Cases and Innovative Techniques	6. 最初と最後の頁 332 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvscit.2019.03.012	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 Samura Makoto, Morikage Noriyasu, Mizoguchi Takahiro, Takeuchi Yuriko, Nagase Takashi, Harada Takasuke, Suehiro Kotaro, Hamano Kimikazu	4. 巻 30
2. 論文標題 Recurrent Delayed Periaortitis after Endovascular Aneurysm Repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Vascular and Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jvir.2018.09.010	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 Samura M, Morikage N, Mizoguchi T, Takeuchi Y, Nagase T, Harada T, Suehiro K, Hamano K	4. 巻 11(3)
2. 論文標題 Effectiveness of Embolization of Inferior Mesenteric Artery to Prevent Type II Endoleak Following Endovascular Aneurysm Repair: A Review of the Literature	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Vasc Dis.	6. 最初と最後の頁 259-264
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3400/avd.ra.18-00064	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 Mizoguchi T, Ueno K, Yanagihara M, Samura M, Kurazumi H, Suzuki R, Morikage N, Hamano K	4. 巻 10(9)
2. 論文標題 Autologous fibroblasts, peripheral blood mononuclear cells, and fibrin glue accelerate healing of refractory cutaneous ulcers in diabetic mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 2920-2928
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suehiro K, Morikage N, Ueda K, Samura M, Takeuchi Y, Nagase T, Mizoguchi T, Hamano K	4. 巻 53
2. 論文標題 Aggressive Decongestion in Limbs with Lymphedema without Subcutaneous Echo-Free Space	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Vasc Surg	6. 最初と最後の頁 205-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2018.04.033	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 Takeuchi Y, Morikage N, Matsuno Y, Nakamura T, Samura M, Ueda K, Harada T, Ikeda Y, Suehiro K, Ito H, Sakata K, Hamano K	4. 巻 51
2. 論文標題 Midterm Outcomes of Endovascular Aortic Aneurysm Repair with Carbon Dioxide-Guided Angiography	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Ann Vasc Surg	6. 最初と最後の頁 170-176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.avsg.2018.02.036	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 Mizoguchi T, Ueno K, Takeuchi Y, Samura M, Suzuki R, Murata T, Hosoyama T, Morikage N, Hamano K	4. 巻 47(1)
2. 論文標題 Treatment of Cutaneous Ulcers with Multilayered Mixed Sheets of Autologous Fibroblasts and Peripheral Blood Mononuclear Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Physiol Biochem	6. 最初と最後の頁 201-211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000489767	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 Suehiro K, Morikage N, Ueda K, Samura M, Takeuchi Y, Nagase T, Mizoguchi T, Nakamura K, Hamano K	4. 巻 16(4)
2. 論文標題 Correlation Between Changes in Extremity Volume and Bioelectrical Impedance in Arm and Leg Lymphedema	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Lymphat Res Biol	6. 最初と最後の頁 385-389
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/lrb.2017.0063	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 Suehiro K, Morikage N, Ueda K, Samura M, Takeuchi Y, Nagase T, Mizoguchi T, Nakamura K, Hamano K	4. 巻 23(2)
2. 論文標題 Venous hemodynamics assessed with air plethysmography in legs with lymphedema	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vasc Med	6. 最初と最後の頁 139-142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1358863X17745372	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 Yoshimura K, Morikage N, Nishino-Fujimoto S, Furutani A, Shirasawa B, Hamano K	4. 巻 19(11)
2. 論文標題 Current Status and Perspectives on Pharmacologic Therapy for Abdominal Aortic Aneurysm	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Drug Targets	6. 最初と最後の頁 1265-1275
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389450119666171227223331	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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 森景則保、大塚 遼、溝口高弘、永瀬 隆、佐村 誠、原田剛佑、末廣晃太郎、濱野公一
2. 発表標題 傍腎動脈腹部大動脈瘤に対するchimney EVARの早期・中期成績 - 人工血管置換術に代わる治療法となり得るか? -
3. 学会等名 第47回日本血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森景則保
2. 発表標題 EndurantによるchimneyEVAR時に発生した最も注意すべき術中合併症
3. 学会等名 第25回日本血管内治療学会学術総会・第14回Japan Endovascular Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森景則保
2. 発表標題 Juxtarenal AAAに対するchimney EVARの良好な成績を得るためのTips
3. 学会等名 第25回日本血管内治療学会学術総会・第14回Japan Endovascular Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森景則保
2. 発表標題 EVAR長期成績安定のためのtype エンドリーク制御への取り組み
3. 学会等名 第25回日本血管内治療学会学術総会・第14回Japan Endovascular Symposium
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森景則保、溝口高弘、永瀬隆、佐村誠、原田剛佑、末廣晃太郎、濱野公一
2. 発表標題 破裂性腹部大動脈瘤（RAAA）に対する当科のEVAR治療戦略の有益性 - 治療戦略確立後の連続EVARの治療成績
3. 学会等名 第60回日本脈管学会総会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	濱野 公一 (HAMANO Kimikazu) (60263787)	山口大学・大学院医学系研究科・教授 (15501)	
研究分担者	佐村 誠 (SAMURA Makoto) (30773402)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	
研究分担者	上野 耕司 (UENO Koji) (30736070)	山口大学・医学部附属病院・助教 (15501)	

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
---------	---------