

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16395

研究課題名(和文)他家MSCs細胞シート移植による心機能改善効果の検討

研究課題名(英文)The study about the allogenic MSCs transplantation to the cardiac disease models.

研究代表者

中村 玉美 (NAKAMURA, Tamami)

山口大学・医学部附属病院・診療助教(4日/週)

研究者番号：40815669

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)：心不全の症例が増加する我が国において自家・他家幹細胞移植療法が期待されたが、近年、幹細胞が機能的な細胞に分化することは稀で、分泌された成長因子等が内因性の再生を促し、臓器機能を回復させることが判明した。本研究は当初「心疾患に対する他家MSCs移植」を検討する予定だったが、修正し「MSCsが分泌するエクソソーム」等に関する検討を行った。幹細胞由来のエクソソームは成長因子等を含み、保存や反復投与が可能で、次世代の治療方法として期待される。諸条件を検討した結果、CDCsはMSCより優位だった。CDCs由来エクソソームの投与は陳旧性心筋梗塞モデルの心機能を改善させ、新規治療法に成る可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会である我が国において、移植適応年齢を外れる高齢者の心不全は多く、心臓移植に代わる新規治療法の開発が望まれている。幹細胞移植療法が期待されたが、近年、幹細胞が機能的な細胞に分化することは稀で、分泌された成長因子等が内因性の再生を促し、臓器機能を回復させることが判明した。本研究は「MSCsが分泌するエクソソーム」等に関する検討を行った。幹細胞由来のエクソソームは成長因子等を含み、保存や反復投与が可能で、次世代の治療方法として期待される。検討した結果、CDCsはMSCより優位だった。CDCs由来エクソソームの投与は陳旧性心筋梗塞モデルの心機能を改善させ、新規治療法に成る可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：While the occurrence of heart failure is increased, the therapeutic chance of cardiac transplantation is seriously limited in Japan. Autogenic or allogenic stem cell transplantation has been intensively investigated, however, recent evidences suggest that the functional differentiation of stem cell is hardly observed in vivo, and that the exosomes secreted from the transplant stimulate the endogenous regeneration, thereby promoting the functional recovery.

We first aimed to study about the allogenic MSCs transplantation, however, given the reason above, we have modified our project and analyzed the MSCs regarding the exosome secretion in comparison with CDCs. CDCs showed the superior function in exosomes secretion or hypoxia-induced activation compared to MSCs. Administration of exosomes from CDCs to chronic myocardial infarction model improved the functionality. We thus suggest that exosomes from CDCs are the novel therapeutic tool against heart failure.

研究分野：心臓血管外科

キーワード：間葉系幹細胞(MSCs) 心筋幹細胞(CDCs) エクソソーム 低酸素プレコンディショニング 陳旧性心筋梗塞モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本邦において急性冠症候群の患者は 7.2 万人/年、慢性心不全の入院患者は 11 万人/年に上る。重症心不全に対する治療法として心臓移植が挙げられるが、慢性的なドナー不足が存在する。また、超高齢社会である本邦では高齢者の心不全が多く、年齢から移植の適応(65 歳未満)とならないことが多い。以上の経緯から、心臓移植に代わる治療法として細胞移植療法に大きな期待が寄せられてきた。これまでは細胞移植に関して、患者自身から採取した自己の幹細胞を使用する自家細胞移植が多く研究されてきた。しかし自家移植は移植細胞の準備時間やコストが多いため、臨床では普及していない。また、高齢者由来の幹細胞は老化しており、幹細胞移植の効果が限定的になる可能性も示唆されている。

これを解決するため健常成人からあらかじめ幹細胞を採取して大量に培養・ストックし、必要時に患者に移植する他家細胞移植が注目された。米国では他家の幹細胞移植を用いる臨床試験として、POSEIDON 試験(拡張型心筋症の症例に間葉系幹細胞(MSCs)を移植)、ALLSTAR 試験(虚血性心疾患の症例に心筋幹細胞(CDCs)を移植)が行われている。間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells (MSCs))は心筋幹細胞(Cardiosphere-derived cells (CDCs))と比較して、採取が比較的簡便であり免疫原性が少ないとされる。

一方で近年の研究から、幹細胞移植後に臓器機能が回復する主な機序は移植された幹細胞が機能的な細胞に分化することではなく、移植細胞から分泌された成長因子が臓器を刺激し、内因性の再生を促進することだと分かった。幹細胞が放出するエクソソーム(脂質二重膜から成る直径 20 ~ 100 nm の膜小胞)は成長因子や miRNA を含み、凍結保存や濃縮および反復投与が可能であるため、エクソソーム投与による Cell-free 再生医療が期待されている。免疫原性は非常に少ない(無い)と考えられている。

本研究は当初、低酸素プレコンディショニングで MSCs を機能賦活化し、他家 MSCs を急性心筋梗塞モデルへ移植して効果を検討する予定だった。しかし上述の通り、医療経済的な観点および生物学的観点から「MSCs による他家移植」はこの分野の潮流に遅れてしまう可能性が危惧された。一方で「エクソソーム投与による Cell-free 再生医療」は将来性に富む反面、未解明な部分も多く、多くの検討をする必要性や価値があると考えられた。

よって本研究では内容を見直し、「MSCs が放出するエクソソームの解析」や「低酸素プレコンディショニングが MSCs 由来エクソソームに与える影響に関する検討」および「エクソソームに関する MSCs と CDCs の比較」などへと方向性を修正した。

2. 研究の目的

- (1) MSCs が放出するエクソソームに関して、含有する成長因子や低酸素培養による機能賦活化を検証すること。
- (2) 上記を CDCs と比較すること。
- (3) 陳旧性心筋梗塞などの心不全モデルにエクソソームを投与し、機能改善効果を検証すること。

3. 研究の方法

(1) MSCs, CDCs の培養

ラビット (NZ White) の大腿骨から MSCs を、心房から CDCs を単離した。ラビットの MSCs は Cyagen Biosciences 社から購入したものも使用した。これらを既報に従い、細胞数や継代数および培養日数などの条件を揃えて培養した(文献)。低酸素プレコンディショニングは既報の通り、2% O₂, 5% CO₂, 33 で 24 時間の培養とした(文献 ,)。血清を含む通常の培地と、血清を含まない培地(CiMS-BM+AF)を使用した。

(2) エクソソームの回収および精製

細胞の培養上清から total exosome isolation reagent (Thermo Fisher Scientific)を用いてエクソソームを回収し、精製した。

(3) 細胞およびエクソソームのタンパク発現に対する評価

細胞溶解液とエクソソームにおいて、成長因子やエクソソームのマーカーを immunoblot で解析した。

(4) エクソソームの取り込みに関する検討

分泌されたエクソソームが標的とする細胞に取り込まれることを確認する検討を行った。細胞の取り込みにはエンドソームなどの細胞内輸送機構が重要だとされる。培養した HUVEC 細胞に RFP-Rab9(RFP: Red Fluorescent Protein, Rab9:エンドソーム系のタンパク)を発現させ、エンドソームを RFP で標識した。この細胞に Exo-Glow Exosome Labeling Kit (System Biosciences)で標識したエクソソームを加えて 24 時間の培養を行った。エクソソームが細胞のエンドソームに取り込まれているか否かを live cell image で蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(5) エクソソーム投与による治療効果の評価

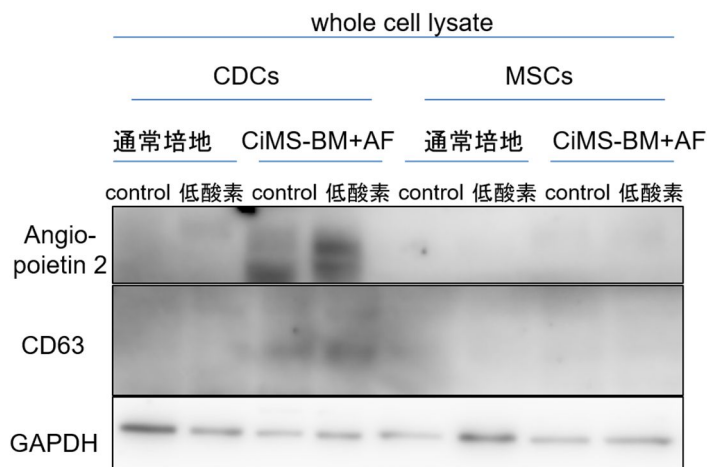
雄の C57BL/6 マウスに左冠動脈結紮を行い、4 週間後に陳旧性心筋梗塞モデルとした。コントロール群は PBS を浸したセラフィラムを心臓に貼付し、治療群はエクソソーム 20 μg を含むセラフィラムを貼付した。8 週間後に心エコーで心機能を評価した。

4. 研究成果

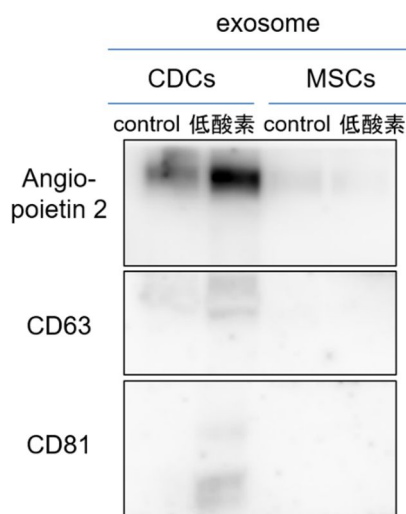
(1) MSCs, CDCs のタンパク発現を検討した。

様々な成長因子とエクソソームのマーカーの発現を、複数の培地を使用して検討した。低酸素プレコンディショニングを併用した。多くの成長因子の発現において CDCs と MSCs の間に明らかな差を認めな

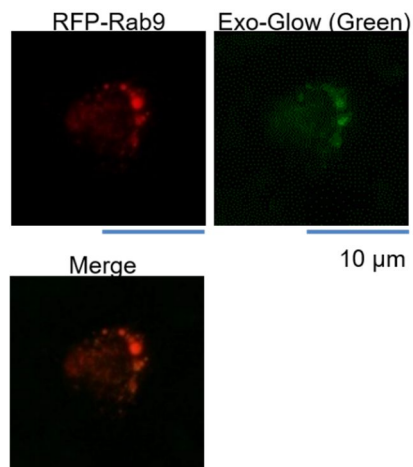
かったが、図に示すように血管新生作用を持つ Angiopoietin2 とエクソソームのマーカである CD63 の発現量は CDCs が MSCs より高いレベルにあった。CDCs は CiMS-BM+AF で培養し、低酸素プレコンディショニングを併用するとこれらを強く発現する傾向が認められた。



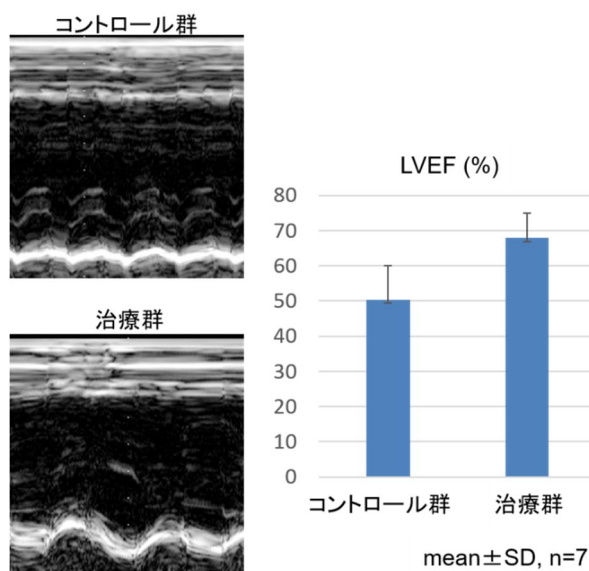
(2) MSCs, CDCs 由来エクソソームのタンパク発現を検討した。様々な成長因子とエクソソームのマーカ発現を検討した。多くの成長因子の発現において CDCs と MSCs の間に明らかな差を認めなかったが、図に示すように Angiopoietin2 と CD63, CD81 の発現量は CDCs が MSCs より高いレベルにあり、低酸素プレコンディショニングによって増強した。



(3) エクソソームが HUVEC 細胞に取り込まれることを確認した。CD81 はエクソソームの取り込みに重要だと報告がある (文献)。 (2) で示したように、CDCs 由来エクソソームは MSCs 由来のそれと比較して CD81 や成長因子の発現が豊富で、標的の細胞に効率良く取り込まれることや血管新生において有利となる可能性が考えられた。培養した HUVEC 細胞に RFP-Rab9 を発現させ、エンドソーム系を標識した。また、CDCs 由来エクソソームを Exo-Glow Exosome Labeling Kit で標識し、この細胞に加えた。エンドソームの RFP の信号とエクソソームの Green の信号が共局在し、エクソソームが細胞に取り込まれていることを確認した。



(4) 陳旧性心筋梗塞モデルに対するエクソソーム投与の治療効果を評価した。雄の C57BL/6 マウスに左冠動脈結紮を行い、4 週間後に陳旧性心筋梗塞モデルとした。コントロール群は PBS を浸したセフラフィルムを心臓に貼付し、治療群はエクソソーム 20 μ g を含むセフラフィルムを貼付した。エクソソームの投与量は既報を参考に決定した (ref 4)。セフラフィルムは、CDCs 移植の際に使用実績があり、細胞移植の台座として有効であることから、今回のエクソソーム投与においても効率的な伝達が見込まれた。8 週間後に心エコーで心機能を評価したところ、有意差には至らないものの、治療群において左室内径短縮率 (LVEF) が高い傾向を認めた。



(5) 結論

複数の成長因子やエクソソームのマーカーにおいて CDCs は MSCs より高い発現を示した。また、低酸素培養による機能賦活化においても CDCs は優位だった。計画を変更し、CDCs から精製したエクソソームをマウスの陳旧性心筋梗塞モデルに投与し、2 か月後に評価した。コントロール群と比較してエクソソーム群では心機能が保たれていた。

CDCs 由来エクソソームの投与は心不全に対する新規治療戦略になると考えられた。

(6) 引用文献

Direct comparison of different stem cell types and subpopulations reveals superior paracrine potency and myocardial repair efficacy with cardiosphere-derived cells.

Li TS, Cheng K, Malliaras K, Smith RR, Zhang Y, Sun B, Matsushita N, Blusztajn A, Terrovitis J, Kusuoka H, Marbán L, Marbán E.

J Am Coll Cardiol. 2012 Mar 6;59(10):942-53. doi: 10.1016/j.jacc.2011.11.029.

Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function of chronically infarcted heart.

Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K, Mikamo A, Yoshimura K, Li TS, Hamano K.

Am J Transl Res. 2015 Dec 15;7(12):2738-51.

Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction.

Fujita A, Ueno K, Saito T, Yanagihara M, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A, Hamano K.

Eur J Cardiothorac Surg. 2019 Dec 1;56(6):1062-1074. doi: 10.1093/ejcts/ezz122.

Radiation increases the cellular uptake of exosomes through CD29/CD81 complex formation.

Hazawa M, Tomiyama K, Saotome-Nakamura A, Obara C, Yasuda T, Gotoh T, Tanaka I, Yakumaru H, Ishihara H, Tajima K.

Biochem Biophys Res Commun. 2014 Apr 18;446(4):1165-71. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.03.067.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、中村玉美、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルを用いた貼付前低酸素培養Cardiosphere-sphere derived cells sheetによる心不全治療効果の検討
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----