

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16956

研究課題名(和文) 虚血性網膜症に対する血管再生を目的とした細胞治療における細胞外小胞の包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive analysis for extracellular vesicles from endothelial progenitor cells

研究代表者

崎元 晋 (Sakimoto, Susumu)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60633047

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)：血管内皮コロニー形成細胞(Endothelial colony-forming cells: ECFCs)は、細胞治療に用いる自家血管内皮細胞のソースとして有望である。申請者らはECFCのパラグラインメカニズムに基づいた、虚血性網膜症に対する血管再生療法および神経保護効果に関する研究を行ってきたが、ECFC由来細胞外小胞(EV)の役割については現在まで不明であった。本研究において、マウス虚血性網膜症モデルに対するECFC由来EVの治療効果に関して、検討を行ったところ、ECFC由来EVはマウスモデルにおいて新生血管および虚血領域の有意な改善作用をもたらした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果によって虚血性網膜症に対する新しい治療の可能性が示された。つまり細胞治療では、免疫原性反応を起こす可能性があるのにたいし、治療に用いる細胞由来の小胞を純化・投与することにより、より安全な治療効果をもたらす可能性がある。血管内皮コロニー形成細胞のパラグラインメカニズムの一つの作用として、細胞外小胞は有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Current standard-of-care treatments for diabetic retinopathy, like VEGF antagonists, aim to inhibit neovascularization and vascular leak but do nothing to alleviate the underlying ischemia driving the disease and fail to provide protection to neural cells under hypoxic stress. As natural carriers of miRs and proteins, EVs secreted from endothelial colony forming cells possess a multi-modal mechanism that may promote physiological angiogenesis and preserve damaged neurons, as suggested by our preliminary data demonstrating these agents may present a promising approach to treat these complex disorders.

研究分野：眼科学

キーワード：血管新生 血管内皮コロニー形成細胞 エクソソーム

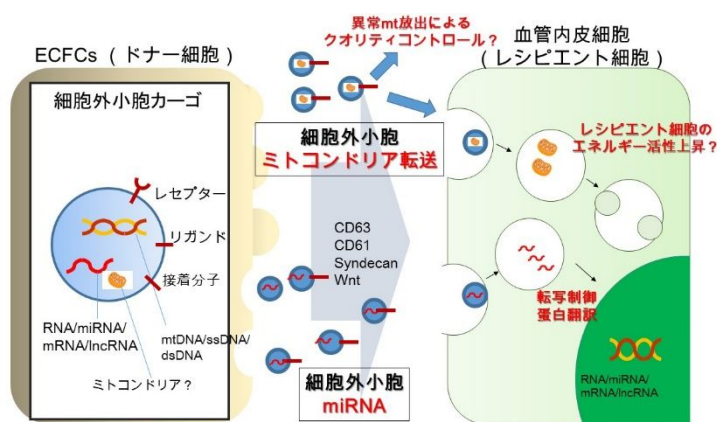
1. 研究開始当初の背景

糖尿病網膜症は、先進国における生産年齢の失明原因の第一位であり、非常に重要な疾患である。近年の抗 VEGF 剤により血管新生と透過性亢進に対して画期的な治療効果をもたらされるようになった。しかし、半減期が短いため反復眼内注射が必要なこと、正常の血流に対する抑制作用も示すため病態そのものに対しては相反する治療であること、など改善を要する点があるため、抗 VEGF 治療に加えて新たな治療の開発が喫緊の課題である。現在でも行われている網膜レーザー治療は、網膜を光凝固・破壊することにより虚血状態を是正する唯一の治療法であるが、極めて非生理的な治療手段である。そのため血管そのものを再生し、虚血を改善することで網膜症の根本的な治療の開発が喫緊の課題である。

血管内皮コロニー形成細胞 (Endothelial colony-forming cells: ECFCs) は、血管内皮前駆細胞 (EPC) の分画のひとつで、臨床での細胞治療に用いる自家血管内皮細胞のソースとして大変注目を集めている。ECFC はヒト臍帯血、末梢血および多能性幹細胞から ex vivo にて誘導され、ロバストでクローナルな増殖能をもつ。また、マウス血管障害モデルにおいて、静脈注射により虚血部位にリクルートされ循環を改善するとされる。一方で、これらの虚血の回復作用は、分化転換および血管構築への直接的な作用よりも細胞のパラクライン作用によるものと考えられている。この点は、これまで報告されてきた幹/前駆細胞による血管再生治療において、種々の虚血モデルで定着する幹/前駆細胞の数に比して虚血の回復の程度が遥かに大きいことから示唆されるものである。ただし ECFC のパラクライン作用による血管再生メカニズムに関しては、ほとんど報告がされていない。

2. 研究の目的

申請者らの目的は、ECFC による虚血性網膜症による ECFC のパラクライン作用を明らかにすることである。特に近年、細胞間伝達の重要な因子としてエクソソームやマイクロベジクルに代表される細胞外小胞 (Extracellular vesicles: EVs) が注目されている。ECFC に関しては、細胞由来の EV 中の miRNA が腎虚血障害に対する治療効果があることが報告されている



以外に全く報告されておらず、虚血性網膜症における役割は不明である。細胞療法よりも純化したナノ粒子を治療に使用できる可能性を示すこととなり大変重要であると考えられる。今回の我々の研究は、ECFC 由来の EVs がマウス虚血性網膜症モデルにおいてどのような治療効果をもたらすのか、その場合どのようなメカニズムに基づくのかを明らかにするものである。また、Ortiz らは間葉系幹細胞が自らの EV 内に封入された miRNA やミトコンドリアを細胞外へ輸送 (shuttle) し、マクロファージに貪食されることにより貪食したマクロファージの酸素や ATP の消費量が増加し、いわゆる生体エネルギーを高めると報告した (Phinney et al. 2015.)。本研究では、ECFC を用いた網膜虚血疾患モデルおよび網膜変性モデルに対する細胞治療におけるパラクライン効果を明らかにすることであるが、その中でも EV の関与そしてそれに含まれる miRNA もしくはミトコンドリア転送の有無を明らかにすることである。この点は同時に、ECFC に限らず幹/前駆細胞を用いた血管再生医療全般においてミトコンドリア転送の役割は完全未知であり、パラクラインメカニズムの中にどのように関与するのかを明らかにするものである (図 1)。

3. 研究の方法

- 1) ECFC の作成 : ECFC はヒト臍帯血により効果的に導入されることが知られているが、近年多能性幹細胞を用いた ECFC の導入が報告されている (Prassin et al. Nat Biotech 2014)。申請者らもヒト胚性幹細胞 (hESC) を用いて ECFC の導入に成功している。
- 2) ECFC 由来 EV の解析: 一般的な MV 単離用の超遠心プロトコル (Lasser et al. Jove, 2012) を行ったのち、ナノ粒子解析装置 NanoSight (LM10)、電子顕微鏡等にて観察を行う。また

レンチウイルスを用いて ECFC を GFP にてラベリングし、必要に応じてタイムラプスライブイメージングを行う。

4. 研究成果

エクソソームの生成に関して、細胞上清に対する限外濾過、サイズ排除クロマトグラフィー、再度限外濾過を行う連続法を用いると、より純度が高く細胞外小胞を得られることが報告されている。今回は本法を用い、細胞外小胞の精製を試みたところ、タンパク量が少ない分画において、CD63 陽性のエクソソームが多く認められた。透過型電子顕微鏡観察では、通常の超遠心を用いた方法に比較し、より多くの細胞外小胞が認められた。さらに連続法により生成した細胞外小胞をマウス虚血性網膜症モデルである高酸素誘導性網膜症 (Oxygen Induced Retinopathy: OIR) モデルに注射したところ、ECFC のある特定の分画は、別の分画由来の exosome に比較し、ECFC 由来の exosome は新生血管や虚血領域が有意に減少しており、特定の分画により分泌される exosome は OIR モデルにおいて血管修復作用があることが示された。さらに網膜変性モデルである RD10 マウスモデルに exosome を投与したところ、TUNEL 陽性の死細胞は減少し、有意に網膜厚の菲薄化が予防された。本研究成果に関して、学会発表を行い論文準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Naito H, Iba T, Wakabayashi T, Tai-Nagara I, Suehiro JI, Jia W, Eino D, Sakimoto S, Muramatsu F, Kidoya H, Sakurai H, Satoh T, Akira S, Kubota Y, Takakura N.	4. 巻 48
2. 論文標題 TAK1 Prevents Endothelial Apoptosis and Maintains Vascular Integrity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dev Cell.	6. 最初と最後の頁 151-166
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2018.12.002.	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 Shiraki A, Sakimoto S, Tsuboi K, Wakabayashi T, Hara C, Fukushima Y, Sayanagi K, Nishida K, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 97
2. 論文標題 Evaluation of Retinal Nonperfusion in Branch Retinal Vein Occlusion Using Wide-Field Optical Coherence Tomography Angiography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Ophthalmol .	6. 最初と最後の頁 e913-e918
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/aos.14087.	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 Hara C, Kamei M, Sakaguchi H, Matsumura N, Sakimoto S, Suzuki M, Nishida K, Fukushima Y, Nishida K.	4. 巻 3
2. 論文標題 Activated Protein C for Ischemic Central Retinal Vein Occlusion: One-Year Results	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ophthalmol Retina.	6. 最初と最後の頁 93-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oret.2018.07.012.	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 Shiozaki D, Sakimoto S, Shiraki A, Wakabayashi T, Fukushima Y, Oie Y, Usui S, Sato S, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Observation of Treated Iris Neovascularization by Swept-Source-Based En-Face Anterior-Segment Optical Coherence Tomography Angiography	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep .	6. 最初と最後の頁 10262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46514-z.	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 Sakimoto S, Okazaki T, Usui S, Ishibashi T, Oura Y, Nishida K, Miki A, Kawasaki R, Matsushita K, Sakaguchi H, Nishida K.	4. 巻 59
2. 論文標題 Cross-Sectional Imaging Analysis of Epiretinal Membrane Involvement in Unilateral Open-Angle Glaucoma Severity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Invest Ophthalmol Vis Sci.	6. 最初と最後の頁 5745-5751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.18-25292.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Kyle V Marra; Susumu Sakimoto; Salome Murinello; Edith Aguilar; Felicitas Bucher; Martin Friedlander
2. 発表標題 Extracellular vesicles from endothelial colony forming cells as paracrine mediators of neurovasculotrophic repair of the retina
3. 学会等名 ARVO Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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