

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06405

研究課題名(和文) 脊髄損傷治療の臨床応用に向けた幹細胞由来エクソソーム徐放化技術の開発

研究課題名(英文) Development of controlled release technology of stem cell-derived exosomes for spinal cord injury

研究代表者

西田 英高(Nishida, Hidetaka)

大阪公立大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：00622804

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)：中枢神経損傷に対する骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームの徐放化技術の開発を目的に、以下の成果を得た。(1) 幹細胞由来エクソソームの徐放剤として、架橋度の異なるカチオン化ハイドロゲルの作製に成功した。また、架橋度の違いによって、*in vitro*および*in vivo*においてエクソソームの徐放速度の調整が可能であった。(2) *in vitro*アッセイにおいて、ハイドロゲルから徐放されたエクソソームはLPSで惹起されたミクログリアの炎症を抑制した。(3) 脊髄損傷モデルラットの効果について検討したところ、徐放エクソソームによって運動機能が改善する傾向が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、セルフリーセラピーの新たな治療ツールとして期待されているエクソソームに特化した徐放剤の開発に成功し、局所に長期間有効性を維持するための基盤技術の開発に成功した。これらの技術は有効性を長期間維持するだけでなく、再生治療にかかるコストを大幅に削減することが可能となる、本研究で得られた結果を次の研究に活かし、イヌの中枢神経損傷に対する臨床応用の実現につなげていく予定である。また、本研究で得られた成果は、伴侶動物の再生医療を推進させるだけでなく、ヒト臨床応用に向けても信頼性の高い情報を提供することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We developed the controlled release technology of stem cell-derived exosomes for spinal cord injury as follows. (1) We developed the cationized gelation hydrogels for controlled release of stem cell-derived exosomes. The varying degrees of crosslinking allowed for the adjustment of exosome release rates in both *in vitro* and *in vivo* settings. (2) *In vitro* assays, exosomes released from the hydrogels demonstrated the ability to suppress inflammation in microglia induced by LPS. (3) It is tendency to improve motor function after implanting hydrogels that immersed exosomes in rat models of spinal cord injury.

研究分野：獣医学、再生医療、細胞工学

キーワード：再生医療 エクソソーム 細胞外小胞 脊髄損傷 徐放 ハイドロゲル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

既存の治療では回復が認められない脊髄損傷に対する新たな治療法として、幹細胞を用いた治療の有効性が報告されている。申請者は、これまでに自家間葉系幹細胞を用いたイヌ脊髄損傷に対する臨床研究を行い、その安全性及び有用性を報告してきた。しかしながら、十分な細胞を準備するためには2-3週間培養を行う必要があり、培養時間が問題となっていた。また、幹細胞の投与は、肺塞栓や腫瘍化など様々な副作用の可能性が指摘されている。

最近の研究によって、幹細胞は様々な核酸(miRNA、mRNA)やタンパク質(栄養因子、受容体)をエクソソームとして分泌し、組織修復に深く関与していることが明らかとなってきた。エクソソームは100-200 nmの小胞であり、細胞膜に覆われているため、小胞内の因子を安定化したまま輸送することが可能であり、これらが再生医療の新たなツールとして期待されている。しかしながら、間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームは静脈投与によって組織の修復を促進するが、静脈投与されたエクソソームが損傷部に到達するのはごく一部である。エクソソームを局所に留まらせ、その効果を長期間持続させるための徐放技術の開発が臨床応用に向けて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、治療困難な脊髄損傷イヌに対する幹細胞を用いた新たな治療法を提供するために、エクソソームの徐放技術を開発する。生体内でエクソソームを徐放することが可能なハイドロゲルを開発する。徐放されたエクソソームが、抗炎症効果を有するかについて明らかにする。脊髄損傷モデルを用いて徐放エクソソームの有効性について検証する。

3. 研究の方法

1) エクソソーム徐放ハイドロゲルの作製

等電点9.0、分子量100,000のゼラチンにリン酸塩緩衝液を加え室温下で1時間ゼラチンを膨潤させ、37℃で溶解させた。ゼラチンをカチオン化するために、ゼラチン水溶液に無水エチレンジアミンを加え、ゼラチンのカルボキシ基をアミド化した。ゼラチン水溶液を37℃下で攪拌し、セルロースチューブを用いて透析後にゼラチン水溶液を回収し、液体窒素を用いて急速凍結し、真空凍結乾燥機で凍結乾燥することでカチオン化ゼラチンを得た。カチオン化ゼラチンに超純水を加え、カチオン化ゼラチン水溶液を作製した。シート状の形状とするために、BALANCE DISHESに注ぎ、液体窒素で急速凍結し、凍結乾燥機で凍結乾燥した。乾燥したカチオン化ゼラチンシートをアルミホイルで包み、真空乾燥装置を用いて、160℃で24時間(low crosslink)、48時間(medium crosslink)、96時間(high crosslink)の3条件で熱脱水架橋を行い、異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルシートを得た。

2) エクソソーム徐放ハイドロゲルの分解・徐放試験

チューブ内で、low, middle, high crosslinkのハイドロゲルにPKH26で蛍光標識したエクソソームを添加し、4℃で一晩含浸させた。ハイドロゲルにPBSを加えてから、Collagenaseを添加し、37℃で反応させ1、3、5、8、12、24時間経過後に上清を回収した。ハイドロゲルの分解についてタンパク定量を用いて評価した。また、エクソソームの徐放については、蛍光強度を用いて評価した。さらに、マウスの生体内におけるハイドロゲルの分解速度についても評価した。

3) 徐放エクソソームの抗炎症効果

マウスミクログリア細胞株であるBV-2を用いて、LPSを1 ng/mLずつ各ウェルに加え、抗炎症効果について評価した。徐放エクソソームではハイドロゲルから徐放されたエクソソームを用い、ゲル単独ではハイドロゲルを同様の条件で分解した溶液を用いた。それぞれ1ウェルあたり100 µL加え、6時間後にリアルタイムPCRを用いて、BV-2のIL-1 β 、TNF- α 、IL-6、GAPDHの遺伝子発現量を評価した。

4) 脊髄損傷モデルに対する徐放エクソソームの有効性の評価

脊髄損傷装置を用いて、ラット胸髄に200 kDyneで作製した。エクソソームを浸潤させたハイドロゲル、またはPBSを浸潤させたハイドロゲルを損傷部に埋植し、運動機能の変化について損傷後28日目までBBB scoreを用いて評価した。

4. 研究成果

1) カチオン化ハイドロゲルの作製

すべての架橋条件において得られたゼラチンハイドロゲルシートは、肉眼的には白色で多孔

性であった(図1)。大きさは縦横が2.0 × 2.0 cmで、厚みが0.5 mmであった。



図1 カチオン化ハイドロゲルの外観

作成されたハイドロゲルシートは、2.0 × 2.0 cmで、厚みが0.5 mmで白色であった。(左：low crosslink、中央：middle crosslink、右：high crosslink)

2) カチオン化ハイドロゲルの分解・徐放試験

ゼラチンハイドロゲルのコラゲナーゼを用いた分解試験では、PBSに26時間浸漬後、24時間架橋群では30.9%、48時間架橋群では23.7%、96時間架橋群では18.5%のゲルの分解が認められた(図2A)。また、PKH-26標識EVを用いた徐放試験では、PBSに26時間浸漬後、24時間架橋群では18.3%、48時間架橋群では37.0%、96時間架橋群では31.9%のエクソソームの放出が認められた(図2B)。その後コラゲナーゼを添加したところ、ゼラチンハイドロゲルは経時的に分解され、24時間架橋群では31時間後、48時間架橋群では38時間後、高架橋群では50時間後にハイドロゲルが完全に消失し、エクソソームが徐放された。

また、マウス生体内でそれぞれのハイドロゲルの徐放速度を比較したところ、in vitroと同様に架橋度によって、分解速度が異なっていた(図3)。以上のことから、カチオン化ハイドロゲルによってゲル内にエクソソームを放出せずに留めることが可能となり、架橋度によって徐放速度を調整することに成功した。

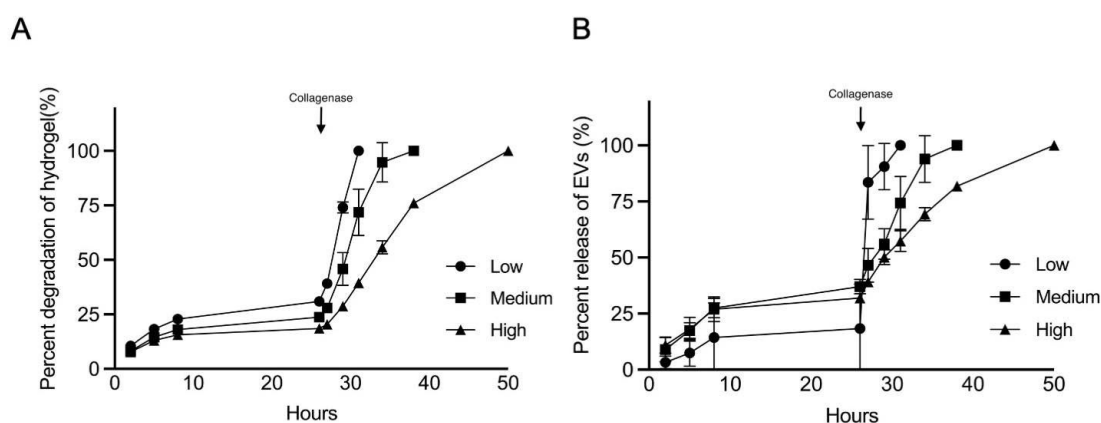


図2 in vitroにおけるハイドロゲルの分解およびエクソソーム徐放

ハイドロゲルの分解(A)は、架橋度が低いほど早く分解された。また、エクソソームの徐放についても、架橋度が低いほど早く徐放された(B)。

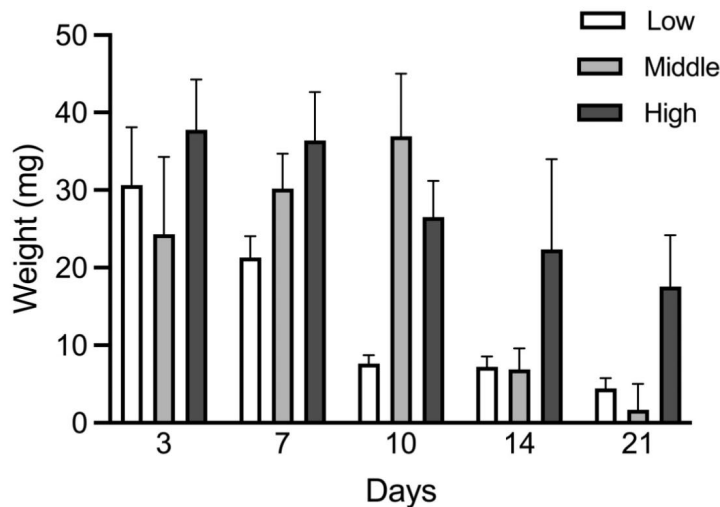


図3 マウス体内におけるハイドロゲルの残存量
架橋度の低いハイドロゲルは、架橋度の高いハイドロゲルと比較して、埋植後の残存量が低下した。

3) 徐放エクソソームの抗炎症効果

IL-1 の mRNA 発現量は、徐放エクソソームにおいてゲル単独と比較して、有意な減少が認められた (図 4A、 $p < 0.01$)。IL-6 の mRNA 発現量は、徐放エクソソームにおいてゲル単独と比較して、減少傾向が認められた (図 4B、 $p = 0.06$)。TNF- α の mRNA 発現量は、徐放エクソソームとゲル単独と有意な差は認められなかった (図 4C)。

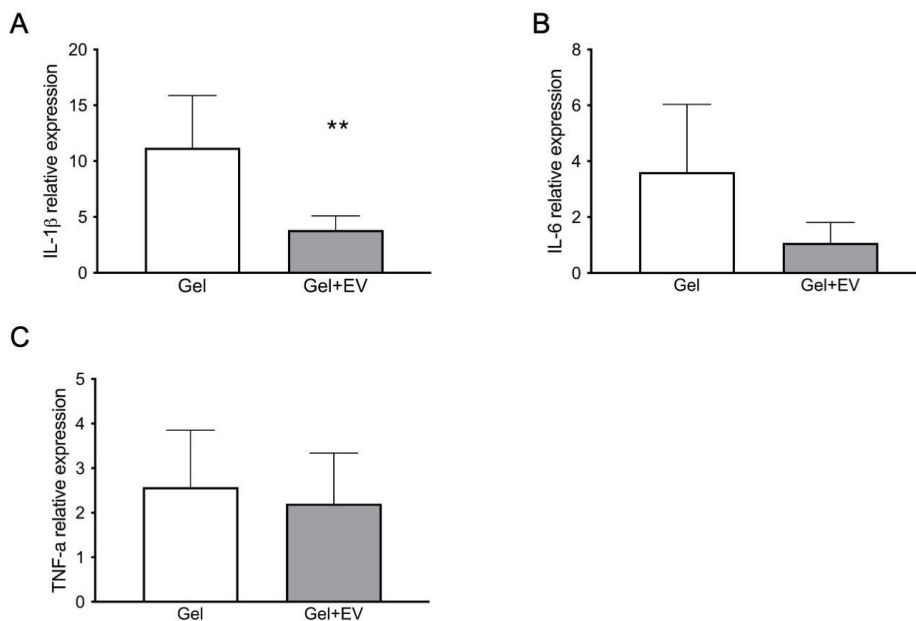


図4 徐放エクソソームの BV-2 における抗炎症効果

徐放エクソソームは、BV-2 の IL-1 の発現量 (A) を有意に低下させ ($p < 0.01$)、IL-6 の発現量 (B) を低下させる傾向が認められた ($p = 0.06$)。一方で、TNF- α の発現量については明らかな差は認められなかった。

4) 脊髄損傷モデルに対する徐放エクソソームの有効性の評価

エクソソームを浸潤させたハイドロゲルを埋植した脊髄損傷ラットでは、PBS を浸潤させたハイドロゲルを埋植したラットと比較して、運動機能が改善する傾向が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 3件）

1. 著者名 Kuwahara Yukina, Yoshizaki Karin, Nishida Hidetaka, Kamishina Hiroaki, Maeda Sadatoshi, Takano Katsura, Fujita Naoki, Nishimura Ryohei, Jo Jun-ichiro, Tabata Yasuhiko, Akiyoshi Hideo	4. 巻 8
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Derived From Canine Mesenchymal Stromal Cells in Serum Free Culture Medium Have Anti-inflammatory Effect on Microglial Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 633426
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2021.633426	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 Kinoshita Kosuke, Nishida Hidetaka, Kanegi Ryoji, Nakamoto Yuya, Tanaka Toshiyuki, Shimamura Shunsuke, Kusumoto Kazuhito, Akiyoshi Hideo	4. 巻 9
2. 論文標題 Case Report: Detection of Transferrin in a Dog Suspected of Having Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 845809
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fvets.2022.845809	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 Michi Nakamura, Hidetaka Nishida, Karin Yoshizaki, Hideo Akiyoshi, Shingo Hatoya, Kikuya Sugiura, Toshio Inaba	4. 巻 82
2. 論文標題 Canine mesenchymal stromal cell-conditioned medium promotes survival and neurite outgrowth of neural stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 668-672
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.19-0141	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 西田英高	4. 巻 2
2. 論文標題 脊髄損傷治療の現状と新たな治療法の開発 (獣医療分野からの視点)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 1244-1246
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 無
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 Narita M, Nishida H, Asahina R, Nakata K, Yano H, Dickinson PJ, Tanaka T, Akiyoshi H, Maeda S, Kamishina H.	4. 巻 81
2. 論文標題 Expression of microRNAs in plasma and in extracellular vesicles derived from plasma for dogs with glioma and dogs with other brain diseases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Veterinary Research	6. 最初と最後の頁 355-360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2460/ajvr.81.4.355.	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

1. 著者名 西田英高	4. 巻 45
2. 論文標題 臨床応用を目指した間葉系幹細胞由来 Extracellular Vesicleを用いた治療法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 68-72
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉崎香琳、西田英高、三重慧一郎、城潤一郎、田畑泰彦、秋吉秀保
2. 発表標題 ゼラチンハイドロゲルを用いたイヌ間葉系幹細胞由来Extracellular Vesicle徐放化技術の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 吉崎香琳、西田英高、三重慧一郎、城潤一郎、田畑泰彦、秋吉秀保
2. 発表標題 イヌ間葉系幹細胞由来Extracellular Vesicle徐放化技術を用いた治療法の開発
3. 学会等名 第10回DDS再生医療研究会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 西田英高
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた中枢神経損傷治療法の開発
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 吉崎香琳、桑原由季菜、西田英高、神志那弘明、前田貞俊、三重慧一郎、秋吉秀保
2. 発表標題 無血清培地条件下で回収されたイヌ間葉系幹細胞由来Extracellular Vesicleの抗炎症効果
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshizaki K, Kuwahara Y, Nishida H, Kamishina H, Maeda S, Mie K, Akiyoshi H
2. 発表標題 Anti-inflammatory effect of extracellular vesicles derived from canine mesenchymal stem/stromal cells in serum free culture medium
3. 学会等名 The 6th Asian Meeting of Animal Medicine Specialties（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪府立大学 獣医外科学教室 http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/surg/ 大阪公立大学 獣医外科学教室 https://www.omu.ac.jp/vet/surg/</p>

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	田畑 泰彦 (TABATA YASUHIKO) (50211371)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	秋吉 秀保 (AKIYOSHI HIDEO) (50420740)	大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授 (24403)	
研究分担者	城 潤一郎 (JO JUN-ICHIRO) (60511243)	大阪歯科大学・歯学部・准教授 (34408)	

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