

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09552

研究課題名(和文) MSC由来エクソソームを用いた新たなデリバリーシステムと骨肉腫治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel delivery system and osteosarcoma therapy using down-regulated MSC-derived exosomes

研究代表者

古田 太輔 (Furuta, Taisuke)

広島大学・病院(医)・助教

研究者番号：30781645

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)：間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; 以下MSC)の組織障害・悪性腫瘍部へ遊走(homing)する機能が報告されており、標的細胞に抗腫瘍効果因子を付加し運搬するデリバリーシステムの開発が注目されている。我々はMSCから放出される液性因子であるエクソソームもhoming機能を有し、標的細胞にデリバリーが可能であると仮説を立て、骨肉腫モデルを用いて検証を行い、MSC由来エクソソームが抗骨肉腫作用を有するmiRNA143を骨肉腫細胞にデリバリーする可能性があることが分かり、MSC由来エクソソームがhoming機能を有する可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; 以下MSC)の組織障害・悪性腫瘍部へ遊走(homing)する機能を液性因子であるMSC由来エクソソームが有している可能性があれば、エクソソームに抗腫瘍効果因子を有するmiRNAなどを標的細胞に遊走できる可能性がある。細胞移植する必要がなければ、免疫反応による副作用のリスクも低い可能性も期待できる。悪性腫瘍治療だけでなく、他の治療にも有用な新たなデリバリーシステムになりうる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem cells (MSCs) have been reported to have the ability to migrate (homing) to tissue lesions and malignant tumors, and the development of a delivery system to add and deliver anti-tumor effectors to target cells has attracted attention. We hypothesized that exosomes, a liquid factor released from MSCs, also have a homing function and can be delivered to target cells, and verified this hypothesis using an osteosarcoma model, showing that MSC-derived exosomes may deliver miRNA143, which has antiosteosarcoma effects, to osteosarcoma cells. The results also suggest that MSC-derived exosomes may have a homing function.

研究分野：骨軟部腫瘍外科

キーワード：MSC由来エクソソーム 骨肉腫 デリバリーシステム homing機能

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、四肢悪性腫瘍の抗癌剤治療の開発により予後の改善を認めるが、抵抗性や重篤な副作用など課題が多く新たな治療開発が切望される。一方で間葉系胚細胞(Mesenchymal stem cell; 以下 MSC)の組織障害・悪性腫瘍部へ遊走(homing)する機能を利用し標的細胞に抗腫瘍効果因子を付加し運搬するデリバリーシステムの報告が散見される。しかし近年、MSC 移植された細胞は数%程度しか生着できず、悪影響を及ぼすことも懸念され、細胞から放出される液性因子が注目されている。その液性因子の一つであるエクソソームは細胞間コミュニケーションに關与する微小胞体であり、MSC から放出されるエクソソーム(以下 MSC 由来エクソソーム)にも homing 効果の可能性が期待されているが機能は不明である。我々は MSC 由来エクソソームの homing 効果の可能性を明らかにし、四肢悪性骨腫瘍に対して抗腫瘍効果のある miRNA を運搬する新たなデリバリーシステムの開発を計画した。

2. 研究の目的

MSC の組織障害・悪性腫瘍部へ遊走(homing)する機能を利用し標的細胞に抗腫瘍効果因子を運搬するデリバリーシステムの報告(Uchibori R; Neurooncology 2007)がある。しかし MSC の標的細胞への生着は数%に満たない報告が多く、生着しない MSC が悪影響を与える影響も指摘されている。そこで我々は液性因子である MSC 由来エクソソームにも homing 機能を有する可能性を期待し、新たな悪性腫瘍に対するデリバリーシステムの開発を考案する。我々は MSC 由来エクソソームの運動器組織再生、特に骨折治癒への関連について報告し、さらに今回、我々は予備データとしてマウス骨折モデル作成後に蛍光マーカーを付けた MSC 由来エクソソームを尾静脈注射したところ、骨折部に集積する傾向があることを確認した。骨肉腫モデルにおいても MSC 由来エクソソームの homing 機能を確認し、我々が保有している HOS, 143B の細胞内、エクソソーム内の miRNA のデータから抗腫瘍効果因子(miRNA)を解析し、MSC に miRNA をトランスフェクションによる過剰発現させた MSC 由来エクソソームを悪性腫瘍へ運搬する、免疫反応および副作用の少ない新たなデリバリー - システムの開発を行うことである。

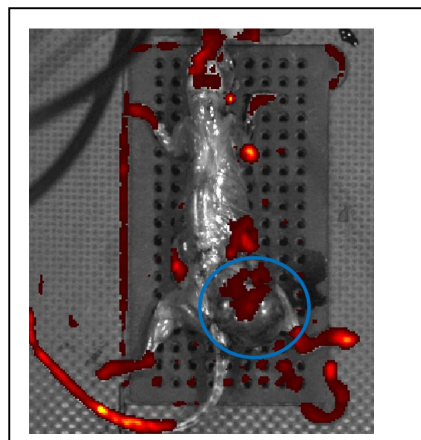
3. 研究の方法

(1) 2×10^7 個の HOS, 143B を右大腿骨周囲に移植し作成した骨肉腫腫瘍モデル(ヌードマウス)を作成する。一方で 1×10^6 個の MSC を培養して準備して、48 時間無血清培地で培養し、condition medium のみを採用し超遠心(180000g, 70 分, 4℃)にてエクソソームを抽出する。そのエクソソームを蛍光染色する。用意したエクソソームを骨肉腫腫瘍モデルに静脈投与し、in vivo imaging system を用いてエクソソームの動態を把握する。

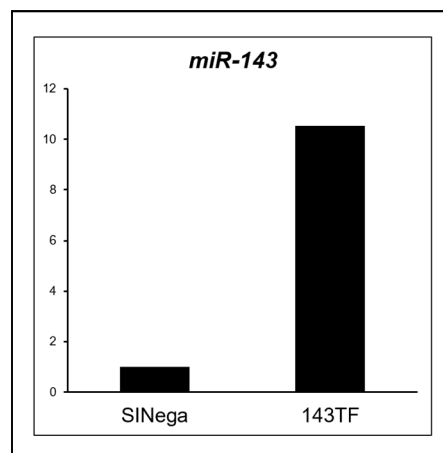
(2) 1×10^6 個の MSC に miRNA143 をトランスフェクション後培養して、48 時間無血清培地で培養し、condition medium のみを採用し超遠心(180000g, 70 分, 4℃)にてエクソソームを抽出する。miR143 を含有した MSC 由来エクソソームを生成し、骨肉腫腫瘍モデルに静脈注射投与する。投与後に腫瘍、腎臓、肺、肝臓を sacrifice して PCR 検査を行う。

4. 研究成果

(1) 上記方法のごとく、蛍光染色した MSC 由来エクソソームを作成した骨肉腫腫瘍モデルに静脈注射した。24 時間後に in vivo imaging system を用いて撮影し、右図のごとく実験初期段階のように腫瘍特異的に集積を示すことが期待された。再現性を確認すべく実験を重ねていったが、確率は低く、必ずしも MSC 由来エクソソームが腫瘍に集積することを検証に至らなかった。しかし右図のように腫瘍に集積することもあり、MSC 細胞が有する組織損傷部、腫瘍部に選択的に集積し損傷部を修復する homing 機能を、MSC から放出される液性因子であるエクソソームが有する可能性がある可能性が推測された。今後もさらに検証していく必要がある。



(2)上記にて MSC 由来エクソソームが、homing 機能を有することを視覚的に証明することができなかった。そのため方法を変えて MSC 由来エクソソームが homing 機能を有する可能性があることを検証する方法を検討した。MSC に抗骨肉腫効果のある miRNA143 をトランスフェクションし、この MSC から放出されるエクソソームを骨肉腫腫瘍モデルに投与後に、腫瘍、肝臓、腎臓、肺を sacrifice して PCR 検査を行い miRNA143 の含有量を比較することにより、homing 機能の検証、さらにはデリバリーシステムとしての検証、治療効果を判定することができると思ったからである。その理由として miRNA143 は骨肉腫細胞において down-regulation されていることを、我々は検証しており、miRNA143 の量が上昇していれば MSC 由来エクソソームが骨肉腫に miRNA143 を運搬したことになる。まず初期の実験を行った。



まずは骨肉腫腫瘍内の miRNA143 への運搬能力を検証する実験を行った。コントロール群として MSC に SiNegative をトランスフェクションし、抽出した MSC 由来エクソソーム(N=4)、そして miRNA143 をトランスフェクションした MSC から抽出した MSC 由来エクソソーム(N=4)を作成した。明らかに右図のごとくコントロール群と比較して、骨肉腫細胞内の miR143 の含有量に差を認める。N が少ないためまだ有意差が出ていないが、MSC 由来エクソソームが miRNA143 を骨肉腫細胞に運搬能を有する可能性が示唆された。

さらに骨肉腫細胞に特化して miRNA143 が運搬されて homing 機能を有するかを確かめた。上記同様にコントロール群(N=4)と miRNA143 トランスフェクション(143TK)群(N=4)の2群を準備した。それぞれの MSC 由来エクソソームを骨肉腫腫瘍モデルに投与して、腫瘍、肝臓、肺、腎臓を sacrifice した。するとその他の臓器ではコントロールとほぼ差がないが、骨肉腫細胞内のみで上昇していることが確認された。MSC 由来エクソソームは骨肉腫細胞に特異的に miRNA143 を運搬した可能性がある。今後はこの研究を継続し N を増やし検証していく必要がある。

(3)当初は in vivo imaging system を用いて視覚的に homing 機能を証明して、MSC 由来エクソソームを利用したデリバリーシステムの開発をスムーズに行う予定であった。しかし実験の途中で in vivo imaging system の故障があり、実験が進まなくなったことと修復後のデータが初期のデータと一致しなくなってしまった。現在も原因を検証中ではあるが、N を重ねて再現性を確認していくしかないと考えている。そのため初期に時間を取られてしまったことと、機械の修復後のデータが一致しなくなったことにより実験の大幅な遅れを招いてしまった。そのため骨肉腫の抗腫瘍効果などを検証する実験に期間内に至れなかった。

(4)総括すると、我々は間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cell; MSC)が有する組織障害、悪性腫瘍部へ遊走(homing)する機能を、MSC から放出される液性因子であるエクソソーム(MSC 由来エクソソーム)が同様に有する可能性があることを示せた。さらにその MSC 由来エクソソームの homing 機能を利用して抗骨肉腫効果を有する miRNA143 を骨肉腫運搬可能であった可能性がある。今後はさらに研究を継続し、さらにこのデリバリーシステムにて抗腫瘍効果の検証を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古田太輔
2. 発表標題 MSC由来エクソソームを用いた新たな骨肉腫治療の開発
3. 学会等名 第35回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古田 太輔
2. 発表標題 骨肉腫に対するMSC由来エクソソームを用いた治療開発
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021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	久保 忠彦 (Kubo Tadahiko) (70397959)	広島大学・医系科学研究科(医)・准教授 (15401)	
研究分担者	味八木 茂 (Miyaki Shigeru) (10392490)	広島大学・病院(医)・講師 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	安達 伸生 (Adachi Nobuo) (30294383)	広島大学・医系科学研究科(医)・教授 (15401)	

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