

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18168

研究課題名(和文) 静脈グラフト内膜肥厚における外膜細胞の保護的役割とエクソソームの関与

研究課題名(英文) Role of exosome in cellular communication of human saphenous vein wall- cross talk between fibroblasts and smooth muscle cells-

研究代表者

竜川 貴光 (Tatsukawa, Takamitsu)

旭川医科大学・大学病院・助教

研究者番号：80837914

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)：末梢動脈疾患に対する自家静脈を用いた動脈バイパス術の問題である内膜中膜平滑筋細胞増殖による術後グラフト狭窄のメカニズム解明を目的に、外膜由来線維芽細胞(Fibs) - 内膜中膜由来平滑筋細胞(SMCs)間で細胞外小胞(エクソソーム)を介した増殖制御機構の存在について検証した。ヒト大伏在静脈由来のFibs及びSMCsの培養上清からエクソソームを抽出した。Fibs由来エクソソームがSMCsの増殖能に影響を与えることを確認した。エクソソーム内のマイクロRNA(miRNA)を次世代シーケンシングにて解析した結果、Fibs由来エクソソームで特異的に発現上昇を認めたmiRNAを45種類同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究の結果、エクソソームを介して平滑筋細胞の増殖を制御可能になった場合、末梢動脈バイパス術後の内膜中膜肥厚によるグラフト狭窄・閉塞という重大な合併症の頻度を減少させることが期待でき、治療予後、再治療介入率、患者のQOL、ひいては医療コストの改善につながると考えている。

現段階では、まだ細胞レベルでの結果段階ではあるが、候補遺伝子の同定、動物実験を経て、最終的には臨床へと、translational researchとして進めるべき研究であると考えている。エクソソームの投与経路としては、血管内投与、薬剤コーティングバルーンによる局所塗布など検討されるが、検討が必要と考えている。

研究成果の概要(英文)： To elucidate the mechanism of intima-media thickening of vein graft during distal arterial bypass surgery for peripheral arterial disease, we examined the existence of an extracellular vesicle (exosome)-mediated growth suppression mechanism between adventitia-derived fibroblasts (Fibs) and media-derived smooth muscle cells (SMCs).

Exosomes were extracted from culture supernatants of Fibs and SMCs derived from human great saphenous vein, and the effect of exosomes from Fibs on the proliferative potential of SMCs was confirmed. MicroRNAs(miRNA) in exosomes were analyzed by next-generation sequencing. As a result, we identified 45 miRNAs that were specifically up-regulated in Fibs-derived exosomes.

研究分野：血管外科

キーワード：末梢動脈疾患 細胞外小胞 自家静脈グラフト狭窄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

末梢動脈疾患 (PAD) による重症下肢虚血は適切な血行再建により治療が成立する。自家静脈を用いた下肢末梢動脈バイパス術は血管内治療とともに下肢血行再建の golden standard な術式である。しかし、バイパスグラフトは 1 年に約 3 割がグラフト狭窄及び閉塞を来すとされており、定期的なフォロー及びリインターベンションを要する。グラフト狭窄を繰り返す症例は患者自身の負担、医療資源の負担増大などを招き、臨床上解決すべき問題とされていた。

グラフト狭窄の主たる要因は内膜中膜を構成する血管平滑筋細胞 (SMCs) の異常増殖による壁肥厚であることが知られており、多くの研究がなされていたが、グラフト狭窄を抑制する有効な手立ては見つかっていなかった。我々の関与した先行研究 (引用 1) において、血管外膜を構成する線維芽細胞 (Fibs) が SMCs との共培養において、SMCs の増殖を抑制させる可能性が示唆された。細胞間情報伝達の方法はホルモン等の血流輸送による内分泌型、局所での仲介物質を用いた傍分泌型、膜結合シグナル分子を介した接触型など様々であるが、近年、細胞外小胞 (エクソソーム、EVs) と呼ばれるエンドソーム膜由来の小胞が、マイクロ RNA (miRNA) を内包し、新たな細胞間コミュニケーションツールとして着目されていた。

2. 研究の目的

我々は、Fibs-SMCs 間の情報伝達がエクソソームによって行われており、Fibs 由来のエクソソーム内に内包されている miRNA の中に、SMCs の増殖制御に関わる miRNA が存在していると仮説を立て、実際の PAD 患者のバイパス手術時に用いた静脈由来の細胞を用いて証明することを目的とした。

3. 研究の方法

[ヒト静脈由来細胞の抽出]

下肢動脈バイパス時に用いた大伏在静脈の残余片を用いた。内膜をスワブで除去後、内膜中膜及び外膜に分離させ、小切片に細断後プラスチック上に留置し DMEM (20%FBS) で培養を行い、プラスチック上に遊走した細胞をそれぞれ SMCs、Fibs と定義し、増殖・抽出した。(Outgrowth 法) 抽出後は Smooth muscle cell growth medium (SMCBM, Cell) を用いて培養した。

[Fibs が SMCs の増殖能に与える影響の評価]

インサータ付きウェルプレートを用いて、下層に SMCs、上層に Fibs を播種した。3 日間培養後、上層を除去し、MTS アッセイにて増殖能を評価した。

[細胞培養上清からのエクソソーム抽出・機能解析]

細胞生存が最低限維持できる条件下かつ PDGF 刺激下 (SMCBM with 2%FBS, 10ng/mL PDGF-BB) で細胞を培養し、48 時間時点での細胞上清を回収しフィルター処理後、超遠心法を用いてエクソソーム分画を抽出した。Fibs エクソソームを PKH26 にて染色し、SMCs の培養上清に添加し、SMCs 細胞内への取り込みの有無を評価した。また、エクソソーム添加による細胞増殖能の変化を MTS アッセイ法により評価した。

[網羅的解析によるエクソソーム内ターゲット miRNA の探索]

Fibs 由来エクソソームと SMCs 由来エクソソームを 5 ペア 10 検体抽出し、次世代シーケンシングにて解析し、Fibs 由来エクソソーム特異的に発現が見られる miRNA を探索した。

4. 研究成果

(1) Fibs、SMCs の抽出

ヒト大伏在静脈は採取後即座に処理し、outgrowth 法によって細胞抽出を行った。欧米での検体例では 1 週時点では 6 割ほどの静脈切片から細胞が遊走しているのに対し、自験例では 1 週時点では Fibs 30%、SMC 5% 程度であり、欧米に比べ細胞遊走能の低さが示唆された。ただその後増殖傾向を示し、その後のアッセイに使用可能な細胞数まで増加可能であった。

(2) SMCs / Fibs 共培養モデルによる増殖能評価

SMCBM with 2%FBS and 10ng/mL PDGF-BB の培養条件下で SMCs と Fibs の共培養モデルを構築し MTS アッセイにて評価したところ、約 4 割細胞増殖能が低下していることを確認し、細胞間コミュニケーションの存在を確認した。(図 1-A)

(3) Fibs/SMCs 由来エクソソームの抽出

エクソソームの抽出は細胞培養上清から行った。SMCBM with 2%FBS and 10ng/mL PDGF-BB の条件を維持し、48 時間 37 °C、5% CO₂ のインキュベーターで培養した後回収し、粗遠心後に 0.22µm フィルターでろ過した。超遠心法により培養液約 70-100mL から最終的に 150-250µL 量で精製した。タンパク濃度は大半が 20-30ng/µL 程度であった。回収したエクソソームの一部は nanosight で計測し、100nm 径前後の particle から構成されていることを確認した。以上より、培養上清

から超遠心法を用いて回収した溶液中にエクソソームが含まれていると定義した。

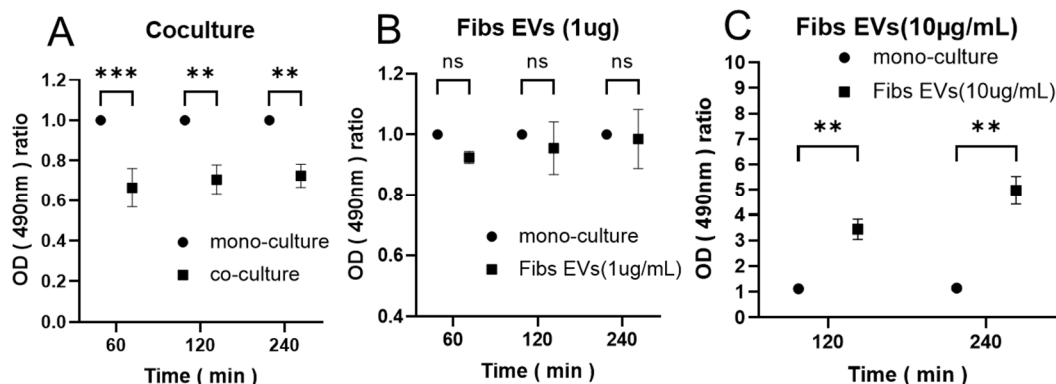


図1：MTS アッセイ結果を示している。(A) Fibs 及び SMCs の共培養モデルでの SMCs 増殖能 (B) 低用量 Fibs 由来エクソソームを添加した SMCs の増殖能 (C) 高用量 Fibs 由来エクソソームを添加した SMCs 増殖能

(4) Fibs 由来エクソソームの SMCs 細胞内への取り込み PKH26 を用いてエクソソームを染色し、SMC 培養液中に添加したところ、対照群と比較し有意に細胞内取り込みの増加を示した(図2)。この結果から、Fibs 由来エクソソームが培養下で SMCs 内に取り込まれると考えられた。

(5) Fibs 由来エクソソーム添加による SMCs 増殖能への影響

SMC の培養液中にエクソソーム溶液を添加し、増殖能への影響を MTS アッセイにて評価した。

SMCs-Fibs 間でのエクソソームの適性濃度については明確な基準はなく、タンパク濃度をもとに低用量(1 µg/mL、図1-B)および高用量(10 µg/mL、図1-C)と定義し、それぞれ SMCs への影響を評価した。低用量では、有意差は認められなかったものの、増殖能の低下傾向を示した。一方、高用量では共培養の結果と反するように、増殖能の増大を示す結果となった。この結果の解釈からは、濃度依存性に反応が変化する、SMC の増殖を亢進・抑制する Fibs のバリエーションの存在(患者特性、遺伝子背景など)などが示唆された。

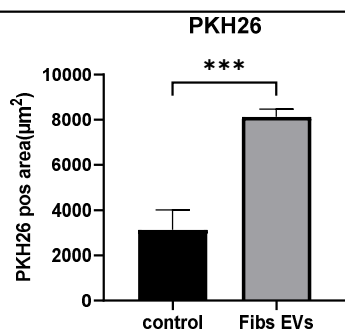


図2：PKH26 による Fibs 由来エクソソームの SMCs 内取り込み評価

(6) 次世代シーケンサーによる Fibs 由来エクソソーム特異的 miRNA 発現の解析

5 患者由来の大伏在静脈から抽出した Fibs 由来エクソソームと SMCs 由来エクソソームを 5 ペア 10 検体抽出し、次世代シーケンサーにより解析したところ

Fibs 及び SMCs から抽出したエクソソームに包埋される miRNA は 2143 種が確認され、特に二つの細胞株間で発現量に有意差(P<0.05)を認めた ex-miRNA は 127 種、このうち Fibs において一定の発現量が確認され、かつ SMCs に対して 2 倍以上の発現を認めた ex-miRNA は 45 種類であった。

現在はこの結果から得られた遺伝子群について文献をもとに候補遺伝子の選定を行っている。本研究機関で得られた結果は以上である。患者検体からの細胞抽出に難渋した点や、コロナ禍による実験計画遅延も生じたが、概ね目的に沿って研究を遂行し、エクソソームを介した血管構成細胞間コミュニケーションが存在する可能性を見出したことは貴重な結果であると考えている。今後は候補遺伝子に対して、さらに機能解析を進めていく予定である。

本研究の最終目的はグラフト内膜肥厚の抑制法の開発である。今後更なる研究の進行が必要であるが、日本と欧米では PAD 患者の患者背景が(透析患者が多い点など)異なっていることから、よりオリジナリティのある研究結果が得られる可能性がある。その点からも、本研究の継続は臨床的・学術的意義があると考えられる。

引用文献：

1) Sobel M, Kikuchi S, Chen L, Tang GL, Wight TN, Kenagy RD. Clinical factors that influence the cellular responses of saphenous veins used for arterial bypass. J Vasc Surg. 2018 (Article in press)

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 菊地信介、亀川貴光、高橋一輝、大平成真、栗山直也、吉田有里、内田大貴、吉岡祐亮、落谷孝広、東信良
2. 発表標題 大伏在静脈壁構成細胞内のコミュニケーションにおけるエクソソームの関与
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------