

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：92720

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17163

研究課題名(和文)再生アソシエイト細胞の細胞外小胞研究

研究課題名(英文)Regeneration-associate cells-derived extracellular vesicles study

研究代表者

サルベコウ アマンケルディ(Salybekov, Amankeldi)

医療法人沖縄徳洲会湘南鎌倉総合病院(臨床研究センター)・一般再生医療研究部・主任部長

研究者番号：80850776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞に対する再生アソシエイト細胞由来細胞外小胞(RACev)の治療効果について間葉系幹細胞由来の細胞外小胞(MSCev)と比較して評価した。心筋梗塞後に細胞外小胞を全身投与したところ、RACev投与群ではMSCev投与群より優れた心機能の改善がみられた。RACev群ではMSCev群と比べて組織学的に梗塞部位の間質線維化が少なく、毛細血管密度が高かった。これらの作用はRACevにおける血管新生、抗線維化、抗炎症および心筋形成関連のmiRsの顕著な発現と関連付けられた一方で、RACevの反復全身投与は虚血組織への血管新生、抗炎症miRの送達を介した心機能増強という点でMSCevより優れている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：RACevを確立し、in vitroおよびin vivoでその治療効果を評価した。本研究成果は、3つの国際学会および3つの査読付きジャーナルにて発表した。また、方法論、治療メカニズムなどについて国際出版済みである。

社会的意義：RACevは、同種異系移植で急性心虚血性疾患の治療効果が期待できることを示した。これは様々な病気を治療するために重要であり、大量生産を可能とするものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the therapeutic efficacy of RAC-derived extracellular vesicles (RACev) compared to mesenchymal stem cell-derived EVs (MSCev) in the context of myocardial infarction. In vitro, RACev markedly enhanced the viability, and proliferation of HUVECs in a dose-dependent manner than MSCev. Notably, systemic injection of RACev improved cardiac functions at 4 weeks, such as fractional shortening, and protection from mitral regurgitation than the MSCev. Histologically, the RACev showed less interstitial fibrosis and enhanced capillary densities compared to the MSCev group. These beneficial effects were coupled with significant expression of angiogenesis, anti-fibrosis, anti-inflammatory, and cardiomyogenesis-related miRs in RACev, while modestly in MSCev. Overall, repetitive systemic transplantation of RACev is superior to MSCev in terms of cardiac function enhancements via crucial angiogenesis, anti-fibrosis, anti-inflammation miR delivery to the ischemic tissue.

研究分野：Cardiovascular diseases (Cardiology)

キーワード：再生アソシエイト細胞 血管新生 extracellular vesicles miR 細胞外小胞 anti-fibrosis cardiomyogenesis exosomes

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血管新生コンディショニングの下では、1型マクロファージ (M1Φ)、T細胞、血管内皮前駆細胞 (EPC) などの末梢血単核細胞 (PBMC) の炎症誘発性細胞サブセットが、血管新生性の EPC や M2 マクロファージ、制御性 T 細胞といった再生促進細胞に表現型をシフトさせる。これらを総称して再生アソシエイト細胞 (RAC) という (Salybekov et al Plos One 2018)。ラット心筋梗塞モデルにおいて、少数の RAC (1×10^5) の全身移植は、微小血管密度 (CD31) の増加、強力な抗炎症作用 (2型マクロファージ (M2Φ) および制御性 T 細胞 (Treg) の浸潤)、心筋形成の開始により、心機能を大幅に改善した。

2. 研究の目的

本研究では、心筋虚血再灌流傷害 (M-IRI) 環境における RAC 由来細胞外小胞 (RACev) の治療効果の解明を試みる。

3. 研究の方法

(1) RAC と MSC の培養：細胞は、成長因子 (Stem Line II (Sigma) および、幹細胞因子、Flt-3 リガンド、トロンボポエチン、VEGF、IL-6 (すべて Peprotech, Inc.) を添加した培地で培養した。PBMC は 37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 10cm ディッシュ (Sumitomo Bakelite Co.) を用いて 7 日間培養した。

(2) EV の分離と定量：Conditioned culture medium (CCM) を回収し、4°C で 10 分間遠心 (300 × g) して細胞を除去した。次に、12°C で 20 分間遠心 (2000 × g) した後、0.2 μm フィルターでろ過することにより、アポトーシス小体と微小胞を除去した。さらに、CCM のろ液を超遠心用チューブに移し、4°C で 110 分間、174000 × g にて超遠心して EV を回収した。EV の数と大きさは NanoSigt NS500® (Malvern Panalytical, UK) を用いて手順書に従って測定した。EV の形態学的特徴は一般的な透過型電子顕微鏡 (JEM-1400, 日本電子株式会社) により確認した。

(3) M-IRI モデル作製および EV 移植：動物実験は東海大学医学部の動物実験委員会の承認 (承認番号 I-20056) を得て、実験動物の管理と使用に関するガイド (National Research Council, 日本) に基づき実施した。日本チャールス・リバー株式会社より雄性ラット (6-10 週齢)、体重 150-250g を購入し、通常飼育環境下で飼育した。M-IRI モデル作製において、3-4% のセボフルラン (丸石製薬株式会社) 麻酔下にて経口挿管し、齧歯動物用人工呼吸器 (Harvard Apparatus, USA) にて 15mL/kg、65~70 回/分の設定で呼吸を維持した。ラットの左側胸郭切開後、30 分間の左前下行冠状動脈の一時的な閉塞とその後の再灌流により M-IRI を誘発した。胸部を閉じた直後に、24G 血管カテーテル (テルモ、日本) を使用して、尾静脈から PBS で希釈した RACev および MSCev (5×10^5 の RAC または MSC に由来する EV) を移植した。実験終了後、5%セボフルランの過麻酔により安楽死させた後、肺や大動脈などの臓器を採取した。

(4) EV 由来の total RNA 抽出、ライブラリ調製およびシーケンシング：miRNeasy mini kit (Qiagen) および RNeasy MinElute Cleanup kit (Qiagen) を使用し、メーカーのプロトコルに従って CCM 由来の small RNA と large RNA を分画した。シーケンスライブラリは、QIAseqTMmiRNA ライブラリキットを使用してメーカーのプロトコルに従って構築した。プールされたライブラリは、NextSeq 500 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) を使用して 76 塩基対 (bp) シングルエンドリードでシーケンスした。

(5) 発現変動した miR のバイオインフォマティク解析：QIAseq miRNA library kit は unique molecular index (UMI) システムを採用しており、成熟した miR の偏りのない正確な定量を可能にする。NextSeq を使用して生成された FASTQ ファイルは Qiagen GeneGlobe データ分析センター (<https://geneglobe.qiagen.com>) にアップロードし、miRBase v21 (<http://www.mirbase.org>) にアラインメントした。特定の miR に割り当てられたすべての読み取りをカウントし、独自の分子をカウントするために関連する UMI を集約した。miR UMI カウントのマトリックスは、StrandNGS 3.4 ソフトウェア (Agilent Technologies) を使用してダウンストリーム分析にかけた。UMI カウントは、トリム平均 M 値 (TMM) 法を使用して定量化した。発現変動した miR の標的遺伝子を決定するために、PITA miRBase バージョン 18、microRNA.org miRBase バージョン 18、および TargetScan バージョン 6.0 に関するすべての情報を統合した。次に、標的遺伝子の生物学的機能を決定するために、ジーンオントロジー (GO) 解析と経路統計分析を実施した。経路内の遺伝子の数と標的遺伝子の数を考慮して経路を決定するための経路統計分析では、PathVisio ツールを使用して WikiPathways データベースの pathway コレクション上で実施した。

4. 研究成果

(1) EV の特性評価

ナノパーティクル分析装置を用いて RAC および MSC から得られた EV の数とサイズを測定した (Fig1A-C)。その結果、RAC は 5×10^5 cells あたりの MSC と比較して、より多くの EV を分泌し

ていた (1.62×10^9 vs. 4.18×10^8 , $P < 0.015$) (Fig1B)。平均直径は MSCev (153.3 ± 2 nm) より RACev (155 ± 1.7 nm) がわずかに大きかった (Fig 1C)。タンパク質含有量を評価したところ、RACev のタンパク量レベルが MSCev に比べて 6 倍高かった (11 ± 1 vs. 64 ± 10 , $P < 0.01$)。さらに、透過型電子顕微鏡により二層膜構造の確認し (Fig1D)、

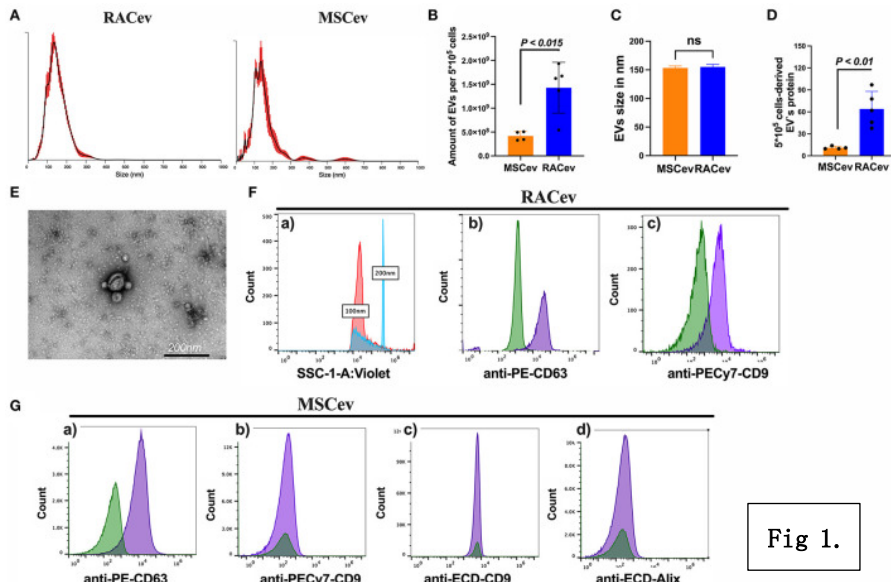


Fig 1.

EV 特異的マーカー (CD9、CD63、および Alix) の発現を確認した (Fig1E、F)。興味深いことに、すべての古典的な EV マーカーが同じ発現パターンを示したわけではなく、RACev では CD9 の高発現がみられた一方で、MSCev では中程度の発現であった (Fig1G)。ここでは、さまざまなサイズのビーズと EV の適切な希釈によりフローサイトメトリー分析を EV のサイズ評価と定量化ツールとして利用できることを示した (Fig1Fa)。

(2) ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に対する RACev の増殖促進および抗アポトーシス作用

HUVEC を異なる濃度の RACev および MSCev (2.5×10^5 および 5×10^5) と共培養した結果、RACev は MSCev と比較して、高い増殖作用を示した (MSCev-250K vs. RACev-250K, $P < 0.001$ および MSCev-500K vs. RACev-500K, $P < 0.0001$) (Fig2A、B)。注目すべきことに、MSCev 共培養では control と比較して、HUVEC の高い増殖作用と growth area の拡大がみられた (Fig2A-C)。

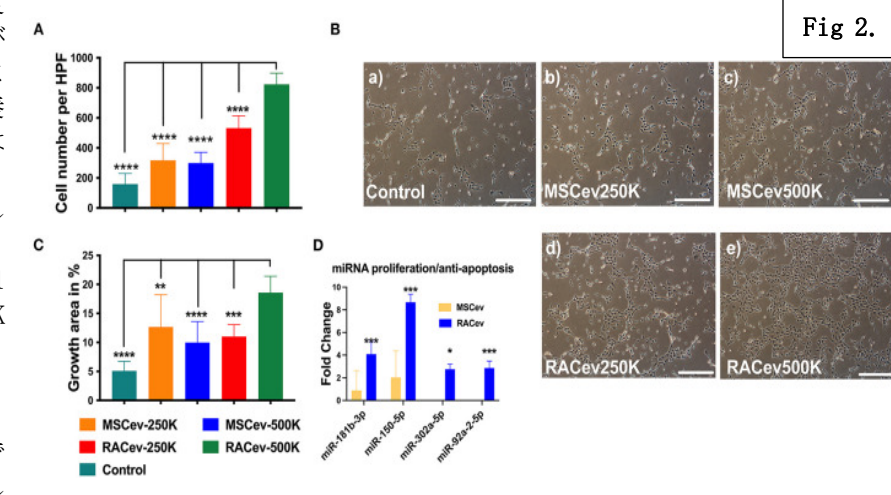


Fig 2.

しかしながら、RACev 共培養では HUVEC の growth area が MSCev 共培養と比べて大幅に拡大した (control vs. RACev-500K, $P < 0.0001$ および MSCev-500K vs. RACev-500K, $P < 0.0001$) (Fig2B、C)。

次に、RACev と MSCev の細胞周期/増殖関連 miR 発現プロファイルを解析したところ、抗アポトーシス作用、細胞分裂および遊走に関する主要な miR が RACev で有意に発現増加していた (Fig2D)。これら in vitro 評価結果から、RACev は MSCev と比較して重要な抗アポトーシスおよび細胞分裂 miR を送達することにより細胞分裂周期を進行させることが示唆された。

(3) RACev 移植による心機能の保存
これまでの臨床データ (Salybekov et al Plos One 2018) および in vitro のデータをもとに、適用量を 5×10^5

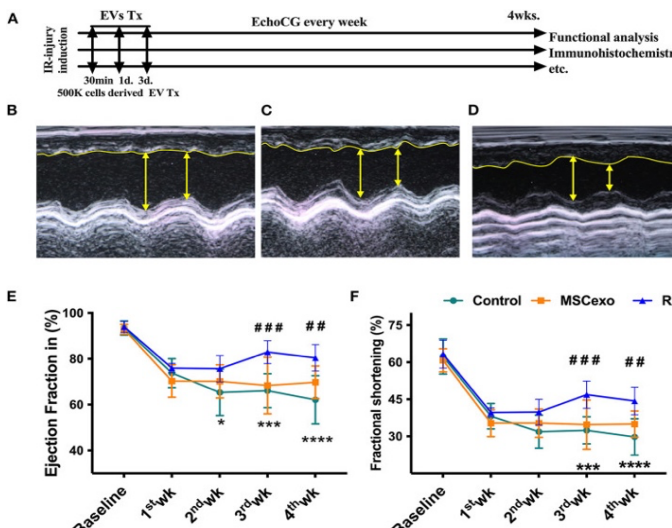
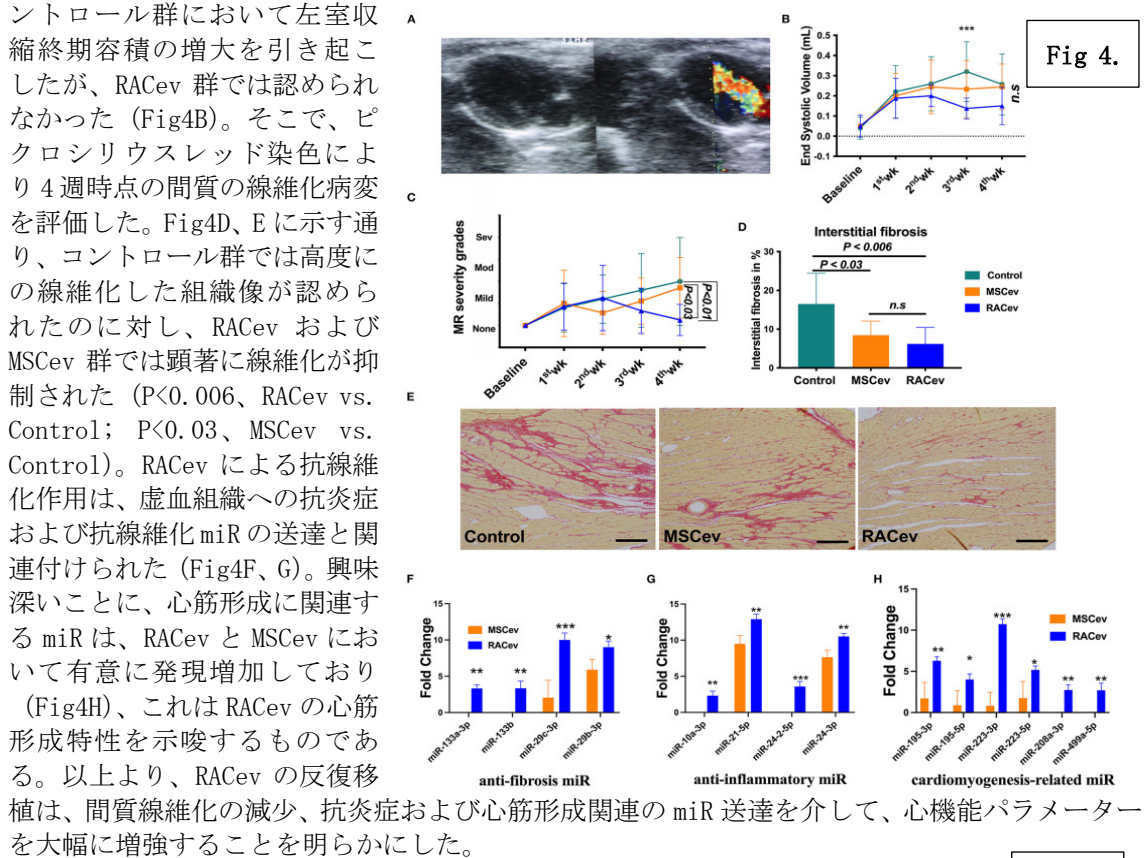


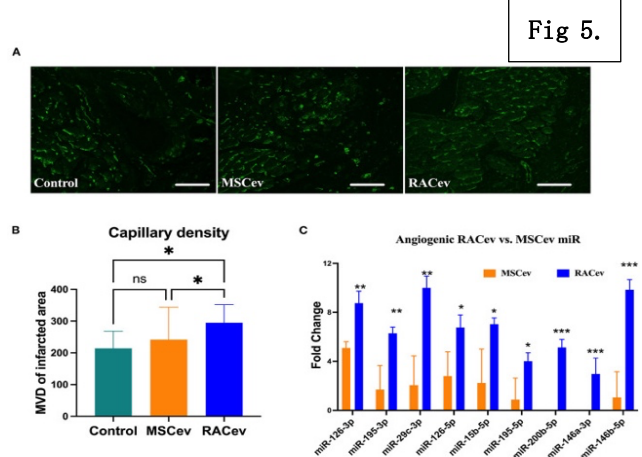
Fig 3.

個の RAC または MSC 由来の EV とし、IRI 処置 30 分、1 日、3 日後に尾静脈から反復投与した (Fig3A)。4 週間後の心エコー検査では、MSCev 移植群およびコントロール群と比較して、RACev 移植群において駆出率の有意な改善が認められた ($P < 0.006$, RACev vs. MSCev; $P < 0.0001$, RACev vs. Control) (Fig3B-E)。左室内径短縮率においても同様に RACev 移植群で改善がみられた ($P < 0.005$, RACev vs. MSCev; $P < 0.0002$, RACev vs. Control、4 週時点) (Fig3F)。M-IRI 後、D-flow mode において僧帽弁不全が多く動物で観察され、この状態が MSCev 移植群およびコントロール群では継続したのに対し、RACev 移植群では 4 週で僧帽弁逆流を緩和した ($P < 0.03$, RACev vs. MSCev; $P < 0.01$, RACev vs. Control) (Fig4A, C)。僧帽弁逆流は MSCev 群およびコントロール群において左室収縮終期容積の増大を引き起こしたが、RACev 群では認められなかった (Fig4B)。そこで、ピクロシリウスレッド染色により 4 週時点の間質の線維化病変を評価した。Fig4D, E に示す通り、コントロール群では高度に線維化した組織像が認められたのに対し、RACev および MSCev 群では顕著に線維化が抑制された ($P < 0.006$, RACev vs. Control; $P < 0.03$, MSCev vs. Control)。RACev による抗線維化作用は、虚血組織への抗炎症および抗線維化 miR の送達と関連付けられた (Fig4F, G)。興味深いことに、心筋形成に関連する miR は、RACev と MSCev において有意に発現増加しており (Fig4H)、これは RACev の心筋形成特性を示唆するものである。以上より、RACev の反復移植は、間質線維化の減少、抗炎症および心筋形成関連の miR 送達を介して、心機能パラメータを大幅に増強することを明らかにした。



(4) RACev による毛細血管密度増加作用
虚血により障害を受けた組織の再生には早期の血管新生の開始が重要である。梗塞を受けた心筋の微小血管密度について、Fig5A, B に典型例を示す。MSCev およびコントロール群と比較して RACev 移植群では微小血管密度が増大しており、これは RACev の強力な血管新生特性を示唆するものである。さらに、トランスクリプトーム解析から、血管新生に関連する主要な血管新生促進 miR である angiomiR が、MSCev と比べて RACev において高発現していることを明らかにした (Fig5C)。

(5) 障害部位への RACev の優先的な蓄積



免疫組織化学的検討により、RACev が梗塞を受けた心筋に蓄積することを明らかにした。一方で、MSCev についても、全身投与後にその一部が選択的に浸潤することを確認した (Fig6A-C)。移植された RACev は MSCev より多く心筋細胞の核内に取り込まれた (Fig6C)。IVIS を用いた EV 追跡実験結果から、RACev 群は MSCev 群と比較して平均放射輝度 (Avg radiance [p/s/cm²sr]) が高く (P<0.01、RACev vs. MSCev) (Fig6D、E)、これは、免疫組織学的検討結果と同じく、RACev の障害部位 (左心室前部の梗塞領域) への優先的な蓄積を示唆するものである。

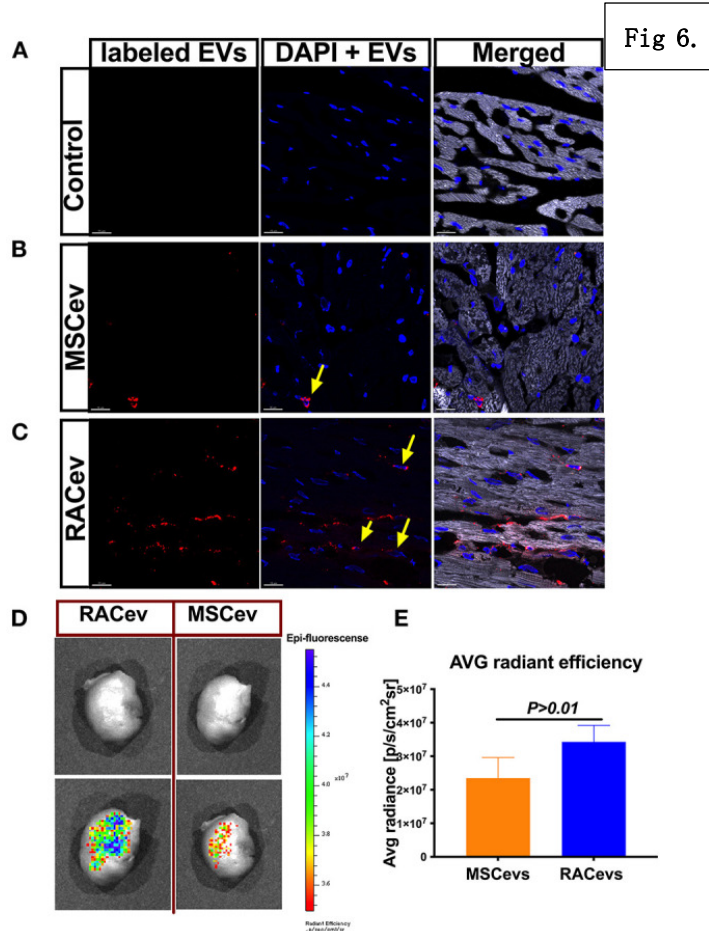
(6) RACev の免疫寛容作用

本研究では、同種 EV 移植 4 日目と 28 日目に宿主免疫反応に関する重要な臨床的兆候について評価した。体重増加と脾臓重量については、すべての群で差がみられなかった。また、RACev および MSCev 移植群において皮膚潰瘍/病変または脱毛、毛皮の質感の変化および下痢は認められなかった

(data not shown)。さらに、末梢血および脾臓由来 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、Treg、TNK、CD11b/c および iNK 細胞数をフローサイトメトリーで計測したところ、すべての群で差がみられなかった。これは、細胞レベルでの RACev 移植 (異種移植においても) 後の免疫反応の発生が少ないことを示している可能性がある。

(7) 結論

本研究結果から、RACev の反復静脈内投与は、心機能の改善 (駆出率、LVDS、および僧帽弁逆流)、angiomiR による強力な血管新生誘導、抗線維化、抗炎症および虚血性心筋における選択的蓄積といった点で MSCev と比較して効果的かつ優れていることを明確に示すことができた。



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 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Amankeldi. A., Salybekov, A. Salybekovs, Sheng Ying, Yoshiko Shinozaki, Keiko Yokoyama, Shuzo Kobayashi, Takayuki Asakara	4. 巻 10
2. 論文標題 Systemic infusion of regeneration-associated cells-derived extracellular vesicles improved ischemia-injured heart function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular vesicles	6. 最初と最後の頁 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jev2.12083	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 該当する
1. 著者名 Salybekov Amankeldi A., Kunikeyev Aidyn D., Kobayashi Shuzo, Asahara Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Latest Advances in Endothelial Progenitor Cell-Derived Extracellular Vesicles Translation to the Clinic	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2021.734562	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 該当する
1. 著者名 Salybekov Amankeldi A., Salybekova Ainur, Sheng Yin, Shinozaki Yoshiko, Yokoyama Keiko, Kobayashi Shuzo, Asahara Takayuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Derived From Regeneration Associated Cells Preserve Heart Function After Ischemia-Induced Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cardiovascular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcvm.2021.754254	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 該当する
1. 著者名 Salybekov Amankeldi A., Wolfien Markus, Kobayashi Shuzo, Steinhoff Gustav, Asahara Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Personalized Cell Therapy for Patients with Peripheral Arterial Diseases in the Context of Genetic Alterations: Artificial Intelligence-Based Responder and Non-Responder Prediction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3266 ~ 3266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123266	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 該当する

1. 著者名 Salybekov Amankeldi A, Salybekova Ainur, Sheng Yin, Kobayashi Shuzo, Asahara Takayuki	4. 巻 144
2. 論文標題 Abstract 10791: Regeneration-Associated Cells Derived Exosomes Beneficial Than Mesenchymal Stromal Cells Derived Exosome in the Context of Myocardial Ischemia-Injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Circulation	6. 最初と最後の頁 10791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1161/circ.144.suppl_1.10791	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 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Amankeldi A. Salybekov
2. 発表標題 Systemic infusion of regeneration-associated cells-derived extracellular vesicles improved ischemia-injured heart function
3. 学会等名 ISEV 2021 (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

1. 発表者名 Amankeldi A. Salybekov
2. 発表標題 Regeneration-Associated Cells Derived Exosomes Beneficial Than Mesenchymal Stromal Cells Derived Exosome in the Context of Myocardial Ischemia-Injury
3. 学会等名 American Heart Association Annual Conference 2021 (国際学会)
4. 発表年 2020年 ~ 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PCT/JP2022/020222	発明者 Amankeldi.Asalybekov & T Asahara	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2022/020222	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------