

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07952

研究課題名(和文) 羊膜MSC由来HSPB6陽性エクソソームを用いた炎症性腸疾患への治療効果の検討

研究課題名(英文) Examination of the therapeutic effect on inflammatory bowel disease using HSPB6-positive exosomes derived from amnion-derived MSCs

研究代表者

桂田 武彦 (Katsurada, Takehiko)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：90507592

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)：研究代表者らは、これまで不明であった羊膜MSCから産生されるエクソソーム内に存在する新たに抗炎症因子としてHSPB6を同定した。また、遺伝子改変技術によりHSPB6過剰発現ならびに欠損エクソソームを作成し、HSPB6発現エクソソームの抗炎症効果を細胞実験により明らかにした。さらに、腸炎マウスモデルを用いて、HSPB6発現エクソソームを投与したところ、腸管における炎症性サイトカインの発現は低下していたが、炎症性細胞の浸潤や病理学的なスコアリングでは、有意な改善効果は認められなかった。今後、HSPB6発現エクソソームの投与量を含めたさらなる検証が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らは、複数の細胞を用いた検討により、羊膜MSCのみからHSPB6陽性エクソソームが大量に産生され、それが強い抗炎症効果を発揮することを世界に先駆けて明らかにしており、現在までに国内外を含め類似する研究はなされていない。

研究代表者らは、この羊膜MSCで特異的に産生されるHSPB6陽性エクソソームの抗炎症効果の検討を詳細に解析することで、未だ不明である炎症性腸疾患に対する新規治療薬の開発を世界に先駆けて実施する予定であり、学術的独自性ならびに創造性の高い研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have identified HSPB6 as a newly discovered anti-inflammatory factor present in exosomes produced from previously unidentified amniotic membrane MSCs. Additionally, utilizing genetic modification techniques, we created exosomes with overexpressed and deficient HSPB6, thereby elucidating the anti-inflammatory effects of HSPB6-expressing exosomes through cellular experiments. Furthermore, using a colitis mouse model, administration of HSPB6-expressing exosomes resulted in a decrease in the expression of inflammatory cytokines in the intestines; however, significant improvement was not observed in the infiltration of inflammatory cells or pathological scoring. Further validation, including the dosage of HSPB6-expressing exosomes, is considered necessary for future

研究分野：再生医療

キーワード：羊膜MSC HSPB6 エクソソーム 炎症性腸疾患

### 1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞は、出産時に廃棄される羊膜にも存在していることが知られており、次世代の再生医療材料として期待されている。研究代表者らは、ヒト羊膜から間葉系幹細胞 (MSC) を分離培養する技術を確立し、炎症性腸疾患、肝硬変、膵炎などの複数の炎症性疾患動物モデルに対して羊膜 MSC やその培養上清を投与したところ、いずれも高い治療効果を発揮することを明らかにしてきた。また研究代表者らは、プロテオーム解析を用いて羊膜 MSC から産生される抗炎症物質の同定を試みたところ、低分子熱ショックプロテインである heat shock protein beta 6 (HSPB6) がエクソソーム内に存在していることを明らかにしており、HSPB6 陽性エクソソームが羊膜 MSC の持つ抗炎症作用に大きく寄与していると想定している。本研究では、羊膜 MSC から産生される HSPB6 陽性エクソソームを用いて細胞培養実験ならびに炎症性腸疾患誘導性動物モデルを用いてヒト炎症性腸疾患に対する臨床応用への基盤を整える。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、羊膜 MSC から特異的に産生される HSPB6 陽性エクソソームにおける抗炎症効果検討を行い、これまで不明であった羊膜 MSC がもつ強力な抗炎症効果のカギとなる物質の正体を明らかにするとともに、炎症性腸疾患を発症した動物モデルを用いてヒト難治性炎症疾患に対する安全かつ有効な新規治療薬の開発を目的とする。研究代表者らは、これまでに肝炎、膵炎、炎症性腸疾患などの動物モデルを作成し、羊膜 MSC ならびにその培養上清を投与することで疾患の発症を抑制することを明らかにしてきた。ところが、羊膜 MSC の強力な疾患への治療効果を示す一方で、そのカギとなる物質については不明なままであった。近年、研究代表者らは、複数の細胞を用いた検討により、羊膜 MSC のみから HSPB6 陽性エクソソームが大量に産生され、それが強い抗炎症効果を発揮することを世界に先駆けて明らかにしており、現在までに国内外を含め類似する研究はなされていない。研究代表者らは、この羊膜 MSC で特異的に産生される HSPB6 陽性エクソソームの抗炎症効果の検討を詳細に解析することで、未だ不明である炎症性腸疾患に対する新規治療薬の開発を世界に先駆けて実施する。

### 3. 研究の方法

本研究では、羊膜 MSC から産生される HSPB6 陽性エクソソームを用いた抗炎症効果の詳細を細胞実験ならびに炎症性腸疾患誘導性動物モデルを用いて、未だ適切な治療法がないヒト炎症性腸疾患に対する臨床応用への基盤を整えた。

#### (1) HSPB6 過剰発現ならびに HSPB6 欠損羊膜 MSC の作成およびエクソソームの樹立

**方法**；羊膜 MSC の HSPB6 過剰発現株ならびに遺伝子欠損株を樹立した。HSPB6 過剰発現株の作成には、CMV プロモーター下に HSPB6 遺伝子を挿入したプラスミドを MSC に導入後、薬剤選択による選別を行い、得られたクローンはウエスタンブロット法による野生型および mock コントロールとの比較解析から、有意に発現増加の認められるクローンを選別することで樹立した。HSPB6 欠損株の作成には CRISPR/Cas9 システムを採用し、ヒト HSPB6 エクソン領域に特異的な gRNA を設計し、CAG プロモーター下で Cas9 および T3 プロモーター下で gRNA を発現するプラスミドを構築、MSC に導入し、genotyping による標的遺伝子座での塩基の欠損が認められ、ウエスタンブロット法で標的分子の翻訳消失が認められるクローンを選別することで樹立した。

#### (2) 炎症細胞を用いた HSPB6 過剰発現ならびに HSPB6 欠損羊膜 MSC 由来エクソソーム処理後の炎症評価の検討

**方法**；上記で作成された HSPB6 過剰発現エクソソームならびに HSPB6 欠損エクソソームの炎症性評価を明らかにするために、マウス由来マクロファージを用いて、LPS (100 ng/ml) の刺激後、20~100 µg/ml の濃度のエクソソームを処理し、産生される複数の炎症性サイトカインを ELISA にて検証した。また、炎症性サイトカインの産生に重要な転写因子の活性化についてもウエスタンブロット法で評価した。さらに、細胞内への HSPB6 の取り込み能を確認するために各エクソソームをラベル化し、エクソソームの細胞への取り込み能を顕微鏡下で観察するほか、エクソソーム処理後のマウス由来マクロファージを PBS で 2 回洗浄し、ウエスタンブロット法で細胞内 HSPB6 の発現を解析した。

#### (3) 炎症性腸疾患マウスを用いた HSPB6 陽性エクソソームの治療効果の検討

**方法**；6 週齢のマウスを用いて 3% デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 水を 11 日間自由飲水させ腸炎モデルを作成する。その間、3 日、6 日ならびに 9 日目で 100~200 µg の HSPB6 過剰発現エクソソームならびに HSPB6 欠損エクソソームをマウスに静脈下で投与し、体重変化ならびに血便等について連日観察した。DSS 投与 11 日後、マウスを処置し病理学的検討により炎症性評価を実施した。また、腸管組織を用いて免疫染色を行い、炎症性細胞浸潤を評価した。また、腸管組織から RNA を抽出し、TNF-α、IL-6 などの炎症性サイトカインの発現を定量的 PCR 法にて評価した。さらに、エクソソームをラベル化し、投与後のエクソソームの腸管内での動態をイメージング装置にて検証した。

#### 4. 研究成果

間葉系幹細胞(MSC)は、骨髄、脂肪などに存在する体性幹細胞であり、骨、軟骨、脂肪などに分化する多分化能を有し、再生医療における有望な細胞として注目されている。研究代表者らは、出産時に廃棄される卵膜に着目し、その中の羊膜には多量の MSC が含まれていること、また、骨髄や脂肪組織由来 MSC と比較すると採取 時の侵襲がないことから新規の再生医療ソースとして期待されている。これまでに研究代表者らは、炎症性疾患動物モデルを用いて羊膜 MSC の病態改善効果を検討しており、腸炎、膵炎、放射線直腸炎ならびに肝線維症において強い抗炎症効果または抗線維化効果を有することで、病態発症を改善させることを明らかにしてきた。しかしながら、これまで羊膜 MSC に由来するどのような物質がさまざまな炎症性疾患を抑制しているのかの詳細は明らかにされていない。近年、研究代表者らは、医薬基盤・健康・栄養研究所の足立淳博士ならびに朝長毅博士との研究で nano LC-MS/MS 羊膜由来 MSC の培養上清中に出てくる抗炎症物質の同定を試みたところ、低分子熱ショックタンパク質である HSPB6(HSP20)が抗炎症効果を示さないコントロールである繊維化細胞由来培養上清にくらべて少なくとも 100 以上と 多量に存在しているおり、HSPB6 は培養上清中にエクソソームに包まれた状態で存在していることを世界に先駆けて明らかにした。また、他の組織由来 MSC を 含む複数の細胞で HSPB6 の存在を確認したところ、羊膜 MSC 由来エクソソームでのみ HSPB6 の発現が認められており、この現象は羊膜由来 MSC 特異的な性質であることが考えられる。そこで、羊膜 MSC から産生される HSPB6 陽性エクソソームを用いた抗炎症効果の詳細を細胞実験ならびに炎症性腸疾患誘導性動物モデルを用いて、未だ適切な治療法がないヒト炎症性腸疾患に対する臨床応用への基盤的研究を実施した。

本研究では、HSPB6 過剰発現ならびに HSPB6 欠損羊膜 MSC の作成およびそれらエクソソームの樹立することができた。炎症細胞を用いた HSPB6 過剰発現ならびに HSPB6 欠損羊膜 MSC 由来エクソソーム処理後のエクソソームの細胞への取り込み能ならびに炎症評価の検討を行った。結果、細胞内への HSPB6 の取り込み能を確認するために各エクソソームを蛍光標識でラベル化し、エクソソームのマウス由来マクロファージ (MQ) への取り込み能を顕微鏡下で観察したところ、細胞内にきちんとエクソソームが取り込まれていることを確認した。次に、MQ を用いて、LPS の刺激後、それぞれのエクソソームを処理し、炎症性サイトカインの発現ならびに細胞培養上清中に産生される複数の炎症性サイトカインを検証したところ、HSPB6 発現エクソソームでそれらの炎症性サイトカインの発現が低下していたほか、培養上清中に産生されるサイトカインも同様に抑制されていた。一方で、HSPB6 欠損エクソソーム処理では、それらの抑制がキャンセルされていた。また、ウエスタンブロット法により炎症性サイトカインの発現に関わる Ik-B や NF- $\kappa$ B の活性化についても同様に HSPB6 発現エクソソーム処理で抑制され、HSPB6 欠損エクソソームではその抑制がキャンセルされていた。

次に、炎症性腸疾患マウスモデルを用いて HSPB6 発現エクソソームの治療効果を検討した。結果、HSPB6 発現エクソソームをマウスに投与したところ、腸管における炎症性サイトカインの発現は低下していたが、炎症性細胞の浸潤や病理学的なスコアリングでは、有意な改善効果は認められなかった。これらのことから、HSPB6 発現エクソソームは、抗炎症効果を示す傾向にあったが、動物実験ではその著しい腸炎発症抑制効果は認められなかった。今後、HSPB6 発現エクソソームの投与量を含めたさらなる検証が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院医学研究院内科学講座消化器内科学教室ホームページ  
<https://halo.med.hokudai.ac.jp/>

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	山本 幸司  (Yamamoto Koji)  (70608322)	旭川医科大学・医学部・特任助教    (10107)	
研究分担者	大西 俊介  (Ohnishi Shunsuke)  (10443475)	北海道大学・薬学研究院・教授    (10101)	
研究分担者	武井 則雄  (Takei Norio)  (50523461)	北海道大学・医学研究院・助教    (10101)	

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