

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07998

研究課題名（和文）間葉系幹細胞由来の細胞外小胞の保存法の確立と急性肝不全に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Establishment of a Preservation Method for Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Development of a Novel Treatment for Acute Liver Failure

研究代表者

芳賀 弘明 (Haga, Hiroaki)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：70466613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：急性肝不全マウスにおいて、間葉系幹細胞由来細胞外小胞（MSC-EV）は肝機能、肝組織を改善させるが、緊急性を有する臨床においてはMSC-EVの有効な保存方法の確立が必要である。我々はMSC-EVの凍結乾燥保存法の検討と、凍結乾燥MSC-EVの急性肝不全マウスへの効果について研究を行った。PBS、1%スクロース、5%スクロース溶液を用いた凍結乾燥法を比較した結果、MSC-EVの数、RNA、および形態は5%スクロース溶液で最も維持されることが示された。さらに、5%スクロースでの凍結乾燥MSC-EVは、非凍結乾燥MSC-EVと同様に、急性肝不全マウスの肝機能および肝組織を改善させることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昏睡型急性肝不全は、死亡率が極めて高い疾患であり、肝臓移植を要する患者も存在する。しかし、深刻なドナー不足のため、新しい肝再生医療の開発が必要とされる。急性肝不全マウスにおいて、MSC-EVは肝機能改善に寄与するが、臨床応用を考えた際に問題となるのはMSC-EVの保存方法である。間葉系幹細胞の培養液からMSC-EVを抽出するには時間がかかるため、緊急性を有する臨床においてはMSC-EVの有効な保存方法の確立が必要である。今回、我々はMSC-EVの凍結乾燥法の確立と、その凍結乾燥MSC-EVが急性肝不全マウスの改善に寄与することを示した。これにより、EVの臨床応用に一歩近づくものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In mice with acute liver failure, mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) have been shown to improve liver function and liver tissue. However, in urgent clinical settings, it is necessary to establish an effective preservation method for MSC-EVs. We investigated the lyophilization method for preserving MSC-EVs and studied the effects of lyophilized MSC-EVs on mice with acute liver failure. By comparing lyophilization methods using PBS, 1% sucrose solution, and 5% sucrose solution, it was demonstrated that the number, RNA, and morphology of MSC-EVs were best maintained with the 5% sucrose solution. Furthermore, lyophilized MSC-EVs in 5% sucrose solution were confirmed to improve liver function and liver tissue in mice with acute liver failure, similarly to non-lyophilized MSC-EVs.

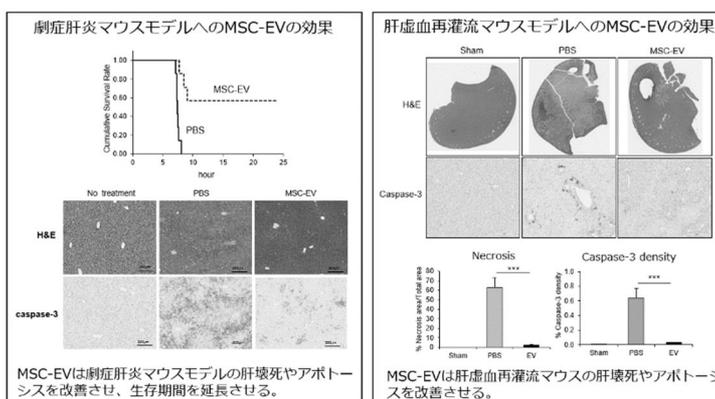
研究分野：肝臓病学

キーワード：細胞外小胞 間葉系幹細胞 急性肝不全 Extracellular Vesicles

## 様式 C - 19、F - 19 -、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

急性肝不全の中でも重症な病態である昏睡型急性肝不全は、死亡率がきわめて高い疾患である。このような肝不全に対しては肝臓移植が標準的治療法であるが、深刻なドナー不足のため、新しい肝再生医療の開発が必要である。申請者は急性肝不全マウスモデルにおいて間葉系幹細胞由来の細胞外小胞 (MSC-EV) が肝機能および肝組織を改善させ、生存率を上げることが明らかになった。次いで、MSC-EV は肝虚血状態で上昇する ROS と NF-



Bを低下させて、肝細胞のviabilityを保つことや、MSC-EV中のY RNA-1が肝細胞のviabilityの改善に寄与することも見出した。しかし、臨床応用を考えたときに問題となるのは、MSC-EVの保存方法である。間葉系幹細胞の培養液からMSC-EVを抽出するには時間がかかるため、緊急性を有する臨床においてはMSC-EVの有効な保存方法の確立が必要である。EVの保存については、-80度では1週間まで可能 (J Extracell Vesicles. 2014) とする報告や、3ヶ月まで保存可能 (Chinese J Cell Molecular Immuno. 2017) であるとの報告があり、いまだ統一な結論はなされていない。また、EVの凍結乾燥保存では14日間保存可能との報告もみられる (Scientific Reports. 2018)。しかし、保存したEVが実際に治療効果を示すかどうかの詳細な検討はなされていない。申請者は凍結乾燥保存に注目し、適切な凍結乾燥保存の検討、および凍結乾燥 MSC-EVの急性肝不全マウスモデルへの効果について検討した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、MSC-EVを様々な条件で凍結乾燥させることに伴うEVの数や形態、またRNA量の変化について検討し、さらにはそれら保存されたEVが急性肝不全マウスモデルに与える効果について検討することである。凍結乾燥させたEVでも肝機能及び肝組織を改善させることが証明できれば、今後のEVの臨床応用に一步近づくものと思われる。

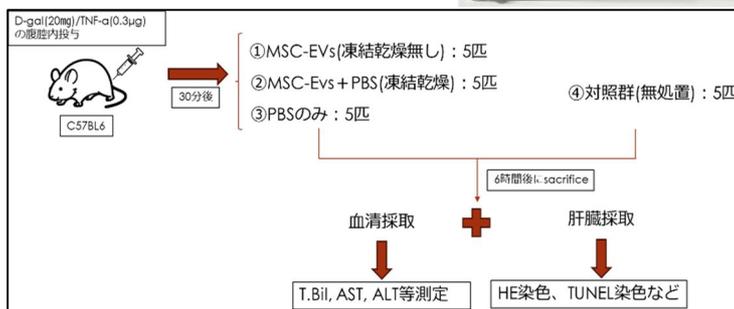
### 3. 研究の方法

マウス骨髄由来間葉系幹細胞の培養液から超遠心法にてEVの採取を行った。抽出したEVを用いて非凍結乾燥群(control群)、凍結保護剤としてPBSを用いた群(PBS群)、凍結保護剤として1%スクロースを用いた群(1%スクロース群)、凍結保護剤として5%スクロースを用いた群(5%スクロース群)を設定した。凍結乾燥は既報を基に-80で予備凍結させた後、サンプルをチャンパー内に入れ(チャンパー圧は40mmTorr)、8時間凍結乾燥を行った。凍結乾燥させたサンプルの融解はDNA/RNA free水を加えて行った。EVの数はNanosightを用いて解析した。RNA量についてはQIAcubeを用いてRNA抽出をし、バイオアナライザーで測定した。EVの形状観察については電子顕微鏡を用いて行った。

凍結乾燥 (Freeze drying)



急性肝不全マウスモデルはC57Bl/6マウスに20mg/body D-galactosamine (GalN) + 0.3ug/body TNF-を腹腔内投与し作成した(右図)。GalN + TNF-投与30分後に、非凍結乾燥EV、PBS凍結乾燥EV、5%スクロース凍結乾燥EVをそれぞれ $2 \times 10^{10}$  particles/bodyを経尾静脈的に投与し、6時間後にsacrificeして血清と肝を採取し、肝障害の程度や組織学的変化について比較検討を行った。



#### 4. 研究成果

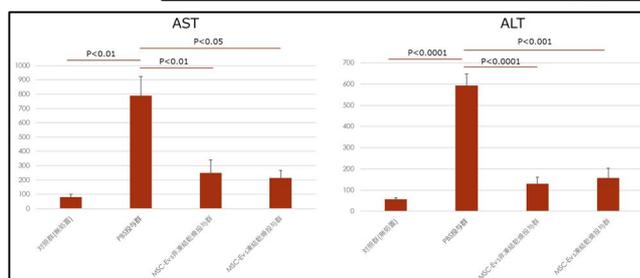
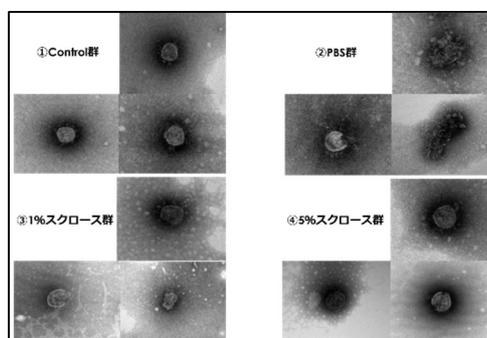
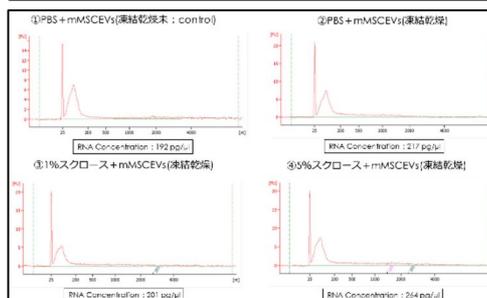
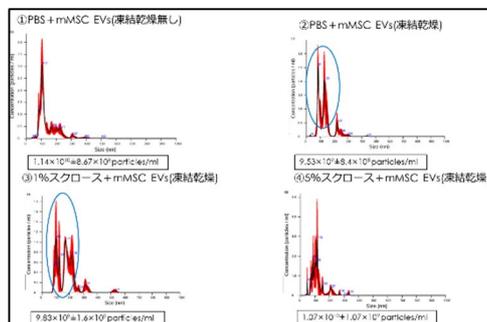
凍結乾燥前後の EV 数については、control 群 ( $1.14 \times 10^{10} \pm 8.67 \times 10^8$  particles/mL) と比較して、凍結乾燥を行った 3 群 (PBS 群:  $9.53 \times 10^9 \pm 8.4 \times 10^8$  particles/mL、1%スクロース群:  $9.83 \times 10^9 \pm 1.6 \times 10^9$  particles/mL、5%スクロース群:  $1.07 \times 10^{10} \pm 1.07 \times 10^9$  particles/mL) では有意差はみられなかった。EV 粒子径は control 群と 5%スクロース群にて exosome が最も多く含まれていた。

RNA 量の比較については、凍結乾燥した 3 群はそれぞれ PBS 群: 217 pg/μl、1%スクロース群: 201 pg/μl、5%スクロース群: 264 pg/μl であり、control 群: 192 pg/μl と比較して有意な差はみられなかった。

EV の形状比較については、1%スクロース群や PBS 群では EV が変形したり、構造が破綻しているものが目立ったが、5%スクロース群は control 群と比較しても形状は保たれていた。以上の結果より 5%スクロース群の MSC-EV を用いて急性肝不全マウスモデルへの効果の検討を行った。

MSC-EV を肝不全マウスモデルに尾静脈投与した実験では、血清 AST は Control (PBS 投与群)、非凍結乾燥 MSC-EV、凍結乾燥 MSC-EV は、それぞれ 789 U/L、249 U/L ( $p < 0.01$ )、215 U/L ( $p < 0.05$ ) であった。血清 ALT はそれぞれ 593 U/L、130 U/L ( $p < 0.0001$ )、158 U/L ( $p < 0.001$ ) であり、凍結乾燥 MSC-EV においても非凍結乾燥 MSC-EV と同様な治療効果を示した。肝組織については、HE 染色と TUNEL 染色を行って評価した。PBS 投与群と比較して、非凍結乾燥 MSC-EV 投与群及び凍結乾燥 MSC-EV 投与群でアポトーシスの割合が有意に低下していた。

MSC-EV の凍結保護剤としては 5%スクロースが最適であると思われた。凍結乾燥させた MSC-EV でも、凍結乾燥させていない MSC-EV 同様に肝機能及び肝組織を改善させることが示唆された。



#### 参考文献

- 1: Haga H, Yan IK, Borelli D, Matsuda A, Parasramka M, Shukla N, Lee DD, Patel T. Extracellular vesicles from bone marrow derived mesenchymal stem cells protect against murine hepatic ischemia-reperfusion injury. *Liver Transplantation*. 2017;23(6):791-803
- 2: Haga H, Yan IK, Takahashi K, Matsuda A, Patel T. Extracellular Vesicles from Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Improve Survival from Lethal Hepatic Failure in Mice. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(4):1262-1272

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芳賀弘明
2. 発表標題 ヒト胆汁由来細胞外小胞における Claudin 3の胆管癌バイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 芳賀弘明
2. 発表標題 胆管癌バイオマーカーとしてのヒト胆汁および 胆汁由来細胞外小胞におけるClaudin 3の検討
3. 学会等名 日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 芳賀弘明
2. 発表標題 ラット70%肝部分切除術後の胆汁由来の細胞外小胞による肝細胞への影響
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2023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	星川 恭子 (Hoshikawa Kyoko) (20613053)	山形大学・医学部・助教  (11501)	

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	勝見 智大  (Katsumi Tomohiro)  (70637355)	山形大学・医学部・助教     (11501)	

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