

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19563

研究課題名（和文）経静脈投与が可能な虚血性心疾患に対するエクソソーム治療法の開発

研究課題名（英文）Development of exosome treatment involving angiogenic microRNAs for ischemia tissues

研究代表者

濱野 公一（HAMANO, Kimikazu）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60263787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：アレイ解析、in vitro解析、in vivo解析によるスクリーニング実験から、血管新生能があるmicroRNAとして、miR-765を同定した。miR-765を内包したエクソソームを下肢虚血マウスモデルの大腿部に投与すると、血管新生関連遺伝子であるFGF2、PDGF-A、PDGF-B、VEGF、HGF、DHHの発現レベルが上昇する結果を得た。miR-765がFGF2を上昇させる機序として、これまでの報告を参考にして実験を行ったところ、miR-765がDPP4を抑制することで、FGF2を上昇させていることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幹細胞由来エクソソームは、幹細胞と同じ血管新生能を持つことが報告されており、その機序は、エクソソームに内包されているmicroRNAが関与していると考えられている。本研究において、研究代表者は、独自のスクリーニング実験により、血管新生能を持つmicroRNAとしてmiR-765を見出した。miR-765の血管新生の機序は、miR-765がDPP4を抑制することで、FGF2が上昇し、血管新生が誘導されていると考えられる。本研究は、幹細胞由来エクソソームではなくても、miR-765を導入したエクソソームであれば、虚血組織に対して血流改善を誘導する可能性があり、虚血疾患に対する治療薬として期待される。

研究成果の概要（英文）：miR-765 as an angiogenic microRNA was identified based on screening experiments involving miRNA array analysis, in vitro analysis and in vivo analysis. The expression levels of angiogenic genes were upregulated in femurs of lower limb ischemia mice by administration of exosomes involving miR-765. Our data suggested that miR-765 repressed DPP4 and increased FGF2.

研究分野：再生医療

キーワード：microRNA 血管新生

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞由来エクソソーム投与による血管新生は、エクソソームに内包されている microRNA によるものであると複数の論文で報告されている。これは、血管新生能を有する幹細胞で発現している microRNA が、幹細胞が分泌するエクソソームに取り込まれているからであると考えられる。

研究代表者は、血管新生能を有する microRNA を特定し、その microRNA を内包させたエクソソームは、血管新生能を有すると考え、本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

独自の方法で特定した血管新生能 microRNA を内包したエクソソームが、血管新生能を持つことを示すこと。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管新生能を持つ microRNA のスクリーニング実験

##### 1 次スクリーニング

ヒト歯髄幹細胞を通常酸素濃度および低酸素濃度で培養し、その培養液中に分泌されたエクソソームを単離し、そのエクソソームに内包されている microRNA を抽出後、microRNA アレイ解析を行った。

##### 2 次スクリーニング

表 1 に示す microRNA の中で、Number8 の miR-1973 を除く、12 個の microRNA を発現するベクターを作製し、293T 細胞に導入することで、293T 細胞が分泌するエクソソームに、目的の microRNA が内包されるエクソソームを作製した。そのエクソソームを、ヒト大動脈由来内皮細胞に添加培養することで、ヒト大動脈由来内皮細胞の増殖を促す microRNA を解析した。

##### 3 次スクリーニング

miR-4485-3p、miR-765、miR-4284、miR-3678-3p を内包するエクソソームを、BALB/C 下肢虚血マウスの大腿部に投与し、経時的にドップラーで血流を解析した。

#### (2) 血管新生関連遺伝子の発現解析

miR-765 内包エクソソーム、および、コントロールである scramble 配列内包エクソソームを BALB/C 下肢虚血マウスの大腿部 10 匹ずつに投与して 2 日後の遺伝子発現解析を qPCR で行った。

#### (3) 3' UTR ルシフェラーゼアッセイ

in silico 解析から、miR-765 と相補的な配列があると予測された DPP4 (Dipeptidyl Peptidase 4、CD26) に対する 3' UTR ルシフェラーゼアッセイを行った。

#### (4) miR-765 の DPP4 および FGF2 に解析

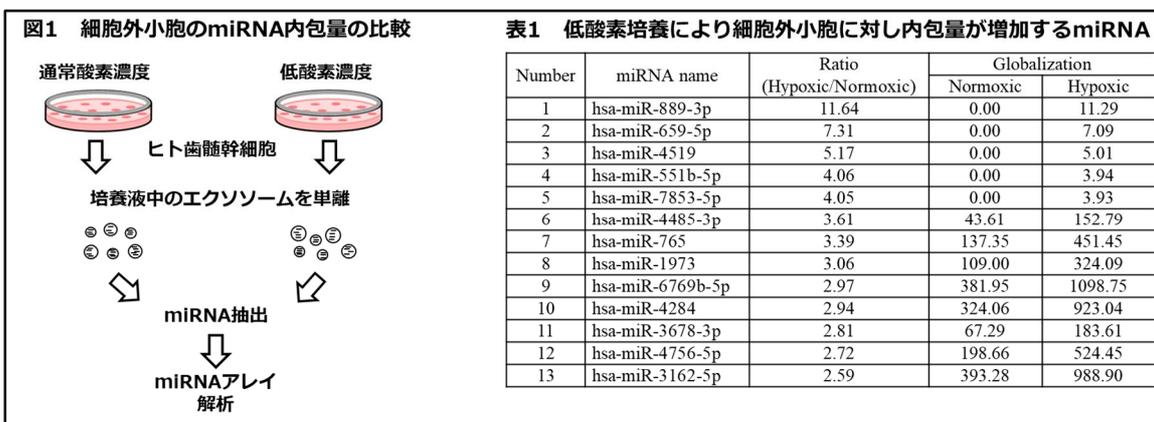
293T 細胞に miR-765 mimic を導入し、その発現レベルを qPCR で解析した。293T 細胞に miR-765 mimic を導入し、タンパク質を抽出後、ウェスタンブロットティングで、DPP4 および FGF2 の発現レベルを解析した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 血管新生能を持つ microRNA のスクリーニング実験

###### 1 次スクリーニング

図 1 に示す実験から、低酸素培養で歯髄幹細胞が分泌するエクソソームに内包されている量が増加した 13 個の microRNA を得た (表 1)。

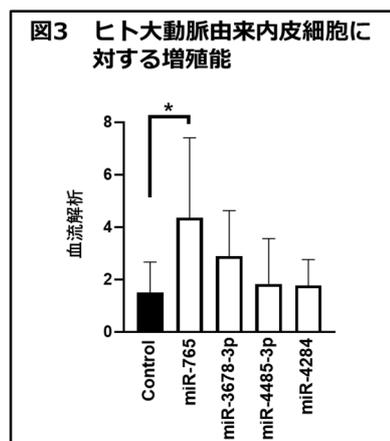
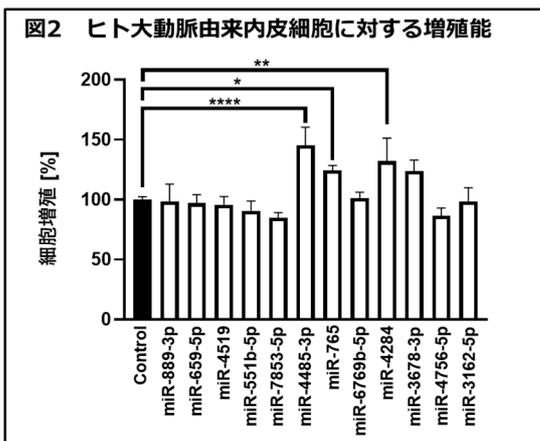


###### 2 次スクリーニング

表 1 に示す microRNA を内包したエクソソームを添加したヒト大動脈由来内皮細胞の増殖を促した microRNA として、miR-4485-3p、miR-765、miR-4284、miR-3678-3p の 4 つの microRNA を選択した (図 2)。

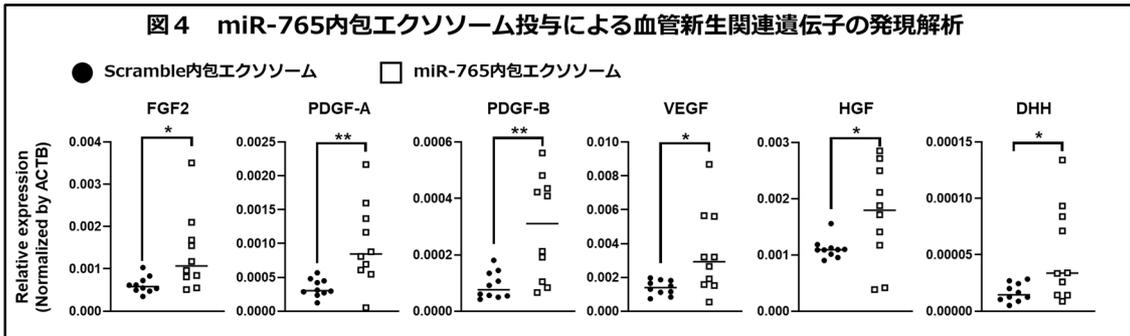
###### 3 次スクリーニング

miR-4485-3p、miR-765、miR-4284、miR-3678-3p を内包するエクソソームを大腿部に投与された BALB/C 下肢虚血マウスの血流をドップラーで解析すると、コントロールと比較して miR-765 内包エクソソームの血流は有意に改善していた (図 3)。



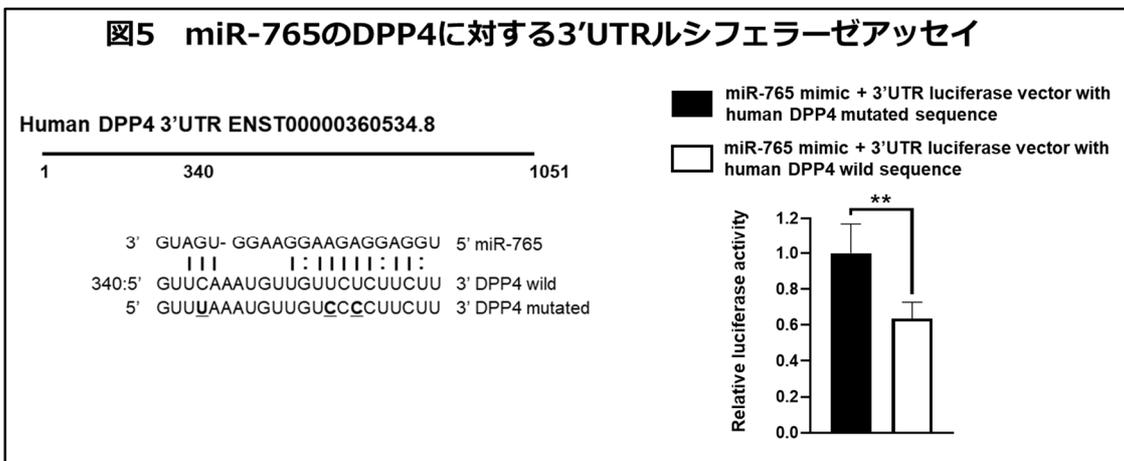
(2) miR-765 内包エクソソーム投与による血管新生関連遺伝子の発現解析

miR-765 内包エクソソームおよび scramble 内包エクソソームを、それぞれ、BALB/C 下肢虚血マウス 10 匹ずつの大腿部に投与して 2 日後に、血管新生関連遺伝子の発現解析を qPCR で解析すると、scramble 内包エクソソームを投与した大腿部に比較して、miR-765 内包エクソソームを投与し大腿部において、FGF2、PDGF-A、PDGF-B、VEGF、HGF、DHH の発現レベルが上昇していた (図 4)。



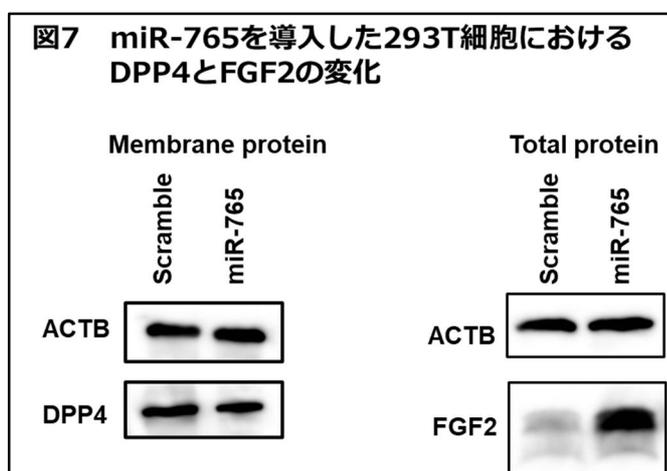
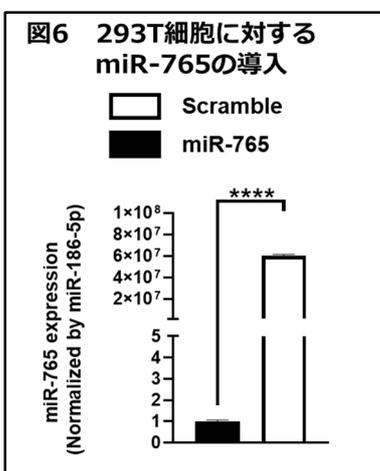
(3) miR-765 の DPP4 に対する 3' UTR ルシフェラーゼアッセイ

miR-765 は、変異型 DPP4 の配列と比較して、野生型 DPP4 の配列に対して、有意にルシフェラーゼの発光を抑制する結果となった (図 5)。



(4) miR-765 は DPP4 を抑制し、FGF2 を上昇させる。

これまでに、前立腺癌細胞株 LNCaP において、DPP4 ノックダウンは FGF2 タンパクを増加させることが報告されている (Cancer Res. 2005;65:1325-1334)。そのため、293T 細胞に miR-765 を導入したところ (図 6) miR-765 は DPP4 タンパクを抑制し、FGF2 タンパクを上昇させる結果を得た (図 7)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Matsuno Yutaro, Yanagihara Masashi, Ueno Koji, Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Katsura Shunsaku, Oga Atsunori, Hamano Kimikazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Dry preserved multilayered fibroblast cell sheets are a new manageable tool for regenerative medicine to promote wound healing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-16345-6	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 -

1. 著者名 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsunaga Kazumasa, Tsubone Sarii, Lv Bochao, Kobayashi Sei, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Samura Makoto, Suehiro Kotaro, Harada Takasuke, Morikage Noriyasu, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 11
2. 論文標題 Perivascular Adipose Tissue Is a Major Source of Nitric Oxide in Saphenous Vein Grafts Harvested via the No Touch Technique	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Heart Association	6. 最初と最後の頁 e020637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1161/JAHA.120.020637	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 -

1. 著者名 Soichi Ike, Koji Ueno, Masashi Yanagihara, Takahiro Mizoguchi, Takasuke Harada, Kotaro Suehiro, Hiroshi Kurazumi, Ryo Suzuki, Tomoko Kondo, Tomoaki Murata, Bungo Shirasawa, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano	4. 巻 14
2. 論文標題 Cryopreserved allogenic fibroblast sheets:development of a promising treatment for refractory skin ulcers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 3879-3892
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔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 鈴木亮、上野耕司、池創一、山本直宗、松野祐太郎、藏澄宏之、桂春作、白澤文吾、濱野公一
2. 発表標題 3Dフリーザーによる細胞シート凍結の可能性
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山本直宗、上野耕司、柳原正志、齊藤寿郎、松野祐太郎、池創一、濱野公一
2. 発表標題 ラットの食道縫合モデルに対する積層線維芽細胞シートの有効性
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会
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
研究分担者	上野 耕司  (UENO Koji)  (30736070)	山口大学・医学部附属病院・助教    (15501)	

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