

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461896

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞制御による選択的・機能的エキソソーム誘導

研究課題名(英文) Induction of functional exosomes selectively derived from mesenchymal stem cells

研究代表者

田嶋 克史 (Tajima, Katsushi)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・プログラムリーダー

研究者番号：80292423

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)の被ばく細胞に対する効果と機序を解析した。被ばく細胞はMSCが放出するエキソソームにより細胞死を抑制され、被ばく量に依存して細胞内取り込みが増加した。放射線は被ばく細胞表面のCD29とCD81の複合体を形成し、エキソソームはこれらの複合体に選択的に接着し細胞内に取り込まれた。エキソソームの取り込みは、貪食(ダイナミン2)、エンドサイト-シス(インテグリン)、ピノサイト-シス(酸化ストレスのいずれにも依存しなかった。MSC産生因子“X”及びエキソソームは、消化管被ばくモデルマウスで、消化管上皮細胞の障害を軽減した。MSCの被ばく細胞に対する機序を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We investigated effects and mechanisms of mesenchymal stem cells (MSCs) against irradiated cells. Exosomes derived from MSCs inhibited cell-death of irradiated cells. Radiation increased cellular uptake of exosomes dependent on its doses, and induced CD29/CD81 complex formation on cellular surfaces. Exosomes were entered into cells through selectively binding its complex. The cellular uptake of exosomes were not dependent on phagocytosis, endocytosis, and pinocytosis. A factor “X” and exosomes from MSCs protected intestinal epithelial cell injury using radiation- exposure model animals. We demonstrated the mechanisms of MSCs on irradiated cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：間葉系幹細胞 再生医療 エキソソーム 放射線

1. 研究開始当初の背景

(1) 間葉系幹細胞 (MSC) は骨髄や皮膚、脂肪組織、歯髄から接着細胞として容易に入手でき、培養すると安定的に増やせ数十代継代しても多分可能を保持し続ける。MSC の多機能性は、損傷部位へのホーミングと分化・補充、前駆細胞の分化と増殖を制御する特殊な環境を作る niche としての役割、免疫反応を制御する調整因子細胞としての働き、そしてタンパク質、RNA、ミトコンドリアを内包するエクソソーム (EX) を周囲の障害細胞に供給する場などで発揮される。しかし、その有効性とは裏腹に、作用機序については十分に解明されていない。その理由に MSC 樹立方法、由来組織、培養条件の違いによる可能性が指摘されている。そのため MSC の作用機構を解明するためには、一定の条件下で MSC を取り扱うことが要求される。しかし無処理下 (通常培養条件) では、EX を含む MSC 外分泌因子の生物活性は一定しないことが多く、個々の研究を比較できないことが指摘されていた。

(2) そこで我々は、MSC を種々の因子を培養液に添加することで無添加の EX を対照として一定の培養条件・状態を作り、EX の不均一性と再現性、対照上清の問題を解決した。我々の検討結果から、同じ MSC でも、条件により MSC から分泌される EX は異なり、EX 機能は誘導されることが初めて示され、MSC 由来外分泌因子の不均一性と再現性、対照性の問題点を解決でき、外分泌因子から責任分子を同定する強力なツールとなることが期待できた。

2. 研究の目的

本研究では、放射線障害細胞に対して細胞死抑制効果を示す MSC 由来 EX 中の責任分子を同定し機能解析すること、臨床応用を意識した選択的な MSC 由来 EX を誘導するための条件検索を行う。責任分子同定を当初の目的とする。複数同定出来た場合は、臨床応用の観点から、詳細に検討する分子を絞り込む。研究は以下の手順で行い、照射モデル動物で、責任分子の有効性を実証、最適な放射線障害治療法策定を目指す。

(1) MSC 由来 EX 中の放射線障害細胞死機構の解明

(2) MSC 由来放射線障害軽減責任分子の同定

(3) 放射線障害モデルマウスで責任分子の機能解析

(4) MSC 二次元、三次元培養による性状変化の解析

3. 研究の方法

(1) 8 Gy (グレイ) 照射したラット腸管上

皮細胞 (IEC-6 細胞) と、ヒト由来 MSC 細胞を同一培養液中でインサートウェル (0.4 μ m) を使用して 48 時間共培養する。照射 IEC-6 をトリパンブルー色素排除法、Annexin-V/PI 二重染色 FACS 解析する。添加因子の有無で、生存率に差のある群の培養上清から EX を超遠心法により回収する。平行してサイトカインアレイで放射線細胞死抑制因子を検索する。

(2) (1) で同定した EX, 責任分子の作用機構を *in vitro* 解析する。

(3) 責任分子の効果を消化管照射モデルマウスにより実証する。

(4) プロスペクティブに採取したマウス骨髄間葉系幹細胞を 3 次元 (ナノカルチャープレート) 2 次元 (通常プレート) で培養して培養環境からの影響を件と検討する。

4. 研究成果

(1) MSC 由来 EX は被照射細胞に選択的に取り込まれる。

放射線は細胞の EX 取り込みを照射量 (8 Gy まで) 依存性が増加し、MSC 由来 EX は放射線細胞死を抑制した (図 1)。

間葉系幹細胞由来 EX は放射線照射 IEC-6 細胞死を抑制 (図 1)

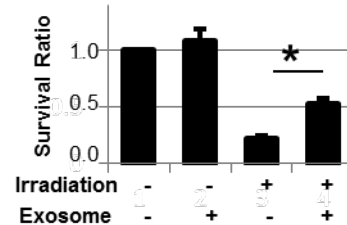


図 1

放射線は細胞表面上で CD29 と CD81 の複合体を誘導 (図 2)。

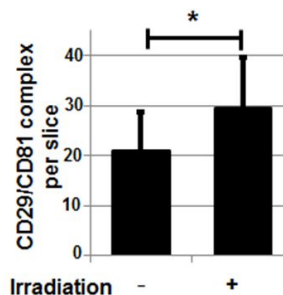


図 2

EX は選択的に細胞表面の CD29/CD81 複合体に結合した。これらの分子を siRNA でノックダウンすると EX の細胞内取り込みは低下した (図 3)。以上の結果から、放射線による細胞内 EX の取り込み増加には、CD29、CD81

分子が必要で更に複合体を形成することが重要であることが明らかになった。一方、CD9、CD63、CD151分子は関与しなかった。

CD29、CD81をノックダウンすると放射線によるEXの細胞内取り込みの増加を抑制(図3)

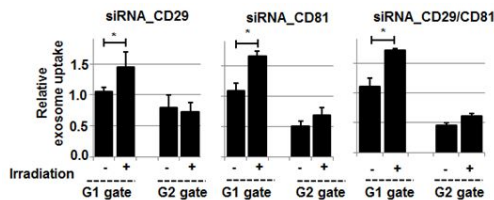


図3

E X細胞内取り込みに必要なシグナル伝達分子を調べたところ、ダイナミン、インテグリン分子、また p38MAP キナーゼの関与は否定的だった。

研究結果のまとめ

放射線は細胞表面のCD29/CD81複合体を誘導し、EXは選択的に同複合体に結合することで細胞内取り込みが増加した。これらの事実は、放射線治療時におけるMSC由来EXを臨床応用する上で基礎的な知見となった。

(2) MSC由来放射線障害軽減責任分子の同定・放射線障害モデルマウスで責任分子の機能解析(未発表データ)

MSC及びMSC産生因子「X」は照射された消化管(下半身照射モデルマウス)の絨毛長と消化管クリプト細胞の分裂能を維持し、アポトーシスを抑制した(未発表データ、投稿中)

(3) MSC二次元、三次元培養による性状変化の解析

MSCは脂肪、骨、軟骨等への分化能や血管新生能を持つことが示されてきた。これらのMSC機能は周囲の環境に強く影響されることも知られていた。MSCは生体内で極めて少数であり、invitroで雑多な細胞集団から培養回を経たMSCを純化してから機能解析する必要があった。しかし、この増殖過程は二次元で行われることが多く、培養過程でinvivoの性状が変化する懸念があった。本研究では、フローサイトメトリーを利用する

ことで、invitroの培養増殖過程を経ないで、MSCを直接採取し、更に3次元を行うこと(引用文献)で、よりinvivoに近い環境を保ちながらマウス骨髄MSCの機能を解析した。

MSCは3次元培養でも2次元培養と同等の細胞増殖能を示した。

3次元(aggregate)、2次元(monolayer)の細胞増殖(図4)

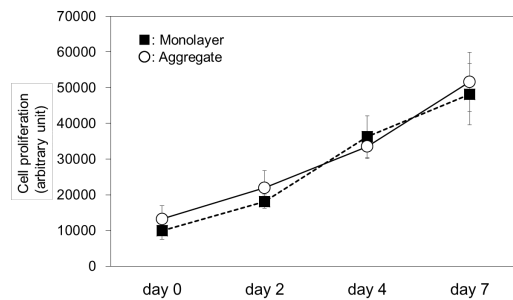


図4

3次元培養MSCは内胚葉関連遺伝子(alpha-fetoprotein: AFP)の発現が強かった。

3次元培養MSCの培養上清は2次元培養MSCの培養上清に比べ、血管新生因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF)、hepatocyte growth factor (HGF)の活性が高かった。実際にヒト臍帯血管内皮細胞を対象にゲル中で血管分岐能を比較すると、3次元MSCの培養上清はより高い分岐能を示した(図5)

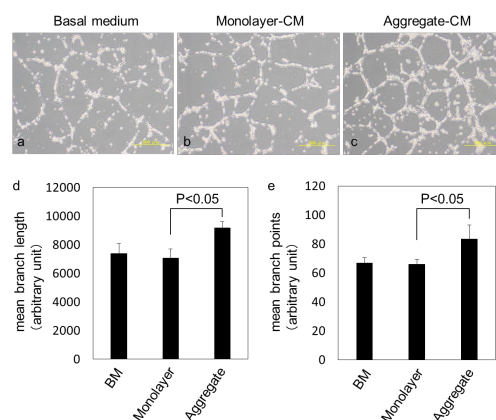


図5

3次元培養MSCと2次元培養MSCをマトリゲルに封入して、マウス皮下に埋め込み、マトリゲル中に移入してきた血管内皮細胞マーカー(CD31)で、比較すると3次元MSCはより多くの血管内皮細胞を誘導した。

3次元MSCと2次元MSCのMSC関連遺伝子の発現量の違いを調べた所、*Anpep*, *Mitf*, *Tgfb1*の遺伝子発現量が3次元培養で高く、*Bdnf*, *Ppar*, *Smurf2*が抑制されていた。*Hgf*, *Vegf*は3次元MSCで発現が亢進していた。

研究のまとめ

選択的に採取したマウス骨髄由来MSCは3次元培養(ナノカルチャープレート)で2次元培養と同等の細胞増殖を示した。3次元培養MSCは高い血管新生能を示した。本研究は内因性in vivo下の骨髄MSCの生物学的性状を理解する上で、有用なツールとなりうる。

<引用文献>

Chizuka Obara¹ & Ken-ichi Tomiyama¹ & Kazuya Takizawa¹ & Rafiqul Islam¹ & Takeshi Yasuda¹ & Takaya Gotoh¹ & Katsushi Tajima, Characteristics of three-dimensional prospectively isolated mouse bone marrow mesenchymal stem/stromal cell aggregates on nanoculture plates, DOI 10.1007/s00441-016-2405-y, Cell Tissue Res

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Masaharu Hazawa, Kenichi Tomiyama, Ai Saotome-Nakamura, Chizuka Obara, Takeshi Yasuda, Takaya Gotoh, Izumi Tanaka, Haruko Yakumaru, Hiroshi Ishihara, Katsushi Tajima, Radiation increases the cellular uptake of exosomes through CD29/CD81 complex formation, BBRC, 査読有, 446, 2014, 1165-1171

Chizuka Obara¹ & Ken-ichi Tomiyama¹ & Kazuya Takizawa¹ & Rafiqul Islam¹ & Takeshi Yasuda¹ & Takaya Gotoh¹ & Katsushi Tajima, Characteristics of three-dimensional prospectively isolated mouse bone marrow mesenchymal stem/stromal cell aggregates on nanoculture plates, DOI 10.1007/s00441-016-2405-y, 査読あり, Cell Tissue Res

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田嶋 克史 (TAJIMA Katsushi)
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・プログラムリーダー
研究者番号: 80292423

(2) 研究分担者

安田 武嗣 (YASUDA Takeshi)
国立研究開発法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・主任研究員
研究者番号: 60332269

(3) 研究分担者

後藤 孝也 (GOTOH Takaya)
大東文化大学・スポーツ健康科学部・教授
研究者番号: 80284355