

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893110

研究課題名(和文)大動脈瘤に対する間葉系幹細胞エクソソーム療法の試み

研究課題名(英文) Possibility of alternative therapeutic strategy for aortic aneurysm using mesenchymal stem cells-derived exosomes

研究代表者

伊藤 英樹 (Hideki, ITO)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50732707

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化の終末像である大動脈瘤に対する外科的治療には限界があり、新たな治療法の開発が望まれる。本研究では、間葉系幹細胞(MSC)から産生されるエクソソームを利用した新たな大動脈瘤治療法の可能性を探った。In vitroでは、MSC由来エクソソーム添加によりマクロファージ中の炎症性遺伝子発現が低下した。in vivoでは、マウス大動脈瘤モデルにMSC由来エクソソームを静脈内投与したところ、生食群に比べエクソソーム群で瘤径の縮小、瘤存在率の低下、エラスチン変性分解の抑制、MMP-2、-9活性の低下がみられた。これらの結果から、MSC由来エクソソームによる大動脈瘤治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：An aortic aneurysm (AA) develops as a result of atherosclerosis and chronic inflammation. Surgical repair of AA is effective treatment to prevent rupture. However, the surgical procedures for thoracic and thoracoabdominal AA are extremely invasive and associated with high mortality and morbidity. In this study, we examined the effect of mesenchymal stem cells (MSC)-derived exosomes for treatment of AA. In the in vitro study, the gene expression of IL-1, TNF-, MMP-2 and MMP-9 in macrophages was significantly decreased in the exosomes group compared to the untreated group. In the in vivo study, intravenous injection of MSC-derived exosomes reduced aortic diameters and existences of AA involving inhibition of elastin degradation and reduction of MMP-2 and MMP-9 activities in AA model mice. These result suggest that MSC-derived exosomes might be an effective treatment for AA.

研究分野：心臓大血管外科学

キーワード：大動脈瘤 リックス 間葉系幹細胞 エクソソーム エラスチン マトリックスメタロプロテアーゼ 細胞外マトリックス 炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化の終末像である大動脈瘤罹患者は本邦において年々増加している。大動脈瘤に対する外科治療は侵襲が大きく、新たな低侵襲治療の開発が望まれる。大動脈瘤病変部位では慢性炎症を呈する。浸潤したマクロファージなどの炎症性細胞から様々な炎症性サイトカインやケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼが産生され、血管壁強度を担うエラスチンの変性分解やエラスチン産生細胞である血管平滑筋細胞のアポトーシス、炎症性細胞の遊走浸潤を促す。これらにより細胞外マトリックス(ECM)の分解/合成バランスが崩壊し、血圧に耐えきれなくなった血管壁が拡張・瘤化する。

一方、抗炎症作用や免疫抑制能、組織修復能、集積能、多分化能を有する間葉系幹細胞(MSC)による細胞治療は、移植片対宿主病(GvHD)の臨床試験で有用性が報告されている。我々はこのMSCの持つ能力を利用した大動脈瘤治療の可能性を見だし、マウス大動脈瘤モデルを用いてMSCの静脈内投与による検討を行ったところ、抗炎症作用およびECM合成促進作用によりECM合成/分解バランスが是正され、大動脈瘤の発症進展抑制および縮小効果を示したことを明らかにした。しかしながら、細胞治療では塞栓症のリスクや形質転換などといった安全性の問題や、培養加工調整にかかる管理の確保などの障壁を抱えている。

近年、mRNAやmiRNA、タンパクを包括する細胞外微小胞「エクソソーム」を用いた治療研究が着目されており、肺癌免疫療法では第II相臨床試験が、GvHDでは第I相臨床試験が行われ、安全性と有用性が報告がされている。また、MSC由来エクソソームに関してはMSCと同様に抗炎症作用や免疫抑制能を有することから、MSC由来エクソソームによる大動脈瘤の治療効果が期待できると推察した。

2. 研究の目的

本研究では、MSCから産生されるエクソソームを利用し、細胞を用いない、新たな大動脈瘤治療の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) BM-MSC 由来エクソソームの分離と characterization: マウス大腿骨から骨髓を採取し、密度勾配法にて分離した単核球成分を培養継代し、骨髓由来間葉系幹細胞(BM-MSC)を樹立した。80%コンフルエントに達した時点で FBS free DMEM 培地に変え 48 時間静置したのち、培養上清を回収、0.22 μm フィルターで濾過した。その後、超遠心法にてエクソソームを分離した。得られたエクソソームは透過型電子顕微鏡で形態を確認した。また flow cytometry でエクソソーム特異的表面抗原マーカー(CD9, CD81)について評価した。

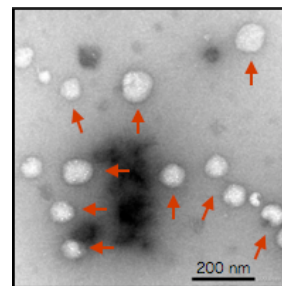
(2) エクソソームによるマクロファージ(Mφ)または血管平滑筋細胞(SMC)への影響: エクソソームによる影響を細胞レベルで確認するため、マウス Mφ (J774A.1) または SMC を用い、遺伝子発現量の変化を定量 RT-PCR にて評価した。エクソソームを PKH-26 でラベルしたのち、Mφ または SMC の培養培地に添加し、16 時間後に細胞内への取り込みを観察した。

(3) エクソソームによる大動脈瘤治療の検討: 24 週齢以上の apolipoprotein E 遺伝子欠損マウス(雄)を用い、背部皮下に埋入した浸透圧ポンプで Angiotensin II を 4 週間持続注入することによる大動脈瘤モデルを作成した。その後、0.2mL 生理食塩水(生食)または 10 μg/0.2mL エクソソームを尾静脈投与し、その 1 週間後に評価した。Angiotensin II 持続注入前、持続注入 4 週間後、生食またはエクソソーム投与 1 週間後の時点において、エコーで胸腹部大動脈の継時的観察を行うとともに、投与 1 週間後では大動脈瘤組織の肉眼所見、組織学的評価(EVG 染色)、生化学的評価(MMP ザイモグラフィ)を行った。

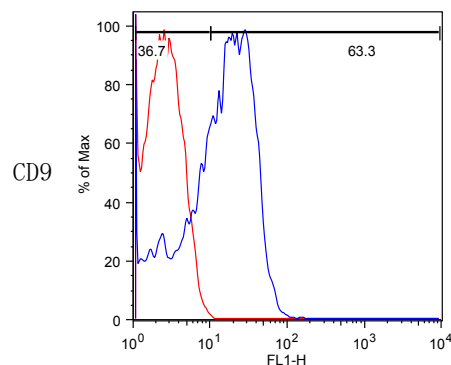
4. 研究成果

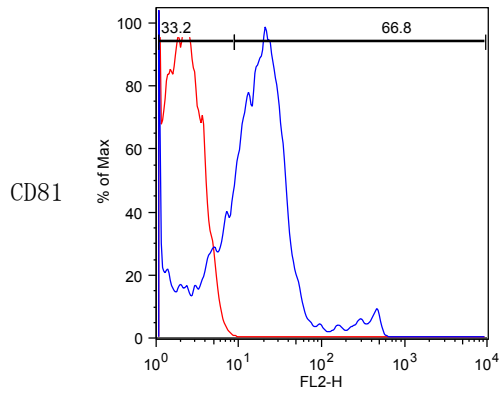
(1) BM-MSC 由来エクソソームの分離と characterization

超遠心法にて分離したエクソソームをネガティブ染色し、透過型電子顕微鏡にて観察したところ、約 100nm 前後のエクソソームの存在が確認された。



フローサイトメトリーでエクソソーム特異的表面抗原マーカーである CD9, CD81 について調べたところ、CD9, CD81 ともに陽性であることがわかった。



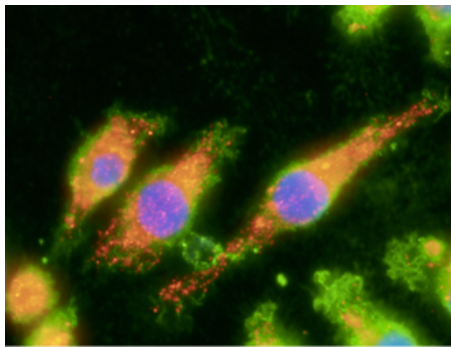


(2) マクロファージ(Mφ)または血管平滑筋細胞(SMC)におけるエクソソームによる遺伝子発現の影響

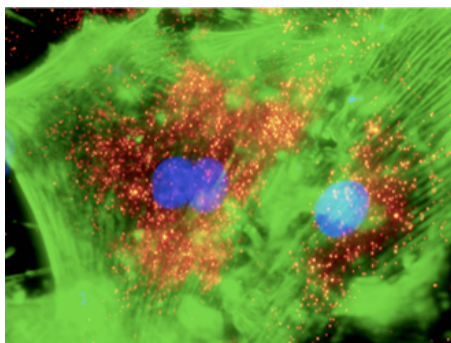
PKH-26 で蛍光標識した 10 μg/mL エクソソームを、Mφ または SMC の培養培地に添加し、16 時間後に観察したところ、細胞内取り込まれている様子が観察された。

(red:エクソソーム, green:F4/80 for Mφ, α-SMA for SMC, blue:核)

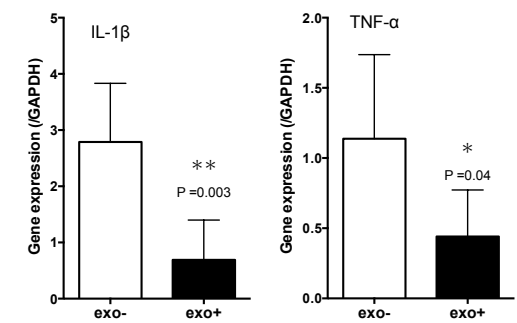
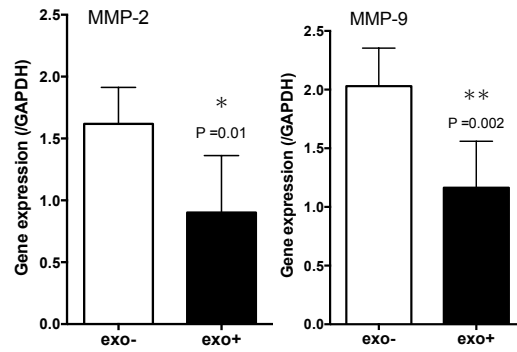
Mφ



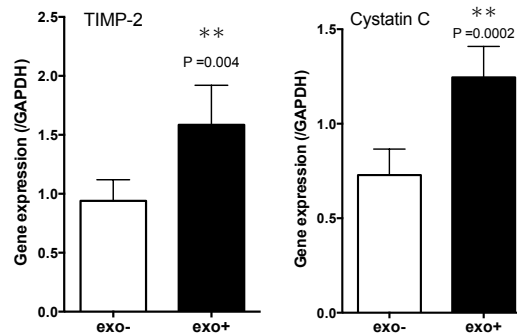
SMC



定量 RT-PCR 評価では、Mφ において無添加群 (exo-) に比べてエクソソーム添加群 (exo+) で MMP-2, MMP-9, TNF-α, IL-1β の遺伝子発現量が有意に低下した。しかし、MMP-12, NF-κB, Cathepsin K, Cathepsin L, Cathepsin S, IL-6 の遺伝子発現では、両群間に有意差は認められなかった。

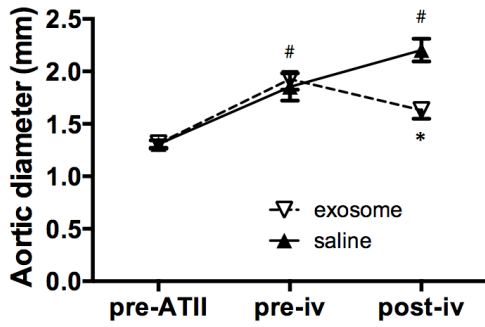


一方、SMC では無添加群 (exo-) に比べてエクソソーム添加群 (exo+) で TIMP-2 および Cystatin C の遺伝子発現量が有意に上昇した。しかし、α-SMA, elastin, TIMP-1, TGF-β 1, IGF-1 の遺伝子発現は、両群間に有意差は認められなかった。

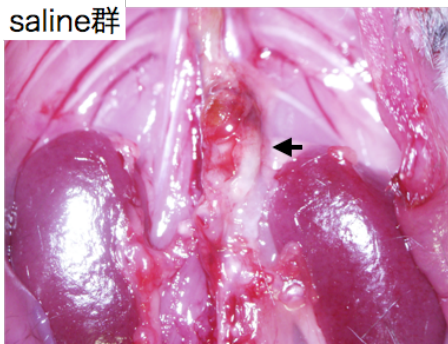


(3) エクソソームによる大動脈瘤治療の検討

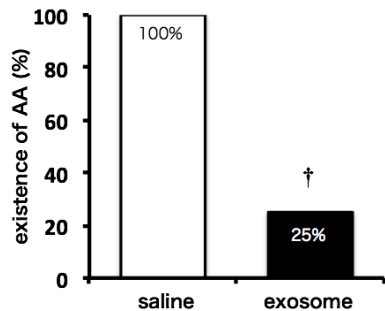
Angiotensin 持続注入前 (pre-ATII)、持続注入 4 週間後 (pre-iv)、生食またはエクソソーム投与 1 週間後 (post-iv) の時点において、エコーによる胸腹部大動脈の継時的観察を行ったところ、生食群、エクソソーム群ともに pre-ATII に比べて pre-iv で有意な径拡大が認められた。また、生食群では投与 1 週間後 (post-iv) でさらに瘤径が拡大したのに対し、エクソソーム群では有意に縮小した。



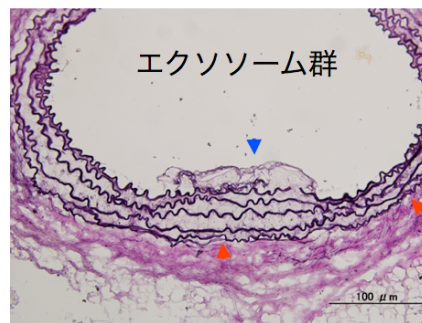
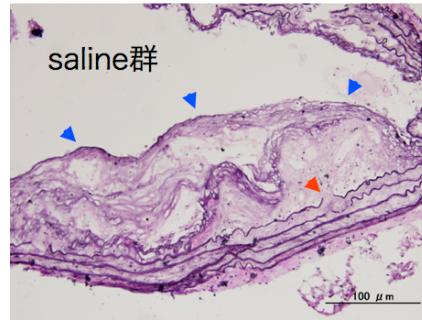
投与1週間後(post-iv)における大動脈組織の肉眼所見では、生食群において横隔膜下に大動脈の瘤形成が認められた(写真矢印)。一方、エクソソーム群では瘤径拡大が抑制されている様子が観察された。



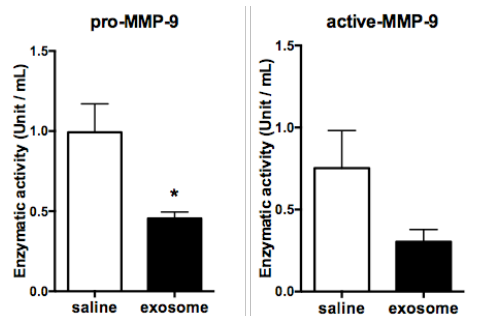
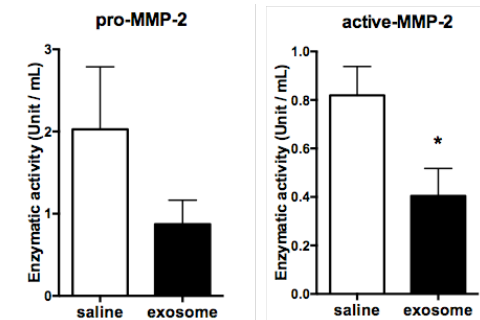
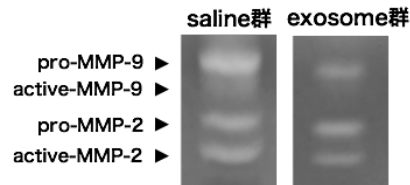
胸腹部大動脈瘤の存在率を算出したところ、生食群で100%だったのに対し、エクソソーム群では25%と有意に低下した。



組織学的評価では、生食群でエラスチン繊維(黒色、赤矢印)の変性分解およびプラーク(青矢印)が観察された。一方、エクソソーム群ではエラスチン繊維の変性分解およびプラーク形成が抑制されている様子が観察された。



MMPs ザイモグラフィーでは、生食群に比べてエクソソーム群でMMP-2およびMMP-9酵素活性が低下した。



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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 緒方藍歌、小坂井基史、伊藤英樹、成田裕司、碓氷彰彦 間葉系幹細胞エクソソームによる大動脈瘤治療の可能性 第15回日本再生医療学会総会 2016年3月17日大阪国際会議場 大阪府大阪市
- ② Motoshi Kozakai, Aika Yamawaki-Ogata, Hideki Ito, Hideki Oshima, Yuji Narita, Akihiko Usui. Possibility of alternative therapeutic strategy for aortic aneurysm using mesenchymal stem cells-derived exosomes The Society of Thoracic Surgeons 52nd Annual Meeting 2015, 2016年1月24日 Phoenix, AZ, USA
- ③ 小坂井基史、緒方藍歌、伊藤英樹、大島英揮、成田裕司、碓氷章彦 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた新たな大動脈瘤治療法の検討 第68回日本胸部外科学会定期学術集会 2015年10月17日 神戸ポートピアホテル/神戸国際展示場1号館 兵庫県神戸市
- ④ 緒方藍歌、伊藤英樹、碓氷章彦、成田裕司 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた新たな大動脈瘤治療法の可能性 第14回再生心臓血管外科治療研究会 2015年2月16日 国立京都国際会館 京都府京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 英樹 (ITO, HIDEKI)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教
研究者番号：50732707

(2) 研究分担者

なし