

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22660

研究課題名(和文)血管新生を目指した虚血組織特異的に集積するエクソソームの探索

研究課題名(英文)Development of exosomes accumulating in ischemic tissues for angiogenesis

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)：ヒト重症下肢虚血の周辺組織と非虚血組織における遺伝子発現解析から、CD72は、非虚血組織に比べて、虚血周辺組織において、発現が高い結果が得られた。マウス下肢虚血モデルにおいても、CD72は、健側組織に比べて、虚血組織において、発現が高い結果が得られた。CD72に対するリガンドであるCD5およびCD100を膜表面に持つルシフェラーゼ内包エクソソームを、マウス下肢虚血モデルに尾静脈投与すると、虚血組織周辺においてルシフェラーゼ発光が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、エクソソームの特性を活かす方法として、虚血周辺組織に発現する細胞表面抗原分子に対するリガンドを持つエクソソームを経静脈投与により、そのエクソソームが虚血周辺組織に集積するか否かを検討したものである。本研究では、動物モデルにおいて、虚血周辺組織に発現する細胞表面抗原分子に対するリガンドを持つエクソソームは、経静脈投与により、虚血周辺組織に集積する可能性があることを示した。この本研究結果は、血管新生能を持つエクソソームを筋肉注射ではなく、経静脈投与により、虚血組織の血管新生を誘導する治療法に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Expression level of CD72 mRNA was higher in tissues around ischemia collected from patients with severe lower limb ischemia compared to non-ischemic tissue. In mice model, expression level of CD72 mRNA was higher in ischemia tissues compared to healthy side tissue. Luciferase-encapsulated exosomes with CD5 or CD100 as CD72 ligands were injected into mice model by administration of the tail vein. Luciferase luminescence was detected in tissues around ischemia.

研究分野：心臓血管外科、再生医療

キーワード：エクソソーム 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症下肢虚血治療の第一選択は、ステントを使用した血管内治療やバイパス手術であるが、症例によっては、それらの血行再建手術を実施できない患者も存在する。重症下肢虚血患者においては、虚血部位の血流を改善させない限り肢切断は免れない。そのため、末梢組織の虚血部位の血管新生を促す方法として、細胞移植治療が実施されてきた。

エクソソームとは、細胞から分泌される脂質二重膜の膜小胞であり、直径は約 20 ~ 100 nm である。エクソソームは、エクソソームを分泌する細胞由来のタンパクや核酸が内包されており、エクソソームは、エクソソームを分泌する細胞の形質を受け継いでいると考えられている。そのため、血管新生を誘導する目的で移植される細胞から分泌されるエクソソームは、血管新生能を有していると考えられる。これまでに、動物モデルにおいて、筋肉注射された幹細胞由来エクソソームは、血管新生を誘導することが報告されている。

我々は、エクソソームの特性を活かす方法として、虚血組織または虚血周辺組織で発現される細胞表面抗原分子に対するリガンドをエクソソームに持たせることで、経静脈投与されたエクソソームが、虚血組織または虚血周辺組織に集積し、血管新生を誘導させることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、経静脈投与で虚血組織に特異的に集積するエクソソームを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 重症下肢虚血患者由来虚血組織および非虚血組織からの RNA 抽出

重症下肢虚血組織、虚血組織周辺および非虚血組織(切断した箇所近傍)が採取され、その組織は RNeasy Lysis Buffer (キアゲン社)に浸けられ、-80℃で凍結保存された。その組織から RNeasy Mini Kit (キアゲン社)を用いて組織から total RNA が抽出された。

(2) PCR array 解析による重症下肢虚血組織に特異的に発現している細胞表面抗原の同定

4名の患者由来の重症下肢虚血組織、虚血組織周辺および非虚血組織から抽出された mRNA の発現レベルを PCR array (キアゲン社) Angiogenesis (# PAHS-024Z)、Cell Surface Markers (# PAHS-055Z)、Chemokines & Receptors (# PAHS-022Z) で解析し、重症下肢虚血組織および虚血組織周辺組織に特異的に発現している細胞表面抗原分子および発現レベルが高い細胞表面抗原分子を同定した。

(3) マウス下肢虚血モデルの大腿部組織における遺伝子発現解析

Balb/c マウスの左大腿動脈を結紮し、マウス下肢虚血モデルが作製された。左大腿動脈を結紮して、1日後、4日後、7日後に犠牲死後に、左右の大腿部組織が摘出され、RNeasy Lysis Buffer (キアゲン社)に浸けられて保存された。その組織から RNeasy Mini Kit を用いて組織から total RNA が抽出され、qPCR 解析が実施された。

(4) 虚血組織特異的に発現する細胞表面抗原分子に対するリガンドを有するルシフェラーゼ内包エクソソーム作製

ルシフェラーゼを内包させたエクソソームを作製するために、XPack MSCV-XP-Luciferase-EF1-Puro Expression Lentivector (SBI社、# XPAK732PA-1)と pPACKH1 Packaging Plasmid Mix (SBI社、# LV500A-1)を 293T 細胞に導入し、ウイルス液が作製された。そのウイルス液を、歯髄幹細胞に与えて培養することで、ルシフェラーゼ内包エクソソームを分泌する歯髄幹細胞が作製された。

虚血組織周辺組織で高レベルに発現している細胞表面抗原分子に対するリガンドの遺伝子を、エクソソーム膜を標的とするペプチド配列である "XStamp" を有する XStamp cloning and expression lentivector MSCV-Leader-MCS-C1C2-EF1-Puro (SBI社、# XSTP710PA-1)に挿入したベクターと pPACKH1 Packaging Plasmid Mix を 293T 細胞に導入し、ウイルス液が作製された。そのウイルス液を、ルシフェラーゼ内包エクソソームを分泌する歯髄幹細胞に与えて培養することで、この歯髄幹細胞から分泌されるエクソソームは、ルシフェラーゼを内包し、虚血組織特異的に発現する細胞表面抗原分子に対するリガンドを有した。

(5) 重症下肢虚血モデルを用いた虚血組織におけるエクソソームの集積解析

上記(4)で作製した虚血組織特異的に発現する細胞表面抗原分子に対するリガンドを有するルシフェラーゼ内包エクソソームを、左大腿動脈を結紮して6日後の Balb/c マウス下肢虚血モデル

ルに尾静脈投与して24時間後に、D-Luciferinが腹腔内投与され、ルシフェラーゼ発光がIVIS imaging system (パーキンエルマー社)で検出された。

4. 研究成果

PCRアレイの結果をキアゲン社の専用サイトで解析した結果が、図1である。CD72は、非虚血組織に比べて、虚血周辺組織において発現が高くなっている結果が得られた。

Balb/cマウス下肢虚血モデルにおいて、健側組織である右大腿部組織および虚血組織である左大腿部組織でのCD72の発現をqPCRで解析すると、CD72は、健側組織に比べて、虚血組織において発現が高くなっている結果が得られた(図2)。

ルシフェラーゼが内包されたCD72のリガンドであるCD5およびCD100を膜表面に持つエクソソームを、Balb/cマウス下肢虚血モデルに尾静脈投与して24時間後にルシフェラーゼ発光を解析すると、左大腿動脈を結紮した周辺組織にルシフェラーゼの発光が確認された。

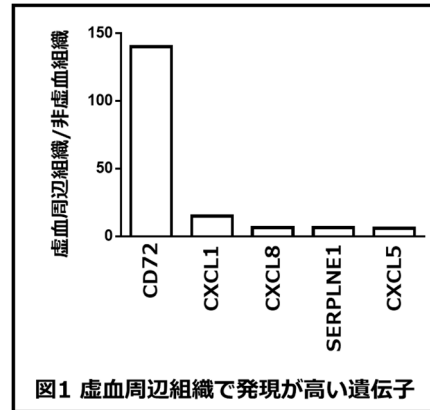


図1 虚血周辺組織で発現が高い遺伝子

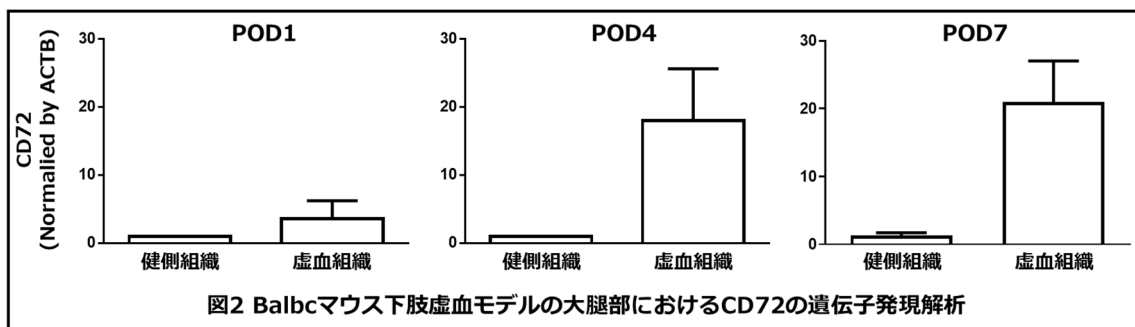
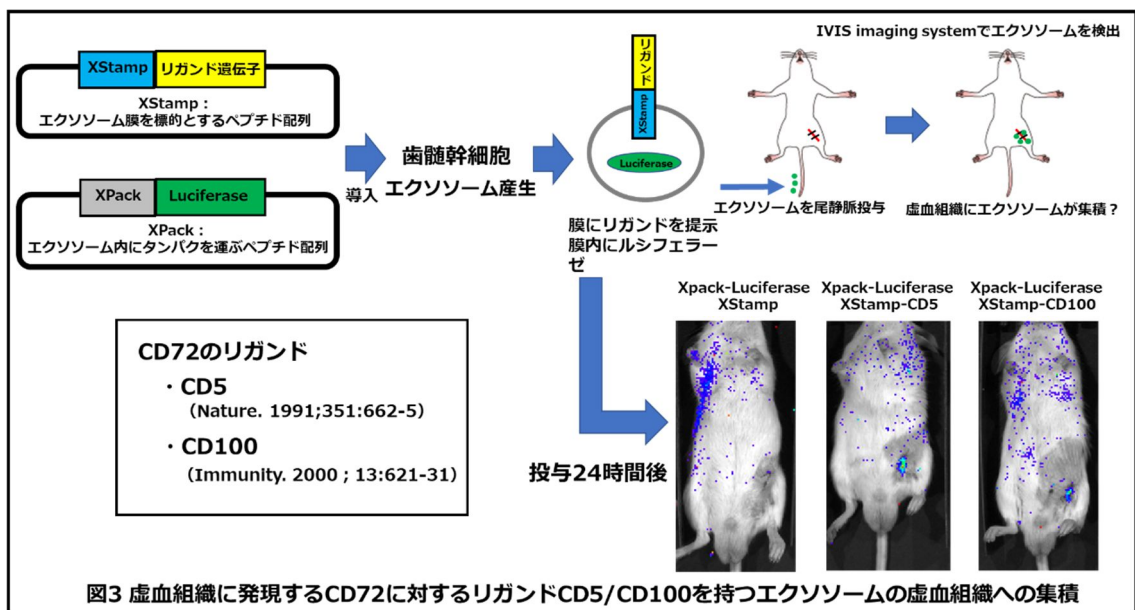


図2 Balbcマウス下肢虚血モデルの大腿部におけるCD72の遺伝子発現解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原田剛佑、森景則保、上野耕司、大塚 遼、溝口高弘、永瀬 隆、佐村 誠、末廣晃太郎、濱野公一
2. 発表標題 虚血組織に特異的に発現する細胞表面抗原の同定とエクソソームを用いたcell-free再生療法の開発
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 虚血組織に集積するエクソソームおよびその製造法	発明者 濱野公一、上野耕司	権利者 山口大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-78972	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------