

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08685

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた全身性強皮症の皮膚硬化治療

研究課題名(英文) Treatment for skin sclerosis in systemic sclerosis by MSCs-derived exosome

研究代表者

横山 洋子 (YOKOYAMA, Yoko)

群馬大学・医学部・技術専門職員

研究者番号：00241901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系幹細胞(MSC)から分泌されるエクソソームが全身性強皮症の皮膚線維化への抑制作用を示し、その膜に存在するmilk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8)がその作用機序にかかわっているのではないかと考え、検討を行なった。我々は、強皮症モデルマウスおよび培養線維芽細胞を用いた実験から、MSC由来エクソソームの皮膚線維化に対する抑制作用を明らかにした。一方、MFG-E8の線維化抑制への関与はみられなかった。本研究により強皮症の皮膚硬化に対するMSC由来エクソソームの治療応用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身性強皮症は皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常、免疫異常を特徴とする原因不明の自己免疫性疾患である。これまでに強皮症モデルマウス皮膚に対する間葉系幹細胞(MSC)の線維化抑制作用は多数報告されているが、幹細胞であるため生体内への注入などで治療に応用することは難しい。一方、エクソソームは細胞から分泌される膜小胞であり、今回、皮膚線維化への抑制作用が明らかになったことから、臨床への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the possibility that exosomes secreted from mesenchymal stem cells (MSCs) have an inhibitory effect on skin fibrosis in systemic scleroderma and that milk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8), which exists on the membrane of MSCs, is involved in the mechanism of this effect. Experiments using mouse models of scleroderma and cultured fibroblasts showed that MSC-derived exosomes have an inhibitory effect on skin fibrosis. On the other hand, the present study did not clarify the involvement of MFG-E8 in the inhibition of fibrosis. This study suggests therapeutic application of MSC-derived exosomes for scleroderma skin sclerosis.

研究分野：皮膚科学

キーワード：全身性強皮症 皮膚線維化 間葉系幹細胞 エクソソーム MFG-E8

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症は、皮膚および内臓臓器の線維化、血管異常、免疫異常を特徴とする原因不明の自己免疫性疾患である。近年、間葉系幹細胞 (MSC) の投与が強皮症モデルマウスの皮膚線維化を抑制させることが多く報告されているが、その機序は明らかになっていない。これまでに我々は、分泌蛋白質 milk fat globule-EGF-factor 8 (MFG-E8) が TGF- β の活性化を抑制することで強皮症モデルマウスの皮膚線維化を改善させることを明らかにしており、さらに MSC から分泌されるエクソソームの膜に MFG-E8 が多く含まれることも見出した。エクソソームは細胞から分泌される脂質 2 重膜を持つ小胞で、様々な核酸物質や蛋白質を含み細胞間シグナル伝達物質として働くことから、我々は、MSC 投与による線維化抑制機序の一つとして、MSC から分泌されるエクソソームが重要な役割を担っているのではないかと考えた。また、その膜に多く存在する MFG-E8 が皮膚線維化の抑制機序の一部に関わっているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は以下の 2 つを主な目的とした。

(1) MSC 由来エクソソームは強皮症モデルマウスの皮膚線維化の抑制および TGF- β 刺激した培養線維芽細胞の細胞外基質産生を抑制するのかを明らかにする。

(2) MSC 由来エクソソームが強皮症モデルマウスの皮膚線維化を抑制した場合、エクソソームに含まれている特定の核酸物質の関与はあるのか、また、エクソソームの膜に多く存在する MFG-E8 は皮膚線維化の抑制機序に関与しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MSC 由来エクソソームは強皮症モデルマウスの皮膚線維化の抑制および TGF- β 刺激した培養線維芽細胞の細胞外基質産生を抑制するのかを明らかにする。

C57BL/6N マウスの背部皮下にプレオマイシンを 2 週間 (合計 10 回) 局注し、皮膚線維化を誘導した。MSC 由来エクソソームは PBS に懸濁し、マウス皮下に連続 5 日間投与した。注射部位の皮膚を採取し、HE 染色、マッソントリクローム染色およびコラーゲン量の定量を行い、皮膚線維化に対するエクソソームの影響を検討した。また、免疫染色により線維化への影響および炎症細胞浸潤についても検討を行なった。

MSC 由来エクソソームは、WT マウスから得た MSC をエクソソーム除去 FBS を加えた培地で培養し、培養上清から超遠心法にて回収した。回収したエクソソームを PBS で再懸濁し、ウエスタンブロットを行い、エクソソームに発現するタンパク質と MFG-E8 の発現を確認した。また、エクソソームナノサイト解析により粒子径を確認した。

(2) MSC 由来エクソソームが強皮症モデルマウスの皮膚線維化を抑制した場合、エクソソームに含まれている特定の核酸物質の関与はあるのか、また、エクソソームの膜に多く存在する MFG-E8 は皮膚線維化の抑制機序に関与しているのかを明らかにする。

MSC 由来のエクソソームと NIH/3T3 細胞の培養上清から回収したエクソソーム (対照) について miRNA マイクロアレイ解析を行い、内包されている microRNA (miRNA) の発現量を比較した。NIH/3T3 由来エクソソームに比べて発現量の多かった miRNA のうち、その標的遺伝子として線維化関連遺伝子が予測されるものをターゲット予測プログラム (TargetScan, miWalk, miRDB) を使用してピックアップした。その miRNA について、標的遺伝子への作用を調べるため、NIH/3T3 細胞への添加実験を行い、ウエスタンブロットにて検討した。

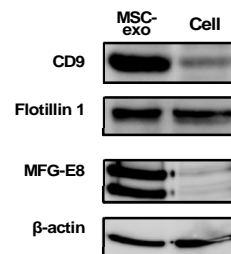
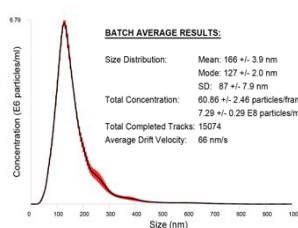
また、エクソソーム膜に存在する MFG-E8 の線維化抑制機序への関与を調べるために、MFG-E8 ノックアウトマウスから得た MSC をエクソソーム除去 FBS を加えた培地で培養し、培養上清から超遠心法にてエクソソームを回収した。回収したエクソソームを PBS で再懸濁し、MFG-E8 の発現がないこととエクソソームナノサイト解析による粒子径の確認を行なった後、NIH/3T3 細胞に添加し、線維化に関与する因子の発現を WT マウス MSC 由来エクソソームと比較した。MFG-E8 は latent TGF- β の活性化を抑制することから、細胞への刺激は latent TGF- β で行った。

4. 研究成果

(1) MSC 由来エクソソームは強皮症モデルマウスの皮膚線維化の抑制および TGF- β 刺激した培養線維芽細胞の細胞外基質産生を抑制するのかを明らかにする。

まず、WT マウス MSC の培養上清から回収した細胞外小胞がエクソソームであることを確認するため、ナノサイト解析により粒子径を確認したところ $166 \pm 3.9 \text{ nm}$ であった。(右図)

また、細胞外小胞のウエスタンブロットを行い、エクソソームのマーカ蛋白質である CD9、flotillin 1 および MFG-E8 の発現を確認した。(右図)

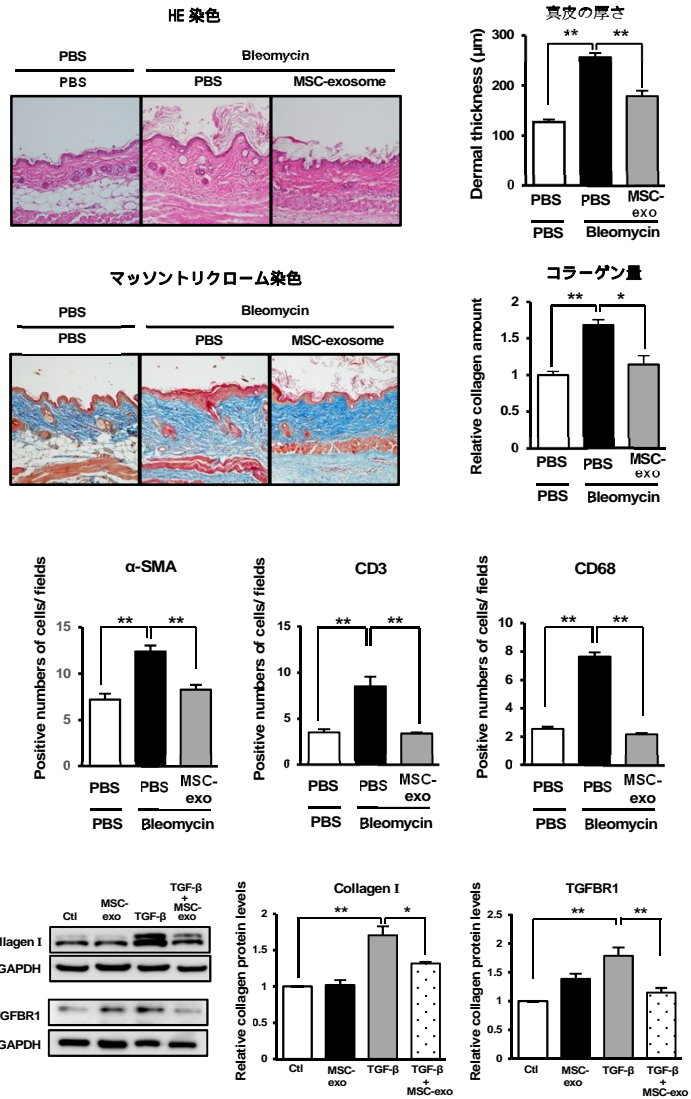


次に MSC 由来エクソソームが強皮症モデルマウスの皮膚線維化に及ぼす影響を見るため、皮膚の HE 染色および真皮の厚さの計測を行ったところ、MSC 由来エクソソームを投与することで、プレオマイシンによって誘導されたマウスの皮膚の肥厚が抑制されることがわかった。(右図)

また、マッソントリクローム染色および皮膚コラーゲン量の定量から、MSC 由来エクソソームの投与で、プレオマイシンによるマウス皮膚のコラーゲン量の増加が抑制されることがわかった。(右図)

さらにマウス皮膚組織の免疫染色を行い線維化および炎症への影響を検討したところ、プレオマイシン投与によって増加した SMA 陽性筋線維芽細胞数は MSC 由来エクソソームの投与によって減少した。皮膚組織の炎症細胞の数は、プレオマイシン投与によって増加した CD3 陽性 T 細胞数と CD69 陽性マクロファージ数が MSC 由来エクソソームの投与によって減少した。(右図)

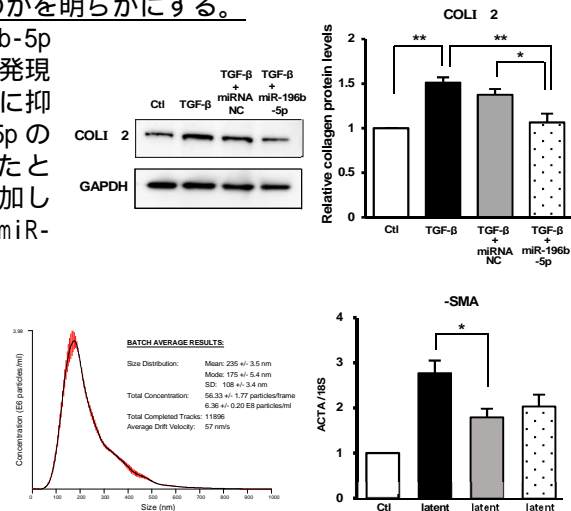
培養細胞を用いた in vitro の検討では、NIH/3T3 細胞を TGF- β で刺激して増加したタイプ I コラーゲンおよび TGF- レセプター 1 のタンパク発現は MSC 由来エクソソームの添加により減少した。(右図)



(2) MSC 由来エクソソームが強皮症モデルマウスの皮膚線維化を抑制した場合、エクソソームに含まれている特定の核酸物質の関与はあるのか、また、エクソソームの膜に多く存在する MFG-E8 は皮膚線維化の抑制機序に関与しているのかを明らかにする。

miRNA マイクロアレイ解析の結果、miR-196b-5p が NIH/3T3 由来エクソソームに比較して最も発現量が多く (Log2FC=10.12) かつ COL1A2 遺伝子に抑制的に働くと予測された。そこで miR-196b-5p の線維化に対する影響について検討を行ったところ、NIH/3T3 細胞への TGF- β 刺激により増加したタイプ I コラーゲン 2 のタンパク発現は miR-196b-5p の添加により減少した。(右図)

一方、MFG-E8 ノックアウトマウス MSC 由来エクソソームを latent TGF- β で刺激した NIH/3T3 培養細胞に添加し、線維化に関する因子の発現を WT マウス MSC 由来エクソソームの添加による発現と比較したが、明らかな違いは見られなかった。(右図)



今回の検討では、MFG-E8 の線維化抑制機序への関与はみられなかったが、MSC 由来エクソソームの皮膚線維化に対する抑制作用が明らかになった。

MSC は幹細胞であるため生体内への注入などで治療に応用することは難しいが、エクソソームは細胞から分泌される膜小胞なので治療への応用が期待でき、本研究により MSC 由来エクソソームの強皮症皮膚硬化に対する治療応用が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Baral Hritu, Uchiyama Akihiko, Yokoyama Yoko, Sekiguchi Akiko, Yamazaki Sahori, Amalia Syahla Nisaa, Inoue Yuta, Ogino Sachiko, Torii Ryoko, Hosoi Mari, Matsuzaki Toshiyuki, Motegi Sei-ichiro	4. 巻 104
2. 論文標題 Antifibrotic effects and mechanisms of mesenchymal stem cell-derived exosomes in a systemic sclerosis mouse model: Possible contribution of miR-196b-5p	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 39 ~ 47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2021.08.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hritu Baral, Akihiko Uchiyama, Yoko Yokoyama, Akiko Sekiguchi, Sahori Yamazaki, Syahla Nisaa Amalia, Yuta Inoue, Sachiko Ogino, Ryoko Torii, Mari Hosoi, Toshiyuki Matsuzaki, Sei-ichiro Motegi
2. 発表標題 Antifibrotic effects and mechanisms of miR-196b-5p of mesenchymal stem cell-derived exosomes in a systemic sclerosis mouse model
3. 学会等名 The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2021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	茂木 精一郎 (MOTEGI Sei-ichiro) (20420185)	群馬大学・大学院医学系研究科・教授 (12301)	

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