

令和元年5月27日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15652

研究課題名(和文) iPS細胞由来エクソソームの皮膚創傷治癒に与える影響に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Effect of exosome derived from iPS cells on wound healing

研究代表者

神戸 未来 (Kambe, Miki)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50597862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトiPS細胞の培養上清からエクソソームを分離・回収(iPS-Exo)した。スクラッチアッセイを行ったところ、iPS-Exo群は培地エクソソーム(M-Exo)群と比較し皮膚線維芽細胞の遊走能を有意に亢進したが、増殖能では増殖傾向を示すものの、有意差を認めなかった。糖尿病性潰瘍モデルを用い、iPS-Exo、M-Exo、PBSをそれぞれ創傷内に局所投与した。術後7及び10日後、iPS-Exo群では他の2群と比較し、創面積が優位に小さかった。また、術後7日後のiPS-Exo群の血管密度も、他の2群と比較し、統計学的に優位に高い値を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞は胚組織を使用しない万能細胞として注目を集めているものの、奇形種形成の懸念があり、広く臨床応用するには懸念が残っている。近年、幹細胞培養上清の有用性がさまざまな疾患モデルで報告され、その治癒メカニズムの一因として、RNAやタンパク質を輸送する微小胞「エクソソーム」の関与が指摘されている。本研究の結果、iPS細胞由来エクソソームが糖尿病性潰瘍の治癒を促進する事が示された。これにより、罹患数の多い糖尿病性潰瘍に対する新たな治療法開発の可能性が示唆され、社会的にも意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the potency of promoting diabetic wound healing by the application of human exosomes derived from human induced pluripotent stem cells. Exosomes derived from iPSCs culture medium (M-Exo) and hiPSCs conditioned medium (hiPS-Exo) were isolated. We evaluated the in vitro effects of hiPSC-Exo on diabetic mouse dermal fibroblasts. PBS, M-Exo, and iPS-Exo were respectively injected subcutaneously around skin defect in a diabetic mouse model, and their effects on wound healing were assessed. hiPS-Exos stimulated the migration of diabetic mouse dermal fibroblasts in vitro, but does not stimulated its proliferation. Injected hiPS-Exo to wound sites resulted in accelerated wound closure. Our findings suggest that hiPS-Exo enhances diabetic skin wound healing by accelerating fibroblast migration. hiPS-Exo might become a therapeutic option for diabetic ulcer.

研究分野：創傷治癒

キーワード：iPSエクソソーム 創傷治癒

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分化万能性は、ES細胞など一部の細胞のみに認められる能力であったが、胚盤胞を使用するという倫理的問題が懸念であった。山中らは体細胞に Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Myc の4遺伝子を導入し、多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell (iPS細胞))へとリプログラミングすることに成功した(*Cell* 126: 663-676, 2006)。同細胞は、理論上体をすべての組織に分化誘導可能であり、再生医療の実現に向けて世界中の注目が集まっており、本法でも iPS細胞を利用した加齢性黄斑変性症に対する臨床研究がスタートした。しかし、人体に移植・応用するには癌化・奇形形成など大きな課題が残っている。

近年、細胞治療による肺梗塞、腫瘍化などの懸念のため、細胞を用いない培養上清投与の有効性に関する報告が散見されるようになってきた (Hu G et al. *Int J Biol Sci.* 7:364-75, 2011.)。その機序として、細胞膜から exocytosis される 50-200nm の微小胞「エクソソーム」に含有される miRNA やタンパク質の関与が注目されている。iPS細胞エクソソーム(iPS-Exo)も遺伝情報やタンパク質を豊富に含有する可能性があり、疾患治療に役立つのではないかという仮説を立てたものの、これに関する報告はない。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、iPS-Exo の特性解析を行い、これを用いた皮膚創傷治療促進の可能性を検討することである。iPS-Exo の特性解析、*in vitro* での線維芽細胞への影響を検討する。また皮膚欠損モデルにおいて、iPS-Exo の影響を確認し、そのメカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト iPS-Exo の分離

細胞は、ヒト iPS 細胞株(201B7)を用いた。DMEM-F12 に非必須アミノ酸、L-グルタミン 200mM、KnockOut Serum Replacement(KSR)、0.1mM メルカプトエタノール添加した培地で培養した。80%コンフルエントで継代し、継代前 3 日分の培養上清を回収し、実験に使用した。エクソソームはMagCapture (Wako, Osaka, Japan)を使用して回収し、-80°Cで保存した。

(2) エクソソームの同定

透過型電子顕微鏡 JEM-1400(Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)を使用し、エクソソームの形態学的観察を行った。2 μ l のエクソソーム液をフォルムバル薄膜上で 1 分間インキュベートし、2%ウラニル酢酸を 10 秒反応させたのち、観察した。

培養上清 80mL 中のエクソソームをフローサイトメトリーに使用した。培地中から得られたエクソソーム(M-Exo)を対照とした。iPS-Exo を 10 μ l aldehyde/sulfate latex 4 μ m-beads (invitrogen) とともに室温で 15 分間静置後、PBS を加えて 400 μ l とし、4°C下でローテーターにかけてオーバーナイトとした。ブロッキングのために、40 μ L の 1M グリシンを加え 30 分間室温で静置した。600 μ l の PBS を添加し、室温下 4,000rpm で 3 分間遠心分離した。上清を除去し、1ml PBS/0.5% BSA で再懸濁し、室温下 4,000rpm で 3 分間遠心分離した。2 回洗浄後、100 μ l の PBS/0.5% BSA で懸濁し、10 μ l のビーズに 20 μ l の抗 exosomal protein 抗体を加え、4°Cで 1 時間インキュベートした。エクソソームの結合したビーズは、抗 CD63、CD81 抗体 (PE-conjugated) または isotype control 抗体と、抗 CD9、HLA-ABC、HLA-DR 抗体 (FITC-conjugated)、または isotype control 抗体 (BD Biosciences Pharmingen) と 4°Cで 30 分攪拌した。PBS/ 0.5% BSA で洗浄し、サンプルは 500 μ l の PBS/0.5% BSA で懸濁し、FACSCalibur (Becton Dickinson and Company) を使用して、FlowJo software(TreeStar Inc.)にて解析した。

(3) 線維芽細胞に与える影響

線維芽細胞の単離

名古屋大学医学部動物実験委員会 2 より承認されたプロトコールに従って行った。10 週齢雄の糖尿病マウス(C57BLKSJ-Leprod (db/db) (Japan SLC, Hamamatsu, Japan)皮膚を採取、Whole Skin Dissociation Kit (Miltenyi Biotec)を使用して線維芽細胞を単離した。10%FBS と 1 μ g/ml penicillin and 1 μ g/ml streptomycin を添加した DMEMにて、5% CO₂、37°Cで培養した。32 日ごとに培地交換を行い、80%コンフルエントで継代を行った。

スクラッチアッセイ

エクソソーム添加した細胞を IncuCyte ZOOM-HD-2CLR (Essen Bioscience, Welwyn Garden City, Hertfordshire, UK)で観察した。線維芽細胞を 96 穴プレートに 1 x 10⁵ 個/well の密度で播種し、コンフルエントまで培養した。96 穴プレート用の PTFE pin tips (Essen Bioscience) で均一なスクラッチを作成した。培地を除去し、PBSで2回洗浄後、iPS-Exo 添加群と M-Exo 添加群に分けた。プレートを IncuCyte ZOOM-HD-2CLR に挿入し、5% CO₂、37°Cで培養した。12時間後、0, 10, 50, 100, or 200 μ g/ml のエクソソームを各ウェルに添加し、1時間ごとに画層撮影して、IncuCyte software (Essen Bioscience)にて解析を行った。スクラッチ部とそうではない部分の細胞密度の比(RWD)で細胞遊走能を評価した。

細胞増殖能

iPS-Exo の細胞増殖能に与える影響を解析するため、線維芽細胞を 96 穴プレートに 4×10^5 個/well の密度で播種し、12 時間後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のエクソソームを各ウェルに添加し、1 時間ごとに画層撮影して、IncuCyte software (Essen Bioscience)にて解析を行った。

(4) 糖尿病性潰瘍モデルでの解析

マウス糖尿病モデルの作成

9 週齢の雄糖尿病マウス (C57BLKSJ-Leprodb (db/db)、体重 41.0~45.5 g) を使用した。全身麻酔後剃毛し、背部の両側にそれぞれ 8mm パンチにて皮膚全層欠損を作成する。ドーナツ型のシリコンプリントを創部周囲に置き、5-0 ナイロン糸にて縫合固定した (図1左)。マウスはランダムに PBS 群、M-Exo 群、iPS-Exo 群の 3 群にわけた。エクソソーム (4 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ PBS) は創周囲 4 カ所と中央に注入した (図1右)。創部はフィルムドレッシングで被覆した。

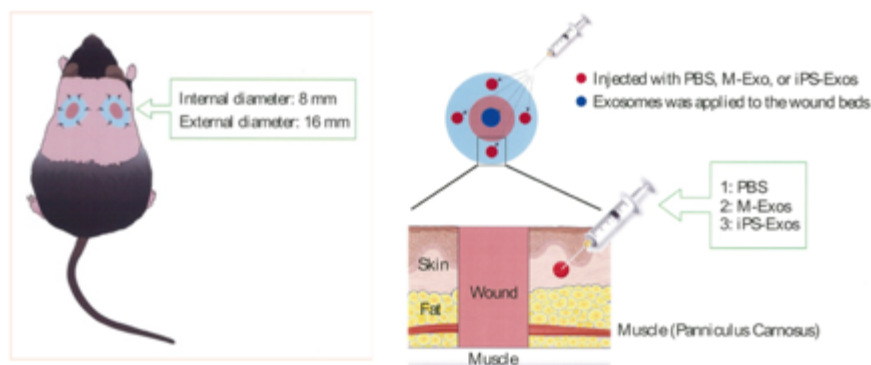


図1 左) 動物モデル. 8mm の全層皮膚欠損を糖尿病マウス背部皮膚両側に作成. 16mm のシリコンプリントを創部の周囲に置き、5-0 ナイロンで固定. 右) エクソソームの局所投. iPS-Exo、M-Exo、PBS をそれぞれ創周囲の 4 カ所と創中央へ注入。

創面積の解析

注入後 0、1、3、5、7、10、14、18、21、and 28 日で創部の写真撮影を行い、創面積を NIH Image software Ver.1.47 (NIH, MD, USA) を使用して解析した。創閉鎖率 (%) = その時点での創面積 / 最初の創面積 $\times 100$ (%) と規定した。

組織学的解析

皮膚サンプルは 4% パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィン包埋し、厚さ 4 μm で切片作成した。

iPS-Exo が血管新生を誘導するかを確認するため、CD31 と αSMA の発現を免疫組織科学的に評価した。10% ロバ血清で 30 分室温でブロックングを行い、ラット抗マウス CD31 抗体 (1:50; Dianova, Hamburg, Germany) とウサギ抗 αSMA 抗体 (1:500; Abcam, Cambridge, UK) を 4 $^{\circ}\text{C}$ 、オーバーナイトで静置した。二次抗体として Alexa-Fluor 594 結合ロバ抗ラット抗体 (1:250; Thermo Fisher Scientific, Yokohama, Japan) と Alexa-Fluor 488 結合ウサギ抗体 (1:250; Thermo Fisher Scientific) を使用し、核染色として DAPI を使用した。BIOREVO VS120 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) にて写真撮影を行った。新生血管は CD31 が発現しているが、成熟した血管は CD31 と αSMA の両方が発現している。標本よりランダムに選んだ 3 カ所で血管数を計測した。

統計解析

得られたデータは GraphPad Prism software, version 5.0 (GraphPad Software, CA, USA) を使用して one-way ANOVA) で解析した。p < 0.05 で有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 透過電子顕微鏡

M-Exo では微小胞を認めなかったが、iPS-Exo では直径 $120 \pm 24.49\text{nm}$ の二重膜の微小胞を確認した (図 2)。

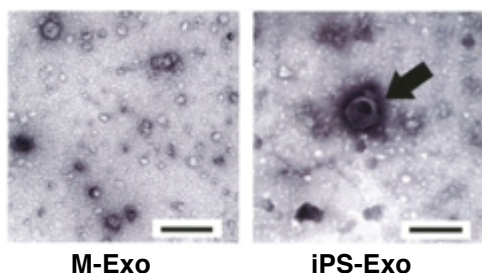


図2 透過電子顕微鏡像 左) M-Exo, 右) iPS-Exo. 黒矢印が二重膜構造を持ったエクソソーム (Scale bars, 200 nm)

(2) フローサイトメトリー

単離されたエクソソームの表面抗原の発現をフローサイトメトリーで確認した。iPS-Exo ではエクソソームのマーカーである CD9, 63, 81 が発現していた。また HLA-ABC、DR は発現していなかった。対照の M-Exo ではいずれも発現していなかった。(図 3)

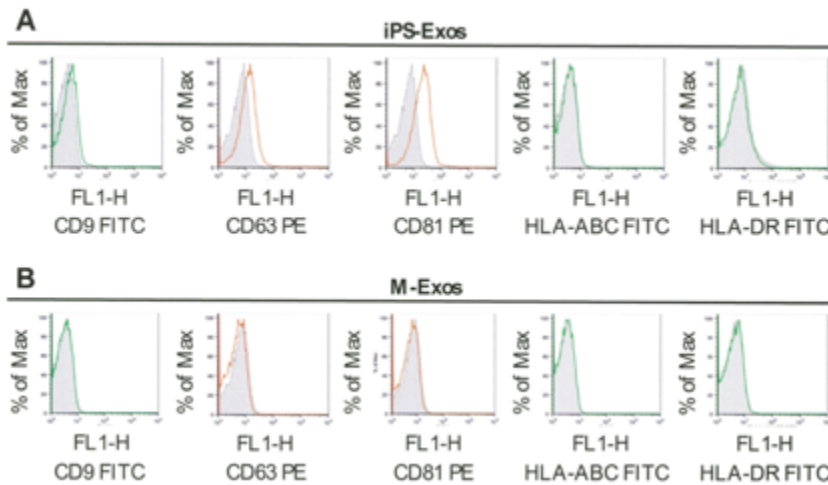


図 3 エクソソームの表面抗原の発現 (A) iPS-Exo と (B) M-Exo

(3) スクラッチアッセイ

iPS-Exo の糖尿病性マウス皮膚線維芽細胞の遊走能に与える影響を解析するため、スクラッチアッセイを行った。添加する iPS-Exo を 0, 50, 100, 200 μ g/mL で比較し、100 μ g/mL が最も遊走能が高かったため、以後この濃度で実験を行った。iPS-Exo 群は M-Exo 群と比較し、スクラッチ部へ侵入した細胞数は 12, 24 時間後でそれぞれ 1.06, 1.10 倍であったが、統計学的有意差を認めなかった(図 4)。

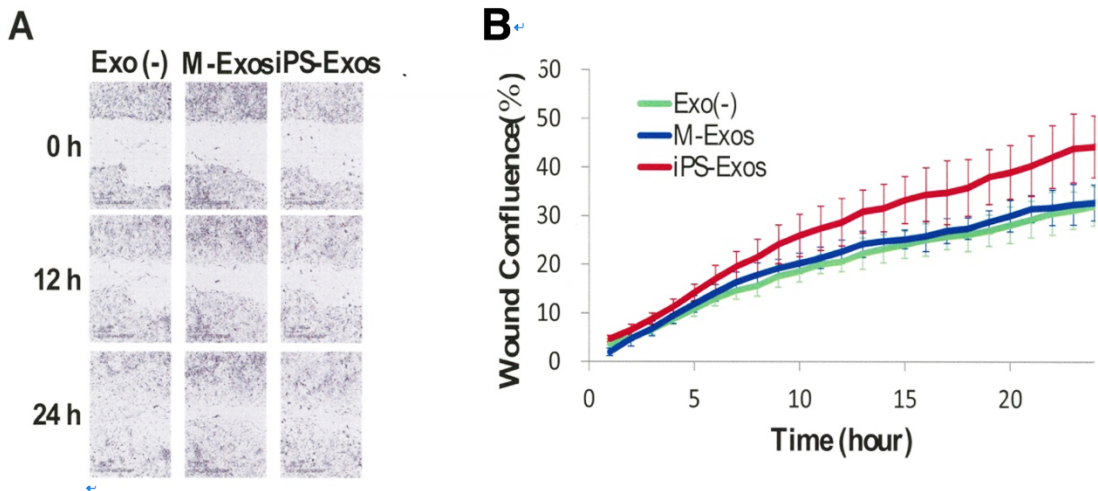


図 4 スクラッチアッセイ. (A) スクラッチした部分の位相差顕微鏡像. (Bar 300 μ m) (B) iPS-Exo(100 μ g/ml)、M-Exo(100 μ g/ml)、Exo(-)群間の比較

(4) 細胞増殖能

iPS-Exo の糖尿病マウス皮膚線維芽細胞の増殖に与える影響を解析した。iPS-Exo 群では 72 時間後に M-Exo 軍と比較し 1.09 倍であったが、統計学的有意差を認めなかった(図 5)。

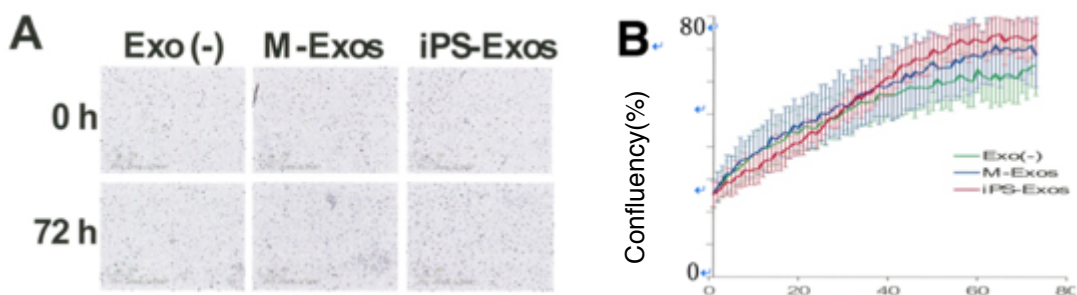


図 5 細胞増殖能アッセイ (A) 位相差顕微鏡像 Bar 300 μ m. (B) 線維芽細胞の経時的増殖曲線

(5) 創部面積

経時的な創部写真を示す (図 6 A)。これを定量化すると、術後 7, 10 日目で iPS-Exo 群が他の 2 群と比較し、創面積が小さくなっていった (図 6 B)。また、創閉鎖に要した期間は iPS-Exos 群、M-Exos 群、PBS 群でそれぞれ 19.0 ± 3.6 日、 18.5 ± 3.3 日、 18.7 ± 2.4 日であったが、各群間に統計学的有意差を認めなかった。

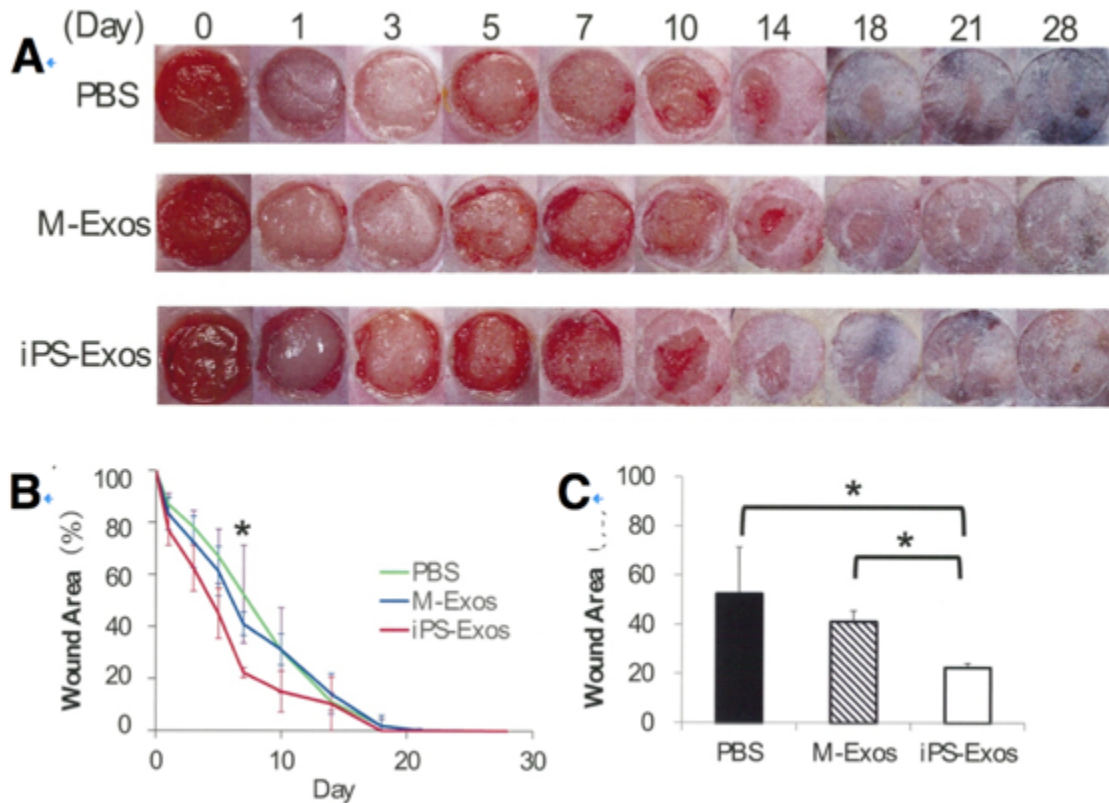


図 6 糖尿病マウス創閉鎖 (A) 0、1、3、5、7、10、14、18、21、28 日目の創部の写真 (B) 0、1、3、5、7、10、14、18、21、28 日目の創面積の定量化 * $P < 0.05$ (C) 術後 7 日目の創面積 $p < 0.05$

(6) 免疫組織学的検討

創部組織の免疫染色で CD31 (赤)、 α SMA (緑) の両方に染色された黄色の部分が生血管である (図 7 D-F)。血管密度を解析すると、iPS-Exo 群では他の 2 群と比較し、有意に血管密度が高く (図 7 G)、iPS-Exo が新生血管形成を促進する事が示された。

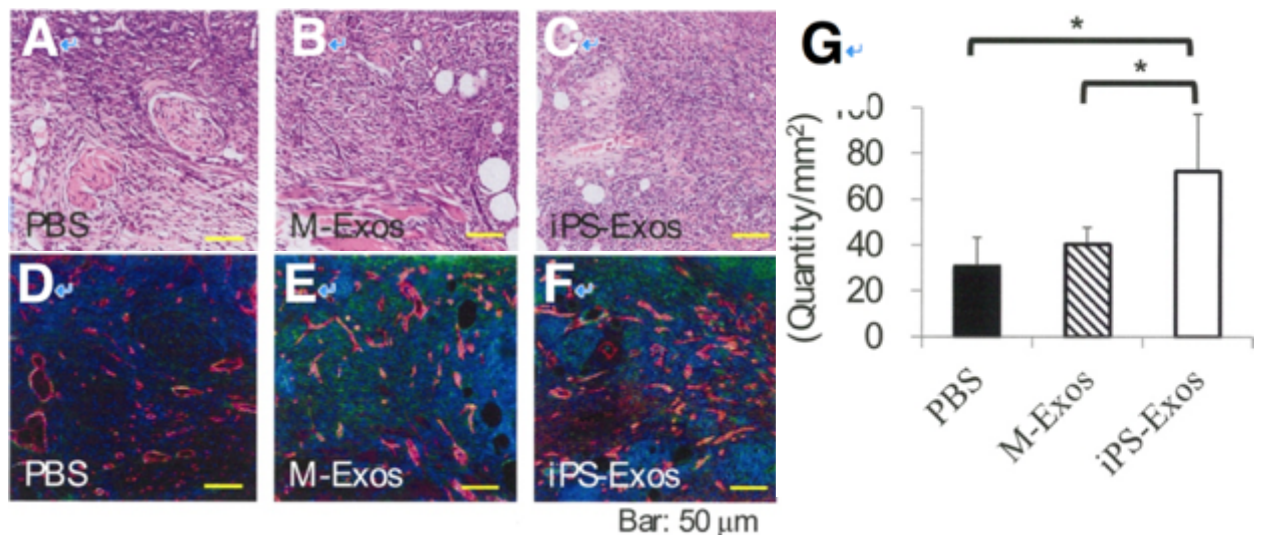


図 7 血管形成の蛍光免疫染色による解析. (A-C) HE 染色像、(D-F) 蛍光免疫染色 CD31 (赤) と α SMA (緑)、核染色 (青) (G) 7 日目の血管密度 ($P < 0.05$).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kobayashi H, Ebisawa K, Kambe M, Kasai T, Suga H, Nakamura K, Narita Y, Ogata A4, Kamei Y. Effects of exosomes derived from the induced pluripotent stem cells on skin wound healing. *Nagoya J Med Sci.* 2018 May;80(2):141-153. 査読あり

〔学会発表〕（計 1 件）

① Ebisawa K, Kobayashi H, Kanbe M, Kamei Y, et.al

Effect of exosomes from human induced pluripotent stem cells on skin wound healing in diabetic mice TERMIS-EU 2017 (Davos, Switzerland. 2017年6月26-30日) .

〔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) 研究分担者

研究分担者氏名：亀井 譲

ローマ字氏名：KAMEI YUZURU

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：10257678

研究分担者氏名：加藤 竜司

ローマ字氏名：KATOU RYUJI

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：創薬科学研究科

職名：准教授

研究者番号（8桁）：50377884

研究分担者氏名：蛭沢 克己

ローマ字氏名：EBISAWA KATSUMI

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学部附属病院

職名：病院助教

研究者番号（8桁）：20397459

研究分担者氏名：高成 啓介

ローマ字氏名：TAKANARI KEISUKE

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：講師

研究者番号（8桁）：80378190

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。