

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10624

研究課題名(和文) 心筋梗塞に対するエクソソーム投与による心筋再生誘導の検討

研究課題名(英文) Induction of myocardial regeneration by exosome administration for myocardial infarction

研究代表者

寺澤 幸枝 (TERAZAWA, Sachie)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：50566990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：心筋再生誘導を試みるために用いるエクソソームの性質を調べるため、各細胞(間葉系幹細胞:MSC, 線維芽細胞:FB, 心筋細胞:CM, iPS由来心筋細胞:iCM)由来のエクソソームを解析した。MSCエクソソーム内には、286種のタンパクが同定され、サイトカイン等が含まれていた。526種の miRNAを同定し、MSC, CM, iCM由来エクソソームには心筋細胞アポトーシス抑制因子miR-146, miR-210, 血管新生因子miR-126, miR-132がより多く発現していた。しかしエクソソーム産生量が少なく、心筋梗塞モデルに投与するには、より回収効率の良い培養方法の確立が課題となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームの性質(膜表面タンパクや包括するmiRNA, mRNA, proteinなど)はホスト細胞に依存するため、細胞の種類によって治療効果が異なることが予想される。多くの論文で様々な疾患に対する治療効果が明らかとなっているMSCに加え、線維芽細胞や心筋細胞由来のエクソソームを用いて各性質を比較検討することは、治療に最適なエクソソームを見出すための重要な基礎検討課題であると考えられる。本研究で得られた成果は、由来細胞により治療効果に差異が生ずる可能性がある。これまでに報告がない本成果は、学術的意義を有すると考える。

研究成果の概要(英文)：Several therapeutic strategies using cell-derived exosomes (exo) which have several functions, including anti-inflammatory and immunosuppressive activities have been reported. In this study, to investigate the character of exo which is used for induction of cardiac regeneration, we analyzed proteins and miRNAs in exo derived from cells including mesenchymal stem cells (MSC), fibroblasts (FB), cardiac myocytes (CM) and iPS-derived cardiac myocytes (iCM). Exo derived from each cell was isolated by ultracentrifugation. MSC-exo had 286 kinds of proteins and 526 kinds of miRNAs. Especially, exo derived from MSC, CM, or iCM were expressed miR-146 and miR-210 which are known as anti-apoptosis of cardiac myocytes, and miR-126 and miR-132 which are known as angiogenesis factors. We prepared to inject to the site of myocardial infarction in vivo. However, the amount of exo produced was small, and to establish an efficient culture method to isolate more exo was required.

研究分野：心臓外科学

キーワード：心筋梗塞 心筋再生 エクソソーム 間葉系幹細胞 心筋細胞 抗炎症 miRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞のほとんどは、冠動脈の粥状動脈硬化部位のプラークが崩壊し、二次的血栓が生じて冠動脈を閉塞して起こる。広範囲心筋梗塞に起因した壊死心筋は、線維化組織に置換され時間とともにリモデリングし、心拡大や収縮障害、最終的に重症心不全を引き起こす。いわゆる虚血性心筋症に基づく心不全は臨床において様々問題が残っており、死亡率も高く 20 - 50%/年に及ぶ。

細胞治療による再生医療では、自己筋芽細胞シートによる臨床治験が試みられているが、細胞療法を臨床応用するためには多大な障壁(コストや時間)がある。また、本邦ではヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針が法整備化され、細胞培養加工の安全性や細胞調整施設の管理の確保がより一層求められることから、近年では、幹細胞自体を用いない、細胞が産生する細胞外微小胞エクソソームによる新たな再生医療が着目されつつある。

心筋梗塞モデル動物を用いた文献報告では、MSC 由来エクソソームによる急性心筋梗塞治療 (*J Mol Med. (Berf) 2014;92:387.*)、心筋塊前駆細胞(CPC)由来エクソソームによる心筋梗塞治療の有効性 (*Cardiovasc Res. 2014;103:530.*)が報告されている。しかし臨床応用を考慮した場合、心筋細胞を得るために心筋梗塞患者自身の正常心筋組織を採取することは負担が大きい。従って、自己組織の場合は採取が容易である細胞(線維芽細胞や iPS 細胞)、他家の場合は免疫抑制能を持つ MSC がエクソソームの細胞源として有利である。

2. 研究の目的

本研究では、エクソソームを利用した心筋再生誘導による心筋梗塞治療を試みる。また、エクソソームは分泌する細胞の性質に依存することが知られていることから、各細胞(間葉系幹細胞:MSC, 線維芽細胞:FB, 心筋細胞:CM, iPS 由来成熟心筋細胞:iCM)から分離したエクソソームでの治療効果を比較検討し、どの細胞由来のエクソソームがより治療効果が高いかを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、動物実験モデルを用いて心筋梗塞に対するエクソソーム療法の是非を明らかにする。心機能評価や組織学的評価、生化学的評価により比較検討し、その有効性及び治療効果の差異について検討する。また、エクソソームに含まれる物質(mRNA, miRNA, protein)を網羅的に解析し、治療効果に関与する因子を明らかにする。

1. エクソソームの分離と同定: 各細胞(MSC, FB, CM, iCM)からエクソソームを分離し、characterizationによる同定を行う。
2. *In vivo* 検討: 実験動物モデルにて、各細胞種エクソソーム注入し、その治療効果の比較検討を行う。
3. エクソソーム含有物質の同定: 次世代シーケンサーや質量分析により、RNA, proteinの網羅的解析を行い、治療効果関連因子の同定を行う。

4. 研究成果

エクソソーム分離

市販正常細胞; ラット MSC (Cyagen)、ラット FB (DS ファーマ)、ラット CM (Lonza)、ヒト iCM (CDI) を各専用培地で培養・増殖させた。80-90%コンフルエントに達した時点で無血清培地に置換して 48 時間静置したのち、培養上清を回収し、200 μ m フィルターでフィルトレーションした。その後、超遠心法にてエクソソームを分離・回収した。

characterization

エクソソームの形態は、ネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡(TEM)にて確認した(図 1A)。エクソソームの粒径は、ナノ粒子測定システム Delsa™ Max (Beckman coulter) を用いて測定した。MSC 254.3 nm、FB 260.4 nm、CM 231.7 nm、iCM 206.7 nm だった(図 1B)。また、フローサイトメトリーにてエクソソーム特異的表面抗原(CD9, CD81)が陽性であること確認した。

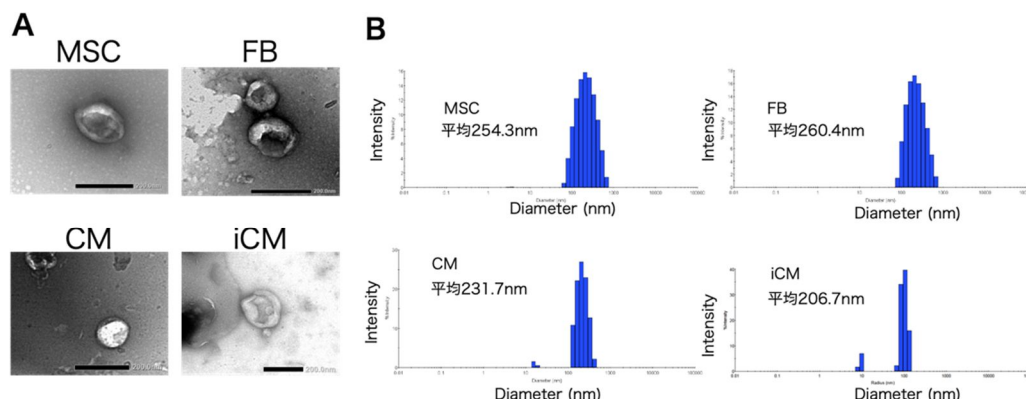
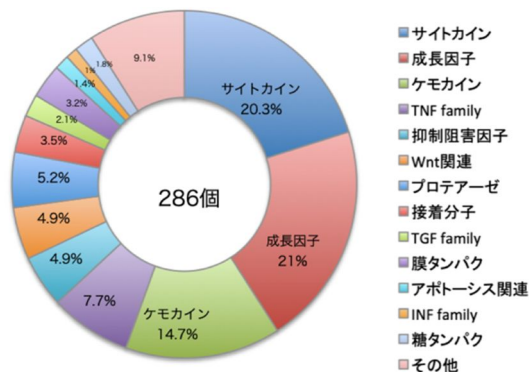


図1 各細胞由来エクソソームの形態

エクソソーム含有タンパク・miRNA の網羅的解析および関与因子の同定

エクソソームに含まれるタンパク・miRNA を抽出した。タンパクは、超音波破碎装置で抽出したのち、Qubit® Protein Assay Kit (Life Technologies)にて定量測定した。MSC エクソソームから抽出したタンパクを、タンパクアレイ (L-Series Mouse Antibody Array L-308, Ray Biotech Inc) で解析したところ、286 種類のタンパクが同定され、サイトカイン 20.3%、成長因子 21%、ケモカイン 14%が占めていた(図 2)



miRNA は、Total RNA Purification Plus kit (NORGEN) を用いて RNA を抽出したのち、Affymetrix GeneChip® miRNA 4.0 Array

図2 MSCエクソソーム包括タンパクの種類

(Affymetrix, Inc)で解析したところ、526 種類の miRNA が同定された。また、Mir-XTM miRNA First- Strand Synthesis and SYBR® qRT-PCR を用いて定量 RT-PCR にて血管新生因子の miR-126, miR-132 および心筋細胞抗アポトーシス因子の miR-146, miR-210 の遺伝子発現量を比較したところ、miR-126, miR-132 では CM で最も発現量が高く、miR-146 では CM, iCM が、miR-210 では MSC, iCM で高発現となった(図 3)

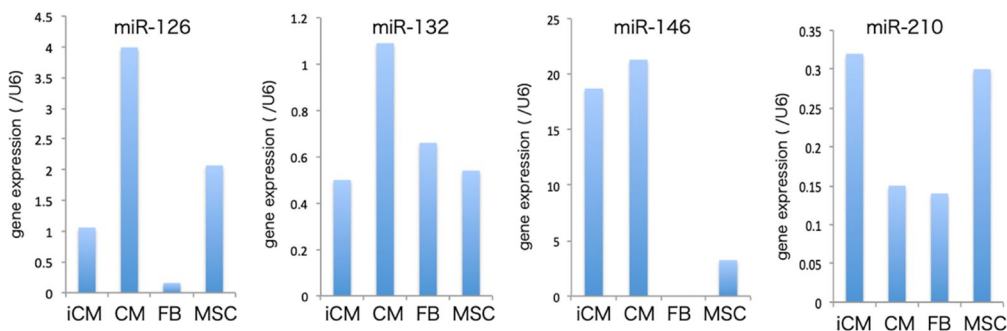


図3 各エクソソームにおけるmiRNA発現量

ラット心筋梗塞モデル

ラットの第 4 肋間開胸から冠動脈左前下降枝の基部に近いところで結紮閉鎖することにより、広範囲前壁梗塞を作成した。梗塞作成から 1, 2, 3, 4 週間後に心臓エコーで LVEF を測定したのち、組織を採取した。1 週間後では LVEF40%だったのに対し、4 週間後では 30%まで低減した。組織観察では、薄膜化した心筋梗塞病変が見られた(図 4)。ランダムで各エクソソーム投与群 (MSC, CM, iCM) にわけ、100 µg エクソソームを梗塞部位に数カ所に分けて注入予定であったが、エクソソーム産生量が低く、10⁶ 個あたり 0.6~1.3 µg と微量だったため、注入するための必要な量が不十分で当初の計画通りに進めることができなかった。

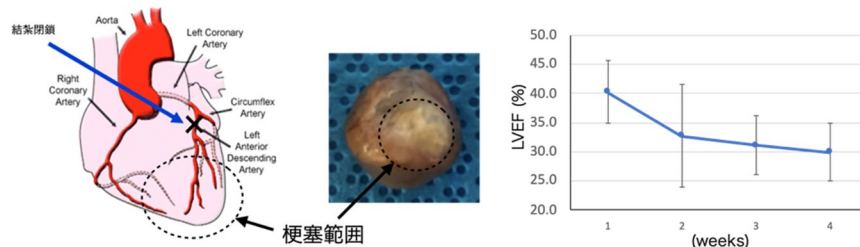


図4 心筋梗塞モデルの作成

以上のことから、エクソソームの性質は宿主細胞によって異なることがわかり、MSCに加え、線維芽細胞を除く MSC, CM, iCM 由来のエクソソームが血管新生や心筋細胞抗アポトーシスに関与する因子を有しており、心筋梗塞治療に用いることができる可能性が示唆された。しかし、必要投与量を準備するため、回収効率を向上させるための培養方法の確立が今後の課題であることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	大島 英揮 (OSHIMA Hideki) (40378188)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	
研究分担者	成田 裕司 (NARITA Yuji) (60378221)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	諫田 泰成 (KANDA Yasunari) (70510387)	国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・部長 (82601)	
研究分担者	藤本 和朗 (FUJIMOTO Kazuro) (70644665)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	緒方 藍歌 (OGATA Aika) (70718311)	名古屋大学・医学系研究科・特任助教 (13901)	