

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11830

研究課題名(和文) HLAハプロタイプホモ歯髄細胞およびiPS細胞由来エクソソームの解析

研究課題名(英文) Characterization of exosomes from HLA homozygous haplotype dental pulp cells and iPS cells

研究代表者

川口 知子(武田知子)(Kawaguchi, Tomoko)

岐阜大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30509815

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)：我々が保有する3種類のHLAハプロタイプホモ(HHH)ヒト智歯歯髄細胞(DPC)細胞は日本人の約25%に移植適合を示す。我々は、これらのHHH細胞からiPS細胞を誘導し、再生医療資源として利用するための研究を続けている。近年、間葉系細胞の培養上清中に含まれる小胞「エクソソーム」が、様々な生理活性を示すことがわかってきた。しかしエクソソームにもHLA分子が含まれている可能性があり、患者の体内でHLA分子の抗体が作られると、免疫的なエクソソームの排除を免れない。本研究では、3種類のHHH-DP細胞と、HHH-DP細胞に由来するHHH-iPS細胞のエクソソームを比較し、今後の応用につなげる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が3種類のHLAハプロタイプホモ歯髄細胞をすでに保管していることは、本研究を進めるうえでその意義は大きく、本研究により、HLAハプロタイプホモの歯髄細胞・iPS細胞の培養上清から、エクソソームを精製する技術の開発が可能となれば、エクソソームは内包する物質がもつ総合的な効果で細胞の性質を変化させる性質をもつ点で、既存の治療薬とは全く概念が異なり、再生医療の資源としてのDPCの価値は更に高くなると考えられる。また再生医療(臨床)に向けより安全な方法と考えられ、その意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human leukocyte antigens (HLA) play an important role in distinguishing self and non-self in the immune system. HLA multi-locus-homozygous cells are considered to be less likely to be rejected in allogeneic transplantation. In recent years, it has been reported that extracellular vesicles ~100 nm in diameter called exosomes are secreted from iPS cells and tissue stem cells, are partly responsible for cellular functions, and serve as a tool in intercellular communications such as those in immune reactions and tissue repair. In this study, we compared exosomes from HLA homozygous haplotype (HHH) dental pulp (DP) cells and exosomes from HHH-iPS cells derived from HHH-DP cells.

HHH-DP exosomes and HHH-iPS exosomes were found to have different expression profiles of miRNAs. HHH-iPS exosomes showed a reduced level of HLA expression. However, larger size-heterogeneity and less exosomal protein markers were also observed with HHH-iPS exosomes when compared with HHH-DP exosomes.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯髄細胞 エクソソーム ハプロタイプホモ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は再生医療への貢献を目的に、医療破棄物として処理されていた抜歯後の智歯より約 300 ラインのヒト歯髄細胞(Dental Pulp Cells: DPC)を樹立し (Takeda et al. J Dent Res. 2008)、多能性幹細胞(iPS)を誘導した (Tamaoki et al. J Dent Res. 2010、Iida et al. J Dent Res. 2013)。しかしながら、これらの研究にはウシ血清を添加して行っていた。ウシ血清の使用は、プリオンや病原性ウイルス等が存在する危険性などの問題が存在している。このような問題を回避するために DPC の無血清培養法を確立し、iPS 細胞を誘導した (Kawaguchi et al. PLOS ONE. 2014)。

すべての患者から iPS 細胞を誘導することは、コストと時間の観点から困難であり、今後の細胞移植医療は他家移植について考慮する必要がある。これまで、他家移植は輸血、骨髄移植、臓器移植の中で行われており、ヒト白血球抗原の不一致が免疫拒絶と有意に相関することがわかっている。長期の移植成績は、抗移植片 HLA 抗体の出現によって顕著に低下する事からも、他家移植において HLA を一致させる事の重要性が再認識されている。我々は、DPC について HLA-A, B, DRB1 の 3 ローカスを調べ、3 例の 3 ローカスホモ細胞を樹立し、iPS 細胞誘導も成功している (Tamaoki et al. J Dent Res. 2010)。これらの 3 例の HLA3 ローカスホモ (HHH) 細胞は、日本赤十字社が公開しているハプロタイプ頻度から推定して、日本人の約 25% に移植が可能である。このような移植は HLA に起因する移植細胞拒絶を抑制し、移植成績を上げる事が期待される。

現在、細胞から分泌される膜小胞であるエクソソームは、離れた細胞や組織に情報を伝達するための役割を担っている可能性が指摘されており、治療薬や drug delivery system の新たな運搬体として期待されている (Théry et al. Biol. Rep. 2011)。そのなかでも間葉系幹細胞 (MSC) の分泌するエクソソームが様々な疾患に対して治療効果を示すことが報告されている (Chamberlain et al. Stem Cells. 2007)。我々の以前の研究から DPC の移植により脊髄損傷後の運動機能改善効果が認められること (Sugiyama et al. J Bone Miner Metab. 2019) から、間葉系の細胞である DPC の分泌するエクソソームでも DPC と同様の組織修復改善効果が期待される。

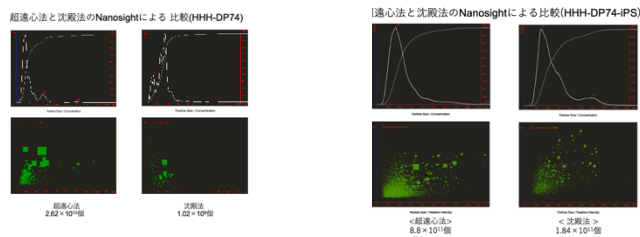
2. 研究の目的

我々が保有する約 300 人分のヒト智歯歯髄細胞(DPC)に含まれていた 3 種類の HLA ハプロタイプホモ (HHH) 細胞は日本人の約 25% に移植適合を示す。我々は、これらの HHH 細胞から iPS 細胞を誘導し、再生医療資源として利用するための研究を続けている。近年、間葉系細胞の培養上清に含まれる小胞「エクソソーム」が、様々な生理活性を示すことがわかってきた。しかしエクソソームにも HLA 分子が含まれている可能性があり、患者の体内で HLA 分子の抗体が作られると、免疫的なエクソソームの排除を免れない。そこで本研究では、HHH-歯髄細胞・iPS 細胞の培養上清からエクソソーム精製技術を開発し、また精製されたエクソソームを網羅的に解析し、今後の応用につなげる。

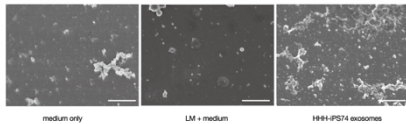
3. 研究の方法

岐阜大学にて樹立した HHH-歯髄細胞 3 種類およびその細胞より誘導した HHH-iPS 細胞の培養上清を回収し、超遠心分離法および沈殿法にてエクソソームを精製した。精製したエクソソームは、NanoSight を用いてナノ粒子解析 (NTA) および電子顕微鏡 (SEM/TEM) にて確認した。また、ウエスタンブロッティングでマーカーおよび HLA の発現を評価した。そして PKH26 を取り込ませた細胞の上清からラベルしたエクソソームを精製し、細胞内への取り込みを観察した、さらに HHH-iPSC エクソソームとの miRNA 発現比較も行った。

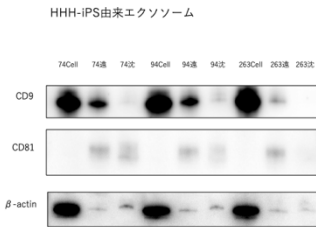
4. 研究成果



NTA において HHH-DPC、HHH-iPS とともに沈殿法に比べて超遠心法で多くのエクソソームを精製することができた。ただし HHH-iPS エクソソームでは、どちらの方法においてもサイズの不均一性が高いことがわかった。



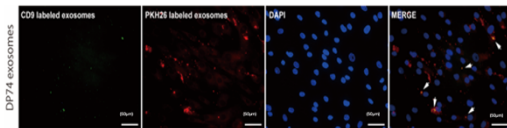
そこで、SEMにてHHH-iPS由来のエクソソームを観察したところ、NTAと同様に形態的に不均一な集団を示した。エクソソーム以外の混入の可能性があるため、培養液のみおよびラミネンコートした培養皿に培養液をいれたものを超遠心後にSEMにて確認したところ、どちらにおいても粒子の存在が認められた。そのためHHH-iPS由来のエクソソームには培養液からの粒子の混入がある可能性があることがわかった。



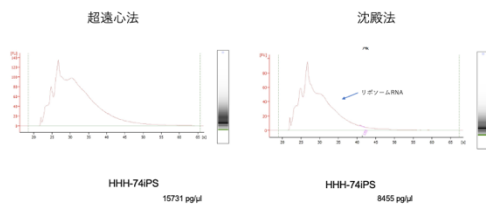
WBにおいては、HHH-DPC由来エクソソームでは、CD9、CD63およびCD81のマーカー発現を認めたが、HHH-iPS由来のエクソソームにおいては、超遠心法ではCD9とCD81のマーカー発現を認めたが、沈殿法ではCD9の発現が低かった。

HLA発現は、HHH-DPCエクソソームが元の細胞よりも低いレベルでHLAクラスI分子を発現することを示した。HHH-iPSCエクソソームは、SEMで確認されたように培養液からのタンパク質の混入が否定できない

ため、HLAクラスIの発現レベルは、HHH-DPCエクソソームよりさらに低レベルであったが、過小評価されていたことに注意する必要がある。



PKH26を取り込ませた細胞の上清からラベルしたエクソソームを精製し、細胞内への取り込みを観察した。PKH26ラベルしたHHH-DPC由来エクソソームが細胞内に取り込まれたことが確認できた。また、取り込まれたエクソソームがCD9を発現していることも確認できた。

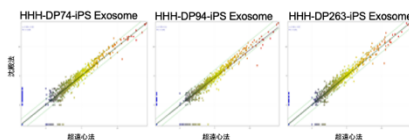


HHH-DPC、HHH-iPS由来エクソソームともにRNAの採取量が、超遠心法の方が多く、リボソームRNAの混入が少ないことがわかった。

miRNAの解析においても、超遠心法と沈殿法で発現しているmiRNAを比較したところ、一部において、精製方法によってmiRNAの発現プロファイルが異なっていた。

またHHH-DPエクソソームとHHH-iPSエクソソームの発現しているmiRNAを比較したところ、かなりのmiRNAの発現プロファイルが異なっていた。

超遠心法および沈殿法によるmiRNA発現比較



まとめると、エクソソームを精製する場合、超遠心法は大量処理に、沈殿法は手軽に短時間でできるメリットがある。採取法の違いにより、表面抗原の発現量や一部のmiRNAの含有量に違いを認めたことから、採取法によって純度や他の小胞のコンタミネーションの度合いが異なることが示唆された。またHHH-iPSエクソソームは、HLA発現レベルが低下するなど、有益な特性を示しました。ただし、HHH-DPエクソソームと比較すると、HHH-iPSエクソソームでは、サイズの不均一性が高く、エクソソームのタンパク質マーカーが少ないことも観察されました。異なる細胞源から産生されたエクソソームは、それらの様々な生物学的活性および治療有用性に影響を与える異なる特性を有する可能性がありそうである。

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 1件）

1. 著者名 Nagashima Kosuke, Miwa Takahiro, Soumiya Hitomi, Ushiro Daisuke, Takeda-Kawaguchi Tomoko, Tamaoki Naritaka, Ishiguro Saho, Sato Yumi, Miyamoto Kei, Ohno Takatoshi, Osawa Masatake, Kunisada Takahiro, Shibata Toshiyuki, Tezuka Ken-ichi, Furukawa Shoei, Fukumitsu Hidefumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Priming with FGF2 stimulates human dental pulp cells to promote axonal regeneration and locomotor function recovery after spinal cord injury	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 13500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-017-13373-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 清水雄太、川口知子、小足周平、澁谷俊昭、手塚建一
2. 発表標題 HLAハプロタイプホモIPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小足周平、青木仁美、川口知子、清水雄太、柴田敏之、國貞隆弘、澁谷俊昭、手塚建一
2. 発表標題 HLA genome editing in human dental pulp stem cells using ZFN
3. 学会等名 第104回アメリカ歯周病学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小足周平、青木仁美、川口知子、清水雄太、柴田敏之、國貞隆弘、手塚建一、澁谷俊昭
2. 発表標題 HLA allele selective genome editing in human iPS cells using ZFN
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会（JADR）学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水雄太、川口知子、小足周平、黒田依澄、柴田 敏之、國貞隆弘、手塚建一、澁谷俊昭
2. 発表標題 HLAハプロタイプホモiPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 第13回日本歯周病学会中部地区 大学・日本臨床歯周病学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水雄太、川口知子、小足周平、柴田 敏之、國貞隆弘、手塚建一
2. 発表標題 HLAハプロタイプホモiPS細胞からのエクソソーム精製
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山健、飯田一規、川口 知子、畠山大二郎、福光秀文、柴田敏之、国貞隆弘、手塚 建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞における脊髄損傷後の回復効果と相関するFGF 2 応答性遺伝子の検索
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小足周平、青木仁美、川口知子、清水雄太、柴田敏之、国貞隆弘、手塚 建一
2. 発表標題 ヒト歯髄細胞におけるHLAアリル選択的なゲノムエディティング
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 清水雄太、川口知子、小足周平、澁谷俊昭、手塚建一
2. 発表標題 HLAはプロタイプホモiPS細胞からのエクソソームの精製
3. 学会等名 第36回日本骨代謝学会
4. 発表年 2018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	飯田 一規 (Iida Kazuki) (30585237)	岐阜大学・大学院医学系研究科・講師 (13701)	
研究分担者	柴田 敏之 (Shibata Toshiyuki) (50226172)	岐阜大学・大学院医学系研究科・教授 (13701)	
研究分担者	畠山 大二郎 (Hatakeyama Daijiro) (60377653)	岐阜大学・医学部附属病院・講師 (13701)	