

令和元年6月17日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15378

研究課題名(和文) 幹細胞由来エクソソームを用いた中枢神経再生に向けた基盤技術の開発

研究課題名(英文) Development of method for central nervous regeneration using stem cell-derived exosomes

研究代表者

西田 英高(Nishida, Hidetaka)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：00622804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イヌおよびヒト骨髄間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた中枢神経損傷に対する新規治療法の基盤技術の開発を目的に、骨髄間葉系細胞を無血清培地で培養し、得られた培養上清からカラムクロマトグフィーを用いて多量のエクソソームを含む分画を回収することに成功した。さらにヒト骨髄間葉系幹細胞の培養上清から2種類のエクソソームの分離に成功し、それぞれこれらのエクソソームには抗炎症作用が有することが明らかとなった。今後これらの技術を用いた幹細胞由来エクソソームを用いた新たな中枢神経再生の治療法の開発へつなげる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、培養上清中に存在するエクソソームに着目し、精製後に凍結保存することによって“ready-to-use”を実現可能にした新たな再生医療の治療技術の提供が実現可能となった。本研究で得られた結果を総合的に評価し、次のターゲットであるイヌの中枢神経損傷に対する臨床研究につなげていく予定である。イヌの中枢神経損傷症例は自然発症疾患であり、ヒトのトランスレーショナルリサーチモデルとして重要な役割を担っている。本研究は伴侶動物の再生医療を推進させるだけでなく、ヒト臨床応用への有効性を検討するための信頼性の高い情報を提供することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：we developed that mesenchymal stem/stromal cells can be activated by incubation for 48 hours in a chemically defined and protein-free medium to produce stem cell-derived exosomes. We developed a scalable chromatographic protocol for isolating exosomes from canine and human mesenchymal stem/stromal cells. These exosomes reduced neuroinflammation as reflected by reductions in IL-1. The results suggest that canine and human mesenchymal stem/stromal cells-derived exosomes can provide a novel therapy for central nervous system diseases.

研究分野：獣医神経病、再生医療

キーワード：エクソソーム 間葉系幹細胞 中枢神経再生 トランスレーショナルリサーチ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、中枢神経損傷に対する再生医療の取り組みは世界的に盛んである。現在までに様々なアプローチが試みられているが、成体に存在する間葉系幹細胞は損傷を受けた組織を修復および再生する際に重要な役割を担っていると考えられており、再生医療へ利用し得る細胞として注目されている。申請者は、これまでにイヌ間葉系幹細胞 (MSC) を用いて脊髄損傷の臨床研究を行い、その安全性および有用性を報告してきた。中枢神経の修復および再生には、幹細胞から分泌される因子が深く関与していると考えられる。最近の研究によって、幹細胞は様々な核酸 (miRNA、mRNA) やタンパク質 (栄養因子、受容体) をエクソソームとして分泌することが明らかとなってきた。エクソソームは 100–200 nm の小胞であり、細胞膜に覆われているため、小胞内の因子を安定化したまま輸送することが可能であり、これらが再生医療の新たなツールとして期待されている。

幹細胞由来の培養上清には神経修復、再生に寄与する因子を含むことが報告されているが、これらの因子を臨床応用するためにはその因子を濃縮・精製する技術が必要不可欠である。このような背景の中、本研究申請者は陰イオン交換クロマトグラフィーを用いてエクソソームを大量に濃縮する方法を開発した。しかしながら、得られたサンプル内には細胞由来の不純物が含まれており、エクソソームにも異なった表現型があることが予想される。

### 2. 研究の目的

幹細胞由来エクソソームを用いた中枢神経損傷に対する新規治療法の基盤技術を獣医臨床で確立することを目的に、

- (1) タンパク不含培地を用いたイヌ MSC の培養条件を検討する。
- (2) イヌおよびヒト MSC のタンパク不含培地における培養上清を用いて、エクソソームを大量に回収する方法について検討する。
- (3) 幹細胞由来エクソソームが持つ抗炎症効果を評価するための *in vitro* アッセイを確立する。

### 3. 研究の方法

#### (1) イヌ MSC のタンパク不含培地を用いた培養条件の検討

イヌ MSC は通常の培地 (10% FBS 含有 MEM 培地) から様々な培地 (ゼノフリー培地 1、ゼノフリー培地 2、タンパク不含培地) に変更し、フローサイトメトリーを用いて細胞の生存率を評価した。また、これらの培養上清中にエクソソームが含まれているかを評価するために、エクソソームのマーカーである TSG101 の発現量をウエスタンブロット法で評価した。

#### (2) 幹細胞由来エクソソームの精製法の開発

エクソソームの表面が負の電荷を有している特徴を利用して、上記で得られたイヌ MSC の培養上清から陰イオン交換クロマトグラフィーを用いて、エクソソームが回収できるかについて検討した。各フラクションのタンパク質量を Bradford 法で測定し、TSG101 の発現量をウエスタンブロット法で評価した。また、溶出するバッファーの塩濃度を変えることによって、ヒト MSC 由来エクソソームをさらに分類できるか検討した。エクソソームマーカーである CD63、CD81 の発現をウエスタンブロット法で評価した。

#### (3) マウスミクログリア細胞株を用いた *in vitro* アッセイの確立

エクソソームは主に生体内のマクロファージやミクログリアなどの細胞に作用し、炎症を抑制することが明らかとなってきた。現在のところ、マウスなどのモデルを用いてその有効性を評価しているが、より簡便な *in vitro* アッセイが必要とされている。そこで、LPS 刺激を与えたマウスミクログリア細胞株 (BV-2) を用いて、MSC 由来エクソソームの抗炎症効果について炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) の発現量をリアルタイム PCR によって評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) イヌ MSC のタンパク不含培養条件の検討

イヌ MSC は、通常の培養条件 (10% FBS MEM 培地) から Chemical Defined Protein Free (CDPF) 培地に変更すると 50% 近くの細胞が死滅することが明らかとなった (図 1)。一方で、ヒト MSC では細胞の生存が維持されることが申請者の過去の研究で明らかとなっており、動物種の違いによって異なることが明らかとなった。そこで、申請者は、通常の培養からゼノフリー培地 1、2 に変更することによって、イヌ MSC の生存を維持することに成功した (図 2)。培地の変更による MSC の細胞表面に変化は認められなかった (図 3)。また、これらの培養上清中には幹細胞由来エクソソームが存在することが明らかとなった。

さらにゼノフリー培地から CDPF 培地に変更することによって、上記で認められたイヌ MSC の死滅を抑制することに成功した (図 4)。また、これらの培養上清から幹細胞由来エクソソームを回収することに成功した。

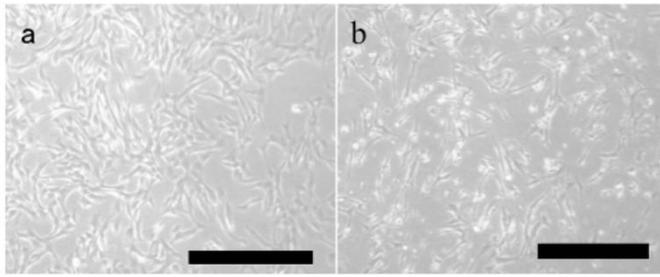


図1 イヌ MSC の顕微鏡写真

a. 10% FBS MEM 培地条件下 b. CDPF 培地条件下 . CDPF 条件下では多くの細胞が死滅し、浮遊している。

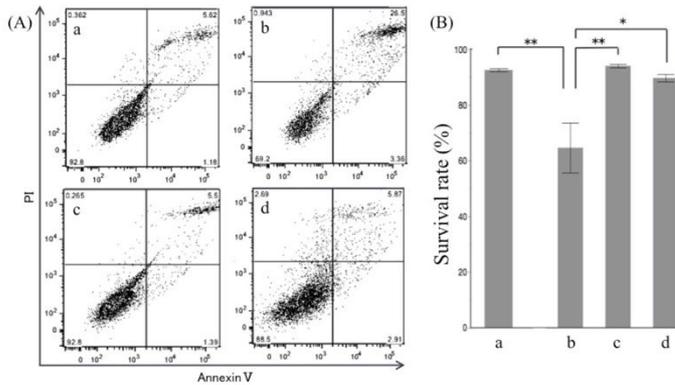


図2 各条件下(a. 10% FBS MEM 培地 b. CDPF 培地 c. ゼノフリー培地1 d. ゼノフリー培地2)におけるイヌ MSC の生存率

A. フローサイトメトリーのヒストグラム B. イヌ MSC の生存率 ゼノフリー培地1、2では、10%FBS MEM 培地と生存率に差は認められなかった。

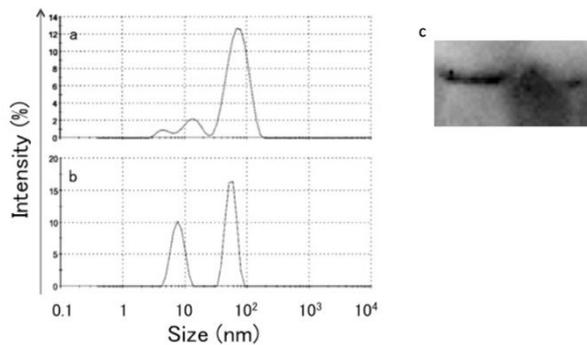


図3 イヌ MSC の培養上清中のエクソソーム

ゼータサイザーによって、エクソソームの存在を確認した(a. ゼノフリー培地1、b. ゼノフリー培地2)。また、エクソソームのマーカである TSG101 の発現を確認した。

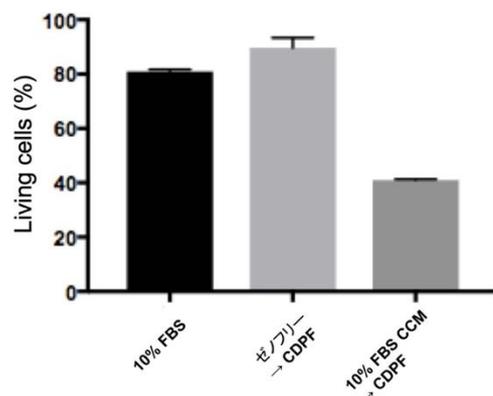


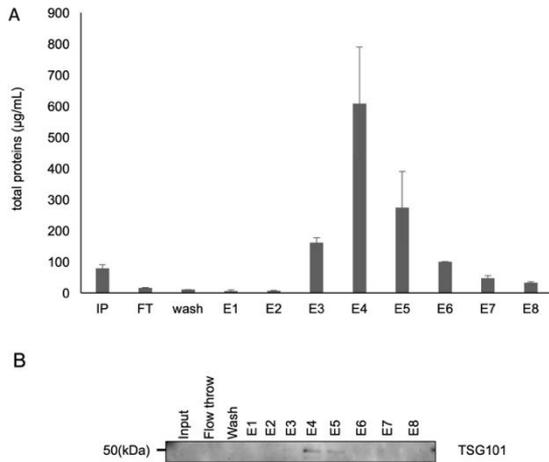
図4 培地変更後のイヌ MSC の生存率

ゼノフリー培地から CDPF 培地に変更することによって、細胞の生存率を維持することができた。

(2) 幹細胞由来エクソソームの精製法の開発

上記の CDPF 培地の培養上清から陰イオンクロマトグラフィー法を用いて、イヌ MSC 由来エクソソームの回収が可能であった(図5)。以上のことから、イヌ MSC においても大量にエクソソーム を回収する方法を開発した。

幹細胞由来エクソソームには、異なった表現型があると考えられており、その有効性についても違いがあると考えられている。そこで、イオン交換クロマトグラフィー法を用いて、塩の濃度の違いによって、ヒト MSC の培養上清から2つの異なるエクソソームの分画の分離をおこなった。エクソソーム1は CD63 陽性であるが、CD81 は陰性であった(図6)。一方、エクソソーム2は CD63, CD81 の発現が陽性であった(図6)。以上のことから、塩の濃度の違いによって、2種類の異なるエクソソームの分離に



成功した。

図5 カラムクロマトグラフィー法を用いたイヌ MSC 由来エクソソームの回収

A. 各フラクションのタンパク量 B. 各フラクションの TSG101 の発現量

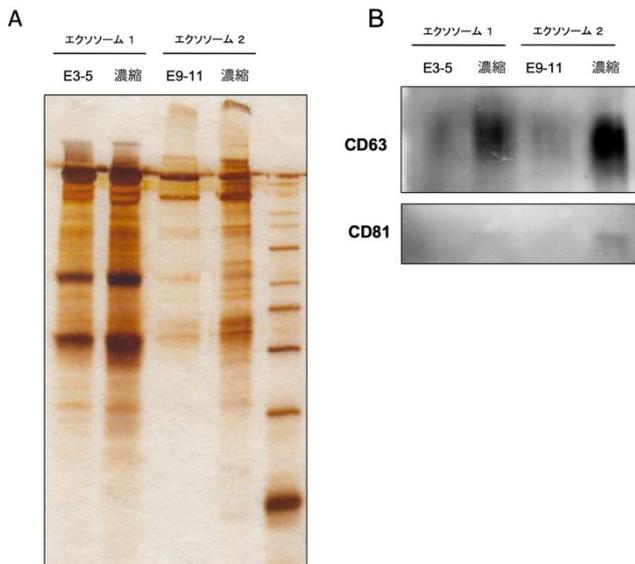


図6 陰イオンクロマトグラフィー法を用いたエクソソーム1と2の違い

A. 銀染色 B. ウェスタンブロット(CD63, CD81)

(3) マウスミクログリア細胞株を用いた in vitro アッセイの確立

BV-2 を LPS で刺激することによって、炎症を惹起することを確認し、イヌ MSC 由来エクソソームを添加することによって、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  や TNF- $\alpha$  が抑制されることを明らかにした(図7)。また、ヒト MSC 由来エクソソームも同様に炎症性サイトカインを抑制することが明らかとなった。以上のことから、脳ミクログリアを用いた in vitro アッセイを作成することに成功した。

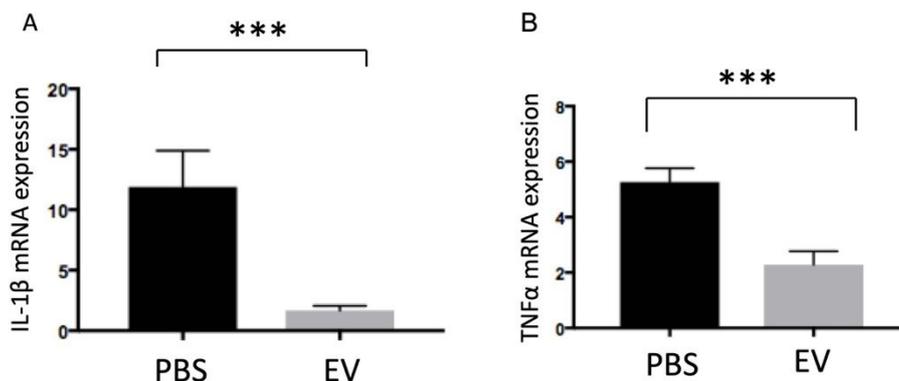


図7 LPS によって刺激された BV-2 の炎症性サイトカインの発現量(A.IL-1 $\beta$  B.TNF- $\alpha$ ) イヌ MSC 由来エクソソームが有意に炎症性サイトカインを抑制した。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計3件)

- Narita M, Nishida H, Nakata K, Yano H, Ueda T, Inden M, Akiyoshi H, Maeda S, Kamishina H. Identification of reference genes for microRNAs of extracellular vesicles isolated from plasma samples of healthy dogs by ultracentrifugation, precipitation, and membrane affinity chromatography methods. *Am J Vet Res.* 2019 May;80(5):449-454. doi: 10.2460/ajvr.80.5.449.
- Nishida H, Yamazaki M, Sakai H, Maeda S, Kamishina H. Intracranial ectopic choroid plexus cyst in a dog. *J Vet Med Sci.* 2019 Mar 14;81(3):365-368. doi: 10.1292/jvms.18-0244.
- Nishida H, Nakata K, Maeda S, Kamishina H. Prevalence and pattern of thoracolumbar caudal articular process anomalies and intervertebral disk herniations in pugs. *J Vet Med Sci.* 2019 May 15. doi: 10.1292/jvms.18-0521.

### 〔学会発表〕(計8件)

- 吉崎香琳, 西田英高, 桑原由季菜, 三重慧一郎, 秋吉秀保, 城潤一郎, 田畑泰彦 無血清培地におけるイヌ骨髄間葉系幹細胞由来 Extracellular Vesicle の回収法の検討 第18回日本再生医療学会 第18回再生医療学会 2019年3月21日-23日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
- Nishida H, Yoshiyazaki K, Kuwahara Y, Mie K, Akiyoshi H. Development of novel therapy for spinal cord injury using extracellular vesicles derived from mesenchymal stem/stromal cells in dogs. 8th Annual Congress of Asia Society of Veterinary Surgery(国際学会)
- 西田英高, 吉崎香琳, 桑原由季菜, 三重慧一郎, 秋吉秀保, Kim Dong-Ki, Prockop Darwin 幹細胞由来 Extracellular Vesicle を用いた中枢神経治療法の開発 第8回 DDS 再生医療研究会 2018年11月8日 ホテルマイステイズ新大阪コンファレンスセンター(大阪府大阪市)
- Nishida H. Clinical application and future directions of mesenchymal stem/stromal cell therapy for spinal cord injury in dogs. 2018 World Congress of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society(招待講演、国際学会) 2018年9月4日-7日 京都国際会議場(京都府京都市)
- 西田英高, 中田浩平, 山崎緑, 中野有希子, 田中宏, 中山正成, 秋吉秀保, 前田貞俊, 神志那弘明 犬の頸部椎間板ヘルニアに対するMRI伸延撮像法の検討 第44回獣医神経病学会 2018年6月30日-7月1日 サンセール盛岡(岩手県盛岡市)
- 西田英高 幹細胞由来液性因子を用いた治療戦略 第13回日本獣医再生医療学会(招待講演) 2018年2月3日-4日 横浜ワールドポーターズ(神奈川県横浜市)
- 西田英高 脊髄再生の道のりと今後の展望 13回日本獣医再生医療学会(招待講演) 2018年2月3日-4日 横浜ワールドポーターズ(神奈川県横浜市)
- 成田桃子, 西田英高, 朝比奈良太, 中田浩平, 矢野大仁, 前田貞俊, 神志那弘明 qRT-PCRを用いた犬の血漿エクソソーム miRNA 定量法の確立 第4回日本細胞外小胞学会/第9回日本 RNAi 研究会 2017年8月30日-9月1日 グランドプリンスホテル広島(広島県広島市)

### 〔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: <http://www.vet.osakafu-u.ac.jp/surg/>

## 6. 研究組織

研究協力者

前田貞俊(MAEDA Sadatoshi)

岐阜大学、応用生物科学部、教授

研究者番号:50377694

神志那弘明(KAMISHINA Hiroaki)

岐阜大学、応用生物科学部、准教授

研究者番号:50506847

秋吉秀保(AKIYOSHI Hideo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号:50420740

鳩谷晋吾(HATOYA Shingo)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号:40453138

Darwin Prockop

Texas A&M Health Science Center, Professor

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。