

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03739

研究課題名（和文）機能増強させた細胞由来のエクソソームを用いたcell-free血管再生療法の開発

研究課題名（英文）Development of vascular regeneration therapy by exosome derived from enhanced cells

研究代表者

濱野 公一（HAMANO, Kimikazu）

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60263787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：エクソソーム治療は、患者さんに細胞を移植しない再生医療療法の一つとして注目されているが、その研究のほとんどが、細胞が分泌するエクソソーム自体をそのまま患者さんに投与するものである。本研究では、血管新生能を持つmicroRNAを見出し、そして、そのmicroRNAをエクソソームに内包させることで、エクソソーム治療の効果を高めることができることをマウスモデルで証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは、cell-free治療法として注目されているが、エクソソームの特性をより高めることで、高い治療効果が期待できる。本研究では、血管新生能を持つmicroRNAをエクソソームに内包させることで、細胞が分泌するエクソソームをそのまま投与するよりも高い血管新生効果があることが確認された。本研究の結果は、将来のエクソソーム治療の開発の一端を担う先進的なものであり、高い治療効果を提供できる可能性を秘めている。

研究成果の概要（英文）：Development of most exosome treatment is on the premise that naive exosomes are injected. In this study, modified exosomes including angiogenic microRNAs induced angiogenesis compared to the control in mice models.

研究分野：再生医療

キーワード：血管新生 エクソソーム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心不全および重症下肢虚血に対する細胞移植による血管新生療法の開発が世界中で実施されている。細胞移植による血管新生療法の治療効果は、移植された細胞が生体に生着して血管を作るのではなく、移植された細胞が分泌する因子が生体の細胞を活性化させることで、生体の細胞が血管を作ると考えられている。このような治療効果はパラクライン効果と呼ばれている。このパラクライン効果をもたらす因子の中で重要であると考えられているのが、エクソソームである。

エクソソームは細胞が分泌する直径約 20~120 nm の脂質二重膜からなる膜小胞であり、DNA、RNA、タンパク等を内包している。エクソソームは、エクソソームを分泌する細胞の特性を受け継いでいると考えられており、細胞移植により血管新生をもたらす幹細胞が分泌するエクソソーム自体が血管新生をもたらす効果を持つことが動物モデルで報告されている。

これまでの幹細胞由来エクソソームが血管新生を誘導する機序解析から、幹細胞由来エクソソームに内包されている microRNA が血管新生において重要であると報告されている。そして、これまでのエクソソームによる血管新生療法の開発は、幹細胞由来エクソソームをそのまま投与方法であり、エクソソームの機能を増強させる方法は実施されていなかった。

我々は、血管新生能を持つ microRNA をエクソソームに人工的に内包させることで、これまでよりも強力なエクソソーム投与による血管新生療法を開発できるのではないかと考えた。

我々は、これまでに、移植細胞を移植前に低酸素で培養することで、移植後の血管新生の治療効果や移植細胞の生着率が向上する低酸素プレコンディショニング法を報告している。そこで、幹細胞を低酸素で培養することで、その幹細胞が分泌するエクソソームに内包されている microRNA の量が上昇する microRNA の中には、血管新生能を持つ microRNA があるのではないかと着想し、本研究を開始するに至った。

### 2. 研究の目的

#### (1) 低酸素培養した幹細胞が分泌するエクソソームに内包されている microRNA の解析

血管新生能が高いエクソソームを作製するために、血管新生能を持つ microRNA をエクソソームに内包させる必要がある。幹細胞を低酸素および通常培養し、低酸素培養された幹細胞由来エクソソームで内包量が上昇している microRNA、または、低酸素培養のみで内包が確認される microRNA を見出す。

#### (2) 低酸素培養でエクソソーム内包量が上昇した microRNA の血管新生能の解析

内皮細胞の細胞増殖アッセイおよびマウス下肢虚血モデルに、microRNA を内包させたエクソソームを添加培養および投与することで、低酸素培養でエクソソーム内包量が上昇した microRNA の中から血管新生能を持つ microRNA を見出す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 幹細胞の培養に適した無血清培地の選択

幹細胞としては歯髄幹細胞 (LONZA 社) を選択した。エクソソームは FBS 等の血清に含まれているため、歯髄幹細胞を KBM ADSC-4 (コージンバイオ株式会社) で培養した。歯髄幹細胞を 96-well plate に播種し、低酸素培養 (33% CO<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、2% O<sub>2</sub>) と通常培養 (37% CO<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、大気圧酸素濃度) のインキュベータで培養し、播種して、1 日後、3 日後、5 日後、7 日後の細胞増殖能を MTS 試薬 (Promega 社) で確認した。490nm の吸光度を、ARVO X4 (PerkinElmer 社) で測定した。歯髄幹細胞を KBM ADSC-4 で 7 日間培養した時に、歯髄幹細胞が培養液中に分泌するエクソソーム濃度を CD9/CD63 Exosome ELISA Kit (コスモ・バイオ株式会社) で測定した。歯髄幹細胞を KBM ADSC-4 で 7 日間培養した時に、歯髄幹細胞が培養液中に分泌するエクソソームに内包されている VEGF (vascular endothelial growth factor: 血管内皮細胞増殖因子) 濃度を VEGF ELISA kit (R&D Systems 社、# DVE00) で測定した。

#### (2) microRNA 解析

7 日間低酸素培養した歯髄幹細胞および 7 日間通常培養した歯髄幹細胞から miRNeasy Micro Kit (Qiagen 社) を使用して microRNA を抽出し、miRNA Oligo chip (東レ株式会社) により microRNA の発現を解析した。

#### (3) microRNA を発現するプラスミド作製と microRNA 内包エクソソームの作製

表 1 の No8 を除く microRNA をコードしている DNA 配列を 293T 細胞由来のゲノム DNA を鋳型にして PCR で増幅させ、pmR-mCherry Vector (タカラバイオ株式会社) に導入することで、microRNA を発現するプラスミドを作製した。作製したプラスミドを 293T 細胞に導入して無血清

培地で培養することで、293T 細胞が分泌するエクソソームに目的の microRNA を内包させた。

#### (4) 内皮細胞の細胞増殖アッセイ

ヒト大動脈内皮細胞(タカラバイオ株式会社)を 96-well plate に播種し、各ウェルにプラスミドで作製した microRNA 内包エクソソームを添加して培養後、ヒト大動脈内皮細胞の細胞増殖を MTS 試薬で評価した。

#### (5) microRNA mimic 内包エクソソームとマウス下肢虚血モデルに対する治療効果の検討

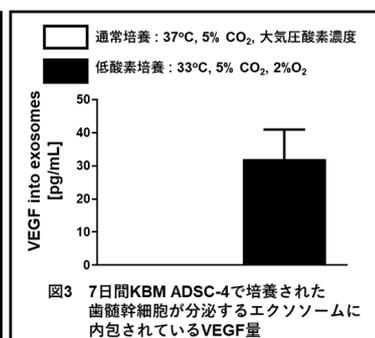
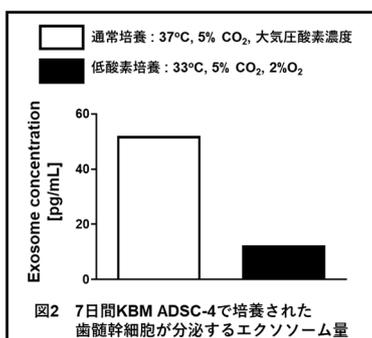
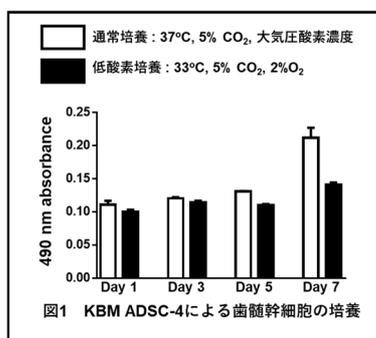
合成された Scramble、miR-4485-3p、miR-765、miR-4284、miR-3678-3p の mimic(味の素バイオファーマサービス・株式会社ジーンデザイン)を 293T 細胞に導入して無血清培地で培養することで、293T 細胞が分泌するエクソソームに目的の microRNA mimic を内包させた。

マウス左大腿動脈を結紮したマウス下肢虚血モデルを作製し、左大腿部に microRNA mimic 内包エクソソームを筋肉注射して経時的に血流をドップラー(laser speckle perfusion imaging system、OMEGA ZONE、Omega Wave)で測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯髄幹細胞の無血清培地 ADSC-4 での培養

歯髄幹細胞は KBM ADSC-4 で培養可能であったが、7 日間培養した時を比較すると、低酸素培養による細胞増殖は、通常培養よりも低い結果であった(図 1)。歯髄幹細胞を 7 日間培養した時の培養液中のエクソソーム濃度を測定すると、低酸素培養により歯髄幹細胞が分泌するエクソソーム量は、通常培養よりも低い結果であった(図 2)。次に、エクソソームに内包されている VEGF 量を比較すると、低酸素培養により歯髄幹細胞が分泌するエクソソームに内包されている VEGF 量は、通常培養よりも高い結果であった(図 3)。血管新生に重要な働きをする VEGF 量が、低酸素培養によりエクソソーム内で上昇したことから、低酸素培養により歯髄幹細胞が分泌するエクソソームには、血管新生能を持つ microRNA の内包量が上昇するのではないかと考えられた。



#### (2) microRNA 解析

表 1 は解析結果である。No1~No5 の microRNA は、低酸素培養した歯髄幹細胞が分泌するエクソソームが内包していることが認められた microRNA であり、通常培養した歯髄幹細胞が分泌するエクソソームには内包されていなかった。No6~No13 の microRNA は、通常培養と比較して、低酸素培養した歯髄幹細胞が分泌するエクソソームに内包されている microRNA 量が 2.5 倍以上上昇していた microRNA である。

表1 microRNAの発現解析の結果

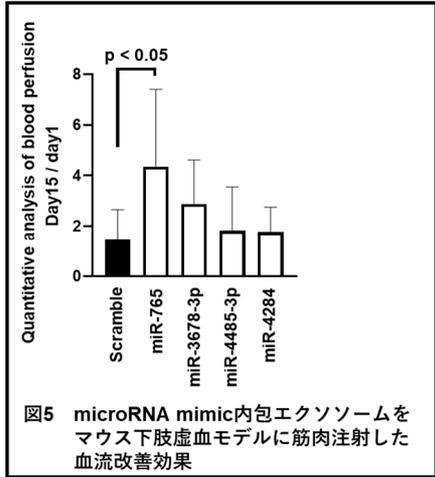
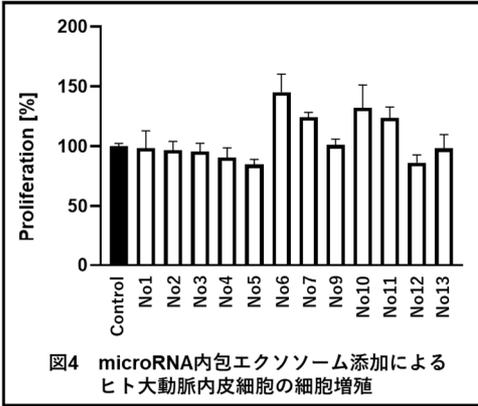
	ratio	
microRNA name	(Hypo/ Normo)	
No1	hsa-miR-889-3p	11.64
No2	hsa-miR-659-5p	7.31
No3	hsa-miR-4519	5.17
No4	hsa-miR-551b-5p	4.06
No5	hsa-miR-7853-5p	4.05
No6	hsa-miR-4485-3p	3.61
No7	hsa-miR-765	3.39
No8	hsa-miR-1973	3.06
No9	hsa-miR-6769b-5p	2.97
No10	hsa-miR-4284	2.94
No11	hsa-miR-3678-3p	2.81
No12	hsa-miR-4756-5p	2.72
No13	hsa-miR-3162-5p	2.59

#### (3) 内皮細胞の細胞増殖アッセイ

ヒト大動脈内皮細胞にプラスミドを用いて作製した microRNA 内包エクソソームを添加したところ、No6(miR-4485-3p)、No7(miR-765)、No10(miR-4284)、No11(miR-3678-3p)を内包したエクソソームは、Mock のプラスミドで作製したエクソソームを添加したコントロールと比べて、ヒト大動脈内皮細胞の細胞増殖を促す結果であった(図 4)。

#### (4) microRNA mimic 内包エクソソームとマウス下肢虚血モデルに対する治療効果の検討

マウス下肢虚血モデルに microRNA mimic 内包エクソソームを筋肉注射後に、経時的に血流を測定していくと、Scramble 内包エクソソームと比較して、miR-765 内包エクソソームを投与されたマウスでは血流量が有意に改善した。これは、エクソソームに内包させるのに適した血管新生能 microRNA として miR-765 を見出したことを示唆する結果であった。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Matsuno Yutaro, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 15
2. 論文標題 Preserving the endothelium in saphenous vein graft with both conventional and no-touch preparation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cardiothoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 317
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13019-020-01352-3	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 -
1. 著者名 Nishimoto Arata, Takemoto Yoshihiro, Saito Toshiro, Kurazumi Hiroshi, Tanaka Toshiki, Harada Eijiro, Shirasawa Bungo, Hamano Kimikazu	4. 巻 533
2. 論文標題 Nuclear $\beta$ -catenin expression is positively regulated by JAB1 in human colorectal cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 548 ~ 552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.09.007	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 -
1. 著者名 Yoshimura Koichi, Aoki Hiroki, Teruyama Chie, Iijima Masumi, Tsutsumi Hiromori, Kuroda Shun'ichi, Hamano Kimikazu	4. 巻 21
2. 論文標題 A Novel Hybrid Drug Delivery System for Treatment of Aortic Aneurysms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5538 ~ 5538
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21155538	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 -
1. 著者名 Takashi Nagase, Koji Ueno, Takahiro Mizoguchi, Makoto Samura, Takasuke Harada, Kotaro Suehiro, Bungo Shirasawa, Noriyasu Morikage, Kimikazu Hamano	4. 巻 12
2. 論文標題 Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 2652 ~ 2663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Fujita Akira, Ueno Koji, Saito Toshiro, Yanagihara Masashi, Kurazumi Hiroshi, Suzuki Ryo, Mikamo Akihito, Hamano Kimikazu	4. 巻 56
2. 論文標題 Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic myocardial infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 European Journal of Cardio-Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 1062 ~ 1074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ejcts/ezz122	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永瀬隆、上野耕司、吉峯宗大、岩本圭亮、溝口高弘、佐村誠、柳原正志、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 異なる創傷治癒モデルにおける自家および他家細胞シートの創傷治癒効果の比較検討
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉峯宗大、村上順一、中村玉美、佐野史歩、上野耕司、田中俊樹、濱野公一
2. 発表標題 積層線維芽細胞シートを用いた気管支断端瘻予防法の開発
3. 学会等名 第19回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩本圭亮、齊藤寿郎、山本直宗、田中裕也、上野耕司、柳原正志、竹本圭宏、原田栄二郎、濱野公一
2. 発表標題 ラット膵液瘻モデルにおいて、積層化線維芽細胞シートは膵液瘻を予防し、正常膵組織を温存する
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田剛佑、森景則保、上野耕司、大塚 遼、溝口高弘、永瀬 隆、佐村 誠、末廣晃太郎、濱野公一
2. 発表標題 虚血組織に特異的に発現する細胞表面抗原の同定とエクソソームを用いたcell-free再生療法の開発
3. 学会等名 第119回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2019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	上野 耕司 (UENO Koji) (30736070)	山口大学・医学部附属病院・助教  (15501)	
研究分担者	佐村 誠 (SAMURA Makoto) (30773402)	山口大学・医学部附属病院・助教  (15501)	
研究分担者	森景 則保 (MORIKAGE Noriyasu) (50335741)	山口大学・医学部附属病院・講師  (15501)	

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
---------	---------