

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03781

研究課題名(和文)安全で効率の高い間葉系幹細胞由来エクソソームによる変形性関節症治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a safe and efficient methods for the collection of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of osteoarthritis

研究代表者

中村 憲正 (Nakamura, Norimasa)

大阪大学・国際医工情報センター・招へい教授

研究者番号：50273719

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)：脂肪由来間葉系幹細胞(MSC)が分泌するエクソソームを主体とする細胞外小胞(EV)は、培養条件によってサンプル中のエクソソーム含有量や粒子数、タンパク質の組成が大きく異なっていることが判明した。回収したEVサンプルの治療効果は、条件によっては、夾雑物の影響が大きく関与することがわかり、純度の高いEVではヒトロ実験において高い治療効果を認めた。高純度EVを用いて動物実験を行ったところ、変形性膝関節症モデルマウスに対して軟骨変性抑制効果が確認できた。本研究により、臨床応用可能な安全で効率的な手法でEVを回収する条件を確立させることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉系幹細胞(MSC)は、損傷組織の修復促進効果が知られており、再生医療・細胞治療における優れたソースとして注目を集めている。一方で、MSCが産生するエクソソームを主体とした細胞外小胞(EV)も、MSCと同様の治療効果を示すことが示唆されているが、臨床グレードでの回収法についての詳細な議論はなされていない。本研究では、MSC由来EVを臨床応用するにあたって、安全で効率的な手法でEVを回収する条件を確立させ、本手法を用いて得られたEVが高い治療効果を有していることを明らかにした。本研究は、今後のEV臨床応用に向けた基礎となる研究であり、得られた成果の社会的意義は非常に高いと考える。

研究成果の概要(英文)：It was reported that adipose-derived mesenchymal stem cells (MSCs) secreted extracellular vesicles (EVs), which are mainly composed of exosomes and have some therapeutic effect. In this study, it was revealed that the amount of exosome, number of particles and protein composition in EV fractions was varied greatly depending on the culture conditions. The therapeutic effect of the collected EV samples was found to be greatly affected by other foreign substances depending on the conditions and EVs with high purity showed high therapeutic efficacy in vitro experiments. Also, high purity EVs showed that the effect of suppression for the cartilage degeneration in mice with knee osteoarthritis. This research established a safe and efficient extraction methods for EVs with highly therapeutic effect that can be applied clinical use.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 間葉系幹細胞 エクソソーム 変形性関節症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から分泌される大きさ 30~200nm 程度の、脂質二重膜構造をもつ小胞である。近年の研究から、エクソソームが細胞間相互作用の媒体として重要な役割をもつことが分かってきた。タンパク質だけでなく microRNA (miRNA)、mRNA などの遺伝物質が、エクソソームの授受を介して細胞間を移動することが示された。送達された分子はエクソソームを受け取った細胞の形質を変化させ、種々の生命現象の制御に寄与する。一方、MSC は成体に存在する幹細胞で、損傷組織の修復促進効果が知られており、再生医療・細胞治療における優れたソースとして注目を集めているが、近年の研究から複数種類の疾患に対し MSC が産生するエクソソームを主体とする細胞外小胞 (MSC-EV) が MSC 自身と同様の治療効果を示すことが示唆され (Katsuda and Ochiya, Stem Cell Res. Ther. 2015)、MSC-EV を用いた新規治療法の可能性も見えてきた。変形性関節症 (OA) においてもその例外ではなく、脂肪や滑膜由来の MSC の関節内注射による治療法の臨床応用は現在世界的広がりを見せているが (McIntyre et al. Am J Sports Med. 2017, Chahla et al. JBJS Am. 2016)、近年の基礎研究において MSC-EV による関節破壊抑制効果が報告され (Cosenza et al. Sci. Report 2017, Mao et al. Stem Cell Res Ther 2018, J. Cell Mol Med 2018, Wang et al. Stem Cell Res Ther 2018)、新たな治療法としての可能性が示唆される。その意味で、MSC-EV 治療の臨床応用に向け、安全でかつ効率的な治療用エクソソーム調製のための MSC の培養条件の確立は急務である。ところが、これまでの研究では MSC エクソソーム投与による治療効果のみが検証され、調製法によるエクソソームの質、量的変化、さらにはそれらを用いた治療効果を比較した研究はない。つまり、MSC の培養条件を変えることによりエクソソームの質と産生量がいかに変化するかという命題は明らかにされていない。一方、エクソソームの安全性はその産生細胞である MSC の安全性により担保されるが、MSC の関節内注射治療の安全性は Systemic Review によって高いエビデンスをもって報告されている (Mc Intyre et al. Am J Sports Med. 2017, Chahla et al. JBJS Am. 2016)。従って、将来の臨床応用を考えた場合、この MSC の高い安全性という長所を損なわない、つまり造腫瘍性等の有害な形質を MSC に持ち込まないような培養法の調製に留意することが望ましい。

2. 研究の目的

本研究の目的は MSC-EV による治療効果を最適化するために、ヒト脂肪組織由来 MSC の培養条件の調整によりエクソソームを中心とした細胞外小胞の産生量や質がいかに変化するかを明らかにすることである。培養条件に関しては将来の臨床応用を考慮し、細胞内への有害な形質導入のリスクを避けるために、MSC への遺伝子導入による細胞の形態に変化を及ぼす刺激は除外した培養条件の調整に絞ってその影響を解析する。

3. 研究の方法

本研究では手術時に切除され、廃棄処分となる余剰な脂肪組織より分離、培養した (2-4 継代) MSC) を用いた。培養条件の異なる細胞群間の比較研究を行う場合、同一組織サンプルから調製したものをを用いた。種々の培養条件を選定し、各条件で得られた EV の定量や純度を測定した。ナノサイトにより粒子濃度の算出を行い、エクソソーム量は ELISA (CD9/63 測定キット、CSR 社) や ExoScreen 法 (Yoshioka, et al. Nat. Commun. 2014) を用いて測定し、タンパク質量によって各群での補正を行った。EV の回収法としては、臨床応用を見据えて、清潔操作が困難である超遠心法では行わず、限外ろ過でのタンジェンシャルフローフィルトレーション (TFF) を行った。各手法で得られた EV を軟骨細胞に添加し、増殖能、遊走能の亢進、アポトーシス抑制能、細胞外基質合成能を評価した。また、最も純度の高い EV を用いてコラゲナーゼ誘発変形性膝関節症マウスに対する EV 関節内注射による OA 進行抑制効果を評価した。

4. 研究成果

(1) 培養中の酸素分圧条件による EV 分泌量や効果についての検討

開始当初の実験において、超遠心法にて MSC-EV が回収できるベースとなる条件を確認した (図 1)。このベースの条件を利用して、比較項目として、まず培養中の酸素分圧条件による違いを確認した。通常酸素分圧 (20% O₂) で培養した場合と比較して、低酸素分圧条件 (1% O₂) にすることで、EV の産生量が有意に増加した (図 2)。しかしながら、培養軟骨細胞に添加しても増殖能に有意な差は見られなかった (図 3)。酸素分圧条件を変動させても、回収された EV サンプル中には種々の夾雑物も認めていたことから、本研究期間において、純度高く回収できる方法の検討を行うこととした。

(2) 臨床応用を見据えた方法での高純度 EV サンプルの回収手法の検討

事前条件検討の末、最終的に比較する培養条件を 4 種に選定し、培養上清中の EV 量や、TFF にて回収した EV サンプルを比較した。各サンプルにおいて、エクソソーム含有量や粒子数、タンパク質の組成が大きく異なっていることがわかった。ピトロ実験においては、各培養条件から回

回収した EVs を用いて軟骨細胞の増殖、遊走能の亢進やアポトーシス抑制能、細胞外基質合成能を評価したところ、条件によっては、EV サンプル中に存在する夾雑物の影響が依然として大きく関与することがわかり、純度の高い EV サンプルではコントロール群と比較して有意に高い治療効果を認めた。各培養条件のうち最も高純度で回収できた EV サンプルを用いて動物実験を行ったところ、変形性膝関節症モデルマウスに EV サンプルを関節腔内投与することで軟骨変性抑制効果が確認できた。本研究により、臨床応用可能な効率的な MSC-EV 回収において基礎となる最適な培養条件を確定させることができた。

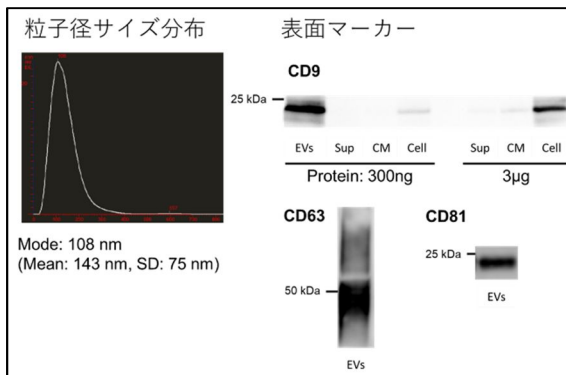


図1 超遠心法にて回収した MSC-EV の特徴

粒子サイズの中央値は108nm。EV フラクシオンにて CD9/CD63/CD81 の発現が確認できた。EVs : EV フラクシオン、Sup : EV フラクシオンを除いた超遠心後の上清液、CM : 超遠心前の培養上清液 (Conditioned medium)、Cell : 細胞溶解液

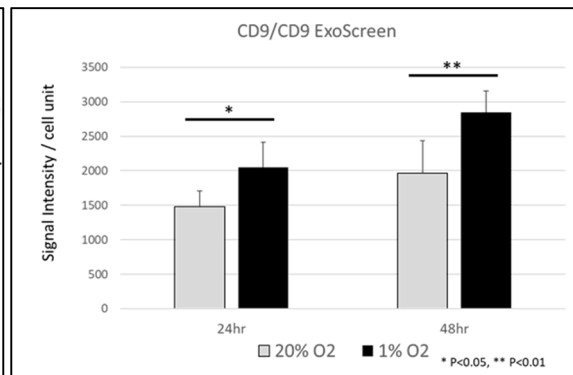


図2 酸素分圧条件による EV 分泌量の検討

ExoScreen 法にて培養上清中の CD9 発現小粒子のシグナル強度を測定した。24 時間、48 時間いずれのタイミングにおいても、低酸素分圧条件において単位細胞あたりの分泌量の有意な増加を認めた。

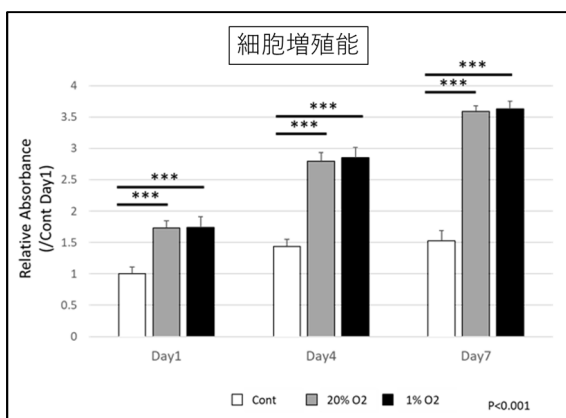


図3 酸素分圧条件による増殖能の検討

各条件で得られた EV を軟骨細胞に添加し、細胞増殖に与える影響を検討した。コントロール群 (PBS 添加群) と比較していずれのタイミングにおいても有意な上昇は認められたものの、分圧条件の異なる EV 間では、有意差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Hanai Hiroto, Jacob George, Nakagawa Shinichi, Tuan Rocky S., Nakamura Norimasa, Shimomura Kazunori | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Potential of Soluble Decellularized Extracellular Matrix for Musculoskeletal Tissue Engineering - Comparison of Various Mesenchymal Tissues | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.581972 | 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 該当する |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Jacob George, Shimomura Kazunori, Nakamura Norimasa | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Osteochondral Injury, Management and Tissue Engineering Approaches | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2020.580868 | 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 該当する |

〔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 | 弓削 類 (Yuge Rui) (20263676) | 広島大学・医系科学研究科（保）・教授 (15401) | |
| 研究分担者 | 紀ノ岡 正博 (Kino-oka Masahiro) (40234314) | 大阪大学・工学研究科・教授 (14401) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 下村 和範 (Shimomura Kazunori) (40755998) | 大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401) | |
| 研究分担者 | 落谷 孝広 (Ochiya Takahiro) (60192530) | 東京医科大学・医学部・教授 (32645) | |

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 |
|---------|---------|
| | |