

令和 5 年 4 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09272

研究課題名(和文)血管新生能を有するmicroRNAを改変した人工核酸による血管新生療法の開発

研究課題名(英文)Development of angiogenic microRNA-contained exosomes for angiogenesis therapy

研究代表者

上野 耕司 (UENO, Koji)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30736070

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)：本研究は、新規血管新生療法を開発する為に、血管新生能を有するmicroRNAを内包させたエクソソームによる治療効果の機序の一端を解明した。研究代表者がこれまでに見出している血管新生能を有するmicroRNAをエクソソームに内包させたものを、マウス下肢虚血モデルおよびヒト大動脈由来内皮細胞に投与すると、血管新生において重要な働きをするbFGFの発現レベルが上昇する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虚血組織に対するエクソソーム投与による血管新生の治療効果は、エクソソームに内包されているmicroRNAが関与していることが報告されている。本研究は、エクソソーム投与による血管新生の治療効果を高めるために、エクソソームに内包させるのに適したmicroRNAを検討したものである。本研究で検討したmicroRNAは、血管新生で重要な働きをするbFGFの発現を高めたことから、本研究結果はエクソソームによる血管新生療法に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Our team elucidated mechanism of therapeutic effect by angiogenic microRNAs-contained exosomes for new angiogenic therapy.

This study reports that one microRNA upregulates the expression of bFGF in mice model and human endothelial cells derived from the aorta.

研究分野：血管新生療法

キーワード：microRNA 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

重症下肢虚血に対する第一選択は外科的治療であるが、外科的治療を実施しても末梢循環が改善しない症例も存在する。また、外科的治療を実施出来ない症例も存在する。末梢循環が改善しないため、指・下肢切断を余儀なくされる症例も存在する。そのような重症下肢虚血に対して細胞移植による血管新生療法の研究が実施されている。

現在の細胞移植による血流改善の機序は、移植された細胞が、生体内で血管を構成する細胞になるのではなく、移植された細胞が分泌する成長因子が、生体内の細胞を活性化させることで、生体内の細胞が血管を作り出すと考えられている。この移植された細胞が分泌する成長因子として、サイトカイン、ケモカイン、エクソソームなどがある。

エクソソームは細胞が分泌すると考えられている脂質二重膜からなる細胞外小胞であり、現在ではエクソソームは慣用名として用いられている。エクソソームは、そのサイズから細胞外小胞 (extracellular vesicles) の中で、sEV (small extracellular vesicles) と mEV (medium extracellular vesicles) に該当すると考えられる。

エクソソームを分泌する細胞の DNA、RNA、タンパク等がエクソソームに内包されていることから、エクソソームは、エクソソームを分泌する細胞の特性を持つと考えられている。そのため、幹細胞を移植するのではなく、幹細胞由来エクソソームをマウス下肢虚血モデルに対して投与すると、血流が改善することが報告されている。また、幹細胞由来エクソソームが血流改善を誘導する機序としては、幹細胞由来エクソソームに内包されている microRNA が関与していることが報告されている。

そのため、研究代表者は、血管新生能を持つ microRNA をエクソソームに内包すれば、従来の細胞由来エクソソームよりも高い血管新生効果を誘導することが出来るのではないかと考え、これまでに血管新生能を持つ microRNA を探索する研究を行ってきた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究代表者が、これまでに血管新生能を持つ microRNA 候補として選んでいる microRNA が、どのような機序で血管新生を誘導するかについて解析することである。

3. 研究の方法

(1) microRNA mimic のエクソソーム内包

合成された Scramble および miR-709 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 細胞に導入した。293T 細胞を無血清培地で培養し、293T 細胞が培養液中に分泌するエクソソームを回収した。293T 細胞および培養液中のエクソソームから microRNA を抽出し、miR-709 の発現レベルを TaqMan Advanced miRNA Assays (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて qPCR で解析した。

(2) マウス下肢虚血モデルに対するエクソソーム投与後の遺伝子発現解析

左大腿動脈を結紮することで、マウス下肢虚血モデルを作製した。左大腿動脈を結紮して 4 日後に、Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームを、左大腿部に筋肉注射した。エクソソームを筋肉注射して 2 日後に、左大腿部を採取し、RNA を抽出した。そして、total RNA から cDNA を作製し、qPCR で bFGF の発現を解析した。Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームを投与したマウス下肢虚血モデルはそれぞれ 6 匹であった。

(3) ヒト大動脈由来内皮細胞に対するエクソソーム添加後の発現解析

Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームをヒト大動脈由来内皮細胞に添加して 8 時間後、24 時間後、48 時間後にヒト大動脈由来内皮細胞から RNA を抽出し、miR-709 の発現レベルを TaqMan Advanced miRNA Assays を用いて qPCR で解析した。また、Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームをヒト大動脈由来内皮細胞に添加して 8 時間後、24 時間後にヒト大動脈由来内皮細胞から RNA を抽出し、BMX および bFGF の発現レベルを qPCR で解析した。

4. 研究成果

(1) microRNA mimic のエクソソーム内包

図 1 は、miR-709 の発現解析の結果である。miR-709 mimic を 293T 細胞に導入した時の 293T 細胞における miR-709 の発現レベルは、Scramble mimic を 293T 細胞に導入した時の 293T 細胞における miR-709 に比べて、約 750 倍上昇していた(図 1 左)。この時のエクソソームに内包されている miR-709 の内包量を解析すると、miR-709 mimic を導入した 293T 細胞が分泌したエクソソームの miR-709 の内包量は、Scramble mimic を導入した 293T 細胞が分泌したエクソソームの miR-709 に比べて、約 140 倍高い結果であった(図 1 右)。

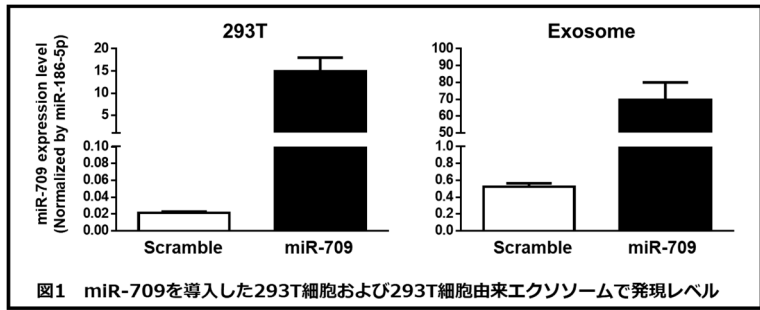


図1 miR-709を導入した293T細胞および293T細胞由来エクソソームで発現レベル

(2) マウス下肢虚血モデルに対するエクソソーム投与後の遺伝子発現解析

マウス下肢虚血モデルに対して、Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームを筋肉注射して 2 日後の、左大腿部における bFGF の発現を解析したところ、miR-709 内包エクソソームを筋肉注射した左大腿部における bFGF の発現は、Scramble 内包エクソソームを筋肉注射した左大腿部に比べて、有意に高い発現レベルであった(図 2)。

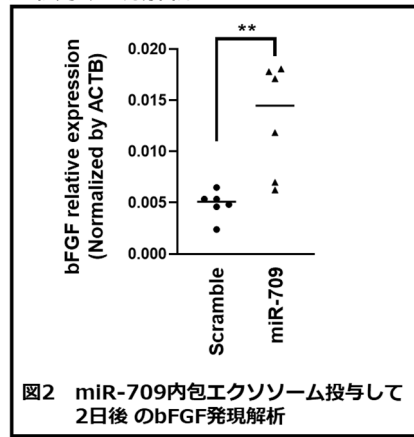


図2 miR-709内包エクソソーム投与して2日後のbFGF発現解析

(3) ヒト大動脈由来内皮細胞に対するエクソソーム添加後の発現解析

Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームをヒト大動脈由来内皮細胞に添加して 8 時間後、24 時間後、48 時間後におけるヒト大動脈由来内皮細胞の miR-709 の発現レベルを解析すると、添加して 8 時間後では、miR-709 の発現レベルは、Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームを添加して 8 時間後では、ヒト大動脈由来内皮細胞において、miR-709 の発現レベルは同等であった。Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームを添加して 24 時間後および 48 時間後では、miR-709 内包エクソソームを添加したヒト大動脈由来内皮細胞における miR-709 の発現レベルは、Scramble 内包エクソソームと比べて、上昇している結果であった(図 3)。

次に、Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームをヒト大動脈由来内皮細胞に添加して 8 時間後および 24 時間後でのヒト大動脈由来内皮細胞の BMX (非受容体型チロシンキナーゼ) および bFGF の発現レベルを解析すると、添加して 8 時間後ではヒト大動脈由来内皮細胞の BMX (図 4 上段) および bFGF (図 4 下段) は同等であった。Scramble 内包エクソソームおよび miR-709 内包エクソソームを添加して 24 時間後では、miR-709 内包エクソソームを添加したヒト大動脈由来内皮細胞における BMX および bFGF の発現レベルは、Scramble 内包エクソソームと比べて、上昇している結果であった。

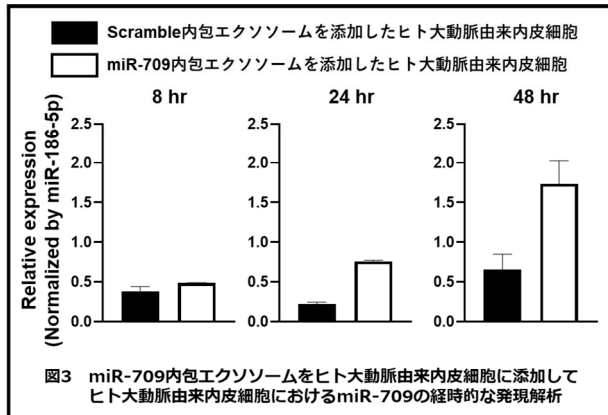


図3 miR-709内包エクソソームをヒト大動脈由来内皮細胞に添加してヒト大動脈由来内皮細胞におけるmiR-709の経時的な発現解析

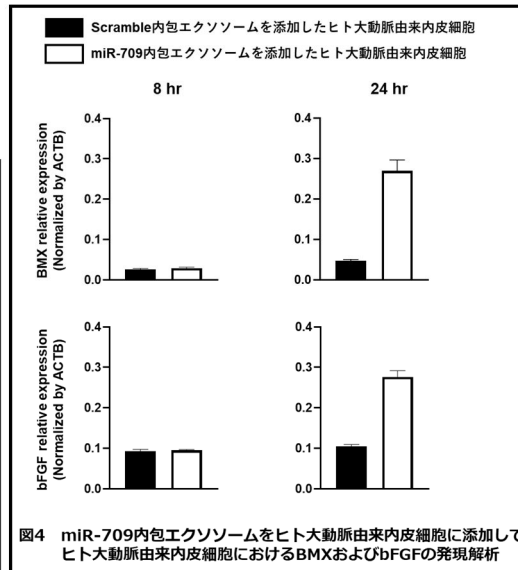


図4 miR-709内包エクソソームをヒト大動脈由来内皮細胞に添加してヒト大動脈由来内皮細胞におけるBMXおよびbFGFの発現解析

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 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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	佐村 誠 (SAMURA Makoto) (30773402)	山口大学・医学部附属病院・助教 (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
---------	---------