

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10038

研究課題名(和文)エクソソームを細胞間コミュニケーションツールとする創傷治癒機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of wound healing by extracellular vesicles as intercellular communication tools

研究代表者

下仲 基之 (Shimonaka, Motoyuki)

東京理科大学・理学部第一部化学科・教授

研究者番号：30277272

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)：生体内に近い条件下で創傷治癒機構の解析を行うため、血管内皮細胞と線維芽細胞を用いた灌流培養モデル系を確立した。この系を用いて血管損傷修復に対するエクソソームの作用を検討したところ、いずれの細胞由来のエクソソームも損傷修復を促進することを明らかにした。さらに損傷を受けた血管内皮細胞由来のエクソソームは正常な内皮細胞由来のエクソソームより損傷修復を遅らせることから、エクソソームが分泌細胞の状況に応じて損傷修復過程を制御していることがわかった。また、プラスミノゲンは血管内皮細胞の増殖と遊走を促進し、エクソソームは遊走の方向性を制御することで協調的に損傷修復を促していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血管内皮細胞と線維芽細胞による灌流培養系を確立し、エクソソームによる創傷治癒過程の制御機構を解析した。この結果は、正常細胞が分泌するエクソソームの新たな役割を提示するとともに、血漿成分とエクソソームとの協調作用が損傷修復に重要な役割を担っていることを示すものである。これら因子についての詳細をさらに検討し臨床レベルの研究に応用することにより、外科的治療を受けている全ての患者に大いなる利益をもたらす「癒痕なき治癒」へ向けた第一歩になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the wound healing mechanism under conditions close to those in physiological states, we established the perfusion cell culture model system using vascular endothelial cells and fibroblast cells. When the effects of exosomes on vascular injury repair were investigated using this system, it was found that exosomes secreted from both cells promoted injury repair. Furthermore, as exosomes secreted from damaged vascular endothelial cells delayed injury repair compared to exosomes secreted from normal endothelial cells, it was clarified that exosomes controlled the injury repair process depending on the conditions of secreting cells. It was also demonstrated that plasminogen promoted the proliferation and migration of vascular endothelial cells, and exosomes coordinately promoted injury repair by controlling the direction of the cell migration.

研究分野：生化学

キーワード：創傷治癒 エクソソーム 灌流培養 血管内皮細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

創傷治癒の過程は、損傷後の止血および炎症反応、血管新生を含む細胞増殖反応、コラーゲンの沈着・退縮反応をともなう再構築過程を経て最終的な回復へと至る。これらの各過程は、それぞれが時間的・空間的に密接に関連づけられながら制御されている。すなわち、血管内皮細胞とその周辺細胞である平滑筋細胞、線維芽細胞などと血液成分とが協調的に作用することで進行し完結する。この分野におけるこれまでの基礎的研究は、主に各種培養細胞系を用いた *in vitro* の実験、もしくはマウスなどを使った *in vivo* の実験系を用いて行われてきた。しかし前者には系を単純化しすぎているという問題点が、後者には詳細な機構解明が難しいという問題があり、両者の橋渡しとなる実験系の確立が求められている。

一方エクソソーム（細胞外分泌顆粒）は、ほとんど全ての細胞が分泌する直径 100 nm 程度の小胞顆粒であり、その内部に様々なタンパク質や核酸などを含んでいる。近年、がん細胞が周辺細胞との間でエクソソームを介したコミュニケーションを行うことで、転移先の環境をがん細胞にとって有利なものへと変えることや、転移先を決定づけるための道標としていることなどが報告され注目を集めているが、正常細胞由来のエクソソームの生理的な機能などについては、未だ明らかになっていない。

創傷治癒の過程を研究する有効な実験系は未だ確立されていないことから、各種細胞と血液タンパク質および血球成分、さらにこれらの細胞によって分泌されるエクソソーム、これらがどのような相互作用を及ぼすことでその過程を制御しているかを解明するための実験系の確立が望まれている。そのような系を確立することができれば、正常細胞が分泌するエクソソームの新たな役割の解明が可能となるとともに、血漿成分とエクソソームとの協調作用が損傷修復に及ぼす影響を明らかにすることができる。さらに、これらの因子についての詳細を検討し臨床レベルの研究に応用することができれば、外科的治療を受けている全ての患者に大いなる利益をもたらす「瘢痕なき治癒」へ向けた第一歩になると期待される。

2. 研究の目的

創傷治癒の過程は、炎症反応期・細胞増殖期・組織再構築期という3つのステップがオーバーラップしながら進行し、最終的な治癒へと至る。損傷の治癒過程において形成される瘢痕をなくすことが臨床的には非常に重要な課題となっているが、そのためには創傷治癒の後期過程における細胞間コミュニケーションを理解することが重要である。ここでは、細胞外マトリックスや血液中の有形成分および可溶性成分、そして線維芽細胞と血管構成細胞との間の多次元的な相互作用に加え、細胞間コミュニケーションツールとして最近注目を集めているエクソソームのタンパク質や miRNA によるタンパク質発現制御などが極めて重要な役割を担っていると考えられる。

本研究は、*in vivo* と *in vitro* の実験系の橋渡しとなる *ex vivo* の創傷治癒実験モデルを構築するため、生体内に近い条件を模倣できる系として、血管内皮細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞などの異種細胞を用いた灌流培養系を確立し、可溶性成分および血球成分と各細胞間の相互作用を解析するとともに、エクソソームの新たな生理機能を探索することで、創傷治癒過程のメカニズム解明を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 本研究申請者は、これまでに様々な血漿タンパク質や血球成分が創傷治癒過程におよぼす役割について研究してきた。すなわち、血小板膜ラフトに存在するプロテオグリカンや糖脂質が血小板凝集制御に関わっていること、線溶系の主要タンパク質であるプラスミノゲンの各種内部断片が他の血漿タンパク質との相互作用を介して血管内皮細胞の増殖を制御すること、また赤血球の膜タンパク質や赤血球中に含まれる可溶性タンパク質が血管内皮細胞や平滑筋細胞の増殖を促進または抑制することを明らかにし、これらの現象が統合的に関与することによって創傷治癒過程が制御されているという可能性について検討してきた。

本研究では、創傷治癒過程が進行するために必要となる細胞増殖能に対するプラスミノゲンとエクソソームの効果を WST-8 アッセイおよびセルカウンターを用いて評価し、細胞遊走能に対するプラスミノゲンとエクソソームの効果をスクラッチアッセイおよびボイデンチャンバーアッセイにより評価した。

(2) 本研究申請者は、血管内皮細胞の灌流培養系が血管修復の機構解明に対し生理的条件を反映する有用なモデルを提示すること、すなわち血漿タンパク質と血管内皮細胞との双方向的なコミュニケーションが、血管内皮修復の過程に極めて重要な役割を有すことを見出してきた。

本研究ではこの実験系をさらに改良し、血管内皮細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞を組み合わせた二細胞による灌流培養系を用いた創傷治癒のex vivoモデル培養系を確立し(図1), その系を用いてそれらの細胞由来のエクソソームが損傷修復にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

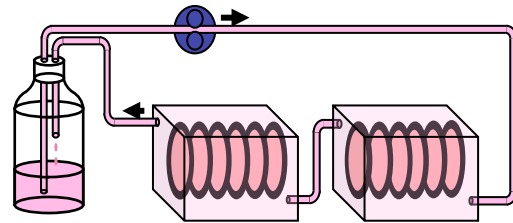


図1 二細胞による灌流培養系

ミニシートに各細胞を播種し、チャンバーを直列に連結し、培地を循環させた。

4. 研究成果

(1) 血管内皮細胞の増殖に対するプラスミノゲンおよび血管内皮細胞由来エクソソームの相互作用

WST-8 アッセイにより血管内皮細胞の増殖能に与える影響を検討した結果、プラスミノゲンおよびエクソソームはいずれも濃度依存的に血管内皮細胞の増殖を促進させた。しかし、両者を同時に作用させた場合、低濃度のエクソソームはプラスミノゲンと相乗的に増殖を促進したのに対し、高濃度のエクソソームでは相乗的な増殖促進能は認められなかった。次に、セルカウンターを用いてプラスミノゲンとエクソソーム同時添加の処理時間による影響を検討したところ、24時間処理では高濃度のエクソソーム存在下でも相乗的な増殖促進効果が見られたが、48時間処理では逆に増殖阻害作用を表すことが明らかになった。

(2) 血管内皮細胞の遊走に対するプラスミノゲンおよび血管内皮細胞由来エクソソームの相互作用

スクラッチアッセイにより血管内皮細胞の損傷修復に与える影響を検討した。コンフルエントになった血管内皮細胞に傷を付けプラスミノゲンおよびエクソソームを添加して損傷の修復状況を観察したところ、いずれを添加した場合も濃度依存的に損傷の修復が促進された。また、両者を同時に作用させた場合、濃度依存的に相乗的な損傷修復が認められた。

次に、両者の遊走能に対する影響を検討するためボイデンチャンバーアッセイを行った。ボイデンチャンバーの上層にプラスミノゲンまたはエクソソームを添加したところ、血管内皮細胞に対する遊走促進効果が示された。続いて、遊走能に対する両者の相乗効果の有無を検討するため、「上層：プラスミノゲン+エクソソーム, 下層：無添加」, 「上層：プラスミノゲン, 下層：エクソソーム」, の2つの条件で血管内皮細胞の遊走能を評価した。どちらの場合もそれぞれを単独で添加した場合に比べより強い遊走促進能を示すことがわかった。また、両者をとともに上層に添加した場合(図2左)に比べ、上層と下層それぞれに添加した場合(図2右)の方が、より強い相乗効果が現れることが明らかになった。

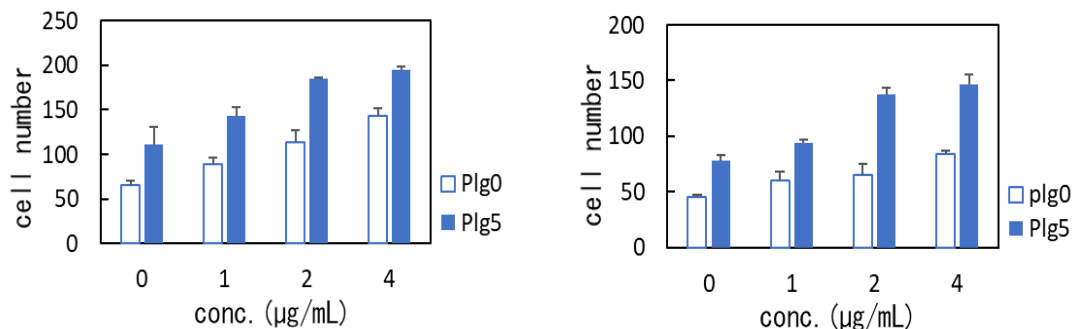


図2 血管内皮細胞の遊走能に及ぼすプラスミノゲンとエクソソームの影響

ボイデンチャンバーの上層にプラスミノゲン(5 µg/ml)を添加した場合(■)または非添加(□)の場合にエクソソームを上層(左)または下層(右)に異なる濃度(1, 2, 4 µg/ml)で添加し、24時間インキュベート後上層から下層に移動した血管内皮細胞の数を計測した。

(1)および(2)の結果より、プラスミノゲンとエクソソームは相乗的に創傷治癒を促す可能性が示された。さらに両者の促進作用については、プラスミノゲンが血管内皮細胞の運動活性を高めることで遊走を促進させる一方、エクソソームはプラスミノゲンによって運動活性の高まった血管内皮細胞の方向性を決め、遊走を誘引することが示唆された。

(3) 血管内皮細胞および線維芽細胞を用いた灌流培養系の確立

灌流培養系を用いて血管内皮細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞それぞれを安定に培養するた

めの条件設定を行った。ミノシートのガラス上に細胞を播種しコンフルエントになるまで培養し、その後ミノシートを培養チャンバーにセットして様々な条件下で灌流培養を行なった。その結果、0.1 M HEPES, 5%ウシ血清を含むDMEMを用い、流速1.5 ml/h~4.5 ml/hで灌流した場合、7日以上培養可能であることがわかった。また培養チャンバーのサイズを検討したところ、血管内皮細胞は6スロットチャンバーの方が24スロットチャンバーより安定に培養できることがわかった。それに対し線維芽細胞は、どちらのチャンバーでも安定性に差は認められなかった。

(4) 灌流培養系を用いたエクソソームの損傷修復能の検討

血管内皮細胞および線維芽細胞、平滑筋細胞をそれぞれ無血清培地中で48時間培養した後、連続超遠心分離法によりエクソソームを調製した。得られたエクソソームを用いて、創傷治癒に対する影響を灌流培養系でのスクラッチアッセイにより検討した。ミノシート上でコンフルエントになった細胞を培養チャンバーにセットして灌流培養を開始し、24時間後に細胞に引っかき傷をつけ、継時的に傷が修復する様子を観察した。それぞれの細胞由来のエクソソームを血管内皮細胞の灌流培養系に添加したところ、いずれのエクソソームも血管内皮細胞の損傷修復を促進することが明らかとなった。

(5) 二細胞灌流培養系を用いたエクソソームの作用検討

確立した各細胞の灌流培養系に準じた条件で、二細胞灌流培養系の構築を行った。上流と下流の細胞の組み合わせは、「血管内皮細胞→血管内皮細胞」、「血管内皮細胞→線維芽細胞」、「線維芽細胞→線維芽細胞」、「線維芽細胞→血管内皮細胞」、の4通りである。これらの組み合わせにおいて下流の細胞に損傷を与え修復するまでの様子を観察したところ、全ての組み合わせにおいて、それぞれの細胞を単独で灌流培養した時に比べ二細胞による灌流培養の方が短時間で修復が完了することがわかった。これが上流の細胞から分泌されたエクソソームによる効果であるかどうかを調べるため、両細胞間にエクソソームをトラップするフィルターを設置し同条件で損傷修復過程を観察したところ、フィルターを設置することにより修復時間が増加したことから(図3)、上流の細胞由来のエクソソームが下流の細胞の修復を促進していることが明らかになった。

続いて、培養中の細胞の状態に応じて分泌されるエクソソームの作用が変化するかどうかを調べるため、上流の細胞に損傷を与えた上で灌流培養を行い、その際の下流の細胞の損傷修復過程を観察した。その結果、上流が線維芽細胞の場合は、損傷の有無に関わらず下流の血管内皮細胞の修復速度は変化しなかったが(図3左)、上流が血管内皮細胞の場合は、損傷があると下流の線維芽細胞の損傷修復が遅れることが明らかとなった(図3右)。

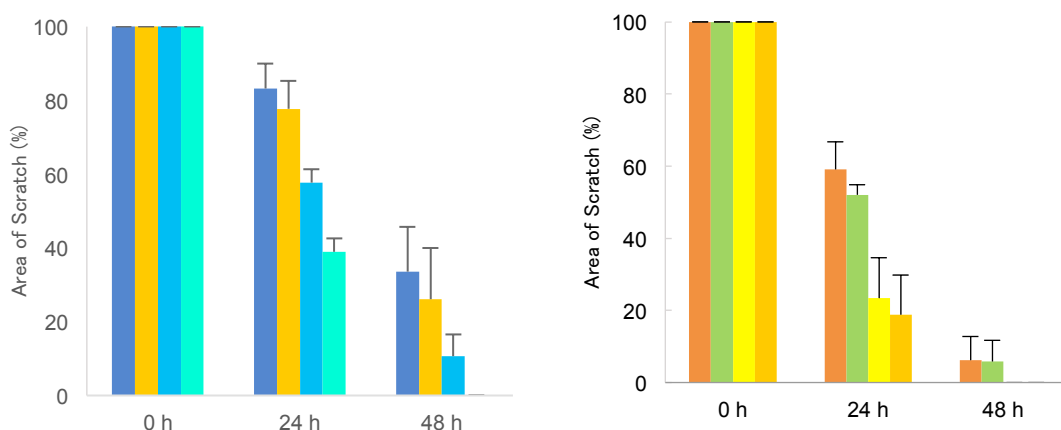


図3 血管内皮細胞と線維芽細胞の二細胞灌流培養系におけるエクソソームの影響

線維芽細胞の上流に血管内皮細胞(左)または血管内皮細胞の上流に線維芽細胞(右)を設置し、両細胞間にエクソソームトラップを設置した場合と上流細胞に損傷を与えた場合の下流細胞の損傷修復の経時的変化を観察した。グラフは左から、上流細胞なし、エクソソームトラップ設置、上流細胞損傷あり、損傷なし、の順である。

(3)~(5)の結果より、二細胞灌流培養系が生体内に近い条件下で創傷治癒機構の解析を行うための実験系として利用できる可能性を示すことができた。この系を用いて損傷修復の過程を解析したところ、血管内皮細胞と線維芽細胞、平滑筋細胞がそれぞれの細胞由来のエクソソームを介した相互作用により損傷修復を制御していることが明らかになった。また血管内皮細胞は損傷の有無によって異なる成分のエクソソームを分泌し、損傷修復に対し自身の状態に依存した調節作用を発揮していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Misa Tatsuzawa, Sakiko Yagawa, Motoyuki Shimonaka
2. 発表標題 Elucidation of The Mechanism of Wound Healing by Extracellular Vesicles as Intercellular Communication Tools
3. 学会等名 TOIN 15th International Symposium on Biomedical Engineering (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立澤美沙, 矢川咲子, 下仲基之
2. 発表標題 Elucidation of the mechanism of wound healing by extracellular vesicles as intercellular communication tools
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakiko Yagawa, Misa Tatsuzawa, Ayane Nakadai, Rika Horibo, Motoyuki Shimonaka
2. 発表標題 Investigation of the Association of Exosomes with Plasminogen and their Regulatory Effects on Wound Healing
3. 学会等名 TOIN International Symposium on Biomedical Engineering 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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