

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06243・19K21339

研究課題名（和文）重症心不全に対する心筋幹細胞エクソソームによるCell-free治療法の開発

研究課題名（英文）A novel therapeutic strategy against heart failure using cardiac stem cell-derived exosomes.

研究代表者

藏澄 宏之（KURAZUMI, Hiroshi）

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50645116

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：心不全が増加している本邦において心臓移植の機会は限られており、新規治療法の開発が重要だ。以前は幹細胞移植が注目されたが、準備に要す時間とコストが多量であり、普及に至っていない。近年の研究から、移植した幹細胞が生体内で分化することは稀であり、分泌された成長因子等が組織修復や機能回復の主因を成すことが判明した。幹細胞が放出するエクソソームは成長因子等を含み、凍結保存や濃縮、反復投与が可能である。エクソソームは幹細胞移植に代わる新規治療法に成る可能性がある。本研究では心筋幹細胞由来エクソソームの機能を賦活化する方法を示し、これの投与が慢性心不全に対する治療候補に成る可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では低酸素培養という簡便な方法が心筋幹細胞由来エクソソームの機能を賦活化することを示し、これの投与が慢性心不全に対する治療候補に成る可能性を示した。超高齢社会であることに加え、心臓移植に関して深刻なドナー不足に苦しむ我が国において、簡便で広く普及する心不全の治療方法を開発することは非常に重要だ。現在は小型動物での検討に過ぎないが、今後は大型動物などで安全性と有効性を確認する必要がある。また、同時に分子機構の解明を更に進めることも重要だと思われる。

研究成果の概要（英文）：The patients with heart failure are progressively increased in Japan, however, the therapeutic chance of heart transplantation is very limited. The transplantation of stem cells requires a vast amount of time and cost for its preparation and fails to spread. Furthermore, it is hardly observed that the implanted stem cells differentiate into functional tissue in vivo. Interestingly, recent evidence suggests that exosomes secreted from the transplant play an important role in mediating tissue recovery. Exosomes are easy to handle, i.e. stock, enrichment and repeated administration, and thus, administration of exosomes is believed to be a novel therapeutic strategy in future.

In the present study, we showed that the hypoxic preconditioning primed the function of cardiosphere-derived cells and exosomes secreted from them. The administration of exosomes ameliorated the cardiac dysfunction in an animal model with old myocardial infarction.

研究分野：心臓血管外科学

キーワード：心筋幹細胞（CDCs） エクソソーム 低酸素プレコンディショニング 陳旧性心筋梗塞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会である本邦において心不全の患者は 170 万人とされ、難治性心不全に対する根本的治療法が必要だ。心臓移植の機会は非常に限られており(65 歳以上は適応とならず、待機期間が 5 年以上とされる) 深刻なドナー不足であり、これに代わる新規治療法の開発が重要だ。以前より重症心不全に対する幹細胞移植が注目され、動物実験で有効性が示されたが、自家細胞の準備に要す時間とコストが多額であることが判明した。骨格筋由来細胞シートが再生医療等製品として 2016 年に保険償還となったが、その価格は 1476 万円/回と非常に高額であり、細胞シート作成に必要な細胞培養加工施設が必要であることから、臨床では普及に至っていない。解決策として他家細胞移植が検討され、複数の臨床試験が行われた。自家移植と比較すると細胞培養に要すコストを削減できるが、それでも細胞培養加工施設が必要であり、限定的な解決しか得られず普及は現実的ではないとされる。

また、近年の幹細胞研究から興味深い知見が得られ、移植した幹細胞が生体内で分化することは稀である一方で、分泌された成長因子などが組織修復や機能回復の主因を成すことが判明した。移植細胞が放出するエクソソーム(脂質二重膜から成る直径 20~100 nm の膜小胞)は成長因子や miRNA を含み、凍結保存や濃縮、体外からの反復投与が可能である。細胞移植と比較して免疫原性も少ないと考えられている。以上から、精製されたエクソソームの投与は幹細胞移植に代わる、Cell-free な新規治療法に成る可能性を期待されている。

実際にラットとブタの急性心筋梗塞モデルにおいて、心筋幹細胞 (Cardiosphere-derived cells (CDCs)) が分泌したエクソソームを精製して投与すると心機能の改善が確認された(文献 1)。エクソソーム中の miRNA がマクロファージを修飾し、心筋を保護することが分かっている。一方で、陳旧性心筋梗塞モデルなどに代表される慢性心不全の病態においては CDCs 由来エクソソームの心筋保護効果は明らかになっておらず、miRNA によるマクロファージの修飾以外にどのような作用機序が存在するか、不明な点は多い。

2. 研究の目的

当研究室ではこれまで、マウスやラビットの陳旧性心筋梗塞モデルに CDCs を移植し、心機能改善効果を確認してきた(文献 2, 3)。CDCs が分泌する成長因子が血管新生を促進することを明らかにし、それが心機能改善の主因だと解明してきた。また、細胞移植療法における低酸素プレコンディショニングなど、細胞機能賦活化を 15 年にわたり研究してきた(文献 2, 3)。

以上を踏まえ、本研究では下記を目的として行った。

- (1) CDCs 由来のエクソソームを解析すること(主に成長因子の含有など)
- (2) 低酸素プレコンディショニングによりエクソソームが増強するか否か検証すること。
- (3) エクソソームをマウスの陳旧性心筋梗塞モデルに投与して心筋保護効果を示すか否かを検証すること。

3. 研究の方法

(1) CDCs の培養

雄の C57BL/6 マウスの心房から CDCs を単離・培養した。低酸素プレコンディショニングは既報の通り、2% O₂, 5% CO₂, 33°C で 24 時間の培養とした(文献 2)。

(2) エクソソームの回収および精製

細胞の培養上清から total exosome isolation reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてエクソソームを回収し、精製した。

(3) 細胞およびエクソソームのタンパク発現に対する評価

細胞溶解液とエクソソームにおいて成長因子やエクソソームのマーカーをウエスタンブロットで解析した。

(4) Matrix metalloprotease (MMP) への影響に関する検討

CDCs 由来エクソソームはマクロファージに作用して、心筋リモデリングを抑制するとされる(ref 1)。また、慢性心不全の病態において線維化の抑制は有効であるとされ、線維成分の turn over を促進する MMP は以前より注目されてきた。CDCs 由来エクソソームがマクロファージに作用して MMP 活性を亢進させると仮説を立て、検証した。

CDCs の培養上清、マクロファージ様細胞である RAW264 の培養上清、RAW264 に CDCs の培養上清を加えて培養した培養上清において、MMP 活性を測定した。エクソソーム合成阻害剤(GW4869, 20μM), MMP 阻害剤(GM6001, 30μM)を併用した。

(5) エクソソームの取り込みに関する検討

エクソソームが標的細胞に取り込まれることを確認するため、精製したエクソソームを Exo-Glow Exosome Labeling Kit (System Biosciences) で標識した。培養した HUVEC 細胞に YFP-Rab9 (YFP: Yellow Fluorescent Protein, Rab9: エンドソーム系のタンパク) を発現させ、標識したエクソソームを加えて 24 時間培養した。エクソソームが細胞のエンドソームに取り込まれる様子を、蛍光顕微鏡を用いて live cell image で観察した。

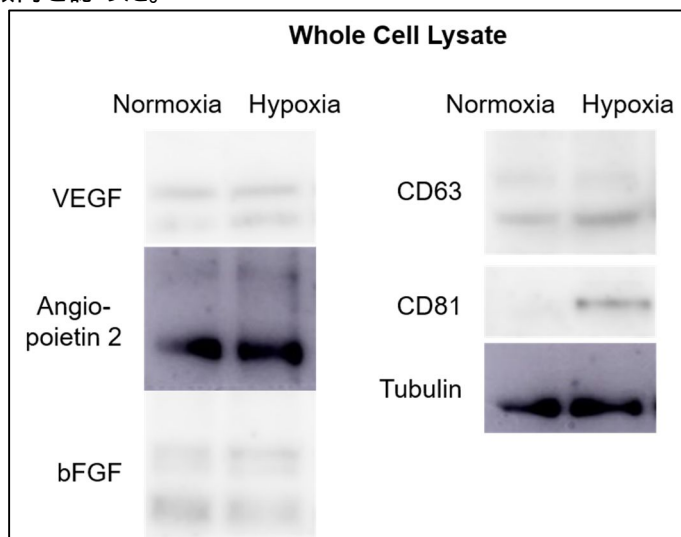
(6) エクソソーム投与による治療効果の評価

雄の C57BL/6 マウスに左冠動脈結紮を行い、4 週間後に陳旧性心筋梗塞モデルとした。コントロール群は PBS を浸したセフラフィルムを心臓に貼付し、エクソソーム群はエクソソーム 20 μg を含むセフラフィルムを貼付した。エクソソームの投与量は既報を参考に決定した(文献 1)。

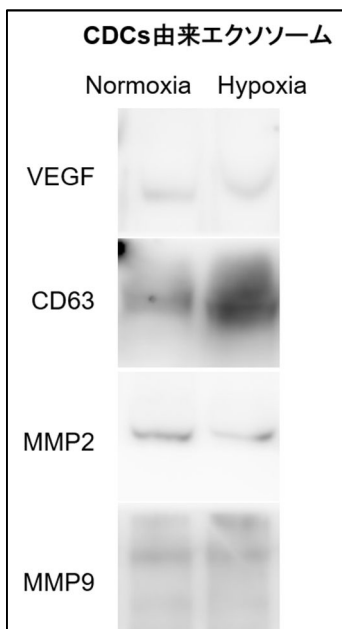
セフラフィルムは、CDCs 移植の際に使用実績があり、細胞移植の台座として有効であることから（文献 3）、今回のエクソソーム投与においても効率的な伝達が見込まれた。8 週間後に心エコーで心機能を評価した。

4. 研究成果

(1) 低酸素プレコンディショニングにより、CDCs において成長因子やエクソソームのマーカ-の発現が亢進する傾向を認めた。

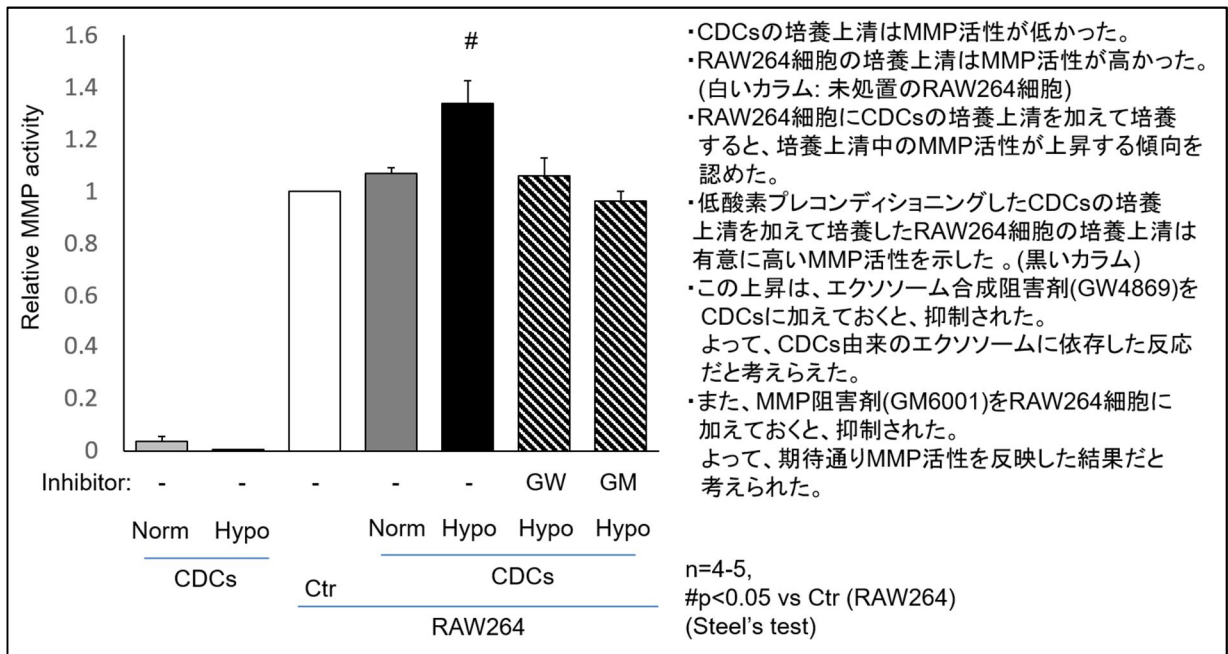


(2) 低酸素プレコンディショニングにより、CDCs 由来エクソソームにおいてマーカ-の発現が亢進する傾向を認めた。成長因子の発現は明らかな変化を認めなかった。また、MMPs が発現していることを確認した。



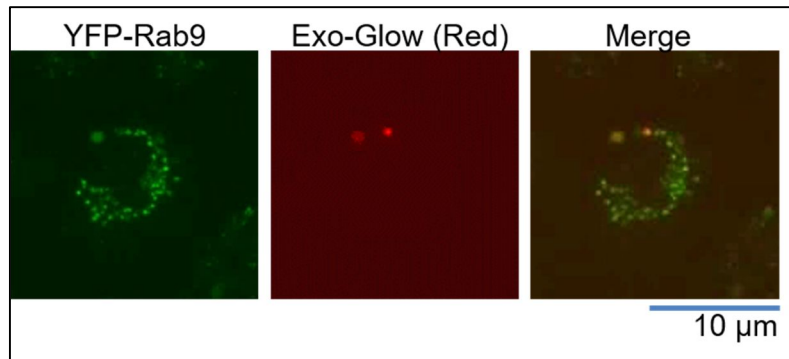
(3) 低酸素プレコンディショニングで機能賦活化した CDCs 由来エクソソームは、マクロファ-ージ様細胞 RAW264 に働いて、MMP 活性を亢進させた。

- ・ CDCs の培養上清は MMP 活性が低かった。（左端の 2 つのカラム）
- ・ RAW264 細胞の培養上清は MMP 活性が高かった。（白いカラム: 未処置の RAW264 細胞）
- ・ RAW264 細胞に CDCs の培養上清を加えて培養すると、培養上清中の MMP 活性が上昇する傾向を認めた。（灰色のカラム）
- ・ 低酸素プレコンディショニングした CDCs の培養上清を加えて培養した RAW264 細胞の培養上清は有意に高い MMP 活性を示した。（黒いカラム）
- ・ この上昇は、エクソソーム合成阻害剤(GW4869)を CDCs に加えておくと、抑制された。よって、CDCs 由来のエクソソームに依存した反応だと考えられた。
- ・ また、MMP 阻害剤(GM6001)を RAW264 細胞に加えておくと、抑制された。よって、期待通り MMP 活性を反映した結果だと考えられた。



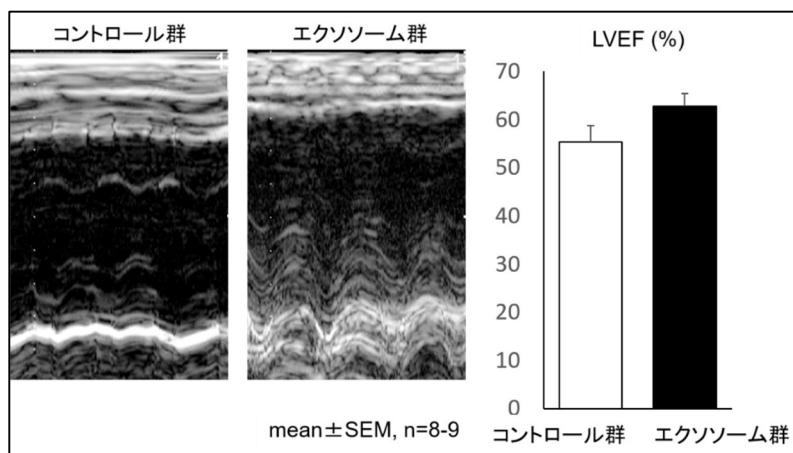
(4) エクソソームが HUVEC 細胞に取り込まれることを確認した。

培養した HUVEC 細胞に YFP-Rab9 を発現させ、エンドソーム系を標識した。また、CDCs 由来エクソソームを Exo-Glow Exosome Labeling Kit で標識し、この細胞に加えた。エンドソームの YFP の信号とエクソソームの Red の信号が共局在し、エクソソームが細胞に取り込まれていることを確認した。



(5) 陳旧性心筋梗塞モデルに対するエクソソーム投与の治療効果を評価した。

雄の C57BL/6 マウスに左冠動脈結紮を行い、4 週間後に陳旧性心筋梗塞モデルとした。コントロール群は PBS を浸したセフラフィルムを心臓に貼付しエクソソーム群はエクソソーム 20 µg を含むセフラフィルムを貼付した。8 週間後に心エコーで心機能を評価したところ、有意差には至らないものの、エクソソーム群において左室内径短縮率 (LVEF)が高い傾向を認めた。



(6) 結論

低酸素プレコンディショニングは CDCs が分泌するエクソソームの機能を賦活化させる可能性が示された。このエクソソーム投与は慢性心不全に対する治療候補に成り得ることが示された。

< 引用文献 >

Exosomal MicroRNA Transfer Into Macrophages Mediates Cellular Postconditioning.
de Couto G, Gallet R, Cambier L, Jaghatspanyan E, Makkar N, Dawkins JF, Berman BP,
Marbán E.

Circulation. 2017 Jul 11;136(2):200-214. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.024590

Cardiosphere-derived cell sheet primed with hypoxia improves left ventricular function
of chronically infarcted heart.

Hosoyama T, Samura M, Kudo T, Nishimoto A, Ueno K, Murata T, Ohama T, Sato K,
Mikamo A, Yoshimura K, Li TS, Hamano K.

Am J Transl Res. 2015 Dec 15;7(12):2738-51.

Hypoxic-conditioned cardiosphere-derived cell sheet transplantation for chronic
myocardial infarction.

Fujita A, Ueno K, Saito T, Yanagihara M, Kurazumi H, Suzuki R, Mikamo A, Hamano K.

Eur J Cardiothorac Surg. 2019 Dec 1;56(6):1062-1074. doi: 10.1093/ejcts/ezz122.

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 0件）

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、中村玉美、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 ウサギ陳旧性心筋梗塞モデルを用いた貼付前低酸素培養Cardiosphere-sphere derived cells sheetによる心不全治療効果の検討
3. 学会等名 第71回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 低酸素下培養によるCardiosphere-derived cells sheet移植の血管新生効果の基礎的検討
3. 学会等名 第49回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤田 陽、上野耕司、松野祐太郎、藏澄宏之、鈴木 亮、美甘章仁、濱野公一
2. 発表標題 ラビット陳旧性モデルに対する低酸素培養刺激CDCシートの治療効果の検討（ポスター）
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
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