

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09133

研究課題名(和文) 完全自家血管新生療法における間葉系細胞培養に係るシグナル伝達に関する検討

研究課題名(英文) A Study on Signal Transductions of MSC Culture in Total Autologous Angiogenic Therapy

研究代表者

福田 尚司 (Fukuda, Shoji)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：70362069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：市販されている正常ヒト細胞株(骨髄間葉系幹細胞(MSC))を用い血管新生関連マイクロRNAを同定した。(20年度)

前段階同様にMSCを用い、同定された血管新生関連マイクロRNAの効果を用い、In vitro(マトリジェル)で評価した。また、同マイクロRNAを内包するエクソソームについても血管新生効果を評価した。(21年度)

同定したマイクロRNAを意図的に強発現させるべくレンチウイルスベクターをMSCに遺伝子導入した。その培養上清から、エクソソームを分離生成してできた血管新生関連エクソソーム強発現液を血管新生薬と位置付け、その効果をIn vitroで評価した。(22～23年度)

研究成果の学術的意義や社会的意義

閉塞性動脈硬化症の最重症例である重症下肢虚血に対する治療では、期待通りの結果が出ていない現状がある。この疾患で年間1万人が下肢切断となっている。私たちが実施している完全自家血管新生療法は、まだ症例数は少ないが、主要評価項目の治療1年後切断回避生存率が67%で、歴史的データでの45%と比較すると今後の結果に期待が寄せられる。

しかし、同療法は患者間に治療効果の差がみられ、その差の原因が血管新生タンパクではなく、ある種のマイクロRNAあるいはエクソソームによるものの可能性が明らかになった。本研究により下肢切断回避に関するエクソソーム創薬の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：1. Normal human cell lines (bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs)) that are commercially available were used to identify angiogenesis-related microRNAs. (2020)

2. Using MSCs as in the previous step, the effects of the identified angiogenesis-related microRNAs were evaluated in vitro (Matrigel). We also evaluated the angiogenic effects of exosomes containing the microRNAs. (2021)

3. Lentiviral vectors were transfected into MSCs to intentionally induce strong expression of the identified microRNAs. Exosomes were obtained from the supernatant of the culture. The exosomes were isolated from the culture supernatant, and the resulting angiogenesis-related exosome-strongly expressing solution was positioned as an angiogenic agent, and its effects were evaluated in vitro. (2022-2023)

研究分野：心臓血管外科

キーワード：エクソソーム 閉塞性動脈硬化症 重症下肢虚血 創薬 下肢切断

1. 研究開始当初の背景

私たちが先進医療として実施中の完全自家血管新生療法における治療効果を改善すべく、間葉系幹細胞培養において分泌される因子の中で、血管新生に影響を与えると考えられるマイクロRNA に関し種類の同定や定量だけでなく、その効果についても検討することを目的とする。次ステップとして、前述の同定された、血管新生に促進的に働くマイクロRNA を用いた血管再生法を知財化し、私たちが実施中の「自己骨髄由来培養間葉系細胞移植による末梢動脈疾患に対する血管新生治療」に関し、企業との共同治験の実現を目指す。

2. 研究の目的

完全自家血管新生療法における治療効果を改善すべく、間葉系幹細胞培養において分泌される因子の中で、血管新生に影響を与えると考えられるマイクロRNA に関し種類の同定や定量だけでなく、その効果についても検討する。

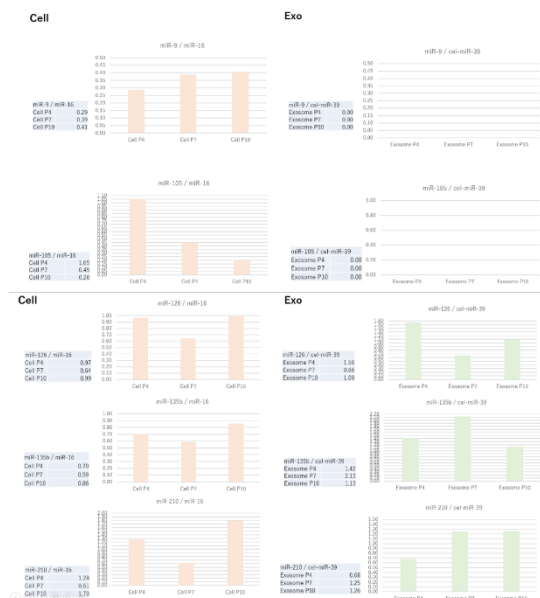
3. 研究の方法

- (1). 血管新生に関与していると思われるエクソソーム及びエクソソーム関連マイクロRNA を文献検索しピックアップする。
市販されている正常ヒト骨髄由来間葉系細胞 (MSC) を培養し、培養上清中の血管新生関連エクソソーム及びマイクロRNA を q-PCR にて発現を解析する。
- (2). 市販されている若年者ヒト骨髄由来 MSC と老年者ヒト骨髄由来 MSC を培養し、培養上清中に、同定されたエクソソーム関連マイクロRNA の発現解析を行い、老若による、あるいは個体差による発現の差を検証する。
- (3). ヒト骨髄由来 MSC とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) との共培養を行い、血管新生、細胞増殖促進あるいは抑制等の検証を行う。
- (4). HUVEC に同定されたエクソソーム関連マイクロRNA の MimicRNA をトランスフェクションにより強発現させ、血管新生促進あるいは抑制等の検証を行う。
- (5). 同定されたエクソソーム関連マイクロRNA を含む lentivirus vector を骨髄由来 MSC に形質導入し、エクソソームの回収を行う。ターゲットのマイクロRNA 産生が増幅するか検討すると共に、細胞外マトリクス上に培養した HUVEC にエクソソームを添加し、血管新生が惹起されるか検討する。

4. 研究成果

- (1). 血管新生に関与していると思われるエクソソーム及びエクソソーム関連マイクロRNA を文献検索より5つをピックアップし、miR-126、miR-135b、miR-210、miR-9、miR-105 をターゲットとした。
次に、市販されている正常ヒト骨髄由来 MSC を培養し、培養上清中の血管新生に関与していると思われるエクソソーム及びエクソソーム関連マイクロRNA を q-PCR にて発現の解析を行った。(図1)
細胞及び培養上清から抽出したエクソソームに発現が確認されたものは、miR-126、miR-135b、miR-210 であった。miR-9、miR-105 は、特にエクソソームでの発現確認ができなかったため、ターゲットから除外することとした。
結果として、miR-126、miR-135、miR-210 の3つのマイクロRNA に絞ることとした。

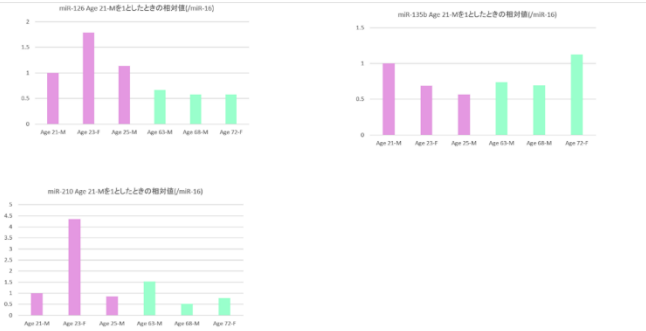
図1. MSC培養上清中の血管新生関連マイクロRNA : miR-9、miR-105は細胞中には存在したが、超遠心法及びエクソスクリーン法で抽出同定したエクソソームとして発現を確認ができなかった。miR-126、miR-135、miR-210は確認することができた。



(2). 市販されている若年者と老年者のヒト骨髄由来間 MSC を培養し、培養上清中に、同定されたエクソソーム関連マイクロ RNA の発現解析を行い、老若および個体による発現の差を検証する。

miR-126 は若年者で高い傾向を認め、miR-210 は個体差があり、miR-135b は年齢による差は無く個体差があると考えられた。(図 2)

図2. MSC培養上清中の血管新生関連マイクロRNAに関する年齢、個体差の検討：miR-126は若年者で高い傾向を認め、miR-210は個体差があり、miR-135bは年齢による差は無く個体差があると考えられた。

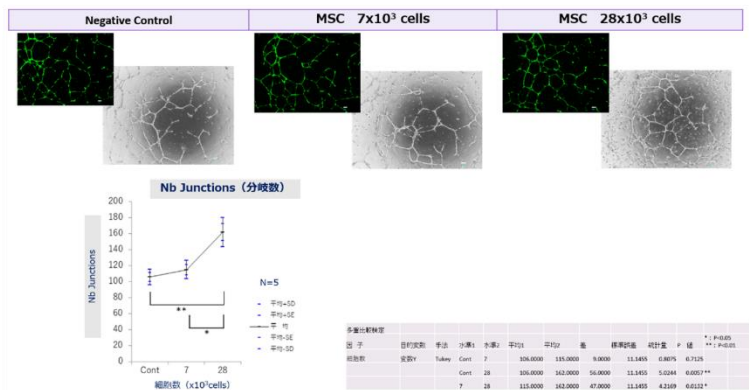


(3). ヒト骨髄由来間葉系細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) との共培養を行い、血管新生、細胞増殖促進あるいは抑制等の検証を行う。形態学的観察では、MSC 7×10^3 cells 群と 28×10^3 cells 群では、 28×10^3 cells 群において血管新生がより誘導されていることが観察された。

ImageJ angiogenesis analyzer ソフトを用いた解析及び統計解析の結果では、MSC 28×10^3 cells 群は、分岐数 (Nb Junctions) において、コントロールと比較して有意差を認めた。また、MSC 7×10^3 cells 群と 28×10^3 cells 群でも有意差を認めた。(図 3)

ヒト骨髄由来間葉系細胞が血管新生に寄与するためには、一定の細胞数が必要であることが考えられ、臨床研究モデルを in vitro で再現することができたと考えられる。

図3. HUVECとの共培養によるMSCの血管新生効果：MSC存在下でHUVECの血管新生効果は増強された。



(4). ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に、同定されたエクソソーム関連マイクロ RNA の MimicRNA をトランスフェクションにより強発現させ、血管新生促進あるいは抑制等の検証を行う。

導入した MimicRNA は、miR-126、miR-135b、miR-210、miR-126 + 135b、miR-126 + 210、miR-126 + 135b + 210 の組合せを行った。形態学的観察では、miR-126 + 135b の組合せと、miR-126 + 135b + 210 の組合せが血管新生がより強く誘導されていることが観察された。(図 4-a)

ImageJ angiogenesis analyzer ソフトを用いた解析及び統計解析の結果では、分岐数においては、コントロールと比較して、miR-126、miR-135b、miR-210、miR-126 + 135b、miR-126 + 135b + 210 が有意差を認めた。

面積においては、コントロールと比較して、miR-126、miR-210、miR-126 + 135b が有意差を認めた。(図 4-b)

図4-a. Mimic RNAをHUVECに導入した血管新生効果：miR-126 + 135bの組合せと、miR-126 + 135b + 210の組合せが血管新生がより強く誘導されていることが観察された。

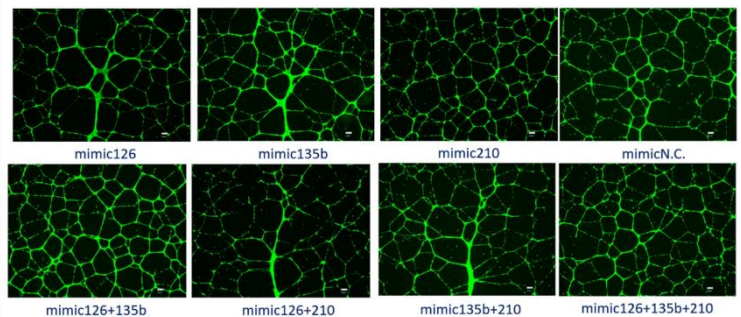
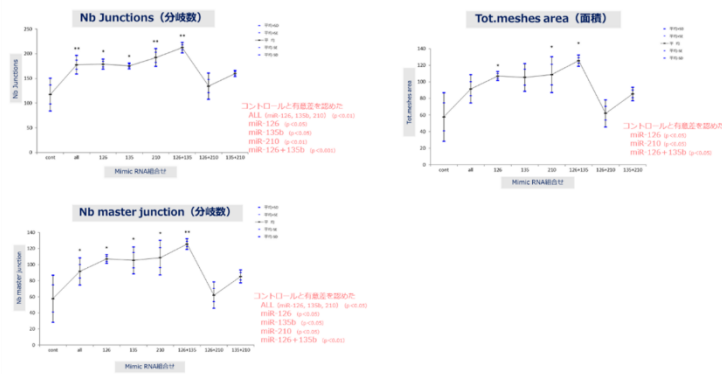


図4-b. Mimic RNAをHUVECに導入した血管新生効果の解析：
分岐数においては、コントロールと比較して、miR-126、miR-135b、miR-210、
miR-126+135b、miR-126+135b+210が血管新生効果を増強していた。面積に
おいては、コントロールと比較して、miR-126、miR-210、miR-126+135bが血管
新生効果を増強していた。



(5). MSC 由来エクソソームの粒子数、タンパク濃度を NTA, Qubit で解析し、Extracellular Vesicles (EVs) の範疇として矛盾ない数値であった。(図 5-a)

HUVEC へのエクソソーム投与により HUVEC の細胞外マトリクス上での tube formation が促進され、MSC 由来エクソソームによる血管新生能が示唆された。(図 5-b)

Lentivirus vector での形質導入を行った MSC、及びそこから回収したエクソソームでは proangio miRNA の発現が増強していた。更に、同エクソソームの HUVEC への投与により細胞外マトリクス上での tube formation が促進された。(図 5-c)

図5-a. 形質導入したMSC由来エクソソームのNTA解析結果：
Extracellular Vesicles (EVs)の範疇として矛盾ない数値であった。

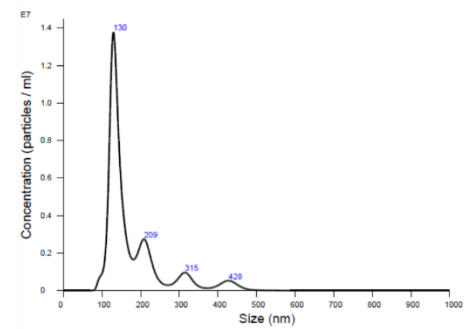


図5-c. Exosome投与によるHUVECのtube formation：
遺伝子組み換えMSC由来のエクソソーム(LV)の方が非遺伝子組み換えMSC由来
エクソソーム(CV)やエクソソーム非投与群(NC)と比較してtube formationが促
進されている。

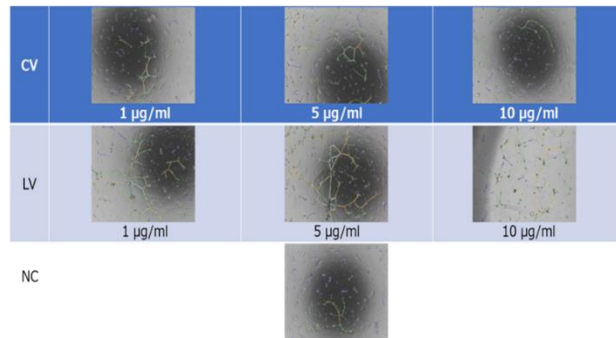
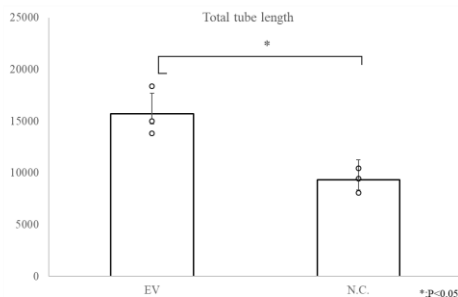


図5-b. HUVECのtube formation解析結果：
Extracellular Vesicles (EV) 投与群の方が非投与群(N.C.)よりも血管新
生効果 (Total tube length) に延長が見られた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福田尚司、小嶋一輝、本多爽、鈴木隼、岩堀晃也、藤吉俊毅、岩橋徹、島原佑介
2. 発表標題 Bench to Bedside, and the Bedside to the Bench. 完全自家血管新生療法の場合
3. 学会等名 日本血管外科学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 和田良樹、福田尚司、日下部智美、工藤敏文
2. 発表標題 The First Step to Therapeutic Angiogenesis with Extracellular vesicles
3. 学会等名 欧州血管外科学会（国際学会）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 新規国内出願（miRNA）	発明者 福田尚司他2名	権利者 東京医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-046258	出願年 2024年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

今回の研究でvitroは終了しましたが、vivoの研究費がいただけず研究が中断してしまいました。残念です。

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	落谷 孝広 (Ochiya Takahiro) (60192530)	東京医科大学・医学部・特任教授 (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