

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09782

研究課題名(和文)加齢黄斑変性における再生療法に向けた細胞外小胞の機能解明

研究課題名(英文)The roles of extracellular vesicles on regenerative therapy of age-related macular degeneration

研究代表者

林 寿来(Hayashi, Hisaki)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30533715

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)：滲出型加齢黄斑変性は脈絡膜血管新生を伴い主要な失明原因である。本研究では、骨髄由来間葉系幹細胞から細胞外小胞(MSC-EV)を独自手法で分離し、MSC-EVが脈絡膜血管新生や網膜障害に効果を示すのか、またその分子機構解明を試みた。MSC-EVは、酸化ストレスが誘導するROS活性および細胞毒性の低減、血液網膜関門の修復を行うことを確認された。脈絡膜血管新生のマウスモデルに対するMSC-EVの硝子体への投与は、新生血管の縮小・退縮、ミクログリアの集積低下、炎症マーカーの発現低下効果が認められた。MSC-EVは酸化ストレスの低減や抗炎症効果を通じて、脈絡膜血管新生を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脈絡膜血管新生を伴う滲出型加齢黄斑変性は失明の原因であり、近年急速に増加しつつある。加齢や環境により酸化ストレスが蓄積した結果、黄斑部障害、炎症惹起、そして血液網膜関門の破綻、やがて脈絡膜血管新生が滲出型加齢黄斑変性につながると考えられている。間葉系幹細胞由来の細胞外小胞(MSC-EV)は眼疾患に対する効果を本研究で明らかにした。MSC-EVは抗酸化ストレス・抗炎症、バリア修復といった網膜の保護修復作用が認められ、その結果として脈絡膜血管新生を抑制することが考えられた。従来の新生血管を標的とする分子標的薬や抗体療法に加えて、MSC-EV投与による滲出型加齢黄斑変性に対する治療効果が期待される。

研究成果の概要(英文)：Wet age-related macular degeneration accompanied by choroidal neovascularization is a cause of blindness, and has been rapidly increasing in recent years. It is thought that the accumulation of oxidative stress due to aging or the environment causes macular damage, inflammation, and breakdown of the blood-retinal barrier, which eventually leads to choroidal neovascularization. The beneficial effect of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) on eye diseases has not been previously reported, and this study revealed for the first time. MSC-EVs were found to have protective and repairing effects on the retina through antioxidant stress, anti-inflammation, and barrier repair, and were thought to suppress choroidal neovascularization. In addition to conventional molecular target drugs and antibody therapies that target neovascularization, MSC-EV administration is potentially effective in treating wet age-related macular degeneration.

研究分野：生理学

キーワード：血管新生 細胞外小胞 間葉系幹細胞 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢黄斑変性の主要な原因は、目に対する太陽光照射、代謝老廃物の蓄積、炎症反応等に起因して産生される酸化ストレスである。酸化ストレスは網膜色素上皮細胞等に損傷を与え、脈絡膜血管新生、網膜機能障害、失明につながることから、酸化ストレスの抑制は初期治療の鍵である。一方、骨髄由来間葉系幹細胞はその多分化能から細胞移植による再生療法に用いられている。間葉系幹細胞由来の細胞外小胞の移植は、組織の酸化ストレスを抑制することが報告されているがその分子機序は不明で、これまで加齢黄斑変性に対する効果は報告されていない。

2. 研究の目的

本申請では、酸化ストレスに対する間葉系幹細胞由来細胞外小胞(MSC-EV)の投与効果の解析、MSC-EV中の蛋白質の網羅的解析による機能分子の同定、培養細胞および動物モデルでの効果の検討を行い、MSC-EVによる網膜・脈絡膜への作用機序を分子レベルで明らかにする。その結果得られる知見は、加齢黄斑変性の再生療法の開発に繋がること、MSC-EVによるあたらしい眼保護修復方法の確立につながることを期待される。

3. 研究の方法

骨髄由来の間葉系幹細胞から抽出した細胞外小胞(MSC-EV)の網羅的解析を行った。まずヒト網膜色素上皮細胞から細胞外小胞を精製し、さらにタンパク質の抽出を行った。次にiTRAQ標識後にTripleTOF質量分析を行い、MSC-EVに内包されるタンパク質を同定した。

抗酸化ストレス作用の解析は、ROS活性プローブで標識したヒト網膜色素上皮細胞を、フローサイトメーターを用いて解析した。

血液網膜関門のモデルとして、Transwell膜上に網膜色素上皮細胞を培養しバリア形成を行った。その上で酸化ストレス刺激に対する経上皮電気抵抗に与える影響を解析した。

マウス脈絡膜血管新生モデルの作成は、光凝固レーザーの眼球照射により脈絡膜血管新生の誘導を行った。術後経時的に、血管内皮細胞マーカー分子の抗体、およびマイクログリアマーカー分子の抗体を用いて免疫染色を行った。

細胞死抑制作用に関しては、免疫染色によるIn situ apoptosis解析を行った。

マウス網膜組織の酸化ストレス刺激に対する抗炎症効果の解析には、Realtime-PCRによる各種遺伝発現解析を行った。

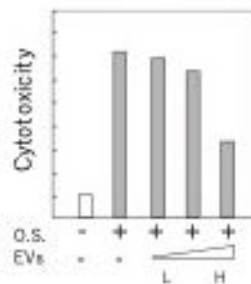
4. 研究成果

骨髄由来の間葉系幹細胞由来細胞外小胞(MSC-EV)の網羅的解析を行った。間葉系幹細胞に対して酸化ストレスを付加し、培養上清からMSC-EVの回収を行った。タンパク質を抽出後に標識を行い、質量分析装置による解析を行った。ストレス刺激によってMSC-EV中のタンパク質発現パターンが変わることが明らかになった。過酸化水素投与により産生される酸化ストレス刺激は、網膜色素上皮細胞のROS活性を上昇させる。しかしMSC-EVの投与群は、ROS活性を有意に抑制することが明らかになった。また同時に酸化ストレスにより誘導される細胞毒性をLDH活性測定キットで解析したところ、MSC-EVの存在下では有意な細胞ダメージの低下が認められた(Fig. 左)。同様の酸化ストレスは、Transwell膜上に作った網膜色素上皮細胞のバリア

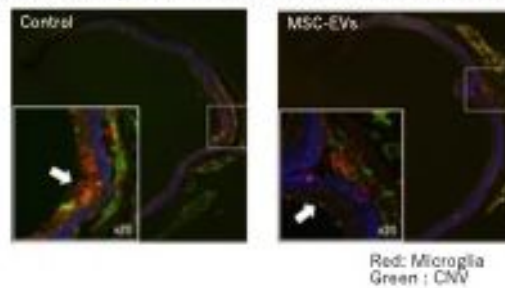
機能の破綻を誘導することが経上皮電気抵抗測定により確認されたが、MSC-EV の投与によりバリア機能の保護が認められた。

野生型マウス眼球に光凝固レーザーの照射を行い、脈絡膜血管新生 (CNV; Choroidal Neovascularization) モデルを作成した。MSC-EV を硝子体に投与したマウスではアポトーシス様細胞死が抑制されることを In situ cell apoptosis detection kit により、また細胞死関連遺伝子発現の減少を Realtime-PCR によって確認した。さらに術部サイトへのミクログリアの集積、脈絡膜血管の網膜への侵入による血管新生が抑制されることが免疫染色により確認された (Fig. 右)。CNV における新生血管が網膜を圧迫し種々のダメージを与えることが失明原因につながる。滲出型加齢黄斑変性の原因が CNV であることを考慮すると、酸化ストレスの抑制が MSC-EV による CNV の抑制の一つの鍵メカニズムだと考えられる。本研究成果から MSC-EV による加齢黄斑変性に対する効果が期待される。

MSC-EV treatment in O.S. -induced cytotoxicity in RPEs.



MSC-EV injection in Laser-induced murine CNV



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1.Mamun AA, Hayashi H, Yamamura A, Nayeem MJ, Sato M.	4. 巻 70
2. 論文標題 J. Physiol. Sci.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hypoxia induces the translocation of glucose transporter 1 to the plasma membrane in vascular endothelial cells.	6. 最初と最後の頁 44
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00773-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Md Junayed Nayeem , Aya Yamamura , Hisaki Hayashi , Hiroyuki Muramatsu , Kogenta Nakamura , Naoto Sassa , Motohiko Sato	4. 巻 288
2. 論文標題 Imatinib mesylate inhibits androgen-independent PC-3 cell viability, proliferation, migration, and tumor growth by targeting platelet-derived growth factor receptor-	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Sciences	6. 最初と最後の頁 120171
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lfs.2021.120171.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato Maki、Hayashi Hisaki、Kanikowska Dominika	4. 巻 65
2. 論文標題 Seasonal differences in clock gene expression levels in buccal epithelial cells of obese men: a pilot study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Biometeorology	6. 最初と最後の頁 1119～1124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00484-021-02092-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山村彩、Alamgir Hossain、高橋理恵、家崎高志、林寿来、佐藤元彦
2. 発表標題 肺動脈性肺高血圧症におけるPDGF受容体とHippoシグナル
3. 学会等名 第100回 日本生理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林寿来
2. 発表標題 Regulation of the outer blood-retina barrier with mesenchymal stem cells derived extracellular vesicle
3. 学会等名 第99回 日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 元彦, 林 寿来, 山村 彩
2. 発表標題 G蛋白活性調節因子による血管シグナル制御機構
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Md Junayed Nayeem, 山村 彩, 高橋 理恵, 林 寿来, 村松 洋行, 中村 小源太, 佐々 直人, 佐藤 元彦
2. 発表標題 アンドロゲン非依存性前立腺癌を用いたPDGFR シグナル抑制による抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林寿来 佐藤元彦
2. 発表標題 酸化ストレスが誘導する間葉系幹細胞由来細胞外小胞の機能解明
3. 学会等名 第67回日本中部生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hisaki Hayashi, Motohiko Sato
2. 発表標題 Blue light induced leakage of outer blood-retina barrier is recovered with extracellular vesicles from mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 第98回日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hisaki Hayashi
2. 発表標題 Regulation of the outer blood-retina barrier with mesenchymal stem cells derived extracellular vesicles
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hisaki Hayashi
2. 発表標題 Role of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles on retinal cells and corneal neovascularization
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hisaki Hayash, Motohiko Sato
2. 発表標題 Roles of mesenchymal stem cell derived extracellular vesicles on retinal cells and corneal neovascularization
3. 学会等名 第101回日本生理学会
4. 発表年 2024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
---------	---------