

令和 5 年 10 月 26 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09811

研究課題名（和文）羊膜由来間葉系細胞エクソソームの分離と眼表面における効果

研究課題名（英文）The isolation of exosome from amniotic membrane mesenchymal cells, and effect of exosome in the ocular surface.

研究代表者

島崎 潤 (Shimazaki, Jun)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40170930

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）：我々はこれまでに羊膜から分離した間葉系細胞の培養上清が角膜上皮の創傷治癒を促進することを報告した。本研究では、羊膜由来間葉系細胞培養上清から細胞外小胞体（EVs）を分離し、その解析と角膜上皮創傷治癒モデルへの効果について検討した。羊膜由来間葉系細胞の培養上清から分離したEVsは直径 156 ± 5.9 nmを多く含み、EVsのマーカーを発現していた。EVs添加により培養角膜上皮の重層化が促進され、未分化マーカーの発現も維持されていた。ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルにおいても創傷治癒が促進する傾向を示した。羊膜由来間葉系細胞から放出されたEVsは一部角膜上皮創傷治癒促進効果を担っている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

羊膜中に存在する間葉系細胞由来エクソソームの眼表面上皮に対する効果を調べることで羊膜の持つ効果のメカニズムを解明することが可能である。これにより羊膜を用いたより効果的な眼表面疾患の治療を行うことが可能となると同時に、羊膜由来エクソソームを用いた難治性眼表面疾患に対する新しい治療法として期待される。

研究成果の概要（英文）：We reported that amniotic membrane-derived fibroblasts (AMFs) have multi-differentiation potential, and AMF-supernatant (AMF-sup) is promoting corneal epithelial wound healing. In this study, extracellular vesicles (EVs) were isolated from AMF-sup, analyzed its characteristics, and compared to its effects in the rabbit corneal epithelial wound healing model. Vesicles isolated from AMF-sup are many spherical vesicles about 156 ± 5.9 nm in diameter, expressed marker of EVs such as CD63, CD9, and TSG101. Application of EVs resulted in maintenance of the limbal epithelial phenotype and immature state in cultivated human corneal limbal epithelial sheets, and significantly promoted wound healing in rabbit corneal epithelium compared with the control. These data suggest that EVs isolated from AMF-sup is effective in maintaining the limbal epithelial phenotype and promoting corneal epithelial wound healing, which may be of value in ocular surface reconstruction.

研究分野：眼科学

キーワード：羊膜 細胞外小胞体 創傷治癒

1. 研究開始当初の背景

羊膜は外胚葉由来の上皮と中胚葉由来の間葉系細胞からなる胚膜の一つである。妊娠中の母体内において、この羊膜は胎児を包み込む最も胎児側の膜である。羊膜には抗炎症作用や創傷治癒促進効果などが知られているだけでなく、コラーゲンを豊富に含んだ血管のない免疫寛容組織であり、角膜、皮膚、血管、気管、鼓膜など様々な臓器の代替基質として臨床応用されるなど、再生医療の分野でも注目されている。スティーブンス・ジョンソン症候群などの症例では重度のドライアイを伴ったケースも多く

存在し、我々は以前からその眼表面を再建させるため、羊膜を基質としたドナー由来の角膜上皮幹細胞の移植を行ってきた(K.Tsubota, J. Shimazaki. N Engl J Med, 1999)。また、より安定した上皮化をはかるため、角膜上皮幹細胞を羊膜上に培養した培養上皮シートの移植も行ってきた(J.Shimazaki, Ophthalmology, 2002)。一方で、我々は羊膜の基礎的な研究についても行っている。例えば、羊膜上に角膜上皮や結膜上皮を培養すると免疫調節に関与するMHC class Iの一つであるHLA-Gの発現が上昇すること(K.Higa, J. Shimazaki. Cornea, 2006)、重篤な炎症をともなった眼表面疾患にこの羊膜を物理的なカバーとして用いると、炎症細胞が羊膜にトラップされ抗炎症効果をもたらすこと(S.Shimmura, J. Shimazaki. Cornea, 2001)、さらに、その効果は羊膜に豊富に存在するヒアルロン酸と炎症細胞で発現するCD44を介して接着しトラップされていることなどについて報告した(K.Higa, J. Shimazaki, Cornea, 2005)。骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞などの間葉系に属する細胞へ分化する能力を持った間葉系幹細胞は、皮膚、脂肪組織、骨髄、歯髄などさまざまな組織に存在する事が報告されており(J.G. Toma, Nat Cell Biol, 2001; S. Gronthos, J Cell Physiol, 2001; S. Gronthos, Proc Natl cad Sci USA, 2000)、これらの間葉系幹細胞は存在する組織の恒常性の維持や創傷治癒過程において重要な働きをしていると考えられる(J.G. Tome. Nat Cell Boil, 2001; S. Growths. J Cell Physiology, 2001)。

本研究の申請者は2017年4月から2020年3月までの文部科学省科学研究費補助金(基盤C)「羊膜由来間葉系幹細胞の眼表面疾患モデルにおける効果」で、羊膜から分離した間葉系細胞の培養上清によって、Wound healingモデルの創傷治癒を促進する効果があることが分かってきた(図1)(K.Higa, J. Shimazaki. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2019)。

以上の研究成果は、羊膜由来間葉系細胞(hAMF)から放出された因子(セクレトーム)によって、角膜の眼表面再建で創傷治癒を促進することが示唆される。間葉系幹細胞から放出されたセクレトーム(特にエクソソーム)は創傷後の上皮化を促進し、瘢痕、血管新生や炎症を抑制することがわかってきた(Yanling, Stem cells 2006; Song, Mol Ther 2018; Eslani Stem cells 2018; Di, Invest Ophthalmol Vis Sci 2017)。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに構築してきた羊膜の生物学を基盤として、角膜上皮創傷治癒を促進するhAMF由来EVsを同定し、その効果とメカニズムを明らかにする。

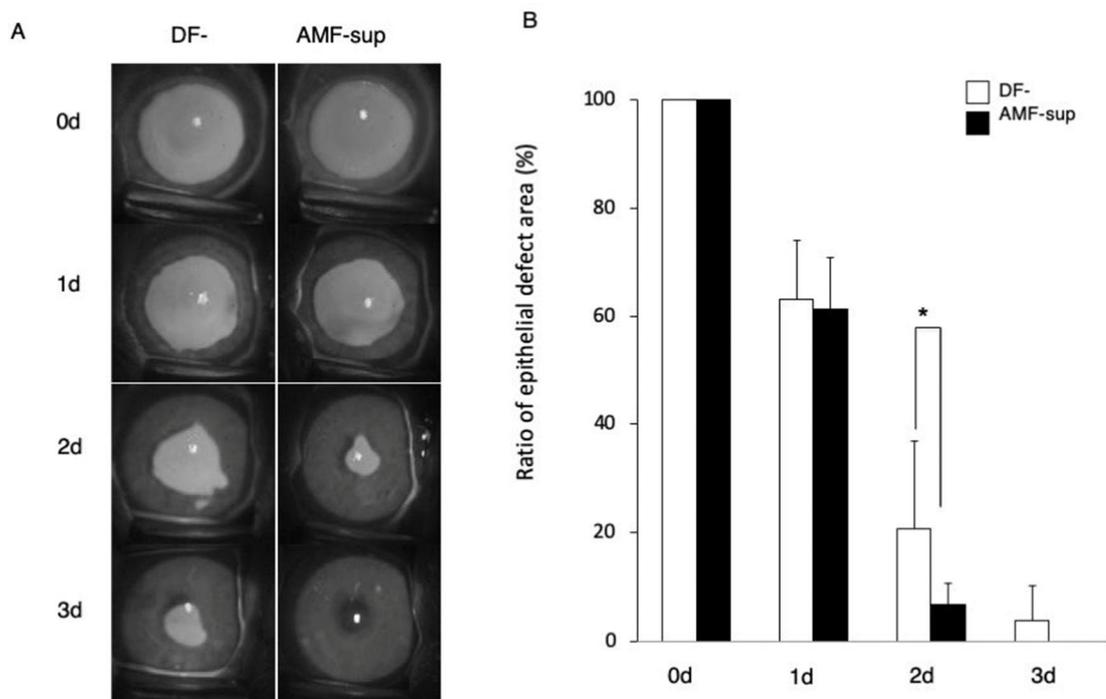


図1) ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルにおける羊膜由来間葉系細胞培養上清(AMF-sup)点眼の効果。(A) ウサギ角膜上皮創傷治癒モデル作成直後(0d)から上皮化までの観察。(B) Aにおける上皮欠損部位の面積の割合(0dの上皮欠損部位の面積を100とした時の割合)。DF-:基礎培地を点眼したもの。AMF-sup:AMF-supを点眼したもの。

3. 研究の方法

本研究では、羊膜由来間葉系細胞(hAMF)を培養した培養液からEVsを分離し解析を行うとともに、in vitroならびにin vivoにおける上皮創傷治癒モデルを作成し、その効果を観察ならびに解析を行う。

1) 羊膜からhAMFの分離ならびに培養

分離・培養条件はこれまで行ってきた方法を基に、研究協力者(比嘉)と協力して行う。必要であれば、酵素的ストレス、酸化的ストレス、不栄養性ストレス等を組み合わせて分離・培養を行って、細胞をより安定的に供給できる様に調整する。

2) hAMF培養上清からEVsの分離

EVsは超遠心法を用いて培養上清から分離を行う。分離したEVsはサイズや形状を電子顕微鏡で観察し、CD63などのEVsマーカーでEVsであることを確認する。

3) 角膜上皮シート創傷治癒モデルの作成

角膜輪部組織から角膜上皮シートを作成し、中央部分に6mm径の組織生検トレパンを用いて上皮欠損を作成したものをin vitroの創傷治癒モデルとする。

4) 角膜上皮シート創傷治癒モデルにおけるエクソソームの効果の観察ならびに解析

継時的に再上皮化するまで観察し、培養液中に添加したエクソソームの効果を比較する。

5) ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルの作成

白色家兎の角膜上皮中央部分に8mm径の組織生検トレパンを用いて上皮欠損を作成したものを創傷治癒モデルとする。

6) ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルにおけるエクソソームの効果の観察ならびに解析
 エクソソームを点眼し、フルオレセイン染色による上皮欠損部位の比較を再上皮化するまで観察する。

4. 研究成果

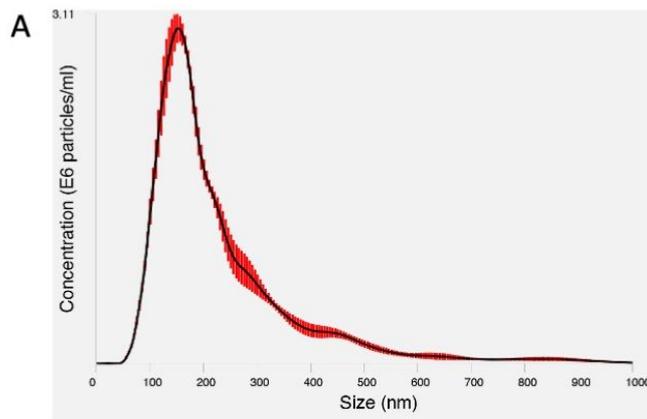


図1) 羊膜由来間葉系細胞の培養上清から分離したEVsの解析。A)EVsのナノサイト解析。ピークの平均が直径 $156 \pm 5.9\text{nm}$ 。B)EVsの電子顕微鏡像。左：弱拡大写真(Scale bar : 500nm)。右：強拡大写真 (Scale bar : 100nm)。

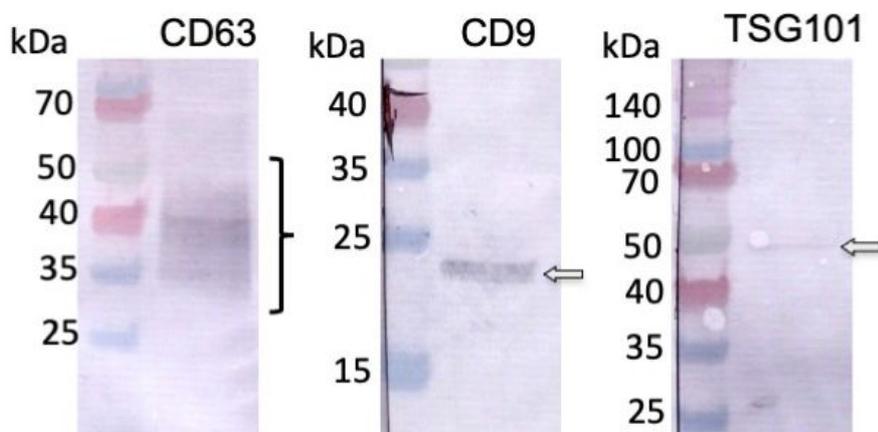
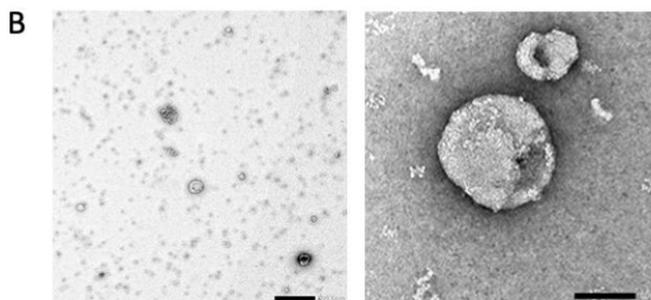


図2) EVsのスタンブロット。左：CD63 (約30~60kDaのスミア状のバンド)。中央：CD9 (約23kDaのバンド)。右：TSG101 (約48kDaのバンド)。

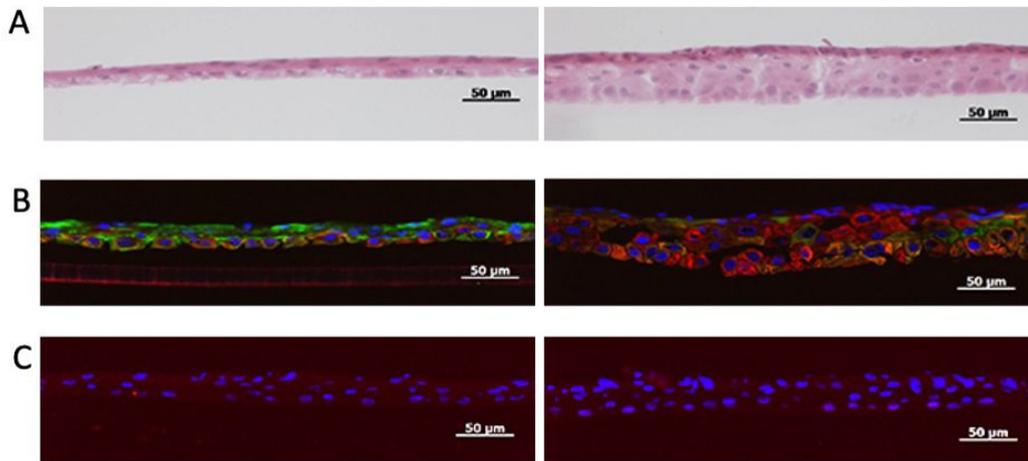


図3) 培養角膜上皮シートの組織学的解析。A)ヘマトキシリン・エオジン染色。B)ケラチン15(赤)並びにケラチン12(緑)の免疫染色。C) p63(赤)の免疫染色。DAPIによる核染色(青)。左側：EV未添加の上皮シート。右側：EV添加の上皮シート。Scale bar：50μm。

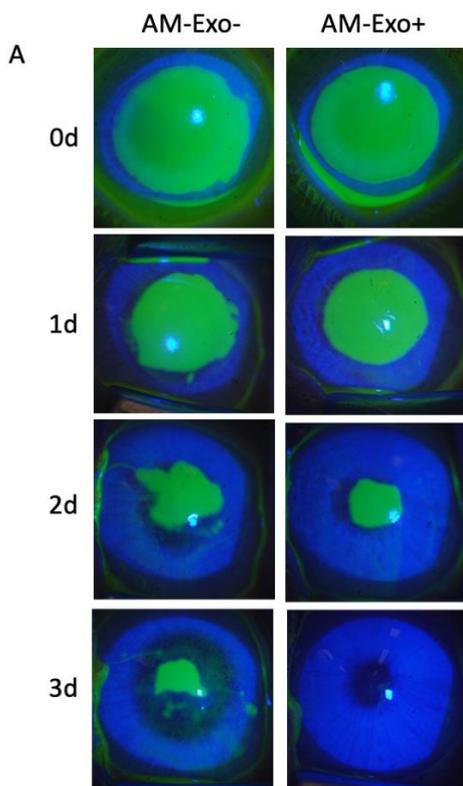
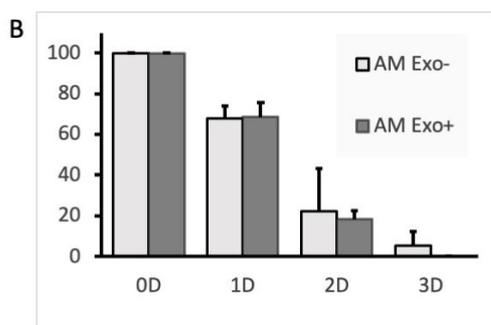


図4) ウサギ角膜上皮創傷治癒モデルにおけるEV点眼による効果。A) 経日的変化。0d：創傷治癒作成日、1d：1日後、2d：2日後、3d：3日後。左(AM Exo-：PBS点眼)、右(AM Exo+：EVs点眼)。B) 図4Aの上皮欠損部位の面積を数値化してグラフにしたもの。



羊膜から分離した間葉系細胞の培養上清から分離したEVsはナノサイト解析並びに電子顕微鏡解析により直径 $156 \pm 5.9\text{nm}$ を多く含んだ球状の粒子であり、 4.73 ± 0.15 個/mlの濃度で回収できていることがわかった(図1A,B)。ウェスタンブロットによりCD63、CD9やTSG101といったEVsの分子マーカーの発現を確認することができた(図1C)。培養角膜上皮シート作成時におけるEVs添加により約1.8倍の上皮の重層化が促進され、免疫染色によりK15、p63の未分化マーカーの発現も維持されていることがわかった(図2A,B,C)。ウサギ角膜上皮の創傷治癒モデルにおいてEVs点眼により創傷治癒を促進する傾向が観察された(図3A,B)。

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 0件）

1. 発表者名 比嘉一成、木本玲緒奈、石渡三冬、平山雅敏、山口剛史、島崎 潤
2. 発表標題 ヒト羊膜由来線維芽細胞から分離した細胞外小胞体の角膜上皮への効果
3. 学会等名 角膜カンファランス2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 比嘉一成、木本玲緒奈、石渡三冬、平山雅敏、山口剛史、島崎 潤
2. 発表標題 ヒト羊膜fibroblasts由来細胞外小胞体の分離と角膜上皮への効果
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会
4. 発表年 2023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
研究協力者	比嘉 一成 (Higa Kazunari) (60398782)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

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