様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ５ 月 ３１ 日現在

機関番号：１１３０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：２０Ｋ１２６４１

研究課題名（和文）再生医療等製品の細胞材料における媒介物質エクソソームを用いた機能評価法の確立

研究課題名（英文）Establishment of functional evaluation method using exosomes in cell resource for regenerative medicine products

研究代表者
沖田　ひとみ（Okita, Hitomi）

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：３０４００４５１

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）：　間葉系幹細胞（MSC）培養上清中に存在するエクソソームから細胞特性を解析するため、MSC培養中の細胞未分化能の維持特性および細胞生存率の経時観察を行った。さらに、それらの結果とMSC培養上清に存在するエクソソーム発現量の時間的変化との関係性を検討した。その結果、MSC細胞中のSSEA-3発現量と培養上清中のCD63,CD81で、培養開始から94時間後に変化が現れることが示された。このことから、培養上清に存在するエクソソームを解析することが、細胞を用いる事無く、迅速に行うことのできる品質評価法として、品質を満たした継代細胞の有効活用へと繋がると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義
多くの研究者は細胞株の持つ情報を信頼し、その細胞の性質がある程度保たれていることを信じ、研究を行う。しかし、特定の物質に対する細胞応答を解析したい場合などの実験を行う上で組織特異的なマーカーの発現や、遺伝子の発現が確認できないという状況に直面することがある。特に有限寿命のある細胞では品質検査に使用した細胞と同じ性質の細胞は入手できなくなることもあるため、細胞を用いる事なく分化能や機能に関する品質評価を迅速かつ正確に行える方法が必要である。さらにそれが実現すれば品質を満たした継代細胞の有効活用が可能となり、時間および経費の削減を通して再生医療等製品の標準医療化に大きく貢献する事が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the cellular properties of exosomes present in the MSC culture supernatant. First, the characteristics of preserve undifferentiated cell potency and cell viability during MSC culture were observation on chronological change. Furthermore, we examined the relationship between these results and temporal changes in exosome expression levels present in the MSC culture supernatant. As a result, the SSEA-3 in MSCs, and CD63 CD81 in culture supernatants it was shown that changes appeared 94 hours after the start of culture. Therefore, we believe that analyzing the exosomes present in the culture supernatant will lead to the effective use of passaged cells that satisfy quality as a quality evaluation method that can be performed quickly without using cells.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療等製品　品質検査　生体材料

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

再生医療等製品の細胞材料となる体性幹細胞は、腫瘍化のリスクが低く、安全性が高いため、様々な組織の代替や組織修復効果を目的とした細胞治療で頻用されている。しかしながら、連続継代による形質変化や増殖能低下、また凍結保存細胞株の機能保持が困難な為、多くの場合が初代培養からの利用に限定される。

このことから、有限寿命のある細胞を用いる事なく細胞分化能や機能に関する品質評価を迅速かつ正確に実施できれば、基準を満たす継代細胞の有効活用が可能となり、再生医療等製品としての標準医療化に大きく貢献する事が期待できると考えた。そこで着目しているのがエクソソームである。エクソソームは細胞から分泌される膜小胞で、細胞情報伝達の為の媒介物質として注目されている。我々はヒト培養細胞への外的刺激により、24 時間以内と極めて迅速に細胞由来エクソソームの CD9 及び炎症系指標が増加することをこれまでの検証で確認している。

本研究ではこの知見に基づき、細胞培養上清から分泌されたエクソソームを同定することで細胞を使用せずとも細胞材料の品質評価が行えると考え、その検証を実施する。

２．研究の目的

有限寿命のある細胞では品質検査に使用した細胞と同じ性質の細胞は入手できなくなることもあるため、培養過程での変化や組織由来特性を確認するための検査方法は確立されていない。そこで、着目しているのはエクソソームである。エクソソームは細胞から分泌される脂質膜構造を持つ粒子であり、その膜小胞内には様々なたんぱく質、核酸、脂質を含んでいることが報告されている。分泌されたエクソソームが他の細胞を刺激することが確認されており、細胞情報伝達の媒介物質として注目されている。また、正常細胞だけではなく、がん細胞などの異常な細胞からも分泌され、分泌された細胞情報を反映することからバイオマーカーとして病態との関連の解析は進んでいる。*(Melo, S. A. et al. Nature 523, 177-182 (2015)* 我々はすでにヒト培養細胞への外的刺激によりエクソソーム、*microparticle*、*microRNA* の増加減少の変化を観察し、24 時間以内に品質評価ができる実験系を確立している。さらに内在性因子の解析を行うことで研究遂行の早期段階で細胞材料の品質評価が行えると考えた。以上のことから、本研究では細胞を使用せずに培養上清中の媒介物質であるエクソソームの同定、解析を行い安定した品質の細胞供給を可能にすることを目的とし、今後、機能面の解析及び安全性の評価を行っていくことで生体内の反応や病態形成にいたる機序を明らかにすることができれば有用な結果をもたらすことが期待されていくと考える。

３．研究の方法

培養上清中に存在するエクソソームから細胞特性を解析するために以下の方法を実施した。

（１）　MSC 培養中の未分化能維持および細胞生存率の観察

継代培養によっておこる細胞の形態変化に伴う分化能力や免疫抑制特性および免疫調節機能因子の産生を調査するため、培養時間毎の未分化能維持性の観察を行った。細胞は播種からおよそコンフルエントとなる 72，94，114 時間後で回収し、幹細胞未分化マーカーである SSEA-3 を用いて発現量の観察、また物理的なダメージによる細胞生存率の観察を行った。

（２）　MSC 培養上清中のエクソソーム発現量の観察

これまで培養上清を検体としてエクソソームの検出を行うには、大量の上清から超遠心機を用いて、回収することが一般的とされていたが、より簡便で迅速な単離を行うための検出法として、PS アフィニティー精製法を採用し、ヒト骨髄間葉系幹細胞（MSC）からのエクソソームを回

収することとした。

培養上清は細胞播種から 72，94，114 時間後の上清を回収し、限外濾過フィルターユニットを用いて濃縮させた後に PS アフィニティー精製法にて回収し、テトラスパニン類の CD9,CD63,CD81 の発現量を観察した。

４．研究成果

（１） MSC 培養中の未分化能維持および生存率の観察

72，94，114 時間後で回収した SSEA-3 陽性細胞の MACS ソーティングを行った際の陽性細胞回収率、及びソーティングによる細胞への物理的ダメージによる死細胞数を計測し、生存率を比較した結果、継代培養細胞播種から 3 日目（72 時間後）、4 日目(94 時間後)の陽性細胞の回収率で良好な傾向を示した（ Fig1,Fig2 ）。特に 4 日目(94 時間後)ではどの細胞群でも陽性細胞回収率、生存率ともに良好な細胞を得ることができた。一方、5 日目では分離後の細胞生存率が低下していくことが示され、また死細胞の増加がフローサイトの解析結果にも影響することから、SSEA-3 陽性細胞率の低下も見られることとなった。

MSC 培養中の SSSEA-3 の経時変化を観察することで、幹細胞の未分化性が最も維持される期間は培養開始から 94 時間後であることが示された。

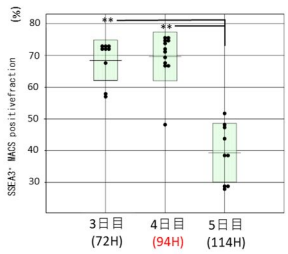

Fig.1 SSEA-3 陽性分離細胞回収率

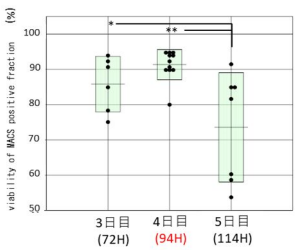

Fig.2 SSEA-3 陽性分離細胞生存率

（２） MSC 培養上清中のエクソソーム発現量の観察

また、SSEA-3 の発現量の変化と同様に MSC 培養上清液中に存在するエクソソームの発現量にも変化があり、特に CD63，CD81 では細胞播種から 4 日目（94 時間後）から発現量が増加傾向にあることが示された（Fig3)。

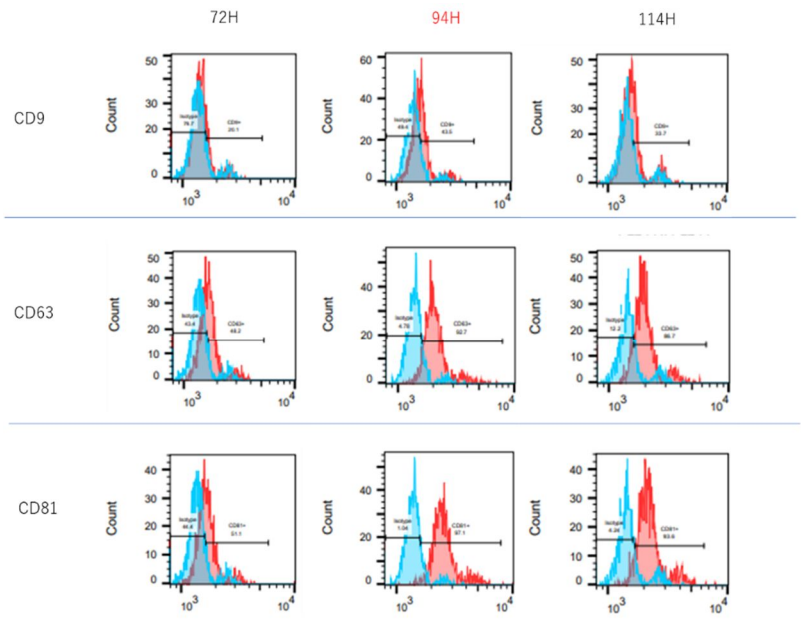

Fig.3 テトラスパニンマーカー発現量の変化

以上より、MSC 細胞の SSEA-3 陽性細胞率と細胞培養上清液中に放出される CD63 及び CD81 の発現量にはいずれも細胞播種から 94 時間後に変化が観察され、培養上清エクソソームの検出は、間葉系幹細胞の未分化性維持の指標となる可能性が示唆される。このように使用する細胞の媒介物質から細胞の特異的な発現パターンを示す情報を先に得られることができれば、より研究の早期段階で培養を継続しながらも、細胞の使用可否を決定することができる。今回の結果より、細胞培養上清液中のエクソソームは、有限寿命があるとされる体性幹細胞の機能や特性解析の重要なツールであり、細胞を用いる事無く、迅速に行うことのできる品質評価法として、品質を満たした継代細胞の有効活用へと繋がり、再生医療等製品の標準医療化へ大きく貢献する有用な結果となると考える。

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 沖田ひとみ、伊藤貴子、黒田康勝、若尾昌平、出澤真理、後藤昌史、張替秀郎
２．発表標題 アカデミア発の再生医療シーズの実用化へ向けた東北大学再生医療ユニットの取り組み
３．学会等名 第21回日本再生医療学会総会
４．発表年 2022年

１．発表者名 沖田ひとみ、伊藤貴子、佐藤則子、岡田克典、今井啓道、後藤昌史
２．発表標題 東北大学における組織移植推進体制の構築
３．学会等名 第58回日本移植学会総会
４．発表年 2022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
研究分担者	伊藤　貴子（斎藤貴子） (Ito Takako) (10375173)	東北大学・大学病院・助教 (11301)	

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