

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17384

研究課題名（和文）GVHD関連骨髄不全の脂肪組織由来間葉系幹細胞エクソソームによる治療開発

研究課題名（英文）Treatment of GVHD-related bone marrow failure with exosomes derived from AD-MSCs

研究代表者

西 由希子（Nishi, Yukiko）

琉球大学・病院・助教

研究者番号：60793924

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）：AD-MSC由来のエクソソーム単離およびGVHDモデルマウスのAD-MSC投与時の抗体産生能について検証した。GVHDモデルマウスにNP-CGGを免役し、抗体産生を評価したところ、骨髄GVHDを発症したマウスでは抗体産生が著しく低下した一方で、AD-MSCを投与したGVHDモデルマウスでは抗体価の上昇を認めた。骨髄GVHDが免疫能に与える影響及びAD-MSCによる免疫機能の改善を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄GVHDが免疫能に与える影響及びAD-MSCによる免疫機能の改善を認めた。臨床において、同種造血幹細胞移植後GVHDの患者では、GVHD治療による免疫抑制のみならず、GVHDそのものによる免疫不全を呈している可能性が強く示唆される。

研究成果の概要（英文）：We isolated exosomes derived from AD-MSCs and examined their ability to produce antibodies in GVHD model mice treated with AD-MSCs. Mice with bone marrow GVHD showed significantly decreased antibody production, while mice with GVHD model mice treated with AD-MSCs showed increased antibody titers. The effect of bone marrow GVHD on immunocompetence and the improvement of immune function by AD-MSCs were observed.

研究分野：血液内科

キーワード：脂肪組織由来間葉系幹細胞 GVHD

1. 研究開始当初の背景

細胞間伝達物質としてのエクソソームの役割と病態的意義が注目されており、疾病治療への応用が期待されている。特定のエクソソームを標的臓器へ特異的に送達出来れば治療効果を最大限に高めることができる。我々は、同種造血幹細胞移植の合併症である移植片対宿主病 (GVHD; graft versus host disease) の治療・予防として脂肪組織由来間葉系幹細胞 (AD-MSC; adipose tissue-derived mesenchymal stem cell) の有効性をマウス病態モデルで検証し、特に骨髄 GVHD に対する優れた効果を報告したが、その機序にエクソソームが関わる可能性が強く想定される。

2. 研究の目的

骨髄 GVHD に対する AD-MSC 由来エクソソームの有効性に関わる分子群をマウス病態モデルを用いて同定し、骨髄への送達に優れたエクソソームを開発する。細胞治療と比較し、腫瘍化や感染のリスクが低く、単純に分離されたエクソソームを全身に投与するより、はるかに有効性の高い治療法の開発につながる可能性が期待出来る。

3. 研究の方法

(1) GVHD マウスモデルの作製

CB6F1 マウスをホストマウスとし、Ly5.1(CD45.1)コンジェニック C57BL/6 マウス脾臓由来の単核球をドナー細胞として移植することで GVHD を人工的に誘導した。本モデルは、移植前処置として抗癌剤投与や放射線照射を行わず骨髄破壊を免れるため、骨髄 GVHD の観察に優れたモデルである。

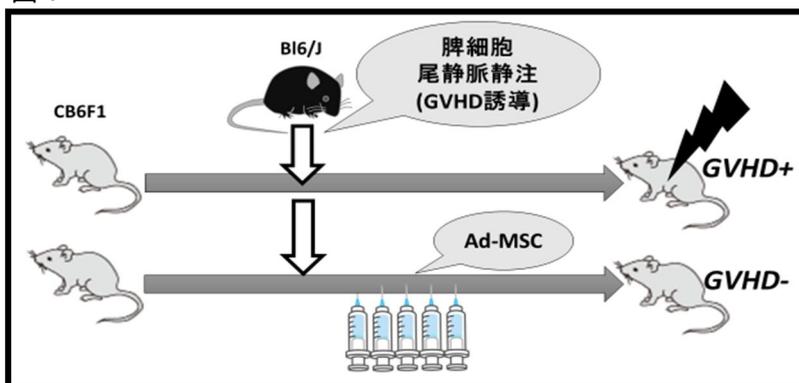
(2) AD-MSC 由来エクソソームの分離

MSC ドナーマウスの皮下脂肪組織を採取し、メスで細断し、ハイドロキシアパタイト基材に乗せ、培養することで AD-MSC を分離する。ポリマー沈殿法を用いて AD-MSC 由来エクソソームを単離する。

(3) GVHD マウスモデルへの AD-MSC 投与

(1)で作成した GVHD マウスモデルに、(2)で培養した Ad-MSC またはエクソソームを尾静脈から AD-MSC を 1×10^6 /匹/日、15日間投与する。(図1)

図 1



(4) 骨髄 GVHD とその改善に伴う免疫能の評価

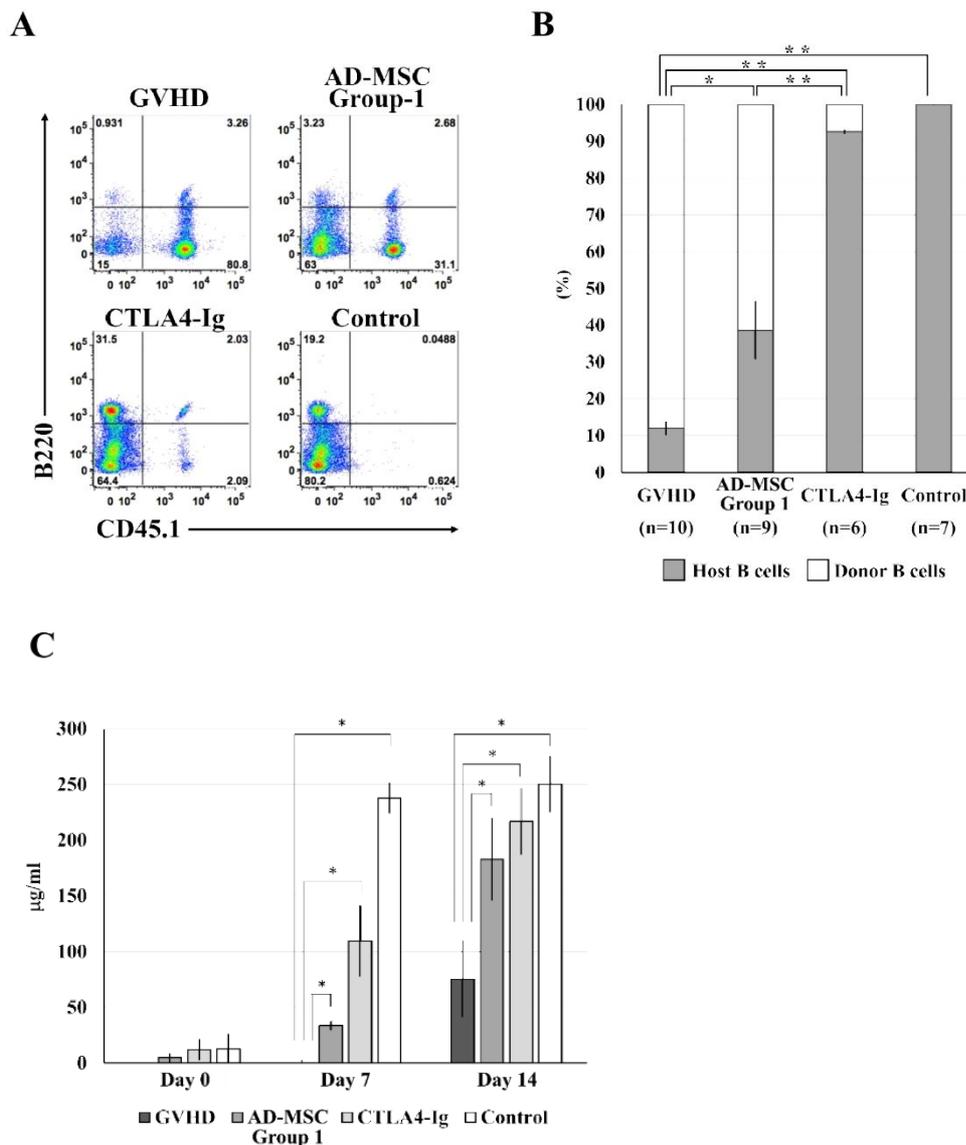
AD-MSC 治療マウスと非治療マウスにおける GVHD 後の抗原特異的な免疫反応を検証し、移植後免疫不全に対する Ad-MSC の影響、有効性を明らかにする。AD-MSC 治療群、非治療群のマウスに CFA + OVA を免疫し、OVA-IgG を測定することで、移植後の感染を模し、移植後免疫不全・移植後免疫再構築に対する Ad-MSC の影響を検証する。

4. 研究成果

AD-MSC 由来エクソソームに関しては、エクソソーム単離にあたり培養液の血清中のエクソソームが混入するため無血清培地での AD-MSC 培養を試行したが、AD-MSC を十分に培養することが困難であった。そのため当初の予定とは異なるが、AD-MSC そのものを使用して実験を進めた。AD-MSC 投与マウスで骨髄 GVHD が改善することにより、液性免疫がどの程度保たれるのかを研究方法(4)で検証した。

移植後 14 日目のマウスの末梢血中の B 細胞サブセットのレベルを、B220 と CD45.1 の発現に基づくフローサイトメトリーで解析した (図 2)。我々のデータでは、末梢血中宿主 B 細胞である B220+CD45.1-細胞が GVHD マウスで著しく減少していることを示した。尚、図中の CTLA4-Ig はマウス GVHD に対する既知の免疫抑制剤であり、ポジティブコントロールとして設定している。宿主 B 細胞の割合は、GVHD マウス (AD-MSC 非投与) (0.46% (±0.06%)) と比較して、AD-MSC 投与マウス (5.6% (±2.5%)) では有意に高かった。GVHD マウスと AD-MSC 投与マウスの B 細胞活性を調べるために、マウスに OVA を免疫し、注射後 7 日目と 14 日目に血清の抗 OVA-IgG レベルを ELISA で評価した。OVA に結合した IgG 抗体のレベルは、図 2B に示すとおりである。7 日目、GVHD グループの抗 OVA-IgG の抗体量は 1.1 μg/ml (±3.2 μg/ml)、AD-MSC 投与グループは 33.6 μg/ml (±3.9 μg/ml) であった。14 日目、GVHD 群の抗 OVA-IgG レベルは 75.3 μg/ml (±33.8 μg/ml)、AD-MSCs 群マウスでは 182.5 μg/ml (±36.3 μg/ml) であった。抗 OVA-IgG のレベルは、GVHD グループと比較して、AD-MSC グループでより高いという結果であった。

図 2



AD-MSC 投与群の末梢血中の宿主 B 細胞の生存率は、非投与群の約 4 倍であることが実証された。マウスに OVA を免疫した場合、AD-MSC 非投与群ではわずかな OVA 特異的 IgG 産生しか観察されなかった。一方、AD-MSC 投与群では約 30 倍の特異的抗体が産生された。以上のことから、AD-MSC の投与により、骨髄 GVHD の改善、宿主 B 細胞の生存率の上昇、抗原特異的免疫応答の早期回復が同時に観察された。

以上のことから、本研究は、CTLA4-Ig のような強力な免疫抑制剤を用いることなく、AD-MSC の投与により GVHD が改善され、免疫応答の早期回復が促進されることを実証した。今後、AD-MSC と他の薬剤との相乗効果を明らかにするとともに、AD-MSC の GVHD に対する予防的適用を検討する必要がある。AD-MSC の投与が GVHD の骨髄不全を抑制するメカニズムはまだ解明されていないが、AD-MSC の投与は、過剰な免疫抑制を伴わずに GVHD を予防・改善する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------