

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17717

研究課題名（和文）マクロファージによる貪食を回避するエクソソーム経静脈投与による血管新生療法の開発

研究課題名（英文）Development of engineered exosomes to avoid phagocytosis by macrophages

研究代表者

溝口 高弘（MIZOGUCHI, Takahiro）

山口大学・医学部附属病院・診療助教（4日/週）

研究者番号：90844796

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）：エクソソームは高い治療効果があると期待されているが、投与方法により、エクソソームを経静脈投与した場合、投与されたエクソソームがマクロファージなどの単球に貪食されるため、エクソソームの治療効果が減弱する可能性が示唆されている。本研究では、単球の貪食回避のために、Don't eat me signalの一つであるCD47をエクソソームに持たせることで、エクソソームが単球の貪食から回避できる可能性があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソーム治療はcell-free再生医療の一つとして注目されている。エクソソームを局所投与する場合はあまり問題にならないが、エクソソームを経静脈投与で治療する場合、投与されたエクソソームが単球などに貪食されることで、治療効果が減弱すると考えられている。本研究では、単球の貪食回避の機能を持つCD47分子をエクソソームに持たせると、エクソソームは単球の貪食から回避することができる結果が得られた。そのため、本研究は、エクソソームの経静脈投与による治療法を実現させることに寄与する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Naive exosomes may be phagocytosed by macrophages when administered intravenously. This study suggested that engineered exosomes with CD47 might avoid phagocytosis by macrophage .

研究分野：再生医療

キーワード：エクソソーム

### 1. 研究開始当初の背景

細胞移植による再生医療が実臨床で実施されている。細胞移植による生体の機能改善のメカニズムは2つに大別される。一つ目は、移植した細胞が生体に生着して、機能を補う働きをすることで、生体の機能が改善すること。二つ目は、移植した細胞が分泌する因子が、生体の細胞を活性化させることで、細胞が増殖して生体の機能が改善すること。上記の二つ目を期待した細胞移植が、現在の大部分の細胞移植による再生医療である。

細胞が分泌する因子として、サイトカイン、ケモカイン、エクソソームなどがあり、これらの中でも、エクソソームが重要な因子であることを示す多くの報告がなされている。その為、近年、移植細胞が分泌するエクソソームを培養液から精製し、その精製したエクソソームを細胞の代わりに移植することで生体の機能を改善させることを目的とした cell-free 再生医療が盛んに研究されている。

エクソソームは直径約 30 ~ 120 nm の脂質二重膜からなる細胞外小胞の一つであり、エクソソームを分泌する細胞由来の DNA、RNA、タンパクを内包している。そして、エクソソームは、エクソソームを分泌する細胞の形質を持っていると考えられており、細胞移植で血管新生を誘導する幹細胞の場合、その幹細胞由来のエクソソームも、血管新生を誘導することが報告されている。

エクソソームを局所投与する治療法と比べて、エクソソームを経静脈投与で治療する方法を考えた時に課題となるのが、マクロファージなどの単球によるエクソソームの貪食である。マクロファージの貪食を回避するために、Don't eat me signal を持つ CD47 をエクソソームの膜表面に提示させる方法が考えられている。また、エクソソーム内にタンパクを内包させるためのシグナル配列や、エクソソームの膜表面にタンパクを提示させるためのシグナル配列も報告されている。

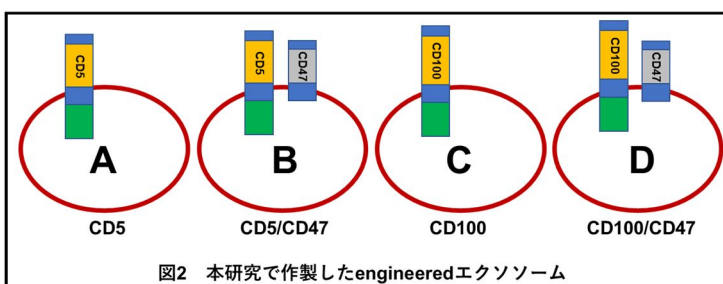
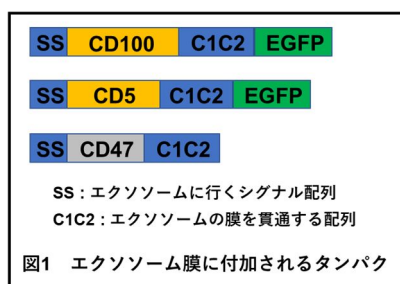
本研究では、エクソソームを経静脈投与で治療する方法を確立する為に、CD47 をエクソソームに持たせるための、CD47 陽性エクソソームの作製方法を検討することにした。

### 2. 研究の目的

治療に用いられるエクソソームは、通常の細胞由来のエクソソームである naive exosomes をそのまま治療薬として使用する方法と、細胞に遺伝子などを導入し、その細胞由来のエクソソームを改変している engineered exosomes を治療薬として使用する方法が考えられている。本研究で検討する CD47 陽性エクソソームは engineered exosomes に該当する。本研究の目的は、engineered exosomes を作製するにあたり、最適な CD47 陽性エクソソームの作製方法を検討することである。

### 3. 研究の方法

図1に示すようなタンパクを発現するプラスミドを作製した。それらのプラスミドを 293T 細胞に導入し、無血清培地で培養することで、培養液中に示すエクソソームを作製した(図2)。CD5 および CD100 は、エクソソームを改変するために付加させるタンパクとして使用した。



#### (1) CD47 を付加したエクソソームの単球の貪食回避の効果の検討

図2のBのエクソソームを作製するために、CD5 および CD47 を発現するプラスミドをそれぞれ等量ずつ 293T 細胞に導入することで、エクソソームを作製した。この実験では図2のAのエクソソームを作製するために、CD5 を発現するプラスミドおよび Mock のプラスミドを等量ずつ 293T 細胞に導入することで、エクソソームを作製した。

24-well plate にヒト単球細胞 THP-1 を播種し、そのウェルにエクソソーム A およびエクソソーム B を添加して 12 時間培養した。ウェルから培養液を回収し、その培養液中に存在するエクソソームを CD5 に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングした。

#### (2) CD47 を付加したエクソソームの単球の貪食回避の効果の検討

図2のCおよびDのエクソソームを作製するために、293T細胞に導入するCD100およびCD47を発現するプラスミドまたはMockのプラスミドの濃度を変えて、エクソソームを作製した。以下に293T細胞に導入したプラスミドの割合を示す。

a : CD100 : CD47 : Mock = 5:0.5:4.5

b : CD100 : CD47 : Mock = 5:2.5:2.5

c : CD100 : CD47 : Mock = 5:5:0

d : CD100 : CD47 : Mock = 5:0:5

24-well plate にヒト単球細胞 THP-1 を播種し、そのウェルに上記 a~d のプラスミドの割合で作製したエクソソーム C およびエクソソーム D を添加して 12 時間培養した。ウェルから培養液を回収し、その培養液中に存在するエクソソームを CD100 に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングした。

#### (3) CD47 を付加したエクソソームの単球の貪食回避の効果の検討

図4のCおよびDのエクソソームを作製するために、293T細胞に導入するCD100およびCD47を発現するプラスミドまたはMockのプラスミドの濃度を変えて、エクソソームを作製した。以下に293T細胞に導入したプラスミドの割合を示す。

e : CD100 : CD47 : Mock = 5:5:0

f : CD100 : CD47 : Mock = 5:2.5:2.5

g : CD100 : CD47 : Mock = 5:2:3

h : CD100 : CD47 : Mock = 5:1.5:3.5

i : CD100 : CD47 : Mock = 5:0:5

24-well plate にヒト単球細胞 THP-1 を播種し、そのウェルに上記 a~d のプラスミドの割合で作製したエクソソーム C およびエクソソーム D を添加して 12 時間培養した。ウェルから培養液を回収し、その培養液中に存在するエクソソームを CD100 に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングした。また、作製したエクソソーム C およびエクソソーム D に対してエクソソームのマーカーである CD63 に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングした。

## 4. 研究成果

#### (1) CD47 を付加したエクソソームの単球の貪食回避の効果の検討

図3のウェスタンブロッティングの結果では、エクソソーム B の CD5 のタンパク量は、エクソソーム A の CD5 のタンパク量よりも多いことが示唆された。この結果は、エクソソームに CD47 を付加すると、単球の貪食から回避される可能性があると考えられた。

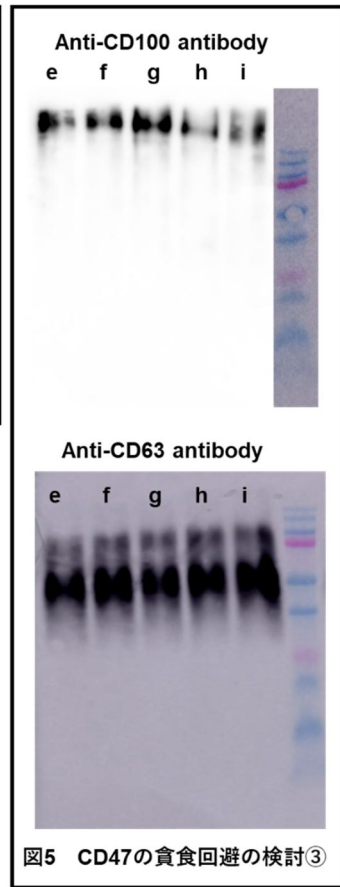
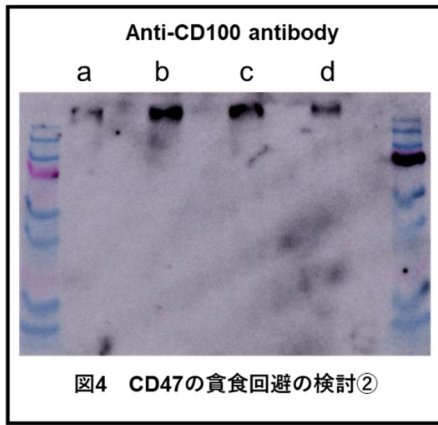
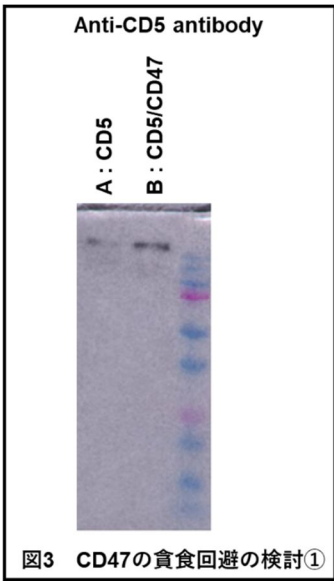
#### (2) CD47 を付加したエクソソームの単球の貪食回避の効果の検討

図4のウェスタンブロッティングの結果では、エクソソーム D の CD100 のタンパク量は、b と c のプラスミドの割合で作製した場合、同じであることが示唆された。しかし、a のプラスミドの割合でエクソソームに CD47 を付加することを試みた場合、単球の貪食から回避される効果は減少すると考えられた。

#### (3) CD47 を付加したエクソソームの単球の貪食回避の効果の検討

図5のウェスタンブロッティングの結果では、h のプラスミドの割合でエクソソームに CD47 を付加することを試みた場合、単球の貪食から回避される効果は減少すると考えられた。

本研究の結果から、CD47 を発現するプラスミドを細胞に導入して engineered exosomes を作製する場合、細胞に導入するプラスミドの中で、CD47 を発現するプラスミドの割合は 2 割以上であれば、単球の貪食から回避される効果が得られる可能性があることが示唆された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nagase T, Ueno K, Mizoguchi T, Samura M, Harada T, Suehiro K, Shirasawa B, Morikage N, Hamano K	4. 巻 12
2. 論文標題 Allogeneic fibroblast sheets accelerate cutaneous wound healing equivalent to autologous fibroblast sheets in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Translational Research	6. 最初と最後の頁 2652-2663
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Samura Makoto, Morikage Noriyasu, Otsuka Ryo, Mizoguchi Takahiro, Takeuchi Yuriko, Nagase Takashi, Harada Takasuke, Yamashita Osamu, Suehiro Kotaro, Hamano Kimikazu	4. 巻 271
2. 論文標題 Endovascular Aneurysm Repair With Inferior Mesenteric Artery Embolization for Preventing Type II Endoleak	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 238 ~ 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLA.0000000000003299	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 Suehiro Kotaro, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Mizoguchi Takahiro, Hamano Kimikazu	4. 巻 62
2. 論文標題 Regular Compression Therapy May Not Be Necessary for Lymphedema in Arms without a Subcutaneous Echo-Free Space	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Surgery	6. 最初と最後の頁 258 ~ 262
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.avsg.2019.04.020	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Suehiro Kotaro, Morikage Noriyasu, Harada Takasuke, Samura Makoto, Nagase Takashi, Takeuchi Yuriko, Mizoguchi Takahiro, Suzuki Ryo, Kurazumi Hiroshi, Hamano Kimikazu	4. 巻 13
2. 論文標題 Interface Pressures Derived from a Tubular Elastic Bandage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Vascular Diseases	6. 最初と最後の頁 410 ~ 413
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3400/avd.oa.20-00136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 溝口高弘、末廣晃太郎、永瀬隆、佐村誠、原田剛佑、上野耕司、原田耕志、森景則保、濱野公一
2. 発表標題 静脈不全による難治性皮膚潰瘍に対する培養ヒト自己細胞混合シートを用いた移植治療
3. 学会等名 第50回日本心臓血管外科学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 溝口高弘、森景則保、竹内由利子、永瀬隆、佐村誠、原田剛佑、末廣晃太郎、濱野公一
2. 発表標題 腹部大動脈腸骨動脈病変に対するVBXを用いた血管内治療の検討
3. 学会等名 第61回日本脈管学会総会
4. 発表年 2020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
---------	---------