

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06964

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞由来機能性細胞外小胞体の臨床応用に向けた研究開発

研究課題名(英文) Development of MSC-derived extracellular vesicle for clinical application

研究代表者

大根田 修 (Ohneda, Osamu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：30311872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：機能的に優れたMSCを単離できるヒト由来組織を同定し、2型糖尿病及び老化によるMSC機能低下を分子レベルで解明し、その機能を補完するための方法を確立した。機能補完法的手段として細胞外小胞 EVを用いて行った。1) 2型DM患者の脂肪組織から採取したdAT-MSC由来のdEVと健康者のnAT-MSC由来のnEVの機能を比較した。nAT-MSCにdEVを投与すると、増殖能には変化がなかったが、脂肪分化能が有意に上昇した。2) 高齢者由来AT-MSC(eAT-MSC)は、新生児由来AT-MSC(iAT-MSC)と比較して、増殖能・分化能加えて創傷治癒能の低下が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Transformed extracellular vesicles with high angiogenic ability as therapeutics of distal ischemic tissues. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2022. PMID: 36120585

上記論文を公表することにより、機能性幹細胞から単離された細胞外小胞EVが効果的に標的細胞の性質をトランスフォームすることが可能であることを明らかにした点は、社会的意義が高いものと思われる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate functional abnormalities of MSCs derived from patients with diseases (type 2 diabetes) and functional decline of MSCs due to aging at the molecular level, this study was performed. The following studies were conducted using extracellular vesicles (EVs): 1) dEVs derived from dAT-MSCs collected from adipose tissue of patients with type 2 DM were compared with EVs derived from nAT-MSCs of healthy subjects; 2) administration of dEVs to nAT-MSCs did not alter proliferative ability but significantly increased adipogenic differentiation, and 3) the function of hEVs was significantly enhanced in patients with type 2 DM. Elderly AT-MSCs; eAT-MSCs showed decreased proliferative and differentiation capacity as well as wound healing ability compared to infant AT-MSCs; iAT-MSCs. ROS expression was significantly upregulated in eAT-MSCs compared to i-AT-MSCs, and the increase in ROS was attributed to the decreased expression of Sirtuin-1, a senescence suppression factor.

研究分野：再生医学

キーワード：間葉系幹細胞 2型糖尿病 老化 細胞外小胞

1. 研究開始当初の背景

間葉系幹細胞(MSC)は、骨髄・臍帯血・胎盤・脂肪組織・歯髄等様々な組織に存在し、骨・軟骨・脂肪細胞への分化能を有する組織幹細胞の一つである。再生・細胞医療のソースとして、MSCは優れた性質を有し、特に脂肪組織由来MSC(Adipose Tissue derived-MSC:以下AT-MSC)は、他の組織由来MSCと比較して増殖能が高い。

2型DM患者由来AT-MSC(dAT-MSC)は、健常者由来AT-MSC(nAT-MSC)と異なりインスリン抵抗性を示し低酸素応答性・サイトカイン産生・遊走能が有意に低下しており、dAT-MSCの創傷治癒能が低下している。

最近細胞治療法の新たなツールとして、細胞外小胞体EVが挙げられる。EVは、主にエクソソームおよびマイクロベシクルから構成され、EVは標的細胞内に容易に取り込まれることから、細胞治療に結びつく新たな細胞間コミュニケーションツールとして注目されている。

2. 研究の目的

MSCが幹細胞治療において、汎用性の高い細胞ソースとして使用できるようにするために機能的に優れたMSCを単離できるヒト由来組織を同定し、かつ疾患を有する患者由来MSCの機能異常及び老化によるMSC機能低下を分子レベルで解明し、その機能を補完するための方法を確立することである。機能補完法の手段としては、以前行った研究成果を活かして、細胞外小胞体EVを用いる。以下2つの課題に対して取り組む：

1)EVを用いて2型DM患者由来MSCの機能を改善する、2)幼若性EVを用いてMSCの若返りを誘導する。

3. 研究の方法

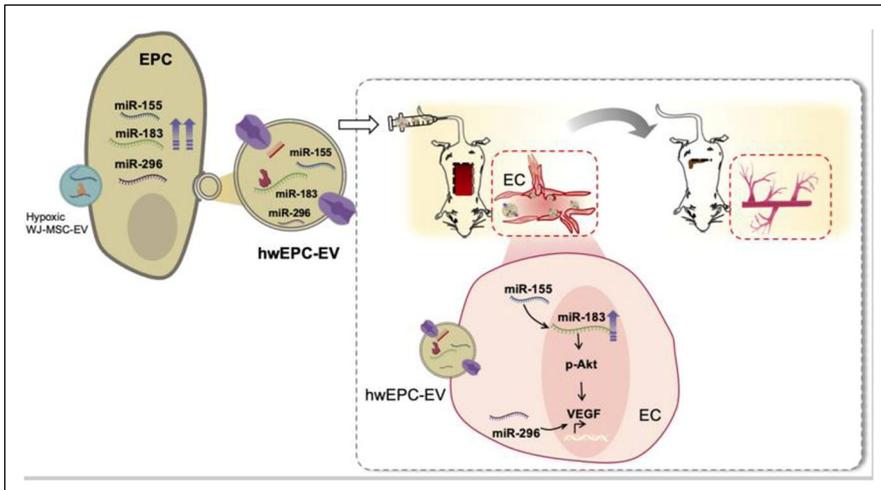
1)2型DM患者の脂肪組織から採取したdAT-MSC由来のdEVと健常者のnAT-MSC由来のhEVの機能を比較したnAT-MSCにdEVを投与すると、増殖能には変化がなかったが、脂肪分化能が有意に上昇することが分かった。マウス創傷モデルを用いたin vivo解析では、nAT-MSCをマウスに移植することによりAT-MSCを移植しない群(PBS:バッファのみ投与)と比較してnecrotic areaの減少が有意に見られることを示した。一方、dEVをnAT-MSCに取り込ませると、本来あるnAT-MSCの機能が損なわれ、逆にdAT-MSCにnEVを取り込ませるとによりdAT-MSCの分化能及び創傷治癒能の改善が見られることを明らかにした。これらの結果を元に、本研究ではnAT-MSCから放出されるnEVに対してマイクロアレイ解析を行い、dAT-MSCの機能改善に作用する因子を同定する。加えて、2型DMモデルであるdb/dbマウスを用いることにより、より2型DM患者における合併症治療におけるEVの機能について詳細に解析を進める。

2)高齢者(70歳代)由来AT-MSC(elderly AT-MSC; eAT-MSC)の機能低下が、新生児由来AT-MSC(infant AT-MSC; iAT-MSC)由来EV(iEV)により機能回復が見られるかどうか解析する。今までの予備実験により、eAT-MSCにiEVを取り込ませると、増殖能がiAT-MSCと同程度に回復し、加えて骨分化能もiAT-MSCと同程度に回復することを見出している。iEV投与により、活性酸素ROS等の老化によりeAT-MSCにおいて異なる遺伝子発現を示すキーとなる遺伝子発現について解析を行う。また、in vitroの系において、eAT-MSCの「若返り」がiEVの投与によって明らかとなったことから、マウスを用いたin vivoの系でその効果について解析を行う。また、iEVに含まれるどの因子が「若返り」に有効に作用するのかについて、マイクロアレイを用いて候補因子を同定する。申請者は今まで、新生児由来AT-MSCを「若返り化」を誘導するソースとして研究を進めてきた。本申請では、さらに幼若性が高い臍帯由来MSCを用いて比較検討を行う。

4. 研究成果

本研究では、疾患(2型糖尿病)患者由来MSCの機能異常および加齢によるMSCの機能低下を分子レベルで解明することを目的として、細胞外小胞(EV)を用いて以下の研究を行った。1)2型糖尿病患者の脂肪組織から採取したdAT-MSCs由来のdEVsと健常人のnAT-MSCs由来のnEVsを比較した。2)nAT-MSCsにdEVsを投与しても増殖能は変化しなかったが、脂肪分化能は有意に亢進した。3)dEVをnAT-MSCに取り込ませると、本来あるnAT-MSCの機能が損なわれ、逆にdAT-MSCにnEVを取り込ませることにより、dAT-MSCの分化能及び創傷治癒能の改善が見られることを明らかにした。

高齢者 AT-MSCs; eAT-MSCs は、幼児 AT-MSCs; iAT-MSCs と比較して、増殖能、分化能、創傷治癒能の低下を示した。 eAT-MSCs では、 i-AT-MSCs に比べて活性酸素 ROS の発現が有意に上昇しており、活性酸素の増加は老化抑制因子であるサーチュイン-1(Sirtuin-1)の発現低下に起因していた。 eAT-MSC に iEV を取り込ませると、増殖能が iAT-MSC と同程度に回復し、加えて骨分化能も iAT-MSC と同程度に回復することが明らかとなった。また、eAT-MSC の「若返り」が iEV の投与によって明らかとなったことから、マウスを用いた in vivo の系でその効果について解析を行った。



血管内皮細胞 EPC-EV は、静脈内注射によりマウスの虚血組織に優先的に取り込まれる。虚血部位において、EPC-EV は EC の増殖と血管新生機能を誘導し、miR-155、miR-183、miR-296 などの血管新生に関連する miRNA の EC への移行に関与している可能性が考えられた。

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 2件）

1. 著者名 Chang YH, Ngo NH, Vuong CK, Yamashita T, Osaka M, Hiramatsu Y, Ohneda O.	4. 巻 31
2. 論文標題 Type 2 Diabetes Mellitus Promotes the Differentiation of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells into Cancer-Associated Fibroblasts, Induced by Breast Cancer Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cells and Development	6. 最初と最後の頁 659-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2022.0086	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 Ngo NH, Chang YH, Vuong CK, Yamashita T, Obata-Yasuoka M, Hamada H, Osaka M, Hiramatsu Y, Ohneda O.	4. 巻 10
2. 論文標題 Transformed extracellular vesicles with high angiogenic ability as therapeutics of distal ischemic tissues.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontier Cell Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2022.869850	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 Khanh VC, Fukushige M, Yun-Hsuan C, Hoang NN, Yamashita T, Obata-Yasuoka M, Hamada H, Osaka M, Hiramatsu Y, Ohneda O.	4. 巻 30
2. 論文標題 Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Reduce SARS-CoV2-Induced Inflammatory Cytokines Under High Glucose and Uremic Toxin Conditions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cells & Development	6. 最初と最後の頁 758-772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/scd.2021.0065	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 該当する

〔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
研究分担者	VUONG CAT KHANH (VUONG KHANH) (20816102)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山下 年晴 (YAMASHITA TOSHIHARU) (50400677)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

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