

令和 6 年 5 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19891

研究課題名（和文）プログラム細胞死細胞を原料とした新しい人工細胞外小胞の開発

研究課題名（英文）Development of new artificial extracellular vesicles from programmed cell-dead cells

研究代表者

岸田 晶夫（Kishida, Akio）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：60224929

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：プログラム細胞死を誘導した細胞を用いた人工細胞外小胞（AECV）の調製と特性解析を進めた。HeLa細胞およびNIH3T3細胞を用い、プログラム細胞死様式として高静水圧誘導細胞死を選択し、圧力条件を変更してin vitroにて各様式の細胞死を誘導した。その後、エクストルーダーにて物理的に小胞を形成させAECVを得ることができた。細胞外小胞のサイズを動的な光散乱を用いて解析した。AECVのサイズ分布を制御するエクストルーダーの適用条件を決定した。AECVは細胞死を誘導した条件によって免疫系の活性可能が異なることが明らかとなった。これらの検討によりAECVの新しい生体制御材料としての可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的に細胞外小胞（EV）は培養細胞から得られるエクソソームや生体組織から得られる組織結合型小胞が知られており、がん治療や再生医療への応用が期待されている。これらの細胞が産生する小胞以外に人工的小胞であるリボソームがある。本研究で調製した人工細胞外小胞は、これらの小胞とは異なり、死細胞から作製する新しい小胞で、細胞膜タンパク質や多糖を有するため大量・均一な生産が可能で、かつ種々の生体機能性が期待できる。高静水圧処理を用いることでこれまで困難であったプログラム細胞死を起こした細胞の回収を可能にした。本小胞の研究により、細胞間連絡の基礎研究や新しいDDSモダリティの開発の進展が期待される。

研究成果の概要（英文）：We prepared artificial extracellular vesicles (AECVs) using programmed cell death-induced cells and analyzed their properties and biofunctions. The cells were then physically killed by an extruder. Subsequently, AECVs were obtained by physically forming vesicles in an extruder. The size of extracellular vesicles was analyzed using dynamic light scattering, and the conditions under which the extruder was applied to control the size distribution of AECVs were determined. These studies demonstrated the potential of AECVs as a new biocontrol material.

研究分野：生体医工学

キーワード：人工細胞外小胞 プログラム細胞死 高静水圧処理 エクストルーダー

1. 研究開始当初の背景

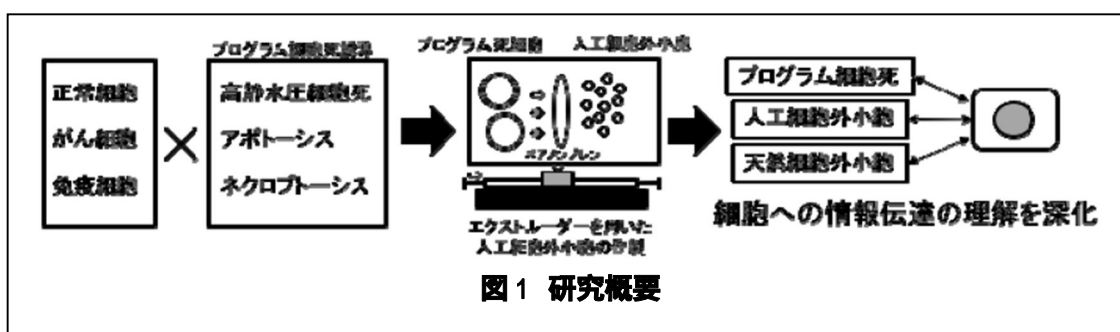
細胞から放出される核を持たない脂質二重膜で囲まれた粒子は“細胞外小胞”と呼ばれ、細胞間の情報を媒介し、様々な生命現象や疾患の進行に関与することが知られている。細胞外小胞は、エンドソーム膜が内側に貫入して多小胞を形成・分泌したり、細胞膜が芽出してちぎれることで形成されたり、アポトーシス時に形成されたりする。50~150nm をエクソソーム、100~1000nm をマイクロベシクル、1~5 μ m をアポトーシス小体と便宜上分類されている。現在、これらのメカニズムや機能の解明や、バイオマーカーやドラッグデリバリーシステムへの応用、新規治療法の開発など臨床応用に向けた取り組みが行われている。

また、細胞間の情報を媒介するものとして細胞死があり、細胞死の情報が疾患の進行などに関係することが知られている。細胞死については、受動的な細胞死(ネクローシス)とアポトーシス、ネクロトーシスなどの制御されたプログラム細胞死に大別される。これまで、細胞死は不要となった細胞や有害細胞の除去が目的であり、死細胞は単に捨て去られる存在であると考えられてきたが、最近では、これらの細胞死様式によって周囲の細胞に異なる情報が発信され、炎症、免疫応答、線維化、修復、再生などの生体応答をコントロールしている可能性が明らかとなってきた。

このように、生体では様々な方法にて細胞間コミュニケーションを獲得している。申請者らは、細胞外小胞およびプログラム細胞死について、高静水圧技術を応用した研究を実施している。血管、皮膚などの生体組織から細胞のみを除去した細胞外マトリックスである脱細胞化生体組織を調製する脱細胞化方法として高静水圧技術を応用しており、高静水圧処理により細胞死を誘導し、細胞残渣を洗浄除去することで脱細胞化生体組織を得ている。脱細胞化生体組織には、マトリックス結合小胞(MBVs)と称される細胞外小胞が存在しており、脱細胞化生体組織の移植時における高い生体適合性を示す一つの要因と示唆された。また、高静水圧処理による細胞死誘導についてどのような細胞死様式をとっているかを検討したところ、プログラム細胞死の一つである免疫原性細胞死の様式であることが明らかとなった。この様式では細胞形態、細胞膜構造を維持しながら細胞死を誘導できることがわかった。

2. 研究の目的

上記を背景として、申請者らは、高静水圧によりプログラム細胞死が誘導された細胞を用い、脂質二重膜小胞を作製するエクストルーダにてダウンサイジング化することで、人工的に細胞外小胞を構築できるのではないかと発想に至った。この発想をもとに本研究では、高静水圧による細胞死誘導を含む様々な様式で誘導されたプログラム細胞死細胞を用いて人工的に細胞外小胞を作製する手法の開発を目的とする。得られた人工細胞外小胞の物性や生物学的機能等を詳細に解析し、生きた細胞から放たれる細胞外小胞との違いを明らかにし、細胞への情報伝達の理解を深める(下図)。



3. 研究の方法

プログラム細胞死を誘導した細胞を用いた人工細胞外小胞の調製：細胞として MC3T3-E1、ATDC5 および HeLa 細胞を用いた。プログラム細胞死様式として、高静水圧誘導免疫原性細胞死にて細胞死を誘導した。得られたプログラム細胞死誘導細胞を回収し、エクストルーダにて物理的に小胞を形成させ、細胞外小胞を得た。

人工細胞外小胞の物性解析：得られた人工細胞外小胞の物性解析を行った。サイズを DLS にて解析し、測定結果をもとに、エクストルーダの条件検討を行い、サイズコントロールを行う。TEM を用いて細胞膜の脂質二重膜構造を確認する。それぞれの起源細胞種に応じたマーカーを選択し、免疫染色にて人工細胞外小胞の細胞膜の表面抗原の有無を検討する。人工細胞外小胞の内包物の解析として、DNA、RNA (mRNA, miRNA) について PCR、RT-PCR 等にて有無の確認と同定を検討する。これらについて、天然の細胞外小胞と比較し相違点を明らかにする。

人工細胞外小胞の機能解析：人工細胞外小胞の機能解析は、天然の細胞外小胞(エクソソーム)

にて細胞機能促進が確認されている細胞増殖試験にて行った。また人工細胞外小胞の免疫系細胞への刺激について、THP-1 細胞から誘導したマクロファージ活性化試験を行った。以上について、天然の細胞外小胞、プログラム細胞死細胞と比較検討し、相違点を明確にする。

4. 研究成果

図2に高静水圧処理した細胞の走査型電子顕微鏡写真を示す。圧力処理を施すと細胞死が誘導されるが細胞の形態は球体を保ったままである。細胞膜に孔が形成されていることから内容物は細胞外に流出していると考えられる。これらの細胞に残存している二本鎖DNAを定量としたところ生細胞の半量以下であることがわかった。完全に除去されていないことがわかった。これらの高圧力処理細胞をエクストルーダで破碎して小胞を得た。

人工細胞外小胞の透過型電子顕微鏡写真を図3に示す。いずれの細胞種、圧力処理条件においても、脂質二重膜小胞様の粒子が観察され、人工細胞外小胞の調製が可能であることがわかった。粒子径と粒子数濃度の測定を行ったところ、いずれの人工細胞外小胞も 120nm 程度のサイズであり、また1細胞当たり $2 \sim 4 \times 10^4$ 個程度の小胞が得られることがわかった。さらにバイオアナライザーによる RNA プロファイリングを測定した。いずれの圧力処理条件においても、miRNA 領域(25-200 nt)にピークが検出されたことから HHP 処理細胞から調製した人工細胞外小胞は miRNA を含むことが示唆された。

人工細胞外小胞の生物活性についてマクロファージからの IL-1 分泌活性を調べた。凍結融解等のネクローシスを起こした細胞から得た小胞では IL-1 分泌活性が上昇したことから、これらの小胞は免疫源となることが示された。一方で、高静水圧処理で細胞死を誘導された細胞から得られた小胞では、そのような活性は示されなかった。以上の結果から、高静水圧処理によってプログラム細胞死を誘導された細胞から得られた人工細胞外小胞は、通常の細胞死からのそれとは異なる生物活性を有することが示唆された。

高静水圧処理細胞から得られる人工細胞外小胞は、免疫原性が低いことから生体反応、特に異物反応について新しい知見を与える可能性が考えられる。また、高静水圧処理された生体組織(脱細胞化組織)の低免疫原性を理解する知見を与えると期待できる。さらに小胞作成時に薬物を添加することで薬物内包型小胞体の作製も考えられ、基礎研究から応用研究まで幅広い領域に新たな情報提供ができると期待される。

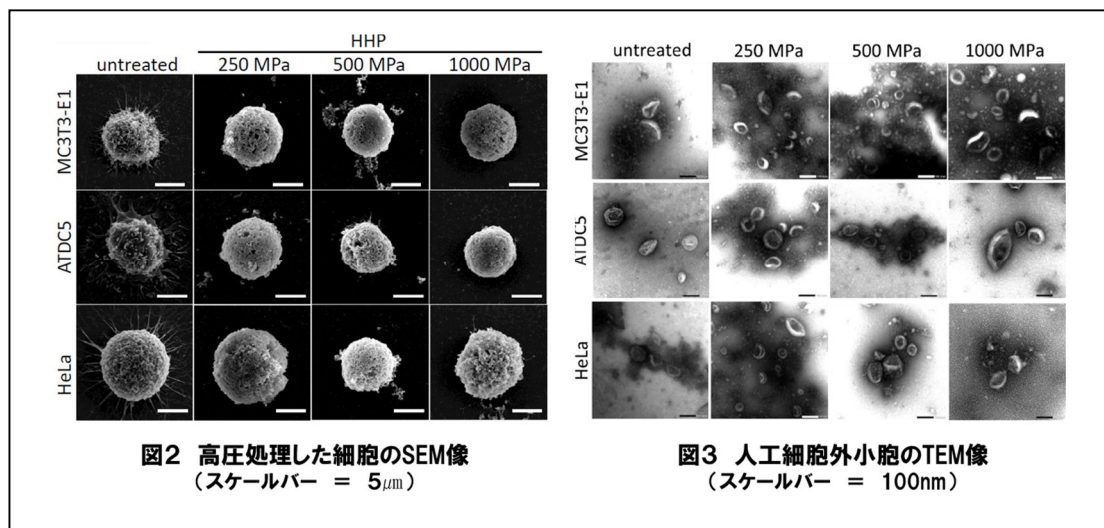


図2 高圧処理した細胞のSEM像
(スケールバー = 5 μ m)

図3 人工細胞外小胞のTEM像
(スケールバー = 100nm)

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 海田こころ、木村剛、橋本良秀、秋吉一成、佐々木善浩、岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 高静水圧処理細胞を用いた人工細胞外小胞の調製 |
| 3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小林真子、石田直樹、橋本良秀、根岸淳、佐々木善浩、秋吉一成、山本雅哉、木村剛、岸田晶夫 |
| 2. 発表標題 脱細胞化脳・胎盤由来マトリクス結合型ナノベシクル（MBV）の抽出と神経機能回復への効果検討 |
| 3. 学会等名 第35回代用臓器・再生医学研究会総会/日本バイオマテリアル学会北海道ブロック第7回研究会 |
| 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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 木村 剛 (Kimura Tsuyoshi) (10393216) | 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授 (12602) | |
| 研究分担者 | 橋本 良秀 (Hashimoto Yoshihide) (40638384) | 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教 (12602) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|