

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19933

研究課題名（和文）複数・大量タンパク導入システムを用いたスーパーエクソソームによる肝再生療法開発

研究課題名（英文）Development of liver regeneration therapy using super exosomes with multiple and high volume protein delivery systems

研究代表者

土屋 淳紀（Tsuchiya, Atsunori）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70464005

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、今回の研究にて、エクソソーム内にtdTomato及びAnnexin A1を導入することに成功した。tdTomato導入により、肝硬変ではマクロファージ内に大量に取り込まれる事が確認でき、治療を目指す上でのエクソソームの動態の基盤データを得ることができた。また、我々がマクロファージを抗炎症に導く可能性のある一つとして考えているAnnexin A1の導入では、導入されていることは確認できたが、治療効果が劇的に高まるまでにはいかなかった。単一のタンパクでは不十分であった可能性、内容物が全体的に変わる可能性等今後の課題があるが、導入システムの確立は非常に有意義で今後の基盤データとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは細胞培養上清から修飾を施さずにそのまま採取される天然型や特定の細胞株培養上清液や特定の動植物やその培養細胞などからエクソソームを精製・回収した後にペプチド付与などの修飾を施したり、エクソソームの供給元である細胞あるいは動植物等に遺伝子改変を施したりすることで、特定の機能をEVsに付与するもの、また特定の治療薬を内包することでドラッグデリバリーシステム（DDS）の担体として利用する改変型EVsがあり、今回の結果は、改変型エクソソームを将来、目指す上での重要な基盤データを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we succeeded in introducing tdTomato and Annexin A1 into exosomes, and confirmed that tdTomato is taken up by macrophages in large amounts in cirrhosis, providing basic data on the dynamics of exosomes for therapeutic purposes. In addition, the introduction of Annexin A1, which we consider to be one of the potential factors that may lead macrophages to become anti-inflammatory, was confirmed, but did not lead to a dramatic increase in therapeutic efficacy. Although there are issues to be addressed in the future, such as the possibility that a single protein was not sufficient and that the overall contents may have been altered, the establishment of the introduction system was very significant and provided fundamental data for the future.

Translated with DeepL.com (free version)

研究分野：肝臓病学

キーワード：エクソソーム 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝臓はB・C型肝炎、脂肪性肝炎、アルコール等による慢性的な肝臓の障害で、線維化が進行し肝硬変に至る。肝硬変は肝機能低下やその付随する症状例えば、栄養障害、黄疸、むくみ、腹水、食道静脈瘤、肝性脳症等をはじめ多くの症状を呈し、問題となる疾患で日本で40万人程度が罹患する国民病の一つである。肝臓は元々再生能力が高く、通常例えば抗ウイルス薬などで慢性肝障害の原因が除去されれば線維化は改善し、肝機能も改善するが、進行例ではその能力は落ち、また能動的に肝線維化改善を促進させる薬はなく高いニーズがある。基礎研究からマクロファージが線維化改善には非常に重要な役割を果たすことが明らかになっている。(Hepatology 2011, Nature Medicine 2014)また、実際英国エジンバラ大学では自己のマクロファージを誘導し、組織修復マクロファージへと導き、投与を行うマクロファージ療法(Nature Medicine 2019)の治験がスタートしている。このように肝硬変ではマクロファージの状態をコントロールすることで組織修復を促す事ができる可能性がある。我々は間葉系幹細胞を用いた肝硬変に対する基礎研究及び企業治験を行っているが間葉系幹細胞の効果メカニズムとしてマクロファージを炎症性から抗炎症性に変化させ、組織修復マクロファージへと導く事によって肝硬変の線維化改善、再生促進がおきていることを明らかにした(Stem cells Trans Med 2019)。更に間葉系幹細胞がマクロファージを組織修復マクロファージへと導く過程において間葉系幹細胞の産生するエクソソームが非常に重要な働きをする事を明らかにし、更にIFN- γ であらかじめ間葉系幹細胞を刺激した後に採取したエクソソームではより組織修復マクロファージの増加を促し強い線維化改善効果を導き出すことを明らかにした。またその過程でエクソソームのプロテオミクス解析を多数行った実績を持ち、組織修復マクロファージ誘導に重要なタンパクを複数個確認しそのうちの一つにAnnexin-A1がある。このような背景から肝硬変治療に関しては、組織修復マクロファージを如何にして導き出すかが肝要であると考えている。

2. 研究の目的

エクソソームを用いた治療法を考える場合、質が良く均一で有効成分が明らかで、大量に採取採取する事ができれば理想である。今回我々は、間葉系幹細胞のエクソソームの専門家である我々と、筑波大学、産業技術総合研究所で、既に複数のタンパクを細胞内で大量に持続的に発現するセンダイウイルスベクターシステムを持つ西村、佐野と共同研究を展開し、間葉系幹細胞のエクソソームをベースにそこに、組織修復マクロファージを誘導すると推定されるタンパクを持続的に導入し効果を高めたエクソソームの産生を行い、その投与により組織修復マクロファージを大量に生体内で導き肝硬変の線維化改善、再生促進を実験的に証明する事を目的とする。今回はこの期間中に以下の二つの検討を行った。

(1) tdTomato含有エクソソームを作成し、その標的細胞及び動態をin vitro, in vivoで明らかにする。

(2) Annexin-A1含有エクソソームを作成し、その有効性をin vitro, in vivoで明らかにする。

3. 研究の方法

(1) tdTomatoとエクソソームに含まれるCD63をfusionさせるように設計してセンダイウイルスベクターを用いて、間葉系幹細胞に導入し、tdTomato含有エクソソームを作成し、

肝構成細胞(肝細胞、星細胞、マクロファージ、内皮細胞)にそれぞれ導入されるか in vitro にて確認した。また、四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスの肝臓の一部にも投与を行い、その沈着部位の確認を行った。

(2)) Annexin- A1 とエクソソームに含まれる CD63 を fusion させるように設計してセンダイウイルスベクターを用いて、間葉系幹細胞に導入し、Annexin- A1 含有エクソソームを作成し、in vitro でマクロファージへの影響を観察し、in vivo にて、肝硬変モデルマウスへの治療効果の検証を試みた。

4. 研究成果

(1) tdTomato 含有エクソソームの作成に成功した。粒子は 100nm 前後でおよそ 80% の粒子に導入され

ていることが確認できた。更に in vitro で行った肝構成細胞(肝細胞、星細胞、マクロファージ、内皮細胞)への取り込み

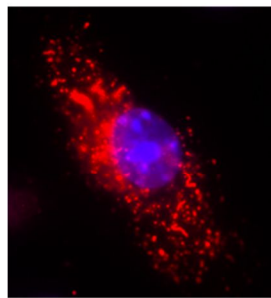


図1 in vitroでのマクロファージへの取り込み

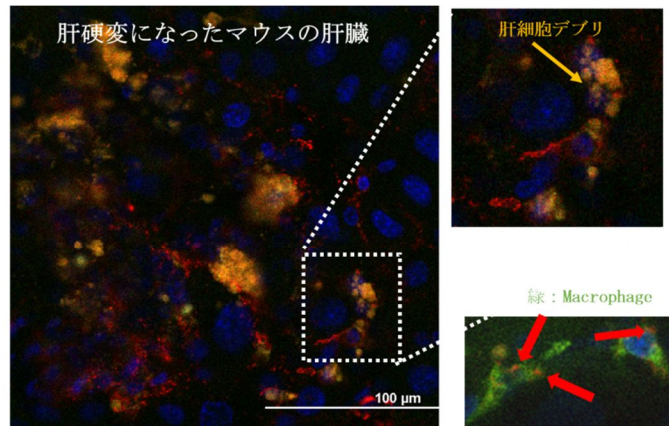


図2 硬変肝では障害部のマクロファージに取り込まれる

に関しては、マクロファージに圧倒的に取り込まれる結果であった(図1)。四塩化炭素誘導肝硬変モデルマウスの肝臓の一部にも投与を行うと肝障害部のマクロファージに取り込まれる事がわかった(図2)。このような事から我々の手法は、特定のタンパクを入れ込むだけでなくこれを用いてその動態を観察するのに有効である事がわかった。

(2) 我々は次ぎに Annexin- A1 含有エクソソームの作成を行った。このエクソソームを用いてマクロファージに対して、どのような影響を与えるかを観察した。一般的に抗炎症性にマクロファージが誘導されるときに、治療効果が高まることが知られているので real-time PCR

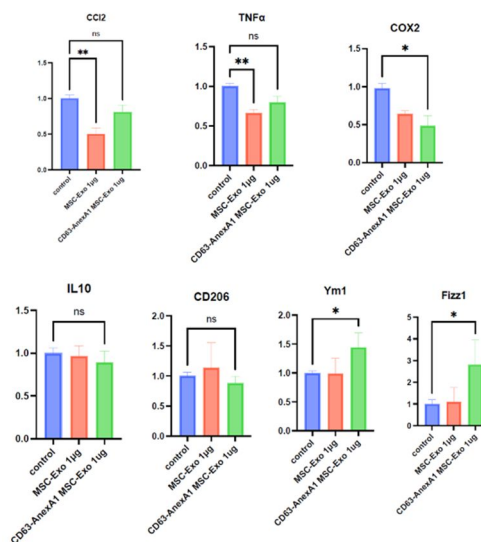


図3 マクロファージへの影響
上段が炎症性マーカー、下段が抗炎症性マーカー

MSC-Exo; 変更のないもの
CD63 -AnexA1; Annexin A1の導入

にて確認した。結果として炎症性マーカーは抑制傾向が見られたが、今回の検索では強い抗炎症性変化とは言えなかった(図3)。また、in vivo での結果でも同様で、一種類のタンパク導入のみで劇的に変わらなかった。これらの事より、一つのタンパク導入だけでは効果が乏しい可能性が考えられた。

タンパクや miRNA の変化なども現在追っており、内容物に変化を加えることでどのような変化がおきてくるかの解析も現在解析中で重要である。これらのデータを今後、複数でのタンパクの導入の際などに生かせると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuchiya Atsunori, Natsui Kazuki, Ishii Yui, Koseki Yohei, Takeda Nobutaka, Tomiyoshi Kei, Yamazaki Fusako, Yoshida Yuki, Terai Shuji	4. 巻 14
2. 論文標題 Small extracellular vesicles and liver diseases: From diagnosis to therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Hepatology	6. 最初と最後の頁 1307 ~ 1318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4254/wjh.v14.i7.1307	査読の有無 無
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 Tsuchiya Atsunori, Terai Shuji, Horiguchi Ikki, Homma Yasuhiro, Saito Atsuhiro, Nakamura Norimasa, Sato Yoji, Ochiya Takahiro, Kino-oka Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Basic points to consider regarding the preparation of extracellular vesicles and their clinical applications in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative Therapy	6. 最初と最後の頁 19 ~ 24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.05.003	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土屋淳紀、寺井崇二
2. 発表標題 肝硬変に対する細胞治療、細胞外小胞（エクソソーム）治療、ペプチド治療の開発状況
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋淳紀、寺井崇二
2. 発表標題 肝硬変に対してのデザイナー細胞外小胞（エクソソーム）治療の可能性
3. 学会等名 日本再生医療学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsunori Tsuchiya, Shuji Terai
2. 発表標題 Therapies using mesenchymal stem cells and their small extracellular vesicle for liver cirrhosis
3. 学会等名 JDDW
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋淳紀、寺井崇二
2. 発表標題 肝硬変のマクロファージをターゲットとしたエクソソーム治療の可能性
3. 学会等名 消化器免疫学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺井崇二、土屋淳紀
2. 発表標題 間葉系幹細胞由来細胞外小胞を用いた肝硬変治療法の開発（基礎研究から臨床応用へ）
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
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	佐野 将之 (Sano Masayuki) (80415687)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	

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	西村 健 (Nishimura Ken) (80500610)	筑波大学・医学医療系・教授 (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