

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659652

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞によるマクロファージ機能抑制機構の解明と新たな脳動脈瘤治療法の開発

研究課題名(英文) Potential novel treatment approach for cerebral aneurysm with mesenchymal stem cell

研究代表者

中溝 玲 (NAKAMIZO, AKIRA)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：80529800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：マクロファージは脳動脈瘤の発生と増大に大きな役割を果たしている。マクロファージはmicroRNA-21を細胞内外に発現することにより、MMP-9の分泌を促進することが示唆された。ヒト間葉系幹細胞からは多数のmicroRNAが分泌されているが、なかでもマクロファージの機能を抑制する作用を有するmicroRNA-145が高レベルで分泌されていることを明らかにした。間葉系幹細胞から分泌されるexosome内のmicroRNA-145がマクロファージに取り込まれることによって、マクロファージから分泌されるMMP-9が抑制されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The macrophage is largely responsible for the development of cerebral aneurysms. We showed that macrophages secreted high level of matrix metalloproteinase (MMP)-9 via the intracellular and extracellular expression of microRNA-21. Moreover, we revealed that conditioned medium of mesenchymal stem cell suppressed the secretion of MMP-9 from macrophages. Furthermore, we showed that mesenchymal stem cells secreted a wide variety of microRNAs including microRNA-145 that inhibited the secretion of MMPs. This indicated that mesenchymal stem cell-derived exosomal microRNA-145 was introduced into macrophage, resulting in the suppression of MMP-9 secretion.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科科学

キーワード：間葉系幹細胞 脳動脈瘤 マクロファージ micro RNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳動脈瘤の本態は、血行力学的ストレスによる内皮細胞損傷に起因して生じる血管壁の慢性炎症性疾患である。近年、脳動脈瘤壁に浸潤する炎症細胞の主体はマクロファージであることが確認され、動脈瘤形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。脳動脈瘤の病理学的特徴は、細胞外基質の過剰な変性分解であり、ヒト動脈瘤サンプルではタンパク分解酵素の一種である MMP-2 および 9 が過剰に発現している (Bruno G, J Neurosurg 1998)。最近になり、脳動脈瘤壁に浸潤したマクロファージが MMP-2 と 9 を産生しており、これらが動脈瘤形成の主因であることが明らかとなった (Aoki T, Stroke 2007)。

(2) 組織幹細胞の中で、間葉系幹細胞は最も臨床応用が進んでいる幹細胞であるが、その本態の解明は未だ不完全である。間葉系幹細胞は、損傷を受けた組織に集簇し修復・再生する際の細胞の供給源になっていると考えられており、その多様な分化能から細胞治療を実現するための tool として期待されている。間葉系幹細胞は骨髓液から分離精製し実験室内で培養増殖させるテクニックが既に確立されており、また自己細胞を用いるため神経幹細胞や胚性幹細胞のような倫理的問題が生じることがなく、かつ、免疫学的問題を回避することができるので、臨床応用に適している。間葉系幹細胞は、脳腫瘍や炎症をはじめとした病理的部から分泌されるサイトカインやケモカイン、各種成長因子を感知して局所に集簇し (Nakamizo A, Cancer Res 2005)、炎症局所においては natural killer 細胞、T 細胞、B 細胞、好中球、マクロファージの機能を抑制し抗炎症作用を呈する。さらに、間葉系幹細胞には周辺細胞からの MMP 分泌を制御する作用があることが知られている。間葉系幹細胞は MMP の発現を抑制することにより椎間板の変性

を抑制したり (Miyamoto et al. Orth Res Ther 2010)、ERK1/2 のリン酸化を down-regulate することにより心筋線維芽細胞からの MMP-2 分泌を抑制する作用を有する (Wang et al. Exp Biol Med 2011)。我々は、先行研究において間葉系幹細胞と神経膠芽腫細胞 U87 を共培養すると U87 細胞から分泌される MMP-2 と MMP-3 のタンパクレベルが有意に低下することを明らかにした。

(3) これまで、細胞間コミュニケーションは主に cytokine や chemokine といったタンパクレベルによってのみ行われると考えられてきたが、近年ドナー細胞から分泌された exosome 内の micro RNA (miRNA) がレシピエント細胞に取り込まれて、レシピエント細胞内における遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。近年の miRNA の研究では、miRNA-145、miRNA-125b、miRNA-29b、miRNA-451、miRNA-21、miRNA-340、miRNA-155 などのいくつかの miRNA が MMP の分泌を制御していることが明らかにされた。その中でも miRNA-145 は MMP-9 の抑制に関与し (Gao P, Oncogene 2013)、一方、miRNA-21 は MMP-2、9 の活性に関与している (Bullock MD, Cell death and disease 2013) ことが明らかとなった。間葉系幹細胞を含む様々な幹細胞は多数の miRNA を分泌していることが知られているが (Gangaraju et al. Nature Rev 2009)、その作用や機序についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

上記背景より、間葉系幹細胞はその特性上、静注もしくは動注などの全身投与によっても、炎症部位である脳動脈瘤壁に集簇することが予想される。集簇した間葉系幹細胞から分泌された exosomal miRNA が瘤壁内のマクロファージに取り込まれ、マクロファージにおける MMP 発現が制御され、その結果、

脳動脈瘤の形成と増大が抑制される可能性が高い。また、MMP 分泌に対する作用からみると、miRNA-21 は脳動脈瘤の形成と増大に促進的に働くのに対して、miRNA-145 は抑制に重要な役割を果たす可能性が高い。そこで本研究では、培養マクロファージ細胞と間葉系幹細胞を用いて、それぞれ miRNA-21 と miRNA-145 に注目し、細胞内及び exosome 内の miRNA の発現を調べることとした。また、間葉系幹細胞がマクロファージの MMP-9 分泌に及ぼす影響と、両者の間で MMP-9 分泌に影響する可能性がある exosomal miRNA を同定することを目的とした。

3 . 研究の方法

(1)ヒト間葉系幹細胞を10cm dish内で MSCGM-CD™を用いて一定期間培養し、confluentとした。無血清培地に変更し72時間後に上清から exosomal miRNA を単離し、microRNA QC PCR Panel (Exiqon)を用いて、網羅的な quantitative real-time PCR 解析を行った。さらに再度上記条件で得られたヒト間葉系幹細胞の上清から exosome を単離し、miRNA-145のプライマーを用いて quantitative real-time PCRを行い、exosome 内のmiRNA-145の発現の再現性を確認した。

(2) 上記条件で得られたヒト間葉系幹細胞を用いて、quantitative real-time PCRを行い、細胞内のmiRNA-145の発現を調べた。

(3)単球系細胞U937を10cm dish内で RPMI1640を用いて一定期間培養し、合計細胞数を 1×10^6 個とした。培養マクロファージとするため、100nMフォルボールエステル (PMA)で分化させた。PMA刺激前の上清内のMMP-9の分泌とPMA刺激24時間後の上清内のMMP-9の分泌をELISA法を用いて調べた。

(4)上記条件で得られたPMA刺激後のU937の上清から単離したexosomeを用いて quantitative real-time PCRを行い、exosome

内のmiRNA-21の発現を調べた。

(5)上記条件で得られたPMA刺激後のU937の細胞を用いて、quantitative real-time PCRを行い、細胞内のmiRNA-21の発現を調べた。

(6)無処理の培養液(MSCGM-CD™)に間葉系幹細胞培養後の上清(conditioned medium)を混ぜ、U937の培地とした。間葉系幹細胞の上清は、細胞がconfluentとなり72時間経過した時点で採取した。U937を100nMのPMAで刺激を行い、上清のMMP-9の分泌をELISA法で測定した。

4 . 研究成果

(1) ヒト間葉系幹細胞上清内の exosome における網羅的な quantitative real-time PCR の結果、miRNA-145 の発現を確認した。また検出した 752 種類の primer のうち、7 番目に発現亢進していることが明らかになった。miRNA-145 のプライマーを用いて exosome における quantitative real-time PCR を行った結果、miRNA-145 の発現亢進を認め、網羅的な quantitative real-time PCR の結果の再現性を確認した。

(2)ヒト間葉系幹細胞における quantitative real-time PCR の結果、細胞内 miRNA-145 の発現亢進を認めた。

(3)PMA 刺激前の U937 上清内における MMP-9 は、ELISA 法で検出感度以下であった。PMA 刺激 24 時間後では、MMP-9 の有意な上昇を認めた (図 1 A,B)。

(4) PMA 刺激 24 時間後の U937 上清内の exosome における quantitative real-time PCR の結果、miRNA-21 の発現亢進を認めた。

(5) PMA 刺激 24 時間後の U937 における quantitative real-time PCR の結果、細胞内 の miRNA-21 の発現亢進を認めた。

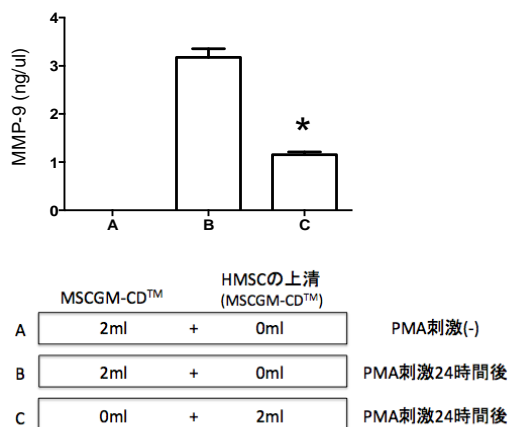
(6) 間葉系幹細胞から得られた conditioned medium のみで U937 の分化培養を行った群

では、PMA 刺激 24 時間後の MMP-9 の発現が control 群と比べ約 1/3 に抑制された (図 1B, C)。

以上の結果から、マクロファージ細胞内、exosome 内ともに miRNA-21 が分泌されていることから、miRNA-21 はマクロファージ細胞自身だけでなく周辺細胞における MMP-9 分泌にも関与していることが示唆された。さらに、間葉系幹細胞から分泌される exosome 内の miRNA-145 がマクロファージに取り込まれることによって、マクロファージからの MMP-9 分泌が抑制されることが示唆された。

今回行ったヒト間葉系幹細胞の exosomal miRNA の網羅的解析により、ヒト間葉系幹細胞から分泌される miRNA は多数存在していることが明らかとなった。今後は miRNA-145 以外の exosomal miRNA が培養マクロファージに与える影響を検討していく予定である。

図 1. 無処理の培養液(MSCGM-CD™)と間葉系幹細胞培養後の上清(conditioned medium)における割合を変え培地とし、U937 から分泌された上清内の MMP-9 濃度を測定した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

中溝 玲 (NAKAMIZO AKIRA)
九州大学・大学院医学研究院脳神経外科・
講師
研究者番号：80529800

(2)研究分担者

秦 暢宏 (HATA NOBUHIRO)
独立行政法人国立病院機構九州医療セン
ター (臨床研究センター)
研究者番号：10596034

天野 敏之 (AMANO TOSHIYUKI)
九州大学・大学院医学研究院脳神経外科・
助教
研究者番号：70448413

吉川 雄一郎 (KIKKAWA YUICHIRO)
九州大学・大学院医学研究院脳神経外科・
助教
研究者番号：80423515

(3)連携研究者

なし