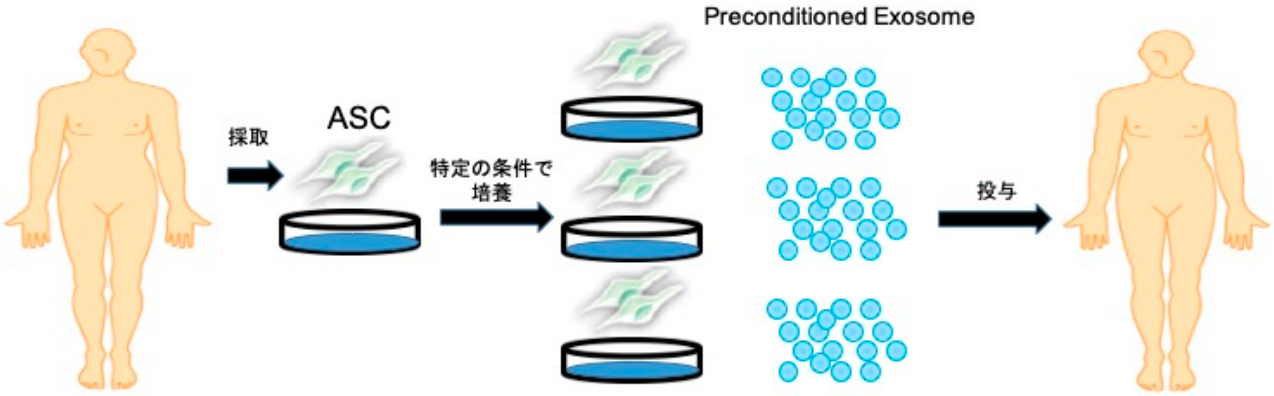
177　Preconditioned ASCエクソソームの機能解明	田代　絢亮

【目的】脂肪由来間葉系幹細胞（ASC）が、細胞治療による再生医療の供給源として注目を集めているが、その作用の一端を担うものとしてエクソソームが注目されている。エクソソームとは直径 40〜200 nm ほどの細胞が放出する細胞外小胞体であり、細胞が持つ働きの媒介を担うことが知られている。このような間葉系幹細胞のエクソソームが治療効果を持つことが近年分かってきており、多くの研究が行われている。安全性の点では、ASC は体外で長期培養した際に染色体異常などのゲノム異常が生じうる可能性があるが、ASC エクソソームは、cell-free であり、その心配は少ない。さらに、細胞を移植することに比べエクソソームのみを単離して使用することで、治療効果の調節が簡単になり、移植した細胞の壊死や予期せぬ細胞への分化の懸念を除けるといった利点がある。ASC を様々な条件下で培養する（Preconditioned ASC）ことで、ASC が分泌するエクソソーム（Preconditioned ASC Exosome）の性質が変わってくることが明らかになってきた。例えば、低酸素下で培養した ASC の分泌するエクソソームが血管新生を亢進させることが分かってきている。今回、我々は、ASC をいくつかの低分子化合物下で培養し、その性質変化を見るとともに、特定の化合物下で精製されたエクソソームの持つ性質を調べた。

【方法】ASC の培養にあたり、4 種の低分子化合物（W、X、Y、Z）を混合して、培養を行った。それぞれの低分子化合物の有無から、2×2×2×2＝16 通りの培養を行い、ASC の培養に与える影響を形態の変化、老化度、増殖率から解析を行った。その中から増殖率を低下させる低分子化合物を除外し、残った低分子化合物で培養された ASC の持つ機能を調べるため、それらからエクソソームを精製した。精製されたエクソソームのリンパ管内皮細胞に対する機能解析のため、Proliferation assay を行った。最もリンパ管新生作用を持つエクソソーム中に含まれる miRNA を解析するため、miRNA PCR array を行った。

【結果】ASC の形態変化、老化度、および増殖率から、W、X、WX、XY、WXY の 6 つに絞り、解析を行った。各々の条件下で精製されたエクソソームをリンパ管内皮細胞に添加し、解析を行った。Proliferation assay にて最もリンパ管新生の亢進を見せたのは、低分子化合物 X から精製されたエクソソームであった。そこでこの X から精製されたエクソソームと通常の ASC エクソソームを miRNA PCR array にて解析したところ、X から精製されたエクソソームには miR-AAA、miR-BBB、miR-CCC、miR-DDD、miR-EEE が多く含まれていることが分かり、また文献的考察より、これらの miRNA がリンパ管新生を誘導する因子と考えられた。

ASC エクソソームを用いた治療法の概要



177. Preconditioned ASC エクソソームの機能解明

田代　絢亮

*自治医科大学 形成外科

Key words：エクソソーム，間葉系幹細胞，脂肪由来間葉系幹細胞，再生医療

緒　言

エクソソームとは、直径 40～200 nm ほどの細胞外小胞体であり、あらゆる細胞が分泌する。2000 年代後半に、エクソソーム内にタンパク質のみならず mRNA や miRNA などの核酸が含まれ、到達先の細胞内にそれらの情報を伝達することで、遺伝子発現などの細胞の機能を調節していることが分かってきた。以降、様々な分野におけるエクソソームの研究が飛躍的に発展した［1］。

間葉系幹細胞（MSC）は、組織障害時の修復促進作用を持つ中胚葉系の幹細胞である。骨髄・脂肪・臍帯などに存在する MSC は、再生医療や細胞治療の供給源として注目を集めている。これまで治療効果を有する因子としては、MSC 由来のサイトカイン、成長因子といったタンパク質性因子が考えられていた。しかし、近年 MSC から分泌されるエクソソームが様々な疾患（心筋梗塞や急性腎炎、アルツハイマー病など）に対する治療効果を持つことが明らかになり、新たな疾患治療薬として注目されている［2，3］。

細胞の培養環境により分泌されるエクソソームの質や量が変化することが分かっている。言い換えれば、細胞は周囲環境を感知し、それをコンディショニングするようにエクソソームを分泌しているとも言える。そのため、ASC 培養の微小環境を操作することで、各疾患治療に最適なエクソソームを分泌する ASC の培養法を確立できる可能性がある。

我々は、今回、ASC を種々の低分子化合物下で培養し、血管新生とリンパ管新生を最も促す低分子化合物を同定し、また、得られたエクソソーム中で血管新生およびリンパ管新生を最も促す miRNA を同定したので、報告する。

方法および結果

1.　低分子化合物下での ASC の培養

低分子化合物 W、X、Y、Z を用いて、ASC の培養を行った。ASC の培養には DMEM 培地および 10%FBS を用いた。各々の培養条件下での Population Doubling Level を計算すると、図 1 のようになった。

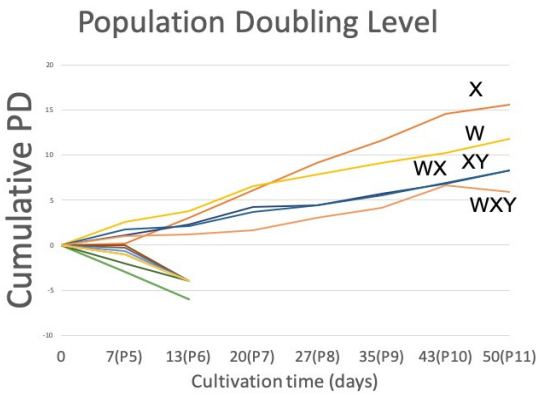


図 1.　各培養コンディションにおける Population Doubling Level
低分子化合物 X、W、WX、WY、WXY を加えたもので、Population Doubling Level の上昇が認められた。

*現在の所属：順天堂大学 形成外科

また、低分子化合物 X、W、WX、XY、WXY 以外では、ASC の形態の変形および老化度の著明な亢進から、細胞培養に適していないと考えられたため、以降の解析からは除外することとした。

2. Proliferation assay

低分子化合物 X、W、WX、XY、WXY で培養された ASC の P2～6 までを用い、エクソソームの精製を行った。得られた培養上清を、2,000g で 10 分間遠心して、上清だけを回収し、濾過を行った。さらに 100,000 g で 1 時間 10 分超遠心を行い、上清をデキャンタにて破棄して、エクソソームの回収を行った（図 2）。

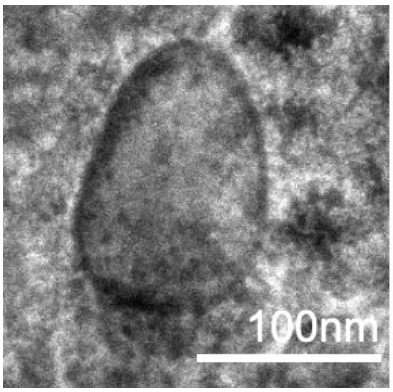


図 2. 得られたエクソソームの電子顕微鏡像
直径 100 nm ほどのエクソソームが確認できた。

得られたエクソソームを用いて Proliferation assay を行った。96 well プレートを用いて、1.5×10^4 cells/well でヒトリンパ管内皮細胞（LEC）を播種した。100 μl の EGM-2-MV 培地で一晩培養した後、培地を EBM-2 のみ、EBM-2＋エクソソーム X、EBM-2＋エクソソーム W、EBM-2＋エクソソーム WX、EBM-2＋エクソソーム XY、EBM-2＋エクソソーム WXY に変え、48 時間培養した。その後 10 μl の WST-8 assay solution を加え、4 時間培養し、450 nm の波長をマイクロプレートリーダーで測定し、結果は図 3 のようになった。

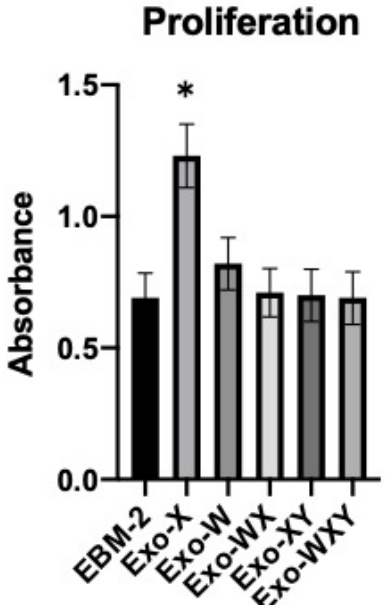


図 3. Proliferation assay
EBM-2、および EBM-2 に Exo-X を加えたもの、Exo-W を加えたもの、
Exo-WX を加えたもの、Exo-XY を加えたもの、Exo-WXY を加えたものを
比較すると、Exo-X を加えたもので、増殖の亢進が認められた。
One-way ANOVA、mean±SD、$p<0.05$。

低分子化合物 X を加えた培地から得られたエクソソームは、他のエクソソームに比べて、有意にリンパ管内皮細胞の増殖を促す、という結果が得られた。

3. miRNA PCR array

低分子化合物 X を培地に加えて得られたエクソソーム（ASC-Exo-X）と、通常のエクソソーム（ASC-Exo）の内容物を比較するため、miRNA PCR array を行った。ASC-Exo-X と ASC-Exo から miRNA を含む全 RNA を抽出し、miRCURY LNA RT Kit（Qiagen、Netherlands）を用いて逆転写を行った。得られた cDNA を Kit の指示に従い、LightCycler 480 Instrument2 を用いて real-time PCR を行った（図 4）。

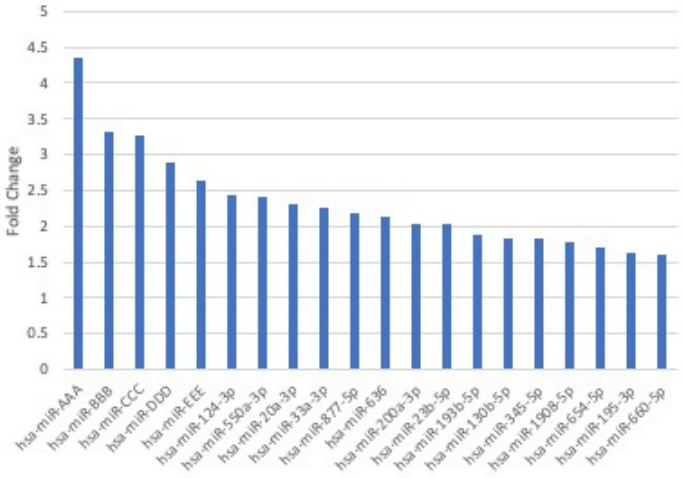


図 4. miRNA PCR array
miRNA PCR array の結果、ASC-Exo-X には、miR-AAA、BBB、CCC、DDD、EEE が多く含まれることが分かった。

この結果から、ASC-Exo-X は hsa-miR-AAA、BBB、CCC、DDD、EEE を多く含み、また文献の検索より、これらの miRNA が血管新生、リンパ管新生作用を持つことが分かった。以上より、低分子化合物 X 下で培養した上清中に含まれるエクソソームは hsa-miR-AAA、BBB、CCC、DDD、EEE をリンパ管内皮細胞に受け渡すことで、リンパ管新生作用をもたらしていると考えられた。

考　察

ASC は分化可塑性、障害部位の栄養効果、炎症抑制効果、障害部位へのホーミング能などの多様な作用を持つが［4］、その詳細なメカニズムは不明な点も多い。ASC はエクソソームというカプセルの中にどのようなメッセージを詰めているのか、ということはこれまでよく分かっていなかった。今回の研究を通して、ASC はその培養条件によって、エクソソーム中に異なる miRNA を詰め込み、疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

エクソソームを使用した再生医療の利点に関して、細胞移植では体外で長期培養した際に染色体異常などのゲノム異常が生じうる可能性があるが、エクソソーム投与の場合は、このような問題を回避することができる。また、エクソソームのみを単離して使用することは、治療効果の調節を容易にし、他家由来で製造が可能であるといった利点があると言える。

またエクソソーム投与の安全性に関して、ASC エクソソームは、実際に臨床投与されている報告もあり、安全性は高いと考えられる［5］。今後は、ASC エクソソーム投与による治療効果と安全性の確立を目指し、製剤化による臨床応用へと発展させたい。

共同研究者・謝辞

本研究のご指導を頂いた自治医科大学形成外科学教室の教室員の先生方に御礼申し上げます。また自治医科大学の実験補助に当たっていただいた、垣沼康代氏に感謝申し上げます。

文　献

1） Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. Nat Cell Biol. 2007 Jun;9(6):654-9. Epub 2007 May 7. PMID: 17486113　DOI: 10.1038/ncb1596

2） Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NS, Choo A, Chen TS, Salto-Tellez M, Timmers L, Lee CN, El Oakley RM, Pasterkamp G, de Kleijn DP, Lim SK. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. Stem Cell Res. 2010 May;4(3):214-22. doi: 10.1016/j.scr.2009.12.003. Epub 2010 Jan 4. PMID: 20138817 DOI: 10.1016/j.scr.2009.12.003

3） Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, Morando L, Busca A, Falda M, Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. J Am Soc Nephrol. 2009 May;20(5):1053-67. doi: 10.1681/ASN.2008070798. Epub 2009 Apr 23.　PMID: 19389847　PMCID: PMC2676194　DOI: 10.1681/ASN.2008070798

4） Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, Takeshita F, Sakai Y, Kuroda M, Ochiya T. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes.　Sci Rep. 2013;3:1197. doi: 10.1038/srep01197. Epub 2013 Feb 1.　PMID: 23378928　PMCID: PMC3561625 DOI: 10.1038/srep01197

5） Ferreira ADF, Gomes DA. Stem Cell Extracellular Vesicles in Skin Repair. Bioengineering (Basel). 2018 Dec 30;6(1). pii: E4. PMID: 30598033　PMCID: PMC6466099　DOI: 10.3390/bioengineering6010004