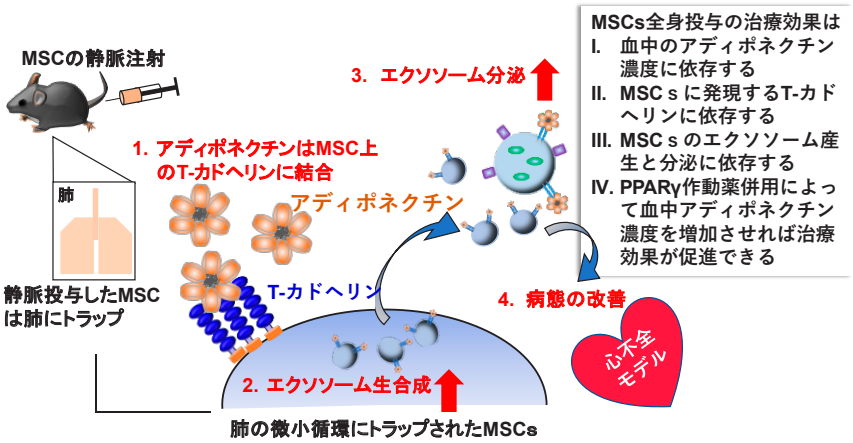
215　エクソソーム制御による個体機能維持機構の解明	下村　伊一郎

【目的】生理的多量体アディポネクチン（APN）はGPIアンカー型膜タンパクT-カドヘリン（T-cad）との高親和性相互作用によって細胞内後期エンドソームに集積し、エクソソーム（Exo）産生を促進することを見出した。APNや*T-cad*欠損マウスでは血中Exoが有意に低下しており、APNは本経路によって全身のExoレベルをも規定することを明らかにした。T-cadは細胞内シグナル伝達に通常必要とされる細胞内ドメインを有さないが、APNによって、セラミドをExoに搬出し、内皮細胞のセラミド蓄積を低下させるなどで、不要物・余剰物の除去に機能していることを明らかにした（Obata et al. JCI Insight 2018, Kita et al. JCI 2019）。一方、Exoはマイクロ RNAや生理活性タンパク・脂質を内包し、細胞間の情報伝達を担うことで注目される。間葉系幹細胞（MSCs）移植療法は様々な心血管疾患に有効性が示されている。興味深いことに、MSCsはT-cadを発現し、APN添加に応じてExo産生が亢進することを見出した。

【方法】マウスに大動脈縮窄（TAC）を処置し、2あるいは4週間後に心エコー装置を用いて心機能を評価した。ヒト脂肪由来間葉系幹細胞（hMSCs）は尾静脈より週3回投与した。血中Exoは PEG及び超遠心法で精製し、Exoマーカータンパクをウェスタンブロットにて評価した。また、フォスファチジルセリンアフェニティー法により精製し、散乱光分析ナノサイトにより粒子数と粒子径分布を評価した。PPARγ作動薬ピオグリタゾンは50 mg/kgを一日2回経口投与した。

【結果】野生型（WT）マウスでは大動脈縮窄（TAC）処置2週間後に心機能（EF%及びFS%）が低下し、ヒト脂肪由来hMSCsの週3回の尾静脈投与により有意に改善した。また投与hMSCs由来Exoが血中に産生されていることを確認した。Exo生合成複合体分子である*Alix*をノックダウンすることで、hMSCsの多分化能やサイトカイン産生に影響せず、Exo産生を顕著に抑制できた。このようなExo産生能欠損hMSCs（siAlix-MSCs）を投与したところ、血中Exoの増加が認められず、心機能も有意な改善を示さなかった。これらの心組織及びhMSCs産生ExoのRNAseq解析から、Exoに含まれる複数の主要なmiRNAsによる遺伝子発現制御が心機能の改善に寄与していると考えられた。次に、hMSCsはT-cadを発現しており、T-cad依存的かつ培養液に加えた多量体APNの濃度依存的にExo産生が増加すること、*APN*欠損マウスへの投与ではWTに比して血中へのExo産生が有意に減弱することを見出した。そこで、*APN*欠損マウスにTACを処置し、MSCsを投与したところ、血中Exoの有意な増加を認めず、また心機能の有意な改善を認めなかった。一方で、PPARγ作動薬投与により血中APN量を増加させたところ、MSCs投与による血中Exo量がさらに有意に増加し、心機能改善効果も有意に増強したが、これらの効果は*APN*欠損マウスでは認められなかった。また、hMSCsに発現している*T-cad*をノックダウンした細胞（siTcad-MSCs）では、WTマウスへの投与でも血中Exoの増加が認められず、心機能の改善効果も有意に減弱した。

間葉系幹細胞（MSCs）治療への応用



215. エクソソーム制御による個体機能維持機構の解明

下村　伊一郎

大阪大学 大学院医学系研究科 内分泌・代謝内科学

Key words : アディポネクチン，エクソソーム，間葉系幹細胞，心不全，T-カドヘリン

緒　言

アディポネクチン（APN）は脂肪細胞特異的かつ大量に産生される善玉アディポサイトカインとして知られる。血中濃度が非常に高いこと、900 KDa 程度にもなる高分子多量体を形成することが他の内分泌因子と極めて異なった特徴と言える。即ち、その血中濃度は通常 2〜20 μg/mL と、他の一般的なホルモンやサイトカインの千倍から百万倍高濃度で存在する。また、3 量体、6 量体、及び 18 量体以上の多量体を形成して分泌されるが、臨床的に重要な活性体は高分子多量体であることが、数々の臨床研究から示唆されている。では何故アディポネクチンはこれらの際立った特徴を有するのか、その合目的性とは何か？これまでその答えを説明し得る作用メカニズムは提唱されてなかった。

活性分子種とされる多量体 APN は、GPI アンカー型膜タンパク T-カドヘリン（T-cad）との相互作用によって組織に集積することで、筋再生促進・心血管保護作用を発現するが、T-cad には細胞内シグナル伝達に通常必要とされる膜貫通領域や細胞内ドメインはなく、作用分子メカニズムは不明であった。また、APN の多様な臓器保護作用の多くは、7 回膜貫通タンパク AdipoR を介する代謝亢進作用や、細胞表面に表出された Calreticulin との相互作用を介したオプソニン作用によって説明されてきた。

我々は、生理的多量体 APN は AdipoR や Calreticulin には結合せず［1］、T-cad との高親和性相互作用［2］によって細胞内後期エンドソーム（多胞体 : MVB）に集積し、エクソソーム（Exo）産生を促進することを見出した［3］。*APN* や *T-cad* 欠損マウスでは血中 Exo が有意に低下しており、APN は本経路によって全身の Exo レベルをも規定することを明らかにした［3］。T-cad は細胞内シグナル伝達に通常必要とされる細胞内ドメインを有さないが、APN によって、セラミドを Exo に搬出し、内皮細胞のセラミド蓄積を低下させるなどで、不要物・余剰物の除去に機能していることを明らかにした［3〜5］。

一方、Exo は miRNA や生理活性タンパク・脂質を内包し、細胞間の情報伝達を担うことで注目される。間葉系幹細胞（MSCs）移植療法は様々な心血管疾患に有効性が示されており、その作用は MSCs が生着分化して機能するか、あるいはサイトカインや Exo の分泌によって機能すると考えられている。興味深いことに、MSCs は T-cad を発現し、APN 添加に応じて Exo 産生が亢進することを見出した。本研究では、圧負荷心不全（TAC）モデルにおける MSCs 投与の心機能改善作用が、MSCs の Exo 分泌に依存するか、さらには MSCs に発現する T-cad 及び血中アディポネクチンの重要性を明らかにした［6］。

方法および結果

1.　間葉系幹細胞（MSCs）のエクソソーム産生

ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（MSCs）の培養中に精製多量体アディポネクチン（APN）20 μg/mL を加えて培養し、培養上清を Exo 精製樹脂（フォスファチジルセリンアフィニティー樹 ; MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS）を用いて精製し、粒子解析（Nanosight）を行った。多量体 APN は MSCs の Exo サイズの粒子を約 3 倍有意に増加した。また、細胞は可溶化してウェスタンブロット（WB）法にて、MSCs の T-cadherin（T-cad）タンパク発現、及び APN の細胞への集積を確認した。培養上清を超遠心法で精製し、WB 法にて Exo 画分の各種 Exo マーカーを検出定量

したところ、CD63 や syntenin などのエクソソームマーカーの有意な増加を認め、以上から、多量体 APN は MSCs の Exo 産生を促進したと結論した。このような APN による Exo 産生は 2.5~20 μg/mL の生理的濃度域の APN 濃度依存的に認められ、また MSCs の *T-cad* を、siRNA を導入してノックダウンすることで、強く減弱した。

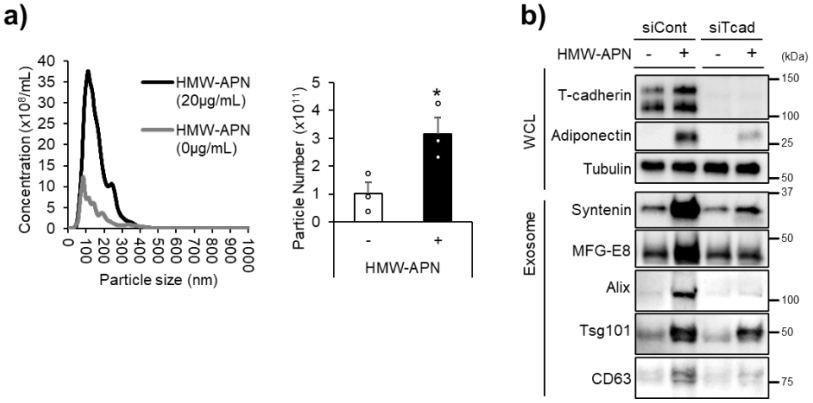


図 1. MSCs の APN による T-cad を介した Exo 産生

a）培養 MSCs を精製多量体 APN 存在下、非存在下に培養した培養上清中の Exo の粒子径と濃度をナノサイトによって分析した。データは mean±SEM を表示。*P＜0.05 (Student's t-test)。

b）*T-cad* をノックダウンした培養 MSCs の細胞溶解液と上清 Exo 画分。

2. MSCs 投与による血中 Exo の増加

心不全モデルとして、胸骨の一部を切開するにとどめて横大動脈を 27 ゲージ針の径まで狭窄することで、侵襲が小さく人工呼吸器を要さないミニマル TAC（以下 TAC とのみ記載）を用いた。TAC を処置し、翌日に細胞膜標識試薬（PKH26）で標識した MSCs を尾静脈より投与し、1 日後に解剖し、各種組織への MSCs の集積を評価したところ、既報と同様に、MSCs は主に肺に集積していた。MSCs 投与 4 時間後の血清を Exo 精製樹脂で精製し、粒子解析したところ、MSCs の投与によって血中の Exo サイズ粒子が 2 倍程度に増加した。この時、血中 Exo を超遠心法で精製して WB 解析したところ、hMFG-E8 や hCD63 等、投与したヒト MSCs に由来する Exo マーカーの増加と投与したマウス及びヒト MSCs 由来の Exo マーカーを検出する Alix や Tsg101 の増加を認めた。

次に、Exo 構成タンパクである MFG-E8 にルシフェラーゼ（gluc）を融合したタンパクを発現するアデノウイルスを作製し、MSCs に感染させたのちに正常マウスに投与した。血中の Exo 画分の gluc 活性を評価することで、MSCs 由来の Exo の生体内での産生動態を追跡したところ、MSCs の投与細胞濃度に依存した gluc 活性の増加を認め、また 72 時間以内にほぼ消失した。

3. 心不全モデルへの MSCs の尾静脈投与

正常マウスに TAC を処置し、2～3 日毎に計 6 回 MSCs を投与した。14 日目の血中 Exo を WB 解析したところ、MSCs 投与による血中への MSCs 由来 Exo の産生の増加を認めた。心機能を、心エコー装置を用いて解析したところ、TAC による左室駆出分画（EF%）、左室短縮率（FS%）の有意な低下、MSCs 投与による有意な改善を認めた。心不全の血液マーカーである ANP や BNP は TAC で有意に高値を示し、MSCs 投与によって有意に低下した。心重量は TAC によって有意に増加し、MSCs 投与によって有意に減少し、この時、左室横断面の心筋細胞は TAC で肥大し、MSCs 投与によって有意に改善した。

4. 血中 APN の重要性

gluc 標識 MFG-E8 発現アデノウイルスを感染させた MSCs を野生型マウスと *APN* 欠損マウスに単回投与したところ、Exo 画分の gluc 活性は野生型マウスに比して *APN* 欠損マウスでは約 1／3 に減少した。TAC を処置し、14 日間

に 2～3 日毎計 6 回 MSCs を投与したところ、WB による評価でも血中 Exo は *APN* 欠損マウスで有意に低下した。この時、野生型マウスでは MSCs 投与による心機能の改善が認められたが、*APN* 欠損マウスでは有意な改善を認めなかった。

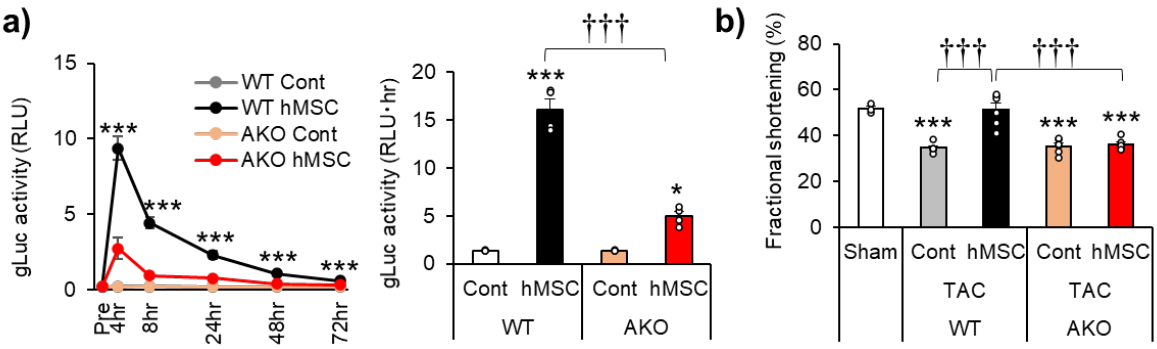


図 2. MSCs 投与の心不全モデル心機能改善作用 - 血中 APN の重要性

a） gluc 融合 MFG-E8 導入 MSCs 投与による血中 Exo 産生動態。

b） *APN* 欠損マウスに作製した心不全モデルへの MSCs 投与による心機能変化。

データは mean±SEM を表示。**P*<0.05, ****P*<0.001 vs sham ; †††*P*<0.001 between groups, by one-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's multiple comparisons.

5. PPARγ作動薬による血中 APN 増加の MSCs 治療効果促進作用

次に、血中 APN の増加が MSCs 投与による心不全治療効果を促進するかを調べる目的で、PPARγ作動薬の一つピオグリタゾンを 30 mg/kg, p.o., BID にて投与した。その結果、野生型マウスに TAC を処置し、MSCs を投与し、かつピオグリタゾンを投与した群は WB 法で評価した血中 Exo が有意に増加した。血中 APN は約 3 倍に増加していた。この時、心機能はピオグリタゾンを MSCs に併用することで有意に改善した。また重要なことにピオグリタゾン投与条件下でも MSCs 投与による心機能改善効果は *APN* 欠損マウスでは認められなかった。

6. MSCs の T-cad の重要性

T-cad の重要性を検証するために、MSCs に T-cad 特異的 siRNA を導入した。T-cad mRNA 発現は導入後 6 日目まで 95%以上低下を継続することを確認した。このような *T-cad* ノックダウン MSCs を投与したところ、MSCs 投与による血中 Exo 増加はほとんど認められず、この時、コントロール siRNA 導入 MSCs の投与では認められる心機能の改善が、強く減弱した。

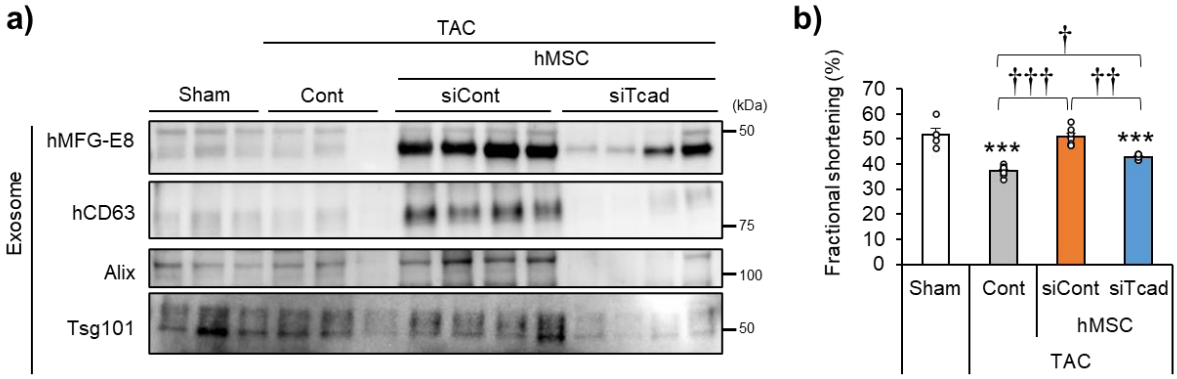


図 3. MSCs 投与の心不全モデル心機能改善作用 - MSCs の T-cad の重要性

a) 血中 Exo 画分の WB 解析。

b) *T-cad* をノックダウンした MSCs 投与による心機能の変化。データは mean±SEM を表示。 ***P<0.001 vs sham.; †P<0.05, ††P<0.01, †††P<0.001 between groups, by one-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's multiple comparisons.

7. MSCs の Exo 産生の重要性

次に、MSCs の心不全モデル治療効果が MSCs の Exo 産生によるものかを検証する目的で、Exo 生合成および分泌に関わる分子を、それぞれ siRNA を用いてノックダウンし、培養下に Exo 産生を評価した。その結果、多胞体 (MVB) の細胞膜輸送に関与する *Rab27a* 及び Exo 生合成に関わる *Alix* のノックダウンによって、Exo 産生が強く減弱することを見出した。なお、*Alix* のノックダウンは、MSCs の増殖、脂肪・軟骨・骨への多分化能、及び培地中へのサイトカイン産生に影響しなかった。そこで、MSCs に *Alix* をノックダウンして、TAC モデルに投与し、エクソソーム産生が治療効果に必要かを検討したところ、MSCs 投与による血中 Exo 増加はほとんど認められず、この時、コントロール siRNA 導入 MSCs の投与では認められる心機能の改善が、ほぼ消失した。

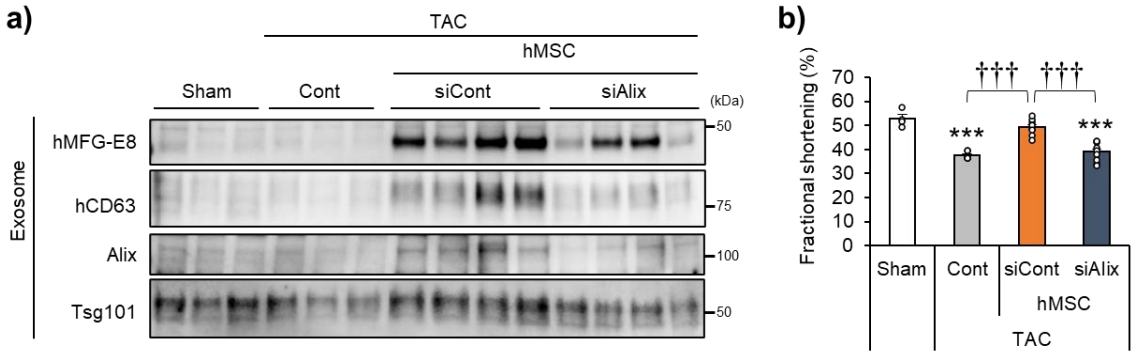


図 4. MSCs 投与の心不全モデル心機能改善作用 - MSCs の Exo 産生の重要性

a) 血中 Exo 画分の WB 解析。

b) *Alix* をノックダウンした MSCs 投与による心機能の変化。データは mean±SEM を表示。 ***P<0.001 vs sham, †††P<0.001 between groups, by one-way analysis of variance with *post hoc* Tukey's multiple comparisons.

8. Exo の miRNA の関与

Exo に含有される miRNA を RNAseq によって解析した。APN の添加によって、MSCs から産生される Exo の量は増加するが、miRNA の組成は変化しなかった。MSCs の Exo には let-7 ファミリーや mir-21 などの心血管保護に働くことが知られる miRNA を豊富に含んでいた。次に、Exo の miRNA が心臓に転送されて、心臓の遺伝子発現が調節された結果として心機能が改善している可能性を探るべく、心臓の RNA 発現を、高密度ジーンチップを用いて解析した。その結果、TAC 処置によって変化し、MSCs 投与で回復するが *Alix* をノックダウンした MSCs の投与では回復しない発現遺伝子群を選択した。これらは、TGF-βシグナルや代謝、アポトーシスに関与する遺伝子が濃縮されており、また約 4 割は MSCs の産生する Exo に豊富に含まれる let-7 等の miRNA のターゲット遺伝子であることが分かった。

考　察

TAC マウスモデルにおいて、APN は MSCs の Exo 産生を促進することで、治療効果を促進していることを明らかにした［6］。本モデルにおいて、MSCs の治療効果は血中の APN、MSCs の T-cad、及び Exo 産生に依存した。薬剤性に血中の APN を増加することで、治療効果を促進できることを示した［6］。これらの知見は様々な MSCs 治療法に応用できる可能性があり、また APN の多様な臓器保護のメカニズムを考察する上で重要と考える。

共同研究者・謝辞

本研究は大阪大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科学の中村勇斗を筆頭に、肥満脂肪病態学寄附講座講師の喜多俊文の指導の下に行われたものである。本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科病態情報学の高橋有己准教授、高倉喜信教授、大阪大学大学院医学研究科最先端再生医療学の宮川繁特任教授、心臓血管外科学の澤芳樹教授、ロート製薬株式会社の西田浩之グループリーダーである。大阪大学微生物研究所遺伝情報実験センターの奥﨑大介助教、大阪大学医学部共同研の方々、大阪大学大学院医学研究科内分泌・代謝内科学の方々に謝意を表します。

文　献

1) Kita S, Fukuda S, Maeda N, Shimomura I. Native adiponectin in serum binds to mammalian cells expressing T-cadherin, but not AdipoRs or calreticulin. Elife. 2019;8. Epub 2019/10/28. doi: 10.7554/eLife.48675. PubMed PMID: 31647413; PubMed Central PMCID: PMCPMC6822988.

2) Fukuda S, Kita S, Obata Y, Fujishima Y, Nagao H, Masuda S, et al. The unique prodomain of T-cadherin plays a key role in adiponectin binding with the essential extracellular cadherin repeats 1 and 2. J Biol Chem. 2017;292(19):7840-9. Epub 2017/03/21. doi: 10.1074/jbc.M117.780734. PubMed PMID: 28325833; PubMed Central PMCID: PMCPMC5427265.

3) Obata Y, Kita S, Koyama Y, Fukuda S, Takeda H, Takahashi M, et al. Adiponectin/T-cadherin system enhances exosome biogenesis and decreases cellular ceramides by exosomal release. JCI Insight. 2018;3(8):e99680. Epub 2018/04/19. doi: 10.1172/jci.insight.99680. PubMed PMID: 29669945; PubMed Central PMCID: PMCPMC5931116.

4) Tanaka Y, Kita S, Nishizawa H, Fukuda S, Fujishima Y, Obata Y, et al. Adiponectin promotes muscle regeneration through binding to T-cadherin. Sci Rep. 2019;9(1):16. Epub 2019/01/09. doi: 10.1038/s41598-018-37115-3. PubMed PMID: 30626897; PubMed Central PMCID: PMCPMC6327035.

5) Kita S, Maeda N, Shimomura I. Interorgan communication by exosomes, adipose tissue, and adiponectin in metabolic syndrome. J Clin Invest. 2019;129(10):4041-9. Epub 2019/09/05. doi: 10.1172/JCI129193. PubMed PMID: 31483293; PubMed Central PMCID: PMCPMC6763291.
6) Nakamura Y, Kita S, Tanaka Y, Fukuda S, Obata Y, Okita T, et al. Adiponectin Stimulates Exosome Release to Enhance Mesenchymal Stem-Cell-Driven Therapy of Heart Failure in Mice. Mol Ther. 2020;S1525-0016(20):30316-6. Epub 2020/07/12. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.06.026. PubMed PMID: 32652045; PubMed Central PMCID: PMCPMC7351027.