

## 209. 幹細胞エクソソーム徐放技術を用いた新規治療法の開発

西田 英高

\*大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科 獣医外科学教室

Key words : エクソソーム, 間葉系幹細胞, 徐放, 脊髄損傷, バイオマテリアル

### 緒言

生体に存在する間葉系幹細胞は損傷を受けた組織を修復・再生する際の細胞供給源になっていると考えられており、すでに幹細胞を用いた治療が開始されている。近年、これらの組織修復能に幹細胞が分泌するエクソソームが深く関与していることが明らかとなってきている。エクソソームは様々な核酸 (microRNA) やタンパク質 (栄養因子) を内包する 100~200 nm の細胞膜に覆われた小胞で、小胞内の因子を安定化したまま輸送することが可能であり、再生医療の新たなツールとして期待されている [1]。これらを臨床応用するためにはエクソソームを大量に濃縮・精製する技術が必要不可欠である。このような背景の中、著者はエクソソームの表面電荷が負である特徴を利用した陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた大量精製技術を開発した [2]。

幹細胞由来エクソソームの臨床応用に際して、病変部にエクソソームを長期に留まらせ、効果を持続させるための技術が必要とされている。海外ではエクソソームの徐放技術の開発が進んでいるが、従来のタンパク質や薬物を徐放するシステムでは長期間安定して徐放することが困難であり、pH に依存して徐放されるために損傷部において安定した徐放効果が得られないことが問題となる。また、既存のバイオマテリアルでは含浸されるエクソソームの量は考慮されておらず、より多くのエクソソームを含浸できるバイオマテリアルの開発が必要である。本研究では、幹細胞由来エクソソームの臨床応用に向けた技術開発を目的とし、生体内で長期間に及んで抗炎症効果を持続することのできるゼラチンハイドロゲルを開発する。さらに、脊髄損傷げっ歯類モデルを用いてその有効性について評価する。本研究で開発するエクソソームの徐放技術が確立されれば、少量のエクソソームで効果を長期間持続することが可能となり、臨床応用へ向けた新たな再生医療技術となり得る。本研究は凍結保存可能な幹細胞由来エクソソームに着目し、“ready-to-use”を実現可能にした新たな再生医療の治療技術を提供することができ、再生医療技術を推進することを目標としている。

### 方法

#### 1. 間葉系幹細胞由来エクソソームの回収

犬の上腕骨より骨髓液を採取し、リンパ球分離溶液にて単核細胞を分離し、培養皿で培養することでディッシュの底に付着する間葉系幹細胞を回収した。得られた細胞を新たなディッシュに播種し、細胞密度が 70~80%に達したときに培地を変更し、48 時間培養後に、培養上清を回収した。培養上清からエクソソームを回収するために、超遠心 (100,000×g, 90 分) を用いて回収した。

#### 2. エクソソーム徐放ゲルの開発

##### (1) カチオン化ハイドロゲルの作製

等電点 9.0、分子量 100,000 のゼラチン 4.0 g に 0.1 M リン酸塩緩衝液 100 mL を加え室温下で 1 時間ゼラチンを膨潤させ、37°C で溶解させた。ゼラチンをカチオン化するために、ゼラチン水溶液に 2 価のアミンである無水エチレンジアミンを加え、ゼラチンのカルボキシ基をアミド化した。氷上で、HCl を用いて pH 5.0 に合わせ

\*現在の所属：麻生大学 獣医学部 獣医学科 小動物臨床研究室

た。2.14 g カルボジイミド塩酸塩をゼラチン水溶液に加え、0.1 M リン酸塩緩衝液で総量 200 mL とした。ゼラチン水溶液を 37°C 下で攪拌し、セルロースチューブを用いて透析後にゼラチン水溶液を回収し、液体窒素を用いて急速凍結し、真空凍結乾燥機で凍結乾燥することでカチオン化ゼラチンを得た。

カチオン化ゼラチンに超純水を加え、室温下で 1 時間静置、37°C 下で攪拌することで 50 mg/mL のカチオン化ゼラチン水溶液を作製した。シート状の形状とするために、BALANCE DISHES に注ぎ、液体窒素で急速凍結し、凍結乾燥機で凍結乾燥した。乾燥したカチオン化ゼラチンシートをアルミホイルで包み、真空乾燥装置を用いて、160°C で 24、48、96 時間の 3 条件で熱脱水架橋を行い、カチオン化ゼラチンハイドロゲルシートを得た。

#### (2) カチオン化ハイドロゲルの分解・徐放試験

作製したゼラチンハイドロゲルの架橋条件による分解およびエクソソームの徐放について評価した。1.5 mL エッペンチューブ内で、24、48、96 時間で架橋したハイドロゲル 2.5 mg に PKH26 で蛍光標識したエクソソームを 20  $\mu$ L ずつ添加し、4°C で一晩含浸させた。PBS (+) を添加し、37°C 下に置いた。PBS に浸漬したゼラチンハイドロゲルを 2、5、8、26 時間経過後に、上清を回収した。ハイドロゲルに PBS を加えてから 26 時間経過後、ハイドロゲルを分解するために Collagenase D を 10  $\mu$ g/mL 含有する PBS 溶液を添加し、37°C で反応させた。Collagenase D 含有 PBS に浸漬したゼラチンハイドロゲルを 1、3、5、8、12、24 時間経過後に上清を回収した。

### 3. 徐放エクソソームの性能開発

#### (1) 間葉系幹細胞由来徐放エクソソームの BV-2 に対する抗炎症効果

ゼラチンハイドロゲルから徐放された間葉系幹細胞由来エクソソームが抗炎症効果を有しているかについて、評価した。160°C、24 時間架橋条件下で作製したゼラチンハイドロゲル 2.0 mg に、徐放エクソソーム群はエクソソーム 100  $\mu$ g/mL、ゲル単独群は同量の PBS を 4°C で一晩含浸させた。さらに、Collagenase D を 10  $\mu$ g/mL 含有する PBS 溶液を 50  $\mu$ L 添加し、24 時間反応させ、徐放されたエクソソームを含む溶液を回収した。

マウスミクログリア細胞株である BV-2 を用いて、LPS を 1 ng/mL ずつ各ウェルに加え、抗炎症効果について評価した。徐放エクソソーム群ではハイドロゲルから徐放されたエクソソームを用い、ゲル単独群ではハイドロゲルを同様の条件で分解した溶液を用いた。それぞれ 1 ウェルあたり 100  $\mu$ L 加え、6 時間後にリアルタイム PCR を用いて、BV-2 の IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-6、GAPDH の遺伝子発現量を評価した。

#### (2) 間葉系幹細胞由来徐放エクソソームの脊髄損傷ラットに対する効果

脊髄損傷モデルは、脊髄損傷装置を用いてラット胸髄に 200 kDyne で作製した。エクソソームを浸潤させたハイドロゲル、または PBS を浸潤させたハイドロゲルを損傷部に埋植し、運動機能の変化について BBB score を用いて評価した。

## 結果および考察

### 1. 間葉系幹細胞由来エクソソームの回収

骨髄間葉系幹細胞の培養上清から超遠心法を用いて回収したサンプルはウェスタンブロット法にてエクソソームのマーカーである TSG101 の発現が確認された。またゼータサイザーを用いて粒子径を測定したところ、ピーク粒子径は 299.5 nm であった [3]。

### 2. エクソソーム徐放化ゲルの開発

すべての架橋条件において得られたゼラチンハイドロゲルシートは、肉眼的には白色で多孔性であった。大きさは縦横が 2.0×2.0 cm で、厚みが 0.5 mm であった。ゼラチンハイドロゲルのコラゲナーゼを用いた分解試験では、PBS に 26 時間浸漬後、24 時間架橋群では 30.9±1.78% (平均値±標準偏差)、48 時間架橋群では 23.7±0.48%、96 時間架橋群では 18.5±0.57% のゲルの分解が認められた (図 1A)。また、PKH-26 標識 EV を

用いた徐放試験では、PBSに26時間浸漬後、24時間架橋群では $18.3 \pm 16.1\%$ 、48時間架橋群では $37.0 \pm 2.59\%$ 、96時間架橋群では $31.9 \pm 1.70\%$ のエクソソームの放出が認められた（図1B）。以上のことから、24時間架橋のゲルが最もエクソソームをゲル内に保持できることが明らかとなった。その後コラゲナーゼを添加したところ、ゼラチンハイドロゲルは経時的に分解され、24時間架橋群では $31 \pm 0.0$ 時間後、48時間架橋群では $38 \pm 1.8$ 時間後、高架橋群では $50 \pm 0.0$ 時間後にハイドロゲルが完全に消失し、エクソソームが徐放された。以上のことから、カチオン化ハイドロゲルによってゲル内にエクソソームを放出せずに留めることが可能となり、架橋度によって徐放速度を調整することに成功した [4]。

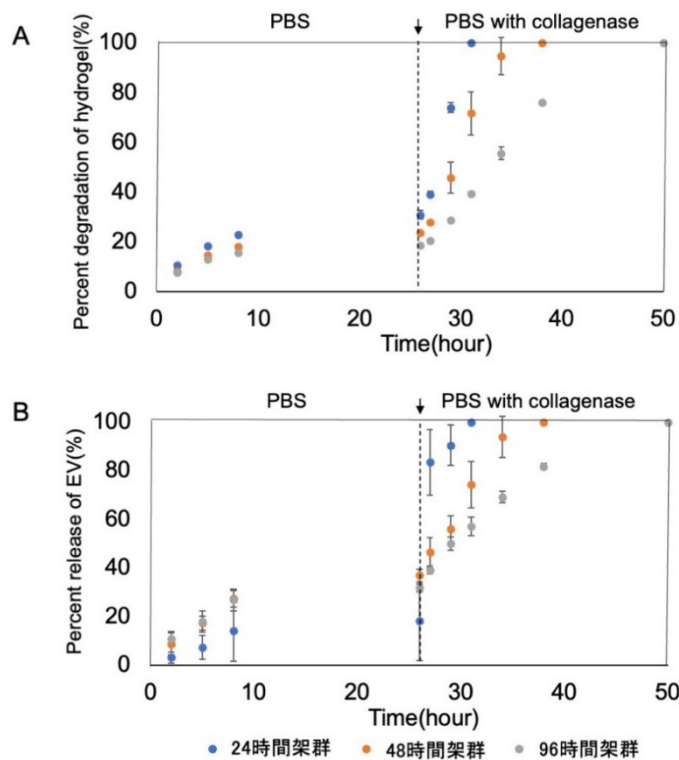


図 1. カチオン化ゼラチンハイドロゲルの分解・徐放試験

24 時間架橋群は 31 時間、48 時間架橋群は 38 時間、96 時間架橋群は 50 時間後に完全にゲルが分解され (A)、エクソソームが徐放された (B)。架橋度によって、ゲルの分解およびエクソソームの徐放速度を調整することが可能であった。矢印に示す時点で collagenase を添加した。

### 3. 徐放エクソソームの性能開発

#### (1) 間葉系幹細胞由来徐放エクソソームの BV-2 に対する抗炎症効果

ハイドロゲルから徐放されたエクソソームが効果を維持しているかについて、LPS によって刺激した BV-2 を用いて評価した。IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量比は、ゲル単独群で  $9.86 \pm 3.36$  (平均値 $\pm$ 標準偏差)、徐放エクソソーム群では  $3.42 \pm 0.71$  であり、徐放エクソソーム群において IL-1 $\beta$  の mRNA 発現量の有意な減少が認められた ( $p < 0.01$ ) (図 2A)。TNF- $\alpha$  の mRNA 発現量比は、ゲル単独群で  $2.57 \pm 1.03$ 、徐放化 EV 群では  $2.21 \pm 1.03$  であった。IL-6 の mRNA 発現量比は、ゲル単独群で  $3.96 \pm 2.26$ 、徐放化 EV 群では  $1.06 \pm 0.72$  であり、徐放エクソソーム群において IL-6 の mRNA 発現量の減少傾向が認められた ( $p = 0.06$ ) (図 2B)。

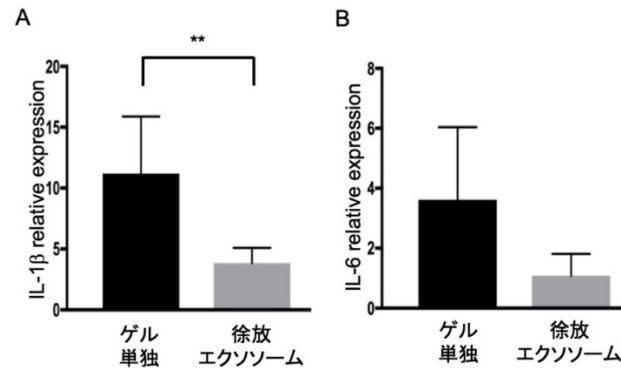


図 2. 徐放エクソソームの BV-2 に対する抗炎症効果

LPS 刺激 BV-2 の IL-1 $\beta$  (A) および IL-6 (B) の mRNA 発現量。徐放エクソソーム群はゲル単独群と比較して、IL-1 $\beta$  の有意な減少 (\* $p < 0.01$ ) と IL-6 の減少傾向 ( $p = 0.06$ ) が認められた (Mann-Whitney test)。

## (2) 間葉系幹細胞由来徐放エクソソームの脊髄損傷ラットに対する効果

エクソソームを浸潤させたハイドロゲルを埋植した脊髄損傷ラットでは、PBS を浸潤させたハイドロゲルを埋植したラットと比較して、埋植後 2 週および 4 週において、有意に運動機能が改善することが明らかとなった [5]。

以上のことから、生体内で長期間に及んで有効性を持続することのできるゼラチンハイドロゲルの開発に成功した。また、脊髄損傷モデルラットにおいて、ハイドロゲルからエクソソームを徐放させることによって、運動機能の回復を促進したことが示唆された。本研究では、少量のエクソソームの効果を長期間持続させることが可能な除法技術の開発に成功した。これらの結果は、臨床応用へ向けた新たな再生医療技術につながると考えられる。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学医生物学研究所再生組織構築研究部門生体材料分野の田畑泰彦教授および城潤一郎助教である。

## 文 献

- 1) Phinnet DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. *Stem Cells* 2017 Apr; 35 (4): 851-858. doi: 10.1002/stem.2575.
- 2) Kim DK\*, Nishida H\*, An SY, Shetty AK, Bartosh TJ, Prockop DJ. Chromatographically isolated CD63+CD81+ extracellular vesicles from mesenchymal stromal cells rescue cognitive impairments after TBI. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016 Jan 5, 113 (1), 170-175. (\*contributed equally to this work.) doi: 10.1073/pnas.1522297113.
- 3) Kuwahara Y, Yoshizaki K, Nishida H\*, Kamishina H, Maeda S, Takano K, Fujita N, Nishimura R, Jo JI, Tabata Y, Akiyoshi H. Extracellular vesicles derived from canine mesenchymal stromal cells in serum free culture medium have anti-inflammatory effect on microglial cells. *Front Vet Sci* 2021 Apr 28; 8: 633426. doi: 10.3389/fvets.2021.633426.

- 4) Yoshizaki K, Nishida H\*, Tabata Y, Jo JI, Nakase I, Akiyoshi H. Controlled release of canine MSC-derived extracellular vesicles by cationized gelatin hydrogels. *Regen Ther* 2022 Dec 10; 22: 1-6. doi: 10.1016/j.reth.2022.11.009.
- 5) Nishida H\*, Yoshizaki K, Matsuura H, Edamura K, Yamazaki A, Nakase I, Akiyoshi H, Tabata Y. Controlled release of extracellular vesicles from canine mesenchymal stromal cells rescue motor function after spinal cord injury. *in preparation*.