

ヒト胎児付属物由来幹細胞の培養上清中に存在する
Exosome の免疫抑制能の検討（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程

内科系小児科学専攻

金澤 剛二

修了年 2018 年

指導教員 高橋 昌里

【背景】

近年、間葉系幹細胞（**Mesenchymal stem cell: MSC**）が細胞外小胞（**Extracellular vesicles : Exosome**）を分泌し、含有するマイクロ RNA（**Micro RNA: miRNA**）を標的細胞へ運搬することにより、組織修復や免疫抑制能をもたらすことが明らかにされている。胎児付属物である臍帯や羊膜にも **MSC** が豊富に存在し、その採取の容易さから治療用細胞として期待されている。また胎児付属物由来 **MSC** から **Exosome** が分泌されることは明らかにされているが、その **Exosome** がどのような免疫調整をもつかは明らかにされていない。本研究では胎児付属物を羊膜間質と臍帯 **Wharton's Jelly** に分離し、羊膜間質由来 **MSC**（**AM-MSC**）および臍帯 **Wharton's Jelly** 由来 **MSC**（**WJ-MSC**）の培養上清より **Exosome** を抽出し、それらの含有する **miRNA** の網羅的解析と **T** 細胞増殖抑制能や制御性 **T** 細胞（**Regulatory T cell : Treg**）の分化に関わる効果を検討した。

【材料と方法】

ヒト臍帯および胎盤は日本大学医学部附属板橋病院倫理委員会の承認を得て、妊娠 37-39 週に予定帝王切開を施行した健康な胎児から採取した。臍帯 **Wharton's Jelly**、胎盤羊膜から **MSC** を単離・培養し、得られた **AM-MSC**、**WJ-MSC** の培養上清からポリマー沈殿法により **Exosome** を抽出した。抽出物が **Exosome** であるか確認するため、透過電子顕微鏡による形態観察とウェスタン

ブロット法による **Exosome** 特異的マーカーの検出を行った。また、**Exosome** が含有する **miRNA** の網羅的遺伝子解析を行うため、**AM-MSC**、**WJ-MSC** 由来 **Exosome** (**AM-MSC Exo**、**WJ-MSC Exo**) から **RNA** を抽出し含有 **miRNA** の発現を **miRNA** マイクロアレイにて解析した。比較対照として正常ヒト皮膚繊維芽細胞 (**Normal human dermal fibroblast : NHDF**) 由来 **Exosome** (**NHDF Exo**) を使用した。また **Exosome** のリンパ球への取り込み能を評価するために、**PKH67** で蛍光標識された **AM-MSC Exo**、**WJ-MSC Exo** を培養中のヒト T リンパ球へ添加し、**24** 時間後に蛍光顕微鏡で観察した。次にリンパ球増殖に対する **Exosome** の効果を評価するため、**AM-MSC Exo**、**WJ-MSC Exo** を種々の濃度で **CFSE** 標識したヒト末梢血単核球 (**Peripheral blood mononuclear cell : PB-MNC**) に加え、抗 **CD3/28** 抗体と **Interleukin-2 (IL-2)** 含有培地にて T 細胞の増殖を刺激した。培養 **4** 日後にフローサイトメーターにて **carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE)** 蛍光強度を測定した。

さらに制御性 T 細胞 (**regulatory T cell : Treg**) の分化に対する **Exosome** の効果を評価するために、**AM-MSC Exo**、**WJ-MSC Exo** を種々の濃度でヒト臍帯血 **CD4** 陽性 T 細胞に添加し、抗 **CD3/28** 抗体と **IL-2** 含有培地にて培養を行った。培養 **4** 日後にフローサイトメーターにて **Treg** 細胞 (**CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺**細胞) の割合を定量評価した。

統計処理は、多群間比較は **One-way analysis of variance (ANOVA)** を用い、**Post-hoc 検定**として **Tukey's multiple comparison test** により各群間の有意差検定を行った。**P<0.05** を有意水準とした。

【結果】

ポリマー沈殿法にて抽出された抽出産物は、直径 **50~200nm** の **Exosome** のサイズに一致する小胞が多数確認され、その一部は **Exosome** の特徴である二重膜構造が確認された。ウェスタンブロット解析では、**AM-MSc Exo**、**WJ-MSc Exo** 共に **Exosome** 特異的マーカーである **CD63** の発現バンドが検出された。

AM-MSc Exo、**WJ-MSc Exo** から抽出された **RNA** は、バイオアナライザの結果、高純度の **small RNA** が含まれていることを確認した。また抽出された **miRNA** のマイクロアレイによる網羅的遺伝子解析では、**AM-MSc Exo**、**WJ-MSc Exo** は **NHDF Exo** に比べ **T 細胞**の発生や増殖促進・抑制や **Treg 細胞**分化に係わる複数の **miRNA** を高発現していることが明らかになり、その **miRNA** 発現は **WJ-MSc** で発現が強い傾向が認められた。

Exosome のヒト末梢血 **T 細胞**への取り込み試験では、多くの **T 細胞**内に **PKH67** の蛍光が検出され、**AM-MSc Exo**、**WJ-MSc Exo** が効率良く **T 細胞**に取り込まれることが確認できた。リンパ球増殖反応に対する **Exosome** の効果は、**WJ-MSc Exo**、**AM-MSc Exo** 共に濃度依存性に **PI** が低下し、**T 細胞**増殖抑制作

用を示したが、両者で増殖抑制能の差は認めなかった。また、**Treg** 細胞誘導試験については、**AM-MSC Exo**、**WJ-MSC Exo** はいずれもヒト臍帯血 **CD4** 陽性 T 細胞の **Treg** 細胞への分化を濃度依存性に促進することが示された。一方両者の **Treg** 細胞誘導促進性に明らかな差は認められなかった。

【結論】

本研究の新規性を以下に列記する。①**AM-MSC Exo** と **WJ-MSC Exo** に発現する **miRNA** を直接比較検討し、**WJ-MSC** の方が **AM-MSC** に比べて T 細胞増殖抑制に関わる **miRNA** が強く発現していた。②**AM-MSC Exo**、**WJ-MSC Exo** は、ヒト T リンパ球へ効率良く取り込まれ、濃度依存性にヒト T リンパ球の増殖を抑制した。③**AM-MSC**、**WJ-MSC** や、それらの **Exosome** は、ヒト臍帯血 **CD4** 陽性 T 細胞の **Treg** 細胞への分化を促進した。

これらの結果から、**AM-MSC**、**WJ-MSC** の免疫抑制能の作用機序として、T 細胞の増殖を抑制するのみならず、**Treg** 細胞の分化を促進させることが示された。また、それぞれの細胞から分泌された **Exosome** が免疫制御に関わる複数の **miRNA** を含有し、T 細胞増殖抑制作用や **Treg** 細胞の分化促進作用を示すことが明らかとなった。

表 1. T 細胞の発生や増殖、Treg 細胞分化に関わる miRNA リスト

miRNA	AM-MSC Exo	WJ-MSC Exo	NHDF Exo	Function	Target gene
miR-181a	++	++	+	Modulates early T cells development ⁶⁵⁾	PTEN ⁶⁵⁾
miR-182	-	-	-	Promotes T cell activation and proliferation ⁶⁶⁾	Foxo1 ⁶⁶⁾
miR-214	++	+	+	Promotes T cell activation and proliferation ⁶⁷⁾	PTEN ⁶⁷⁾
miR-15a	-	-	-	Inhibit CD4 Tcell activation proliferation ⁶⁸⁾	Bcl-2 ⁶⁸⁾
miR-17	++	++	+	Inhibit CD4 Tcell activation proliferation ⁶⁹⁾	TGFβRII, CREB1 ⁶⁹⁾
miR-19b	+	++	+	Inhibit CD4 Tcell activation proliferation ⁶⁹⁾	PTEN ⁶⁹⁾
miR-29a	-	±	-	Inhibit CD4 Tcell activation proliferation ⁷⁰⁾	T-box ⁷⁰⁾
miR-221	-	-	-	Inhibit CD4 Tcell activation proliferation ⁷¹⁾	unknown
miR-10a	++	++	±	Modulates regulatory T cells expansion ⁷²⁾	Bcl-6 ⁷²⁾
miR-21	++	++	+	Modulates regulatory T cells expansion ^{73),74)}	CCR-7 ^{73),74)}
miR-142-3p	-	-	-	Modulates regulatory T cells expansion ⁷⁵⁾	GARP ⁷⁵⁾
miR-146a	++	++	±	Modulates regulatory T cells expansion ⁷⁶⁾	STAT-1 ⁷⁶⁾
miR-155	-	-	-	Modulates regulatory T cells expansion ⁷⁷⁾	unknown

++ : miRNA マイクロアレイで発現を認め、かつ比較対照である NHDF Exo に比較して 1.5 倍以上高く検出された。

+ : miRNA マイクロアレイで 2 サンプル共に発現が検出された。

± : miRNA マイクロアレイで 1 サンプルのみに発現が検出された。

- : miRNA マイクロアレイで発現なし。

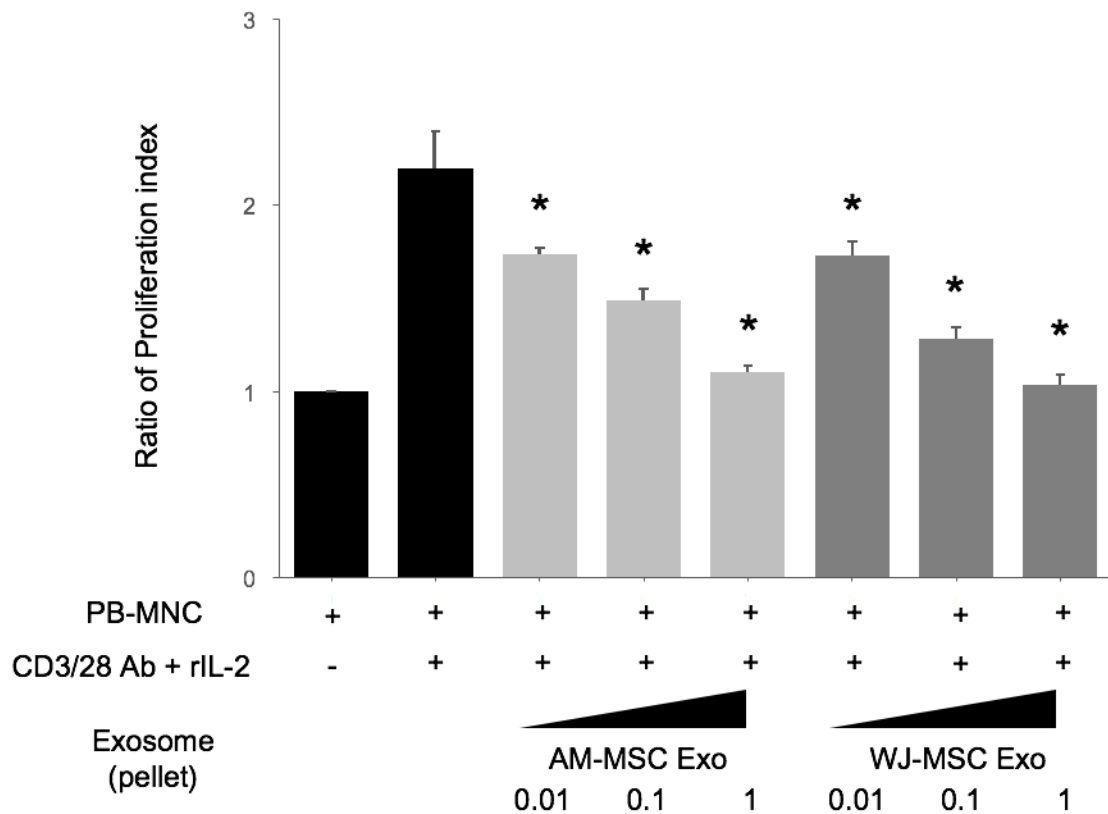


図 8. リンパ球増殖反応に対する AM-MSC、WJ-MSC 由来 Exosome の影響

AM-MSC、WJ-MSC から抽出した Exosome (AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo) を種々の濃度で CFSE 標識した PBMNC に加え、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて T 細胞の増殖を刺激した。培養 4 日後、非付着細胞を回収し、フローサイトメーターにて CFSE 蛍光強度を測定した。CFSE 蛍光強度により Proliferation Index (PI) を算出し、PBMNC (非刺激) を 1 とする比 (Ratio of Proliferation index : PI) として各実験区を比較した。各実験区 n=4. Bar: mean ± SD. *: p<0.05 vs PBMNC (T 細胞刺激+) (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison analysis)

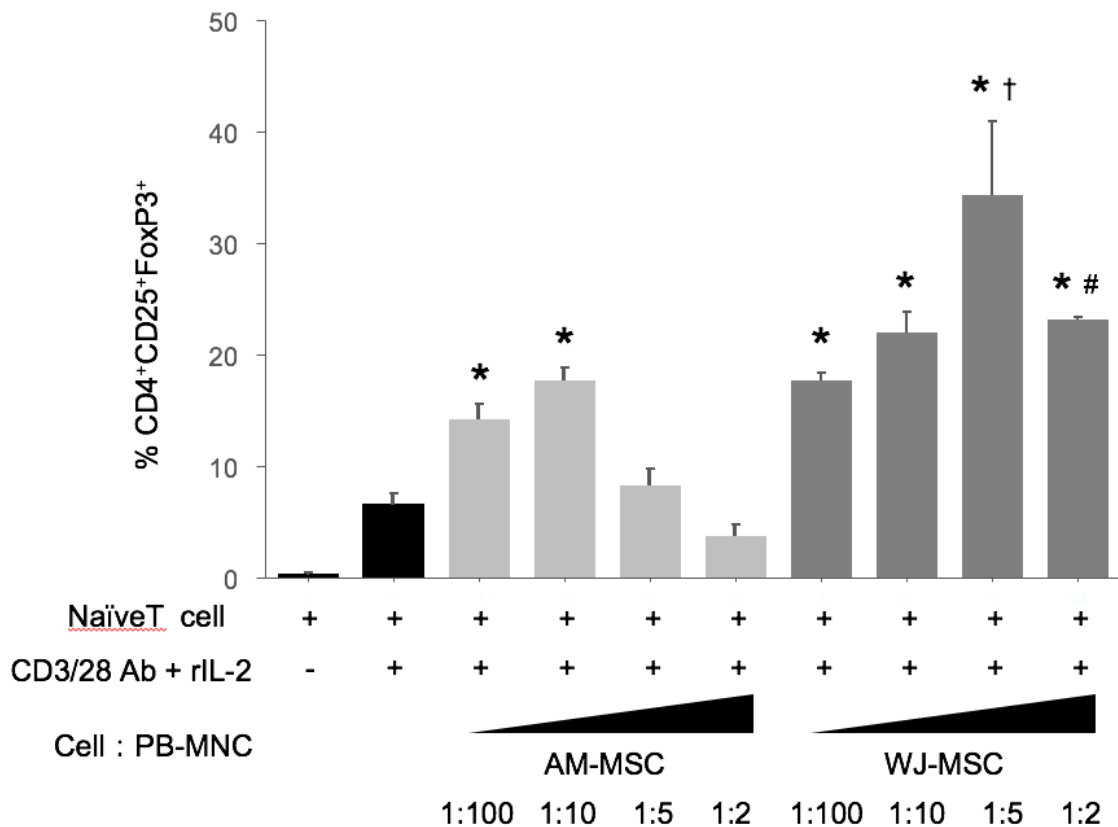


図 9. Treg 細胞分化に対する AM-MSC、WJ-MSC 共培養の影響

AM-MSC、WJ-MSC を 96 ウェルプレートに種々の細胞密度で播種し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にてヒト臍帯血 CD4 陽性 T 細胞と共培養を行った。培養 4 日後、非付着細胞を回収し、フローサイトメーターにて制御性 T 細胞 (regulatory T cell : Treg) (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺細胞) の割合を定量評価した。各実験区 n=4. Bar: mean ± SD. *: p<0.05 vs NaiveT 細胞 (T 細胞刺激+) . #: p<0.05 vs AM-MNC (1:2) . †: p<0.05 vs AM-MNC (1:5) . (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison analysis)

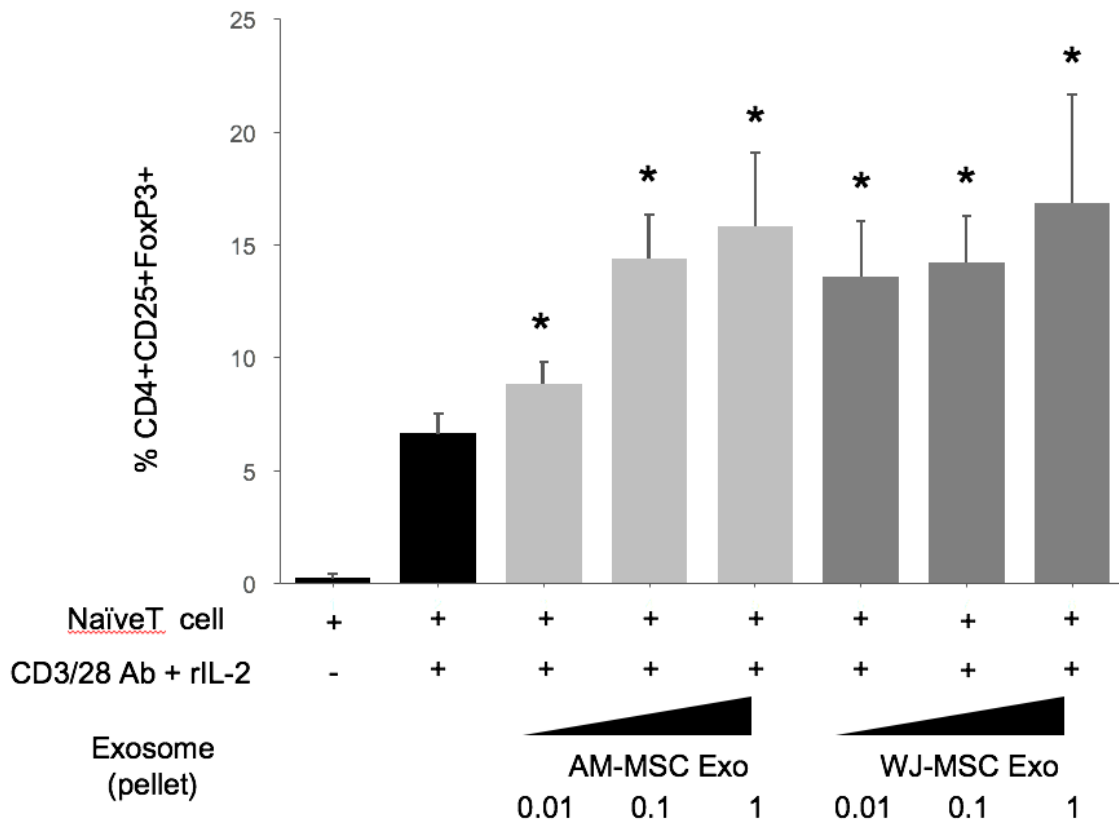


図 10. Treg 胞分化に対する AM-MSC、WJ-MSC 由来 Exosome の影響

AM-MSC、WJ-MSC から抽出した Exosome (AM-MSC Exo、WJ-MSC Exo) を種々の濃度でヒト臍帯血 CD4 陽性 T 細胞に添加し、抗 CD3/28 抗体と IL-2 含有培地にて培養を行った。培養 4 日後、非付着細胞を回収し、フローサイトメーターにて Treg 細胞 (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺細胞) の割合を定量評価した。各実験区 n=4. Bar: mean±SD. *: p<0.05 vs 臍帯血 CD4 陽性 T 細胞 (T 細胞刺激+) . (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparison analysis)