

「傷害肝の修復・再生を促進する新規治療法の開発」

【研究概要】

コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスは、組織や臓器の形態保持や創傷治癒・組織修復において重要な役割を演じている。しかしながら、各種の細胞ストレスにより慢性炎症が惹起されると組織に過剰のマトリックス成分が沈着し、諸臓器の線維化が引き起こされる。臓器線維症は多くの生活習慣病に合併し、癌の発生母地としても重要な病因的意義を有する。例えば、肝臓病学の分野ではメタボリック症候群の肝臓表現型である非アルコール性脂肪肝炎の患者が急増し、高率に肝硬変・肝癌へ進展することから、ウイルス性肝炎に替わる新たな問題となっている。また、糖尿病性腎症や慢性糸球体腎炎による腎線維化は透析患者数の増加と医療費の高騰を招き、医学的な重要課題であるとともに医療経済的問題を招いた。さらに、肺線維症は原因不明の特発性肺線維症のみならず、抗癌剤・放射線治療の副作用や環境中有害物質によってももたらされるなど、社会的関心も高い。

本研究プロジェクトは、各種の細胞ストレスが引き起こす臓器線維症の発症と進展機序の解明に系統的かつ臓器横断的に取り組み、新たな診断・治療法の開発に向けての分子基盤を構築することを目的とする。これまでの研究により、傷害肝細胞の修復と再生を促す新規のエクソソーム内包分子として Opioid growth factor receptor-like 1 (OGFRL1) を同定し、産学連携の元で特許出願を行った。また、エクソソーム指向性タグを有する XPack ベクターに OGFRL1 cDNA をクローニングし、OGFRL1 搭載エクソソームの *in vitro* での高産生系の確立にも成功した。これらの研究成果を受けて、2021 年度は OGFRL1 搭載エクソソームの表面に新たな修飾を施し、投与効果の向上とともに副作用の軽減を目指した。その結果、炭酸アパタイトナノ粒子を用いた修飾がエクソソームの細胞への取り込みやサイトゾルへの移行など、利用効率を改善させることを見出した。また、エクソソーム表面にガラクトース側鎖を用いた修飾を行うことで、肝細胞への指向性を向上させることも明らかにした。

【研究成果】

1) モニタリング用エクソソームの作製：

エクソソームの利用効率や細胞内局在を評価するため、ルシフェラーゼまたは mCherry/EGFP 融合タンパク質を内包するモニタリング用エクソソームを作製した。ルシフェラーゼ発現プラスミドを導入した HEK293T 細胞から分泌されたエクソソームには、導入 24 時間後をピークにルシフェラーゼ活性が確認された。また、mCherry/EGFP 発現プラスミドを導入した HEK293T 細胞の細胞質と培養上清中のエクソソーム分画には、両蛍光の共局在が確認された。

2) 炭酸アパタイトナノ粒子修飾による利用効率の改善：

上記のルシフェラーゼ搭載エクソソームに対して炭酸アパタイトナノ粒子による修飾を行い、マウス初代肝細胞の培養上清に添加もしくはマウスに静脈投与した。その結果、未修飾のルシフェラーゼ搭載エクソソームを培養上清に加えた場合に比して、炭酸アパタイトナノ粒子による修飾はルシフェラーゼ活性を有意に増加させた（図 1）。また、初代培養肝細胞に mCherry/EGFP 搭載エクソソームを添加した検討では、炭酸アパタイトナノ粒子による修飾は未修飾のエクソソームを投与した場合に比して mCherry/EGFP を共発現するエクソソームを増加させ、エクソソーム内包物質がリソソームに移行する前にサイトゾルへと脱出することが示唆された（図 2）。さらに、ルシフェラーゼ搭載エクソソームをマウスに静脈投与すると、3 時間後の肝組織におけるルシフェラーゼ活性は炭酸アパタイトナノ粒子を用いた修飾により有意に増加した。

3) ガラクトース鎖修飾による肝細胞指向性の向上：

肝実質細胞への指向性を付加するため、ポリ-L-リジン主鎖にガラクトース側鎖を結合させた Plys-LA を用いてエクソソームの修飾を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いてその効果を *in vitro* ならびに *in vivo* において検討した。その結果、初代培養肝細胞に取り込まれたエクソソーム数は、Plys-LA 修飾により増加した。また、マウスに静脈投与を行った検討では、未修飾エクソソームの大部分が F4/80 陽性のクッパー細胞内に観察されたのに対して、Plys-LA 修飾は肝実質細胞に取り込まれるエクソソーム数を有意に増加させた（図 3）。

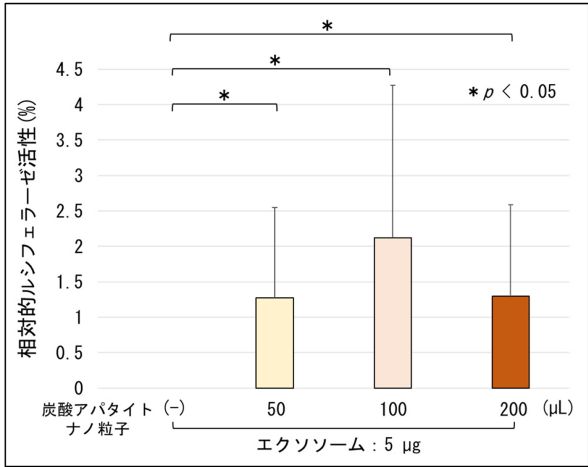


図 1. 炭酸アパタイトナノ粒子によるエクソソームの利用効率の改善
ルシフェラーゼ搭載エクソソームを取り込んだ初代培養肝細胞のルシフェラーゼ活性を、培養上清中に添加したエクソソームの総ルシフェラーゼ活性に対する相対値として示す。



小川はる美
Ogawa Harumi
先端医療科学 研究技術員



柳川享世
Yanagawa Takayo
先端医療科学 助教



住吉秀明
Sumiyoshi Hideaki
先端医療科学 講師



プロジェクトリーダー：稲垣 豊
Inagaki Yutaka



池田麻里子
Ikeda Mariko
先端医療科学 研究補助員



中尾祥絵
Nakao Sachie
先端医療科学 研究補助員



松本勇樹
Matsuki Yuki
大学院先端医科学専攻

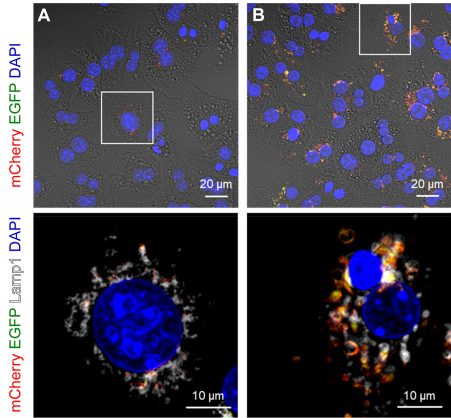


図 2. 炭酸アパタイトナノ粒子によるエクソソームのサイトゾルへの移行
mCherry/EGFP 搭載エクソソームを未修飾 (A) もしくは炭酸アパタイトナノ粒子と混合 (B) した上で、初代肝細胞の培養上清中に添加した。上段の写真中の白枠を拡大して、リソソームマーカーである Lamp1 の免疫蛍光染色とともに下段に示す。

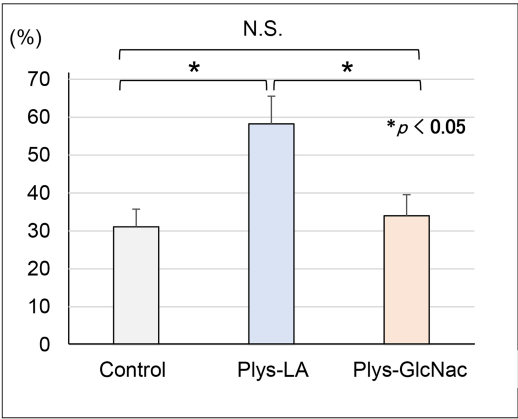


図 3. ガラクトース鎖修飾による肝細胞指向性の向上
蛍光標識したエクソソームを未標識 (Control)、ガラクトース鎖修飾 (Plys-LA)、あるいは N-アセチルグルコサミン修飾 (Plys-GlcNac) を行った上で、マウスに静脈投与した。3 時間後に摘出した肝組織において、全肝実質細胞に対するエクソソームを取り込んだ肝実質細胞の割合を示す。N.S., not significant.

【今後の展望】

エクソソームは、標的細胞に治療分子を送達する天然のキャリアーとしての利用が注目されている。しかしながら、エクソソームの細胞内取り込み効率の低さや、エクソソーム内包物質のサイトゾル放出性の低さによる効果の減弱、さらには標的細胞以外への送達による副作用の懸念など、DDS キャリアーとしての利用には未だ多くの課題が残されている。今回の検討により、エクソソーム表面に修飾を行うことで、利用効率の改善とともに肝細胞への指向性が付加された。これらの所見は、線維肝組織の肝細胞に対して再生促進因子を送達する新たなエクソソーム治療の開発に繋がる可能性を示すものである。

Selected Papers.

- Hideaki Sumiyoshi, Yousuke Okamura, Akira T. Kawaguchi, Tomoko Kubota, Hitoshi Endo, Takayo Yanagawa, Junpei Yasuda, Yuki Matsuki, Sachie Nakao, Yutaka Inagaki: External administration of moon jellyfish collagen solution accelerates physiological wound healing and improves delayed wound closure in diabetic model mice. Regenerative Therapy 18: 223-230, 2021. DOI:10.1016/j.reth.2021.06.008
- Kazuya Anzai, Kota Tsuruya, Kinuyo Ida, Tatehiro Kagawa, Yutaka Inagaki, Akihide Kamiya. Kruppel-like factor 15 induces the development of mature hepatocyte-like cells from hepatoblasts. Sci Rep 11: 18551, 2021. DOI:10.1038/s41598-021-97937-6
- Masatoshi Kakizaki, Yuichiro Yamamoto, Shunya Nakayama, Kazuaki Kameda, Etsuko Nagashima, Masatoshi Ito, Takashi Suyama, Yumi Matsuzaki, Tetsuhiro Chiba, Hideaki Sumiyoshi, Yutaka Inagaki, Ai Kotani: Human hepatocyte-derived extracellular vesicles attenuate the carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. Cell Death Dis 12: 1010, 2021. DOI:10.1038/s41419-021-04204-7
- Yuki Matsuki, Takayo Yanagawa, Hideaki Sumiyoshi, Jumpei Yasuda, Sachie Nakao, Mitsuki Goto, Teiko Shibata-Seki, Toshihiro Akaike, Yutaka Inagaki. Modification of exosomes with carbonate apatite and a glycan polymer improves transduction efficiency and target cell selectivity. Biochem Biophys Res Commun 583: 93-99, 2022. DOI:10.1016/j.bbrc.2021.10.063
- Yukari Shida, Hitoshi Endo, Satoshi Owada, Yutaka Inagaki, Hideaki Sumiyoshi, Akihide Kamiya, Tomoo Eto, Masayuki Tatemichi. Branched-chain amino acids govern the high learning ability phenotype in Tokai high avoider (THA) rats. Sci Rep 11:23104, 2021. DOI:10.1038/s41598-021-02591-7
- Yasuhiro Nakano, Sachie Nakao, Minako Sueoka, Daigo Kasahara, Yuri Tanno, Hideaki Sumiyoshi, Tohru Itoh, Atsushi Miyajima, Katsuto Hozumi, Yutaka Inagaki. Two distinct Notch signals, Delta-like 4/Notch1 and Jagged-1/Notch2, antagonistically regulate chemical hepatocarcinogenesis in mice. Commun Biol 5: 85, 2022. DOI:10.1038/s42003-022-03013-8
- Toshiaki Tanaka, Koji Moriya, Makoto Tsunenaga, Takayo Yanagawa, Hiromi Morita, Takashi Minowa, Yoh-ichi Tagawa, Nobutaka Hanagata, Yutaka Inagaki, Toshiyuki Ikoma. Visualized procollagen Iα1 demonstrates the intracellular processing of propeptides. Life Sci Alliance 5: e202101060, 2022. DOI:10.26508/lsa.202101060