

# 治療効果を高めた細胞外小胞集団 の製造方法及び細胞外小胞集団

高知大学

教育研究部医療学系基礎医学部門  
(附属先端医療学推進センター)

助教 山下 竜幸

2023年9月12日

## 従来技術とその問題点

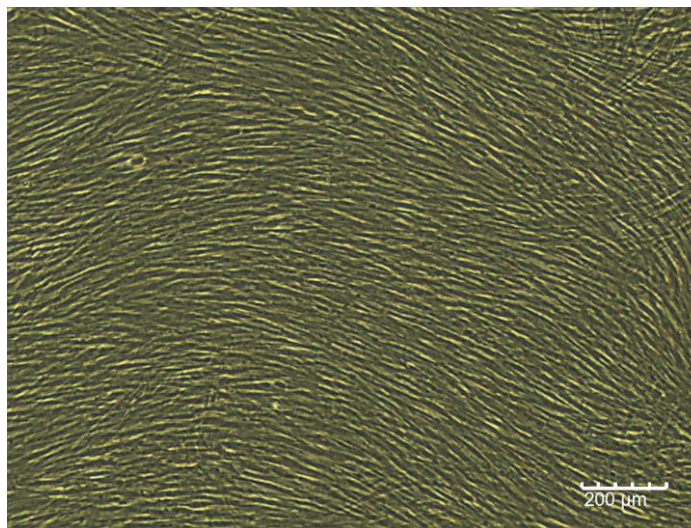
近年骨髄や脂肪、臍帯組織等から得られる間葉系幹細胞(MSC)が医療分野で注目を集めており、特にこれらが分泌する細胞外小胞(EVs: Extracellular vesicles)が様々な疾患の治療に期待されている。しかしながら、MSCの由来や状態の違いで分泌される小胞の性質も大きく異なり、対象となる疾患によってEVsによる治療効果が得られない場合も多い。

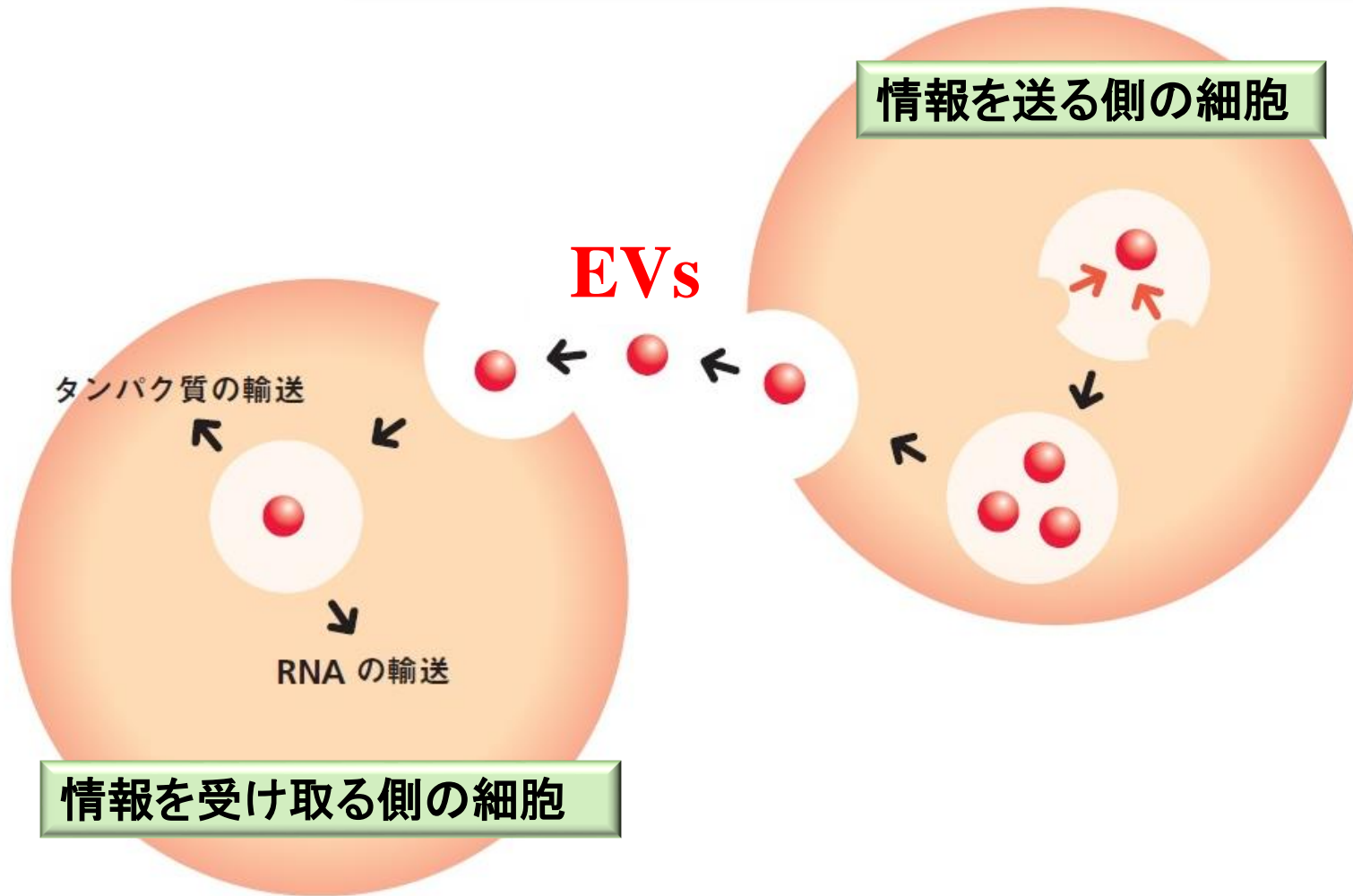
# 新技術の特徴・従来技術との比較

- これまでの研究で申請者はヒト臍帯からMSCを単離培養し、その培養上清から得られるEVsを脳性麻痺モデルマウスに投与したが、その治療効果は認められなかった。今回の新技術として、申請者はMSCを硫酸化糖脂質の一種であるサルファタイドで刺激培養し、得られたEVsを同モデルマウスに投与した。その結果有意な治療効果が認められた(特願2022-066901)。
- サルファタイド刺激培養で得られるEVs: sul(+)EVsは、通常培養で得られるEVs: sul(-)EVsと比較して、サイトカインの一種であるGDF-15(マクロファージ阻害サイトカイン:MIC1としても知られる)の含量が著しく増加していた(特願2022-066901)。
- 競合技術として新潟大のグループがINF- $\gamma$ で刺激培養して得られるEVsの治療応用を報告しており、申請者もこの刺激培養を試したがこの方法でGDF-15のEVsへの濃縮は起こらなかった。

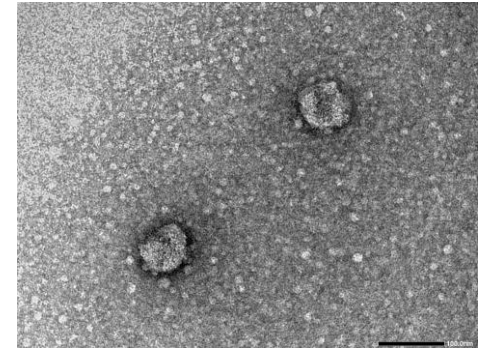
- 成体幹細胞の1つであり、間葉系間質細胞(mesenchymal stromal cell, MSC)とも呼ばれる。
- 接着性の細胞である。
- 特異的マーカー発現パターン(CD73<sup>+</sup>、CD90<sup>+</sup>、CD105<sup>+</sup>、HLA-DR<sup>-</sup>、CD45<sup>-</sup>、CD34<sup>-</sup>)を示す。
- 骨、軟骨、神経などに分化することが出来る。
- 脂肪、骨髄、\*臍帯血、\*臍帯、などに存在する。
- 臓器再生能と免疫制御能を持っており、近年脳梗塞等の中枢神経疾患に対して骨髄や臍帯などに存在するMSCの治療効果が複数報告されている。

臍帯由来MSCの顕微鏡写真

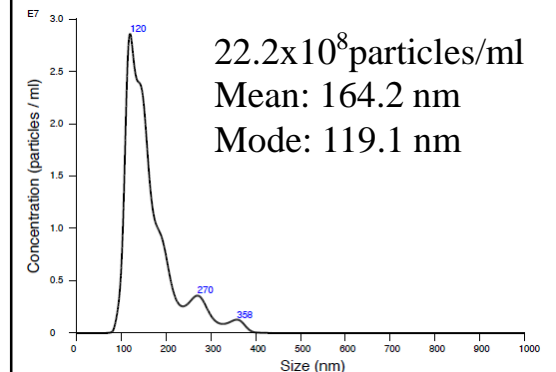




臍帯MSC由来EVsの電子顕微鏡写真



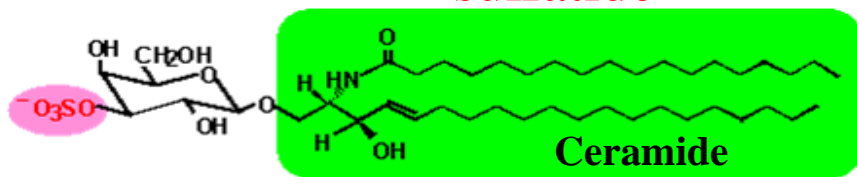
臍帯MSC由来EVsの  
ナノ粒子トラッキング解析  
(Nano sight)



- 細胞から分泌される小胞でタンパク質やRNAを輸送する。
- 細胞培養上清から超遠心(10万×g)により回収できる
- 特異的マーカー: CD9、CD63、CD81など

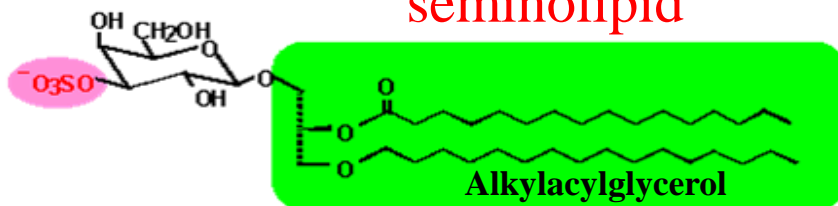
# 硫酸化糖脂質とは

## sulfatide



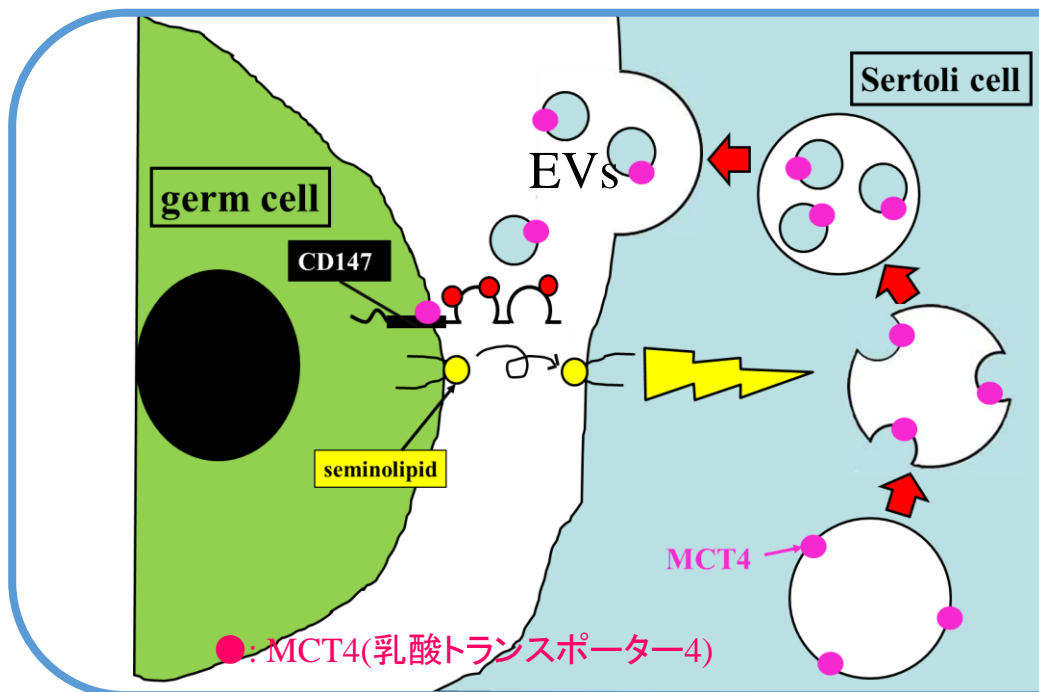
ミエリン, 腎臓, 血漿, 血小板等に存在

## seminolipid



精巣のみに存在

- 哺乳類には2種類存在し、両者ともセレブロシドスルホトランスフェラーゼ (CST) によって合成される。
- **CST 欠損マウス**は**神経異常**をきたし雄の場合**精子形成不全**となる。



## 精子形成におけるseminolipidの役割

Sertoli cellはGerm cell(精子形成細胞)由来のseminolipid刺激を受けると**MCT4含有EVs**を放出する。

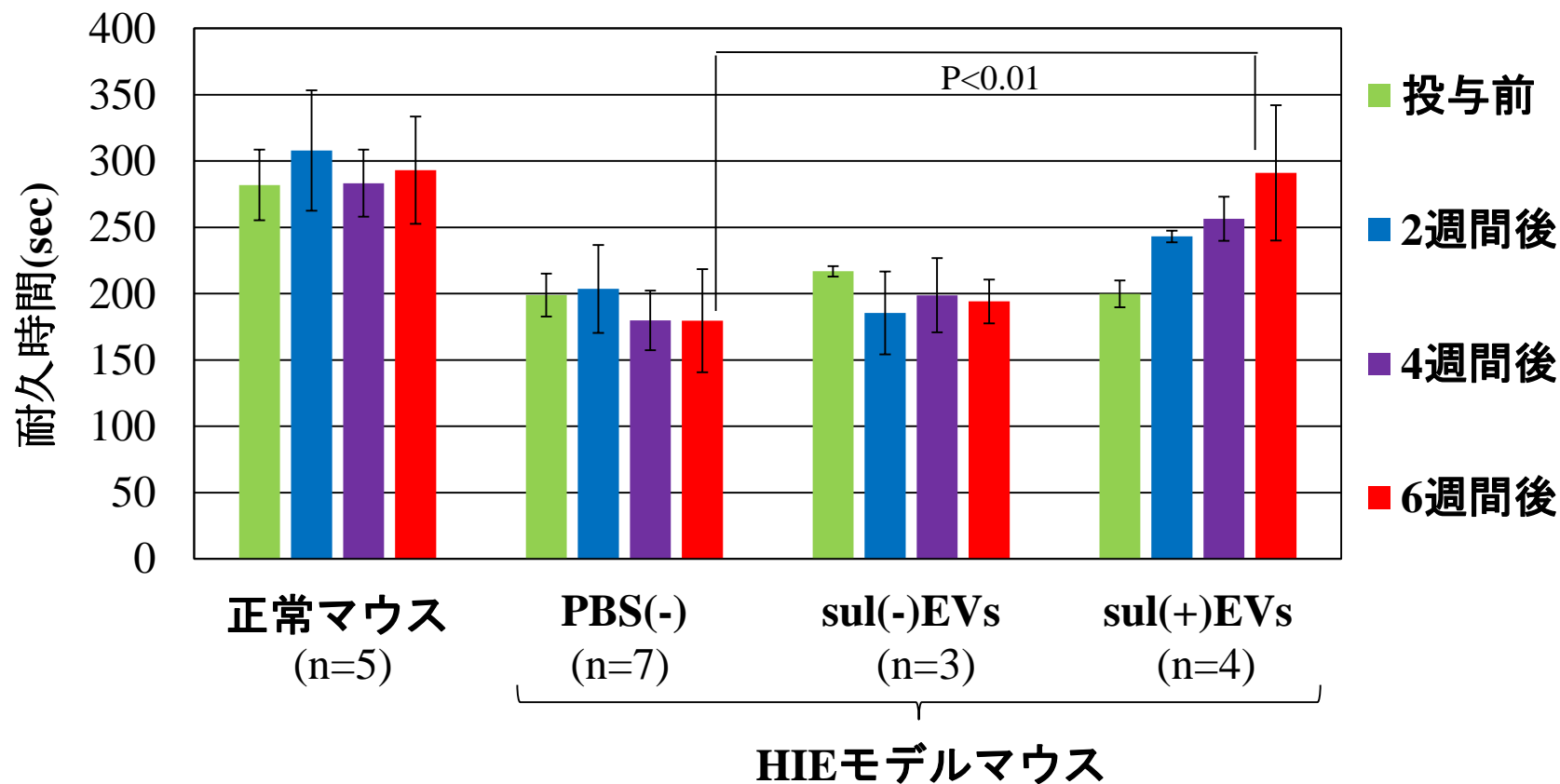
↓  
MCT4を受け取ったgerm cellはエネルギー源として乳酸を利用できるようになる。

**硫酸化糖脂質はEVsの機能を高める**



# サルファタイドで刺激した臍帯MSC由来EVsのHIEモデル に対する運動機能回復効果

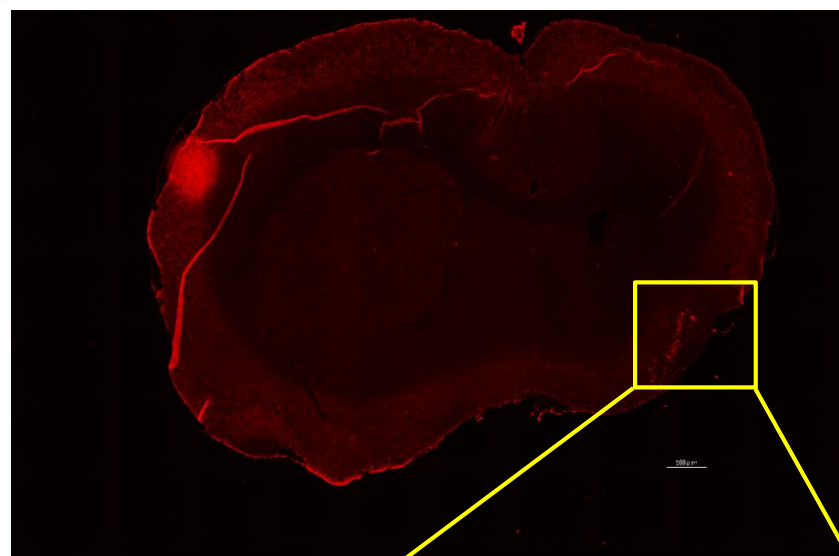
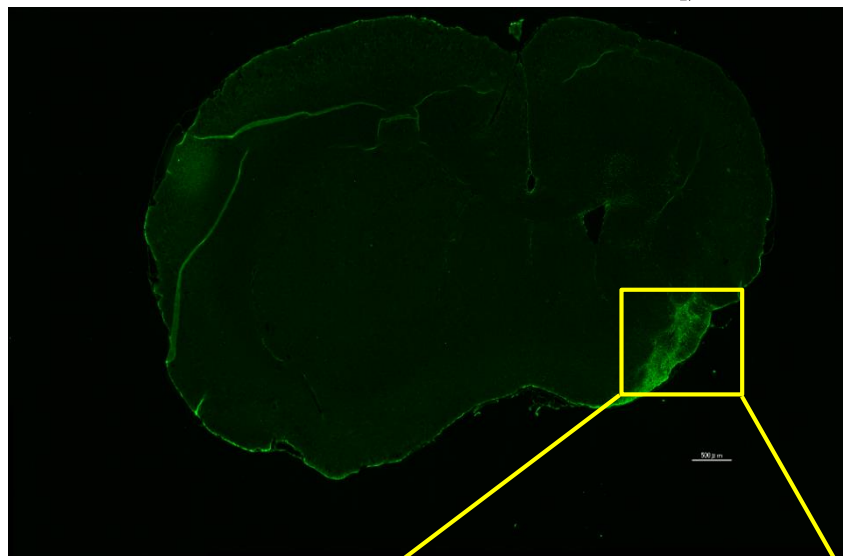
## HIEモデルマウスのロタロッドテスト



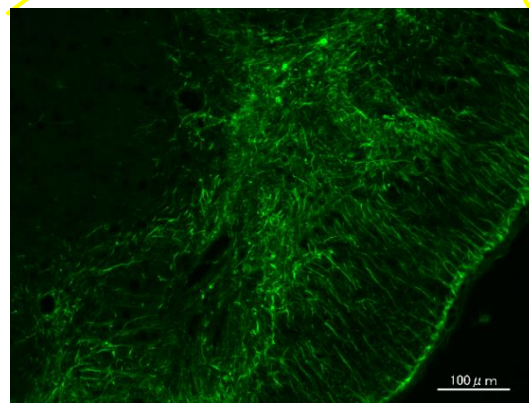
sul(+)-EVsを鼻腔内投与したモデルマウスは6週間後に正常マウス  
と同等まで運動機能が回復した

# 脳性麻痺モデルマウスに鼻腔内投与したEVsの局在

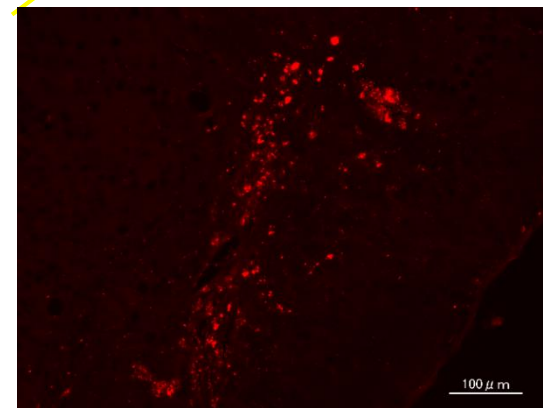
## 側脳室冠状面



GFAP  
損傷部位(グリア瘢痕)  
マーカー



EVs



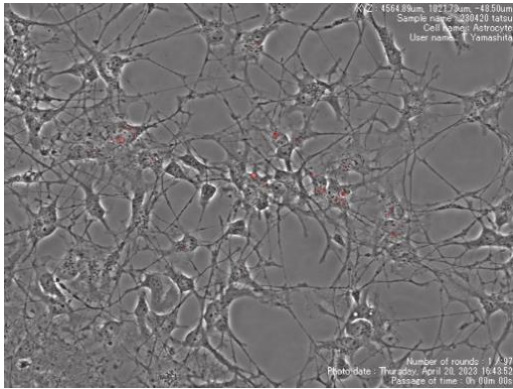
サルファタイドで刺激培養したEVsは脳性麻痺モデルマウスの脳損傷部位に集積する。



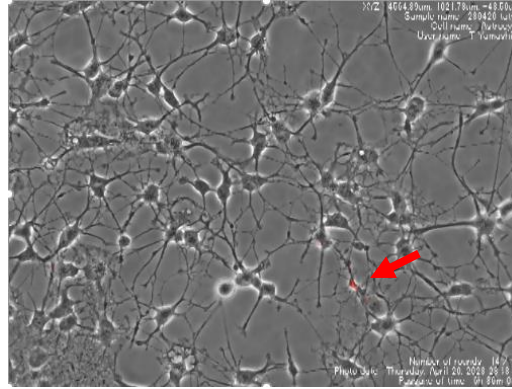
# PKH26ラベルしたEVsの取り込み試験

～マウス脳由来初代培養細胞(mix)に対して～

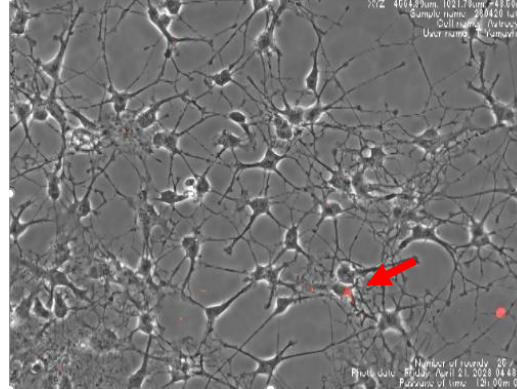
0 time



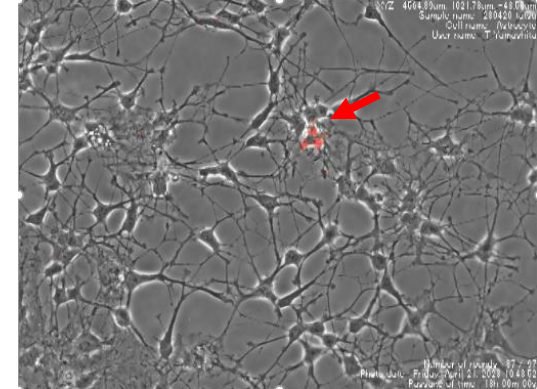
3 hr



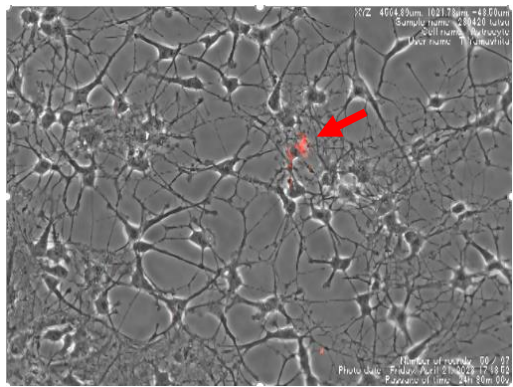
6 hr



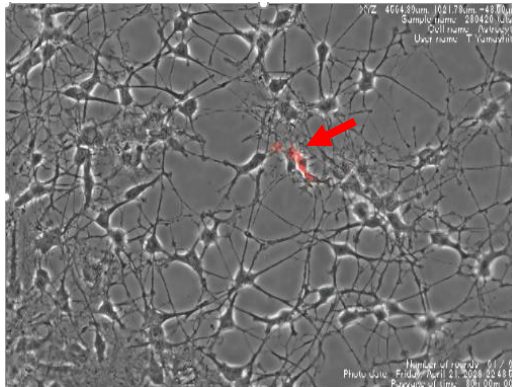
9 hr



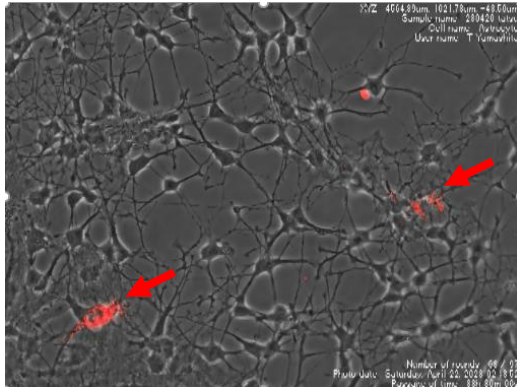
12 hr



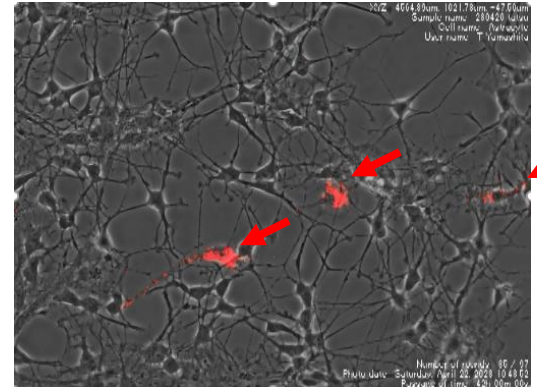
15 hr



18 hr



21 hr

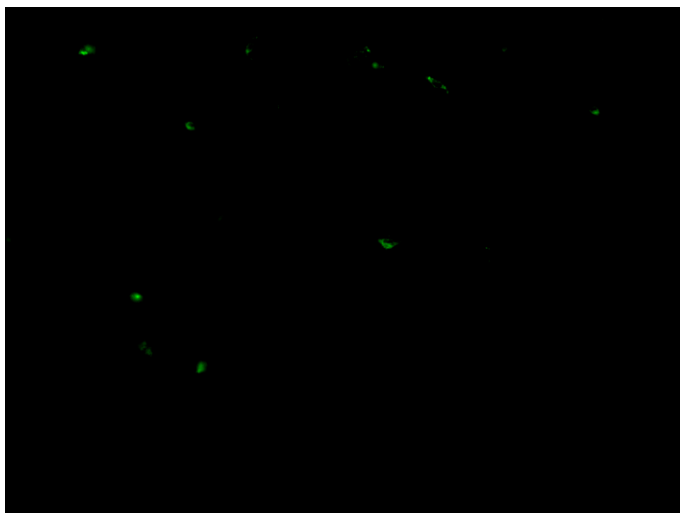


赤: PKH26 laveled EVs

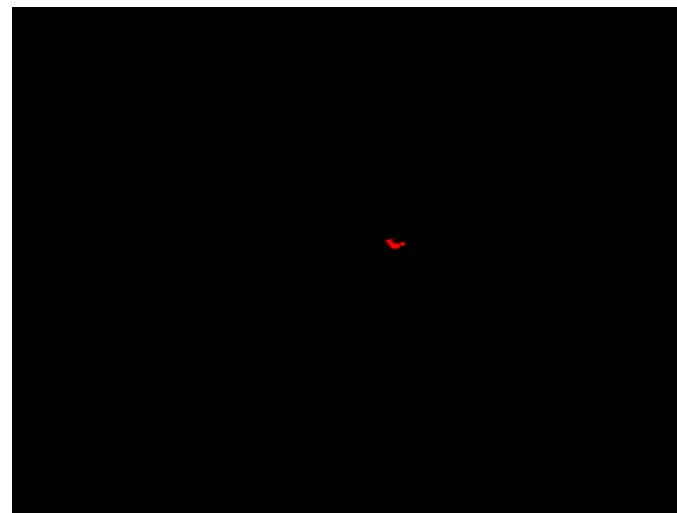
EVsは特定の細胞のみに取り込まれた

## PKH26ラベルしたEVsの取り込み試験2

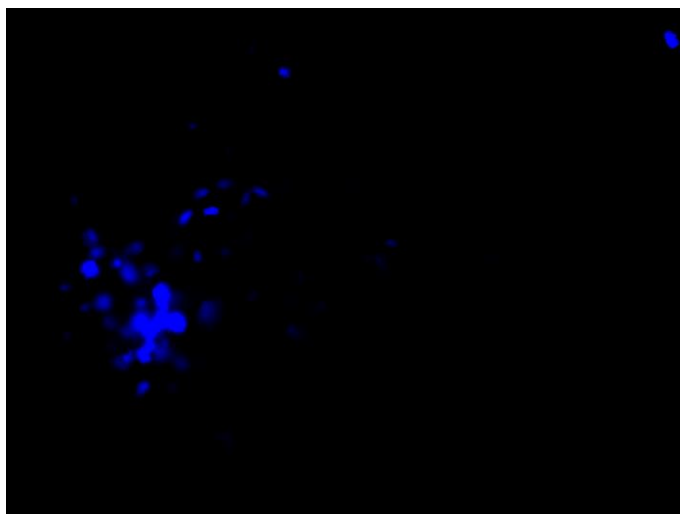
～マウス脳由来初代培養細胞(mix)に対して～



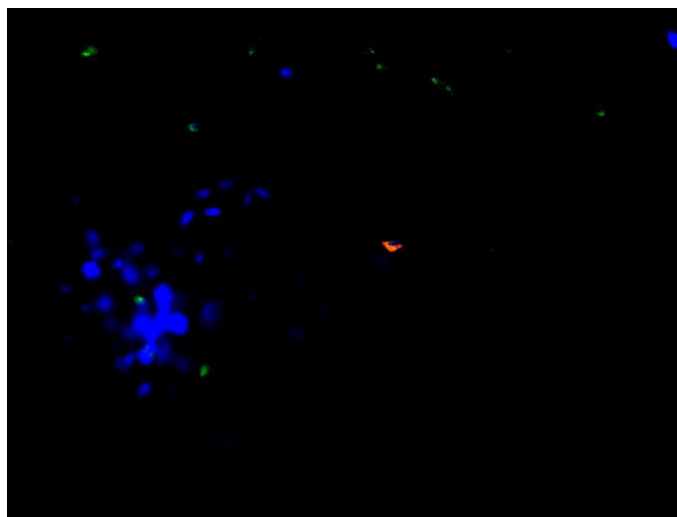
CD11b  
(ミクログリアマーカー)



PKH26 laveled EVs



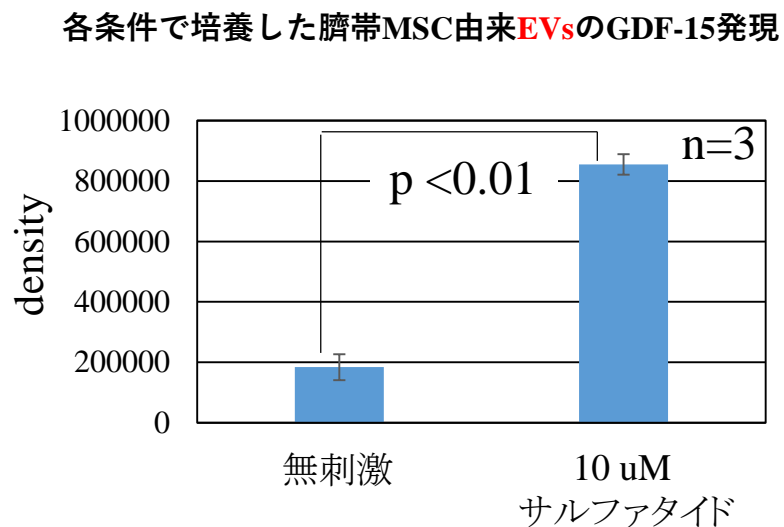
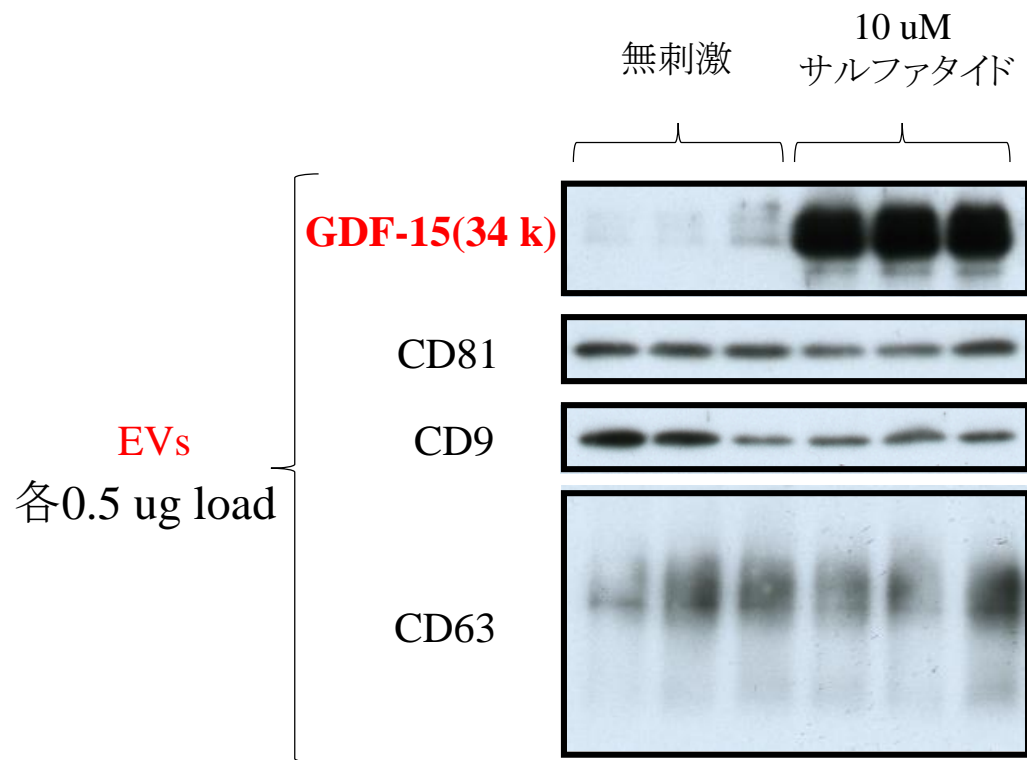
DAPI



marge

EVsは特定のミクログリアに取り込まれる。

# EVsに含まれるタンパクの発現



## GDF-15(Growth Differentiation Factor-15)

TGF- $\beta$  familyのサイトカインで神経新生やシナプスの活性化、神経保護効果などが報告されている。

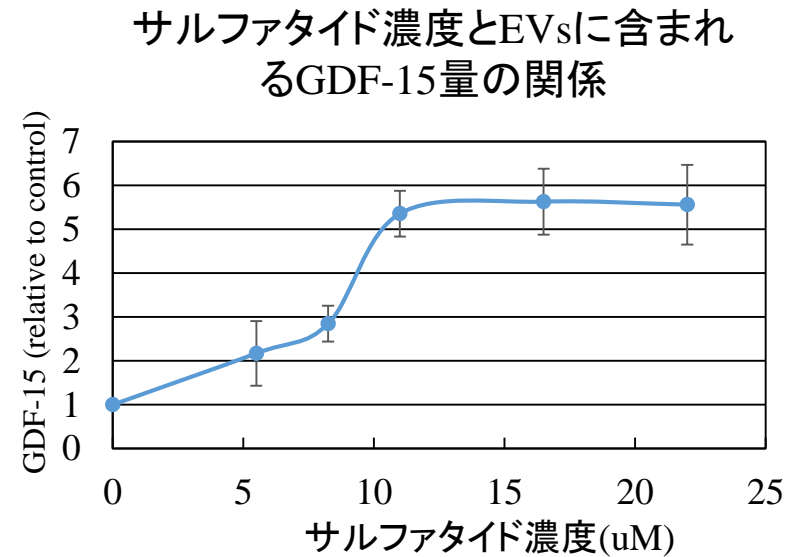
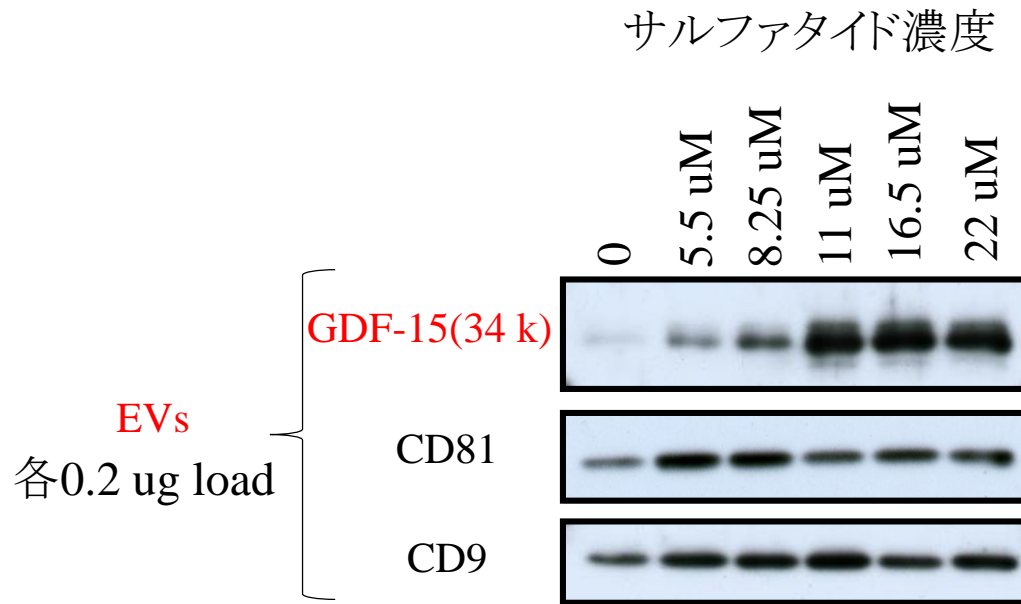
STEM CELLS AND DEVELOPMENT, Number 20, 2015, Volume 24

The Journal of Neuroscience, December 1, 2000, 20(23):8597–8603

MIC-1(Macrophage Inhibitory Cytokine)としても知られている。Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94 (1997)

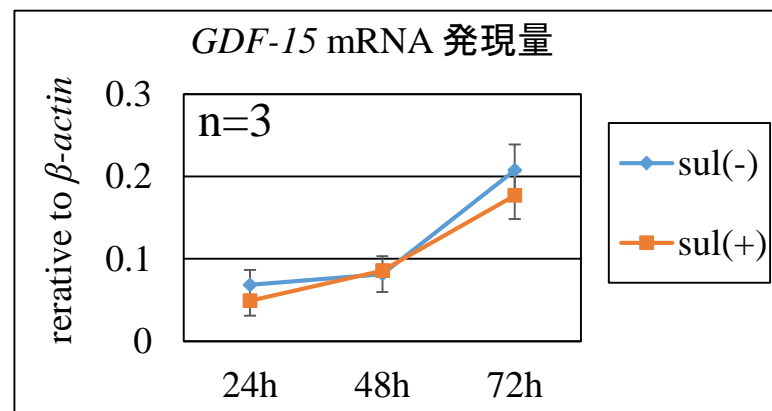
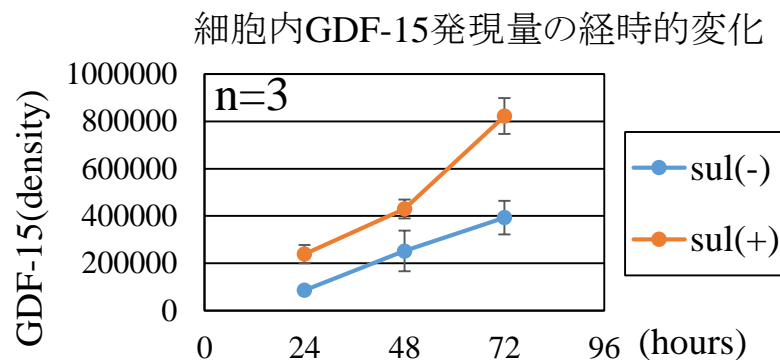
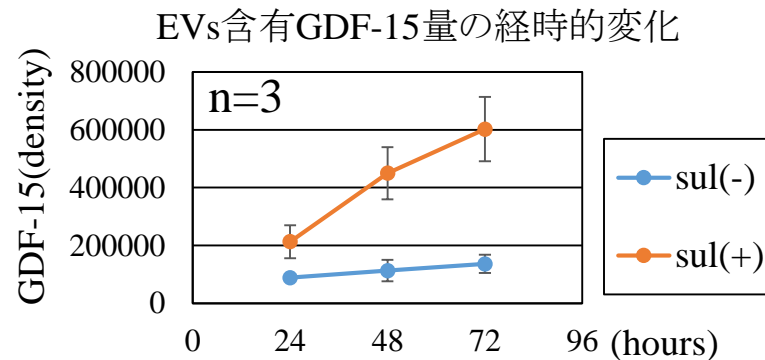
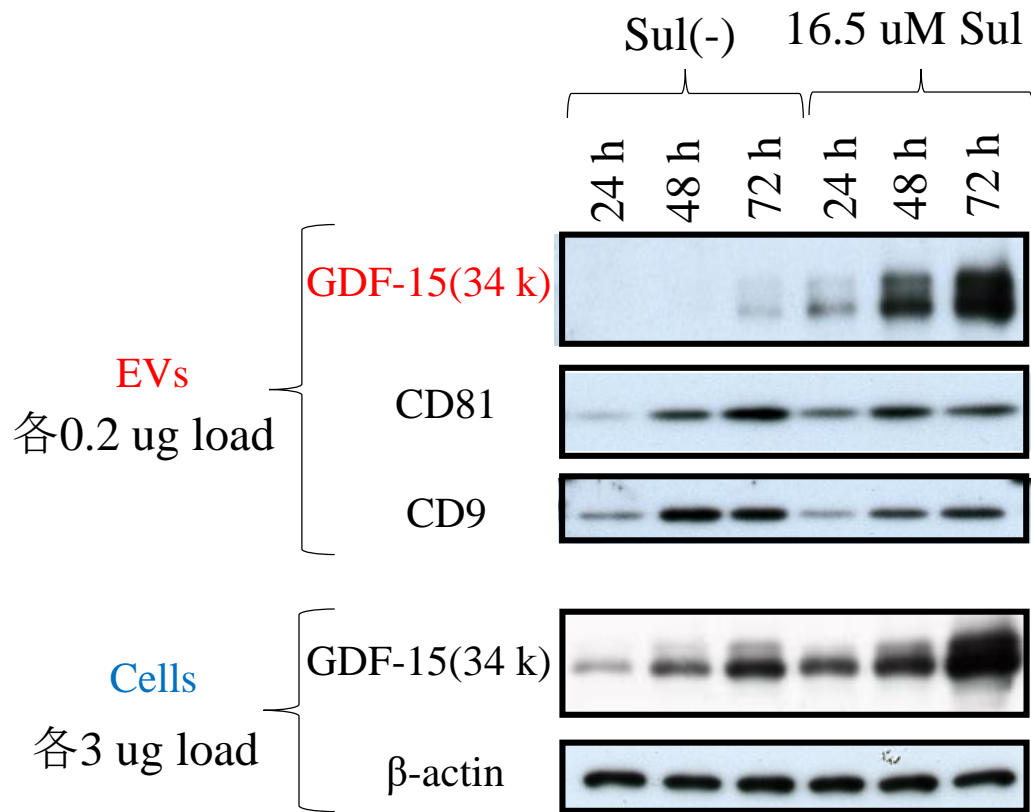
サルファタイドによりEVsのGDF15含量が著しく増加する。

## EVs におけるGDF15の発現とサルファタイド濃度の関係



EVs におけるGDF15の発現はサルファタイド濃度に依存して増加する。

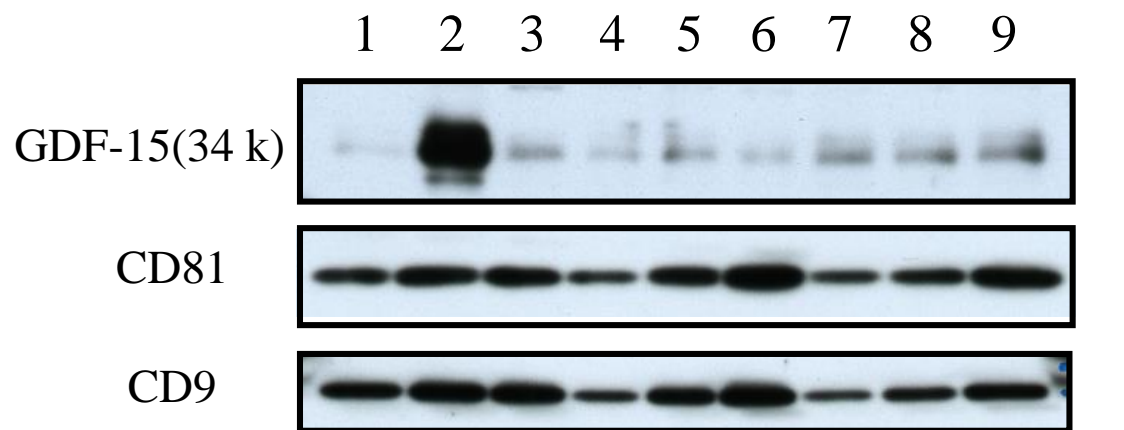
# サルファタイド刺激によるEVs GDF15含量の経時的変化



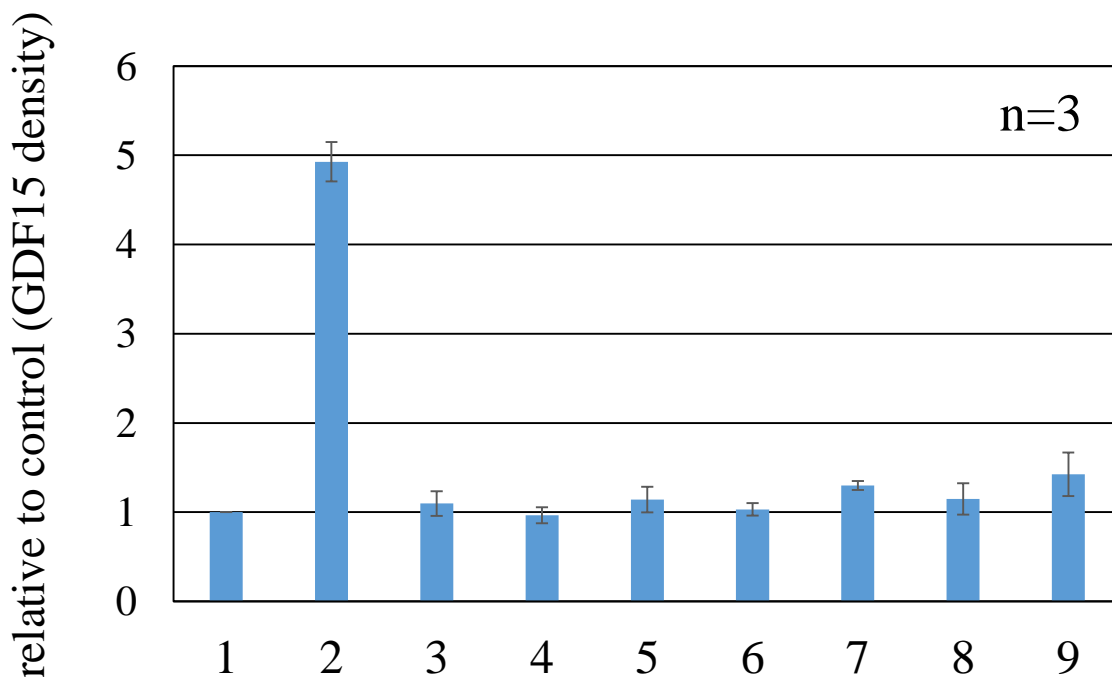
EVs におけるGDF15含量はサルファタイド添加後、経時的に増加する。



# 他の各硫酸化合物によるEVs GDF-15含量に対する効果。



- 1, コントロール
- 2, **サルファタイド**
- 3, コレステロール硫酸
- 4, ヘパリン
- 5, ヘパラン硫酸
- 6, コンドロイチン硫酸A
- 7, コンドロイチン硫酸B
- 8, コンドロイチン硫酸C
- 9, **GM1**



15 ug/mlの各化合物を含むEVs Free培地に交換72 hr後EVs回収

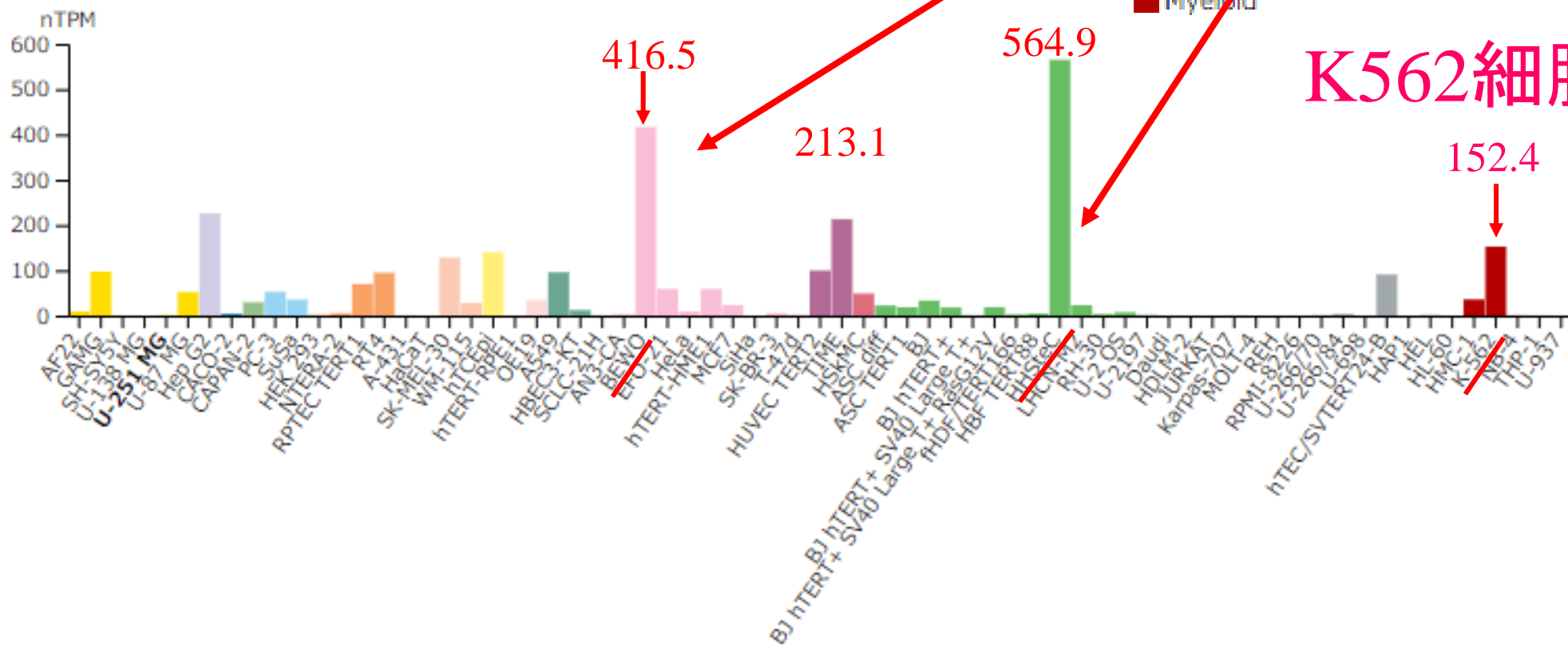
他の各硫酸化合物を添加してもEVs GDF-15の発現に変化はない。



## GDF15

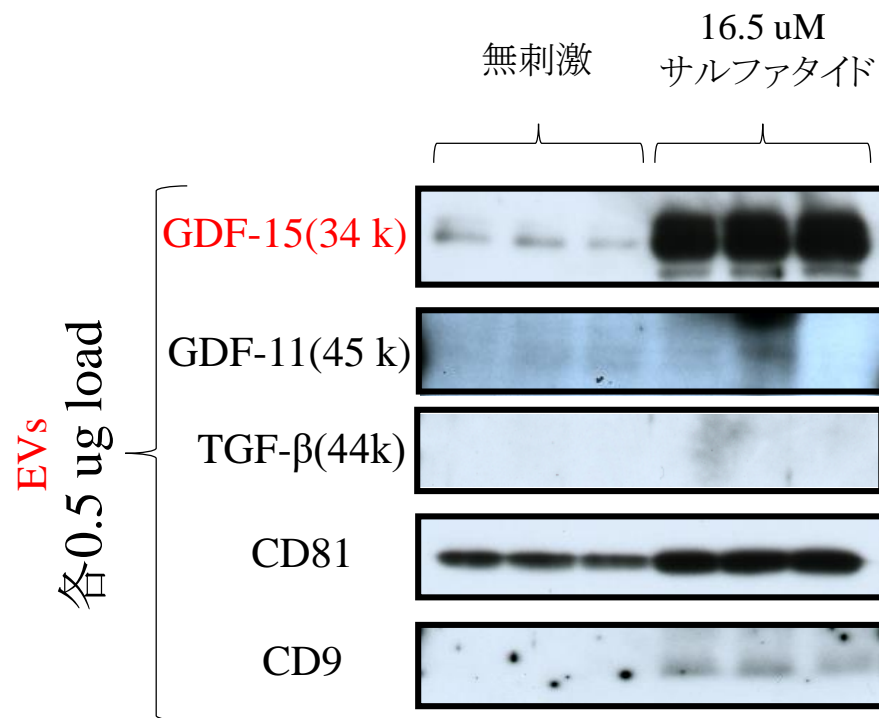
HUMAN PROTEIN ATLAS INFORMATION <sup>i</sup>	
Cell line expression cluster <sup>i</sup>	BEWO - Transcription regulation (mainly)
Cell line specificity <sup>i</sup>	Cell line enhanced (BEWO, Hep G2, HHStcC, TIME)
Cell line distribution <sup>i</sup>	Detected in many
Protein evidence <sup>i</sup>	Evidence at protein level
Extracellular location <sup>i</sup>	Protein predicted to be secreted

- Brain
- Liver & Gallbladder
- Gastrointestinal tract
- Pancreas
- Male reproductive system
- Kidney & Urinary bladder
- Skin
- Eye
- Proximal digestive tract
- Lung
- Female reproductive system
- Endothelial
- Muscle
- Mesenchymal
- Lymphoid
- Myeloid



K562細胞

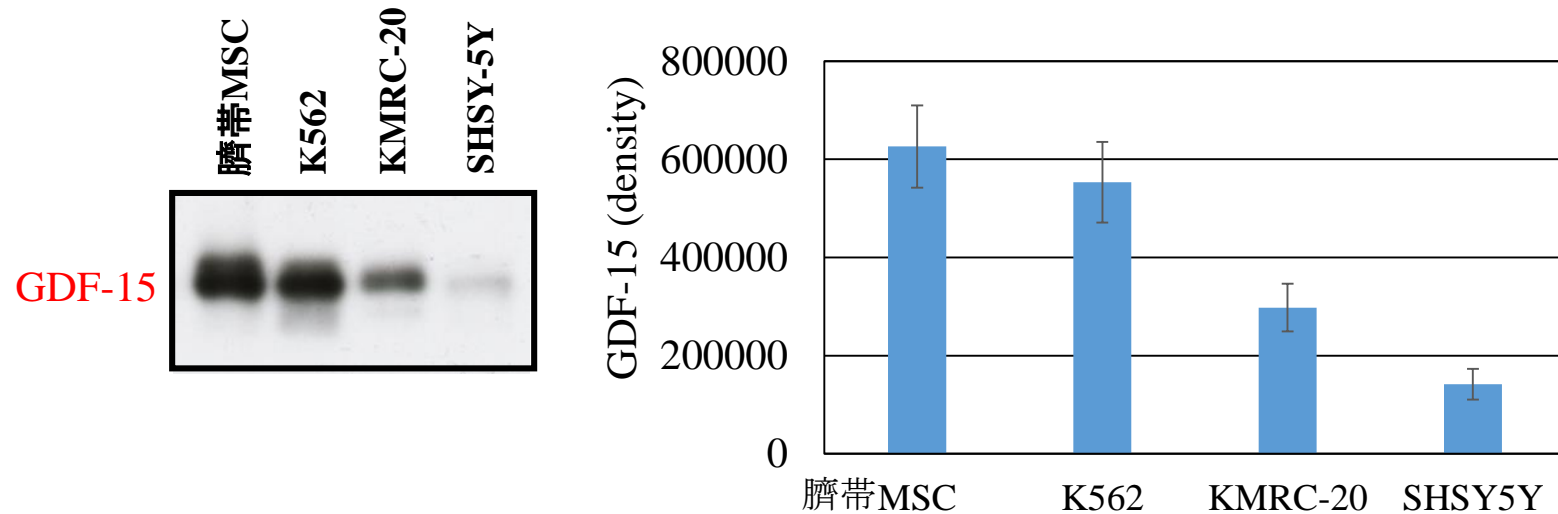
## K562由来EVs含有GDF-15に対するサルファタイドの効果



サルファタイドはほかの細胞株でもGDF15のEVs濃縮効果を示した。

## 各細胞が分泌するEVsにおけるGDF-15含量の比較

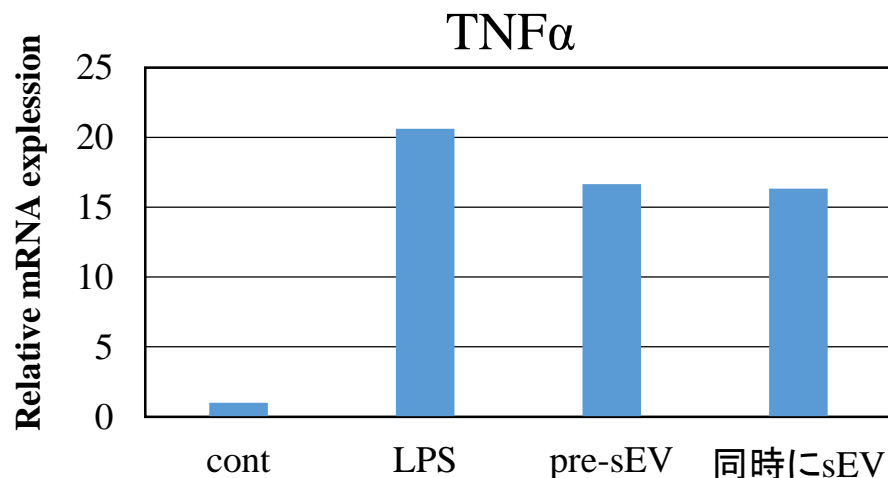
- 各細胞を100%コンフルまで培養。
- 16.5 uM サルファタイド含有培地に交換して3日間培養後の培養上清からEVsを回収した。
- EVsタンパク量をmicroBCA法により定量したのち、0.2 ugをwestern blotに供した。



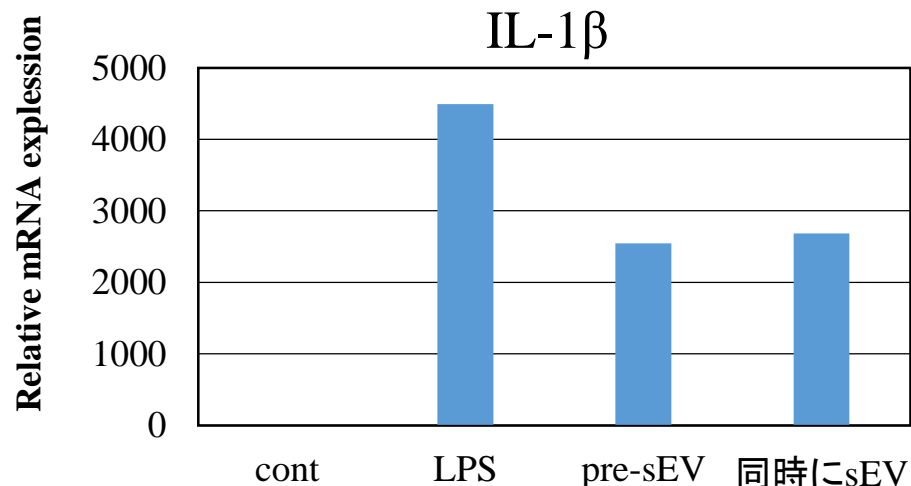
**臍帯MSC由来EVsは他の細胞株に比べGDF-15含有量が多い**

# Sul(+) EVsのミクログリア初代培養細胞に対する 活性化抑制効果の検証

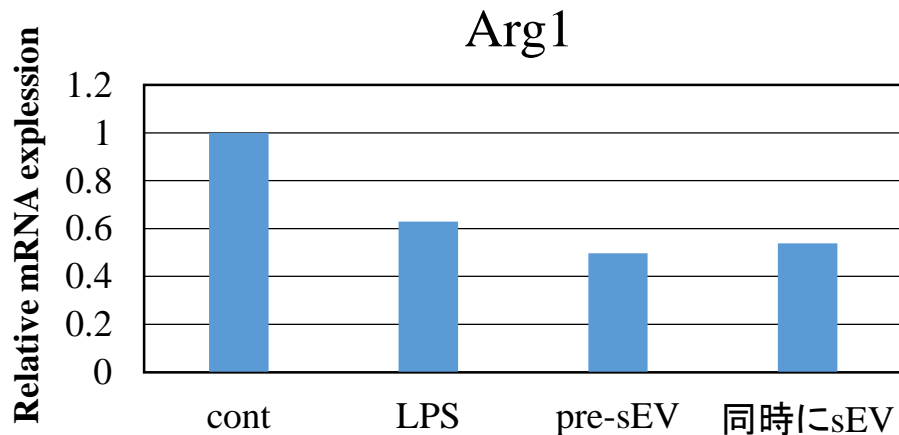
炎症性ミクログリアマーカー



炎症性ミクログリアマーカー



抗炎症性ミクログリアマーカー



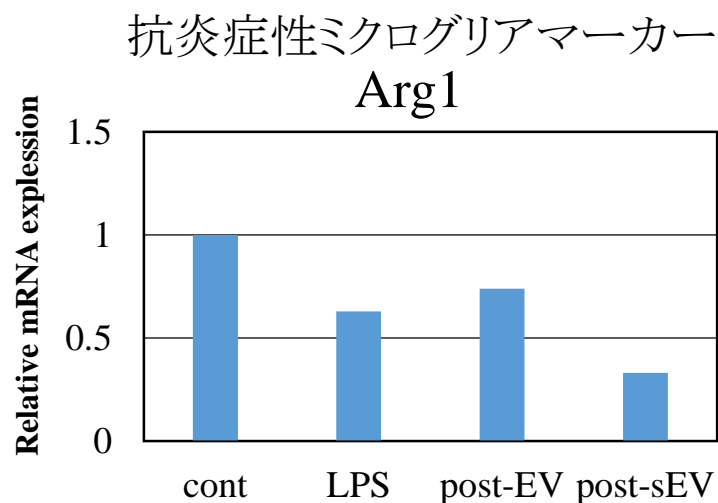
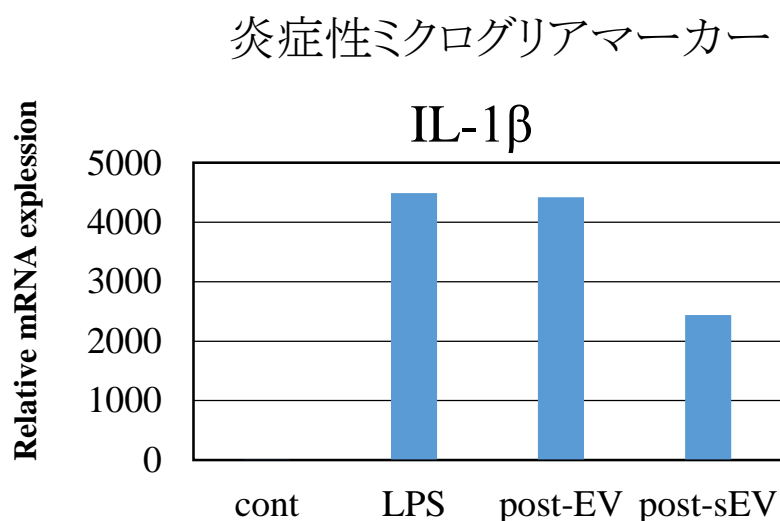
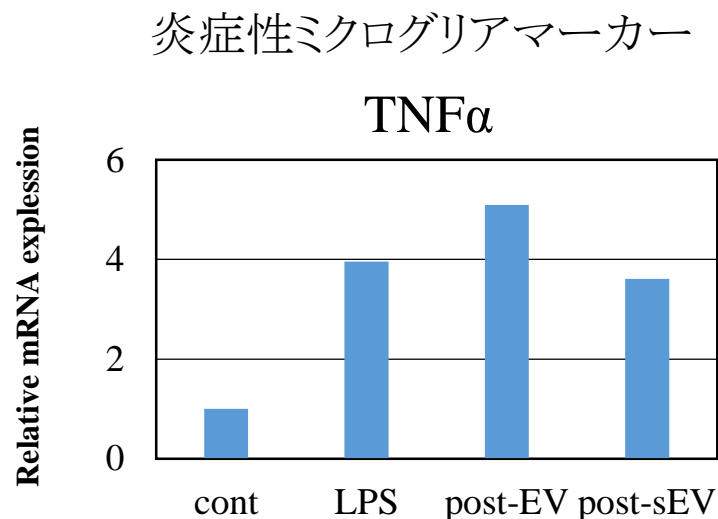
LPS: 10 ng/ml LPS

Pre-sEV: LPS添加12 hr前にsul(+)-EVs添加

LPSを添加して24hr後にmRNA抽出

Sul(+)  
EVsをLPS刺激12時間前、またはLPS刺激と同時に加えると、炎症性ミクログリアマーカーの一つであるIL-1 $\beta$ の発現が抑えられた。

# 各EVsのミクログリア初代培養細胞に対する活性化抑制効果の検証



LPS: 10 ng/ml LPS  
Pro-EV: LPS添加12 hr後にsul(-)EVs添加  
Pro-sEV: LPS添加12 hr後にsul(+)-EVs添加

EVsを添加して12hr後にmRNA抽出

Sul(+)-EVsをLPS刺激12時間後に加えても、炎症性ミクログリアマーカーの一つであるIL-1 $\beta$ の発現が抑えられた。

## 想定される用途

- ミクログリアによる炎症作用を主な原因とする神経疾患(脳性麻痺等)に対する治療
- マクロファージによる炎症作用を主な原因とする疾患(肝硬変等)に対する治療
- GDF-15は肥満抑制サイトカインとしても知られている(Nature 619,143–150,2023)。本技術により精製したEVsは肥満抑制薬としても活用されうる。



## 実用化に向けた課題

- 現在、臨床応用に向けてMSCの培養はGMPグレードの培地で培養している。しかしながら、今回刺激剤として使用しているサルファタイドは動物由来のものである。アニマルフリーの人工的に合成したサルファタイドの開発が望ましい。
- GDF-15のEVsへの濃縮メカニズムは未開のままである。
- 実用化に向けて、EVsのより安価で簡便な精製技術の開発が望まれる。

## 企業への期待

- 未解決のサイトカインのEVs濃縮メカニズムの解明については、ゲノム編集技術によるEVs合成経路に関連するタンパクのノックアウトにより克服できると考えている。
- 臨床応用に向けて製薬会社との共同開発を希望。
- また、アニマルフリーでのEVs精製に向けて、有機合成技術、酵素科学的合成技術を有する企業との共同開発を希望。

## 本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 細胞外小胞集団の製造方法及び細胞外小胞集団
- 出願番号 : 特願2022-066901  
PCT/JP2023/015157
- 出願人 : 高知大学
- 発明者 : 山下竜幸、本家孝一

# お問い合わせ先

高知大学 次世代地域創造センター  
地域イノベーション部門

知財担当 恒川 典之

山下 奉海

TEL 088-844-8418

FAX 088-844-8556

e-mail [kt05@kochi-u.ac.jp](mailto:kt05@kochi-u.ac.jp)