

論文内容要旨

The therapeutic capacity of bone marrow MSC-derived extracellular vesicles in Achilles tendon healing is passage-dependent and indicated by specific glycans

(骨髄間葉系幹細胞由来細胞外小胞のアキレス腱修復効果は、細胞継代数に依存し、細胞外小胞の表面に発現する糖鎖に関連する)

FEBS Letters, 2022, in press.

主指導教員：安達 伸生教授

(医系科学研究科 整形外科学)

副指導教員：大段 秀樹教授

(医系科学研究科 消化器・移植外科学)

副指導教員：亀井 直輔准教授

(医系科学研究科 整形外科学)

林 悠太

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

腱損傷は運動器外傷の中でも頻度の多い疾患であるが、治療法は10年以上大きな進歩がなく、治療の長期化と高い合併症発症率が医学的にも社会的にも問題となっている。そのため質の高い腱への修復を促す革新的な治療法が望まれている。これまでに当教室では、間葉系幹細胞 (MSC: Mesenchymal stem cell) および MSC 由来の分泌因子の一つである細胞外小胞 (EVs: extracellular vesicles) に着目し、MSC や MSC 由来 EVs (MSC-EVs) の投与による運動器組織修復促進効果を報告してきた。近年、MSC-EVs の治療効果を示す論文は一気に増加しているが、単離法や作用機序、動態など基盤となる知見は未だ不明な点が多い。その中で MSC-EVs の治療効果は、分泌源となる細胞の種類、培養条件、回収方法によっても変化すると考えられており、治療効果の高い MSC-EVs (いわゆる質) の単離や評価が臨床応用に向けた課題となるであろう。近年、幹細胞表面に発現している糖鎖は、幹細胞の老化や分化能のマーカーの一つとして報告され、さらに EVs の機能に関与していることが示されている。しかし、治療効果の高い EVs (質) と糖鎖の関係については十分に理解されていない。

本研究はアキレス腱損傷モデルマウスを用いて、継代数の異なる MSC から回収した MSC-EVs のアキレス腱修復効果の違いと MSC-EVs 表面の糖鎖プロファイルを明らかにすることを目的とした。

① 継代培養による MSC と MSC-EVs の性質

継代数 5 と 12 のヒト骨髄 MSC (P5 MSC, P12 MSC、3 ドナー) の細胞老化の状態を評価した。P12 MSC は、P5 MSC と比較し有意に増殖能が低下しており、SA- β Gal 陽性細胞の割合や老化マーカー遺伝子の発現が有意に増加していたことから、細胞老化が誘導されていることが示された。よって、P12 MSC 由来 EVs は老化細胞から分泌された EVs と定義した。P5 および P12 MSC より分泌した P5 MSC-EVs (P5 EVs) および P12 MSC-EVs (P12 EVs) の粒子数、粒子径は P5 EVs と P12 EVs で有意な差がなかった。

② アキレス腱修復に関する MSC-EVs の治療効果

1) 培養腱線維芽細胞を用いた解析

P5 EVs および P12 EVs のアキレス腱修復促進効果を検証するため、P5 EVs および P12 EVs を培養腱線維芽細胞に添加した際の取り込まれ率、細胞増殖能と遊走能を評価した。その結果、腱線維芽細胞への EVs 取り込み効率は P5 EVs, P12 EVs の間に差がなかったが、P5 EVs を添加した腱線維芽細胞では増殖能および遊走能が P12 EVs に比べて有意に増加した。

2) アキレス腱損傷モデルマウスを用いた解析

アキレス腱完全切離によるアキレス腱損傷モデルマウスを用いた評価を行った。アキレス腱切離後翌日と1週後に切離部にそれぞれ P5 EVs, P12 EVs と対象群として PBS を注射した。切離後1週の修復組織内の線維量の違いをマッソントリクローム染色による組織学的評価、さらに切離後4週の修復組織を組織修復スコアリングシステムにより評価した。また、切離後4週時点

の修復組織内のコラーゲン線維径を透過型電子顕微鏡画像により評価した。その結果、切離後1週では修復組織内のコラーゲン線維量がP5 EVs 投与群で有意に増加していることが明らかとなり、さらに4週では有意に組織修復スコアが高かった。一方でP12 EVs 群は修復組織内の異所性軟骨化や修復組織周辺との癒着を起こす頻度が高かった。電子顕微鏡による解析では、修復組織内のコラーゲン線維径が対照群およびP12 EVs と比較しP5 EVs で有意に太いコラーゲン線維の形成が促進されていた。以上よりP5 MSC-EVs は、老化したP12 MSC-EVs と比較して異所性軟骨化や癒着を抑えた良好なアキレス腱修復を促すことが明らかになった。

③ P5 およびP12 MSC と EVs の糖鎖プロファイリング

EVs の質を評価するためにレクチンアレイを用いて糖鎖プロファイリングを行った。フコース特異的レクチンであるTJS-IIは、P12 EV と比較してP5 EV 表面に有意に高発現していた。つまり、糖鎖を指標としたMSC-EVs の質を評価できる可能性が示唆された。

本研究では、治療効果の高い（質の高い）MSC-EVs はEVs 分泌細胞の継代数に依存しており、その指標としてEVs 表面の糖鎖が利用できることを提唱した。MSC-EVs の実用化に向けてEVs 表面の糖鎖を利用したEVs の質の評価法やより質の高いEVs のみを単離する技術などの開発が期待される。