

奨励金No.1592

認知機能に有効な miRNA を内包する間葉系幹細胞由来 エクソソームの開発

中野 正子

札幌医科大学医学部解剖学第二講座 講師

Exploring the culture method of mesenchymal stem cells to produce exosomes encapsulating cognitive effective miRNAs

Masako Nakano

Sapporo Medical University, School of Medicine, Department of Anatomy, Lecture



間葉系幹細胞（MSC）の 3 次元培養として、多孔性担体 A と不織布 B を用いた検討では、不織布 B の方でより多くの exosome が得られた。次に、無血清培地 X と Y の比較検討では、無血清培地 Y において、認知機能に有効な miRNA を多く含有する exosome が得られた。不織布 B と無血清培地 Y の組み合わせで MSC を培養し、培養液から抽出した exosome をアルツハイマー型認知症モデルマウスに点鼻投与したところ、認知機能の改善が得られた。以上から上記組み合わせが 3 次元培養として適切であると考えられた。

We cultured mesenchymal stem cells (MSCs) in 3D environment, using the porous carrier A or the non-woven scaffold B. After the culture, the number of exosomes extracted from the latter culture is higher than that of the former culture. Then, we cultured MSCs in the serum free medium X or Y on the non-woven scaffold B. After the culture, the expressions of cognitive effective miRNAs contained in exosomes were higher in the latter culture than the former culture. Then, we cultured MSCs on the non-woven scaffold B using the serum medium Y and extracted exosomes from the conditioned medium. After the extraction, we injected the exosomes intranasally into Alzheimer's disease mouse model. The cognitive function was significantly improved by the exosome injection.

1. 研究内容

1.1 目的

アルツハイマー型認知症（Alzheimer's disease: AD）の原因は、アミロイド β ($A\beta$) とタウの蓄積と言われている。しかし $A\beta$ ・タウ蓄積など AD 病理を有する症例のうち、約 20% で生前の認知機能が正常であることが知られている。中野らは、札幌医科大学に献体された症例を対象に、死後脳 AD 病理と生前の認知機能について研究を行ってきた（札幌医科大学一般倫理委員会承認研究：26-2-51）。その結果、AD 病理があるにも関わらず生前認知機能が正常であった例が同様に存在し、その

ような症例では海馬の let-7a・miRNA(miR)-26a が増加していることを見出した。

一方、間葉系幹細胞（MSC）由来 exosome は、let-7a・miR-26a を含んでいることが知られている。申請者は MSC の培養法を工夫し、三次元培養を行うことによって、MSC 由来 exosome に含まれる let-7a・miR-26a の発現が増加することを見出した。

我々は将来臨床応用を目指しており、三次元で MSC を大量培養し、MSC 由来 exosome をアルツハイマー型認知症患者へ点鼻投与することを計画している。三次元培養の方法として、多孔性担体

Aや不織布Bを用いて、let-7a・miR-26aの発現が高いexosomeが多く分泌される培養方法を見出すことを目的とする。

1.2 多孔性担体Aと不織布Bを用いた検討

1.2.1 方法

MSC（脂肪由来幹細胞、ロンザ社）を、多孔性担体Aおよび不織布Bを用いて3次元培養を行った。多孔性担体Aにおいては、150 mlのボトルに多孔性担体AとMSCを混合させ、攪拌装置で定期的に攪拌した。培地は無血清培地X（50 ml）を用いた。不織布Bにおいては、キャップ付きフラスコ（底面115 cm²）を用いて、フラスコの底に不織布Bを敷いたのちMSCを播種し、最後にキャップを装着して培養した。培地は無血清培地X（22 ml）を用いた。また多孔性担体A・不織布Bのコントロールとして、2次元培養も行った。培養3日後に、MSCと培養液を回収した。MSCに関しては、stemness marker（OCT4, SOX2, NANOG）の遺伝子発現を評価した。培養液に関しては、exosomeを回収し、exosome数をNanosightで評価した。またexosomeに含まれるlet-7a・miR-26aの発現をPCRで評価した。

1.2.2 結果

OCT4に関しては、多孔性担体Aおよび不織布Bともに、2次元培養に比べて発現は増加していた（図1）。Exosome数に関しては、多孔性担体Aおよび不織布Bともに、2次元培養に比べて低下していたが、多孔性担体A・不織布Bの比較では不織布Bの方が多かった（図2）。Exosomeに含まれるlet-7a・miR-26aに関しては、2次元培養・多孔性担体A・不織布Bにおいて、ほぼ同程度の発現であり、明らかな変化を認めなかった（図なし）。

上記結果より、多孔性担体Aより不織布Bにおいてexosomeの分泌量が多かった。また不織布Bを用いた培養は、攪拌装置も必要でないため、培養法が簡易であった。そのため、不織布Bに培養法を統一し、以下の実験を行った。

1.3 培地Xと培地Yを用いた検討

1.3.1 方法

MSC（脂肪由来幹細胞、ロンザ社）を、不織布Bを用いて3次元培養を行い、コントロールとして2次元培養を行った。培地は無血清培地XおよびYを用いて比較検討を行った。培養3日後に、MSCと培養液を回収した。MSCに関しては、

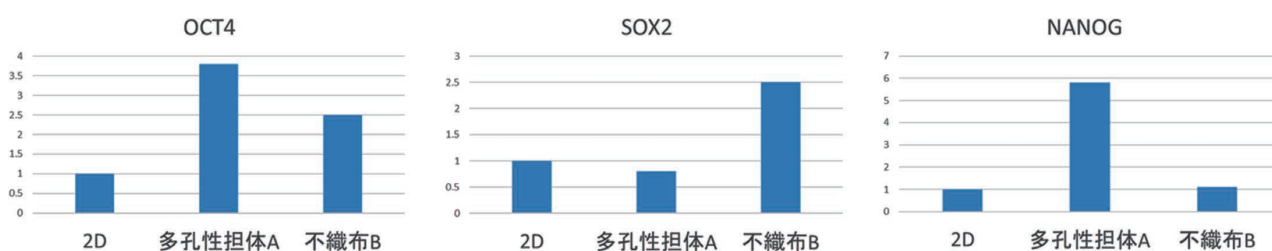


図1

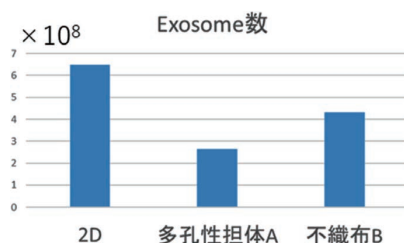


図2

stemness marker (OCT4, SOX2, NANOG) の遺伝子発現を評価した。培養液に関しては、exosome を回収し、exosome 数を Nanosight で評価した。また exosome に含まれる let-7a・miR-26a の発現を PCR で評価した。

1.3.2 結果

SOX2 に関しては、無血清培地 X および Y とともに

に、2次元培養に比べて不織布 B 培養で、発現は増加していた（図3）。Exosome 数に関しては、無血清培地 X および Y とともに、2次元培養に比べて不織布 B で低下していた。不織布 B 培養における無血清培地 X・Y の比較では、X の方が多かった（図4）。Exosome に含まれる let-7a・miR-26a に関しては、無血清培地 Y において、2次元培養に比べて不織布 B で発現が高かった（図5）

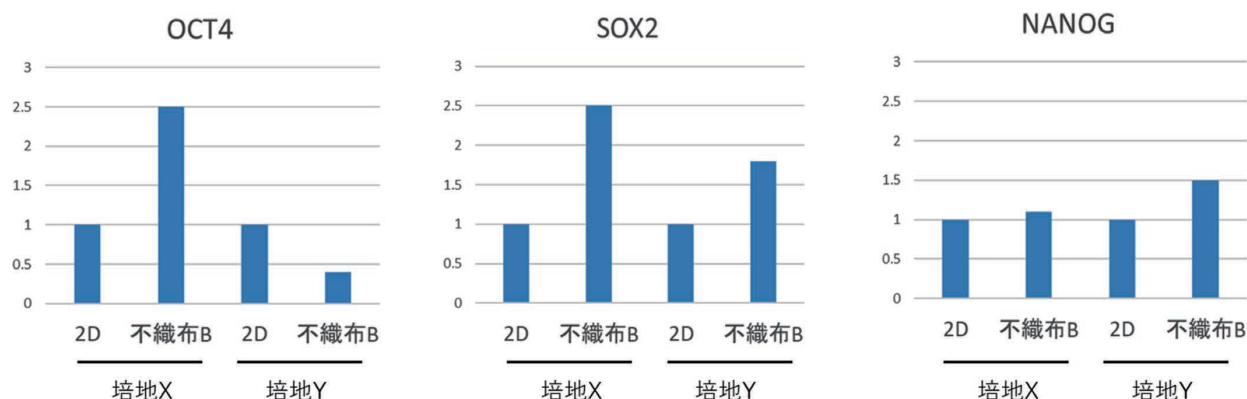


図3

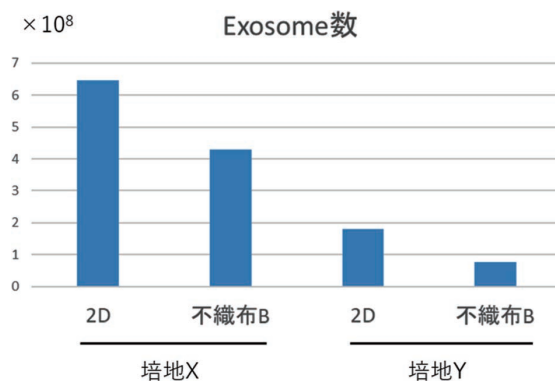


図4

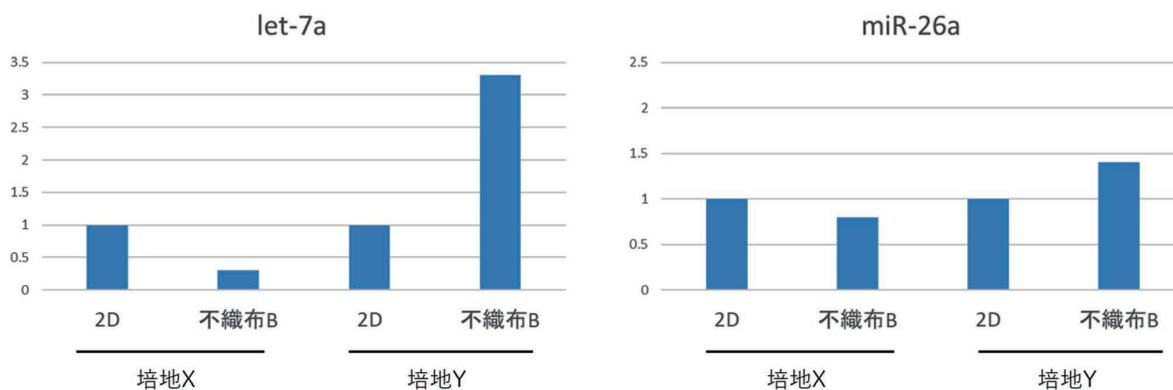


図5

上記結果より、不織布 B と培地 Y の組み合わせは、exosome 数がやや少ないものの、let-7a・miR-26a をより多く内包した exosome が得られることが明らかとなった。そのため、不織布 B と培地 Y の組み合わせによって得られた exosome が、認知機能に対して効果があると考えられ、AD モデルマウスへ点鼻投与を行うこととした。

1.4 MSC 由来 exosome の認知機能への効果

1.4.1 方法

生後 6 か月の 5XFAD マウス (B6SJL-Tg (APP^{SwFlon}, PSEN1^{M146L}*L286V)6799Vas/Mmjax) に、不織布 B と培地 Y の培養液から抽出した exosome を、1 週間ごとに 4 回点鼻投与を行った。生後 7 か月の時点で Y maze test を行い、認知機能を評価した（札幌医科大学動物実験計画：22-085）。

1.4.2 結果

Vehicle 投与群に比べて、exosome 投与群では、認知機能が有意に高かった（図 6）。

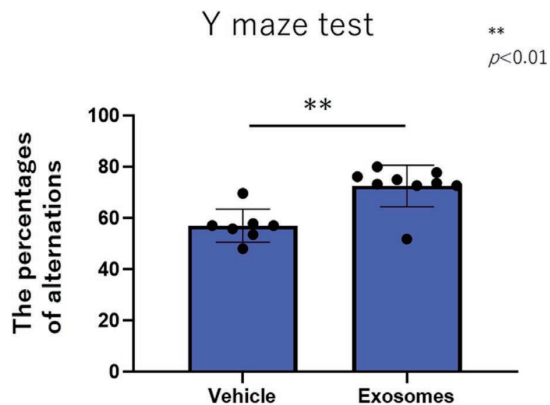


図 6

1.5 考察

多孔性担体 A と不織布 B を用いた検討では、不織布 B の方がより多くの exosome 数が得られた。無血清培地 X と Y の検討では、無血清培地 Y において exosome に含有される let-7a・miR-26a の発現が高かった。なお stemness marker と let-7a・

miR-26a の発現は、必ずしも関連しないことが示唆された。

不織布 B と無血清培地 Y の組み合わせで培養した培養液から exosome を抽出し、AD モデルマウスに点鼻投与したところ、認知機能の改善が得られた。以上から、上記組み合わせによって得られた exosome が認知機能に対して有効であると考えられた。

本研究から、不織布 B と無血清培地 Y の組み合わせは、exosome に含有される let-7a・miR-26a の発現を高める一方、無血清培地 X に比べては培養液中の exosome 数が少ないことが明らかとなった。その理由として、無血清培地 X に比べて無血清培地 Y は、MSC の増殖作用が不十分であることが考えられる。今後無血清培地 Y に細胞増殖因子を添加したうえで、不織布 B で培養する検討を行い、より多くの exosome を得られるか検討を行う予定である。

1.6 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました日立財団に厚く御礼を申し上げます。

2. 発表（研究成果の発表）

1. Nakano M, Kobayashi E, Hashizume S, Kihara K, Nagaishi K, Hisahara S, Fujimiya M. Postmortem study of the cognitive normal subjects with Alzheimer's disease pathology in the brain. 第 65 回日本神経学会学術大会・第 19 回アジア・オセアニア神経学会議 (AOCN2024)（東京、2024 年）
2. Nakano M, Kobayashi E, Hashizume S, Kihara K, Nagaishi K, Fujimiya M. The microRNA analysis of the cognitive normal subjects with Alzheimer pathology in human brain. 第 47 回日本神経科学大会・第 67 回日本神経化学学会大会・第 46 回日本生物学的精神医学会年会・第 8 回アジアオセアニア神経科学連合コンgres

（Neuro2024）（福岡、2024 年）

3. Nakano M, Hashizume S, Kihara K, Nagaishi K, Fujimiya M. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in 3D hydrogels improve cognitive impairment in an Alzheimer's disease model through the secretion of specific miRNAs. APPW2025（第 130 回日本解剖学会／第 102 回日本生理学会／第 98 回日本薬理学会合同大会）APPW2025（千葉、2025 年）