

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「分化再生と生体恒常性を制御するエク
ソソームの新しい細胞同調機能の解明とナノ粒子
による生体機能制御への応用」

研究終了報告書

研究期間 2017年 10月～2023年 3月

研究代表者: 山下 潤
(国立大学法人東京大学大学院医学
系研究科・特任教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

研究代表者が従来行っていた幹細胞分化研究の中で独自に発見した「分化同調(最終的には「細胞形質同調」とする)」という現象を元に、以下の3つの研究項目を実施する。すなわち

1. 最初に発見した多能性幹細胞分化における同調の分子機構を明らかにする
2. 幹細胞分化以外の状況における細胞形質同調機構の存在の探索により、内因性微粒子の関与する細胞形質同調機構を明らかにしていく。同時に
3. 上記で見つけた機構を人工ナノ粒子などの外因性微粒子を用いて再現するにより、発見した現象の操作を可能とする。これら謂わば3次元的な研究の展開により、細胞形質同調現象の意義と有用性を細胞外小胞(EV)を通して拡張することが本研究の主眼である。

研究項目1:EVの分化同調制御機構の解明

「多能性幹細胞分化における protein kinase A (PKA)活性化による分化速度促進現象」

↓

(Minakawa, Biochem Biophys Res Commun, 2020)

PKA 活性化細胞と通常細胞の共培養における分化同調現象の発見とEVの関与

-----↓----- 以下本事業

EV 内分子の探索 → miR-132 の発見 -----> 研究項目3へ応用

↓

miR-132 の下流メカニズムの解析 → PKA の再活性化

miR-132 含有 EV 及び人工ナノ粒子の分化促進作用

(以上 Minakawa, J Extracell Vesicles, 2021)

(追加項目) EV 作用の可視化。EV の隣接細胞への輸送と細胞形質同調等

- ◇ EV による細胞形質同調という新しい現象の発見。
- ◇ 隣接細胞間での速いEVのやりとりという新しい細胞間コミュニケーションの発見。

研究項目2:EVによる細胞同調機構の生体機能維持における意義の解明

- i) 同調性の付与による心筋分化・再生：心筋細胞由来EVの心筋分化誘導作用
- ii) 同調性からの逸脱としてのEnd-MT (endothelial-mesenchymal transition; 内皮-間葉転換)：EndMT誘導時のEV分泌阻害により間葉細胞遺伝子発現増強(同調からの逸脱強化)

- ◇ EVによる細胞形質同調が幅広く種々の生命現象に関与している可能性を示した。

研究項目3：生体内で細胞同調機能を再現しうるナノ粒子システムの開発

- a) 機能性 PLGA ナノ粒子作製基盤の確立
 - b) MicroRNA 封入リポソームの作製 (追加項目)
 - c) in vitro での機能性 PLGA ナノ粒子の検証 (計画変更)
 - d) 心筋梗塞モデルマウスでの内因性 miRNA の検討 (追加項目)
 - e) 心筋梗塞モデルマウスでの機能性ナノ粒子の治療効果の検討
- ◇ miR132封入PLGAナノ粒子、リポソームの作製、マウス心臓へのデリバリーに成功。
 - ◇ マウス心筋梗塞モデルにおいて種々の効果を認めた。
 - ◇ 均一な高い品質の治療薬として人工ナノ粒子の大きなポテンシャルを示した。

- EVの持つ新たな意義・ポテンシャルを多方面に広げること成功した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. EVによる細胞形質同調現象の発見

概要：分化速度が異なる2種類の多能性幹細胞が混在する状況を人為的に作り出す実験モデルを構築し、幹細胞分化時に細胞がEVを介して情報をやり取りし、相互の分化段階や細胞形質を同調させることを見出した。中胚葉への分化同調においてはEV内のmiR-132がおもにその情報を担うことを示した (Minakawa, *J Extracell Vesicles*, 2021)。EVによる細胞形質同調作用は生体の恒常性維持に広く関与する新しい機構である可能性がある。また再生医療等への応用も期待される。

2. 隣接細胞間のEV交換のライブイメージング。新しいモードのEV機能の発見。

概要：高輝度蛍光分子とEVマーカの融合タンパク発現細胞を複数種作製し、超高解像度共焦点顕微鏡を用いて、隣接細胞間におけるEV交換をリアルタイムに近い時間空間解像度で検出することに成功した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 急性心筋梗塞症に対する心筋再生療法開発における基礎的結果

概要：急性心筋梗塞症において失われた心筋組織の再生は大きなチャレンジであり、筋芽細胞やiPS細胞由来の心筋細胞移植などの試みは十分な成果を挙げていない。本研究では内因性のEVから見出されたmiR-132の外因性投与により、心機能の改善につながる基礎的結果を得ており、橋渡し研究に繋がることが期待できる。

<代表的な論文>

1. Minakawa T, Matoba T, Ishidate F, Fujiwara TK, Takehana S, Tabata Y, *Yamashita JK; Extracellular vesicles synchronize cellular phenotypes of differentiating cells. *J Extracell Vesicles*. 10:e12147, 2021.

概要：Protein kinase A (PKA)が多能性幹細胞の分化速度を亢進させるという代表者らの知見を元に分化速度が異なる細胞が共存する条件における細胞分化のふるまいを検討し、EVを介して分化速度が同調する現象を見出した。この同調をもたらす責任分子の一つとしてmiR-132を同定した。分化途上のEVやmiR-132を含む人工ナノ粒子によっても分化の同調やマウス胎仔の心筋への分化促進などが誘導できた。

2. Uchikawa, T., Matoba, T., Kawahara, T., Baba, I., Katsuki, S., Koga, J., Hashimoto, Y., Yamasaki, R., Ichi, I., Akita, H., Tsutsui, H. (2022). Dietary 7-ketocholesterol exacerbates myocardial ischemia–reperfusion injury in mice through monocyte/macrophage-mediated inflammation. *Scientific Reports*, 2022;12:1–15.

概要：急性心筋梗塞病態において、酸化脂質がマクロファージ活性化を介して心筋梗塞を拡大する機序を解析した。CREST 領域内共同研究(東北大学・秋田英万先生)で導入したリポソームを用いて siRNA を培養マクロファージに導入し、LXR α 、LXR β 等の遺伝子発現の制御が得られ、病態機序の解明に有用であった。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「山下」グループ

研究代表者：山下 潤（国立大学法人 京都大学・iPS 細胞研究所 教授

⇒ 2022. 7. 1. より 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科・細胞組織
コミュニケーション講座 特任教授）

研究項目

EV による分化同調制御機構および生体恒常性維持機構の解明

1) EV の分化同調制御機構の解明

2) EV による細胞同調機構の生体機能維持における意義の解明

② 「的場」グループ

主たる共同研究者：的場 哲哉（国立大学法人 九州大学病院・循環器内科 講師）

研究項目

3) 生体内で細胞同調機能を再現しうるナノ粒子システムの開発

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- MicroRNA 封入りポソームの作製に関して、千葉大学・秋田グループとの CREST 内共同研究
- EV ライブイメージングに関して、京都大学物質-細胞統合システム拠点「ZEISS-iCeMS イノベーションコア」、理化学研究所・宮脇敦史教授、名古屋大学・佐藤良勝教授、京都大学・田畑泰彦教授との共同研究
- EV 製品開発に関して、タカラバイオ株式会社出資・東京大学社会連携講座開設