

令和元年9月3日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14601

研究課題名（和文）エクソソーム標識ラットを用いた胎児期、乳幼児期における発育との関連解析

研究課題名（英文）The analysis of extracellular vesicles in fetal and neonatal period using transgenic rats

研究代表者

吉村 文 (Aya, Yoshimura)

藤田医科大学・疾患モデル教育研究サポートセンター・講師

研究者番号：90466483

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：ラットを用いた母乳および羊水エクソソームの新生児や胎児に対する生理的機能を解明するため、それらの取り込み経路、羊水エクソソーム内包成分の解析を実施した。取り込み経路については、さらなる実験方法の改善が必要であった。羊水エクソソームに関しては、microRNAとタンパク質について解析した。タンパク質の網羅的解析から脳に関連する因子が検出されたことから、今後は脳を中心とした検証の必要性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

体液中に分泌されるエクソソームを疾患の診断マーカーとして活用する研究が推進されている一方で、エクソソームの特定の細胞に取り込まれる性質や免疫制御・細胞修復機能などから、治療薬として活用する研究が検討されている。本研究対象の母乳エクソソームも免疫細胞に対する作用が検証されたことから、免疫治療への利用が検討されている。治療薬へつなげるには副作用や安全性の確保が重要となってくる。それには目的エクソソームの標的細胞を明らかにすることが必要である。胎児と新生児は脳の血管バリアが未成熟であるため、本研究の母乳と羊水エクソソームの神経細胞・グリア細胞への取り込み能力解明は、脳への影響について予想できる。

研究成果の概要（英文）：To establish the physiological function of breast milk- or amniotic fluid-derived extracellular vesicles (EVs) in neonatal and fetal stage, the uptake pathway of EVs, and microRNA and proteins of amniotic fluid-derived EVs were analyzed using rats. The uptake pathway need to be improved the experimental methods. The factors associated with brain were detected in proteomic analysis of EVs from amniotic fluid, indicating the necessity of experiments centered on brain development during fetal stage.

研究分野：実験動物学

キーワード：トランスジェニックラット エクソソーム 発育

1．研究開始当初の背景

細胞間コミュニケーション媒体として注目されるエクソソームを可視化させた動物モデルを用い、これまで *in vivo* での移行が未解析であった母乳エクソソームの新生児体内への移行、羊水エクソソームの胎児発育との関係性に注目した研究を行う。母乳エクソソームは免疫に関与するタンパク質や microRNA を多く運んでいることが報告されているが、授乳した新生児体内での取り込み経路は不明である。また、羊水エクソソームに関してはコンポーネントでさえ殆ど明らかとされていない。本研究は、申請者が開発したエクソソーム標識ラットを利用することで、子（胎児、新生児）の発育におけるエクソソームの生理的役割を解明し、この時期の発育不良改善につながる研究成果を目指す。

2．研究の目的

本研究は、これまでの疾患マーカーとしての開発に重点をおいた体液エクソソームの研究ではなく、その生理的機能の解明を目指すものである。

3．研究の方法

・エクソソーム可視化動物

エクソソームマーカーである CD63 タンパク質（ヒト CD63）に蛍光タンパク質 GFP を融合させた遺伝子を発現するトランスジェニック（Tg）ラットを用いる（Yoshimura et al., *Scientific Reports*, 2016）。このラットに由来する血清、羊水、母乳から回収したエクソソームは CD63-GFP で標識されている。

・母乳エクソソームの新生児体内への移行

Tg ラットの母乳を授乳した Wt 新生児ラットの小腸を採材し、4%PFA で固定した組織の凍結切片を作製して GFP を蛍光顕微鏡で確認する。

・羊水エクソソームの胎児組織への移行

妊娠ラット（妊娠 14 日目）の羊水から超遠心分離法（35,000 rpm、70 分間、4℃）によってエクソソームを含む細胞外小胞体を回収し、胎児由来の培養細胞に添加して取り込みを検証する。

・羊水エクソソームの microRNA およびタンパク質の網羅的解析

羊水由来細胞外小胞体の microRNA とプロテオミクスの外部委託による解析を実施する。粒子解析装置による品質評価後、プロテオミクスに関しては可溶化と非可溶化の 2 種類に分けて委託する。

4．研究成果

・母乳エクソソームの新生児体内への移行

作成した小腸切片における標識エクソソームの取り込みを蛍光観察に加えてヒト CD63 抗体による免疫染色も行った。しかし、今回の実験方法では母乳由来と思われるエクソソームを検出できなかった。そのため、Tg ラット由来母乳エクソソームを回収して、濃縮した状態での Wt 新生児への経口摂取が必要と考えられる。

・羊水エクソソームの胎児組織への移行

今回は、Wt 妊娠ラットから回収した羊水由来細胞外小胞体を用い、PKH (Sigma 社) 標識後に胎児線維芽細胞への取り込みを確認した。今後は、他の組織由来培養細胞について取り込みを検証する。

・羊水エクソソームの microRNA およびタンパク質の網羅的解析

羊水由来細胞外小胞体 microRNA の網羅的解析の前に、microRNA の品質チェックと必要なサンプル量を推量するための条件検討を行った。miRNeasy mini kit (キアゲン社) で抽出した total RNA サンプルをタカラバイオ株式会社に送り、microRNA QC PCR Panel による定量 PCR 反応を委託した。結果、microRNA 阻害物質の影響を減らす希釈量の条件と網羅的解析に必要な羊水量が推定できた。また、羊水由来細胞外小胞体、妊娠ラット血清由来細胞外小胞体、妊娠ラット血清由来 microRNA について、7 種類のプライマーを用いて qPCR を行ったところ、3 者間で異なる成分構成を示した。そのため、羊水採取時の血液の混入は低いと考えられる。

Wt 由来羊水サンプルを住化分析センターに送り、超遠心分離法で回収した羊水由来細胞外小胞体を非可溶化と可溶化処理サンプルに分けてプロテオミクスを実施した。可溶化処理でより上位に同定されたタンパク質は小胞内包タンパク質あるいは膜抗原と考えられる。今回、およそ 640 個のタンパク質が検出され、エクソソームマーカー (Alix、TSG101、CD9) を上位に含んでいた。血清エクソソームで検出されるタンパク質の構成パターンとは異なること、さらに血清エクソソームでは検出されないタンパク質の存在から、羊水エクソソーム優位な抽出物とみなすことができた。胎児因子や胎盤因子として知られるタンパク質以外に、神経に関わるタンパク質が存在した。

今後の研究計画として、神経・グリア細胞を中心とした培養系を用い、脳発育を中心とした羊水エクソソームの関与を検証する。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Aya Yoshimura, Naoki Adachi, Hitomi Matsuno, Masaki Kawamata, Yusuke Yoshioka, Hisae Kikuchi, Haruki Odaka, Tadahiro Numakawa, Hiroshi Kunugi,

Takahiro Ochiya, Yoshitaka Tamai; The Sox2 promoter-driven CD63-GFP transgenic rat model allows tracking of neural stem cell-derived extracellular vesicles. *Disease Models & Mechanisms* 30: dmm028779(2018).doi:10.1242/dmm.028779. 査読有.

〔学会発表〕(計3件)

吉村 文,熊本海生航,長尾静子;エクソソーム可視化ラットの作製と表現型への影響. 第49回藤田医学会. 2017年10月日 藤田医科大学.

吉村 文,熊本海生航,釘田雅則,長尾静子;エクソソームの解析と実験動物モデルの紹介. 第4回シーズ・ニーズ発表交流会. 2018年7月21日 藤田医科大学.

吉村 文,熊本海生航,釘田雅則,長尾静子;エクソソーム可視化トランスジェニックラット. 第90回東海実験動物研究会 2018年7月14日 名古屋市立大学桜山キャンパス

〔図書〕(計2件)

吉村 文,落谷孝広 クローズアップ実験法:CD63-GFP トランスジェニックラットによるエクソソーム追跡. *実験医学* 2017年9月号 35巻14号 2415-2421.

吉村 文,細胞外小胞顆粒と疾患:動物モデルを利用したエクソソームの生理学的機能と疾患研究. *最新医学社* 2018年73巻9号 1210-1215.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 文 (YOSHIMURA, Aya)

藤田医科大学 研究支援推進本部 疾患モデル教育研究サポートセンター・講師

研究者番号: 90466483