

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19315

研究課題名（和文）遺伝子改変による細胞特異的エクソソーム単離法の開発

研究課題名（英文）Development of cell-specific exosome isolation method by genetic modification

研究代表者

小野 竜一（Ono, Ryuichi）

国立医薬品食品衛生研究所・毒性部・室長

研究者番号：10401358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、細胞外小胞として知られるエクソソーム表面に時期・部位特異的に特異的な表面タンパクを挿入し、その表面タンパクを精製することでエクソソームを分泌した細胞を特定することである。内在性の CD9 をゲノム編集により欠損させたマウスの作製に成功し、さらに、ヒト CD9 に EGFP の融合させた CD9-EGFP を時期および部位特異的に発現する系の構築に成功し、この系を導入したES細胞を利用してトランスジェニックマウスのキメラマウス作製まで行なったが、全てのキメラマウスで精子形成不全が起り、不妊であることがわかった。CD9-EGFPの発現漏れが精子形成に影響した可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、血液採取を行ない、エクソソーム RNA を解析することで、化学物質暴露により障害を受けた細胞を同定することを可能とする基盤技術の開発を行う研究である。本研究は高感度な有害性評価系の構築を企図しており、従来法に比較してより短期間により少数の動物での評価が可能となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to identify cells that secrete exosomes by inserting timing- and site-specific surface proteins into the surface of exosomes, known as extracellular vesicles, and identifying the origin of exosomes by purifying the timing- and site-specific surface proteins. We have succeeded in generating mice lacking endogenous CD9 by genome editing, and in constructing a system that expresses CD9-EGFP, a fusion of human CD9 and EGFP, in a timing- and site-specific manner and even generated chimeric transgenic mice using ES cells transfected with this system. But, all chimeric mice were found to be infertile due to impaired spermatogenesis. It is possible that the omission of CD9-EGFP expression affected spermatogenesis.

研究分野：毒性学

キーワード：エクソソーム

## 1. 研究開始当初の背景

エクソソームをがんのバイオマーカーとした研究は活発に行なわれている。それは、がんという病巣はがん患者にだけ特異的に存在し、特定のがん患者特異的なエクソソームは特定のがん病巣に由来するエクソソームであると特定することができるからである。また、ヒトを対象とした場合は、患者より数ミリリットルの採血が可能で、その後、超遠心によりエクソソームを単離できる。

一方、マウスを対象とした場合は、採血量としては数百マイクロリットルしかなく、化学物質暴露を行っても、どこの細胞より分泌されたエクソソームであるかも特定できないという欠点があった。そのような経緯もあり、マウスにおいてエクソソームをバイオマーカーとした研究は活発には行なわれてこなかったと思われる。

## 2. 研究の目的

申請者は、私たちの身の回りに存在する有害な化学物質に暴露した際に、どの臓器（細胞）が傷害を受けたのかを迅速に知るためのバイオマーカーとしてエクソソームを利用できるのではないかと考え、マウスに化学物質を投与し、特異的なエクソソーム RNA を次世代シーケンサーを利用して網羅的に単離することを試みた。その結果わかったことは、化学物質特異的なエクソソーム RNA の単離にまで至ったが、いったいそれがどの臓器（細胞）に由来するエクソソームなのか判断できないのであった。

そこで、本研究課題の目的は、エクソソーム表面に存在するタンパクに時期・部位特異的に特異的なタグを挿入し、そのタグを精製することでエクソソームを分泌した細胞を特定することを可能とする。エクソソーム精製用マウスを作製し、評価することである。

## 3. 研究の方法

本研究課題の目的は、細胞外小胞として知られるエクソソーム表面に時期・部位特異的に特異的な表面タンパクを挿入し、その表面タンパクを精製することでエクソソームを分泌した細胞を特定することを可能とすることである。エクソソームは様々な細胞より分泌される脂質二重膜、表面抗原に覆われた小胞であり、その中には、mRNA や miRNA などが含まれており、最近ではがんのバイオマーカーとしての中率 90 % を超えるまでに至っている。エクソソーム表面に存在する表面抗原タンパク、分泌した細胞により特異性があり、特にがん特異的な表面抗原タンパクなども知られている。その中でもほぼ全てのエクソソームに共通して存在することが知られているのが、テトラスパニン (TN4) スーパーファミリーに属する CD9 である。そこで、本研究計画では、ヒト CD9 に EGFP の融合させた CD9-EGFP を時期および部位特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製する。CD9-EGFP は、Cre-loxP システムを利用することで、時期・部位特異的に CD9-EGFP を誘導することが可能となる。

また、CD9-EGFP トランスジェニックアレルが、*in vivo* で機能しうるかを検証するために、CD9 ノックアウトマウスを作製し、CD9-EGFP トランスジェニックマウスと交配することにより、CD9 欠損をレスキューできるのかを解析する。

#### 4. 研究成果

最初に、マウスの内在性 CD9 遺伝子を受精卵においてゲノム編集技術を利用して、CD9 遺伝子のコーディング部分にフレームシフトを導入し、CD9 の機能を欠損したノックアウトマウスの作製を行った。複数のラインが取得できたが、このうち、フレームシフトを起こす変異を持つラインのみを解析対象とし、野生型マウスと交配することで、CD9 欠損マウスをヘテロの状態で維持することに成功した (図 1)。

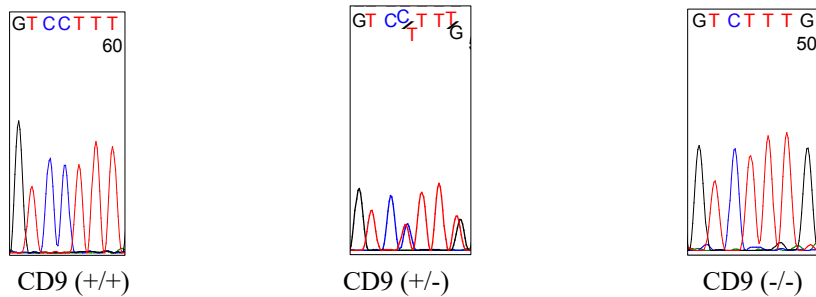


図 1 マウス CD9 遺伝子にフレームシフト変異を導入し、CD9 欠損マウスを作製した。

また、培養細胞において、エクソソーム表面に時期・部位特異的に特異的な CD9-EGFP 融合タンパクを誘導する発現ベクター pREP-CD9-EGFP の構築に成功した (図 2、図 3)。

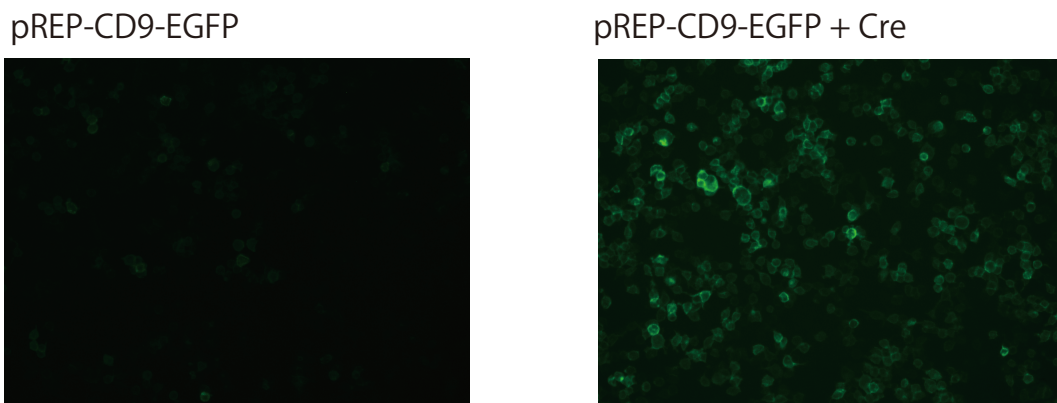


図 2 293T 細胞に pRep-CD9-EGFP および Cre 発現ベクターを導入した場合のみ、CD9-EGFP の発現が誘導される。

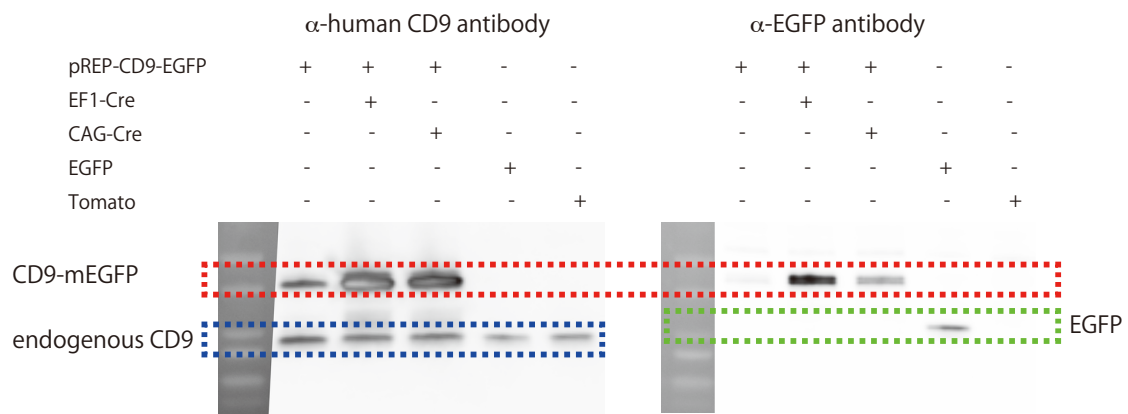


図 3 293T 細胞において、Cre を導入した場合のみ、CD9-EGFP のタンパク誘導がウエスタンブロットによって確認された (赤点線枠)。

また、この発現ベクター (pREP-CD9-EGFP) を C57BL/6 マウスより樹立した ES 細胞にエレクトロポレーションで導入し、薬剤による耐性株の単離により、トランスジェニック ES 細胞を得た。これらの ES 細胞株に対して、Cre 発現ベクターを導入し、CD9-EGFP 融合タンパクの誘導を行った。CD9-EGFP 融合タンパクの誘導を行った ES 細胞の中で、CD9-EGFP の発現の強い ES 細胞株のスクリーニングを行ない、さらに、ES 細胞の核型解析を行い、キメラマウス作成に用いる ES 細胞株 3 ラインの選択を行った (図 4)。

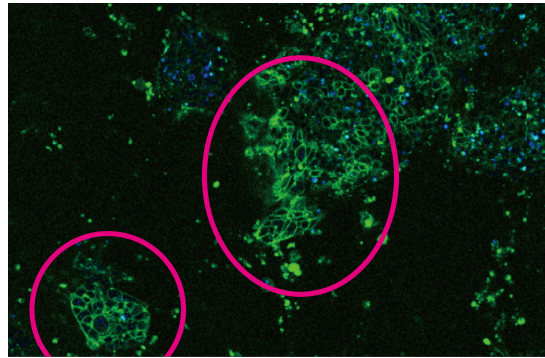


図4 C57BL/6 ES 細胞に pREP-CD9-EGFP コンストラクトおよび Cre 発現ベクターを導入し、CD9-EGFP が強く誘導される ES 細胞コロニーの単離に成功した。赤丸で囲った部分の CD9-EGFP を発現する ES 細胞コロニーの周辺に、CD9-EGFP を膜に含むエクソソームの分泌を超解像共焦点レーザー顕微鏡によって確認できる。

これらの ES 細胞を用いて、ICR 胚にインジェクションを行うことで、キメラマウスの作製を行い、合計 13 匹のキメラマウスの作出に成功した。

これらのキメラマウスと野生型マウスを交配し、トランスジェニックマウスの作製を図った。13 匹のキメラマウスのうち、6 匹は、精子形成不全により不妊であることが判明した。また、残りのキメラマウスに関しては、子供は生まれるが、トランスジェニックのアレルを有した子供を得ることができなかった。

6 匹の精子形成不全の表現型を持つキメラマウスの精巣より、精子を取り出し、顕微授精を行ったが、トランスジェニックアレルを有した子供をレスキューすることができなかった。これは、pREP-CD9-EGFP コンストラクトにおいて、CD9-EGFP のプロモーターにチキンのアクチンプロモーターを使用しており、CD9-EGFP 融合タンパクを誘導していない状態でも、遺伝子発現が多少なりリークすることで、精子形成に異常が生じてしまったと考えられる。

CD9-EGFP 融合タンパクを時期および部位特異的に誘導するトランスジェニックマウスを得ることができなかったが、発生に影響のないレベルのトランスジーンを利用することで、将来的に新たにマウスを作製する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ono Ryuichi, Yoshioka Yusuke, Furukawa Yusuke, Naruse Mie, Kuwagata Makiko, Ochiya Takahiro, Kitajima Satoshi, Hirabayashi Yoko	4. 巻 7
2. 論文標題 Novel hepatotoxicity biomarkers of extracellular vesicle (EV)-associated miRNAs induced by CCl4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxicology Reports	6. 最初と最後の頁 685 ~ 692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxrep.2020.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe Shihori, Quader Sabina, Cabral Horacio, Ono Ryuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Interplay of EMT and CSC in Cancer and the Potential Therapeutic Strategies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.00904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe Shihori, Quader Sabina, Ono Ryuichi, Cabral Horacio, Aoyagi Kazuhiko, Hirose Akihiko, Yokozaki Hiroshi, Sasaki Hiroki	4. 巻 12
2. 論文標題 Molecular Network Profiling in Intestinal- and Diffuse-Type Gastric Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3833 ~ 3833
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12123833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 内田恵理子, 山下拓真, 小野竜一, 内藤雄樹, 井上貴雄	4. 巻 50 (9)
2. 論文標題 ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の規制と安全性評価	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 513-522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 内田恵理子、平松直人、犬飼直人、岩井謙一、渡辺武志、川崎秀吉、田村幸太郎、土屋貴穂、吉見英治、高橋則彦、伊藤辰哉、藤本和則、山下晃人、小野貴士、高木観、小野竜一、内藤雄樹、井上貴雄	4. 巻 50 (8)
2. 論文標題 ゲノム編集技術を用いた遺伝子治療の開発動向	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス	6. 最初と最後の頁 443-453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ono Ryuichi, Yasuhiko Yukuto, Aisaki Ken-ichi, Kitajima Satoshi, Kanno Jun, Hirabayashi Yoko	4. 巻 2
2. 論文標題 Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-019-0300-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Shihori, Ryuichi Ono	4. 巻 2
2. 論文標題 The gene and microRNA networks of stem cells and reprogramming	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIMS Cell and Tissue Engineering	6. 最初と最後の頁 238 ~ 245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3934/celltissue.2018.4.238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirosuke Shiura, Ryuichi Ono, Saori Tachibana, Takashi Kohda, Tomoko Kaneko-Ishino and Fumitoshi Ishino	4. 巻 148
2. 論文標題 PEG10 viral aspartic protease domain is essential for the maintenance of fetal capillary structure in the mouse placenta	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dev.199564	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanabe Shihori, Quader Sabina, Ono Ryuichi, Cabral Horacio, Aoyagi Kazuhiko, Hirose Akihiko, Yokozaki Hiroshi, Sasaki Hiroki	4. 巻 13
2. 論文標題 Cell Cycle Regulation and DNA Damage Response Networks in Diffuse- and Intestinal-Type Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 5786 ~ 5786
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13225786	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Igarashi Toshime, Yasuhiko Yukuto, Ono Ryuichi, Tachihara Erika, Uchiyama Miki, Takagi Atsuya, Takahashi Yu, Kuwagata Makiko, Kitajima Satoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Diverse unintended on-target mutations induced by zygote genome-editing using CRISPR/Cas9 system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 161 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.161	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件 (うち招待講演 11件 / うち国際学会 11件)

1. 発表者名 小野 竜一
2. 発表標題 EV-mediated horizontal gene transfer
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 A novel risk for genome editing
3. 学会等名 南米毒性学会学術年会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 Identification of novel EV-associated miRNAs as toxic biomarkers in mouse
3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles annual meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野竜一
2. 発表標題 エクソソーム中のmiRNAをバイオマーカーとしたリキッドバイオプシー
3. 学会等名 第47回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野竜一、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純
2. 発表標題 Percellomeプロジェクトから見てきたエピジェネティクス影響
3. 学会等名 第45回日本毒性学会学術年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Takahiro Ochiya, Satoshi Kitajima, Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Evaluation of exosomes as toxic biomarkers in mouse
3. 学会等名 15th International Congress of Toxicology (ICTXV) (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Ryuichi Ono, Satoshi Kitajima, Ken-ichi Aisaki, and Jun Kanno
2. 発表標題 Molecular Basis of the 'Baseline Response' and 'Transient Response' Observed in the Newly Designed Repeated Dose Study: Epigenetic Modifications
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
3. 学会等名 55th Congress of the European Societies of Toxicology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 Exosome-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 EV を介した遺伝子水平伝搬によるゲノム進化の可能性
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 Extracellular vesicles-mediated horizontal gene transfer: a possible new risk for genome editing
3. 学会等名 第1回アジア環太平洋細胞外小胞学会学術集会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yukuto Yasuhiko, Ken-ichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 DSB Repair by Capture of Unintentional Sequences, an Emerging New Possible Risk for the Genome Editing
3. 学会等名 ASAITOX（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Yusuke Yoshioka, Yusuke Furukawa, Satoshi Kitajima, Takahiro Ochiya, Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 Standardization of exosome isolation in mice corresponding to toxicity test
3. 学会等名 Japanese Society of Extracellular Vesicles Conference（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryuichi Ono, Keiko Tano, Satoshi Yasuda, Yukuto Yasuhiko, Kenichi Aisaki, Satoshi Kitajima, Jun Kanno, Yoji Sato and Yoko Hirabayashi
2. 発表標題 A possible risk of genome editing for human gene therapy
3. 学会等名 EUROTOX（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野竜一
2. 発表標題 ゲノム編集技術の安全性評価
3. 学会等名 第50回日本環境変異原ゲノム学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 Novel hepatotoxicity biomarkers of exosomal miRNAs acutely induced by CC14
3. 学会等名 アジア毒性学会学術年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野竜一
2. 発表標題 エクソソームが媒介したレトロトランスポゾンの 遺伝子水平遺伝による哺乳類の誕生
3. 学会等名 第93回日本遺伝学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野竜一
2. 発表標題 リキッドバイオプシーによる毒性評価
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryuichi Ono
2. 発表標題 Liquid Biopsy for the Early Detection of Toxicity
3. 学会等名 韓国毒性学会学術年会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関