

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09843

研究課題名(和文) 鼻腔洗浄液中の細胞外小胞(エクソソーム、マイクロベシクル)による新規診断法の開発

研究課題名(英文) Development of new diagnostic methods by extracellular vesicles in nasal lavage fluids

研究代表者

清水 志乃(Shimizu, Shino)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：50505592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームを含む細胞外小胞は微小な膜小胞体で、様々な細胞から放出され、生体の恒常性維持や病態に関わっている。エクソソームは由来細胞の情報を含み、細胞間あるいは組織間の情報伝達を担っている。本研究では、ヒト鼻腔洗浄液中からエクソソームを分離できること、そのエクソソームからプロテオーム解析に用いるために十分な蛋白が抽出できることを確認した。鼻腔洗浄液中のエクソソームを用いたリキッドバイオプシーが可能であることが確認できた。また、培養細胞を用いた検討では、新しい細胞間情報伝達物質として、エクソソームを含む細胞外小胞が好酸球性副鼻腔炎の組織リモデリングに関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鼻腔洗浄液のエクソソームの回収方法とプロテオーム解析について初めての報告である。鼻腔洗浄液の採取は容易に低侵襲で行える利点があり、将来的に簡便で安価な診断法の開発につながる可能性がある。鼻腔洗浄液中の細胞外小胞の検出と解析は、血液検査ではとらえることのできない鼻副鼻腔局所病変の新しい評価法として役立つことが考えられる。嗅神経は脳神経で唯一外界に細胞が暴露されるため、鼻腔のエクソソームの解析によって中枢神経疾患の診断も可能となる可能性がある。また、難治性疾患である好酸球性副鼻腔炎の病態とエクソソームの関係がさらに明らかとなれば治療のターゲットになり得る。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles, including exosomes, are small membrane vesicles that are released from various cells and are involved in maintaining homeostasis and pathology of diseases. Exosomes contain information about the derived cell and have an important role for intercellular communication. In this study, it was confirmed that exosomes can be separated from human nasal lavage fluid, and that sufficient protein can be extracted from the nasal exosomes for use in proteomic analysis. In addition, a study using cultured cells showed that exosomes are involved in tissue remodeling of eosinophilic chronic rhinosinusitis as a new intercellular signaling agent.

研究分野：耳鼻咽喉科学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 鼻腔洗浄液 VEGF 鼻茸線維芽細胞 好酸球性副鼻腔炎 アルツハイマー病

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

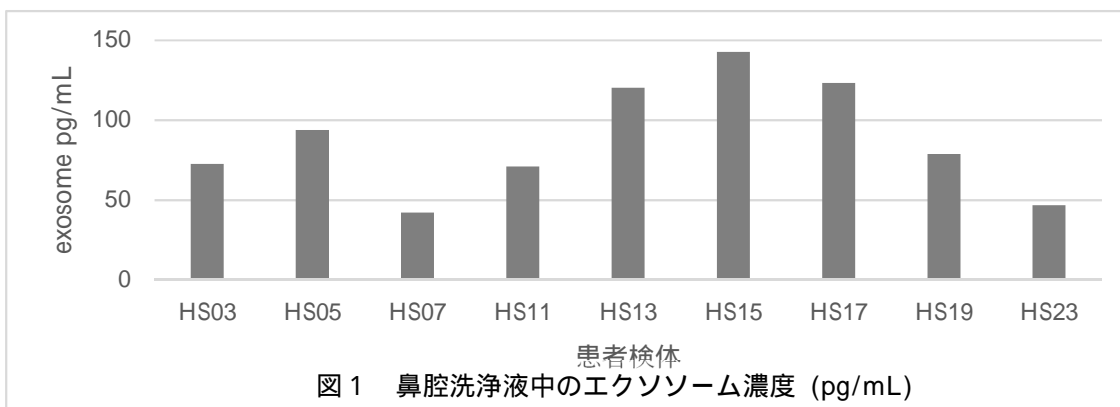
1. 研究開始当初の背景

エクソソームを含む細胞外小胞は微小な膜小胞体で、細胞の活性化やアポトーシスの誘導により様々な細胞から放出され、生体の恒常性維持や病態に関わっている。エクソソームは由来細胞の蛋白質やマイクロRNAなどの情報を含み、細胞間あるいは組織間の情報伝達を担っている。エクソソームは血液だけでなく、脳脊髄液・唾液・尿・関節液・気管支肺胞洗浄液など様々な体液中に放出されている。体液中のエクソソームの持つ情報を解析することによるリキッドバイオプシーで、癌や神経疾患の診断が可能になる時代が近づいている。

これまで鼻腔洗浄液における細胞外小胞について検討した報告は極めて少ない。鼻腔洗浄液の採取は、採血や気管支洗浄液・脳脊髄液に比べて、容易に低侵襲で行える利点があり、簡便で安価な診断法の開発につながる可能性がある。鼻腔洗浄液中の細胞外小胞の検出と解析は、血液検査ではとらえることのできない鼻副鼻腔局所病変の新しい評価法として役立つことが考えられた。鼻腔には脳神経で唯一外界に細胞が暴露される嗅上皮が存在するが、嗅神経細胞由来のエクソソームについての報告もまだない。また、鼻副鼻腔新患でのエクソソームの機能についての報告はわずかで、難治性疾患である好酸球性鼻副鼻腔炎の病態とエクソソームを含む細胞外小胞の関連も明らかではない。

2. 研究の目的

本研究の目的の一つは、鼻腔洗浄液を用いて鼻腔粘膜におけるエクソソームを含む細胞外小胞の収集・測定法を確立し、鼻腔洗浄液中のエクソソームを利用したリキッドバイオプシーの可能性を探索することである。また、もう一つの目的は、好酸球と鼻茸線維芽細胞の共培養を用いて、好酸球性鼻副鼻腔炎における細胞外小胞の機能を検討し、エクソソームが治療のターゲットになり得るか検討することである。

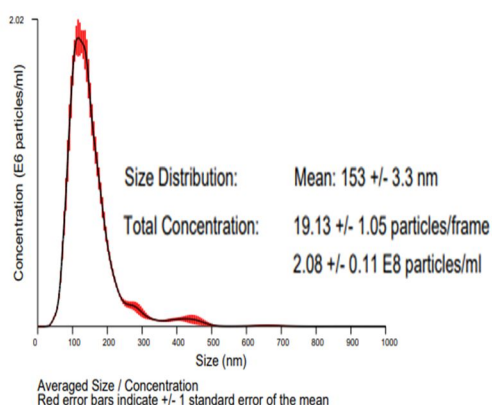


3. 研究の方法

鼻科手術を受けた患者の鼻腔を生理食塩水で洗浄し、洗浄液を回収した。鼻腔洗浄液中のエクソソーム濃度をELISA法で測定した。一部の検体では、鼻腔洗浄液からMag Capture エクソソームアイソレーションキット PS Ver.2 (Wako)を用いてエクソソームを単離・精製した。NanoSightによるNano Tracking Analysisによって、回収したナノ粒子の粒子径と粒子濃度分布を測定した。鼻腔洗浄液中エクソソーム由来の蛋白のショットガン解析をおこなった。

末梢血好酸球あるいは好酸球性細胞株 EoL-1 細胞と好酸球性鼻副鼻腔炎患者の鼻茸線維芽細胞の共培養を行った。

各細胞単独あるいは共培養時の上清中のエクソソームとVEGF濃度をELISA法で測定した。共培養時のエクソソームとVEGF濃度の経時的な変化を観察した。また、鼻茸線維芽細胞を7日間培養し、放出された細胞外小胞を回収し超遠心法で回収した。Nano Tracking Analysisにより粒子径と粒子濃度分布を確認した。線維芽細胞から回収した細胞外小胞をEoL-1細胞に加え、上清中のVEGF濃度を測定した。最後に、エクソソーム阻害薬の共培養時のエクソソームおよびVEGF濃度に対する効果を検討した。



4. 研究成果

鼻科手術を受けた患者9名の鼻腔洗浄液を回収し、鼻腔洗浄液中のエクソソーム濃度をELISA法で測定した。計測したすべての検体でエクソソームが検出された(図1)。

一部の検体で、鼻腔洗浄液から Mag Capture エクソソームアイソレーションキット PS Ver.2 (Wako) を用いてエクソソームを単離・精製した。ナノサイト解析により粒子径と粒子濃度分布を測定した(図2)。粒子径の平均は 153 ± 3.3 nmであった。鼻腔洗浄液からエクソソームが回収でき、プロテオーム解析に十分な量の蛋白を抽出できていることをBCAアッセイで確認した。回収したエクソソームから抽出した蛋白のショットガン解析により、エクソソームマーカーであるCD9、CD63、CD81が検出されていることを確認した。また、鼻腔で回収するエクソソームには嗅覚系を介した中枢神経系の細胞由来のエクソソームも含まれることを予想していたが、脳に特異的に発現する蛋白が鼻腔のエクソソームに含まれていることも確認できた。今後さらに解析をすすめる予定である。

培養細胞を用いた検討では、末梢血好酸球あるいは好酸球性細胞株EoL-1細胞と好酸球性副鼻腔炎患者の鼻茸線維芽細胞の共培養を行った。共培養によって上清中のエクソソームとVEGF濃度が各細胞単独の培養時と比較して増加した(図3)。共培養開始後3時間の比較的早期からエクソソームとVEGF濃度の上昇が生じていた。鼻茸線維芽細胞から放出される細胞外小胞を超遠心法で回収し、ナノサイト解析により粒子径と粒子濃度分布を確認した(図4A)。さらに走査電子顕微鏡で細胞外小胞の形態を確認した(図4B)。線維芽細胞から回収し濃縮した細胞外小胞をEoL-1細胞に加えると上清中のVEGF濃度が上昇した(図4C)。一方、エクソソーム阻害薬で前処置した鼻茸線維芽細胞を用いて共培養すると、エクソソームおよびVEGF産生を共に抑制した(図5)。以上の結果から、好酸球と鼻茸線維芽細胞の細胞間相互作用によってVEGF産生が生じ、その機序にエクソソームが関与することがわかった。

本研究では、ヒト鼻腔洗浄液中からエクソソームを分離できること、そのエクソソームからプロテオーム解析に用いるために十分な蛋白が抽出できることを確認した。鼻腔洗浄液中のエクソソームを用いたリキッドバイオプシーが可能であることが確認できた。今後解析結果から病態との関連についてさらに検討する予定である。また、培養細胞を用いた検討では、新しい細胞間情報伝達物質として、エクソソームを含む細胞外小胞が好酸球性副鼻腔炎の組織リモデリングに関与することを示した(文献1)。

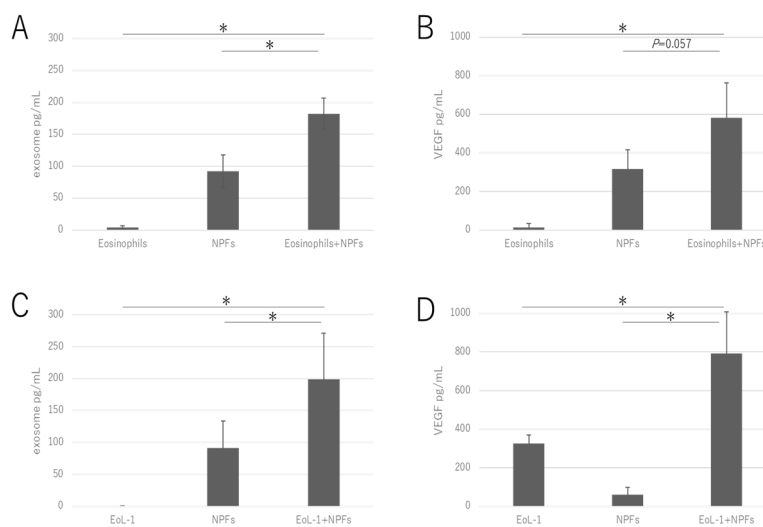


図3 共培養上清中のエクソソーム・VEGF濃度

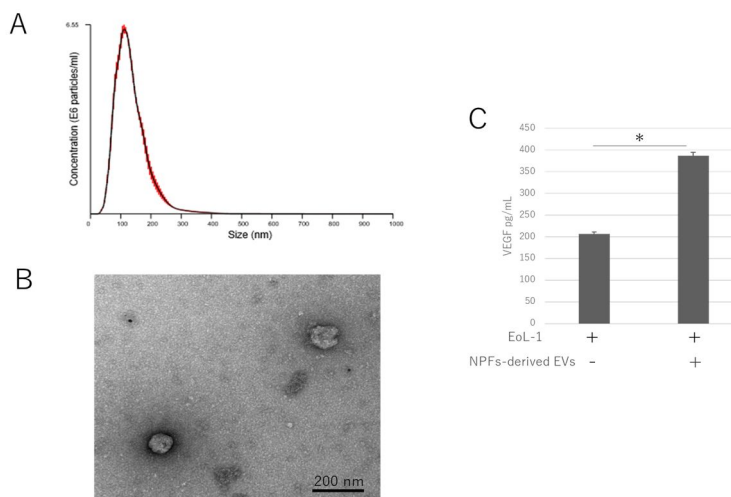


図4 鼻茸線維芽細胞由来の細胞外小胞

<文献>

1. Shino Shimizu, Ichiro Tojima, Keigo Nakamura, Hiroyuki Arai, Hideaki Kouzaki, Takeshi Shimizu. Nasal polyp fibroblasts (NPFs)-derived exosomes are important for the release of vascular endothelial growth factor from cocultured eosinophils and NPFs. *Auris Nasus Larynx* 49(3), 407-414. 2022

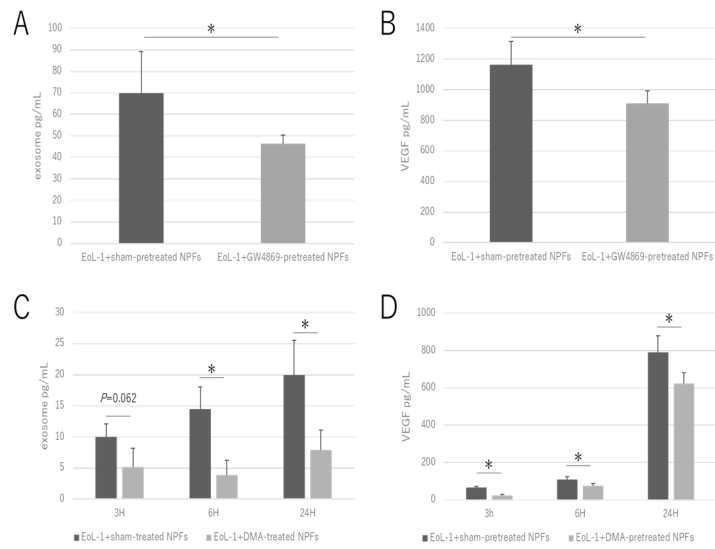


図5 エクソソーム阻害剤の効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shino Shimizu, Ichiro Tojima, Keigo Nakamura, Hiroyuki Arai, Hideaki Kouzaki, Takeshi Shimizu	4. 巻 49
2. 論文標題 Nasal polyp fibroblasts (NPFs)-derived exosomes are important for the release of vascular endothelial growth factor from cocultured eosinophils and NPFs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Auris Nasus Larynx	6. 最初と最後の頁 407-414
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anl.2021.10.002	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水志乃、戸嶋一郎、中村圭吾、神前英明、清水猛史
2. 発表標題 好酸球と鼻茸線維芽細胞の細胞間相互作用におけるエクソソームの役割について
3. 学会等名 第122回日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会
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
---------	---------