

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23743

研究課題名(和文)母体免疫細胞と胎児脳神経系を結ぶエクソソーム解析

研究課題名(英文)Exosome analysis linking maternal immune cells and fetal brain nervous system

研究代表者

星野 歩子 (Hoshino, Ayuko)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：00819964

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：自閉症の子を持つ母親の血漿由来エクソソームのプロテオミクス解析を行い、健常児の母と自閉症児の母では血液中のエクソソーム含有タンパク質組成が異なることがわかった。さらに、このエクソソームは妊娠マウスへ投与すると母体から胎児へ取り込まれることがわかった。この現象には胎盤関門をエクソソームが通り抜ける必要があり、そこには血管透過性の上昇に関わる機構も介在することがわかった。さらに、自閉症児の母親由来エクソソームの質が健常児の母由来エクソソームと異なる理由として血液中の細胞が関わることも本研究によりわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自閉症は年々増加傾向にある神経発達障害であり、現在その診断方法、予防法、そして治療法は確立していない。本研究で、我々はこれまでに注目されてきていない血液内のエクソソームに着目して、それが予測診断に使用できる方法、そしてその差が病態発症に関わる可能性とそれをターゲットにした治療法の開発を将来的には考えている。本研究はこれまでは考えられて来なかった自閉症の病態発症の新たな機構を解明することができると考えており、学術的意義だけでなく社会的意義が非常に高い研究成果が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：From this study, we have found that exosomal protein cargo differs between mother who has children with Autism and mother who has neurotypical children. We further elucidated that those exosomes, when injected in pregnant mice, are uptaken by embryo. This data reveals that maternal exosomes are capable of passing through placental barrier and could potentially effect embryonic development. We further determines that specific bone marrow derived cells in maternal body are responsible for the exosomal cargo differences between mother with Autistic child and neurotypical child.

研究分野：エクソソーム生物学

キーワード：エクソソーム 自閉症 母胎連関

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

発達障害のひとつである自閉スペクトラム (ASD) は、生まれつきの脳の機能障害が原因だと考えられているが、その詳細は未だ解明されていない。申請者はこれまで、がん転移先がどの様に規定されており、どんな変化が未来転移先で起きているのか、そのコミュニケーションツールとして「エクソソーム」と呼ばれる細胞外小胞に焦点を当てた研究を行ってきた。本研究は、ASD の病態についてエクソソームを母胎間媒体とした作業仮説を挙げ、「**母体と胎児の間をエクソソームが往来し、胎児の脳発達に影響をもたらすか**」を検証する。

2. 研究の目的

本研究では、ニューロン形成期であるマウス胎仔期に母体由来のエクソソームが胎仔の脳内へ取り込まれることで脳神経の形質変化、そしてそれ故の機能障害がもたらされている可能性を検討する。また、ASD 児の母親の末梢血中 B 細胞の subtype および subtype 別エクソソームを解析しそれがマーカーとして有用であるか、並びにそれらのエクソソームが母体の免疫細胞と胎仔を結び、胎仔の脳における機能や病態に関与するかを調べる。

3. 研究の方法

本研究ではヒトの血漿サンプルを用いて、ASD 児および健常児の母親の血漿由来エクソソームを分離し、ラベリングして妊娠マウスへ静脈および腹腔内投与し、マウス胎仔の脳内へのエクソソーム分布を調べる。その際マウス胎仔期のどの時期に最も取り込みが盛んであるかを検討するため、投与時期を、胎仔の脳における増殖期、ニューロン分化期、およびグリア分化期に分けて解析する。

さらに、ASD 児と健常児の母親由来エクソソームでマウス胎仔脳内に取り込まれる量と細胞の種類にも差があるかどうかを調べる。また、エクソソーム取り込み後の細胞がどの様にエクソソームの影響を受けて変化しているかを調べるため、RNAseq による遺伝子解析を行う。これにより、エクソソームを微量に取り込んだ細胞の変化も捉えられる可能性があり、ASD の病態に関わる現象に迫る解析が期待できる。加えて、このエクソソームが胎仔の脳に取り込まれた後に胎仔の脳神経発生に与える影響だけでなく ASD 児様の動態を示すかを behavior 実験を行い調べていく。既に申請者は事前データとして、ASD 児をもつ母親の血漿由来エクソソームが健常児の母親由来エクソソームに比べて含有タンパク質に違いがあることを見出している。その中で、多くの免疫グロブリンタンパク質に差があり母体の免疫細胞、特に免疫グロブリンタンパク質を産生する B 細胞の組成・機能に違いがあることで、産生されるエクソソームに含まれるタンパク質が異なることが考えられる。本研究では、母体の免疫細胞、特に B 細胞の活性状態が健常児の母体と異なることでエクソソーム含有タンパク質に変化がもたらされ、それが胎仔の脳へ取り込まれることが ASD の病態に関わる可能性を検討する。すなわち、母体の免疫細胞と胎仔の脳神経細胞をエクソソームが媒介する多臓器連関を調べる。

母体の B 細胞分画を調べるために、ASD 児および健常児の母親の末梢血の白血球分画(単球・顆粒球・リンパ球)を flow cytometry により解析する。リンパ球内の B 細胞を 10 種類の分画に区分し、B 細胞のどの subtype が血中内に多いかを調べ、FACS により B 細胞分画を単離培養してそのエクソソームを回収する。各分画由来のエクソソームに含まれるタンパク質の組成をプロテオミクス解析により調べ、それが ASD 児および健常児の母親でみられる差と相関があるかを検討する。また、B 細胞分画由来のエクソソームを妊娠マウスへ投与し胎児の脳へのエクソソームの取り込みを調べる。胎仔脳内への取り込み量が高い B 細胞分画由来エクソソームのプロテオミクス解析から、接着分子など他の分画と有意に差があるタンパク質を調べ抗体などを使い阻害実験を行うことで母親由来エクソソームの胎児脳内への取り込みを抑制できるか検討する。

4. 研究成果

発達障害のひとつである自閉症スペクトラムは生まれつきの脳の機能障害が原因だと考えられているが、その詳細はいまだ解明されていない。申請者はこれまで、がん転移先がどの様に規定

されており、どんな変化が未来転移先で起きているのか、そのコミュニケーションツールとしてエクソソームと呼ばれる細胞外小胞に焦点を当てた研究を行ってきた。本研究は自閉症の病態について母体と胎児の間をエクソソームが往来し、胎児の脳発達に影響をもたらすか検証を行った。

自閉症の子を持つ母親の血漿由来エクソソームのプロテオミクス解析を行い、健常児の母と自閉症児の母では血液中のエクソソーム含有タンパク質組成が異なることがわかった(図1)。さらに、このエクソソームは妊娠マウスへ投与すると母体から胎児へ取り込まれることがわかった。この取り込みについては胎児の細胞がコンスタントに分裂していることから、これまでに見られる様な核膜付近に集積する、という取り込まれ方とは異なり細胞質全体に取り込みが確認できた。また、取り込み臓器の局在はまだできていないが、少なくとも胎児脳への母由来エクソソームの集積は確認できた。この現象には胎盤関門をエクソソームが通り抜ける必要があり、そこには血管透過性の上昇に関わる機構も介在することがわかった。さらに、行動実験により、自閉症児母由来エクソソーム

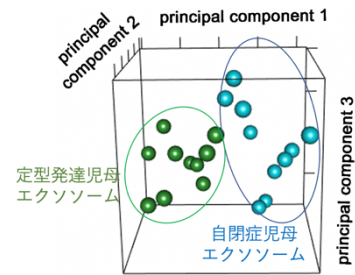


図1 プロテオミクス解析により自閉症児および定型発達児母の血漿由来エクソソーム含有タンパク質が異なることがわかった。

を投与した妊婦マウスの仔マウスはPBS投与、もしくは定型発達児母由来エクソソーム投与群に比べて自閉症様行動を示すことがわかった。具体的には、超音波発生量の有意な減少、そして自閉症児で知られている常同行動を模倣するマーブルベアリングアッセイでは反復行動への有意な増加が観察された(図2)。また現在追加測定中ではあるが、社会性を測るスリーチャンバーアッセイでは社会的相互交渉の減少トレンドが観察された。この結果により、母胎連関を行うエクソソームがマウスの行動に影響を与え得るという衝撃的な結果が得られた。この現象自体、まだ世界的に発表された例はなく今後世界に先駆けて報告できるように進めていきたいと思っている。次に、自閉症児の母親由来エクソソームの質が定型発達児の母由来エクソソームと異なる理由として血液中の細胞に関わることも本研究によりわかった。

超音波発生量減少 (生後7日) **繰り返し行動増加 (生後70日)**

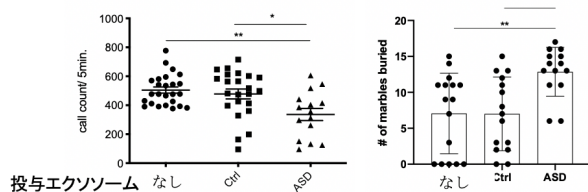


図2 自閉症児および定型発達児の母由来エクソソームを妊婦マウスへ投与しその仔マウスの行動を観察した結果、超音波発生量の有意な減少、そして反復行動を示すマーブルベアリングで有意な増加が認められた。

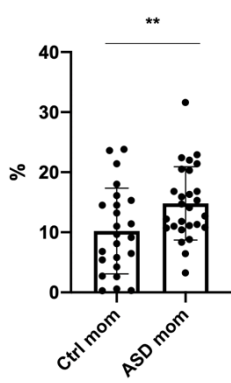


図3 血中のB細胞の割合をflow cytometerで測定した。自閉症児母(ASD mom)は定型発達児母(Ctrl mom)に比べてB細胞の割合が有意に高いことがわかった。

の結果、免疫グロブリンタンパク質について特に差があることがわかり、免疫グロブリンタンパク質の主な産生細胞となるB細胞の量について調べた。その結果、B細胞の割合が自閉症児の母親で有意に高いことがわかった(図3)。これまでに、自閉症児の母に関してはその炎症状態、特にT細胞の活性が原因であるとする研究報告はあるが、B細胞に着目した研究はなく、今後の展開が期待できると考えている。本研究により、母体血中エクソソームを解析することで胎児が将来自閉症になる可能性について言及できることが示唆された。また、その理由や機序が分かってくれば新たな治療戦略となることが期待できる。

スタートアップサポートにより、今後の発展が期待できるデータを数々生み出すことができた。自閉症児の病態発症機序、そしてその原因となる細胞種を今後さらに特定していくことで、将来的には自閉症の治療、そして予防も見据えた研究を進めていきたいと思っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rodrigues G*, Hoshino A*, Matei IR, Scandariato I, Kenific CM, Kim HS, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Tumour exosomal CEMIP protein promotes cancer cell colonization in brain metastasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1403-1412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41556-019-0404-4	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 該当する

1. 著者名 Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, Gyan KE, Cioffi M, et al.	4. 巻 182
2. 論文標題 Extracellular Vesicle and Particle Biomarkers Define Multiple Human Cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1044-1061
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cell.2020.07.009	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 該当する

1. 著者名 Bojmar L, Kim HS, Tobias GC, Pelissier Vatter FA, Lucotti S, Gyan KE, Kenific CM, Wan Z, Kim KA, Kim D, Hernandez J, Pascual V, Heaton TE, La Quaglia MP, Kelsen D, Trippett TM, Jones DR, Jarnagin WR, Matei IR, Zhang H, Hoshino A, Lyden D.	4. 巻 2
2. 論文標題 Extracellular vesicle and particle isolation from human and murine cell lines, tissues, and bodily fluids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xpro.2020.100225	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 がんにおけるエクソソームのプロテオミクス：転移に関わる機能分子とがん診断バイオマーカーの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 エクソソームによる病態寄与機構と疾患バイオマーカーの解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 がんにおけるエクソソームのプロテオミクス: 転移寄与分子とがん診断バイオマーカーの解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 Exosomal proteins in disease etiology and detection
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会 シンポジウム演者
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 Cancer exosomal protein signatures: mechanistic insights and biomarker potential
3. 学会等名 第4回バイオ医薬EXPO
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 エクソソーム含有タンパク質によるがん診断と転移促進機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 Exosomal proteins: Roles in cancer detection and pre-metastatic niche formation
3. 学会等名 Exchange Program Seminar between France and Japan: Frontiers of stem cell and organoid technology: From Basic to Bedside
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 星野歩子
2. 発表標題 エクソソームによる病態寄与機構と疾患バイオマーカーの解析
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉浦圭、橋本彩子、星野歩子	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 4
3. 書名 実験医学2020年4月号 脳転移性がん細胞由来エクソソーム中のタンパク質CEM1PIはがん脳転移を促進する	

〔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
---------	---------