

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22708

研究課題名（和文）内在性ウイルスエンベロープを介したエクソソーム輸送機構に基づく胎盤への薬物送達

研究課題名（英文）Human endogenous retrovirus envelope protein-mediated transport system of placenta-derived exosomes in human placental trophoblasts

研究代表者

稲垣 舞（INAGAKI, Mai）

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（薬学域）・助教

研究者番号：90878274

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）：ヒト胎盤栄養膜細胞におけるエクソソームを介した高分子輸送の仕組みを解明することは、近年新たな創薬モダリティとして注目されている核酸やタンパク質医薬を用いた、効果的な胎盤治療を実現させるために重要である。本研究は、ヒト胎盤由来エクソソームの胎盤栄養膜細胞への取り込みには、少なくとも一部に、シアル酸結合受容体やヘパラン硫酸プロテオグリカン、細胞膜融合因子であるMFSDが関与することを明らかにした。本研究から、ヒト胎盤栄養膜細胞におけるエクソソーム輸送経路を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、エクソソームをキャリアーとして用いた、胎盤栄養膜細胞への高分子薬送達の学術的基盤を構築した。本研究成果は、内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質の膜融合能を利用した、ヒト胎盤組織へのエクソソーム送達システムの構築や、高分子医薬による「胎盤治療」を軸とした、妊娠合併症に対する治療薬の開発戦略に貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Clarifying transport system of exosomes in human placental trophoblasts is important to develop the placental drug delivery system for large molecule, such as peptides and nucleic acids, which would lead to the development of new therapy for pregnancy-specific diseases. The present study has revealed that placenta-derived exosomes are taken up by human placental trophoblasts via sialic acid-binding receptors and heparan sulfate proteoglycans. Moreover, MFSD would function as a receptor of exosomes in human placental trophoblasts. Here, we show the transport system of placenta-derived exosomes in human placental trophoblasts.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：胎盤 胎盤栄養膜細胞 エクソソーム

# 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

母体と胎児をつなぐ胎盤は、物質輸送システムによる胎児への栄養供給や、多様なホルモン分泌を担うことで、胎児の発育や母体の妊娠維持に必須の役割を果たす。胎盤機能の中心的役割を担うのが、胎盤栄養膜細胞であり、その機能破綻は、早産・過期産や、妊娠高血圧症などの妊娠合併症を引き起こす。従って、胎盤栄養膜細胞に薬物を効率的に送達させ、胎盤機能を回復させる治療(胎盤治療)法の開発は、未だ対症療法にとどまっている産科医療に突破口を拓く可能性が高い。近年新たな創薬モダリティとして注目されている核酸医薬やタンパク質医薬を用いた、効果的な胎盤治療を実現させるためには、胎盤栄養膜細胞における高分子輸送の仕組みを解明し、それらの知見に基づいて胎盤を輸送標的とした薬物送達システムを確立することが必須である。

エクソソーム(細胞外小胞)は、標的指向性を有し、核酸やタンパク質などの高分子を内包する特徴を持つことから、標的組織へ高分子薬物を送達させるためのキャリアーとして注目されている。研究代表者は、胎盤に特異的な知見「胎盤栄養膜細胞には、太古の時代にウイルス感染によって宿主ゲノムに組み込まれた配列に由来する、エンベロープタンパク質(=内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質:HERV-Env)が、高レベルで発現し、細胞同士の膜融合(=合胞体化)に関与する。」に着目した。そこで研究代表者は、エンベロープタンパク質は、元来、宿主細胞から放出されるウイルス粒子の外殻に存在し、細胞への侵入に関与すること、胎盤栄養膜細胞から放出されたエクソソームは、再び栄養膜細胞に取り込まれること(FASEB J 28:3703-19, 2014)を踏まえ、「胎盤の栄養膜細胞におけるエクソソームの内在化と膜融合には、胎盤特異的に発現する内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質を介した細胞同士の膜融合と、共通の分子機構が関与する」との仮説を立てた。胎盤栄養膜細胞同士の膜融合(=合胞体化)は、胎盤形成・成熟期である妊娠中期を中心として、妊娠期全体を通して胎盤にみられる特異的な現象であることから、内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質を介した、エクソソームの内在化・膜融合機構の解明は、胎盤への薬物送達開発における合理的戦略であると考え、本研究を着想した。

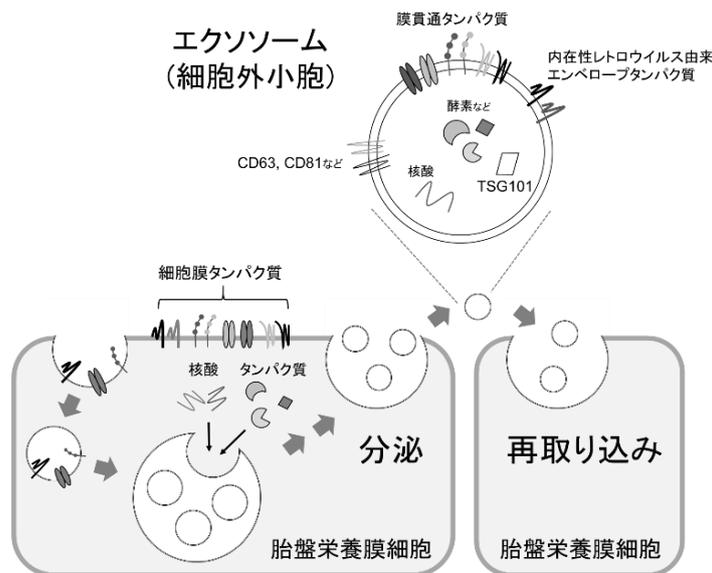


図1. ヒト胎盤栄養膜モデル細胞由来エクソソームの再取り込み機構

## 2. 研究の目的

本研究は、胎盤から分泌されるエクソソームの胎盤栄養膜細胞への再取り込み機能(図1)に着目し、仮説「胎盤栄養膜細胞における、栄養膜細胞由来エクソソームの内在化と膜融合には、胎盤特異的に発現する内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質を介した細胞同士の膜融合と、共通の分子機構が関与する」を実証し、エクソソームを介した胎盤への高分子輸送の仕組みを解明することを目的とする。具体的には、(1)質量分析による網羅的プロテオミクス解析を用いて、ヒト胎盤栄養膜モデル細胞の細胞膜画分及びエクソソーム画分における内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質とその受容体タンパク質の発現アトラスを構築するとともに、(2)(1)で検出された受容体タンパク質について、ヒト胎盤栄養膜細胞へのエクソソーム内在化に果たす役割を解明することを目標とした。最終的には、エクソソームをキャリアーとして用いた、胎盤栄養膜細胞への高分子薬送達の学術的基盤を構築することを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 網羅的プロテオミクスによる、ヒト胎盤栄養膜モデル細胞の細胞膜及びエクソソーム構成タンパク質の発現アトラスの作製

フォルスコリン含有培地で培養することで、cAMP依存性タンパク質リナーゼシグナルの活性化によって膜融合を誘発したヒト胎盤栄養膜モデル細胞株(BeWo細胞及びJEG-3細胞)から、密度勾配超遠心分離によって細胞膜を分画した。ヒト胎盤栄養膜細胞株の培養上清から、超遠心分離法を用いて、エクソソーム(細胞外小胞)を単離し、ゼータサイザーを用いて粒子径を解析した。各画分をトリプシン消化後、網羅的定量プロテオミクス解析を行い、胎盤栄養膜細胞の細胞膜及びエクソソームにおける発現分子を相対定量した。

## (2) ヒト胎盤栄養膜モデル細胞におけるヒト胎盤由来エクソソームの輸送機能解析

PKH67 で蛍光標識したヒト胎盤栄養膜モデル細胞由来エクソソームを、ヒト胎盤栄養膜モデル細胞に添加し、37℃で6時間インキュベートした。取り込み活性は、cell-to-medium ratio を算出することで評価した。エクソソームのヒト胎盤栄養膜モデル細胞内在化における膜タンパク質の寄与の解析には、RNA 干渉によるノックダウン法を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) JEG-3 細胞と BeWo 細胞を構成する膜タンパク質の同定

網羅的プロテオミクス的手法を用いて、世界的に汎用される 2 大ヒト栄養膜細胞株 (BeWo 及び JEG-3 細胞) に発現する膜タンパク質を網羅的に定量した。プロテオミクス解析の結果、BeWo 細胞の細胞膜画分と JEG-3 細胞の細胞膜画分に共通して発現する 5,046 分子の膜タンパク質を同定した (図 2)。細胞膜融合因子である内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質 (Syncytin-1 及び Syncytin-2) は、BeWo 細胞及び JEG-3 細胞共に発現しており、その発現は、JEG-3 細胞と比較して、BeWo 細胞において高いことが示された。

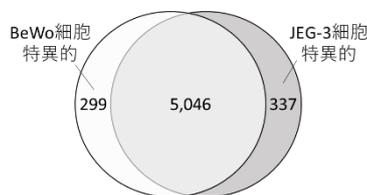


図2. ヒト胎盤栄養膜モデル細胞(BeWo細胞、JEG-3細胞)を構成する膜タンパク質

### (2) ヒト胎盤栄養膜細胞由来エクソソーム画分の評価

ヒト胎盤栄養膜モデル BeWo 細胞の培養上清から、超遠心分離法を用いて単離したエクソソーム画分の平均粒子径は約 140 nm、ゼータ電位は約-35 mV であった。プロテオミクス解析の結果、エクソソームのマーカーである、tumor susceptibility gene 101 protein (TSG101)、CD63、CD81 の発現が、BeWo 細胞膜画分と比較して、5 倍以上高いことが示され、エクソソームの精製が示された。

### (3) ヒト胎盤栄養膜モデル細胞におけるヒト胎盤由来エクソソームの輸送機能解析

BeWo 細胞培養上清から単離したエクソソームを PKH67 で蛍光標識し、BeWo 細胞自身への取り込み活性及び温度依存性を解析した。エクソソームの細胞内取り込みは、37℃と比較して、4℃において有意に低下し、さらには、10 倍量の非標識エクソソーム存在下において、有意に活性が低下することを明らかにした。以上から、胎盤栄養膜細胞内へのエネルギー依存的なエクソソーム取り込み機構が関与することが示唆された。

これまでに、ウイルス粒子の内在化、がん細胞由来エクソソームや間葉系幹細胞由来エクソソームの内在化において、シアル酸結合糖鎖やヘパリン硫酸プロテオグリカンが関与することが報告されている (*Mol Cancer Res* 17:337-347, 2019; *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:17380-5, 2013)。そこで、BeWo 細胞へのエクソソーム取り込みにおける、シアル酸結合糖鎖やヘパリン硫酸プロテオグリカンの関与を検討した。BeWo 細胞へのエクソソーム取り込み活性は、シアル酸及びヘパリン共存下で、それぞれ有意に阻害されたことから、ヒト胎盤由来エクソソームの、BeWo 細胞への輸送機構には、少なくとも一部に細胞膜表面に発現するシアル酸結合糖鎖やヘパリン硫酸プロテオグリカンが関与することが示された。さらに、阻害剤共存下における取り込み解析から、ヒト胎盤栄養膜由来エクソソームの栄養膜細胞への取り込みには、一部クラスリン介在性エンドサイトーシス機構が関与することが示唆された。

プロテオミクス解析から、フォルスコリン処理を行うことで細胞膜融合を誘導した BeWo 細胞では、細胞膜融合因子である内在性レトロウイルスエンベロープタンパク質 (Syncytin-1 及び Syncytin-2) の発現が亢進し、内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質は、細胞膜画分と比較して、エクソソーム画分において濃縮的に発現していることを明らかにした。さらに、フォルスコリンを添加することで、膜融合を誘導した BeWo 細胞から単離したエクソソームは、非添加 BeWo 細胞から単離したエクソソームと比較して、BeWo 細胞への取り込み活性が有意に高いことが示された。これらの結果から、胎盤由来エクソソームの胎盤栄養膜細胞への内在化には、エクソソーム上の内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質が関与する可能性が示された。

膜タンパク質である CD98 や MFSD は、内在性レトロウイルス由来エンベロープタンパク質の受容体として、胎盤栄養膜細胞同士の膜融合に関与することが報告されている (*J Physiol* 550:3-9, 2003; *Proc Natl Acad Sci USA* 105:17532-7, 2008)。そこで、BeWo 細胞上のエクソソームの受容体タンパク質として、CD98 や MFSD のエクソソーム取り込みにおける寄与を検討するために、siRNA ノックダウンを行った。その結果、CD98 については、有意な取込み活性の低下は示されず、CD98 の寄与は低いことが示唆された。一方で、2 種類の MFSD ファミリー膜タンパク質については、エクソソームの取り込みが有意に変動することが示された。以上の結果から、ヒト胎盤栄養膜由来エクソソームの栄養膜細胞への取り込みには、一部に細胞膜融合因子である MFSD が関与することが示された。

以上の結果 (1) ~ (3) から、ヒト胎盤栄養膜細胞における胎盤由来エクソソーム輸送経路を同定することができた。

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 1件）

1. 著者名 Inagaki Mai, Tachikawa Masanori	4. 巻 70
2. 論文標題 Transport Characteristics of Placenta-Derived Extracellular Vesicles and Their Relevance to Placenta-to-Maternal Tissue Communication	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 324 ~ 329
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/cpb.c22-00072	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲垣舞、佐野陽乃里、中野瑛介、登美斉俊、立川正憲
2. 発表標題 ヒト胎盤絨毛細胞株BeWo細胞由来エクソソームのヒト脳血管内皮細胞（hCMEC/D3）への内在化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲垣舞、立川正憲
2. 発表標題 胎盤治療の基盤としての胎盤関門・細胞外小胞輸送システム
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野瑛介、稲井美紅、稲垣舞、立川正憲
2. 発表標題 ヒト胎盤栄養膜細胞（BeWo細胞）由来細胞外小胞の胎盤への再取り込み輸送機構の解明
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
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
---------	---------