

令和 2 年 5 月 23 日現在

機関番号：15401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2017～2019
課題番号：17K07381
研究課題名（和文）一次繊毛由来細胞外小胞（pc-ECV）の生理機能解析

研究課題名（英文）Analysis of physiological function of pc-ECV

研究代表者

池上 浩司（IKEGAMI, KOJI）

広島大学・医系科学研究科（医）・教授

研究者番号：20399687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：一次繊毛由来細胞外小胞を特異的に濃縮精製する方法を確立し、また一次繊毛由来細胞外小胞を特異的に放出しなくなる培養細胞株を樹立し、一次繊毛由来細胞外小胞の生理機能を検証できる実験系を確立することに成功した。これらの手法を駆使し、実際に一次繊毛由来小胞が標的細胞に取り込まれること、その結果として標的細胞の細胞移動が亢進することを見出すことに成功した。これらの方法論および発見の一部は国際科学雑誌、和文科学雑誌、各種学会において報告された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新しい細胞間コミュニケーションツールとして機能する一次繊毛由来細胞外小胞の一側面が明らかになったことは、基礎生命科学の中でも細胞生物学に留まらず古典的な内分泌学にも新しい影響を与えうるとわれ学術的意義が期待できる。また、一次繊毛由来細胞外小胞を濃縮精製する方法の確立、一次繊毛由来細胞外小胞の細胞内への取り込みの実証は、その医学・薬学など広い分野における産業利用に向けた基盤になる可能性もあり社会的意義が期待できる。

研究成果の概要（英文）：We established a method to specifically concentrate and purify primary cilia-derived extracellular vesicles and established a cell line that does not specifically release primary cilia-derived extracellular vesicles, and succeeded in establishing an experimental system that can verify the physiological functions of primary cilia-derived extracellular vesicles. By making full use of these methods, we succeeded in finding that primary cilia-derived vesicles were actually taken up by the target cells and that the cell migration of the target cells was enhanced as a result. These methodologies and findings have been reported in international scientific journals, Japanese language science journals, and various academic conferences.

研究分野：細胞生物学

キーワード：一次繊毛 細胞外小胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 研究開始当初、細胞から放出される細胞外小胞 (ECV) が基礎生命科学や医学など幅広い分野で非常に大きな注目を集めていた。とりわけ、ECV 中のエクソソーム (exosome) は、その内容物としてマイクロ RNA (miRNA) が見つかるなど、細胞間コミュニケーションにおける『シグナルパッケージ』としての役割が明らかになりつつあり、実際に、癌の転移に exosome が寄与していることなどが明らかされていた。
- (2) このような ECV 研究の目覚ましい進歩にもかかわらず、体内で放出される ECV の由来や放出源が完全に理解されているわけではなかった。また、超遠心による濃縮や限られたマーカーによる精製に頼っている現状では、由来の異なる“ヘテロな” ECV を解析することになり、個々の ECV の機能を正確に理解することを難しくしていた。さらに、特定の ECV の放出を特異的に阻害する実験系が確立していない点も問題となっていた。
- (3) 研究代表者は、研究開始当初までに細胞の表面に突出する一次繊毛の先端が切り取られ、ECV として細胞外に放出されることを見出した。さらに、一次繊毛由来 ECV (pc-ECV) の内容物を高精度に解析する手法として、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術で作出した一次繊毛を持たない細胞を対照とした differential proteomics の系を確立した。これらの成果により、細胞から放出された pc-ECV の機能を特異的に解析する本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

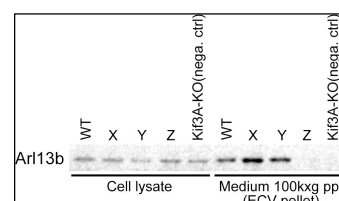
- (1) ECV の定義は非常に広く、由来や放出源の異なるものが一緒に扱われ議論されていることが多い。ECV の機能を深く理解するためには、由来や放出源を特定した、より特異的な解析が望まれる。申請者は細胞の表面に突き出た『一次繊毛 (primary cilia)』から ECV が放出される現象を発見し、特異的かつ高精度でその内容物を解析する手法を確立した。本研究では、新しいタイプの ECV である一次繊毛由来 ECV (pc-ECV) について、細胞間コミュニケーションツールとしての生理学的機能を細胞レベルで解明することを目指した。

3. 研究の方法

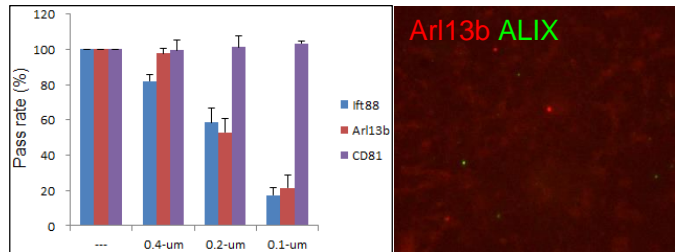
- (1) 市販の一般的な細胞株を用い、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を介した複数の遺伝子破壊株を作成した。作成した遺伝子破壊株の培養上清から超遠心法により細胞外小胞を沈殿濃縮し、一次繊毛に局在する Arl13b, Ift88 を指標に培地中に放出されて一次繊毛由来細胞外小胞の量を解析した。
- (2) 一次繊毛由来細胞外小胞とエクソソームなどの他の細胞外小胞を分離する方法を検討するために、メンブレンフィルターを用いた小胞の粒子径の検討を行った。さらにサイズ排除クロマトグラフィーを用いた細胞外小胞の分離精製法を検討した。得られた細胞外小胞はそれぞれのマーカーで免疫染色し、組成の区別の可否を検証した。
- (3) 市販の一般的な細胞株に加えて、マウス線維芽細胞由来の細胞を用いて CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を介して一次繊毛形成に必須なタンパク質群をコードする遺伝子破壊株を作成した。作成した遺伝子破壊株および正常 (野生型) 細胞株の培養上清から超遠心法により細胞外小胞を沈殿し、培地に再懸濁した細胞外小胞濃縮液を作成した。一次繊毛の生えていない遺伝子破壊株、すなわち一次繊毛由来細胞外小胞を放出できない細胞株を細胞外小胞濃縮液 (一次繊毛由来細胞外小胞; 含・不含) 各々で処理し、細胞の応答を解析した。一次繊毛由来細胞外小胞とエクソソームの放出に寄与する遺伝子の破壊株について細胞外小胞の細胞内局在を解析した。
- (4) 一次繊毛を欠損した線維芽細胞株を、一次繊毛を持つ細胞株と一次繊毛を欠損した細胞株の馴化培養液、一次繊毛を持つ細胞株と一次繊毛を欠損した細胞株の馴化培養液から超遠心法を用いて調製した濃縮細胞外小胞溶液でそれぞれ処理し、細胞株の挙動を検証した。

4. 研究成果

- (1) 遺伝子破壊株を作成した結果、遺伝子 Z のノックアウトによって一次繊毛由来細胞外小胞の放出が顕著に阻害されることが明らかとなった (右図: Z)。さらに、逆に遺伝子 X のノックアウトによって一次繊毛由来細胞外小胞の放出が亢進することが明らかとなった (右図: X)。

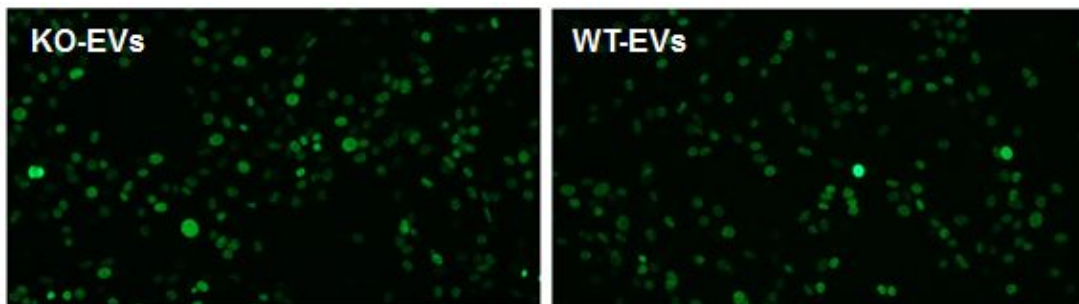
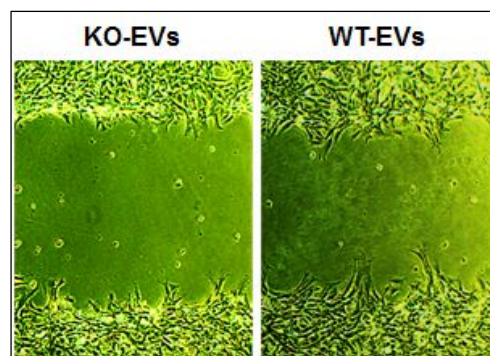


(2) メンブレンフィルターを用いた粒子径解析の結果, CD81 陽性のエクソソームは容易に直径 $0.1\mu\text{m}$ の小孔を通過するのに対し, Arl13b や Ift88 陽性の一次繊毛由来細胞外小胞は $0.2\mu\text{m}$ の小孔で半分程度トラップされた(右グラフ). この結果より, 一次繊毛由来細胞外小胞は粒子径を指標に容易にエクソソームと分離して濃縮精製できることが明らかとなった. さらに, 培地中に放出された細胞外小胞を基質膜上にトラップして免疫染色した結果, Arl13b 陽性の一次繊毛由来(右上図: 赤の粒子)はエクソソームのマーカの一つである ALIX(右上図: 緑の粒子)を含まなかった. この結果より, 一次繊毛由来細胞外小胞は組成としてもエクソソームと区別することができることが明らかとなった. これらに加えて, 極めて顕著な極性構造を持つ上皮細胞の頂端面と基底面から放出される細胞外小胞の組成を詳しく解析した結果, エクソソームと一次繊毛由来細胞外小胞を分離できることが明らかとなり, 新しい一次繊毛由来小胞濃縮法の確立に成功し, 同時にエクソソームの大量生成法の確立にも成功した.



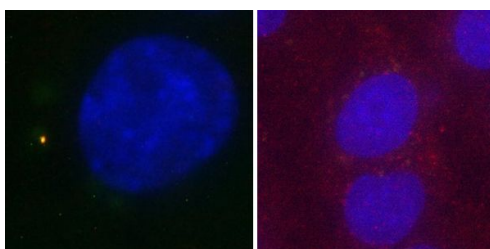
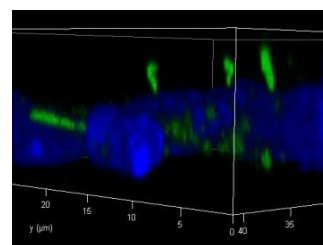
Arl13b ALIX

(3) 一次繊毛を持つ細胞株 (WT 細胞株) および一次繊毛を欠損した細胞株 (Kif3a ノックアウト細胞株) そこから濃縮した細胞外小胞溶液 (WT-EVs, KO-EVs) を調製し, 一次繊毛細胞外由来小胞を放出できない細胞株 (Kif3a ノックアウト細胞株) をそれぞれの細胞外小胞濃縮溶液で処理した結果, 一次繊毛由来細胞外小胞を含む WT-EVs で処理された細胞で細胞の移動が亢進した(右図: WT-EVs 処理群). この時, 細胞分裂の亢進作用を Ki67 の発現状態によって検証した結果, 一次繊毛由来細胞外小胞を含む細胞外小胞濃縮溶液 (WT-EVs) と一次繊毛由来細胞外小胞を含まない細胞外小胞濃縮溶液 (KO-EVs) との間で, 細胞外小胞濃縮溶液を処理された細胞の Ki67 陽性細胞の数や比率, すなわち細胞の増殖に顕著な差は認められなかった(下図).



これらの結果より, 一次繊毛由来細胞外小胞は細胞の分裂ではなく, 細胞の移動を促進する生理作用を持つことが示された.

(4) ゲノム編集技術を用いたノックイン法によって内在性の一次繊毛局在タンパク質 Arl13b が蛍光タンパク質で標識された安定発現細胞株の樹立に成功した(右図). この生理的レベルで蛍光 Arl13b を安定的に発現する細胞株の馴化培地を標的となる未標識の野生型細胞株に投与し, 標的細胞に取り込まれた蛍光標識 Arl13b の量・大きさ・局在を検証した. その結果, 細胞によって蛍光標識 Arl13b すなわち一次繊毛由来細胞外小胞の取り込みに違いが見られた. いくつかの細胞群は比較的大きく輝度の高い蛍光標識 Arl13b の粒子を 1 つのみ細胞質に取り込んでいた(右図: 左写真の赤い点). 一方, 別の細胞群は非常に小さく輝度の低い蛍光標識 Arl13b の粒子を多量に細胞質全体に取り込んでいた(右図: 右写真の細かい赤い微粒子). これらの結果より, 細胞群によって一次繊毛由来細胞外小胞の取り込み様式が異なることが示された. 取り込み様式の違いと細胞応答すなわち一次繊毛由来小胞の生理作用の違いとの関係性が次の課題として明らかとなった.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ageta H, Ageta-Ishihara N, Hitachi K, Karayel O, Onouchi T, Yamaguchi H, Kahyo T, Hatanaka K, Ikegami K, Yoshioka Y, Nakamura K, Kosaka N, Nakatani M, Uezumi A, Ide T, Tsutsumi Y, Sugimura H, Kinoshita M, Ochiya T, Mann M, Setou M, Tsuchida K	4. 巻 9
2. 論文標題 UBL3 modification influences protein sorting to small extracellular vesicles	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-018-06197-y	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 該当する

1. 著者名 Kimura Y, Tsutsumi K, Konno A, Ikegami K, Hameed S, Kaneko T, Kaplan OI, Teramoto T, Fujiwara M, Ishihara T, Blacque OE, Setou M	4. 巻 8
2. 論文標題 Environmental responsiveness of tubulin glutamylation in sensory cilia is regulated by the p38 MAPK pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-26694-w	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 該当する

1. 著者名 Ijaz F, Ikegami K	4. 巻 68
2. 論文標題 Live cell imaging of dynamic behaviors of motile cilia and primary cilium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microscopy	6. 最初と最後の頁 99-110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jmicro/dfy147	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 池上浩司	4. 巻 54
2. 論文標題 一次繊毛を光学顕微鏡で観ると見えるもの	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 顕微鏡	6. 最初と最後の頁 85-90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11410/kenbikyo.54.2_85	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 Takeuchi K, Xu Y, Kitano M, Chiyonobu K, Abo M, Ikegami K, Ogawa S, Ikejiri M, Kondo M, Gotoh S, Nagao M, Fujisawa T, Nakatani K	4. 巻 8
2. 論文標題 Copy number variation in DRC1 is the major cause of primary ciliary dyskinesia in the Japanese population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Genetics & Genomic Medicine	6. 最初と最後の頁 e1137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mgg3.1137	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 池上浩司、瀬藤光利	4. 巻 31
2. 論文標題 線毛運動と機能の制御メカニズム	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 481-486
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 池上浩司、瀬藤光利	4. 巻 36
2. 論文標題 繊毛由来小胞に特異的なタンパク質をいかにして捉えるか	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 968-969
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 中里亮太、吉川慧、池上浩司	4. 巻 87
2. 論文標題 線毛由来小胞の放出機構と機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 腎と透析	6. 最初と最後の頁 692-696
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 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 細胞外小胞放出器官として機能しうる一次繊毛
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Ikegami K, Setou M
2. 発表標題 Lipoquality-mediated regulation of primary cilia dynamics
3. 学会等名 International Symposium on Imaging Frontier 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上浩司、瀬藤光利
2. 発表標題 超解像イメージングで観る線毛の形態と動態
3. 学会等名 第49回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 一次繊毛由来細胞外小胞について考える
3. 学会等名 第8回繊毛研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 管腔面に生える『毛』の機能と新動態
3. 学会等名 第59回日本脈管学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 細胞骨格微小管の翻訳後修飾と線毛に関するイメージング研究
3. 学会等名 第73回日本解剖学会中国四国支部学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 線毛軸糸の翻訳後修飾変化による粘液線毛機能制御
3. 学会等名 第44回難治性気道疾患研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池上浩司、瀬藤光利
2. 発表標題 生体膜マイクロドメインとしての一次線毛とその動態
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二宮昌彦、瀬藤光利、池上浩司
2. 発表標題 培養腎臓髓質集合管上皮細胞における lnp5e 依存的なエクソソームの放出
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 ナノスケールの線毛と細胞外小胞が見せるクロストーク
3. 学会等名 第6回CarMEN Conference (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 管腔に直立する線毛と細胞外粒子について
3. 学会等名 第18回心臓血管発生研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 一次線毛と細胞外小胞
3. 学会等名 第10回繊毛研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 サブミクロン構造の生き様が魅せる“動的解剖学”の楽しさ
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池上浩司
2. 発表標題 細胞局所構造の線毛が示す生命現象のライブ観察
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>広島大学大学院医系科学研究科解剖学及び発生生物学研究室 http://anatomy.hiroshima-u.ac.jp/index.html 広島大学大学院医系科学研究科解剖学及び発生生物学研究室 https://www.hiroshima-u.ac.jp/med/research/lab/basis/Anatomy_and_Developmental_Biology</p>

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
研究協力者	イジャーザ ファリアール (IJAZ Faryal)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	二宮 昌彦 (NIMIYA Masahiko)		