

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15314

研究課題名（和文）胎盤-脳連関に立脚した胎盤エクソソームの血液脳関門透過機構と脳細胞送達性の解明

研究課題名（英文）Placenta-to-brain communication-related transport characteristics of placental trophoblast-derived exosomes in the blood-brain barrier endothelial and parenchymal cells

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、妊娠期特異的な臓器である胎盤から分泌される細胞外小胞（エクソソーム）に着目し、血液脳関門における胎盤由来エクソソームの輸送特性を明らかにすることを目的とした。本研究を通して、妊娠マウスの脳組織及び血液循環する細胞外小胞において胎盤関連miRNAを検出するとともに、胎盤が分泌したmiRNA内包エクソソームのヒト脳微小血管内皮細胞への内在化に、受容体介在性エンドサイトーシス機構が関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳への高効率な高分子輸送システムを開発するためには、脳内送達において障壁となる血液脳関門（Blood-Brain Barrier, BBB）の透過と脳細胞への送達技術の基盤開発が重要である。本研究は、妊娠中に特異的に出現する「胎盤」から脳への情報伝達（胎盤-脳連関）の仕組みを動態学的な視点で解明するという学術的意義がある。さらに、胎盤-脳連関におけるBBB輸送システムの新たな分子機構と役割を解明することは、中枢薬のBBB透過技術の基盤開発につながるという社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research project is to clarify the blood-brain barrier transport characteristics of the extracellular vesicles (exosomes) secreted from the placenta, a pregnancy-specific organ. The present finding is that the placenta-associated miRNA can be detected in the brain tissue as well as the circulating extracellular vesicles in mice. The results have shown that human blood-brain barrier endothelial cells exhibit the energy-dependent and receptors-mediated internalization of the placental trophoblast-derived exosomes in which the placenta-associated miRNAs are encapsulated.

研究分野：薬物送達学

キーワード：胎盤 血液脳関門 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

末梢臓器と脳は、様々な情報伝達の手段を用いて相互にコミュニケーションを図っている。脳には血液脳関門(Blood-Brain Barrier, BBB)が存在して、循環血液から脳への物流を厳密に制御しており、情報伝達を妨げているように見える。しかし BBB は、その実体である脳毛細管内皮細胞に、情報伝達を担うシグナル分子の輸送系を発現し、末梢臓器-脳連関における制御装置として機能する。例えば、BBB に発現するインスリン受容体は、膵臓から分泌されたインスリンを脳内に輸送し、中枢代謝を制御することが知られている(*Raven press* 123-148, 1991)。さらに BBB インスリン受容体が担う経細胞輸送は、脳への薬物送達経路としても応用されている。そこで脳-末梢臓器連関における、BBB 輸送システムの新たな分子機構と役割を解明することで、中枢薬の BBB 透過技術開発に突破口を拓く可能性がある。

妊婦特異的に出現する末梢臓器である「胎盤」は、ホルモンや細胞外小胞(エクソソーム)などの様々なメッセージ物質を分泌し、母体臓器に働きかけることで妊娠維持に必須の役割を果たす。そこで、研究代表者は胎盤から脳への情報伝達(胎盤-脳連関)に着目し、BBB には胎盤からの情報伝達を制御する機構があるのではないかと考えた。実際に、胎盤の合胞体性栄養膜細胞がマイクロ RNA (miRNA)などのシグナル分子を母体血液に分泌すること(*Biol Reprod* 81:717-729, 2009)、妊婦の脳では神経回路が再構築され脳高次機能が変化すると報告(*Nat Neurosci* 20:287-296, 2017)から、「胎盤-脳連関」の存在が示唆されている。

細胞外小胞(エクソソーム)は、細胞から放出されるナノ粒子であり、内包する miRNA を標的細胞に輸送することで、臓器間の情報伝達を担う。中でも胎盤関門の実体である合胞体性栄養膜細胞が分泌するエクソソームは他の正常細胞由来エクソソームと異なり、その表面上に内在性レトロウイルス由来エンベロプタンパク質(human endogenous retrovirus envelope protein, HERV-Env)を特異的に発現している(*FASEB J* 28:3703-3719, 2014)。これまでに研究代表者は、ヒト BBB モデル細胞である hCMEC/D3 細胞にはウイルス受容体として機能することが知られている膜タンパク質を発現していることを見出している。そこで研究代表者は、仮説(図1)「胎盤の合胞体性栄養膜細胞が分泌するエクソソームは、ウイルス受容体を介して BBB に取り込まれ、内包物である miRNA が BBB に送達される」を立てた。実際に、ヒトメラノーマ SK-Mel-28 細胞から分泌されたエクソソームの hCMEC/D3 細胞への取り込みには一部、麻疹ウイルス受容体である CD46 が関与することが報告(*Mol Pharm* 16:292-304, 2019)されており、研究代表者の仮説を支持している。

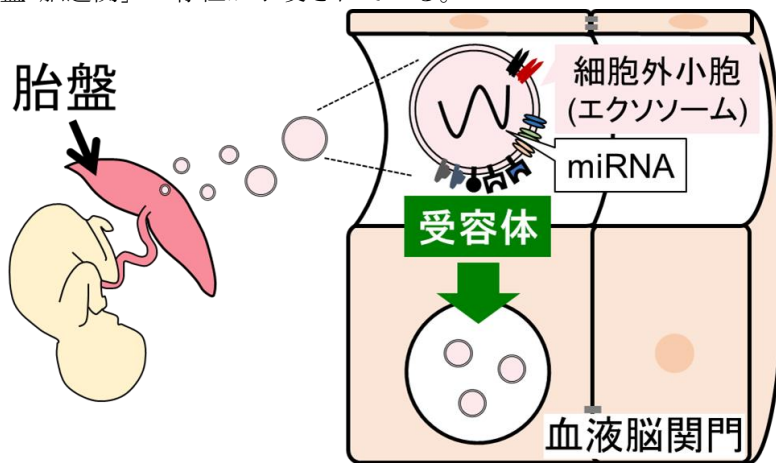


図1 想定されるヒト血液脳関門(Blood-Brain Barrier, BBB)における胎盤由来エクソソーム輸送機構

2. 研究の目的

本研究は、妊娠期特異的に出現する胎盤から分泌される細胞外小胞(エクソソーム)の特異性に着目し、ヒト BBB における胎盤由来エクソソームの輸送特性を明らかにすることを目的とした。具体的には、仮説(図1)「胎盤の合胞体性栄養膜細胞が分泌するエクソソームは、ウイルス受容体を介して BBB に取り込まれ、内包物である miRNA が BBB に送達される」に基づいて、ヒト BBB モデル細胞において胎盤由来 miRNA が輸送されることを実証し、BBB における胎盤由来エクソソームの取り込み経路を同定することを目指した。

3. 研究の方法

(1) miRNA の妊娠マウス脳への分布とヒト脳血管内皮細胞における胎盤由来エクソソームを介した輸送

同週齢の妊娠 18.5 日目マウスと非妊娠マウスから循環血液及び脳を摘出した。循環血液中に存在するエクソソーム内包 miRNA は、exoRNeasy Midi/Maxi Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。ヒト胎盤合胞体性栄養膜モデル細胞である BeWo 細胞の培養上清から、超遠心分離法を用いて、

細胞外小胞（エクソソーム）画分を単離し、ヒト BBB モデル細胞である hCMEC/D3 細胞に添加して、37°C で 6 時間培養した。miRNA の脳内分布及び発現量は、それぞれ miRNA アレイ及び定量的 PCR 法を用いて解析した。

(2) ヒト脳血管内皮細胞におけるヒト胎盤由来エクソソームの取り込み機構解析

超遠心法を用いて BeWo 細胞から回収したエクソソームを PKH67 で蛍光標識し、hCMEC/D3 細胞に添加し、37°C で 6 時間培養した。4%パラホルムアルデヒドで固定後、超解像顕微鏡もしくは共焦点顕微鏡を用いて観察した。ミトコンドリアマーカーとして、MitoBright LT Red (DOJINDO) を、リソソームマーカーとして LysoTracker RED (Invitrogen) を用いた。取り込み活性は、細胞及び上清中の蛍光値を測定し、cell-to-medium ratio を算出することで評価した。エクソソームの hCMEC/D3 細胞への取り込み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もしくは CRISPER Cas9 によるゲノム編集を用いた。

4. 研究成果

(1) miRNA の妊娠マウス脳への分布とヒト脳血管内皮細胞における胎盤由来エクソソームを介した輸送

網羅的 miRNA アレイ解析の結果、妊娠 18.5 日目マウス脳にて、胎盤に高発現する miRNA が検出され、同週齢の非妊娠マウスでは本 miRNA 発現は検出限界以下であった。さらに、同定された miRNA は妊娠マウス循環血液中のエクソソーム画分において特異的に検出された。さらに、超遠心法によって回収した BeWo 細胞由来エクソソームを hCMEC/D3 細胞に添加し、37°C で培養したところ、ヒト胎盤特異的 miRNA が検出された。以上から、胎盤から分泌されたエクソソームが BBB に取り込まれ、そのエクソソームに内包されている胎盤由来 miRNA が脳内に分布する可能性が示された。

(2) ヒト脳血管内皮細胞におけるヒト胎盤由来エクソソームの取り込み機構解析

PKH67 で蛍光標識した BeWo 細胞由来エクソソームを、BBB モデル細胞である hCMEC/D3 細胞の培養上清に添加し、37°C で培養した結果、BBB 細胞内において粒子状の蛍光シグナルが検出された。さらに、超解像顕微鏡を用いた細胞内局在解析から、BeWo 細胞由来エクソソームのシグナルは、ミトコンドリアマーカーとは重ならず、リソソームマーカーと重なるものと重ならないものが検出された。これらの結果から、胎盤由来エクソソームは BBB 細胞に取り込まれた後、リソソームやエンドソームに分布することが示唆された。

PKH67 で蛍光標識した BeWo 細胞由来エクソソームの、hCMEC/D3 細胞への取り込み活性及び温度依存性を解析した。PKH67 標識エクソソームの細胞内取り込みは、37°C と比較して、4°C において有意に低下することが示された。さらに、非標識エクソソーム共存下において有意に低下することが示されたことから、ヒト BBB モデル細胞内へのエネルギー依存的な胎盤由来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。ヒト BBB モデル細胞へのエクソソーム取り込みは、 $\alpha 2$ -マクログロブリン共存下では阻害されなかった一方で、ヘパリン共存下で、有意に阻害されたことから、胎盤細胞由来エクソソームの、ヒト BBB モデル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ヘパラ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、エンドサイトーシス阻害剤共存下における取り込み解析から、BeWo 細胞由来エクソソームの hCMEC/D3 細胞への取り込みには、一部カベオ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。

Forskolin 処理によって内在性レトロウイルスエンベロープタンパク質である syncytin-1 及び syncytin-2 の発現を亢進させた 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、hCMEC/D3 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 BBB 細胞への取り込みには、エクソソーム上に発現する syncytin が関与する可能性が示された。一方で、syncytin-1 受容体のエクソソーム取り込みにおける寄与は示されず、BBB にはエクソソームの分泌元である胎盤細胞への取り込み機構とは異なるエクソソーム輸送機構が存在することが示唆された。BBB 細胞においては、他にもウイルス受容体が発現していることから、ウイルス受容体をノックアウトもしくはノックダウンした BBB 細胞を用いエクソソームの取り込み解析を行った結果、一部のウイルス受容体が胎盤由来エクソソームの取り込みに関与することが示唆された(図 2)。以上から、BBB における胎盤由来エクソソームの取り込み経路を同定した。

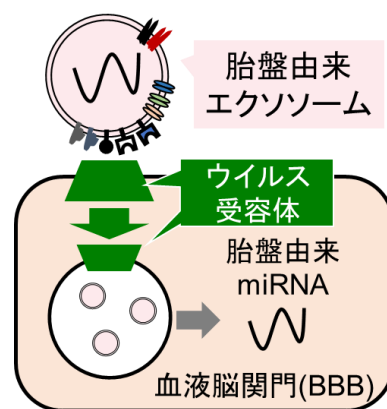


図 2 ウイルス受容体介した BBB における胎盤由来エクソソーム取込み及び miRNA 送達

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 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6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、稲井美紅、赤沼伸乙、細谷健一、立川正憲
2. 発表標題 ヒト脳血管内皮細胞における胎盤栄養膜細胞から分泌される細胞外小胞の輸送特性
3. 学会等名 第36回日本薬物動態学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野陽乃里、稲井美紅、稲垣舞、立川正憲
2. 発表標題 ヒト脳血管内皮細胞(hCMEC/D3細胞)におけるヒト胎盤絨毛細胞株BeWo細胞から分泌される細胞外小胞の輸送特性
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 稲井美紅、稲垣舞、赤沼伸乙、細谷健一、立川正憲
2. 発表標題 マイクロRNAの妊娠マウス脳への分布とヒト脳血管内皮細胞における胎盤由来細胞外小胞を介した輸送
3. 学会等名 日本薬学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中野瑛介、稲垣舞、立川正憲
2. 発表標題 ヒト胎盤栄養膜細胞(BeWo細胞)が分泌する細胞外小胞の分泌元細胞への再取り込み機構
3. 学会等名 第16回次世代を担う若手のための医療薬科学シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平沢介、稲垣舞、稲井美紅、小迫英尊、立川正憲
2. 発表標題 ヒト胎盤関門モデル細胞 (BeWo細胞・JEG-3細胞) におけるトランスポータータンパク質発現プロファイルの比較解析
3. 学会等名 第61回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 稲垣舞、中野瑛介、立川正憲
2. 発表標題 胎盤分泌細胞外小胞のヒト胎盤栄養膜細胞への内在化機構
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023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
---------	---------