

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19836

研究課題名(和文)環境化学物質曝露により産生される異常な細胞外小胞による毒性発現メカニズムの解明

研究課題名(英文)Toxic Effects of Extracellular Vesicles(Exosomes) from the cells exposed to Environmental Chemicals

研究代表者

宮崎 航(Miyazaki, Wataru)

弘前大学・保健学研究科・教授

研究者番号：90512278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞(EVs)のエクソソームは、恒常性の維持や周産期の児の発達などに不可欠である。ドナー細胞から産生・放出されたエクソソームは、内包するmiRNAやタンパクを標的細胞に移送し、機能変化を引き起こす。申請者は、環境化学物質曝露により異常なEVsが産生され、血液などの体液を介して他臓器に移行し、影響をもたらす可能性があると考え、特に肝臓ならびに胎盤を標的臓器として、環境化学物質曝露による異常なエクソソームの影響について解析を行った。その結果、環境化学物質の曝露は異常なエクソソームの産生・分泌を促進し、様々な毒性影響をもたらすという、新たな毒性発現経路の存在を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、環境化学物質の毒性発現が直接的な作用のみならず、環境化学物質による細胞外小胞を介する経路のかく乱により間接的に細胞・臓器に影響をもたらされるという、新たな毒性発現メカニズムが存在することを示した。これは、環境化学物質曝露によって産生されたエクソソームの解析により、毒性の発現する細胞の評価と予測が可能となることに繋がる。さらに、エクソソームは母子間を移行することが知られていることから、子の発達における母子間のエクソソームのやり取りが互いの身体発達・機能維持に関わることの解明、そして、これまでに説明のつかなかった環境化学物質の曝露影響を解明する上で意義のある研究となった。

研究成果の概要(英文)：Exosomes, one of the extracellular vesicles (EVs), play an essential role in the cellular signaling pathway for organ homeostasis and developments. Some stimuli induce the release of EVs from the injured cells, and the released EVs may cause adverse effects on the target cells. Although environmental pollutants may induce the production and release of abnormal EVs, it is still unknown the mechanisms.

In this study, to analyze the effects through the EVs from environmental pollutants, we exposed PFOS or PFOA to liver or placenta cell-lines and obtained the EVs from each cell-line. We confirmed the characters of these EVs using several markers including exosomes. In addition, we also investigated the effects of these EVs on neural differentiation and observed that the EVs affected the neurite outgrowth. These results indicated that the EVs released from environmental pollutants exposed cells may induce the several toxicities in the target organs/cells.

研究分野：衛生学、毒理学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 環境化学物質 miRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞間伝達経路のひとつである細胞外小胞( extracellular vesicles : EVs )のエクソソームは、恒常性の維持や周産期の児の中樞神経系・免疫系の発達などに不可欠である<sup>(1)</sup>。ドナー細胞から産生・放出されたエクソソームは、膜上のインテグリンファミリーの組み合わせにより標的細胞が決定され<sup>(2)</sup>、内包する microRNA(miRNA)やタンパク(ペプチド)を標的細胞に移送し、機能変化を引き起こす<sup>(3)</sup>。この特性から、近年、特にがん研究や薬物輸送システムの開発において注目されている。以上から申請者は、環境化学物質曝露により異常なエクソソーム・EVs が産生され、血液などの体液を介して他臓器に移行し、影響をもたらす可能性があると考えた。また、エクソソームは母体血・母乳にも含まれることから<sup>(4)</sup>、母体で産生された異常なエクソソームが子へ移行し、子の身体に影響を及ぼす可能性もある。しかし、環境化学物質の新たな毒性発現メカニズムとしてエクソソームに着目した研究はほぼない。

### 2. 研究の目的

申請者は上記の背景から、エクソソームに着目した研究「カドミウム(Cd)曝露に伴い産生される異常エクソソームの骨への影響の解明」を開始した(環境省重金属研究)。この研究では、Cd曝露を受けた細胞から産生・放出されたエクソソームを培養上清から抽出して骨芽細胞に添加し、骨分化への影響について解析した。その結果、骨細胞への分化が抑制されることを見出した。さらに、産生されたエクソソームに内包される miRNA の量と種類、エクソソーム膜上のインテグリンの発現の変化も観察された。この結果は環境化学物質等の曝露に伴い産生される異常エクソソーム(EVs)により、他の臓器に毒性をもたらされる可能性があることを強く示唆している。

以上から、本研究の目的は、環境化学物質曝露により産生される異常エクソソーム・EVs による毒性発現メカニズムを解明し、新たな毒性評価・予測ならびに毒性を積極的に予防・抑制することが可能となる手法を開発することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 異常エクソソームの標的臓器・細胞と産生細胞の特定

本研究では、多くの化学物質にさらされ、異常エクソソームを産生・放出しうる肝臓を中心に解析を行った。また、将来的に母子間移行に関する研究につなげることを見据え、胎盤も対象臓器として検証を行った。曝露物質については、現在特に問題となっているペルフルオロアルキル物質およびポリフルオロアルキル化合物(PFAS)のうち、PFOS および PFOA を用いることとし、可塑剤(BPA, BHPF)についても順次使用した。

ヒト肝がん細胞株 HepG2、ヒト妊娠性絨毛がん由来細胞株 BeWo に上記化学物質を曝露し、培養上清からエクソソーム等を含む EVs を抽出した。抽出した EVs については、エクソソームマーカー、インテグリンの発現を確認するとともに、曝露細胞における EVs の産生・分泌にかかる遺伝子の発現変化を確認した。

#### (2) 異常エクソソームによる他臓器への影響の検証と毒性評価法の開発

(1)において回収した EVs の他の細胞への影響を解析するため、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SH-SY5y を用いて分化させると同時に 1)の各 EVs を曝露し、神経突起伸長等への影響を中心に解析を行った。また、その影響をもたらす EVs 内の因子について解析するため、正常および異常 EVs に内包される miRNA の網羅的解析・比較を行った。

#### (3) 異常エクソソーム解析にむけた実験動物からのエクソソーム抽出とその由来の検証

生体内の EVs の解析を行うに当たり、血液等の体液内の様々な夾雑物を取り除いて、EVs を精製する必要がある。さらに、EVs も各臓器から産生・分泌されていることから、各 EVs の由来と標的を特定することが肝要である。そこで、EVs 産生細胞の由来については、EVs 内 cell free DNA を用いて産生臓器・細胞の特定を試みた。また、標的については、1)のインテグリンの発現から予測を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 異常エクソソームの標的臓器・細胞と産生細胞の特定

ヒト肝がん細胞株 HepG2、ヒト妊娠性絨毛がん由来細胞株 BeWo に PFOS および PFOA をそれぞれ曝露し、培養上清からエクソソーム等を含む EVs を抽出した。EVs の構成について確認するため、エクソソームマーカー(CD63, CD9, HSP70, Alix)の発現を確認したところ、各細胞と化学物質の組み合わせでいずれも発現が確認できた。特に、用量依存的なエクソソームの増加が認められたが、PFOS 曝露 HepG2 細胞由来 EVs については、エクソソーム量の減少が認められた。一方、エクソソーム以外の EVs のうち、小胞体由来小胞のマーカーである Calnexin の発現を確認したところ、こちらもいずれの組み合わせでも発現が確認されたが、特に PFOA, PFOS 高用量群に発現の増加が認められた。このことから、化学物質の曝露がエクソソーム等の EVs の分泌を促している可能性が示唆されたが、用量によっては異なる EVs が産生される可能性が示唆された。

EVsの産生・分泌に対する影響について解析するため、Multivesicular Body(MVB)形成促進に関わる Rab タンパク群<sup>(5)</sup>、エクソソーム産生に関わる ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)複合体を構成するタンパク<sup>(6)</sup>、エクソソーム分泌に関わる soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) タンパク<sup>(7)</sup>について、遺伝子発現量を解析した。その結果、PFOS, PFOA のそれぞれの曝露細胞において、各遺伝子の発現が有意に増加した。

#### (2) 異常エクソソームによる他臓器への影響の検証と毒性評価法の開発

(1)において回収した EVs の他の細胞への影響を解析するため、ヒト神経芽細胞腫由来細胞株 SH-SY5y を定法<sup>(8)</sup>に基づいて分化を行い、分化の最終段階(神経突起伸長を促す段階)に、1)の各 EVs を曝露した。曝露後、神経軸索マーカーとして beta3-tubulin, 樹状突起マーカーMAP2 の発現を解析した。その結果、特に、化学物質曝露 HepG2 由来の EVs によって各神経突起の伸長抑制が確認された。一方、Bewo については、神経突起の伸長を促進する影響がわずかに見られた。合わせて、これらの影響をもたらす EVs 内の因子について解析するため、正常および異常 EVs に内包される miRNA の網羅的解析・比較を行った。その結果、神経突起に関わる遺伝子の発現並び経路に關与する可能性ある miRNA 候補が抽出された。現在、各遺伝子・経路と神経突起伸長の調整への関連と影響について詳細な検証を行っている。

#### (3) 異常エクソソーム解析にむけた実験動物からのエクソソーム抽出とその由来の検証

本研究において取り扱う体液は血液と母乳が主であるが、方法にも書いた通り、夾雑物の除去ならびに EVs の由来と標的の特定が不可欠である。夾雑物の除去について、血液はすでに様々な精製法(キット)が開発されていることから問題はない。一方、母乳については、実験動物(マウス)からの母乳そのものの回収が非常に少量であること、脂質が非常に多いことから取り扱いが困難であった。現在、母乳の回収とともに脂質の除去を中心に効率的な方法の検証・開発を進めている。続いて、各 EVs の由来と標的を特定に向け、EVs 内 cell free DNA の抽出を試みた。細胞培養上清からの cell free DNA の回収については問題なく行えたものの、血液および母乳から十分な回収が行えていない。現在、上記と同様に、より効率的な抽出・精製法の確立を目指している。また、EVs 標的については、EVs 膜状インテグリンファミリーの各発現をウエスタンブロット法で確認した。その結果、PFOS, PFOA 曝露により、インテグリンの発現の組み合わせが変化することを見出した。現在、さらに特定の組み合わせにより、他の細胞への移行・影響が変化するかを詳細に検証する予定である。

#### ・参考文献

1. Sharma P et al. Exosomes regulate neurogenesis and circuit assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Aug 6;116(32):16086-16094.
2. Hoshino A et. al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. Nature. 2015 Nov 19;527(7578):329-35.
3. Shahabipour F et al. Exosomes: Nanoparticulate tools for RNA interference and drug delivery. J Cell Physiol. 2017 Jul;232(7):1660-1668.
4. Sheller-Miller S et al. Cyclic-recombinase-reporter mouse model to determine exosome communication and function during pregnancy. Am J Obstet Gynecol 2019 Nov;221(5):502.e1-502.e12.
5. Chen L et al. Pathways of production and delivery of hepatocyte exosomes. J Cell Commun Signal. 2018 Mar;12(1):343-357.
6. Gorshkov A et al. Exosomes as Natural Nanocarriers for RNA-Based Therapy and Prophylaxis. Nanomaterials (Basel). 2022 Feb 2;12(3):524.
7. Aheget H et al. Exosome: A New Player in Translational Nanomedicine. J Clin Med. 2020 Jul 26;9(8):2380.
8. Shipley M et al. Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line J Vis Exp 2016 Feb 17;(108):53193.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>宮崎 航、櫻木 青、目加田京子、松丸大輔、中西剛          |
| 2. 発表標題<br>カドミウム曝露細胞から産生されたエクソソームによる骨系細胞への影響 |
| 3. 学会等名<br>第23回環境ホルモン学会研究発表会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                              |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Wataru Miyazaki, Jo Sakuragi, Kyoko Mekata, Daisuke Matsumaru, Tsuyoshi Nakanishi   |
| 2. 発表標題<br>Cadmium-exposed cell-derived extracellular vesicles disrupt osteoblast differentiation and osteoclast functions   |
| 3. 学会等名<br>The 8th Educational Symposium on RADIATION and HEALTH by young scientists (ESRAH2021) ” & “The 4th Workshop on Radiation Research and Its Related Issue 2021 ” Joint Symposium (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2021年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>宮崎 航、櫻木 青、目加田京子、松丸大輔、中西剛           |
| 2. 発表標題<br>カドミウム曝露細胞から分泌された微小小胞による骨系細胞への影響の検討 |
| 3. 学会等名<br>第92回日本衛生学会学術集会                     |
| 4. 発表年<br>2022年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Wataru Miyazaki, Jo Sakuragi, Kyoko Mekata, Daisuke Matsumaru, Tsuyoshi Nakanishi    |
| 2. 発表標題<br>miRNA status in the extracellular vesicles released from cadmium exposed hepatocytes |
| 3. 学会等名<br>第99回日本生理学会大会   |
| 4. 発表年<br>2022年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|           | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                 | 備考 |
|-----------|--|---------------------------------------|----|
| 研究<br>分担者 | 下川 哲昭<br><br>(Shimokawa Noriaki)<br><br>(90235680) | 高崎健康福祉大学・健康福祉学部・教授<br><br><br>(32305) |    |
| 研究<br>分担者 | 中西 剛<br><br>(Nakanishi Tsuyoshi)<br><br>(50303988) | 岐阜薬科大学・薬学部・教授<br><br><br>(23701)      |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|