

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830061

研究課題名(和文)エクソソームを蛍光標識したトランスジェニックラットの開発と脳での解析

研究課題名(英文)The generation of transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in vivo

研究代表者

吉村 文(Aya, Yoshimura)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・疾病研究第三部・科研費研究員

研究者番号：90466483

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：新たな細胞間コミュニケーション媒体として注目されるエクソソームの生体内での動態を調べるため、エクソソームを蛍光標識した実験動物の作製を試みた。エクソソームマーカーとして知られるCD63とGFPの融合タンパク質(CD63-GFP)を利用したトランスジェニックラットを作製した結果、CAGプロモーターとSox2プロモーターで発現する2種類の系統を得ることができた。血清等の体液、あるいはその組織を培養した培地上清から回収したエクソソームにおいて、CD63-GFPによる標識を確認した。さらに、細胞内への移行実験in vitroにおいても、トランスジェニックラット由来のエクソソームを識別することができた。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) which encompass microvesicles (budding from the plasma membrane) and exosomes (endosomal in origin) have an important role in the transfer of biomolecules between cells. To facilitate the investigation of the intercellular transfer of EVs in vivo, we generated a new transgenic (Tg) rat model. In this study, GFP-tagged human CD63 was used because CD63 protein is highly enriched on EV membranes and is known as an EV marker. We produced two Tg rat lines expressing human CD63-GFP regulated by CAG promoter or Sox2 promoter, respectively. Exogenous human CD63-GFP was detected on EVs isolated from the body fluids and the cultured medium of Tg rats. Furthermore, in vitro culture showed transfer of Tg-derived EVs into recipient cells. These results suggested that the new Tg rat model should provide significant information to reveal the communication between cells via EVs in vivo.

研究分野：分子生物学

キーワード：ラット エクソソーム トランスジェニック

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは多胞性エンドソームと呼ばれる細胞内小胞のなかで産出され、多胞性エンドソームが細胞膜と融合することにより細胞外へと放出される直径 40 ~ 100nm の小さな膜小胞である。内部には種々の酵素やタンパク質の他、mRNA や microRNA といった核酸分子を含んでおり、この成分は細胞の生育状態・生育環境・細胞が取り込む物質により変化する。そのため、血液をはじめとする体液から回収されたエクソソームを疾患マーカーとして利用する研究が近年推進されている。さらに、細胞外へ放出されたエクソソームは、他の細胞に取り込まれることで遠く離れた細胞まで情報を伝達している可能性が示唆され、新たな細胞間コミュニケーション媒体として注目されている。

脳・神経におけるエクソソームの働きについては、アルツハイマー症や筋委縮性側索硬化症をはじめとする神経変性疾患の病態を示す患者あるいは実験動物において、血液中に分泌される疾患特異的な microRNA の発現変化が報告されており、その分泌にエクソソームの関与が指摘されている (Mizuno et al., PLoS One, 2011)。さらに、神経細胞死の原因となる変性タンパク質の排出や分解にエクソソームが直接関与していることも報告されている (Yuyama et al., J. Biol. Chem., 2012)。また、グリア細胞と神経細胞間でエクソソームの移行が生じ、エクソソーム由来の構成成分が神経細胞の恒常性維持に寄与している可能性が示唆されている (Fruhbeis et al., PLoS Biol., 2013)。

しかし、これまでのエクソソーム研究は

培養細胞を用いた解析が中心であり、生体内でのエクソソームの生理作用については不明な部分が多い。そこで本研究において、エクソソームの生体内での動態を解析できる動物モデルを作製し、それを使った脳におけるエクソソーム分泌と生命現象との関係を明らかにすることを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、新たな細胞間コミュニケーション媒体として注目される小型膜小胞エクソソームを生体内で可視化できる実験動物の作製を目的とする。エクソソームマーカーである CD63 膜タンパク質と蛍光タンパク質 GFP との融合タンパク質 (CD63-GFP) を利用したトランスジェニックラットを作製し、生体 (組織) 内でのエクソソーム移行を観察できる実験系の確立を計画する。

過去の研究において、大脳皮質の初代培養から神経細胞がエクソソームを分泌し、その分泌の増減にシナプス活動が関与している可能性が報告されている (Faure et al., MCN, 2006, Lachenal et al., MCN, 2011)。そこで正常な脳機能との比較として、過剰なストレスを受けた個体のエクソソーム分泌や支持細胞であるグリア細胞とのエクソソーム移行について、個体と生体脳の性質を保持する初代培養を使って検証を行い、エクソソームの脳における恒常性維持への作用を解明する。

3. 研究の方法

脳におけるエクソソームの動態を明らかにするため、ラットを用い、下記の事柄についての研究を行った。ラットはヒトの疾

患研究における重要な実験動物モデルであり、その適度な大きさから外科的処置や採血・薬理試験などの生理学的測定を行う実験での高い利便性を持つ。エクソソームに関してもラットを材料とすることで、体液中のエクソソーム回収がマウスと比べて容易であると考えられる。

1) トランスジェニックラット (CAG/CD63-GFP)(Sox2/CD63-GFP)の作製

本研究では、内在性のラット CD63 と識別できるようにヒト由来の CD63 を用い、通常の GFP よりも蛍光性が高い copGFP を使用した (System Biosciences)。CD63-GFP の発現プロモーターとして、全身性の CAG プロモーターと、生体内でのエクソソーム移行を観察できる系を確立するため、ES 細胞や神経幹細胞で発現する Sox2 の 5' 上流をプロモーターとした 2 種類のベクターを作製した。Sox2 プロモーターについては、マウスの報告 (Kevin and Gage, PNAS, 2003) をもとに Wistar ラットゲノム DNA から約 6.7kb の領域を PCR で単離した。

本研究では、ラット ES 細胞を利用してトランスジェニックラットを作製した。ES 細胞を使った場合、導入された遺伝子はサイレンシングの影響を受けやすいが、蛍光の安定性を基にコピー数の少ない細胞株を選択することができる。4 種類のインヒビター (4i) を加えるラット ES 細胞の培養法 (Kawamata & Ochiya, PNAS, 2010) を用い、Wistar ラット (白毛) から樹立された ES 細胞へのトランスフェクションを行った。GFP 蛍光を安定的に発現する細胞株は、マイクロインジェクション法により

LEA ラット (茶毛) 胚へ導入し、偽妊娠ラット (Wistar) の子宮に移植する。得られた産仔のキメラについては、毛色による判定・蛍光顕微鏡下での GFP の観察・PCR によるジェノタイピングで確認する。キメラ個体は野生型 Wistar と交配し、遺伝子導入 ES 細胞由来のヘテロ個体を同定する。

2) トランスジェニックラットにおける CD63-GFP の発現解析

作製したトランスジェニック個体における CD63-GFP の発現について、各組織の蛍光観察 (実体顕微鏡) および発現解析 (ウェスタンブロット) を行う。Sox2/CD63-GFP 系統は、胎児終脳の神経幹細胞を培養し、分化に伴う CD63-GFP の発現変化を調べる。

3) エクソソームの単離および細胞への移行実験 in vitro

トランスジェニックラットの体液から超遠心分離法 (35,000 rpm, 70 min, 4) により、エクソソームを含む細胞外小胞体 (Extracellular vesicles: EVs) を単離する。単離した EVs は、NanoSight システムによる粒子サイズと数の検出、ウェスタンブロットによる EV マーカーおよび CD63-GFP の標識を確認する。さらに、human CD63 抗体を使った免疫電顕による EV 標識の確認も行う。Sox2/CD63-GFP 系統は、血液の他に、胎児神経幹細胞 (eNSCs) の培養上清から超遠心分離法により EVs を単離し、解析を行なう。

単離した EVs の細胞への取り込み実験を行い、標識の検出を検討する。CAG/CD63-GFP 系統では、血清由来の EVs

を用いて胎児線維芽細胞をレシピエント細胞として移行実験を行った。また、Sox2/CD63-GFP 系統は、培養 eNSCs 由来の EVs を用いて eNSCs とアストロサイトに対する移行実験を行った。

4. 研究成果

CD63-GFP を利用したトランスジェニックラットの作製を行った結果、CAG/CD63-GFP と Sox2/CD63-GFP の両者ともトランスジェニックを得ることができた。しかし、CAG/CD63-GFP ラットに関しては、雄は胎生致死であり、雌も早期に死亡する傾向がみられた。一方、Sox2/CD63-GFP ラットについては、両性ともそのような性質はみられず生殖能力を持った個体が得られたが、過剰な飲水量と多尿症状を示した。これらの性状には CD63 の過剰発現のほか、小胞膜関連タンパク質への GFP 融合によるアグリゲーションの影響が関与している可能性がある。

Sox2/CD63-GFP 系統の脳の発育に伴う CD63-GFP の発現を調べた結果、妊娠 14 日目の胎児終脳から出産後 10 日目の大脳新皮質においてみられた Sox2 発現の低下に伴う CD63-GFP の発現低下が確認された。さらに、詳細な発現を調べるため、eNSCs を分化誘導したときの CD63-GFP 発現を検証した。その結果、CD63-GFP の発現（ウェスタンブロット）は分化に伴い低下し、分化誘導直後の Nestin 陽性（未分化マーカー）細胞でみられた GFP シグナルは MAP2 陽性（ニューロンマーカー）、CNPase 陽性（オリゴデンドロサイト）、GFAP 陽性（アストロサイトマーカー）細胞において観察されなかった。ただし、増

殖（活性）型のアストロサイトにおいては、GFP シグナルが検出された。これらは、感染による SOX2 の発現パターンと一致している。

単離した EVs サンプルにおいて、EV マーカー（内在性 rat CD63、Flotillin-1）の他、外来性 CD63-GFP を検出した。さらに、CAG/CD63-GFP ラットの血清由来 EVs の一部において、免疫電顕により human CD63 の標識が確認できた。EVs の細胞内への移行実験を行い、human CD63 抗体による標識の確認を行った。CAG/CD63-GFP ラットの血清由来 EVs の実験では、エンドソームマーカーである LAMP1 と human CD63 の局在によって、レシピエント細胞のエンドソーム内への取り込みを確認できた。また、Sox2/CD63-GFP ラットの eNSCs の培養上清から単離した EVs が、同じ細胞種である eNSCs に加えてアストロサイトにも移行することを確認した。

超遠心分離法によって単離される EVs にはエンドソーム由来であるエクソソームに加えて細胞膜由来の microvesicles（100～1000 nm）も含まれている。さらにエクソソームの形成機構にも種類があり、EVs には複数の subpopulation が存在する。EVs の可視化には、PKH 色素による蛍光標識が一般的に用いられるが、PKH は脂質親和性を持つため、すべての EVs のほか、体液中に含まれる脂質物質も標識する。Human CD63 によって標識された EVs は免疫電顕の結果と EVs 取り込み実験により、EVs の一部の population であることが示唆された。これは、EVs の機能をより詳細に研究する上でも重要なツールとなる。

これまでの成果として、エクソソームが

標識されたトランスジェニックラットの作製を確認できた。今後は、CAG/CD63-GFPラットを用いて、中枢神経系が細胞障害を受けたときにどの細胞のエクソソーム分泌が促進・抑制され、どの細胞間でエクソソーム移行が生じるのかを、生体脳の性質を保持する初代培養あるいはスライスカルチャーを使ったスクリーニング系を立ち上げ、プロファイリングを行う。また、脳におけるエクソソームの機能については近年報告が増えているが、神経幹細胞については殆どない。そのため、本研究で作製したSox2/CD63-GFPラットが、生体内での神経幹細胞を取り巻くニッチの形成にどのような働きを持つのかを明らかにするモデルになると考えている。In vitroでの移行実験およびエンドソームの動態を観察することができたので、今後は生体内でのエクソソームの分泌・移行を確認できる実験系の確立を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Aya Yoshimura, Tadahiro Numakawa, Haruki Odaka, Naoki Adachi, Yoshitaka Tamai, Hiroshi Kunugi; Negative regulation of microRNA-132 in expression of synaptic proteins in neuronal differentiation of embryonic neural stem cells. *Neurochemistry International* 97: 26-33 (2016). doi:10.1016/j.neuint.2016.04.013. 査読有.

[学会発表](計3件)

Aya Yoshimura, Tadahiro Numakawa, Haruki Odaka, Yoshitaka Tamai, Takumi Ers, Hiroshi Kunugi; The effect of IL-6 on expression of microRNAs in rat embryonic neural stem cells during their differentiation. 熊本医学・生物科学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」2014年9月4日～5日 熊本市医師会館

Haruki Odaka, Tadahiro Numakawa, Aya Yoshimura, Naoki Adachi, Shingo Nakajima, Takumi Ers, Takafumi Inoue, Hiroshi Kunugi; Influence of chronic glucocorticoid exposure on proliferation and differentiation of rat neural stem cells in vitro. 熊本医学・生物科学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」2014年9月4日～5日 熊本市医師会館

吉村 文, 沼川忠広, 中島進吾, 安達直樹, 川又理樹, 落谷孝広, 功刀 浩, 玉井淑貴; Possible of CD63 in synaptic function of rat cortical neurons. 第57回日本神経化学会大会・第36回日本生物学的精神医学会 合同大会 2014年9月29日～10月1日 奈良県文化会館・奈良県新公会堂

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 文 (YOSHIMURA, Aya)

国立研究開発法人国立精神・神経医

療研究センター 神経研究所・疾病

研究第三部・科研費研究員

研究者番号 : 90466483