

#### 4 研究内容

研究課題名：環境化学物質曝露細胞由来細胞外小胞：エクソソームを介する  
神経毒性発現メカニズムの解明

宮崎航（弘前大学大学院保健学研究科）

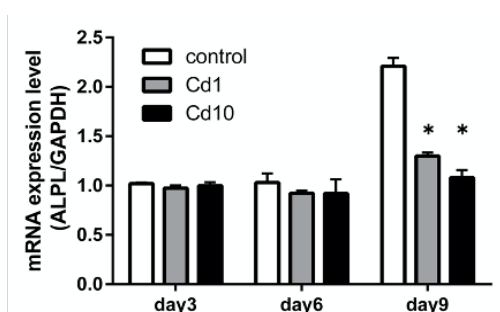
野見山桂（愛媛大学沿岸環境科学研究センター）

##### 1. 研究目的

近年、がん研究や薬物輸送システムの開発において、細胞外小胞（extracellular vesicles: EVs）：エクソソームが注目されている。エクソソームはドナー細胞内の核酸（DNA、microRNA など）やタンパク（ペプチド）などを内包しており、エクソソームが標的細胞に移送され、これらの内包物により標的細胞に機能的変化を引き起こすことが知られている(*J Cell Physiol.* 232(7):1660-1668)。我々は、環境化学物質曝露を受けた細胞・臓器において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、影響を及ぼすという、これまでにない新たな毒性発現メカニズムの存在の可能性に着目し、研究を進めている。

これまで、我々は「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」を進めている（環境省重金属研究）。この研究において、Cd 曝露を受けた細胞から産生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ところ、骨細胞への分化が抑制されることを見出した（図 1:未発表知見）。この結果は環境化学物質等の曝露によって産生される異常エクソソーム（もしくは EVs）により、他の臓器に毒性がもたらされる可能性があることを強く示唆している。

一方、エクソソームは母体血・母乳にも含まれる(*Am J Obstet Gynecol.* 221(5):502.e1-502.e12.)。そのため、化学物質による子への影響は化学物質そのものの影響のみならず、母体で産生された異常なエクソソームが子へ移行し、影響を及ぼす可能性もある。以上から、本研究では、母体への環境化学物質曝露により産生される異常なエクソソーム・EVs が子へと移行し影響を及ぼすという新たな毒性発現メカニズムを解明の発見・解明を目指す。



【図1】分化9日目でのALPL(骨細胞分化マーカー)のmRNAの発現低下を確認  
各群: n=8, \*p< 0.05 vs control in day9  
control: Cdばく露していない細胞の培養上清から抽出したエクソソーム  
Cd1: Cd 1μMをばく露した細胞の培養上清から抽出したエクソソーム  
Cd10: Cd 10μMをばく露した細胞の培養上清から抽出したエクソソーム

## 2. 研究方法および結果

母体胎盤から産生されるエクソソームによる神経系細胞への影響を検証するため、ヒト妊娠性絨毛がん細胞由来BeWo細胞に有機フッ素化合物類(PFOA)を0, 1, 10, 100 $\mu$ Mで曝露し、細胞培養上清からエクソソームを抽出した。なお、BeWo細胞へは胎盤機能をもつ合胞体形成のため、Forskolin(FSK)をPFOA添加と同時に添加している。神経細胞のモデルはヒト神経芽細胞腫由来SH-SY5Y細胞を使用し、Shipleyらのプロトコール(*J Vis Exp.* (108):53193.)に従って分化を行った。最終分化時に上記のエクソソームを添加し、3日後に細胞毒性ならびに神経突起に関するマーカーの発現の評価を行った。まず、PFOAのSH-SY5Y細胞への直接の作用による毒性を確認するため、上記のエクソソーム添加時と同じ時期・期間にPFOAを曝露して、細胞毒性並びに神経突起マーカーの発現を確認した。その結果、細胞毒性はなかったが、神経突起マーカー( $\beta$ 3-tubulin, MAP2)は100 $\mu$ M PFOAにおいて、それぞれ有意に減少もしくは増加した。一方、BeWoに1, 10, 100 $\mu$ M PFOAを曝露した際には、100  $\mu$ M曝露時に特に合胞体形成が阻害されたことを確認した。そのため、100  $\mu$ M PFOA曝露BeWo細胞の培養上清から回収したエクソソームをSH-SY5Y細胞へ添加し、最終分化における神経突起マーカー( $\beta$ 3-tubulin, MAP2)の発現を測定した。その結果、いずれのマーカーも対照群に対して100 $\mu$ M PFOA曝露BeWo細胞由来エクソソームによる有意な変化を認めなかった(図1)。

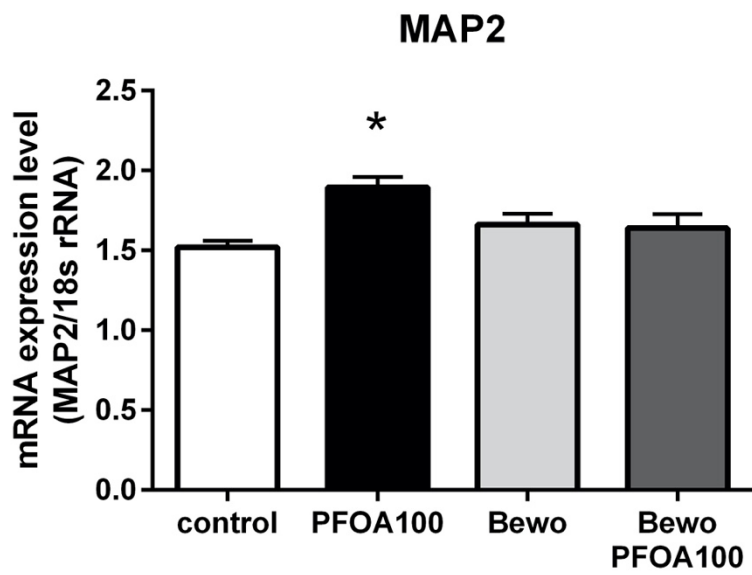
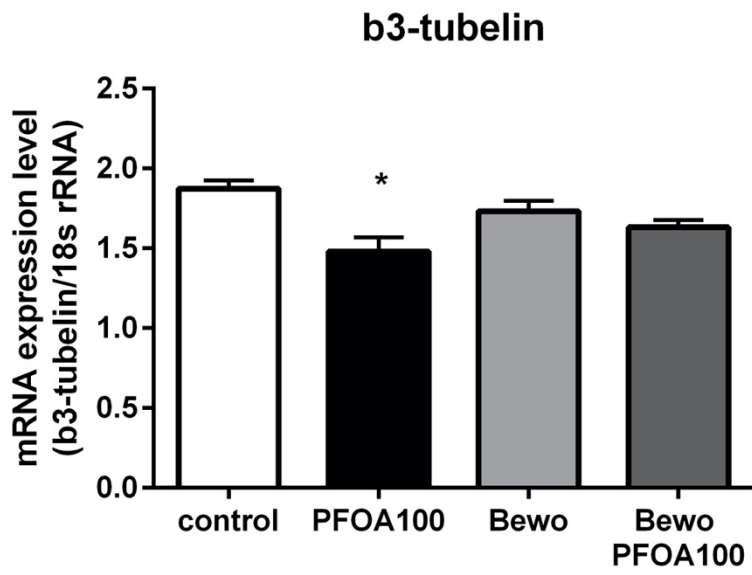
BeWoの細胞培養上清から抽出したエクソソームについて、その性状を明らかにするため、エクソソームの分泌に関わるマーカー遺伝子の発現について検討を行った。BeWo細胞へPFOA(1, 10, 100  $\mu$ M)単独、もしくはFSKと同時に曝露し、3日後にBeWo細胞からtotal RNAを抽出し、逆転写を行ったのち、リアルタイムPCR法にて発現の解析を行った。各マーカーは、nSmase2(セラミド合成酵素でエクソソームを産生する前段階である後期エンドソーム(Multivesicular body (MVB))の形成を促進。過剰発現によりエクソソーム分泌が増加)(*JBC*, 288, 10849-10859)、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: STAM1(*Nanomaterials*, 12(3), 524)、エクソソーム分泌に関わるsoluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE)のひとつであるYKT6とした(*J. Clin. Med.* 9(8), 2380)。各遺伝子発現の結果(図2)から、まず、すべての遺伝子でFSKにより発現が増加していた。つまり、合胞体形成が促進されるに合わせて、エクソソーム形成・分泌が促進されていることが示唆された。PFOA曝露時には、nSmase2は発現が増加していたことから、エクソソーム産生が促進された可能性がある一方、STAM1はPFOAの曝露により発現が減少していることが確認された。合わせて、YKT6も発現が減少して

いた。このことから、MVBの形成が促進しているものの、最終的に成熟したエクソソームの形成ならびに分泌が抑制されている可能性が示唆された。

### 3. 今後の課題

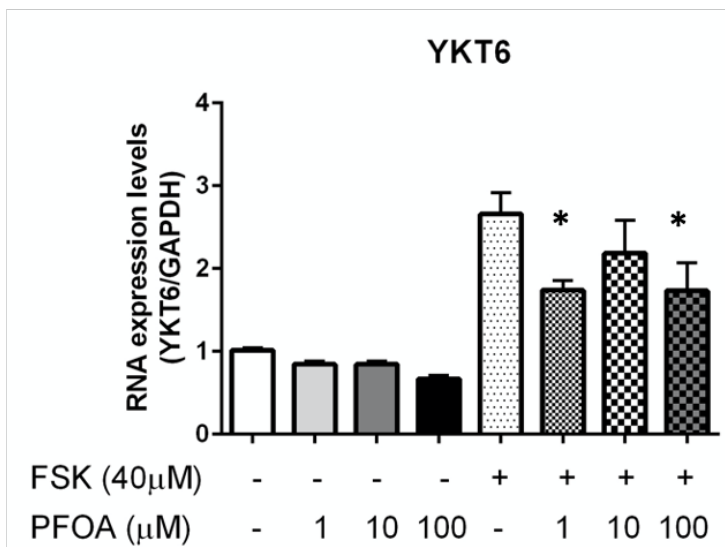
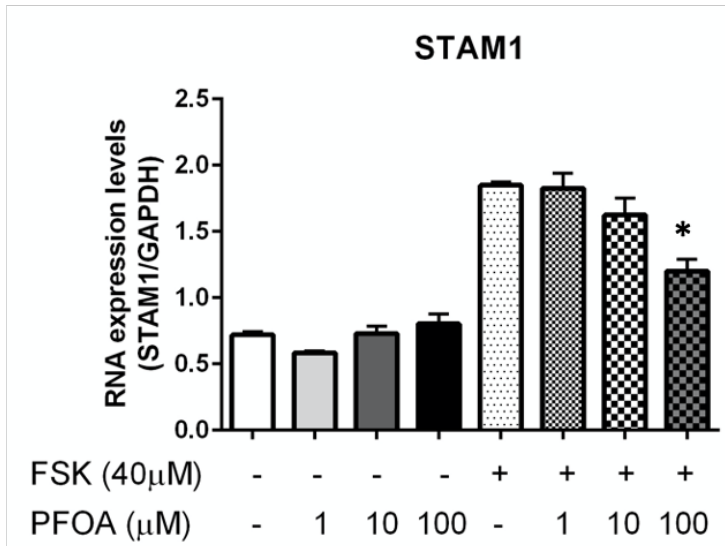
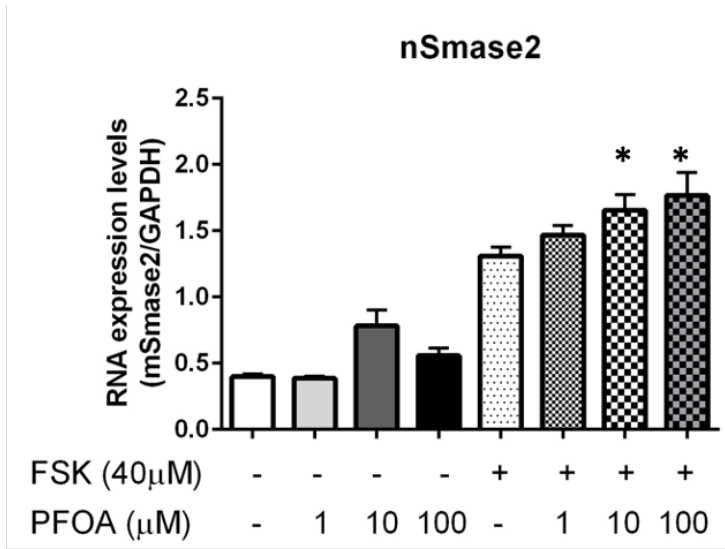
今回の研究においては、神経細胞への PFOA 曝露細胞由来エクソソームの添加が神経突起伸長をはじめとする神経分化に影響を及ぼしうるかを検証した。神経細胞並びに胎盤由来細胞において影響が確認された用量をもとに、PFOA 曝露細胞由来エクソソームを神経細胞へ添加したが、分化への影響は見られなかった。また、エクソソームの産生・分泌にかかる各遺伝子の発現から、エクソソームの性状の確認を行ったところ、胎盤由来細胞への PFOA 曝露がエクソソームの産生・分泌に影響を及ぼしていることが観察された。特にエクソソームの分泌に関わる遺伝子の発現が阻害されていたことは、PFOA 曝露胎盤細胞由来エクソソームが対照群と比較して、数的に減少している可能性が考えられる。今後は、エクソソーム量の確認とともに、エクソソーム産生・分泌メカニズムに PFOA がどのように関与しているのかを確認していく予定である。さらに、ヒトの中で大きな臓器である、肝臓から産生されるエクソソームの胎盤・神経系に対する影響を検証していく。以上の実験において成果が得られた際は、エクソソームに内包される物質（PFOS/PFOA、核酸、ペプチド、代謝物）について詳細な解析をおこない、影響をもたらす因子を明らかにする予定である。

☒ 1



*p* < 0.05 vs. control

Figure 2



*p* < 0.05 vs. FSK