

令和 3年 4月 12日

若手研究者海外挑戦プログラム報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

受付番号 202080077

氏 名 小室 博明

(氏名は必ず自署すること)

若手研究者海外挑戦プログラムによる派遣を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記記載の内容については相違ありません。

記

- 1 派遣先: 都市名 ミシガン州 (国名 アメリカ合衆国)
- 2 研究課題名 (和文): 細胞外ベジクルを用いた心筋を標的とした遺伝子デリバリーシステムの開発
- 3 派遣期間: 令和 2年 11月 4日 ~ 令和 3年 3月 19日 (135日間)
- 4 受入機関名・部局名: Michigan State University, Department of Biomedical Engineering
- 5 派遣先で従事した研究内容と研究状況 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

現在までに世界中で遺伝子導入の開発に物理的・化学的・生物学的の様々なアプローチがなされているが、未だ効果的で安全な技術が実現できていない。細胞外小胞 (EVs) は多種多様な細胞から分泌され、脂質二重膜からなる粒子径 100 nm ほどのナノ粒子である。EVs は細胞間での DNA、RNA、タンパク質などの内包物質を輸送することが報告されていて、この性質を利用した遺伝子デリバリーのためのキャリアとして開発研究が盛んに行われている。しかし、生体適合性の優れた EVs は多臓器へ取り込まれてしまい、標的部位へのデリバリーすることが課題として挙げられている。本研究では、標的部位への特異性向上のために既に派遣先研究室で確立している EVs 膜上へのペプチドを配列する技術の習得し、心筋細胞へのデリバリーキャリアを開発することを目的とした。はじめ、EVs 膜に存在する PS へ結合するタンパクを含みターゲティングペプチドを発現するプラスミドをデザインし、細胞へ遺伝子導入後、分泌した EVs を分離し評価を行った。ペプチドが EVs 膜上に配列されたことを確認し、その標的細胞への有効性について *in vivo* と *in vitro* で EVs をルシフェラーゼ (gLuc) でラベルし IVIS で評価し標的部位への特異性が向上することがわかった。さらに *in vivo* では組織から DNA を抽出し qPCR を用いて標的部位に送達した EVs を検出する未だ報告されていない評価方法を確立することにも取り組んだ。

6 研究成果発表等の見通し及び今後の研究計画の方向性 (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

派遣期間において得られた研究成果はまとめて、査読付き国際雑誌の *Nanotheranostics* に投稿し、3月末にアクセプトされた。また、2021年5月にオンライン上で開催される *The International Society for Extracellular Vesicles* の年会にて研究成果の発表を行う予定である。この領域の学会への参加は初めてになります。EVsはドラッグ（核酸）をデリバリーするためのキャリアとして応用するだけでなく、バイオマーカーなど診断への応用も可能であり大変興味深く、さらに研究の視野を広げるためにこれらの研究者と議論を行う予定である。

本研究においてEVs膜上に標的とする細胞・組織へ特異的なペプチドを配列することに着目し、その効果を示すことに成功した。一方、今後の課題として以下の2点が挙げられる。まず1点目は、標的部位へのEVの取り込みを未だ報告されていない qPCR を用いた評価法を報告したが、*In vivo* 試験に比べて *In vitro* 試験ではばらつきが大きい値を示した。*In vitro* 試験では、1種類の細胞からでありエンドサイトーシスしたEVsがエクソサイトーシスによって細胞外へ放出され、これらが繰り返されることによる影響かもしれない。そこで、今後はより短いタイムコースで細胞と培地中からのDNAを定量することを試みる。これを解決することで、低量のEVsで蛍光物質などでのEVsのラベル化が必要ない評価法をさらに確立することができる。2点目は、遺伝子デリバリーするためのキャリアは開発することができたが医療へ応用するためのドラッグ（核酸）を担持した材料の有効性などの様々な詳細な検討を進めて研究を進めていく予定である。

7 本プログラムに採用されたことで得られたこと (1/2 ページ程度を目安に記入すること)

本プログラムの存在を知り、細胞外小胞で遺伝子治療のキャリア開発を専門で行っている研究室で学びたいと考えた。この研究領域の世界中の研究者や研究室を探すところから始まり複数の研究者に連絡を取りプログラムに採用した際の受け入れ可否などを確認した。この過程は今後、ポスドクなどで研究室を選び、研究者と連絡を取る際に必要であり良い経験ができた。採用後、COVID-19のため当初予定した期間に行く事ができなく渡航の見通しもなく不安もあったが受入研究者からは連絡を絶えず取っていただき、さらに私のバックグラウンドを活かせることのできる総説論文を提案され国際雑誌の *Cancers* に投稿することもでき、原著論文とは違った書き方などを学べた。米国に到着後は2週間の自粛期間と実験や生活するための大学内のWeb上での講義や簡単な試験をパスするためなどに費やすことになった最初の1ヶ月間もポスドクとしてフェローシップや研究費獲得のために必要な書類作成をたくさんディスカッションしながら完成させた。日本とは大きく異なる書き方に戸惑い、何度も修正を繰り返したがとても貴重な経験になったと感じている。

研究については、細胞外小胞の遺伝子治療の応用キャリアの開発について習得したいと考えていたことを達成することができた。特に細胞外小胞をペプチド付加させたキャリアにデザインすることで標的部位へ効果的に送達させることが技術や結果を得たことは今後の研究設計に大きな影響を与えている。多くの人との交流や議論する機会は減ってしまっことは残念であったが、3回発表を行った研究室内のミーティングは絶えず毎週開催され、研究を進める意欲を存分に感じた。さらに研究所内や世界各地の研究者間の共同研究が多くて行いやすいのは、アイデアを躊躇することなく伝えて議論するからだと思い、見習うべき点である。上記のような貴重な経験を与えてくださった日本学術振興会、そして派遣先の研究室・研究所の方々をはじめとする皆様に心より厚く御礼申し上げます。