

帰国後 2 週間以内に提出してください (厳守) A4 用紙 4 枚以内 下記項目は変更しないでください。

(海外・国内) インターンシップ報告書

2022 年 11 月 15 日提出

氏名	河野 光平
所属	繁殖学教室
学年	DC4
活動先名	コロラド州立大学、米国
期間 ① (出発日—帰札日) ② (インターンシップ実施開始日—終了日)	① 2022 年 10 月 31 日-11 月 14 日 ② 2022 年 10 月 31 日-11 月 12 日

・活動目的及びインターンシップ先を選択した理由

博士課程における研究テーマである、暑熱ストレスによる牛の卵子発生能の低下のメカニズムについて、今後より詳細に調査していくために、細胞から放出される微小な小胞であるエキソソームに関する知見や実験手技について学ぶ。また、米国コロラド州立大学における研究および教育体制を実際に見て学ぶことで、海外の大学でのポスドクを視野に入れた大学院卒業後の進路について考える機会とする。

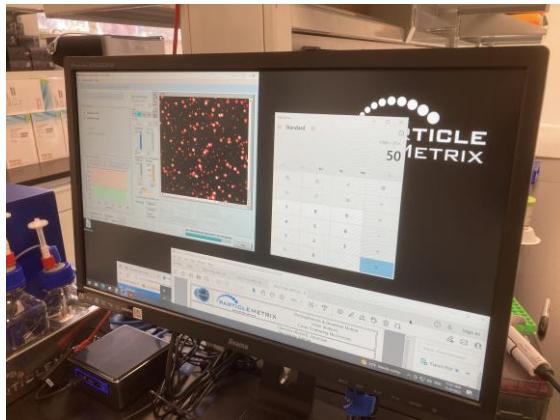
・活動内容・成果 (2,000 字程度、活動内容が判る様な写真や図表を加えて下さい)

細胞から分泌され、細胞と同じ脂質 2 重膜からなる微小な小胞であるエキソソーム(直径 50-150 nm 程度)は、タンパク質、メッセンジャーRNA、マイクロ RNA、DNA など様々な生理活性物質を含んでいる。近年、エキソソームを取り扱った研究が盛んにおこなわれており、エキソソームが細胞に取り込まれ、その細胞の機能制御に大きな役割を果たすことが示されている。一方で、エキソソームを取り扱った研究を行ううえでは、体液や培養液からエキソソームを単離し、かつ、純度の高いエキソソームが含まれていることを証明することが必須であるが、特殊な機器や様々な実験手技が求められる。今回のインターンシップでは、コロラド州立大学の Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory (ARBL) の Prof. Dawit Tesfaye の研究室を訪問した。Prof. Dawit Tesfaye は、エキソソームによるウシの生殖細胞の機能制御に関する研究において、近年多くの業績をあげられている。

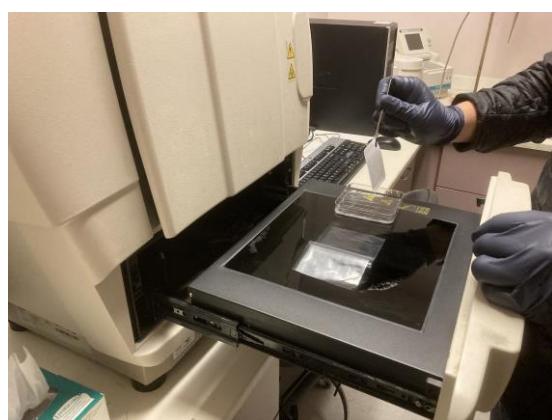
エキソソームに関する実験手技として、以下のことを学ぶことができた。

- 超遠心分離機およびサイズ排除クロマトグラフィー (Size-exclusion chromatography) によるエキソソームの単離
- ナノ粒子トラッキング解析 (Nanoparticle tracking analysis) によるエキソソームの個数の計測およびサイズの分布の解析

3. ウエスタン blot によるエキソソーム特異的タンパク質の検出
4. マイクロ RNA の牛顆粒層細胞への取り込み (Transfection)



エキソソームのナノ粒子トラックキング解析



ウエスタン blot によるタンパク質の検出

なかでも、1-3 については、エキソソームを取り扱う研究において必須であるため、実際の実験手技を学ぶことができたのは有意義であった（1-3 に加えて電子顕微鏡による観察も必須である）。既出の論文から実験プロトコールは手に入るが、論文中のプロトコールに記述されていない注意点が多々あった。

Prof. Dawit Tesfaye の研究室の大学院生やポスドクに質問を行い、以下に挙げるような、エキソソームの研究に関する知見についても得ることができた。

- ・培養液を回収する際は、通常の遠心処理による細胞成分の除去およびフィルター処理によるサイズの大きい細胞外小胞（直径 200 nm 以上）の除去が必要であること。これらの処置を行う前に凍結保存をしてしまうと融解後に細胞成分などのコンタミネーションが起こってしまう。

- ・超遠心分離によるエキソソームの単離は、エキソソームの実験において必須の実験過程であると考えていたが、必ずしも必要というわけではないことが分かった。キットとして販売されているサイズ排除クロマトグラフィー法に加えて、限外濾過法（Ultrafiltration）などを組み合わせることで、純度の高いエキソソームを抽出できるということを学んだ。

- ・培養細胞から回収できるエキソソームの量は、体液（卵胞液など）と比較して、非常に少なく、エキソソームを単離し、培養細胞に作用させるには大量（少なくとも 10 ml 以上）の培養液が必要であることが分かった。

Prof. Dawit Tesfaye の研究室のミーティングにおいて、自身がこれまでに行ってきました研究について発表する機会があった。研究室のメンバーからは自身の研究に興味を持っていただき、有意義なディスカッションを行うことができた。また、設備が限られている日本の研究室でも実験を行うためにどのようにすればよいか、いろいろと助

言を頂いた。

International Society for Extracellular Vesicles (ISEV) のオンラインセミナーにも参加し、最新のエキソソームに関する知見（エキソソームの新しい単離方法や単離方法の違いによって以降の実験結果が異なってくることなど）を取り入れることができた。また、ARBL におけるセミナーにも参加した。ARBL の Director である Prof. Thomas Hansen や体細胞クローニング技術の研究で有名なユタ州立大学の Prof. Irina Polejaeva の講演も聞くことができ、動物の繁殖学に関連した幅広い知見を得ることができた。

大学院卒業後は海外の研究機関でのポスドクを視野に入れており、今回のインターンシップではそれについて考える良い機会となった。Prof. Dawit Tesfaye の研究室のポスドクである Dr. Ahmed Gad とポスドクについて話す機会があった。Dr. Gad はこれまでに米国以外にもドイツやチェコでポスドクの経験があるとのことであった。海外でのポスドクになるうえで、自分としては外国での生活に適応できるのかが懸念事項であったが、Dr. Gad によると「まあ、最初は大変だけど慣れる」とのことであった。また、ポスドクになるメリットとして、新しい環境に身を置いてチャレンジすることで自分の能力を高められる点や研究に集中できる点を挙げていた。さらに、日本に帰った後もエキソソームの実験のことなど何でも聞いてくださいと言つていただけた。このようなつながりを構築できたことも今回のインターンシップにおける収穫であった。

ARBL には 30 名近い教員が在籍し、研究室の数も少なくとも 10 以上あった。ARBL 全体で研究活動に取り組んでいるよう、ARBL 内の他研究室の実験機器を自由に使えたり、他の研究室のテクニシャンに解析をお願いしたりするなど、非常に効率的に研究を進めていると感じた。他には、日本では牛の卵巣は週に 1-2 回しか採取することができないが、ARBL では平日であれば毎日手に入り、朝から卵巣を採取して実験を行うことができる。学生や教員も含めて夕方の 5 時にはみんな帰宅しており、ワーカーライフバランスの点からも日本とかなり異なっており印象的であった。

さらに、インターンシップ期間中に ARBL 以外に、動物と人間双方への医療に役立てるための研究を行っている Translational Medicine Institute にも訪問することができた。様々な動物種専用の手術台や CT などの設備があり、手術の様子もモニターにて常に見学できるようになっていたことが印象的であった。

・後輩へのアドバイス

「餅は餅屋」という諺があるように、インターンシップに行くのであれば、その分野でトップレベルの研究機関に行くべきである。その意味では、今回のインターンシップは非常に有意義であると考えている。

指導教官との知り合いではない研究者のもとに行く場合は、メールのやり取りだけでなく、Zoomなどでインターンシップの内容について直接話し合う機会を設けた方がよい。自分の場合はメールのやり取りではうまく内容について詰めることができず、現地で会った際に内容が決まっていくかたちだったので、100%自分の望む内容にすることが難しかった。

指導教員確認欄	指導教員所属・職・氏名 繁殖学教室・教授・片桐 成二
---------	-------------------------------

※1 電子媒体を国際連携推進室・卓越大学院プログラム担当に提出して下さい。

※2 インターンシップ先の担当者が活動内容を証明した文書（署名入り）を提出して下さい。

※3 本報告書は卓越大学院プログラムキャリアパス支援委員会で内容を確認します。その後、教務委員会で単位認定を受けることになります。

提出先：VETLOG

内線：6108 e-mail: ohf@vetmed.hokudai.ac.jp