

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08326

研究課題名(和文) 脳細胞由来血漿エクソソームの多層的オミックス解析によるアルツハイマー病の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of Alzheimer's disease through multi-layered omics study of blood exosomes derived from brain

研究代表者

滝川 修 (TAKIKAWA, Osamu)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・その他部局等・その他(移行)

研究者番号：70163342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：認知症の大半を占めるアルツハイマー病(AD)においてアミロイド仮説に基づきアミロイドペプチド(A β)を標的として治療薬開発が行われて来たが成功していない。本研究では、ADの前段階である軽度認知症及びAD患者の脳細胞(アストロサイト及び神経細胞)由来の血漿中エクソソームの多層的網羅的解析(蛋白質、代謝産物、miRNA)を行うことにより、その分子病態に迫り、ADの予防法や根本治療薬の開発を目指した。その基盤技術として血漿に含まれる神経細胞由来エクソソーム(NDE)及びアストロサイト由来エクソソーム(ADE)単離法の確立を試みた。

研究成果の概要(英文)： Alzheimer's disease (AD) accounts for the majority of dementia. Therapeutic drug development for AD has long been conducted, targeting amyloid peptide (A β) based on amyloid hypothesis but it has not succeeded yet.

In this study, to identify novel molecular targets for drug development for AD, non-biased multilayered comprehensive analysis of proteins, metabolites, and miRNAs of exosomes in plasma derived from brain cells (neurons and astrocytes) of mild cognitive impairment (MCI) and AD was planned and to this end, we first tried to establish the reliable isolation method of neuron-derived exosomes (NDE) and astrocyte-derived exosomes (ADE) from human plasma.

研究分野：神経科学

キーワード：認知症 アルツハイマー病 エクソソーム リキッドバイオプシー 多層的オミックス解析

1. 研究開始当初の背景

加齢性神経変性疾患である認知症の根本治療薬の開発は高齢化が急速に進む我が国のみならず欧米先進国の喫緊の課題である。これまでに認知症の50%以上を占めるアルツハイマー病(AD)においてアミロイド仮説に基づき神経毒とされるアミロイドペプチド(A β)の産生抑制剤及び免疫療法の開発が行われてきたが何れも成功しておらず、アミロイド仮説が揺らぎ始めている。

2. 研究の目的

本研究の最終目的は、ADの前段階である軽度認知症及びAD患者の脳細胞(アストロサイト及び神経細胞)由来の血漿中エクソソームの多層的オミックス解析、即ち、トランスクリプトーム解析(miRNA解析)、メタボロミクス、プロテオミクスのnon-biasedな3層解析を行うことにより、その分子病態に迫り、ADの予防法や根本治療薬の開発に資する新たな科学的基盤を提供することにある。本研究ではまず血漿中に存在する神経細胞由来のエクソソームを高純度で分離する方法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

標準品として健常人血漿中の脳神経細胞由来エクソソーム(NDE: neuron-derived exosomes)は米国NanoSomixから得た。その分離方法は、既報の論文(Fiandaca et al., *Alzheimers Dement.* 11:600-607, 2014)に準拠している。即ち、ExoQuick(SBI社、品番EXQ5-1)で沈殿させた血漿全エクソソームからNDEに特異的な表面マーカーであるL1CAMに対するピオチニル化抗体とアビジン結合ビーズで沈降して分離した。抗体とビーズの複合体として沈降したNDEはpH3.0の酸性条件下で遊離させ、1M Trisを添加して中和後、分析まで-80℃で凍結保存した。NDE中のA β 42はギ酸処理して可溶化後、Human Amyloid (1-42) ELISA Kit(和光純薬、品番296-6441)を使用して測定し

た。NDE中のpTau181は界面活性剤で可溶化後、Human Tau [pTau] ELISA Kit(Thermo Fisher社、品番KH00631)により測定した。NDEの粒子径及び濃度測定はqNano(IZON社)を使用して行った。NDEの蛋白定量はBCA法(TaKaRa社)により行った。上記の界面活性剤を含む可溶化液はKitのプロトコールに記載された方法で調製した。

4. 研究成果

(1) NDE中のA β 42及びpTau181量の測定

血漿NDEに含まれるA β 42及びpTau181レベルの測定で軽度認知症障害やアルツハイマー病(AD)の診断が可能と報告されている(Fiandaca et al., *Alzheimers Dement.* 11:600-607, 2014)。論文では血漿0.5mlで測定可能と報告されているが、本研究で追試を行い測定に必要な最低血漿量を調べた。市販の血漿3mlから上記の研究方法に従い単離したNDEを300 μ LのPBS懸濁し、ELISA kitによる測定に必要な最低血漿量を求めた。その結果、A β 42に関しては40 μ LのNDE懸濁液、即ち血漿0.4mlに含まれるNDEで十分に信頼性の高い測定が可能であることが判明した。pTau181に関しては10 μ LのNDE懸濁液、即ち血漿100 μ Lで再現性良く測定可能であることが判明した。

(2) 血漿からNDEの分離法の確立

血漿NDEの単離は本技術を確立したUCSFのGoezl教授らが設立したバイオベンチャーであるNanoSomixに外注していたが、その費用が300USドル/検体と高額であり、今後多数の検体の解析を考慮すると外注することが困難である。そこで、自ら血漿からNDEの分離法を確立することを試みた。Fiandacaらの原法(*Alzheimers Dement.*, 11:600-607, 2014)及び同グループによる最近の続報(*Frontiers, et al., Neuroscience*, 11:278-282, 2017)に準じて分離を追試した

が NDE を分離するには至っていない。全く同じ市販の ExoQuick、ピオチニル化抗 L1CAM 抗体やストレプトアビジンビーズ等を使用しており、その原因は現時点では不明である。

(3) 考察

本研究において、脳組織由来の血漿 NDE に含まれる病原性バイオマーカー Aβ42 及び pTau181 の測定の追試を行った。Fiandaca らの原法 (Alzheimers Dement., 11:600-607, 2014) で報告されている通り、0.5ml の血漿 NDE で Aβ42 及び pTau181 の測定可能であることが判明した。本研究では通常の ELISA kit を使用したが、最近開発されたデジタル ELISA 装置を使用すれば、100 分の 1 量の血漿量で十分であり、患者に負担の少ない微量の採血で Aβ42 及び pTau181 に加えて、シヌクレインや FDP43 等の他の病原性蛋白の多項目測定が可能であり、認知症のタイプ診断が可能である。

自験例で NDE の分離が再現できなかった原因として、ExoQuick で濃縮した全エクソソームは高度に凝集しており、ピオチニル化抗 L1CAM 抗体を添加する前に単分散させる必要があるが、この実験条件の論文記載が曖昧であり、この段階に問題がある可能性が高い。現在、論文著者らに当該実験条件も含めて詳細を問い合わせ中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- 1) Torii Y, Kawano Y, Sato H, Fujimori T, Sasaki K, Kawada J, Takikawa O, Lim C K, Guillemin G J, Ohashi Y, Ito Y. Metabolome analysis reveals the association between the kynurenine pathway and HHV6 encephalopathy in immunocompetent children, *Metabolomics*, 13:136 (2017)

- 2) 滝川 修、脳リキッドバイオプシー、

MEDCHEM NEWS, 27:64-69 (2017).

- 3) Kayano M, Higaki S, Satoh J, Matsumoto K, Matsubara E, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomark Res.* 4:22 (2016).
- 4) 茅野光範、桧垣小百合、佐藤準一、新飯田俊平、松本健治、松原悦郎、滝川 修、網羅的血液 miRNA 解析による軽度認知障害のバイオマーカー探索、*日本認知症学会誌*、31: 79-85 (2017)

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) 滝川 修、「医療・健康産業を変える革新技術：細胞特異的リキッドバイオプシー（アルツハイマー病を例として）」日本化学会第 97 春季年会(2017)、平成 29 年 3 月 18 日、慶應義塾大学 日吉キャンパス

- 2) 滝川 修、脳リキッドバイオプシー、2017 年度日本老年病医学会学術集会、シンポジウム“認知症医療の最前線”、平成 29 年 6 月 16、名古屋国際会議場

- 3) 滝川 修、「医療・健康産業を変える革新技術：脳リキッドバイオプシー（アルツハイマー病を例として）」第 22 回日本フードファクター学会、平成 29 年 3 月 18 日、日本大学、藤沢。

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称:アルツハイマー病の発症を予測する方法
発明者:前川京子、田島陽子、石川将己、斎藤嘉朗、奥野海良人、新飯田俊平、滝川 修
権利者:国立食品衛生研究所、国立長寿医療研究センター
番号:特許第 5986440 号

取得年月日：平成 28 年 8 月 12 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

https://www.tut.ac.jp/university/faculty/ee/post_40.html

<https://ja.wikipedia.org/wiki/瀧川修>

6．研究組織

(1)研究代表者

滝川 修 (TAKIKAWA, Osamu)

国立長寿医療研究センター・治験臨床研究推進センター・部長

研究者番号：70163342

(2)研究分担者

奥野海良人 (OKUNO, Alato)

つくば国際大学・保険医療学部・講師

研究者番号：50623980