

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15667

研究課題名(和文)“Exosome Cargo”：DAMPs の新規デリバリーシステムの提唱

研究課題名(英文)Proposal of novel concept, Exosome cargo as a novel DAMPs delivery system

研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任教授

研究者番号：20082282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1. エクソソーム内にヒストン内包は証明済み、HMGB1の内包に関しては証明中。1) エクソソーム分離法：メラノーマ細胞A375の培養液から超遠心で分離した上清pellet分画にエクソソームが回収されることを確認。2) 本分画のimmunoblot解析で、CD9Alix, CD63, HSP70, Histonesは陽性、HMGB1は現在研究中。3) エクソソーム内Histoneの種類とエピジェネティック修飾は解析中。2. エクソソーム表面糖鎖構造に特徴的な物を発見し現在構造決定中。3. エクソソーム内包microRNA解析も現在進行中。4. 今後HMGB1分子の還元型, 部分酸化型, 全酸化型を決定予定。

研究成果の概要(英文)：We have been investigating in damage associated molecular patterns, DAMPs, focusing on HMGB1 and histones. We established the specific ELISA assay method and showed that these two DAMPs are worthy of diagnostic marker for DIC and septic shock. Therefore we have stated to establish “exosomal DAMPs”. After the ultracentrifugation of conditioned medium from melanoma, we obtained exosome. The immunoblotting study, the exosome expressed and showed molecules of CD63, CD 81, both are markers of exosome. We also detected high mannose glucose chain. We could positive band for histones, suggesting that exosome contains histones. In conclusion of this preliminary study, DAMP; histones are actually contained into exosome. Whether the exosomal histones exert their cytotoxic effect is remained as a next study. In conclusion we partially succeeded in showing that exosome actually contains DAMP: histones. We are going to study on the cytotoxic bioactivity of this exosomal histones.

研究分野：血管代謝とその病態、ショック、播種性血管内凝固症候群性の発症機構とその検査学的診断法、治療法の開発

キーワード：エクソソーム DAMPs PAMPs

1. 研究開始当初の背景

申請者らは DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns), PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) の機能、生理活性と病態発現、DAMPs/PAMPs の特異的アッセイ法とその標的治療法などについて研究してきた。

特に、DAMPs; HMGB1, ヒストン、PAMPs; LPS などについては、その特異的測定法、生理活性と受容体、シグナル伝達に関する研究では一定の成果を挙げてきている。しかし、DAMPs: HMGB1, ヒストンの細胞外への放出機構に関しては、現在のところ解明されていない。一方申請者らは別個に細胞由来の小胞 exosome の研究を行ってきた。そこで DAMPs が exosome 内に内包されて細胞外に放出される可能性を考えて本研究に取り掛かった。いわゆる “exosome cargo” なる概念の創出である。exosome 内に内包されて放出されると仮定すると、微量の DAMPs であっても循環血液で希釈されることなく、一定の濃度を保持できるほか、有効に標的細胞にターゲティングして、生理活性を發揮しうると考えられる。

2. 研究の目的

(1) naked, free DAMPs, -PAMPs と exosomal DAMPs, -PAMPs という 2 様の存在様式という作業仮説の検証: 諸細胞、特に癌細胞からの DAMPs, あるいは病原体感染細胞からの PAMPs の中には、フリー、すなわち naked なものと、exosome 内に内包されているもの、すなわち exosomal DAMPs, -PAMPs も存在することを証明し、naked DAMPs, -PAMPs の場合には循環血中で希釈され、活性は減弱するものの、量的・時間的に一定の閾値を超えると、全身性の表現型; systemic symptoms の発現に関わること、これが DIC やショック、多臓器不全などに関わることの検証。

(2) 一方、exosomal DAMPs, -PAMPs の場合には、局所限局性の機能発現、すなわち修復、恒常性維持などに関わるが、動脈硬化、血栓症、ショック、感染拡大、播種性化、悪性腫瘍の転移拡大などの病態形成にも関係していることを明らかにする。DAMPs に関してはこれまで研究してきた、データが蓄積している HMGB1 とヒストンを中心に研究を展開する (図 1)。

(3) 循環血中の exosome は at random に血中を循環するのではなく、ある程度の

selectivity を持って循環し、標的臓器にターゲティングされ、標的細胞で機能を発現するという exosomal DAMPs logistic system という作業仮説の可能性を検証する。そしてこの場合においては、exosome 表面糖鎖が、遠隔臓器・組織の特有のレクチンによって認識されて、標的化され、これが癌の転移臓器志向性に関わる、という作業仮説を証明する。すなわち、exosome の運命が遠隔臓器に発現しているレクチンによって認識され、標的化されて、exosome の志向性を決めている可能性の検証である。

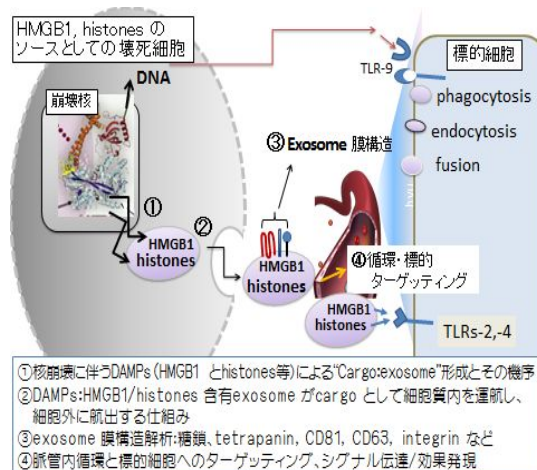


図 1. Exosome 形成と標的シグナリングのダイナミズム

3. 研究の方法

(1) 細胞は、株化されている細胞を培養して使用する。今回はメラノーマ細胞株 B 16 を培養し、培養上清を超遠心して、沈殿分画より exosome 分画を得た。これを電顕で exosome であることを証明した後に、ウエスタンブロットで発現している分子 (CD63, flotillin など) で同定する。

(2) exosome 中にどのような DAMPs が入っているのかを免疫学的に調べる。

4. 研究成果

(1) exosome は正常人から得た血漿、尿中にも存在する。しかし病態下のヒトの血漿、尿中での exosome の多寡を検証するところまでは到らなかった。これは信頼できる exosome の定量法の確立に至らなかったためである。

(2) メラノーマ細胞株 B 16 の培養上清から得られた exosome 内には、ヒストンが豊富に

含まれていることが判明した(図2、図3)。このヒストンが遠隔臓器に運ばれて、組織・細胞に粘着し、DAMPs としての機能を発揮するか否かについては検証し得なかった。あと一つ、目的とした HMGB1 に関しては、再三トライしたが、確認し得なかった。しかし HMGB1 に特異的な ELISA 法では検出しえたので、immunoblot 法の感度を上げる方法を確立する必要があると考えられた。そのほかに heat shock proteins がリッチに含まれていることが検証された。この heat shock proteins は最近、DAMPs の機能抑制(炎症制御、修復など)活性を発揮することから、RAMPs(Resolution Associated Molecular Patterns)としての概念が提唱されているので、exosome 内には DAMPs のみならず、RAMPs も含まれて、炎症を制御している可能性が示唆されて、今後の研究の方向性が提示された。

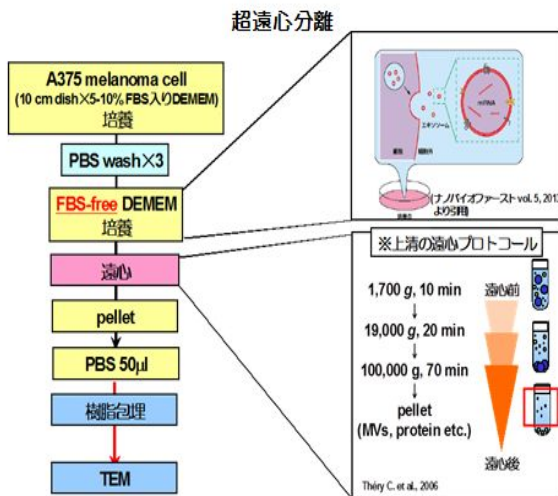
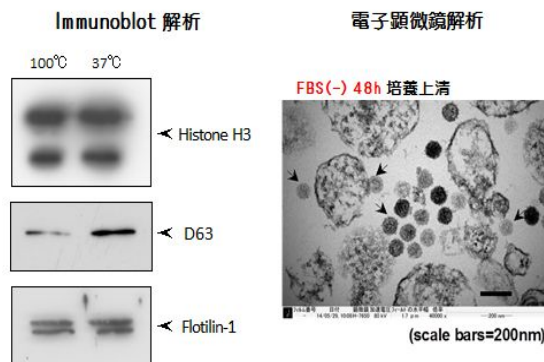


図2 Exosome 分離方法



* HMGB1のバンドはimmunoblot では検出し得なかったが、ELISA 法では検出しえた

図3 . Exosome の電顕、免疫電気泳動上の Characterization

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Iba T, Ito T, Maruyama I, Jilma B, Brenner T, Müller MC, Juffermans NP, Thachil J. Potential diagnostic markers for disseminated intravascular coagulation of sepsis. Blood Rev. 査読有 . 2016 ;30(2):149-55. doi: 10.1016/j.blre.2015.10.002.

Fujita H, Yagishita N, Aratani S, Saito-Fujita T, Morota S, Yamano Y, Hansson MJ, Inazu M, Kokuba H, Sudo K, Sato E, Kawahara K, Nakajima F, Hasegawa D, Higuchi I, Sato T, Araya N, Usui C, Nishioka K, Nakatani Y, Maruyama I, Usui M, Hara N, Uchino H, Elmer E, Nishioka K, Nakajima T. The E3 ligase synoviolin controls body weight and mitochondrial biogenesis through negative regulation of PGC-1 . EMBO J. 査読有 . 2015 15;34(8):1042-55. doi: 10.15252/embj.201489897.

Tanaka M, Shinoda M, Takayanagi A, Oshima G, Nishiyama R, Fukuda K, Yagi H, Hayashida T, Masugi Y, Suda K, Yamada S, Miyasho T, Hibi T, Abe Y, Kitago M, Obara H, Itano O, Takeuchi H, Sakamoto M, Tanabe M, Maruyama I, Kitagawa Y. Gene transfer of high-mobility group box 1 box-A domain in a rat acute liver failure model. J Surg Res. 査読有.2015;194(2): 571-80 doi: 10.1016/j.jss.2014.11.022.

[学会発表](計0件)

[図書](計4件)

一瀬白帝、丸山征郎、村田 満 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「検査と診療」、2015、208

一瀬白帝、丸山征郎、和田英夫郎 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「抗凝固と線溶」、2015、133

一瀬白帝、丸山征郎、家子正裕 編著、金芳堂、新・血栓止血血管学「凝固と炎症」、2015、189

一瀬白帝、丸山征郎、内山真一郎 編著、
金芳堂、新・血栓止血血管学 「血管と
血小板」、2015、251

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：細胞老化抑制剤

発明者：丸山征郎、川原幸一

権利者：国立大学法人鹿児島大学、
学校法人常翔学園

種類：特許

番号：特願 2016-010965

出願年月日：2016年1月22日

国内外の別：国内、国外

取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

丸山 征郎 (MARUYAMA, Ikuro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科

・特任教授

研究者番号：20082282

(2)研究分担者

山口 宗一 (YAMAKUCHI, Munekazu)

鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授

研究者番号：20325814

伊藤 隆史 (ITO, Takashi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・講師

研究者番号：20381171

(3)連携研究者

原田 陽一郎 (HARADA, Yoichiro)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任准教
授

研究者番号：80464147