

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02585

研究課題名(和文) タンパク質恒常性維持機構の変容に着目した神経変性疾患の診断治療法開発

研究課題名(英文) Development of diagnostic biomarkers for neurodegenerative diseases by comprehensive analysis of disease-associated alterations in organismal proteostasis

研究代表者

武内 敏秀 (Takeuchi, Toshihide)

近畿大学・ライフサイエンス研究所・講師

研究者番号：70600120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：多くの神経変性疾患は、タンパク質の凝集・蓄積が原因となって発症する。以前、著者らは分子シャペロンのエクソソーム分泌・伝播を介した新しい生体内防御機構の存在を明らかにし、その活性化による細胞非自律的な神経変性抑制効果を報告した。そこで本研究では、エクソソームを介した生体内防御機構に着目し、その分子機序解明と神経変性疾患における変容解析を行った。その結果、シャペロン分泌を制御する細胞内因子を同定した。また、神経変性疾患で変動するエクソソーム分子を同定した。以上から、エクソソームを介した生体防御機構の一端が解明されるとともに、神経変性疾患の診断バイオマーカー候補分子が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エクソソームを介した細胞非自律的プロテオスターシス維持機構の分子機序の一端が明らかとなった。また、神経変性疾患におけるエクソソーム分泌の変容が明らかとなり、病態機序との関連が示唆された。さらに、ポリグルタミン病における血液エクソソームタンパク質の変容が網羅的に明らかとなり、神経変性疾患の病態診断バイオマーカー候補分子が同定された。

研究成果の概要(英文)：Protein misfolding and aggregation are associated with the onset and progression of many neurodegenerative diseases. Previously we reported that secretion and transmission of molecular chaperones via exosomes, one of the extracellular vesicles (EVs), suppress neurodegeneration in a non-cell autonomous manner, contributing to maintenance of organismal protein homeostasis. To elucidate the molecular mechanisms, here we performed comprehensive analysis of EV contents using the cellular and animal models of the polyglutamine diseases, one of the neurodegenerative diseases. We found that a cellular factor is responsible for secretion of molecular chaperones via EVs. We also found that several EV proteins are altered in the disease models, some of which are confirmed in patients. Our data provide not only insight into the mechanism of EV-mediated secretion of chaperones but also a promising platform for the development of EV-based biomarkers for the neurodegenerative diseases.

研究分野：分子生物学

キーワード：神経変性疾患 エクソソーム プロテオスターシス

1. 研究開始当初の背景

神経変性疾患は、脳や脊髄の神経細胞が徐々に変性・脱落することで、物忘れが多くなったり、手足がうまく動かせなくなったりする病気の総称である。例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、ポリグルタミン病（ハンチントン病や一部の脊髄小脳失調症）などがよく知られている。根本的な治療法は開発されていない。神経変性疾患は、一般に高齢で発症することが多いが、近年の高齢者人口の増加に伴い、患者数が増加傾向にある。とりわけ世界に先駆けて超高齢社会を迎えた我が国においては、患者数の増加に伴う介護者の負担や医療費の増大などの社会負担が深刻な国民的問題となりつつある。神経変性疾患の病態機序の解明とそれに基づく治療法・診断法の開発が求められている。

多くの神経変性疾患では、異常なタンパク質の凝集や蓄積が疾患の発症や進行に深く関与すると言われている。アルツハイマー病におけるアミロイドβやタウ、パーキンソン病におけるαシヌクレイン、筋萎縮性側索硬化症におけるTDP-43、ポリグルタミン病における異常伸長ポリグルタミンタンパク質などのタンパク質は、いずれも構造安定性に乏しく、容易に異常な構造へと変移（ミスフォールディング）して凝集し、神経細胞内（もしくは細胞外）に蓄積する。異常構造へと変移したタンパク質は、それ自身の生理機能を失ったり、あるいは他の生理活性分子を巻き込んで凝集したりすることで、神経細胞の活動や生存に負の影響を与え、最終的に神経機能障害や細胞死を引き起こすと考えられている。

近年、このタンパク質凝集を引き起こす要因として、遺伝子変異による原因タンパク質自身の凝集性獲得に加え、タンパク質凝集を抑制する生体内防御機構＝タンパク質恒常性維持機構（プロテオスタシス維持機構）の機能不全が指摘されている。プロテオスタシス維持機構は、分子シャペロンを中心とするタンパク質の品質管理機構であるが、神経変性疾患では分子シャペロンの発現量低下や凝集体との共凝集による著しい機能喪失が報告されていることから、生体が備える凝集処理機構の機能低下が共通して神経変性病態に促進的に関与していると考えられる。特に、遺伝子変異を持たない野生型の原因タンパク質がやはり凝集蓄積する孤発性神経変性疾患の多くにおいては、タンパク質の凝集性を規定する生体内プロテオスタシス維持機構の変容が重要な役割を担うと考えられる。一方、遺伝子発現や薬剤投与によりシャペロン発現量を逆に増大させると、タンパク質凝集が抑制されて病態が改善することから、生体が備えるプロテオスタシス維持機構は病態機序のみならず、治療法開発のための創薬標的としても重要である。これらのことから、生体が備えるプロテオスタシス維持機構の全容を解明し、疾患における変容を詳細に明らかにすることは、神経変性疾患の病態解明のみならず、診断法や治療法開発に重要な知見を提供することが期待できる。

このような背景のもと、我々はこれまで生体内プロテオスタシス維持機構の解明を目指して研究を進めてきた。その結果、熱ショックタンパク質 Hsp70 や Hsp40 などの分子シャペロンがエクソソームと呼ばれる細胞外小胞により分泌され、他の細胞に伝播してタンパク質凝集を抑制するという細胞非自律的なプロテオスタシス維持機構を明らかにした（図1）（Takeuchi, PNAS 2015）。生体内プロテオスタシスは、個々の細胞で独立に維持されるだけでなく、個体全体でも細胞間・組織間ネットワークを介して適切に維持されると考えられ、後者の仕組みにエクソソーム伝播が重要な役割を担う可能性が示された。注目すべきことに、シャペロン分泌はシャペロン発現量に相関して変動することから、神経変性疾患では従来考えられてきた組織内シャペロンシステムの変容に加え、エクソソームを介した防御機構も同時に変容し、個体全体で凝集をうまく処理できない状況に陥っている可能性がある。

エクソソームは、細胞が分泌する直径 50~200nm 程度の膜小胞であり、血液や脳脊髄液、尿などの細胞外液中に豊富に存在する。エクソソーム内には、タンパク質や核酸、脂質、代謝物などといった細胞内容物を含む。したがって、病態と関連するエクソソーム変動因子を同定できれば、生体内防御機構の変容から疾患状態を間接的に捉える病態診断バイオマーカーとして利用できる可能性がある。

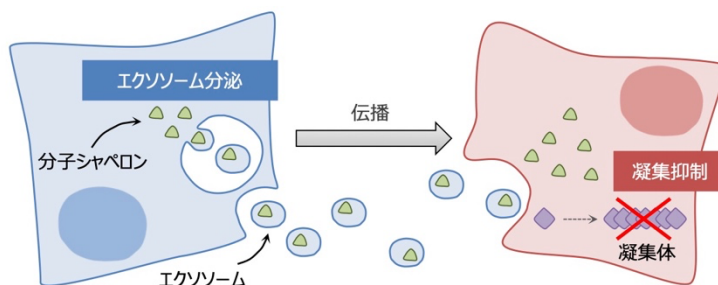


図1 エクソソームを介したプロテオスタシス維持

2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では細胞非自律的なプロテオスタシス維持機構について、エクソソーム分泌・伝播に着目してその分子機序解明を行うとともに、神経変性疾患でこれがどのように

変容しているかを明らかにすることを目的とした。神経変性疾患におけるエクソソーム分泌や伝播の変容が明らかとなれば、疾患状態を生体内プロテオスターシスの変容として間接的に捉える病態診断バイオマーカーへの展開が期待できる。

3. 研究の方法

本研究では、神経変性疾患のひとつであるポリグルタミン病に着目した。ポリグルタミン病は、グルタミンをコードする CAG リピートの異常伸長という単一遺伝子変異により発症する遺伝性疾患であり、アルツハイマー病などの他の神経変性疾患と比較して発症や病態進行における環境要因（非遺伝性要因）の寄与が少ないため、実験モデルの構築が容易であり、分子生物学的解析に優れるという特長を有している。実際、ポリグルタミン病は、特定の遺伝子変異の導入によりヒト疾患病態を再現するノックインマウスや霊長類モデルがすでに樹立されており、これを解析することでヒト病態に近い結果が期待できる。ポリグルタミン病モデル細胞およびモデルショウジョウバエを用い、エクソソームを介した細胞非自律的プロテオスターシス維持機構の分子機序解明を行った。また、ポリグルタミン病モデルマウスおよびモデルマーマーモセットを用い、ポリグルタミン病におけるエクソソーム分泌変容を詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) エクソソームを介した細胞非自律的プロテオスターシス維持機構の機序解明

以前申請者は、分子シャペロンがエクソソームを介して分泌され、他の細胞に伝播してタンパク質凝集を抑制するという、本研究の基盤となる細胞非自律的なプロテオスターシス維持機構を報告したが、未だ詳細な分子機序は不明なままである。そこで本研究では、エクソソームを介したシャペロンの分泌制御機構について解析を行った。その結果、1) エクソソーム分泌およびシャペロン分泌が熱ストレス負荷により増大すること（図 2 A-D）、2) 熱ストレス負荷による分泌増大効果は、熱ショック転写因子 HSF1 の欠損により、ほぼ見られなくなるが明らかとなった（図 2 E）。また、3) 熱ストレス条件下における分子シャペロンのエクソソーム分泌を制御するタンパク質 X を同定した。一般に、細胞が熱ストレスにさらされると、細胞内タンパク質の凝集を防ぐべく、HSF1 依存的に熱ショックタンパク質の発現が一過性誘導されることがよく知られている（熱ストレス応答）。上記の結果は、エクソソームを介したシャペロン分泌が、HSF1 によって制御される熱ストレス応答の一部である可能性を示している。熱ストレス条件下では、熱ショックタンパク質の発現誘導という細胞内イベントに加え、個体レベルでは、エクソソームを介したシャペロン分泌も増大し、これが他の細胞に対して保護的に働くという個体レベルのストレス応答機構が存在するのではないかと考えられる。

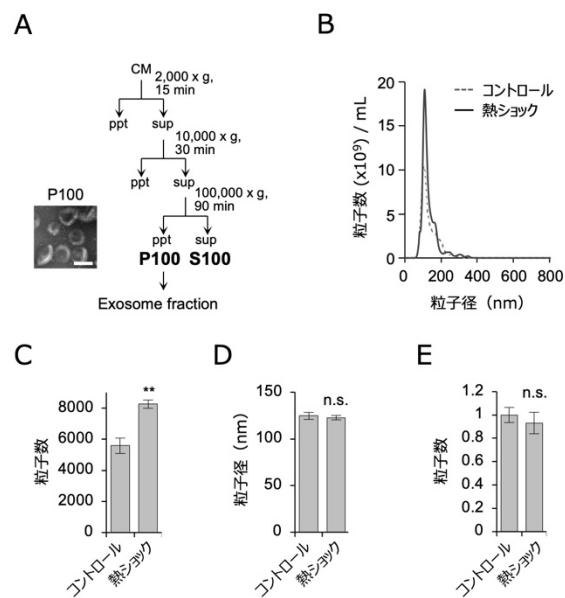


図 2 熱ストレス下におけるエクソソーム分泌増加

(2) エクソソームを介したプロテオスターシス維持機構の神経変性疾患における変容解析

① 神経変性疾患におけるエクソソーム分泌量の変容解析

神経変性疾患におけるエクソソーム分泌・伝播の変容を明らかにし、新たな視点からの病態理解、診断バイオマーカー開発を行った。この目的において、ポリグルタミン病モデル細胞を樹立した。これらの細胞の培地を回収し、超遠心法によりエクソソーム画分を精製した。エクソソーム粒子数および粒子径の測定は、ナノ粒子解析装置 NanoSight を用いて行った。実験の結果、異常伸長ポリグルタミンタンパク質を発現する細胞の培地から得られたエクソソーム画分中には、コントロール細胞と比較して、エクソソームに相当する粒子径の粒子がより多く検出された。一方、両者の細胞から分泌される粒子径に違いは見られなかった。ポリグルタミン病のノックインマウスの血液エクソソームについて、上記と同様にナノ粒子解析を行ったところ、野生型マウスの血液エクソソームと比較して、エクソソームと思われる粒子数の増加が確認された。以上の結果から、凝集性ポリグルタミンタンパク質の発現によりエクソソーム分泌が亢進することが示唆された。

② 神経変性疾患におけるエクソソーム内容物の変容解析

ポリグルタミン病におけるエクソソーム内容物の変容について解析を行った。この目的において、ポリグルタミン病の霊長類モデルであるトランスジェニックマーマーモセット (TG マーモセ

ット)を用いた。TG マーモセットおよび対照群として野生型マーモセット (WT マーモセット) から経時的に採血し、血液エクソソーム画分を精製した。この画分に対し、LC-MS/MS解析を行った。その結果、合計でおよそ 2,500 種程度のエクソソームタンパク質を同定した (図 3 A)。WT マーモセットと比較して、TG マーモセットで 2 倍以上の増減が見られるタンパク質について調べたところ、月齢によらず一貫して増加または減少する血液エクソソームタンパク質を複数同定した (図 3 B-C)。また、TG マーモセットにおいて疾患の進行とともに変動する血液エクソソームタンパク質を複数同定した。これらのタンパク質について、ポリグルタミン病の患者血液検体にて検討を行ったところ、一部のタンパク質について病態と相関して変動することが確認された。

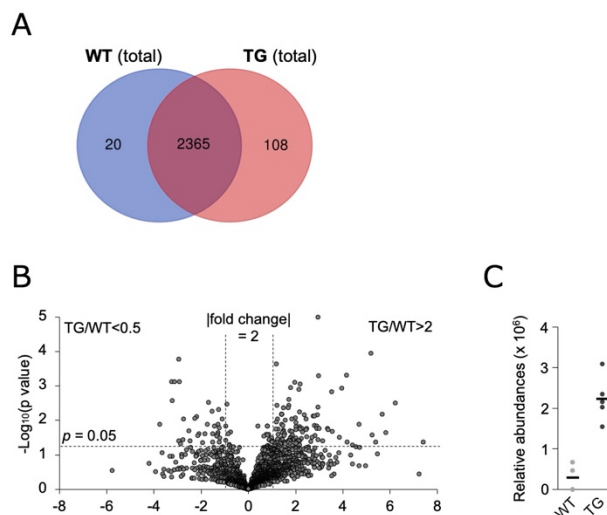


図 3 ポリグルタミン病における血液エクソソームのタンパク質解析

(3) 血液検体の違いがエクソソーム研究に与える影響

上記の血液由来エクソソーム研究を進めるにあたり、エクソソームの準備条件について事前検討を行った。一般に血液を対象として実験を行う場合、血清もしくは血漿のどちらか一方を選択して用いることが多いが、その両者がエクソソーム研究において同等であるかは不明である。そこで野生型マウスの血液から血清および血漿由来エクソソームを精製し、比較検討を行った。その結果、血清由来エクソソーム画分中には、血漿由来エクソソーム画分中よりも粒子数が多く検出された (図 4 A-C)。この違いをもたらす原因を探るため、両者のタンパク質組成について検討した結果、血清由来エクソソーム画分には血小板関連因子がより多く検出されることが分かった。血液凝固の際に血小板からマイクロベジクル (もしくはマイクロパーティクル) と呼ばれる細胞外小胞が多量に放出されることが報告されていることから、血清中にはこのような小胞が混入している可能性が明らかになった (投稿中)。

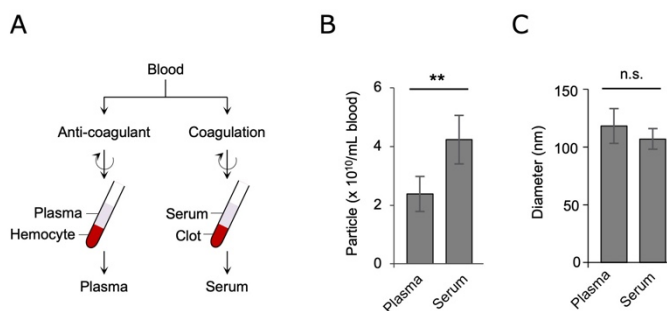


図 4 血清由来エクソソームと血漿由来エクソソームの違い

本研究により、エクソソームを介した分子シャペロンの分泌が熱ストレス下に亢進すること、およびこれを制御する細胞内因子が明らかになった。これは、熱ストレスに対する生体応答反応の一部として、エクソソームを介した細胞非自律的プロテオスターシス維持機構が個体レベルで重要な役割を担う可能性を示唆するものである。また、ポリグルタミン病モデル細胞の解析から、疾患状態におけるエクソソーム分泌の亢進が示唆された。さらに、ポリグルタミン病モデル動物の解析から、疾患における血液中エクソソームのタンパク質組成の変容が示唆された。一部のエクソソーム分子については、ヒト患者でも変容が確認されたため、バイオマーカー候補としてさらなる検証を進めていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeuchi T, Nagai Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Emerging roles of extracellular vesicles in polyglutamine diseases: mutant protein transmission, therapeutic potential, and diagnostics.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurochem Int	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hideshima M, Kimura Y, Aguirre C, Kakuda K, Takeuchi T, Choong CJ, Doi J, Nabekura K, Yamaguchi K, Nakajima K, Baba K, Nagano S, Goto Y, Nagai Y, Mochizuki H, Ikenaka K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Two-step screening method to identify α -synuclein aggregation inhibitors for Parkinson's disease.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeuchi T	4. 巻 169
2. 論文標題 Pathogenic and Protective Roles of Extracellular Vesicles in Neurodegenerative Diseases.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 181-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Minakawa EN, Popiel HA, Tada M, Takahashi T, Yamane H, Saitoh Y, Takahashi Y, Ozawa D, Takeda A, Takeuchi T, Okamoto Y, Yamamoto K, Suzuki M, Fujita H, Ito C, Yagihara H, Saito Y, Watase K, Adachi H, Katsuno M, Mochizuki H, Shiraki K, Sobue G, Toda T, Wada K, Onodera O, Nagai Y.	4. 巻 143
2. 論文標題 Arginine Is a Disease Modifier for PolyQ Disease Models That Stabilizes PolyQ Protein Conformation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain	6. 最初と最後の頁 1811-1825
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakai R, Suzuki M, Ueyama M, Takeuchi T, Minakawa EN, Hayakawa H, Baba K, Mochizuki H, Nagai Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 E46K Mutant α -Synuclein Is More Degradation Resistant and Exhibits Greater Toxic Effects Than Wild-Type α -Synuclein in Drosophila Models of Parkinson's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0218261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi T	4. 巻 41
2. 論文標題 Non-cell Autonomous Maintenance of Proteostasis by Molecular Chaperones and Its Molecular Mechanism.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biol Pharm Bull	6. 最初と最後の頁 843-849
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Minakawa EN, Wada K, Nagai Y.	4. 巻 20
2. 論文標題 Sleep Disturbance as a Potential Modifiable Risk Factor for Alzheimer's Disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci	6. 最初と最後の頁 E803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi T	4. 巻 45
2. 論文標題 Roles of Exosomes in Neurodegenerative Diseases	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 MEMBRANE	6. 最初と最後の頁 54 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5360/membrane.45.54	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 13件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Takeuchi T, Sakai S, Ando H, Nagai Y.
2. 発表標題 Dysfunction in an autophagy-lysosome degradation pathway promotes secretion of ubiquitinated proteins via extracellular vesicles.
3. 学会等名 International Society of Extracellular Vesicles Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内敏秀
2. 発表標題 Hsp70を介したエクソソーム分泌制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内敏秀
2. 発表標題 ペプチドを用いた細胞内送達と脳移行性キャリアの開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34回年会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 武内敏秀
2. 発表標題 Inhibition of autophagy promotes secretion of autophagy-related proteins via extracellular vesicles
3. 学会等名 Keystone Symposia on Selective Autophagy (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内敏秀、永井義隆
2. 発表標題 オートファジー機能障害による細胞外小胞分泌
3. 学会等名 第91回 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshihide Takeuchi
2. 発表標題 The roles of extracellular vesicles in regulation of protein homeostasis
3. 学会等名 HFSP meeting 2018 in Osaka（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武内敏秀、坂井聖子、永井義隆
2. 発表標題 不要タンパク質の蓄積ストレス下における細胞外小胞分泌
3. 学会等名 第13回 臨床ストレス応答学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeuchi T
2. 発表標題 Exosome-based therapy and biomarker development for the polyglutamine diseases.
3. 学会等名 第58回日本生物物理学会年会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武内敏秀
2. 発表標題 熱ストレスによる細胞外小胞分泌
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 武内敏秀、皆川栄子、植田幸嗣、齊藤勇二、高橋祐二、関和彦、永井義隆
2. 発表標題 Extracellular vesicles as blood-based biomarkers for polyglutamine diseases
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武内敏秀
2. 発表標題 タンパク質の品質管理とエクソソーム
3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会大会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 武内敏秀、永井義隆
2. 発表標題 細胞外小胞を介した凝集性タンパク質のクリアランス
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takeuchi T
2. 発表標題 Secretion of extracellular vesicles as a cellular response to heat stress
3. 学会等名 Pacifichem 2021 symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 皆川栄子
2. 発表標題 タンパク質凝集阻害薬を用いたポリグルタミン病の疾患修飾療法の開発
3. 学会等名 第62回日本神経学会学術大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 皆川栄子
2. 発表標題 Dementia research from the perspective of sleep
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Minakawa EN
2. 発表標題 Why and how to study sleep in Parkinson 's disease.
3. 学会等名 International Parkinson and Movement Disorder Society Asia-Oceania Section (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 皆川栄子
2. 発表標題 プロテオスタシスと睡眠 - 「良い眠り」による神経変性疾患の疾患修飾治療の可能性 -
3. 学会等名 第11回日本臨床睡眠医学会イブニングセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	皆川 栄子 (Minakawa Eiko) (20726252)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・流動研究員 (82611)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------