

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06456

研究課題名(和文) エクソソームの神経細胞への標的化機構の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of physiological exosome delivery to neurons

研究代表者

湯山 耕平 (Yuyama, Kohei)

北海道大学・先端生命科学研究院・特任准教授

研究者番号：80415546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳内でミクログリアから放出される細胞外小胞(エクソソーム)は、アルツハイマー病病原因子タウなど含み神経細胞へ送達することで病理形成に関与することが示唆されているが、その神経細胞ターゲティング機構は不明であった。本研究ではミクログリア由来エクソソームに多く発現するシアル酸を含む特定の糖タンパク質糖鎖構造が神経細胞へのターゲティングに寄与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞の神経細胞間移行はアルツハイマー病のタウ病理をはじめとして神経変性疾患の病理形成に関与しているとの報告がある。本研究で明らかとなった細胞外小胞の神経ターゲティング因子候補は現在根本治療法のないアルツハイマー病の病理形成機構の解明につながる成果であり、アルツハイマー病の予防・治療法開発に応用できる可能性がある。また当該糖鎖含有人工リボソームの作製は新たな脳神経をターゲットとしたドラッグデリバリーシステム開発への応用も考えられる。

研究成果の概要(英文)：In brains, the exosomes, a type of extracellular vesicles, released from microglia contain tau protein, a pathogenic agent of Alzheimer's disease, and transport them into neurons, contributing pathogenesis of the disease. However, the molecular mechanism for exosome targeting to neurons remains unclear. In this study, I found that a specific sialic acid-containing sugar chain of glycoprotein was involved in the transport of microglia-derived exosomes to neurons.

研究分野：神経化学

キーワード：エクソソーム ミクログリア ニューロン 糖鎖 アルツハイマー病 アミロイドbeta

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞エクソソームは、様々な細胞から放出され、その内包分子や表面結合分子を標的細胞へ送達する。中枢神経系においても、神経細胞やグリア細胞間のエクソソーム依存的な分子輸送によって、ミエリン形成や神経突起伸長などの細胞機能が調節されている。また、エクソソームは、複数の神経変性疾患の原因分子を含有し、これら病因分子の分解や脳内伝播を媒介することで病理形成に関与する可能性が報告されている。

私はこれまでに、神経細胞由来エクソソームが、アルツハイマー病(AD)原因分子のアミロイドβタンパク質(Aβ)の分解を促進することを報告した(Yuyama et al, JBC, 2012, 2014, FEBS Lett., 2015)。Aβは、神経細胞由来エクソソームの表面に結合した状態でミクログリアへ運ばれ、取り込まれ分解を受ける。エクソソームのミクログリアへの標的化、及び取り込みは、エクソソーム表面膜のホスファチジルセリン(PS)が、ミクログリアのPS受容体によって認識されて遂行される。また、別のAD病原タンパク質であるタウもエクソソームに含有され、細胞間輸送される。タウを輸送するのはミクログリア由来エクソソームで、神経細胞へ送達することで、タウの脳内伝播(病理拡散)を媒介する。しかし、エクソソームの神経細胞へのターゲティング機構に関しては、神経細胞にはPS受容体が発現していないことから、現在のところ不明である。本研究では、エクソソームの神経細胞標的化メカニズムを明らかにする目的で、ミクログリア由来エクソソーム表面膜上に発現する標的化責任分子を探索した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、エクソソームの神経細胞標的化機構の解明である。本課題の成果は、脳内におけるエクソソーム依存性細胞間伝達の基礎的知見となるとともに、アルツハイマー病のタウ病理伝播の機構解明に繋がることも期待できる。また、神経細胞標的化に関与する分子の同定は、人工リポソーム等の(脳神経疾患を対象とした)ドラッグデリバリーのキャリア開発に応用できる可能性がある。

3. 研究の方法

・蛍光標識エクソソームによる神経細胞取り込み解析 – 神経細胞及びミクログリア由来の株細胞 BV-2, N2a, ラット初代ミクログリア及びマウス初代神経細胞を用いて、培養上清中から単離したエクソソームの神経細胞への標的化(取り込み)能力を解析した。エクソソームは、蛍光色素 PKH により標識した。また野生型マウス(C57BL/6)海馬実質へ脳定位装置を用いて PKH 標識 BV-2 エクソソームをインジェクションし、3時間後還流固定後に脳切片を作成し、免疫組織染色により NeuN 陽性ニューロン及び Iba1 陽性ミクログリアとの共局在率を解析した。

・ルシフェラーゼ含有エクソソームによる神経細胞取り込みの解析 – 神経細胞への取り込みがエクソソームと細胞の膜融合を伴うか検討するため、ルシフェラーゼを内包するエクソソームを産生するミクログリアを作製し、解析した(エクソソームが神経細胞へ取り込まれた場合、神経細胞内へ移行するルシフェラーゼ発光を観察)。

4. 研究成果

エクソソームはその大半が、PS によってミクログリア(末梢組織ではマクロファージ)に標的化し取り込まれる。ミクログリア由来エクソソームも同様にミクログリアに再取り込みされやすく、神経細胞への取り込み活性は非常に弱い。この事は神経細胞標的化機構の解析を困難にしているが、私は培養細胞を用いた実験で、「神経細胞標的化能力が亢進したミクログリア由来エクソソーム」を見出した。リポ多糖(LPS)、アミロイドβタンパク質(Aβ)1-42 存在化でミクログリア由来細胞株 BV2 から産生されたエクソソームを培養上清中から超遠心法で回収した。このエクソソームを PKH 蛍光色素で標識した後、同量を神経細胞株 N2a の培養液中に添加した。24 時間後に N2a 細胞へ取り込まれたエクソソームを蛍光観察したところ、未処理ミクログリア由来エクソソームと比較して、LPS, Aβ 処理ミクログリア由来エクソソームは N2a 細胞への取り込み量が顕著に増加した(図 1)。これは初代ミ

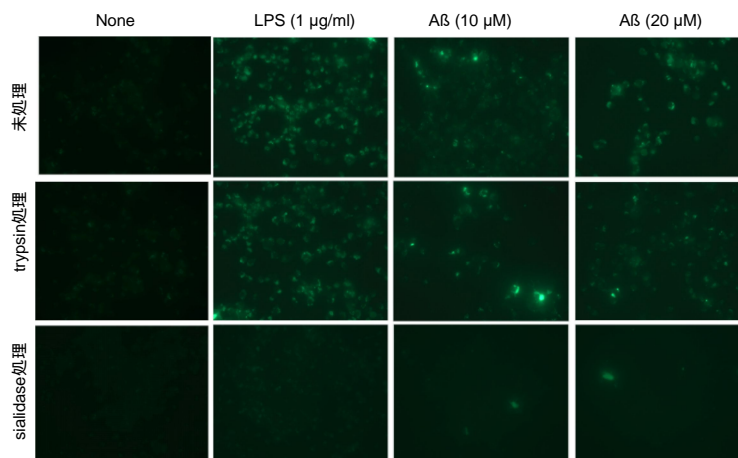


図1. BV-2由来エクソソームのN2a細胞への取り込み
BV-2細胞のLPSやAβ処理によって促進し、エクソソームのsialidase処理によって阻害される。

クログリア由来エクソソームでも同様の結果であった。LPS, A β 処理によってミクログリア由来エクソソームの神経細胞への標的化能が上昇していると考えられる。また神経細胞標的化に寄与するエクソソーム表面分子を探索する目的で、まず LPS, A β 処理 BV-2 細胞由来エクソソームをあらかじめトリプシンによるタンパク質分解能, シアリダーゼによるシアル酸分解を行った後、神経細胞に対する取り込み実験を行った。その結果トリプシン処理エクソソームの取り込み量は変化しなかったが、シアル酸処理エクソソームの取り込みは顕著に抑制された(図 1)。このことから神経細胞の標的化には、エクソソーム表面に発現するシアル酸を含む糖鎖構造が関与していることが示唆された。

そこで BV-2 由来エクソソームに発現し LPS や A β 処理で発現量が増加する糖鎖構造を探索したところ、糖タンパク質糖鎖の糖鎖 A が、細胞膜と比較してエクソソーム膜に濃縮しており、さらに LPS, A β 処理で発現が顕著に増加することがわかった(図 2)。初代培養ミクログリア由来のエクソソームにも同様に高発現しており、LPS, A β 処理でさらに発現量が増加した。糖鎖 A は、末端にシアル酸の結合した糖タンパク質糖鎖で、脳細胞に普遍的に発現するが、ミクログリアで特に発現が高い。またこれまでの報告から、高齢のアルツハイマー病モデルマウス(APP 遺伝子導入マウス)やアルツハイマー病患者脳での発現増加が示されている。

次に BV-2 由来エクソソームを神経細胞に添加する際に、糖鎖 A に対する抗体を混合してから処理する実験を行った。その結果、normal IgG 処理群と比較して抗糖鎖 A 抗体処理群では神経細胞に取り込まれるエクソソーム量が顕著に減少した(図 2)。また糖鎖 A 合成酵素発現を siRNA を用いてノックダウンした BV-2 細胞由来エクソソームにおいても N2a への取り込み量が有意に減少した。ミクログリア由来エクソソームの神経細胞への標的化には糖鎖 A が関与していると考えられる。

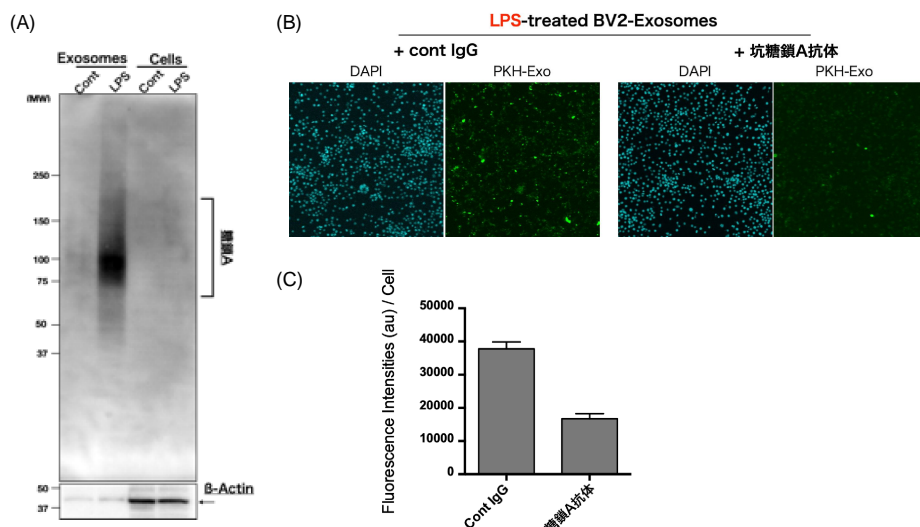


図1. BV-2由来エクソソームのN2a細胞への取り込みにおける糖鎖Aの関与 (A) 糖鎖A抗体によるウエスタンブロット像、(B、C) 糖鎖A抗体による蛍光標識エクソソーム取り込み量の解析

最後に、BV-2 由来エクソソームをマウス脳へインジェクションし、神経細胞への取り込みを免疫組織化学により解析した。野生型マウス海馬へ、未処理、LPS, A β 処理 BV-2 細胞由来のエクソソームを蛍光標識マイクロシリンジを用いて注入した。3時間放置した後還流固定して脳切片を作成し、NeuN 陽性ニューロン及び Iba1 陽性ミクログリアとの共局在率を解析した。その結果、各処理 BV-2 由来エクソソームの大半はミクログリアとの共局在が観察されたが、未処理 BV-2 由来エクソソームと比較して、LPS, A β 処理 BV-2 由来エクソソームは神経細胞との共局在率が有意に上昇した。さらに LPS 処理 BV-2 由来エクソソームと糖鎖 A 抗体をあらかじめインキュベートした後、インジェクションした場合、神経細胞との共局在率が減少した。また糖鎖 A 合成酵素をノックダウンした BV-2 由来のエクソソームをインジェクションした場合も神経細胞との共局在率が減少した。マウス脳内においてもミクログリア由来エクソソームの神経細胞への標的化に糖鎖 A が関与していると考えられる。

本研究の結果からミクログリア由来エクソソームの神経細胞標的化にエクソソーム表面タンパクに結合する特定の糖鎖構造が関与することが示された。エクソソーム含有分子の神経細胞への伝播が病理形成に関与していることが示唆されるアルツハイマー病において、この糖鎖発現量の変化等がどの様に関与しているか将来の課題である。また神経細胞における糖鎖 A を介した受容、取り込み機構についても不明であり今後さらなる解析が必要である。また本研究では実施できなかった糖鎖 A 含有人工リポソームの作製は新たな脳神経をターゲットとしたドラッグデリバリーシステム開発への応用も考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yuyama Kohei, Takahashi Kaori, Usuki Seigo, Mikami Daisuke, Sun Hui, Hanamatsu Hisatoshi, Furukawa Junichi, Mukai Katsuyuki, Igarashi Yasuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Plant sphingolipids promote extracellular vesicle release and alleviate amyloid- pathologies in a mouse model of Alzheimer 's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-53394-w	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 Usuki Seigo, Yasutake Yoshiaki, Tamura Noriko, Tamura Tomohiro, Tanji Kunikazu, Saitoh Takashi, Murai Yuta, Mikami Daisuke, Yuyama Kohei, Monde Kenji, Mukai Katsuyuki, Igarashi Yasuyuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Nrp1 is Activated by Konjac Ceramide Binding-Induced Structural Rigidification of the a1a2 Domain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 517 ~ 517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9020517	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 Othman Muhamad Aqmal, Yuyama Kohei, Murai Yuta, Igarashi Yasuyuki, Mikami Daisuke, Sivasothy Yasodha, Awang Khalijah, Monde Kenji	4. 巻 10
2. 論文標題 Malabaricone C as Natural Sphingomyelin Synthase Inhibitor against Diet-Induced Obesity and Its Lipid Metabolism in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1154 ~ 1158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsmchemlett.9b00171	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 Ohara Masatsugu, Ohnishi Shunsuke, Hosono Hidetaka, Yamamoto Koji, Yuyama Kohei, Nakamura Hideki, Fu Qingjie, Maehara Osamu, Suda Goki, Sakamoto Naoya	4. 巻 2018
2. 論文標題 Extracellular Vesicles from Amnion-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Hepatic Inflammation and Fibrosis in Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/3212643	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 Hanamatsu Hisatoshi、Mitsutake Susumu、Sakai Shota、Okazaki Toshiro、Watanabe Ken、Igarashi Yasuyuki、Yuyama Kohei	4. 巻 7
2. 論文標題 Multiple Roles of Sns2 in White and Brown Adipose Tissues from Dietinduced Obese Mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Metabolic Syndrome	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4172/2167-0943.1000241	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 Usuki Seigo、Tamura Noriko、Yuyama Kohei、Tamura Tomohiro、Mukai Katsuyuki、Igarashi Yasuyuki	4. 巻 67
2. 論文標題 Konjac Ceramide (kCer) Regulates NGF-Induced Neurite Outgrowth via the Sema3A Signaling Pathway	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oleo Science	6. 最初と最後の頁 77~86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/jos.ess17141	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 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 湯山耕平
2. 発表標題 セラミドによるエクソソーム産生誘導とその神経疾患関連機能
3. 学会等名 第12回セラミド研究会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯山耕平
2. 発表標題 こんにゃくセラミドによるエクソソームを介した 脳内アミロイドbetaの除去メカニズム
3. 学会等名 第73回日本栄養・食糧学会大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kohei Yuyama
2. 発表標題 Dietary ceramides in skin and brain health
3. 学会等名 7th International Conference on Food Factors (ICoFF2019) (招待講演) (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------