

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：85402  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K07620  
研究課題名（和文）アストロサイト由来エクソソームを基盤としたうつ病のバイオマーカーの探索研究

研究課題名（英文）An Exploratory research on biomarkers of depression based on astrocyte-derived exosomes

研究代表者  
岡田 麻美（Okada-Tsuchioka, Mami）  
独立行政法人国立病院機構（呉医療センター臨床研究部）・その他部局等・研究員（移行）

研究者番号：30517280  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではうつ病のバイオマーカー探索の標的としてアストロサイト由来エクソソーム（ASTエクソソーム）に着目した。ASTエクソソームを定量・精製するための有望な抗体を見出した。うつ病の病態及び治療反応性モデルマウスの脳においてASTエクソソーム量の変化は見られなかった。そこで同抗体を固定したビーズを用いたASTエクソソームの精製方法を構築し、現在内包成分の解析を進めている。一方、ヒト血漿中におけるASTエクソソームは微量であり、定量・精製のためには更なる検討が必要であると考えられた。代替研究において、うつ病患者及びうつ病モデルマウスの血漿中で総エクソソームが変化している可能性を見出した。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに末梢血を用いてバイオマーカーの探索研究が行われてきたが、末梢由来の因子が多く含まれているために脳内の変化のみを捉えることが困難であった。この問題を解決するために、末梢血中における脳内の変化を反映する成分を使えないかと考えてASTエクソソームに着目した。既に報告されているものとは異なる有望なアストロサイト系膜表出タンパクを見出すことができ、脳の総エクソソーム中からASTエクソソームを精製することにも成功した。ヒト血漿中においても微量であるが同定することができている。今回の研究成果はさらなる高感度化への条件検討や技術開発への発展につながる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on astrocyte-derived exosomes (AST-exosomes) as targets for biomarker of depression. We have found a promising antibody for quantifying and purifying AST-exosomes. No changes in AST-exosome levels were observed in the brain of disease model and treatment-responsive model for depression. Therefore, we have constructed a method for purifying AST-exosomes using magnetic beads on which the specific antibody is immobilized, and are currently proceeding with the analysis of exosomal cargo. On the other hand, the amount of AST-exosomes in human plasma is very small, and further studies are considered necessary for quantification and purification. In an alternative study, we found that total exosome levels may be altered in the plasma of depressed patients and depression model mice.

研究分野：精神神経科学

キーワード：エクソソーム アストロサイト うつ病 トランスレーショナルリサーチ 精神神経科学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

うつ病を初めとする脳の異常に起因する疾患では、ヒトの脳内で起こっている変化を捉えることが重要である。脳内変化の評価を目的としても、脳脊髄液の採取は侵襲性が高く、脳の生検は障害などの脳への影響を考慮すると適切ではない。末梢血は比較的低侵襲性であるが、脳以外に末梢由来の因子が多く含まれており、脳内の変化を特異的に捉えることが困難である。末梢血中から脳内の変化を反映する成分の回収を試み、それをを用いた検討が今後の研究には必要である。

近年、エクソソームと呼ばれる直径 30 ~ 150 nm ほどの脂質二重膜に包まれた小胞の機能が注目されている。エクソソームは殆ど全ての細胞から分泌され、血液等の体液中で観察される。エクソソームの膜表面には様々なタンパクが表出している。エクソソームのマーカーとなるテトラスパニンファミリー (CD81 など) の他に、分泌する細胞に由来する特異的な膜タンパクが表出しており、それを標的としたより詳細な精製も可能である。エクソソーム内には分泌する細胞種や生理条件に依存したタンパクなどが含まれている。近年、神経変性疾患患者の末梢血中からアストロサイト由来エクソソーム (AST エクソソーム) が回収できることを示唆する報告がなされた (Goetzl et al., 2016)。アストロサイトは脳内で神経栄養因子、シナプス新生促進因子などを分泌する主要な細胞である。近年、うつ病の病態や治療効果発現においてアストロサイトが重要な役割を担っていることが報告されている。そこで、末梢血中で回収可能とされる AST エクソソームがうつ病の病態や治療反応性に関連する可能性があるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

うつ病の病態や治療効果発現にアストロサイトが関与する可能性が考えられている。本研究では、AST エクソソームと呼ばれる、末梢血で回収可能とされるアストロサイトを反映する成分の中にうつ病の病態及び治療反応性に関連する分子が存在すると仮説を立てた。トランスレーショナルリサーチの観点から、マウスを用いた *in vivo* での評価からうつ病の病態及び治療反応性に関連するうつ病のバイオマーカー候補分子を探索し、さらにヒト由来サンプルでその有用性を検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス脳からのエクソソーム回収

C57BL/6 マウスを犠死後、脳を摘出し、コラゲナーゼ処理で組織を分散した。段階的な遠心で細胞デブリ、粗大粒子等を除去した。得られた上清から超遠心機を用いた密度勾配遠心法あるいはサイズ排除クロマトグラフィー法でエクソソーム分画を得た。(引用文献 2 の方法を改変)

#### (2) エクソソームの定性

ナノ粒子トラッキング解析法 (NanoSight) で粒度分布および粒子数を測定した。またウェストンブロット法でエクソソームマーカー (CD81) の発現を確認した。

#### (3) エクソソーム ELISA 法

市販のエクソソーム ELISA キットを用いて、まずエクソソームをプレートに捕捉させ、そこに一次抗体としてアストロサイト特異的膜表面タンパクのビオチン化抗体を重ねた。さらにストレプトアビジン-HRP あるいは抗ビオチン-HRP を重ね、化学発光後に吸光度を測定して定量した。総エクソソームの定量を行う場合には一次抗体としてビオチン化テトラスパニン抗体を用い、同様の方法で定量した。

#### (4) AST エクソソームの精製

ストレプトアビジン磁気ビーズに (3) と同様のアストロサイト特異的膜表面タンパクのビオチン化抗体を反応させて、抗体ビーズを作成した。(1) の方法で回収した脳由来総エクソソームと抗体ビーズを攪拌して反応させ、洗浄後に酸処置あるいは Laemmli バッファーを添加して溶出した。

#### (5) マウスのうつ病病態モデルの作成

マウスにコルチコステロン (35 mg/L) を自由飲水で 7 週間慢性投与した。行動評価を行い、シヨ糖嗜好性の低下をもってモデルの妥当性を確認した。犠死後に脳と血漿を回収した。

#### (6) マウスのうつ病治療反応性モデルの作成

抗うつ薬の効かない難治例にも有効性がある電気けいれん療法の実験動物モデルである電気けいれん刺激 (electroconvulsive seizure: ECS) を施行したマウスを作成した。麻酔下で耳から ECS を与え、肉眼的に強直性および間代性けいれんが観察されることで、有効な刺激が与えられたことを確認した。犠死後に脳と血漿を回収した。

#### (7) ヒト血漿サンプル

研究協力者の支援により、文書による説明と同意を得た電気けいれん療法前後のうつ病患者、および年齢と性別について統制された健常者の血漿を採取した。高齢の健常者については国立長寿医療研究センターバイオバンクに分譲を依頼した。

匿名化かつ検体情報がブラインド化された状態で健常者群とうつ病患者群で(3)のエクソソーム ELISA 法を用いて血漿中総エクソソームレベルを測定した。

### 4. 研究成果

- (1) AST エクソソームの標識となるアストロサイト系細胞表面タンパクについて既に報告されているものには末梢の影響を受けるものもあり、より中枢を反映するものを見出すため、複数種類の抗体を検討した。マウス脳および血漿から回収したエクソソームを比較検討し、複数種類の中から有望な抗体を見出した。
- (2) 市販のエクソソーム ELISA キットに(1)で見出した抗体を組み合わせた実験系とウェスタンブロット法を用いて、マウス脳およびヒト血漿中において AST エクソソームを同定した。
- (3) マウスのうつ病モデル、治療反応性モデルの脳における AST エクソソーム量の変化を検討したが、現段階のモデル作成条件では有意な変化は見られなかった。
- (4) (3)の結果から、AST エクソソーム内包成分の検討を進めるために、AST エクソソームを特異的に精製する技術の構築を試みた。(1)で見出した抗体を固定した磁気ビーズを作成し、脳由来総エクソソーム中から特異的に AST エクソソームを精製することに成功した。脳から回収された AST エクソソームについては内包成分の検討を進めている。
- (5) ヒトのサンプルについてはバイオバンクおよび研究協力者の収集した血漿を用いた検討を行った。血漿そのものを(2)のエクソソーム ELISA に用いる方法以外に、予め超遠心法などでエクソソーム分画を濃縮した状態でも検討した。しかしながら、ヒト血漿中における AST エクソソームは非常に微量であるために、定量するためにはさらなる感度向上のための検討が必要と考えられた。また、(4)の抗体ビーズを用いたヒト血漿中からの AST エクソソーム精製についても、同様に更なる検討が必要であると考えられた。
- (6) 代替研究として、血漿中の総エクソソームの定量を行った。その結果、うつ病患者血漿中およびうつ病モデルマウスの血漿中で変化している可能性を見出した。今後はまず追試を行い、その結果を踏まえたうえで、うつ病の病態との関連や、エクソソーム内の内包成分について詳細な検討を行い、脳内変化を反映したうつ病のバイオマーカーとしての可能性をさらに検討していきたい。

#### <引用文献>

1. Goetzl EJ et al., FASEB J. 2016; 30(11): 3853-3859.
2. Vella LJ et al., J Extracell Vesicles. 2017; 6(1): 1348885.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7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 5件）

1. 著者名 Hisaoka Nakashima Kazue, Yokoe Toshiki, Watanabe Shintaro, Nakamura Yoki, Kajitani Naoto, Okada Tsuchioka Mami, Takebayashi Minoru, Nakata Yoshihiro, Morioka Norimitsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Lysophosphatidic acid induces thrombospondin 1 production in primary cultured rat cortical astrocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurochemistry	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） 10.1111/jnc.15227	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 Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Kano Kuniyuki, Omori Wataru, Boku Shuken, Aoki Junken, Takebayashi Minoru	4. 巻 531
2. 論文標題 Differential anatomical and cellular expression of lysophosphatidic acid receptor 1 in adult mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 89 ~ 95
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.068	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 Omori Wataru, Hattori Kotaro, Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Boku Shuken, Kunugi Hiroshi, Okamoto Yasumasa, Takebayashi Minoru	4. 巻 23
2. 論文標題 Increased Matrix Metalloproteinases in Cerebrospinal Fluids of Patients With Major Depressive Disorder and Schizophrenia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 713 ~ 720
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ijnp/pyaa049	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 Okada Tsuchioka Mami, Omori Wataru, Kajitani Naoto, Shibasaki Chiyo, Itagaki Kei, Takebayashi Minoru	4. 巻 40
2. 論文標題 Decreased serum levels of thrombospondin 1 in female depressed patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 39 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/npr2.12088	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 Omori Wataru, Itagaki Kei, Kajitani Naoto, Abe Hiromi, Okada Tsuchioka Mami, Okamoto Yasumasa, Takebayashi Minoru	4. 巻 73
2. 論文標題 Shared preventive factors associated with relapse after a response to electroconvulsive therapy in four major psychiatric disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Psychiatry and Clinical Neurosciences	6. 最初と最後の頁 494 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcn.12859	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 Abe Hiromi, Kajitani Naoto, Okada Tsuchioka Mami, Omori Wataru, Yatsumoto Masahide, Takebayashi Minoru	4. 巻 39
2. 論文標題 Antidepressant amitriptyline induced matrix metalloproteinase 9 activation is mediated by Src family tyrosine kinase, which leads to glial cell line derived neurotrophic factor mRNA expression in rat astroglial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropsychopharmacology Reports	6. 最初と最後の頁 156 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/npr2.12055	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 Itagaki Kei, Takebayashi Minoru, Abe Hiromi, Shibasaki Chiyo, Kajitani Naoto, Okada-Tsuchioka Mami, Hattori Kotaro, Yoshida Sumiko, Kunugi Hiroshi, Yamawaki Shigeto	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced Serum and Cerebrospinal Fluid Levels of Autotaxin in Major Depressive Disorder.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Neuropsychopharmacology	6. 最初と最後の頁 261 ~ 269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ijnp/pyz005	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 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岡田麻美、大盛 航、梶谷直人、柴崎千代、板垣 圭、町野彰彦、竹林 実
2. 発表標題 血清トロンボスポンジン-1(TSP-1)は女性うつ病患者において減少する
3. 学会等名 第50回日本神経精神薬理学会年会 第42回日本生物学的精神医学会年会 第4回日本精神薬学会総会・学術集会 NPBPPP2020合同年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田麻美、大盛 航、梶谷直人、柴崎千代、板垣 圭、町野彰彦、竹林 実
2. 発表標題 血清トロンボスポンジン-1(TSP-1)は女性うつ病患者において減少する
3. 学会等名 第38回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田麻美、宮野加奈子、梶谷直人、安部裕美、大盛 航、板垣 圭、上園保仁、竹林 実
2. 発表標題 グリアにおける抗うつ薬受容体としてのLPA1の可能性-抗うつ薬のLPA1への直接作用に関する検討-
3. 学会等名 第5回サイコグリア研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター 臨床研究部 <a href="http://kure.hosp.go.jp/department/clinical_research/">http://kure.hosp.go.jp/department/clinical_research/</a> 国立病院機構呉医療センター・中国がんセンター 精神科 <a href="http://kure.hosp.go.jp/department/psychiatry/">http://kure.hosp.go.jp/department/psychiatry/</a>
--

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
連携研究者	竹林 実  (Takebayashi Minoru)  (60304440)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授    (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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
連携研究者	梶谷 直人  (Kajitani Naoto)  (60755742)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特別研究員    (17401)	
連携研究者	大盛 航  (Omori Wataru)  (70799171)	独立行政法人国立病院（呉医療センター・臨床研究部）・臨床研究部・精神科・医師    (85402)	

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