

令和 4 年 5 月 4 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22578

研究課題名（和文）神経回路再構築におけるエクソソームの機能の解明

研究課題名（英文）Roles of exosomes in neuronal circuit reconstruction

研究代表者

華山 力成（Hanayama, Rikinari）

金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授

研究者番号：40403191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：神経膠腫が分泌するエクソソームが、腫瘍関連分子WT1を周囲のミクログリアへと送達することで新たな血管を作り出し、腫瘍にとって浸潤・転移を起こしやすい環境を構築することを見いだした。まず、モデルマウスにおいて、神経膠腫によるエクソソーム産生を抑えることで、脳腫瘍サイズが縮小し、浸潤・転移が抑えられ、マウスの生存期間が延長することが判明した。次に、神経膠腫由来エクソソームが、周囲のミクログリアに取り込まれ、遺伝子発現を低下させることで、血管新生を促進することを示した。更に、WT1がヒト患者由来の神経膠腫由来エクソソームに含有されており、ミクログリアによる血管新生能を制御することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫は脳腫瘍の中で最も悪性度が高く、集学的治療を施しても平均生存期間が約2年と非常に予後が悪い腫瘍である。本研究により、神経膠腫の進展における神経回路の再構築に、エクソソームが深く関与しており、その産生を抑えることで、腫瘍の浸潤・転移を抑えることができる可能性が示された。今後、神経膠腫の早期発見や予後診断、新たな治療法の開発へと研究が発展することが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have revealed that glioma-derived exosomes convey a tumor-related factor WT1 to microglial cells in the surrounding areas of a tumor leading to angiogenesis (generation of new blood vessels), which contributes to the creation of a microenvironment favorable for invasion and metastasis of a tumor.

Using an intracranial implantation glioma mouse model, we first showed a longer survival time of mice through tumor size reduction and suppression of invasion and metastasis by repressing the production of exosomes by the glioma. Next, we showed that exosomes secreted from the glioma were taken up by the surrounding microglia thus regulating gene expression in microglia, thereby promoting angiogenesis. Furthermore, we showed that WT1, an expression regulator of that gene, was contained in tumor-derived exosomes of human patients and regulated the microglial ability of angiogenesis.

研究分野：腫瘍免疫学

キーワード：エクソソーム 神経膠腫 ミクログリア 血管新生

1. 研究開始当初の背景

本研究は、神経回路の再構築制御を司る制御因子として、新たな細胞間情報伝達機構として注目されているエクソソームに焦点を当て、その機能の分子基盤と生体内における役割の解明を目指す課題である。発生過程のシナプス競合において、勝者が敗者のシナプスを淘汰する為に **punishment signal** を放出すると考えられているが、それが何かは長らく不明であった。私達は、脱分極刺激で活性化した神経細胞が放出するエクソソームにより、ミクログリアが活性化され神経突起の剪定を強く促進することを見出しており、このことから **punishment signal** の実体が、神経活動依存的に放出されたエクソソームではないかと提唱している (**Sci Rep.5:7989 (2015)**)。エクソソームには様々な蛋白質、脂質、**mRNA・miRNA** が含まれているが、これらの分子の構成は、細胞の種類や状況により大きく異なっており、標的細胞の応答を正にも負にも制御しうる。実際、私達は神経細胞由来エクソソームが神経突起剪定を促進することを見出したが、逆に、グリア細胞由来のエクソソームは神経突起の発達を促進することが報告されている。このことから、エクソソームを介した細胞間ネットワークは、神経回路の再構築過程の新たな制御機構であると考えられ、その分子基盤と生理機能・動態の解明が急がれる。

2. 研究の目的

エクソソームは脂質二重膜に囲まれた細胞外小胞で、分泌細胞由来の様々な蛋白質、脂質、**mRNA・miRNA** を運ぶことにより、標的細胞の応答を制御する。このことから、エクソソームを介した細胞間ネットワークは、神経回路の再構築制御を司る "**Master Regulator**" としての可能性を持ち、その機能の分子基盤と時空間的動態の解明が重要かつ急務である。そこで本研究では、神経細胞やグリア細胞などから放出されるエクソソームに着目し、神経回路の再構築を制御するエクソソーム上の機能分子の同定と生体内における作用機序の解明を目指す。私達は既に、これらの細胞特異的にエクソソームの放出を阻害するマウスを樹立しており、これを用いて、神経回路の再構築におけるエクソソームの機能を世界に先駆けて解明する。

3. 研究の方法

(a) 神経回路の再構築を誘導するエクソソームとその機能分子の同定: 神経回路の再構築過程では、不要な神経突起の剪定とともに新たな神経突起の発達が生じる。そこで、様々な刺激で活性化させた神経細胞やグリア細胞などから放出されるエクソソームを、初代培養神経細胞や **PC12** 細胞の発達過程に加えることで、どの刺激により放出されたエクソソームが、神経突起の発達を強く促進するのかを検討する。次に、そのエクソソーム上に特異的に発現している分子を質量分析法や **RNA** シークエンス法で同定することで、神経回路の再構築を誘導するエクソソーム上の機能分子を同定する。

(b) 細胞特異的エクソソーム放出阻害マウスにおける表現型の解析: 神経回路の再構築におけるエクソソームの生体内機能を検討する為、細胞特異的にエクソソームの放出を阻害するマウスを樹立する。エクソソームは多胞体と呼ばれる細胞内小胞の中で産生されるが、私達は最近、多胞体上の分子 **TSG101** がエクソソームの開口放出を促進することを見出した。実際、**TSG101** の欠損で、様々な細胞において放出されるエクソソーム量が顕著に減少する。そこで、細胞特異的

に **TSG101** を欠損させ、エクソソームの放出を阻害する事により、これらのエクソソームの機能を解明する。

4. 研究成果

本研究期間内においては、神経細胞、グリア細胞（ミクログリア、アストロサイトなど）神経膠腫（グリオーマ）由来のエクソソームによる神経回路の再構築を検討した。神経細胞、グリア細胞に関するデータについては、まだ未発表である一方、神経膠腫に関する成果が論文公開されている為（**Carcinogenesis. 41(9):1238-45 (2020)**）以下、その成果について報告する。

今回我々は、神経膠腫が分泌するエクソソームが、腫瘍関連分子 Wilm's Tumor-1 (**WT1**) を腫瘍周囲のミクログリアへと送達することで新たな血管を作り出し、腫瘍にとって浸潤・転移を起こしやすい環境を構築することを見いだした。まず、神経膠腫細胞株をマウス脳内へと移植した脳腫瘍モデルマウスにおいて、**TSG101** の欠損より神経膠腫によるエクソソームの産生を抑えることで、脳腫瘍サイズが縮小し、浸潤・転移が抑えられ、マウスの生存期間が延長することが判明した。次に、神経膠腫から分泌されたエクソソームが、腫瘍周囲のミクログリアに取り込まれ、ミクログリア内のトロンボスポンジン 1 遺伝子の発現を低下させることで、血管新生を促進することを示した。さらに、その遺伝子の発現調整因子である **WT1** がヒト患者由来の神経膠腫由来エクソソームに含有されており、ミクログリアによる血管新生能を制御することを明らかにした。

本研究により、神経膠腫の進展における神経回路の再構築に、エクソソームが深く関与しており、その産生を抑えることで、腫瘍の浸潤・転移を抑えることができる可能性が示された。今後、神経膠腫の早期発見や予後診断、新たな治療法の開発へと研究が発展することが期待される。

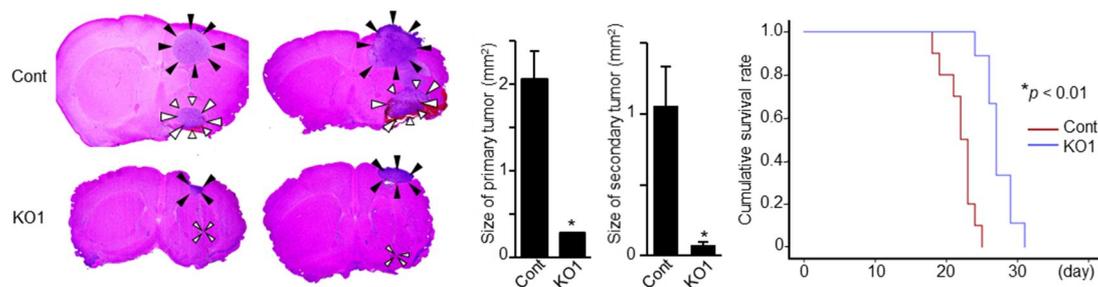


図 1. エクソソームの産生と神経膠腫の浸潤・転移能との関連性

TSG101 の欠損によりエクソソームの産生を低下させた神経膠腫細胞株 (**KO1**) を樹立し、対照細胞株 (**Cont**) と進展能の比較を行った。**KO1** を脳内に移植したマウスでは、腫瘍サイズの縮小(左)と浸潤・転移能の低下(中)が観察され、マウスの生存期間にも有意な差を認めた(右)。

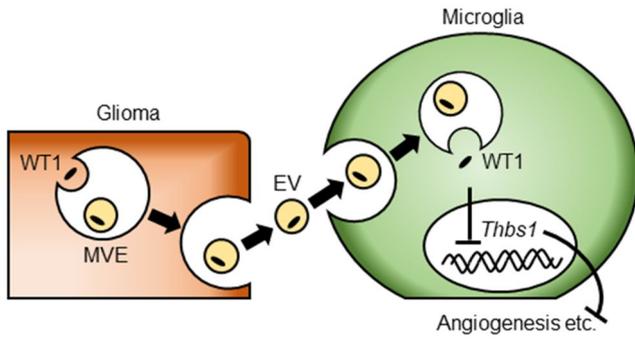


図 2. エクソソームによる血管新生制御のモデル図

神経膠腫 (**Glioma**) 内の多胞性エンドソーム (**MVE**) の中でエクソソーム (**EV**) が形成される際に **WT1** が含有される。腫瘍から分泌され、ミクログリア (**Microglia**) に取り込まれた **EV** は、その内部で **WT1** を放出し、血管新生を阻害するトロンボスポンジン (**Thbs1**) の遺伝子発現を低下させる。その結果、ミクログリアによる血管新生 (**Angiogenesis**) が増強され、腫瘍の浸潤・転移を促進する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 8件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamaguchi Hiroki, Kawahara Hironori, Kodera Noriyuki, Kumaki Ayanori, Tada Yasutake, Tang Zixin, Sakai Kenji, Ono Kenjiro, Yamada Masahito, Hanayama Rikinari	4. 巻 9
2. 論文標題 Extracellular Vesicles Contribute to the Metabolism of Transthyretin Amyloid in Hereditary Transthyretin Amyloidosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 839917
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2022.839917	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 Ma Yunfei, Yoshida Takeshi, Matoba Kazutaka, Kida Katsuhiko, Shintani Rito, Piao Yingshi, Jin Jingchun, Nishino Taito, Hanayama Rikinari	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of small compounds regulating the secretion of extracellular vesicles via a TIM4-affinity ELISA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13471
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-92860-2	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 Baba Tomohisa, Yoshida Takeshi, Tanabe Yamato, Nishimura Tatsunori, Morishita Soji, Gotoh Noriko, Hirao Atsushi, Hanayama Rikinari, Mukaida Naofumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Cytoplasmic DNA accumulation preferentially triggers cell death of myeloid leukemia cells by interacting with intracellular DNA sensing pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-021-03587-x	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 Nguyen Tuan Duc, Miyatake Yuji, Yoshida Takeshi, Kawahara Hironori, Hanayama Rikinari	4. 巻 148
2. 論文標題 Tumor secreted proliferin 1 regulates adipogenesis and lipolysis in cachexia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1982 ~ 1992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.33418	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 Hanayama Rikinari	4. 巻 169
2. 論文標題 Emerging roles of extracellular vesicles in physiology and disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 135 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa138	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 Wang Rong, Rikinari Hanayama (27名中21番目)、Yano Seiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-18442-4	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 Lim Keesiang, Kodera Noriyuki, Wang Hanbo, Mohamed Mahmoud Shaaban, Hazawa Masaharu, Kobayashi Akiko, Yoshida Takeshi, Hanayama Rikinari, Yano Seiji, Ando Toshio, Wong Richard W.	4. 巻 20
2. 論文標題 High-Speed AFM Reveals Molecular Dynamics of Human Influenza A Hemagglutinin and Its Interaction with Exosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 6320 ~ 6328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.0c01755	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 Tsutsui Taishi, Kawahara Hironori, Kimura Ryouken, Dong Yu, Jiapaer Shabierjiang, Sabit Hemragul, Zhang Jiakang, Yoshida Takeshi, Nakada Mitsutoshi, Hanayama Rikinari	4. 巻 41
2. 論文標題 Glioma-derived extracellular vesicles promote tumor progression by conveying WT1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 1238 ~ 1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa052	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 Yamano Tomoyoshi, Dobes Jan, Voboril Matous, Steinert Madlen, Brabec Tomas, Zietara Natalia, Dobesova Martina, Ohnmacht Caspar, Laan Martti, Peterson Part, Benes Vladimir, Sedlacek Radislav, Hanayama Rikinari, Kolar Michal, Klein Ludger, Filipp Dominik	4. 巻 216
2. 論文標題 Aire-expressing ILC3-like cells in the lymph node display potent APC features	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1037
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20181430	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 -

1. 著者名 Bahrini Insaf, Hanayama Rikinari	4. 巻 42
2. 論文標題 Development of a Method That Delivers Drugs to Enveloped Viruses	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 977 ~ 981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b18-01000	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 -

1. 著者名 Shimagaki Tomonari, Yoshio Sachiyo, Kawai Hironari, Sakamoto Yuzuru, Doi Hiroyoshi, Matsuda Michitaka, Mori Taizo, Osawa Yosuke, Fukai Moto, Yoshida Takeshi, Ma Yunfei, Akita Tomoyuki, Tanaka Junko, Taketomi Akinobu, Hanayama Rikinari, Yoshizumi Tomoharu, Mori Masaki, Kanto Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Serum milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) as a diagnostic and prognostic biomarker in patients with hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-52356-6	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 -

1. 著者名 Nozato Yoichi, Takami Yoichi, Yamamoto Koichi, Nagasawa Motonori, Nozato Satoko, Imaizumi Yuki, Takeshita Hikari, Wang Cheng, Ito Yuki, Takeda Shuko, Takeya Yasushi, Sugimoto Ken, Nakagami Hironori, Hanayama Rikinari, Rakugi Hiromi	4. 巻 34
2. 論文標題 Novel properties of myoferlin in glucose metabolism via pathways involving modulation of adipose functions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2792 ~ 2811
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201901539RR	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9件（うち招待講演 9件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 Propagation of alpha-synuclein mRNA via neuronal extracellular vesicles
3. 学会等名 第7回 国際多系統萎縮症コンgres（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 Regulation of glial functions by neuronal exosomes and its disorder
3. 学会等名 第44回 日本神経科学大会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 細胞外小胞エクソソームによる神経免疫の制御機構
3. 学会等名 第32回 日本神経免疫学会学術集会 特別講演（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 神経由来エクソソームによるalpha-synucleinの伝播機序
3. 学会等名 Japanese Neurologist Parkinson's Disease Seminar（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 エクソソームによる α -synuclein mRNAの伝播機序
3. 学会等名 第14回 パーキンソン病・運動障害疾患コンgres (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 Development of analysis methods of exosomes, endogenous nano-particles
3. 学会等名 Laboratory for Intellectual Innovation Forum (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 エクソソームによる疾患の発症機序
3. 学会等名 Pfizer Endocrinology Forum 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 エクソソームを介したシヌクレイノパチーの発症機序
3. 学会等名 第37回 日本神経治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 華山力成
2. 発表標題 神経系エクソソームによる疾患の発症機序
3. 学会等名 日経バイオテクセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

細胞外小胞による神経膠腫の進展機構を解明 https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/81088

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