

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06871

研究課題名(和文) グリア前駆細胞から放出される細胞外小胞を介した再ミエリン化の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of remyelination via extracellular vesicles released from glial progenitor cells

研究代表者

小野 健治 (Ono, Kenji)

名古屋大学・環境医学研究所・助教

研究者番号：80329698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：光感受性陽イオンチャネルを発現したグリア前駆細胞を光刺激すると、オリゴデンドロサイトへ分化誘導でき、脱髄疾患を緩解できることをこれまでに見出していた。本研究では、光刺激により分化誘導したグリア前駆細胞から放出されるエクソソーム量が増大し、エクソソーム中に含まれるmiRNAなどの内容物に変化が生じることがわかった。また、ミクログリアがそのエクソソームを受容することでM1からM2へ極性転換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

本研究では、脱髄疾患においてグリア前駆細胞から放出されるエクソソームが脱髄周囲のミクログリアに取り込まれることで、エクソソーム内のmiRNAを介してミクログリアの機能を調節していることが示唆された。これまでにグリア前駆細胞が放出する細胞外小胞を介した細胞間情報伝達に焦点をあてた研究はほとんどなく、脱髄疾患など中枢神経系疾患における再ミエリン化を促進する分子機構の理解や将来的な新規診断・治療法の開発に役立つと考えられた。

研究成果の概要(英文)： We have previously reported that glial progenitor cells expressing photo-activated cation channels can induce differentiation into oligodendrocytes with blue light exposure, and that the differentiated cells contribute to recovery from demyelinating diseases. In this study, we found that exosomes released from the differentiated glial progenitor cells by photo-activation were increased and the contents of exosomes, including miRNAs, were altered. We also found that microglia undergo a polarity shift from M1 to M2 by accepting their exosomes.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞外小胞 グリア前駆細胞 オリゴデンドロサイト ミクログリア オプトジェネティクス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脱髄疾患は、神経軸索を覆うミエリンが消失し神経の興奮伝導障害が生じることにより四肢の痺れなど多様な神経症状が見られる疾患である。脱髄疾患を根本的に治療するには、中枢神経系においてミエリンを形成するオリゴデンドロサイトを脱髄部位で分化誘導させ、ミエリンを再形成させること(再ミエリン化)が重要である。培養条件下では NG2 陽性グリア前駆細胞を種々の増殖因子で刺激することでオリゴデンドロサイトへ分化誘導させられるが、生体内では増殖因子が種々の細胞にも作用するため、効率よく分化誘導させることは難しい。また、脱髄部位では LINGO-1 などの分化阻害物質の発現上昇が見られることや、他のグリア細胞や神経細胞との細胞間相互作用が報告されているものの、オリゴデンドロサイトが再ミエリン化するための機序については未だ不明な点が多く、脱髄疾患を根治させるために分子機序の解明が強く求められている。申請者は、グリア前駆細胞がオリゴデンドロサイトへ分化する際に細胞内  $Ca^{2+}$  濃度上昇を伴うことに着目し、光感受性陽イオンチャネル ChR2(Channelrhodopsin-2)を発現させた NG2 グリア前駆細胞を光刺激することで、オリゴデンドロサイトへ分化誘導できることを明らかにした。この際、光刺激によって細胞内  $Na^{+}$  や  $Ca^{2+}$  の濃度上昇が生じ、Akt/mTOR シグナル伝達経路を活性化させ、GalC などのオリゴデンドロサイトマーカー発現を上昇させた。また、NG2 グリア前駆細胞選択的に ChR2 を発現する NG2-ChR2 マウスを用いた脱髄モデルで光刺激を行うと、光刺激したグリア前駆細胞が GalC を発現するとともに、神経軸索を包み込んだミエリン様構造を形成し、脱髄による運動機能障害を緩解させた。NG2-ChR2 マウス脱髄モデルの脳脊髄切片を光刺激の有無によって分析すると、脱髄が生じた部位にミクログリアの集積がどちらも見られるが、光刺激群では CD206 や CD163 といった M2 マーカーを発現するミクログリアが有意に増加した。M2 マーカーを発現するミクログリアを除去すると再ミエリン化が抑制されるので[Nat Neurosci 16(9):1211-1218 2013]、光刺激を受けたグリア前駆細胞とミクログリアの間で何らかの相互作用があり、再ミエリン化に寄与している可能性が考えられた。

近年、細胞間情報伝達の機序の一つとして細胞外小胞を介した伝達に注目が集まっている。EV は、細胞から放出される脂質二重膜で囲まれた小胞であり、粒子径や構成成分、分泌機構の違いでアポトーシス小体、エクソソーム(SEV)、マイクロベシクル(LEV)に大別される。小胞内にはタンパク質や miRNA などが含まれており、EV を受け取った細胞の機能を変化させるが、従来の液性因子などの放出に比べ作用する細胞に選択性があると考えられている。ChR2 発現グリア前駆細胞の EV を調べてみると、光刺激によって細胞当たりの EV 放出量が增大することがわかった。また、これらの EV はグリア前駆細胞の細胞分化には関与せず、ミクログリアによく取り込まれミクログリアの mRNA 発現を変化させた。したがって、EV を介したグリア前駆細胞とミクログリアとの細胞間相互作用を明らかにすることが、再ミエリン化に関する分子機序の解明に繋がると考えられた。

### 2. 研究の目的

ChR2 発現グリア前駆細胞が光刺激によって放出する EV はミクログリアにどのような機能変化を及ぼすのか、また EV 応答によって生じたミクログリアの機能変化が再ミエリン化にどのように関わるのかを明らかにし、将来的な再生医療応用や新規治療開発へと展開するための基盤を確立することが目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) OS3ChR2 細胞の培養

OS3ChR2 細胞を 3 日間  $CO_2$  インキュベータ内で青色光刺激 (ON 1 min/ OFF 4 min) し、培養上清を回収した。培養上清を回収する際、生細胞を回収し細胞数を計測した。いくつかの実験条件では、阻害剤 (manumycin A、GW4869、U0126、LY294002) の存在下で光刺激を行った。リン酸化応答を調べる実験においては、光照射後 6 h で細胞を回収し Western blotting に用いた。

#### (2) EV の回収

培養上清から生細胞を  $300 \times g$  5 min で遠心除去し、さらに  $2000 \times g$  20 min でアポトーシス小体を除去した。その培養上清を  $10,000 \times g$  60 min で遠心し、LEV を回収した。LEV まで除去した培養上清を  $110,000 \times g$  70 min で遠心し SEV を回収した。採取した LEV と SEV は Nanosight NS300 を用いてナノトラッキング分析を行い、平均粒子径と濃度を計測した。細胞数に基づき細胞あたりの EV 放出量を算出した。

#### (3) Western blotting

光刺激の有無によって採取した細胞、LEV、SEV をタンパク定量後、アクリルアミドゲルで電気泳動し PVDF メンブレンに転写した。ブロッキング後、Can Get Signal で希釈した 1 次抗体に浸し 4 晩インキュベートした。TBS-T で洗浄後、Can Get Signal で希釈した HRP 標識された 2 次抗体と 1 h インキュベートした。洗浄後、ECL Clarity で 5 min 反応後、メンブレンの撮像

を行った。1次抗体は、anti-CD63抗体(MBL), anti-CD81抗体(Biolegend), anti-CD9抗体(Biolegend), anti-Alix抗体(Santa Cruz), anti-Mitofilin抗体(Proteintech), anti-GAPDH抗体(Wako), anti-phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204)抗体(CST), anti-ERK1/2抗体(CST), anti-phospho-Akt(Ser473)抗体(CST), anti-Akt抗体(CST)を用いた。

#### (4) EVを受容したミクログリアの機能評価

C57BL/6新生仔マウスの脳から mixed glial culture を作製し、14日後初代培養ミクログリアを単離した。EVなし、無刺激 OS3ChR2由来LEV、光刺激 OS3ChR2由来LEV、無刺激 OS3ChR2由来SEV、光刺激 OS3ChR2由来SEVの5種の刺激をミクログリアに行い、24h後RNAを抽出した。逆転写によりcDNAを作製し、リアルタイムPCRによってIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , iNOS, CD206, GAPDHの発現を調べた。

#### (5) SEV中のmiRNA分析

miRNeasy Serum/Plasma Kit (Qiagen)を用いてSEVからmiRNAを抽出した。miScript II RT Kit (Qiagen)を用いて逆転写を行い、miScript miRNA PCR Array (Mouse Inflammatory Response & Autoimmunity)を実施した。

#### (6) 脱髄モデルマウスの解析

Iba1-tdTomatoマウスの脳梁にリゾフォスファチジルコリンを注入した脱髄モデルを作製した。7日後脱髄部位へSEVやmiR-155-5p阻害剤を注入し、7日後PBSで灌流し脳を採取しOCT Compoundで包埋し80 $^{\circ}$ Cで保存した。厚さ10 $\mu$ mの連続切片を作製しanti-iNOS抗体(BD)やanti-CD206抗体(Bio-Rad)で染色後tdTomato陽性ミクログリアの性質について調べた。一部の切片は脱水処理後、レーザーマイクロダイセクションでtdTomato陽性細胞を回収し、RNA抽出後Real time PCRで分析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 光刺激により分化誘導したグリア前駆細胞から放出されるEVの性質

ChR2を遺伝子導入したグリア前駆細胞株OS3ChR2を青色光刺激し、培養上清からLEVとSEVを採取した。ナノトラッキング解析により平均粒子径を調べてみると、LEVとSEV間で明瞭な平均粒子径の差が見られたが、光刺激の有無によって放出されたLEVやSEVの平均粒子径に変化は見られなかった。一方、細胞当たりのLEV及びSEVの放出量は、LEV、SEVともに光刺激によって増大した。このことから分化誘導によりEVの放出量が増大することがわかった。放出されたEVの性質を調べるために、Western blottingによってテトラスパニンなどのカーゴタンパク含有量を比較した。同じタンパク量で比較するとCD63,CD81,CD9及びAlixの含有量はSEVで顕著に見られ、LEVではほとんど見られなかった。一方、MitofilinについてはLEVで確認されたが、SEVではほとんど見られなかった。光刺激の有無で比べると、光刺激時のSEV中のテトラスパニンやAlixの含有量が減少していた。また、光刺激時のLEV中のMitofilinについても含有量の減少が見られた。これらのことから、光刺激により放出されるEVの性質に変化が生じることがわかった。

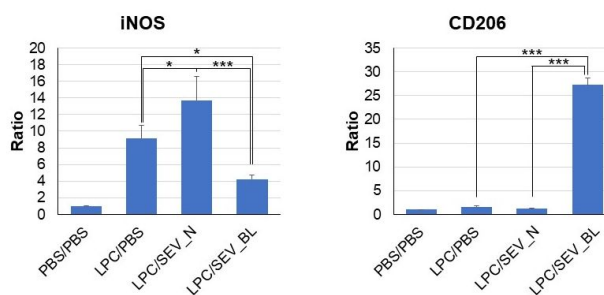
#### (2) 光刺激によるEV放出増大の機序に関する解析

SEVの放出にはendosomal sorting complexes required for transport (ESCRT)依存的経路と非依存的経路が存在するので、光刺激による細胞当たりのSEV放出増大がどの経路を介するかを調べた。ESCRT依存的経路の阻害剤manumycin AまたはESCRT非依存的経路の阻害剤GW4869存在下で放出されるSEVの細胞当たりの放出量を計測すると、いずれも光刺激によって生じたSEV放出増大が抑制された。この時、OS3ChR2細胞におけるシグナル伝達経路を分析してみると、光によって増大が見られたERK1/2のリン酸化やAktのリン酸化が抑制されていることがわかった。そこでERK1/2の阻害剤であるU0126存在下で放出されるSEV放出量を計測すると、予想に反して光刺激によって生じたSEV放出増大がさらに増大することがわかった。この時、OS3ChR2細胞のERK1/2のリン酸化増大はU0126によって抑制されていたが、Aktのリン酸化増大はさらに増大していた。Aktが優位に働いている可能性が考えられたので、Aktの阻害剤であるLY294002存在下でSEV放出量を調べると、こちらも予想に反して光刺激によって生じたSEV放出増大がさらに増大した。この時、OS3ChR2細胞のAktのリン酸化増大はLY294002によって抑制されていたが、ERK1/2のリン酸化増大はさらに増大していた。以上のことから、光刺激によるSEV放出量の増大は、ESCRT依存的/非依存的のどちらの経路も関与すること、ERK1/2およびAktの両シグナル伝達経路が重要な役割を果たすが片方のシグナルを抑えると相補的に反対の経路の活性化が生じることがわかった。

#### (3) グリア前駆細胞が放出したEVを受容したミクログリアの性質に関する解析

グリア前駆細胞が放出するEVを介してミクログリアがどのように機能変化するかを調べるために、初代培養ミクログリアにEVを添加し炎症に関連するmRNA変化について検討した。光刺激を行っていないOS3ChR2由来のLEVやSEVで刺激されたミクログリアは、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ やM1マーカーの1つiNOSの発現が上昇し、M2マーカーの1つであるCD206の発現が減少した。一方、光刺激により分化誘導したOS3ChR2由来のLEVで刺激

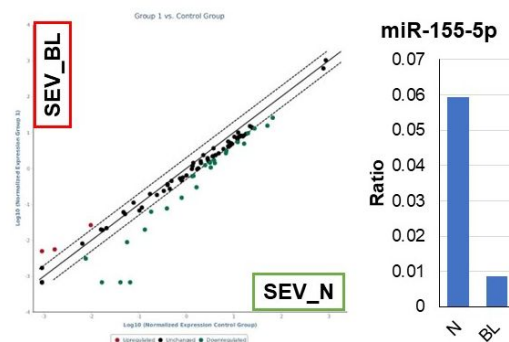
されたミクログリアは IL-1b や iNOS の発現上昇が抑制された。また、光刺激された細胞から得られた SEV で刺激されたミクログリアは、IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , iNOS の発現上昇が抑えられるとともに、CD206 の発現減少が抑制された。脱髄モデルマウスにおいて OS3ChR2 由来 SEV を注入すると、無刺激群の SEV を注入した脱髄部位のミクログリアは iNOS を発現し CD206 の発現がほとんど見られないのに対して、光刺激群の SEV を注入した部位のミクログリアは iNOS の発現があまり見られず CD206 を発現していた。レーザーマイクロダイセクションで脱髄部位の Iba1 陽性ミクログリアを分離し、mRNA の発現を調べると同様の結果を示しており (図 1) 分化誘導により SEV の性質が変化しそれを受けたミクログリアの極性も変化することが示唆された。



**図1: レーザーマイクロダイセクションで採取したミクログリアの性質**  
tdTomato 陽性細胞 (Iba1 陽性ミクログリア) を 3000 個回収し、iNOS 及び CD206 mRNA の発現を調べた。PBS/PBS: 脱髄未作製/SEV 投与なし, LPC/PBS: 脱髄作製/SEV 投与なし, LPC/SEV\_N: 脱髄作製/無刺激 OS3ChR2 由来 SEV 投与, LPC/SEV\_BL: 脱髄作製/光刺激 OS3ChR2 由来 SEV 投与。  
\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$

#### (4) グリア前駆細胞が放出する SEV 中に含有される miRNA の分析

EV 中に含まれるどのような機能性分子がミクログリアの機能変化に寄与するのかを検討するために、EV 中に含まれる miRNA に着目した。光刺激の有無によって放出された SEV に含有される miRNA について炎症に関連する miRNA という観点から PCR array 分析を行った。その結果、光刺激によって SEV 中に含有される miRNA のうち 2 倍以上含有量が増減する miRNA が複数確認できた。その中の 1 つとして炎症や M1 極性転換に関わる miR-155-5p の含有量が光刺激で放出される SEV では減少することが分かった (図 2)。miR-155-5p がミクログリアの性質に変化を及ぼしている可能性が考えられたので、脱髄モデルマウスに miR-155-5p に対する阻害剤を投与し、ミクログリアの性質について調べた。脱髄モデルマウスの脱髄部位におけるミクログリアは、M1 マーカーの一つ iNOS を発現し M2 マーカーである CD206 の発現がほとんど見られない。それに対し miR-155-5p に対する阻害剤を投与したマウスの脱髄部位では、iNOS を発現したミクログリアが減少し、CD206 を発現したミクログリアが増加した。グリア前駆細胞に ChR2 を発現させたトランスジェニックマウス NG2-ChR2 マウスを用いた脱髄モデルにおいても光刺激によって iNOS 陰性 CD206 陽性ミクログリアの集積が見られるので、miR-155-5p のようなエクソソーム中の miRNA を介してグリア前駆細胞はミクログリアと細胞間情報伝達を行っている可能性が考えられた。



**図2: SEV 中に含有される miRNA の変化**

炎症に関連する miRNA について PCR array 解析を行った。無刺激 OS3ChR2 由来 SEV (SEV\_N) で含有量が多くなった miRNA を緑色、光刺激 OS3ChR2 由来 SEV (SEV\_BL) で含有量が多くなった miRNA を赤色で示す。SEV\_BL で減少する miRNA として miR-155-5p が見つかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Ono Kenji, Niwa Mikio, Suzuki Hiromi, Kobayashi Nahoko Bailey, Yoshida Tetsuhiko, Sawada Makoto	4. 巻 560
2. 論文標題 Secretion of signal peptides via extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 21 ~ 26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.04.073	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 Yoshioka Naoki, Tanaka Miyako, Ochi Kozue, Watanabe Akiko, Ono Kenji, Sawada Makoto, Ogi Tomoo, Itoh Michiko, Ito Ayaka, Shiraki Yukihiro, Enomoto Atsushi, Ishigami Masatoshi, Fujishiro Mitsuhiro, Ogawa Yoshihiro, Suganami Takayoshi	4. 巻 140
2. 論文標題 The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor Tofogliflozin prevents the progression of nonalcoholic steatohepatitis-associated liver tumors in a novel murine model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicine & Pharmacotherapy	6. 最初と最後の頁 111738 ~ 111738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2021.111738	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 Ono Kenji, Niwa Mikio, Suzuki Hiromi, Kobayashi Nahoko Bailey, Yoshida Tetsuhiko, Sawada Makoto	4. 巻 23
2. 論文標題 Signal Sequence-Dependent Orientation of Signal Peptide Fragments to Exosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3137 ~ 3137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23063137	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 Ono Kenji, Niwa Mikio, Suzuki Hiromi, Kobayashi Nahoko Bailey, Yoshida Tetsuhiko, Sawada Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Calmodulin as a Key Regulator of Exosomal Signal Peptides	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 158 ~ 158
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells12010158	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10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀裕介、洪暎淳、松本龍太、鈴木弘美、小野健治、前田裕樹、小河潔、澤田誠
2. 発表標題 ホットメルトレーザーマイクロダイセクションおよび並列LCを用いた高速LC-MSイメージングシステムの開発
3. 学会等名 第68回質量分析総合討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野健治、大橋和哉、鈴木弘美、澤田誠
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトへ分化誘導したグリア前駆細胞株から放出されるエクソソームの性質
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西海伸哉、浅川修一、黄松銭、Md Asaduzzaman、渡邊壮一、金子豊二、吉武和敏、木下滋晴、木村聡、五十嵐洋治、小野健治、前山薫、永井清仁、渡部終五、吉田徹彦、満山 進
2. 発表標題 魚介類エクソソームの単離
3. 学会等名 令和3年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野健治、伊藤友香、鈴木弘美、澤田 誠
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトへ分化誘導したグリア前駆細胞のエクソソーム放出機序
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野健治、伊藤友香、大橋和哉、鈴木弘美、澤田 誠
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトへ分化誘導したグリア前駆細胞から放出されるエクソソームの解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木弘美、藤田爽加、小野健治、澤田 誠
2. 発表標題 質量分析イメージングによる脳内神経炎症の検出の試み
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 ANAS Andrea Roxanne Jocsing、鈴木弘美、小野健治、外山 宏、野村昌彦、旗野健太郎、原田健一、澤田 誠
2. 発表標題 LC-MS/MS-SRMを用いたマウス脳組織中のTSP0リガンド PK11195とFEPPAの同時定量
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野健治、伊藤友香、大橋和哉、鈴木弘美、澤田 誠
2. 発表標題 オリゴデンドロサイトへ分化誘導したグリア前駆細胞から放出されるエクソソーム
3. 学会等名 Neuro2022 (第45回日本神経科学大会、第65回日本神経化学会大会、第32回日本神経回路学会大会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野健治、丹羽幹夫、鈴木弘美、小林ベイリー菜穂子、吉田徹彦、澤田 誠
2. 発表標題 エクソソームを介したシグナルペプチドの細胞外放出
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木弘美、小野健治、澤田 誠
2. 発表標題 質量分析と質量イメージングによる活性化マイクログリアの検出
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 質量分析方法	発明者 澤田 誠、小野健治、 鈴木弘美、王勇、緒 方是嗣、村田 匡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/044239	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 質量分析方法	発明者 澤田 誠、小野健治、 鈴木弘美、王勇、緒 方是嗣、村田 匡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-208582	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 レーザマイクロダイセクション装置	発明者 澤田誠、鈴木弘美、 小野健治、洪暎淳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2021/186577	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 質量分析方法	発明者 澤田 誠、小野健治、 鈴木弘美、王勇、緒 方是嗣、村田 匡	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2022/131000	取得年 2022年	国内・外国の別 外国



〔その他〕

[https://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/html/100002655\\_ja.html](https://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/html/100002655_ja.html)

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