

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07985

研究課題名（和文）うつ病モデルマウスの脳由来エクソソームを用いた血液バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）Analysis of serum extracellular vesicles of chronic stress mouse to identify blood biomarkers for major depressive disorder

研究代表者

松野 仁美（鈴木仁美）（Matsuno, Hitomi）

日本医科大学・大学院医学研究科・ポストドクター

研究者番号：40415302

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）：近年の研究から、うつ病の発症には脳内の炎症反応が関与することが示唆されてきた。そして少なくとも一部のうつ病病態には血液脳関門（BBB）の機能低下が関与していることが示されている。本研究課題ではうつモデルマウスから採取したエクソソームのmiRNA解析と機能解析を実施した。うつ病モデルマウス血清由来エクソソームでは血管内皮細胞由来miRNA、血管新生・リモデリング関連遺伝子をターゲットとする複数のmiRNA発現増加が見られた。今後は脳血管内皮細胞由来エクソソームの単離、動態・機能解析、ヒト検体を用いた血液バイオマーカーとしての有用性の検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは脂質二重膜で形成された小胞内にタンパク質、核酸等を含んでおり、比較的安定な状態で放出細胞から遠く離れた標的細胞まで情報を伝達することができ、体液中のエクソソームは様々な疾患バイオマーカーとしての応用が期待されている。本研究はうつモデルマウスを用いて、BBB機能低下を伴ううつ病サブタイプの血液バイオマーカー探索を目的として実施した。血清由来エクソソームの遺伝子解析の結果において、血管新生・リモデリングに関与するmiRNAが抽出されたことは、うつ病病態に血管機能低下が関与しているという仮説を支持するとともに、新規のバイオマーカー開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we analyzed the characterization and miRNA expression pattern of exosomes derived from a chronic stress mouse model to identify the blood biomarkers of major depressive disorder subtype associated with BBB dysfunction. We observed increased concentration of exosomes in the serum of stressed mice, and found that the target genes of some differential expression of miRNAs were involved in the angiogenesis, and vascular remodeling. These findings suggest a possibility that chronic stress promotes exosome-secretion-mediated signaling and these changes may be involved in vascular alteration, including BBB dysfunction, in the pathogenesis of major depressive disorder.

研究分野：精神神経科学

キーワード：慢性ストレス うつ病 血液脳関門 血管透過性 エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、うつ病患者では血液中と脳脊髄液中の炎症性サイトカインレベルが健常者と比べて高いことや、死後脳において活性化ミクログリアが増えていることから、神経炎症がうつ病の病態メカニズムとして注目されている。さらに、私たちはうつ病患者やうつモデルマウスの解析から、少なくとも一部のうつ病では血液脳関門（BBB）機能低下がその病態の一旦を担っていることを明らかにしてきた（Matsuno et al., 2022）。BBB機能低下タイプのうつ病では、従来のモノアミン神経伝達物質の再取り込み阻害剤による治療効果が見られない難治性の患者が多く、脳脊髄液中の血漿タンパク質フィブリノーゲンの濃度および総タンパク質濃度が増加している。本研究ではBBB機能低下タイプうつ病の血液バイオマーカの探索を目的として、うつモデルマウスの末梢血由来エクソソームの遺伝子解析、機能解析を行い、血液バイオマーカの探索を目指した。

2. 研究の目的

BBB機能変化を検出するためには画像診断や脳脊髄液検査が必要であり、末梢血中のエクソソームを用いたバイオマーカ開発は、BBB機能低下タイプのうつ病の早期診断や治療方法の最適化に繋がる。本研究ではうつモデルマウスを用いて、うつ病発症およびBBB機能障害に伴う末梢血中エクソソームの分泌変化、内容物のmiRNA解析を行い、BBB機能低下の血液バイオマーカ候補を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

（1）BBB機能低下モデルマウスの脳血管解析

BALB/cマウスに1日6時間、21日間連続で慢性拘束ストレスを与え、うつモデルマウス(以下拘束ストレスマウス)を作成した。末梢血採取後、灌流固定、脳組織の採取を行い、電子顕微鏡観察用組織サンプルの作成を行なった。また拘束ストレスマウスと同様に、脳凍傷マウスを作成し末梢血の採取を行なった。

（2）マウス血液由来エクソソームの回収、解析

マウス血液由来エクソソームは、ExoQuick-Ultra (System Bioscience) を用いて、単離を行った。単離エクソソーム分画について、ウエスタンブロッティング、ナノ粒子ナノトラッキング解析により、エクソソーム含有の確認および粒子サイズ・濃度定量を行った。また単離エクソソームの機能解析のため、マウス脳血管由来内皮細胞株bEnd.3へ投与を行い、細胞透過性および細胞形態への影響を調べた。bEnd.3はtranswell上に単層培養し、EVOM2(World Precision Instruments)を用いた電気抵抗値測定により細胞透過性を評価した。またエクソソーム投与後、

Claudin-5の免疫染色を行い、BBBバリア機能を担うタイトジャンクションへの影響について検討を行った。

(3) 血液由来エクソソームのmiRNA網羅解析

マウス血液(血清)から単離したエクソソームからmiRNA単離(miRNeasy, Qiagen)後、Agilent2100バイオアナライザによるクオリティチェックを行い、ライブラリー調整(SMARTer smRNA-Seq Kit for illumina, Takara Bio USA)、シークエンス解析(Qiaseq miRNA Library kit, Qiagen)を行った。

4. 研究成果

(1) BBB機能低下モデルマウスの脳血管構造解析

拘束ストレスマウスの海馬脳血管の微細構造について電子顕微鏡観察を行った。その結果、拘束ストレスマウスの脳血管内皮細胞では、内腔側細胞膜に接している多胞体の割合が有意に増加しており、血液中へのエクソソーム分泌が増加している可能性が示唆された。また多胞体の全体数については変化がなかった。

(2) 血液由来エクソソームの回収、解析

マウス血液から単離したエクソソーム分画について、ウエスタンブロッティングを行った結果、エクソソームマーカであるCD63, TSG101のバンドが確認された。一方で、脳血管内皮細胞のタイトジャンクション構成タンパク質であるClaudin-5については、より重度なBBB障害を誘導する脳凍傷マウスにおいてもバンドを検出することが出来なかった。次に、ナノサイトNS300(Quantum Design)を用いてナノトラッキング解析を行った。その結果、コントロールマウスと比較して拘束ストレスマウスでは、エクソソーム粒子サイズに変化はなかったが、粒子量が有意に増加していることが分かった。先行研究よりがん細胞由来のエクソソームは標的の内皮細胞のバリア機能低下や血管新生を誘導することが報告されている。そこで拘束ストレスマウス血液中エクソソーム量増加とBBB機能低下メカニズムの関係について検討するため、単離エクソソームをマウス脳内皮細胞株bEnd.3へ投与した。拘束ストレスマウス由来エクソソームを投与した細胞では、コントロールマウス由来エクソソームを投与した細胞と比較して、バリア機能が亢進していることを見出しており、今後BBB機能低下との関連性について検討を行う予定である。

(3) 血液由来エクソソームのmiRNA網羅解析

コントロールおよび拘束ストレスマウス血液由来エクソソームのmiRNAについて、miRNA-seqによる網羅的miRNA発現解析を行った。得られた配列についてmiRBaseに登録されている成熟miRNAを参照配列としてリード数を算出し、全リード数によって正規化した値を用いてt-検定を行った。拘束ストレスマウス血清由来エクソソームで発現レベルが有意に($p < 0.05$)増加したmiRNAのターゲット遺伝子をmiRTarBaseで検索し、GO解析を行ったところ、血管新生および血管リモデリングに関わる複数のGO-termが抽出された。また拘束ストレスマウスで発現増加したmiRNAには内皮細胞特異的miRNAであるmiR-126が含まれており、内皮細胞エクソソーム放出増加の可能性を支持する結果となった。先行研究より、拘束ストレスマウスでは脳と血液の両方において血管新生誘導サイトカインである血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現増加が見られ、BBB機能低下の主要なメカニズムとなっていると考えている。したがって本研究で明らかとなった拘束ストレスマウスにおけるエクソソーム放出変化の少なくとも一部は、VEGFによる脳血管内皮機能の低下と関与している可能性が考えられる。また拘束ストレスマウスでは、血管内皮細胞エクソソーム放出が増加している可能性が示唆されたが、解析を行った血液由来エクソソームには中枢および末梢における複数のドナー細胞由来エクソソームが混在しており、脳血管内皮細胞のエクソソーム動態については不明である。今後は、血液中に放出される脳血管内皮細胞由来エクソソームの単離・動態追跡、標的細胞における機能解析、さらにヒト検体におけるバイオマーカーとしての有用性について検証していく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hitomi Matsuno, Shoko Tsuchimine, Kazunori O'Hashi, Kazuhisa Sakai, Kotaro Hattori, Shinsuke Hidese, Shingo Nakajima, Shuichi Chiba, Aya Yoshimura, Noriko Fukuzato, Mayumi Kando, Megumi Tatsumi Shintaro Ogawa, Noritaka Ichinohe, Hiroshi Kunugi, and Kazuhiro Sohya	4. 巻 -
2. 論文標題 Association between vascular endothelial growth factor-mediated blood-brain barrier dysfunction and stress-induced depression	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Psychiatry	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） 10.1038/s41380-022-01618-3	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 松野(鈴木)仁美, 功刀 浩	4. 巻 53巻4号
2. 論文標題 うつ病と血液脳関門機能低下	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 臨床精神医学	6. 最初と最後の頁 479-484
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 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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松野仁美、土嶺章子、大橋一徳、境和久、服部功太郎、秀瀬真輔、中島進吾、千葉秀一、吉村文、譜久里紀子、漢人真由美、辰巳めぐみ、一戸紀孝、惣谷和広、功刀浩
2. 発表標題 慢性拘束うつ病モデルマウスにおける脳血液関門の機能変化と発症機序の解明
3. 学会等名 第43回日本生物学的精神医学会・第51回日本神経精神薬理学会（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究協力者	功刀 浩 (Kunugi Hiroshi)		
研究協力者	一戸 紀孝 (Ichinohe Noritaka)		
研究協力者	境 和久 (Sakai Kazuhisa)		
研究協力者	土嶺 章子 (Tsuchimine Shoko)		
研究協力者	小川 眞太郎 (Ogawa Shintaro)		
研究協力者	早川 智久 (Hayakawa Tomohisa)		
研究協力者	福原 茂朋 (Fukuhara Shigetomo)		

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