

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11664

研究課題名（和文）認知機能低下の早期バイオマーカー探索：長期縦断研究の検体を用いた細胞外小胞の解析

研究課題名（英文）Search for early biomarkers of cognitive decline: analysis of extracellular vesicles using samples from a long-term longitudinal study

研究代表者

川上 恭司郎（Kawakami, Kyojiro）

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター（東京都健康長寿医療センター研究所）・東京都健康長寿医療センター研究所・研究員

研究者番号：90589227

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）：本研究は長期縦断研究の検体を使用し、個人差を抑えたうえで、細胞外小胞を標的とした認知機能低下の新規バイオマーカー探索をすることを目的とした。まずは同一個体で70歳を起点として73歳、76歳と連続的に認知機能が低下している検体を選定した。続けて、血漿を用いた細胞外小胞のプロテオーム解析に適した精製法の検討を行った後、検体より細胞外小胞を精製し、プロテオーム解析を行った。その結果、737個のタンパク質が同定され、増減するタンパク質として、21個が抽出された。今後は認知機能が低下していない群との比較を行ったうえで、多検体を用いた検証を行い、認知機能低下の新規バイオマーカーの開発を進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知機能の低下は超高齢社会である我が国では重要な問題の一つである。認知機能低下の早期バイオマーカーの開発には様々な取り組みがなされているが、実用化には至っていない。我々はバイオマーカーの開発を難しくしているのは、個人差が影響しているのではないかと考えた。本研究では長期縦断研究の検体を使用することで、個人差を抑えた探索研究が可能であり、新規のバイオマーカーの開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to search for novel biomarkers of cognitive decline targeting extracellular vesicles, using samples from a long-term longitudinal study to minimize individual differences. First, we selected samples from a longitudinal study in which cognitive function declined continuously from age 70 to age 73 and 76 in the same individuals. Then, after investigating a purification method suitable for proteome analysis of extracellular vesicles using plasma, we purified extracellular vesicles from the samples and performed proteome analysis. As a result, 737 proteins were identified, and 21 proteins were significantly increased or decreased in cognitive decline samples. We will compare the results with those of the group without cognitive decline, verify the results using multiple samples, and develop a new biomarker for cognitive decline.

研究分野：生化学、分子生物学、細胞外小胞

キーワード：細胞外小胞 バイオマーカー 認知機能低下 長期縦断研究

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の我が国では認知機能の低下は重要な問題の一つである。認知機能低下は早期の介入により重症化の抑制や遅延ができることが分かってきており、そのためには早期診断に役立つバイオマーカーが必要であるが、現在までに実用化に至ったものはない。認知症のバイオマーカーとしてはアミロイド やタウなどがあり、脳脊髄液の分析や PET イメージングによる画像診断などの有用性が示されているが、高い侵襲性や費用から、検診などでは容易に実施できない。そのため、低侵襲、低コストかつ大規模スクリーニングが可能な認知機能低下・認知症の血液バイオマーカーの発見が期待されている。

細胞外小胞は細胞より放出される膜小胞で、その内部には由来する細胞のタンパク質・核酸などが含まれている。細胞外小胞は血液、髄液などの体液中に存在しており、新たなタイプのバイオマーカーとして注目されている。申請者はこれまで細胞外小胞の研究を行い、がんのエクソソームマーカーの探索(参考文献1)に加え、ミクログリア由来エクソソームの神経細胞に対する影響を検討してきた(基盤研究C H28-H30、若手研究B H26-H27)。

従来のバイオマーカー探索の研究では横断研究が一般的であり、疾患群と対照群を比較しているため、個人差が大きく候補マーカーの同定は困難であった。そこで、申請者はこの問題を解決するためにSONIC(Septuagenarians, Octogenarians, Nonagenarians Investigation with Centenarians)に着目した。これは、東京都健康長寿医療センター研究所と大阪大学が中心となり、関東圏、関西圏の都市部、非都市部の70歳、80歳、90歳を対象に、3年毎に同一人物を追跡調査する長期縦断研究であり、加齢に伴う心身の変化と健康長寿要因の解明を目的としている。この検体を用いることで同一人物の縦断的な比較が可能と考えた。

本研究では、経年的に認知機能が低下した参加者の検体を用い、血漿から単離した細胞外小胞のプロテオーム解析を行うことにより、従来の血漿全体の解析では見えていなかった認知機能低下の早期バイオマーカーを同定できるのではないかと考え、研究を行った。

## 2. 研究の目的

認知機能の低下は超高齢社会の我が国では重要な問題の一つである。認知機能低下の早期のバイオマーカー開発には様々な取り組みが行われているが、実用化には至ってはいない。その原因として、横断研究における個人差が挙げられる。そこで、本研究では同一人物を長期追跡した縦断研究の検体を用い、個人差を抑えた探索研究を行う。具体的には、細胞から体液中に放出され、由来細胞の成分を内包する細胞外小胞(EV: extracellular vesicle)を血漿から単離した後、プロテオーム解析を行い、従来の血漿全体の解析では見えなかった新規バイオマーカーの発見を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 解析対象の選定

長期縦断研究SONICより70歳代の初回、2回目(3年後)、3回目(6年後)の調査で、認知機能検査であるMoCA-J(Japanese version of Montreal Cognitive Assessment)スコアが連続的に低下した参加者を選定し、「認知機能低下群」とした。さらに、MoCA-Jスコアが低下しなかった参加者から教育歴等を考慮して「認知機能維持群」を選定した。

### (2) 血漿由来の細胞外小胞の精製法の検討

血清または血漿を10,000xg, 4℃, 30分遠心し、夾雑物を沈殿させた。次にその上清を0.22μmのフィルターを通すことで、大きな粒子などを除いた。その後、下記の方法で細胞外小胞を精製した。

ホスファチジルセリン(PS)アフィニティ法:

ビオチン化ラベルをしたT-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4(Tim4)分子(富士フィルム和光純薬)をストレプトアビジン磁気ビーズに結合させ、0.22μmフィルターを通した血清・血漿を室温1時間、攪拌下で反応させた。反応後、TBSTにより洗浄を行い、EDTA-PBS溶液によりTim4から細胞外小胞を遊離させた(参考文献2)。

細胞外小胞マーカー抗体による精製:

ビオチン化ラベルをしたCD9、CD63、CD81抗体(富士フィルム和光純薬)をそれぞれストレプトアビジン磁気ビーズに結合させたのち、磁気ビーズを混合し、0.22μmフィルターを通した血清・血漿を室温1時間、攪拌下で反応させた。反応後、TBSTにより洗浄を行い、RIPAバッファーによりビーズに結合した細胞外小胞を溶出した。

### (3) サンドイッチ ELISA

溶液中の CD9, CD63 の測定には磁気ビーズを用いたサンドイッチ ELISA にて測定した。ExoCap Streptavidin Kit (MBL) と CD9, CD63 抗体 (MBL) と同抗体の ALP 標識抗体 (MBL) を用いて、Kit のマニュアルに記載されている CLEIA 法に従って行った。

### (4) 細胞外小胞のプロテオーム解析

細胞外小胞マーカー抗体により精製した細胞外小胞を用いた。細胞外小胞は S-Trap 法 (ProtiFi) のマニュアルに従いトリプシン消化を行った。

得られたペプチドは SDB Stage-Tip にて脱塩後、UltiMate 3000 RSLCnano と Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) により nano LC-MS/MS 解析を行った。取得されたデータは Proteome Discoverer Software (Thermo Fisher Scientific) にて解析し、タンパク質の同定と定量比較を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 解析対象の選定：

前述のように認知機能検査 MoCA-J スコアが連続的に低下する参加者を選定した結果、認知機能低下群が 12 例、認知機能維持群が 12 例選定された (図 1)。

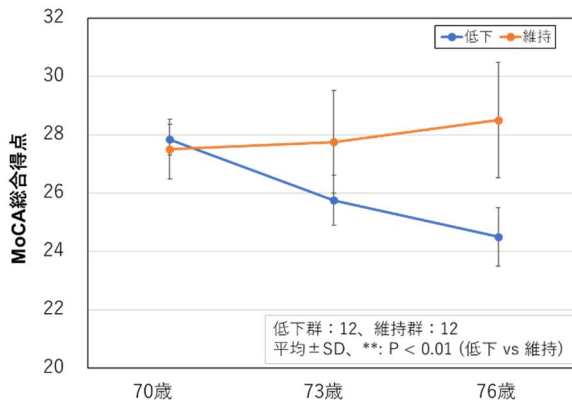


図 1. 認知機能低下群と認知機能維持群の MoCA スコアの推移

### (2) 血漿由来の細胞外小胞の精製法の検討

我々が行ってきた細胞外小胞の精製は主に血清を使用して行ってきたが、長期縦断研究 SONIC で採取されているのは血漿であるため、血漿を用いても同様に細胞外小胞を精製することが可能であることを市販の血漿を用いて確認した。その結果、PS アフィニティ法では血漿でも血清と同程度の細胞外小胞を回収することが可能であった (図 2)。

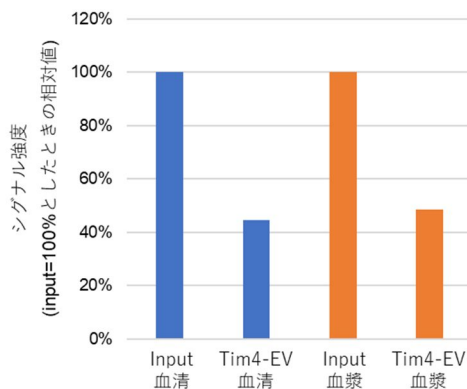


図 2. 血清および血漿から PS アフィニティ法にて精製した時の CD9 回収率

血清と血漿それぞれから PS アフィニティ法にて細胞外小胞を回収し、CD9 サンドイッチ ELISA にて測定した。数値は input のシグナル強度を 100% としたときの相対値にて示した。

しかしながら、その後の検討により、PS アフィニティ精製法は血漿から高純度の細胞外小胞が回収可能と考えていたが、限られた性質をもつ細胞外小胞のみを回収しているのではないかという懸念が生じた。そのため、PS アフィニティ法以外の別のアフィニティ精製法やサイズ排除クロマトグラフィー法なども含めて細胞外小胞を精製し、サンドイッチ ELISA やプロテオーム

Δ解析での細胞外小胞マーカータンパク質の検出程度の比較を行い、最もよい条件の精製方法を検討した。その結果、精製方法はEVマーカーに対する抗体による精製法を選択することとした(図3)。

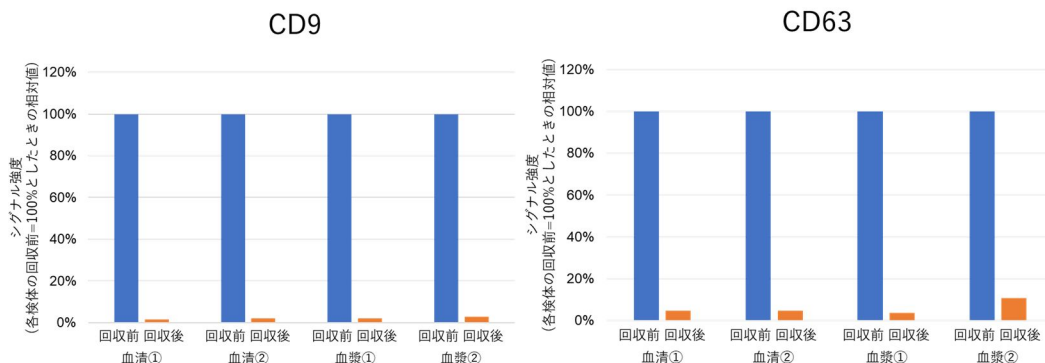


図3. 細胞外小胞の回収前後の血清・血漿中のCD9、CD63の測定(左:CD9、右CD63)  
細胞外小胞の回収量の検討には、回収した細胞外小胞のマーカータンパク質をウエスタンブロットで調べるより簡便に測定が可能であるため、細胞外小胞回収後の血清・血漿中の細胞外小胞マーカーの残存量で検討した。Inputを100%としたときCD9/CD63/CD81抗体ビーズMixで回収した後の血清・血漿中にはどのくらいのCD9とCD63が検出されるかを示した。

### (3) 細胞外小胞のプロテオーム解析

選定した長期縦断研究SONICの認知機能低下群の70歳と76歳時点の検体から細胞外小胞を精製し、プロテオーム解析を行った。その結果、737個のタンパク質が同定され、同一人物で6年後に変化するタンパク質として、21個が抽出されてきた。今後は認知機能が変化しない群との比較を行い、認知機能低下と関係性が強い可能性があるタンパク質を選抜し、多検体を使用した検証を行うことで、新規バイオマーカーの開発を目指していく。

## 5. 参考文献

1. Kawakami, K. et al. Gamma-glutamyltransferase activity in exosomes as a potential marker for prostate cancer. BMC Cancer 17, 316 (2017)
2. Kawakami, K. et al. Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies. Sci. Rep. 11, 15000 (2021)

## 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 3件）

1. 著者名 Iinuma K, Kawakami K, Mizutani K, Fujita Y, Yamaguchi T, Ito M, Kumano T, Matsuo M, Nakano M, Koie T, Ito M, Kato T	4. 巻 41(5)
2. 論文標題 miRNA-93 in Serum Extracellular Vesicles Before and After Low Dose Rate Prostate Brachytherapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 2411-2418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15016	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 Muramatsu-Maekawa Y, Kawakami K, Fujita Y, Takai M, Kato D, Nakane K, Kato T, Tsuchiya T, Koie T, Miura Y, Ito M, Mizutani K.	4. 巻 18(3)
2. 論文標題 Profiling of Serum Extracellular Vesicles Reveals miRNA-4525 as a Potential Biomarker for Advanced Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics.	6. 最初と最後の頁 253-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20256	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 Hishida S, Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Takai M, Iinuma K, Nakane K, Tsuchiya T, Koie T, Miura Y, Ito M, Mizutani K.	4. 巻 81(9)
2. 論文標題 Proteomic analysis of extracellular vesicles identified PI3K pathway as a potential therapeutic target for cabazitaxel-resistant prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 592-602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.24138	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 Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Horie K, Koie T, Umezawa K, Tsumoto H, Miura Y, Katagiri Y, Miyazaki T, Ohsawa I, Mizutani K, Ito M.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94603-9	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 Taku Kato, Kosuke Mizutani, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Hidetoshi Ehara, Masafumi Ito	4. 巻 6(7)
2. 論文標題 CD44v8-10 mRNA contained in serum exosomes as a diagnostic marker for docetaxel resistance in prostate cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e04138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e04138	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 Kengo Horie, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Yoko Matsuda, Tomio Arai, Natsuko Suzui, Tatsuhiro Miyazaki, Takuya Koie, Kosuke Mizutani, Masafumi Ito	4. 巻 98(10)
2. 論文標題 Serum Exosomal Gamma-Glutamyltransferase Activity Increased in Patients with Renal Cell Carcinoma with Advanced Clinicopathological Features	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 734-742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508688	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 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kawakami, K., EDO, N., Morita, K., Ishikawa, T., Onose, H., Fukumori, T., Tsumoto, H., Umezawa, K., Miura, Y., Fujita, Y., Ohsawa, I., Ito, M.
2. 発表標題 Proteomic analysis of serum extracellular vesicles derived from follicular thyroid cancer patients
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上 恭司郎, 藤田 泰典, 加藤 卓, 堀江 憲吾, 古家 琢也, 梅澤 啓太郎, 津元 裕樹, 三浦 ゆり, 片桐 恭雄, 宮崎 龍彦, 大澤 郁朗, 水谷 晃輔, 伊藤 雅史
2. 発表標題 前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を発現する細胞外小胞の測定系構築と前立腺および腎がんの診断における臨床的有用性
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 水谷晃輔、菱田勢始、川上恭司郎、藤田泰典、加藤卓、高井学、飯沼光司、中根慶太、土屋朋大、三浦ゆり、伊藤雅史、古家卓也
2. 発表標題 細胞外小胞のプロテオーム解析によるカバジタキセル耐性因子の解明
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プロテオーム 研究チーム紹介 東京都健康長寿医療センター研究所 <a href="https://www.tmgig.jp/research/team/roukakikou/proteome/">https://www.tmgig.jp/research/team/roukakikou/proteome/</a> 老化機構研究チーム プロテオーム研究 <a href="https://tmig-proteome.org/">https://tmig-proteome.org/</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

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