

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17638

研究課題名（和文）細胞外分泌小胞による摂食メカニズムの解析と新規治療法開発

研究課題名（英文）Analysis of feeding mechanisms regulated by exosomes and development of novel therapeutic approaches

研究代表者

濱本 明恵（Hamamoto, Akie）

広島大学・統合生命科学研究科（総）・研究員

研究者番号：60784197

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）：エクソソームはほとんどの細胞から分泌される極めて小さな（50-150 nm）膜小胞であり、細胞外情報伝達を行う。摂食亢進作用を有するメラニン凝集ホルモン受容体1（MCHR1）がエクソソームに存在し、細胞外に分泌されることを見出した。しかし、他細胞に取り込まれたMCHR1は細胞内シグナルをほとんど生じず、不要なMCHR1を細胞外に排出する可能性が示唆された。さらに、エクソソームに発現するためにはMCHR1が糖鎖付加されること、エクソソームに存在するMCHR1はインターナリゼーション後に移行したものであること、MCHR1の細胞内C末端領域がエクソソーム発現に重要なことが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役型受容体（GPCR）は生きるための様々な生理機能において必須の役割を果たしている。これまでごく一部のGPCRがエクソソームに存在することが報告されているが、エクソソームに存在するGPCRの発現や機能を解析した報告は極めて少なく、現在、GPCR研究においてエクソソームの重要性は全くと言っていいほど考慮されていない。しかし今回、摂食制御に関与するMCHR1がエクソソームに発現すること、これにより不要なMCHR1が細胞外に排出することで摂食行動を制御する可能性を見出した。本研究により、エクソソームによるGPCR送達機構が解明され、摂食行動の新規メカニズム解明が期待される。

研究成果の概要（英文）：Exosomes are extremely small (50-150 nm) membrane vesicles secreted by most mammalian cells that carry extracellular information. We discovered melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) is present in exosomes, which are secreted outside the cells. However, MCHR1 taken into other cells was found to produce little intracellular signaling, suggesting a potential role in excreting unnecessary MCHR1 from the cells. Furthermore, it was found that: (1) MCHR1 requires glycosylation for expression in exosomes, (2) the MCHR1 present in exosomes is transferred after internalization, and (3) the intracellular C-terminal region of MCHR1 is crucial for exosomal expression. This study elucidates the receptor delivery mechanism by exosomes and holds promise for understanding the physiological functions of receptor-containing exosomes.

研究分野：生化学

キーワード：エクソソーム Gタンパク質共役型受容体 メラニン凝集ホルモン受容体1 摂食

1. 研究開始当初の背景

肥満は様々な疾患の重大リスクとなる現代病であるが、代謝系の異常のみならずうつ病などの精神疾患とも高い相関が知られている。摂食行動は細胞膜上に発現する G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の活性化が起点となる。GPCR は細胞膜貫通型のタンパク質であり、摂食行動以外にも生物の感覚である光・匂い・味のセンサーをはじめ生きるための様々な生理機能において必須の役割を果たしている。GPCR は細胞外ドメインでリガンドが結合すると立体構造が変化し、細胞内で G タンパク質と共役することで情報を伝達する。現在使用されている薬剤の約 30% が GPCR を標的としており、治験状況から見ても GPCR は今後も引き続き創薬標的となることが予想される。

ここ最近、非常に注目を浴びている物質としてエクソソームが挙げられる。エクソソームとはエンドソーム (細胞外からの分子を取り込んだ細胞膜小胞) に由来し、最終的に細胞外へと放出される膜結合性の極めて小さい (50-150 nm) 小胞である。エクソソームにはタンパク質、シグナル分子、核酸など様々な物質が含まれており、放出されたエクソソームは異なる細胞に取り込まれることで細胞間の情報伝達を行う。またエクソソームはガンの転移をはじめとした疾患との密接な関係が報告されている。エクソソーム内に GPCR が存在することが報告されているが、現在ごく一部の GPCR しか機能が解明されていない。しかし興味深いことに、血圧を制御するアンギオテンシン II 受容体や免疫に関与するスフィンゴシン 1 リン酸受容体がエクソソーム内に存在し、機能的に働くことが報告された。そこで、摂食関連 GPCR もエクソソームに存在し、発現や機能に影響する可能性が十分考えられる。すなわちエクソソームを介した GPCR 制御機構を解析することで、摂食の新規メカニズムが明らかになることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は GPCR とエクソソームというこれまで関係性がほぼ考慮されてこなかった両者の相関関係に注目し、これまで明示されてないエクソソームを介した GPCR の制御機構の解明を目指すものである。その中でも今回は摂食関連 GPCR に焦点を当て、エクソソームに摂食関連 GPCR が存在するかどうかを網羅的に探索して GPCR を同定し、発現や細胞内シグナルに対する機能を明らかにする。次に、*in vivo* においても同様にエクソソーム内に摂食関連 GPCR が存在するか解析し、生理作用に及ぼす影響を調べる。最終的には摂食関連 GPCR 含有エクソソームを薬物輸送システムのように活用した肥満や摂食障害などの新規治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

①エクソソームに含まれる摂食関連 GPCR の同定

哺乳類培養細胞に摂食関連 GPCR をそれぞれ遺伝子導入し、安定発現細胞株を作製した。各 GPCR 安定発現細胞を無血清培地に交換して 4 時間培養した後、培地を回収した。回収した培地は 100 kDa の限界ろ過スピニングにより濃縮し、アフィニティー精製キットを使用してエクソソームを精製した。回収したエクソソームに摂食関連 GPCR がタンパク質または mRNA として発現しているかどうかをウェスタンブロット法 (WB 法) および逆転写 PCR (RT-PCR) 法により解析した。次に、リガンド添加によりエクソソーム放出量が増加するかを WB 法により解析した。また、エクソソームに存在する GPCR の共通点 (配列等) を調べた。

②エクソソームにおける摂食関連 GPCR の機能解析

GPCR 含有エクソソームをヒト胎児由来腎臓 (HEK293T) 細胞に添加し、受取側細胞における GPCR の発現を細胞免疫染色法により観察した。また、この細胞にリガンドを添加し、細胞内シグナル (Ca^{2+} 応答性 NF-AT ルシフェラーゼレポーターアッセイ、ERK 活性等) への影響を調べた。次に、糖鎖付加阻害剤や糖鎖付加欠損変異体により GPCR のエクソソームにおける発現が変化するかを解析した。さらに、GPCR がエクソソームに局在するためのメカニズムを解析した。β アレスチン阻害剤等を用いて細胞内移行 (インターナリゼーション) が抑制された場合、エクソソーム放出に影響が生じるか調べた。

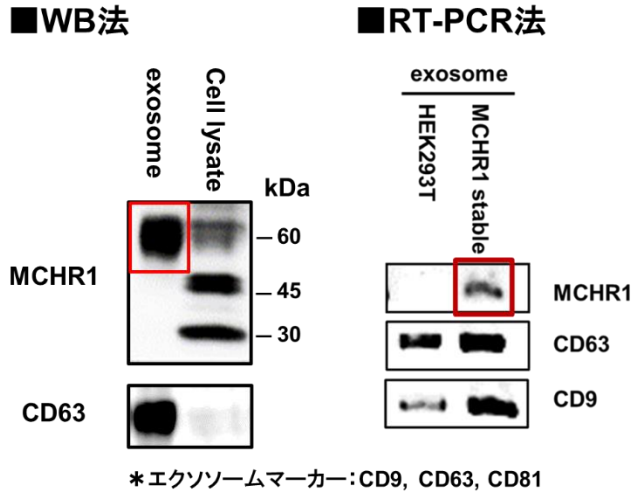
③マウス血漿中エクソソームにおける摂食関連 GPCR の同定

マウスから血液を採取し、血漿を精製した後アフィニティー精製キットを用いて血中のエクソソームを回収した。WB 法および RT-PCR 法を行うことで、①で同定した摂食関連 GPCR が *in vivo* で実際に発現しているかどうかを解析した。

4. 研究成果

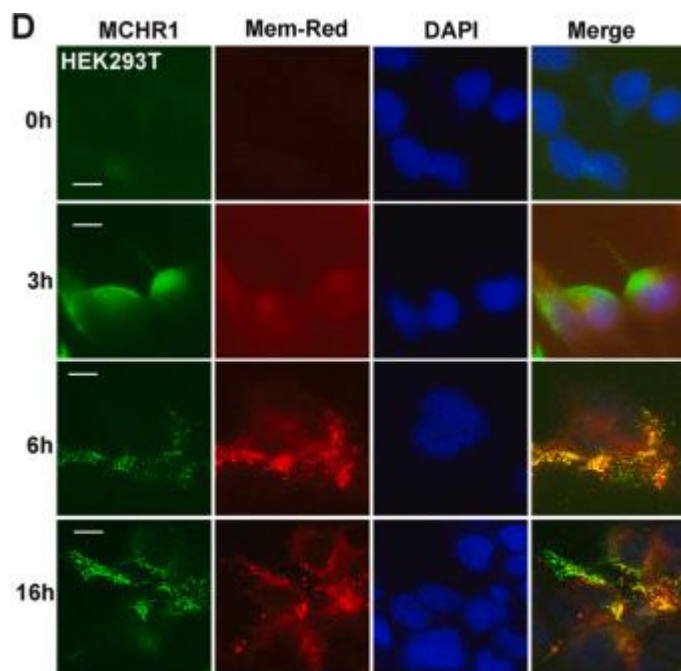
①エクソソームに含まれる摂食関連 GPCR の同定

各GPCR安定発現細胞株由来のエクソソームを精製した後、WB法及びRT-PCR法によってGPCRの発現を解析した。その結果、摂食亢進作用を有するメラニン凝集ホルモン受容体(MCHR1)がエクソソームにタンパク質およびmRNAとして存在することを初めて見出した(右図)。興味深いことに、エクソソームに発現するMCHR1は糖鎖付加された高分子量のもののみが検出された。一方、グレリン受容体やソマトスタチン受容体3型、メラノコルチン受容体4型、アディポネクチン受容体などはエクソソームに存在しないことが判明した。次に、エクソソーム放出におけるリガンド添加の影響を解析したところ、全てのGPCR安定発現細胞において、リガンド添加によりエクソソーム放出量が著しく増加した。特にMCHR1安定発現細胞では、エクソソーム放出量の増加に伴い、そこに含まれるMCHR1の発現量も大きく増加した。また、エクソソームに発現するGPCRと発現しないGPCR間でアミノ酸配列を比較した所、細胞内C末端領域がGPCRのエクソソーム発現に関与する可能性が示唆された。

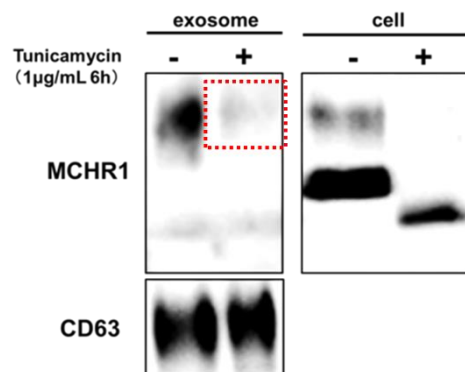


②エクソソームにおける摂食関連 GPCR の機能解析

MCHR1含有エクソソームをHEK293T細胞に添加し、細胞免疫染色を行った。その結果、受取側の細胞においてMCHR1は細胞質内で小胞状のスポットとして検出され、細胞膜上にはあまり存在しなかった(右図)。この細胞を用いて、Ca²⁺応答性NF-ATルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、リガンドMCHを添加しても活性に優位差は認められなかった。この時、MCHR1発現・機能が非常に低かったため、条件検討を行ったところ、共培養により比較的安定したMCHR1発現が観察された。しかし、NF-ATルシフェラーゼレポーターアッセイにより細胞内シグナルが若干増加したが、通常時(膜発現細胞)と比べると活性は非常に低かった。従って、MCHR1がエクソソームを介して細胞外に分泌されることで、MCHR1シグナル伝達を終結させる可能性が考えられる。



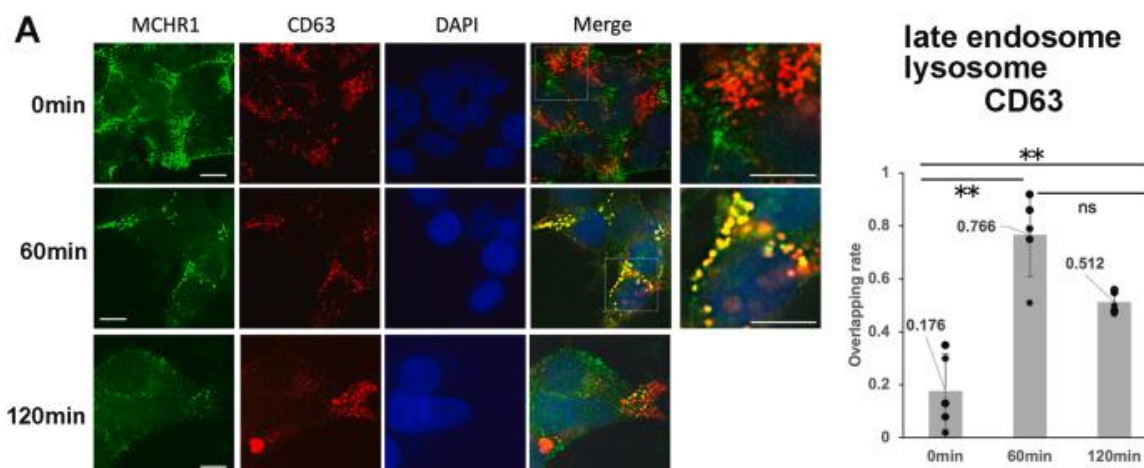
次に、糖鎖付加がMCHR1のエクソソーム発現に重要なことが示唆されたことから、糖鎖付加阻害剤ツニカマイシンをMCHR1安定発現細胞に添加し、エクソソームを精製した。その結果、エクソソーム放出量はツニカマイシンを添加しても変化しないにもかかわらず、エクソソーム内におけるMCHR1の発現量が著しく低下した(右図)。さらに、糖鎖付加抑制型変異体(N13A/N16A/N23A)の安定発現細胞を作製したところ、エクソソームにおけるMCHR1発現が消失し、MCHR1がエクソソームに発現するためには糖鎖付加が重要であることを確認した。



さらに、エクソソームに存在するMCHR1は、細胞膜からインターナリゼーションしたものか、小胞体から新しく合成されて移行したものかを調べた。MCHR1はβアレスチン2と相互作用することでインターナリゼーションを生じることから、βアレスチン2ドミナントネガティブ変異

体を用いてインターナリゼーションを阻害し、MCHR1 のエクソソーム発現への影響を調べた。その結果、エクソソームに存在する MCHR1 が著しく低下し、エクソソーム内の MCHR1 は細胞膜上に発現したものが細胞内へインターナリゼーションした後にエクソソームに輸送されることが分かった。

そこで、各種エンドサイトーシスマーカーを用いて細胞免疫染色を行うことで、MCHR1 のインターナリゼーションの挙動を詳細に解析した。その結果、MCHR1 は時間経過により初期エンドソーム (Rab5)、後期エンドソーム (Rab7) に移行した後、一部はリサイクルエンドソーム (Rab11) に移行した。しかし、リソソーム (LAMP1) にはほとんど移行せず、エクソソームマーカーである CD63 と高い割合で共局在することが分かった (下図)。



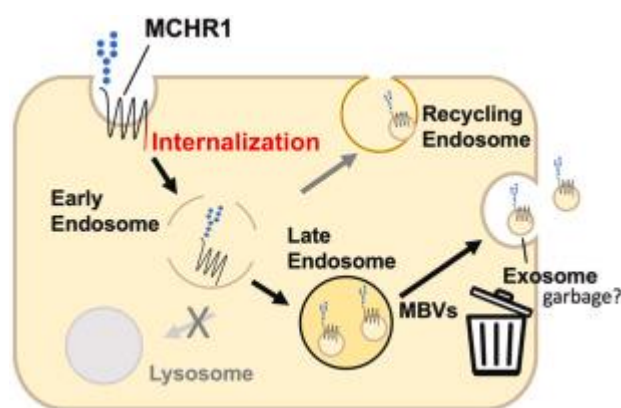
さらに、エクソソーム発現に重要な MCHR1 の部位を調べるため、細胞内 C 末端領域を除去した F318stop 変異体を作製したところ、細胞内シグナルを保持しているにもかかわらず、MCHR1 のエクソソームにおける発現が完全に消失した。従って、細胞内 C 末端領域が MCHR1 のエクソソーム発現に重要なことが判明した。

③マウス血漿中エクソソームにおける摂食関連 GPCR の同定

マウスから血液を採取し、血漿を精製して血中エクソソームを回収し、WB 法および RT-PCR 法を行ったが、MCHR1 の発現は認められなかった。MCHR1 含有エクソソーム発現量が低い可能性が考えられるため、絶食により脳内 MCH を増加させ、回収した血漿を濃縮して再度実験を行う予定である。

(結論)

本研究でエクソソームに発現する摂食関連 GPCR を探索したところ、MCHR1 がエクソソームに存在し、細胞外に分泌されることを初めて見出した。しかし、他の細胞に取り込まれた MCHR1 は細胞内シグナルをほとんど生じず、この現象は不要な MCHR1 を細胞外に排出するために生じた可能性が示唆された。さらに、①エクソソームに発現するためには MCHR1 が糖鎖付加されること、②エクソソームに存在する MCHR1 はインターナリゼーション後に移行したものであること、③MCHR1 の細胞内 C 末端領域がエクソソーム発現に重要なことが分かった。今後は vivo における摂食関連 GPCR の発現を引き続き調べる予定である。



本研究により、エクソソームによる GPCR の送達機構が解明され、GPCR 含有エクソソームの生理機能解明が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yuto Hasegawa, Masanari Motoyama, Akie Hamamoto, Shintaro Kimura, Yuji O Kamatari, Hiroaki Kamishina, Kentaro Oh-Hashi, Kyoji Furuta, Yoko Hirata	4. 巻 13
2. 論文標題 Identification of Novel Oxindole Compounds That Suppress ER Stress-Induced Cell Death as Chemical Chaperones	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Chem Neurosci.	6. 最初と最後の頁 1055-1064
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acchemneuro.2c00064.	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 Takahashi M, Hamamoto A, Oh-Hashi K, Takemori H, Furuta K, Hirata Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Antiferroptotic Activities of Oxindole GIF-0726-r Derivatives: Involvement of Ferrous Iron Coordination and Free-Radical Scavenging Capacities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Chem Neurosci.	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） 10.1021/acchemneuro.3c00042.	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 Ryohei Yamada, Momoka Michimae, Akie Hamamoto, Hiroshi Takemori	4. 巻 710
2. 論文標題 Melanin-concentrating hormone receptor 1 is discarded by exosomes after internalization	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 149917
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2024.149917.	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11件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 濱本明恵、斎藤祐見子、徳永優希、小林勇喜
2. 発表標題 一次繊毛におけるドーパミン受容体5のシグナル依存的排出
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 斎藤祐見子、濱本明恵、小林勇喜
2. 発表標題 一次繊毛長は繊毛におけるシグナル受容能を調節する
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋凜太郎、濱本明恵、斎藤祐見子、小林勇喜
2. 発表標題 拘束ストレスにより誘導したうつ様表現型を示すマウスの脳内一次繊毛解析
3. 学会等名 日本動物学会 第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 濱本明恵、斎藤祐見子、小林勇喜
2. 発表標題 細胞外小胞エクソソームに発現するGPCRの機能解析
3. 学会等名 令和5年度日本動物学会中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 高橋凜太郎、濱本明恵、斎藤祐見子、小林勇喜
2. 発表標題 拘束ストレス負荷に伴うマウスの1次繊毛動態と情動行動の変化
3. 学会等名 令和5年度日本動物学会中国四国支部広島県例会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 山田凌平、道前桃花、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 エクソソームおけるGPCRの発現及び機能解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akie Hamamoto , Masumi Hayazaki , Osamu Hatano , Hiroshi Takemori
2. 発表標題 Zebrafish could be useful as animal models to evaluate chemical-induced leukoderma.
3. 学会等名 第31回日本色素細胞学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道前桃花、山田凌平、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 エクソソームを介したメラニン凝集ホルモン受容体(MCHR1)のシグナル伝達
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 道前桃花、山田凌平、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 エクソソームによるGタンパク質共役型受容体(GPCR)の伝達機構
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田凌平、道前桃花、竹森洋、濱本明恵
2. 発表標題 エクソソームにおける摂食関連GPCRの発現と機能
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 濱本明恵
2. 発表標題 摂食関連受容体と細胞から分泌されるナノ粒子
3. 学会等名 SPIRITS生物-無機-有機融合化学セミナー
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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