

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19465

研究課題名（和文）末梢血からの中枢神経由来exosome精製方法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a method for purification of CNS-derived exosomes from peripheral blood

研究代表者

岩田 淳（Iwata, Atsushi）

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：40401038

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：Liquid Biopsyは疾患診断の為に極めて有用な方法だが、中枢神経疾患では脳脊髄液の採取が必須となり、末梢血でのliquid biopsyは困難である。本研究では、末梢血での信頼性の高い中枢神経細胞由来exosomeマーカーを確立することを目的とした。1) 中枢神経細胞特異的に蛍光標識tetraspaninを発現するマウスを作製した。2) 中枢神経細胞由来のexosome特異的なマーカーを確立した。3) 2)によって得られた中枢神経細胞特異的exosomeマーカーを利用して末梢血より神経細胞由来のexosomeを精製する方法を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経疾患は生前において病理学的な確定診断を得ることがほぼ不可能であり、末梢血liquid biopsyによるバイオマーカー診断が重要な役割を果たすポテンシャルを有する。Exosomeは異なる細胞間の情報伝達に重要で、由来する細胞の情報を保有することから、癌においては発症や転移のマーカーとして注目されている。神経においてもExosomeが病態において重要であるとする報告はあるものの、現在提唱されている中枢神経由来のexosomeマーカーの信頼性は著しく低い。本研究では、信頼性の高い中枢神経細胞由来exosomeマーカーを確立できた。

研究成果の概要（英文）：Liquid biopsy is an extremely useful method for disease diagnosis; however, it is difficult to perform liquid biopsy in peripheral blood because cerebrospinal fluid must be collected for CNS diseases. In this study, we aimed to establish a reliable CNS-derived exosome marker in peripheral blood. 1) We generated mice expressing fluorescently labeled tetraspanin specifically in CNS. 2) We established a CNS-derived exosome-specific marker. 3) We established a method to purify the exosomes derived from neurons from peripheral blood using the CNS-specific exosome marker obtained by 2).

研究分野：神経内科学

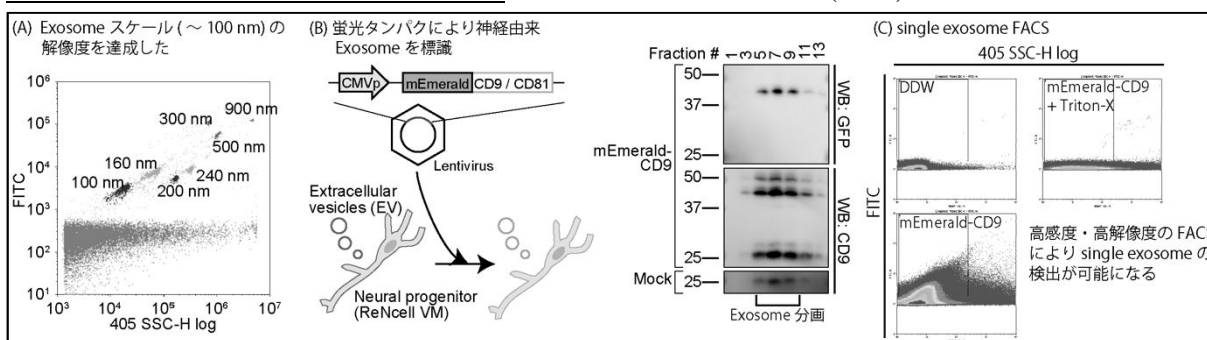
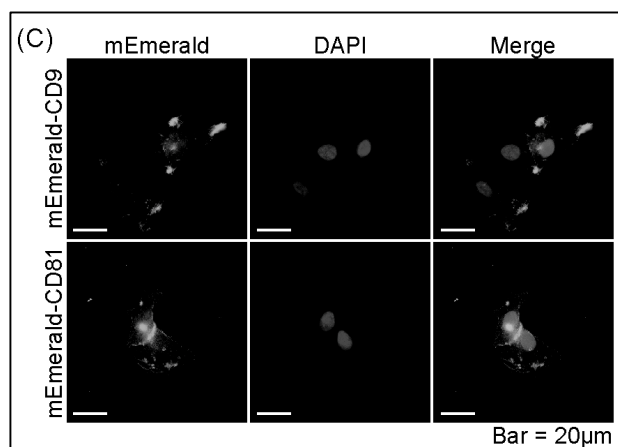
キーワード：liquid biopsy exosome

【本研究の目的】 中枢神経疾患は生前において病理学的な確定診断を得ることがほぼ不可能であり、末梢血 liquid biopsy によるバイオマーカー診断が重要な役割を果たすポテンシャルを有する。Exosome は異なる細胞間の情報伝達に重要で、由来する細胞の情報を保有することから、癌においては発症や転移のマーカーとして注目されている。神経においても Exosome が病態において重要であるとする報告はあるものの、現在提唱されている中枢神経由来の exosome マーカーの信頼性は著しく低い。本研究では 信頼性の高い中枢神経細胞由来 exosome マーカーを確立することを目的とする。

【その研究目的を達成するための研究方法】

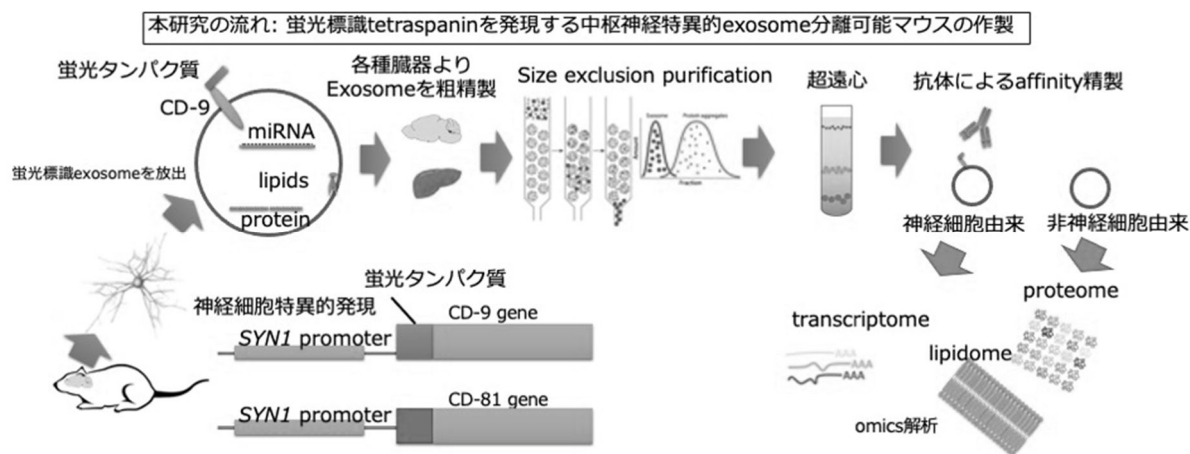
- 1) 中枢神経細胞特異的に蛍光標識 tetraspanin を発現するマウスを作製する
- 2) 中枢神経細胞由来の exosome 特異的なマーカーを確立する
- 3) 2)によって得られた中枢神経細胞特異的 exosome マーカーを利用して末梢血より神経細胞由来の exosome を精製する方法を確立する

真の中枢神経細胞由来 exosome の特異的なマーカーを確立するため、本研究では中枢神経細胞由来の exosome に特異的なタグ標識を行った後に omics 解析を行うことでその本質的な特徴を明らかにする事を目的とする。申請者の研究室では右に示すように神経前駆細胞 ReNcell に蛍光標識した exosome マーカーであるテトラスパニン CD-8 及び CD-81 を発現させ、安定発現株を作成することで放出される exosome を蛍光標識する事に成功している。この細胞系を使用する事で、培養上清中の exosome をフローサイトメーターを用いることで感度良く定量性をもって検出する事にも成功している(下図)。



この技術を応用し、*SYN1* プロモーター下において蛍光標識テトラスパニンを発現する事で、マウスの脳由来 exosome のみを蛍光標識する事が可能である。その結果末梢血中に脳由来の exosome がどの程度存在するか、又どのような条件下で増減が見られるのかの定量が可能となる。次に、マウスの脳や他の臓器(肝臓を想定)より exosome を抽出し、蛍光標識された exosome の割合をフローサイトメーターによって検討する。さらに抗蛍光タンパク質抗体を用いたアフィニティ精製を行い、蛍光タンパク質陽性(脳由来であれば神経細胞由来)、陰性の exosome(末梢組織由来であれば末梢細胞由来)を精製する。それらにおいて RNA(mcRNA ncRNA などの網羅的解析を次世代シーケンサーを用い

て、またタンパク質や脂質の網羅的解析を質量分析器によって行うことで神経細胞由来の exosome に特異的なマーカーをスクリーニングする。この結果、中枢神経細胞 exosome 表面マーカーが確認できれば、それに対する抗体を用いたアフィニティ精製を組み合わせることで末梢血からの真の意味での神経細胞由来 exosome 精製が可能となる。以下に概要を示す。



1. 研究開始当初の背景

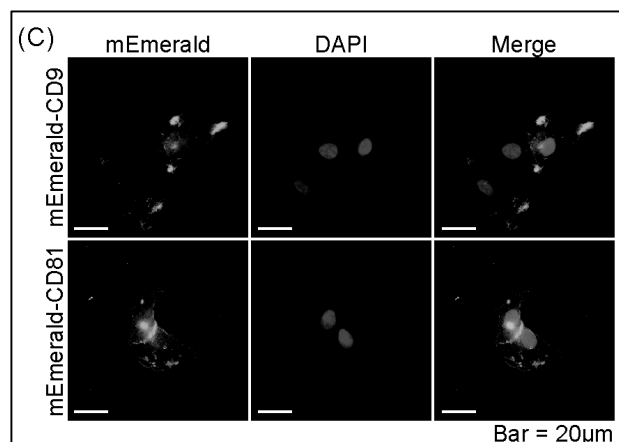
中枢神経疾患は生前において病理学的な確定診断を得ることがほぼ不可能であり、末梢血 liquid biopsy によるバイオマーカー診断が重要な役割を果たすポテンシャルを有する。Exosome は異なる細胞間の情報伝達に重要で、由来する細胞の情報を保有することから、癌においては発症や転移のマーカーとして注目されていた。中枢神経疾患でも liquid biopsy は有効な診断手段となるが、血液脳関門の問題があり、末梢血において中枢神経由来 exosome の liquid biopsy を行う事は困難とされている。

2. 研究の目的

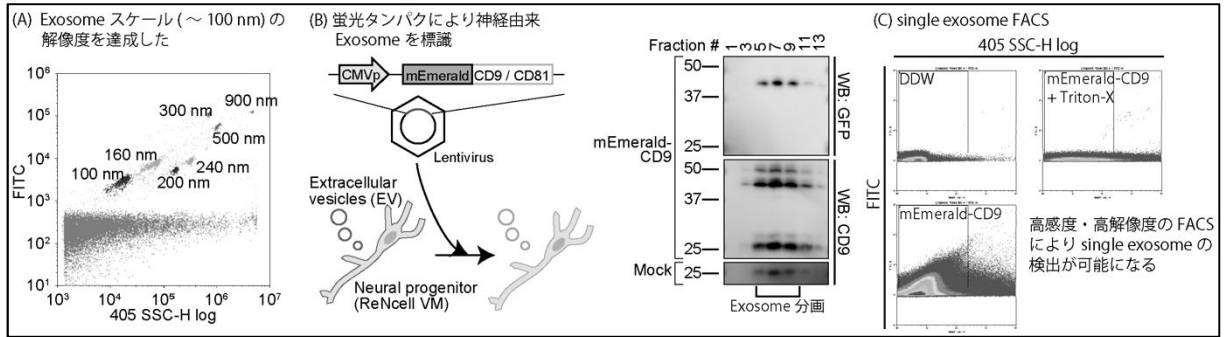
神経においても Exosome が病態において重要であるとする報告はあるものの、現在提唱されている中枢神経由来の exosome マーカーの信頼性は著しく低い。本研究では、信頼性の高い中枢神経細胞由来 exosome マーカーを確立することを目的とした。

3. 研究の方法

真の中枢神経細胞由来 exosome の特異的なマーカーを確立するため、本研究では中枢神経細胞由来の exosome に特異的なタグ標識を行った後に omics 解析を行うことでその本質的な特徴を明らかにする事を目的とした。申請者の研究室では右に示すように神経前駆細胞 ReNcell に蛍光標識した exosome マーカーであるテトラスパニン CD-8 及び CD-81 を発現させ、安定発現株を作成することで放出される exosome を蛍光標識する事に成功していた。この細胞系を使用する事で、培養上清中の exosome をフローサイトメーターを用い



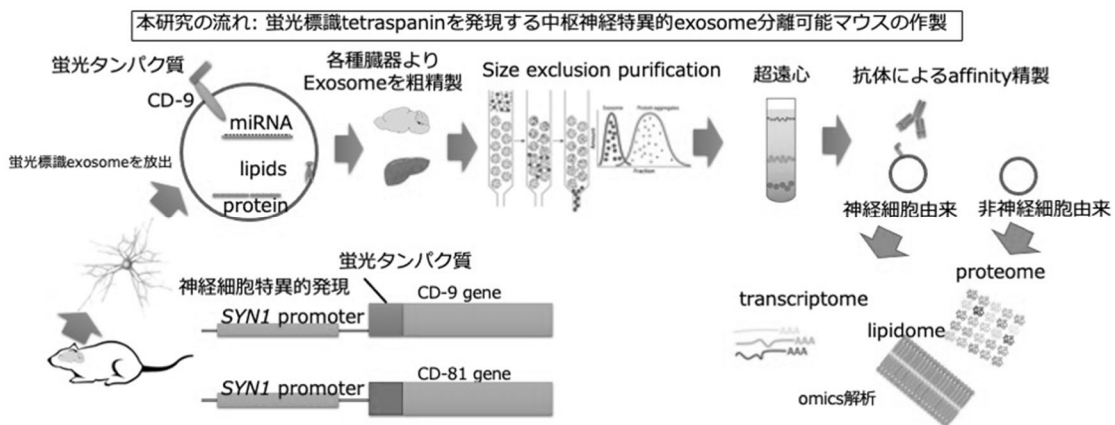
ることで感度良く定量性をもって検出する事にも成功していた(下図)。



この技術を応用し, *SYN1* プロモーター下において蛍光標識テトラスパンインを発現する事で, マウスの脳由来 exosome のみを蛍光標識する事が可能であると考えた. その結果末梢血中に脳由来の exosome がどの程度存在するか, 又どのような条件下で増減が見られるのかの定量が可能となる. 次に, マウスの脳や他の臓器(肝臓を想定)より exosome を抽出し, 蛍光標識された exosome の割合をフローサイトメーターによって検討した.

4. 研究成果

さらに抗蛍光タンパク質抗体を用いたアフィニティ精製を行い, 蛍光タンパク質陽性(脳由来であれば神経細胞由来), 陰性の exosome(末梢組織由来であれば末梢細胞由来)を精製する. それらにおいて RNA(miRNA ncRNA など)の網羅的解析を次世代シーケンサーを用いて, またタンパク質や脂質の網羅的解析を質量分析器によって行うことで神経細胞由来の exosome に特異的なマーカーをスクリーニングした. この結果, 中枢神経細胞 exosome 表面マーカーが確認できれば, それに対する抗体を用いたアフィニティ精製を組み合わせることで末梢血からの **真の意味での神経細胞由来 exosome 精製が可能** となった.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------