

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20903

研究課題名（和文）アストロサイト由来のエクソソーム分離方法の確立とリキッドバイオプシーとしての応用

研究課題名（英文）Establishment of an exosome separation method derived from astrocytes and its application as a liquid biopsy

研究代表者

丸谷 典子（Marutani, Noriko）

大阪大学・キャンパスライフ健康支援・相談センター・招へい研究員

研究者番号：10909815

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：精神神経疾患のバイオマーカーを確立するために、脳を直接バイオプシーすることは難しい。そのため、代替の方法が必要である。様々な細胞は、血液や他の体液中にエクソソームと呼ばれる小さな構造物を放出していて、脳のアストロサイトも同様である。したがって、血液中に存在するアストロサイト由来のエクソソームを分析することで、「リキッドバイオプシー」と呼ばれる手法を用いて、新たな精神神経疾患のバイオマーカーを見つけることができる。この研究では、特定のアストロサイトの膜蛋白をターゲットにし、免疫沈降法という手法を用いて、血漿中のアストロサイト由来のエクソソームを分離する方法を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精神神経疾患の診断には確かなバイオマーカーが少なく、問診だけでは正確ではない。その理由の一つは、脳を直接バイオプシーすることが難しいからである。そこで、脳のアストロサイトが血液中に放出する微小な構造物であるエクソソームを分離し、リキッドバイオプシーと呼ばれる方法を確立することで、精神神経疾患の効果的なバイオマーカーを見つけることができる。これは、精神医療において大きな貢献となる。

研究成果の概要（英文）：In order to establish biomarkers for mental and neurological disorders, it is difficult to directly biopsy the brain. Therefore, alternative methods are necessary. Various cells release small structures called exosomes into the blood and other bodily fluids, including astrocytes in the brain. Thus, by analyzing astrocyte-derived exosomes in the blood, a technique known as "liquid biopsy," it is possible to discover new biomarkers for mental and neurological disorders. In this study, we targeted specific membrane proteins of astrocytes and investigated a method for separating astrocyte-derived exosomes in the plasma using an immunoprecipitation technique.

研究分野：精神医学

キーワード：アストロサイト エクソソーム リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

- (1) 精神神経疾患の診断には確かなバイオマーカーが少なく、問診だけでは正確ではない。その理由の一つは、脳を直接バイオプシーすることが難しいからである。そのような中、脳病理の比較的明らかなアルツハイマー型認知症においてはアミロイドPETや脳脊髄液検査などがバイオマーカーとして臨床の現場で使われつつあるが、費用性や侵襲性の問題が指摘されている。やはり、安価で比較的侵襲のない血液検査による精神神経疾患のバイオマーカーの確立が待たれる。
- (2) 様々な細胞は、血液や他の体液中にエクソソームと呼ばれる小さな構造物を放出していて、その内容物は親細胞を反映しているとされている。血液中の脳神経細胞由来のエクソソームを分離できれば、脳のバイオプシーの代わりに「リキッドバイオプシー」が可能と考えられる。申請者らは神経細胞膜の特異蛋白であるAPLP1をターゲットとして免疫沈降法を用いることで血液中の神経由来エクソソームの分離に成功しており、新たなアルツハイマー病のバイオマーカーの確立を行っている。本研究はその理論と技術を応用して血液中のアストロサイト由来エクソソームの分離技術の開発を行った。

2. 研究の目的

アストロサイト膜特異的な蛋白に対する抗体を用いて血漿中のアストロサイト由来エクソソームの分離方法の確立を行い、新たなリキッドバイオプシー法を確立する。

3. 研究の方法

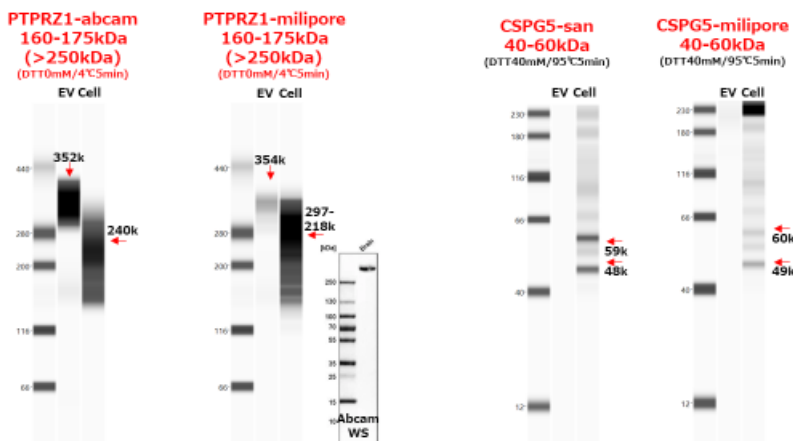
- (1) アストロサイトのプライマリーカルチャー細胞の培養液からサイズ排除クロマトグラフィーによりエクソソームを分離する（アストロサイト由来エクソソーム）。文献的にアストロサイト特異的膜蛋白を選出し、アストロサイト由来エクソソーム標品を用いてウエスタンブロットで検討した。
- (2) 上記のアストロサイト由来エクソソーム標品をLC/MSを用いたショットガン解析により膜蛋白探索を行った。

4. 研究成果

文献的にアストロサイト膜特異的蛋白として、プロテインチロシンホスファターゼゼータ1 (PTPRZ1)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン5 (CSPG5)、グルタミン酸トランスポーター1 (SLC1A3)、グリアマグネシウム輸送体6A (GPM6A)、およびトリトラック輸送タンパク質ホモログ1 (TTYH1) に注目して市販抗体によるウエスタンブロット解析を行った。PTPRZ1、TTYH1、SLC1A3のアストロサイト由来エクソソームに発言していることが確認された(図1、2、3、表1)。すなわち、PTPRZ1、TTYH1、SLC1A3などをターゲットとしてアストロサイト由来エクソソームを分離できることが示された。今後は、上記の3分子のうち血漿からアストロサイト由来エクソソームを分離するのに適した分子を選定し、アルツハイマー病患者の血液に応用予定である。

**図1：アストロサイト由来エクソソームマーカーの解析**

- PTPRZ1 :  
二つの抗体で同じようなバンドを検出、特にAbcam社抗体で強く検出できた
- CSPG5 :  
Cell lysateで問題なく検出できたが、EVでは発現が確認できなかった



## 図 2 : アストロサイト由来エクソソームマーカの解析

2

### ■ SLC1A3

- ・ミルテニー抗体ではDTT処理(4℃)でEV, Cellどちらもバンドを確認(ややバンドサイズが異なるため、確認が必要)
- ・CST社抗体ではCell lysateのみ検出
- ・ミリポア社抗体は性質が低い



## 図 3 : アストロサイト由来エクソソームマーカの解析

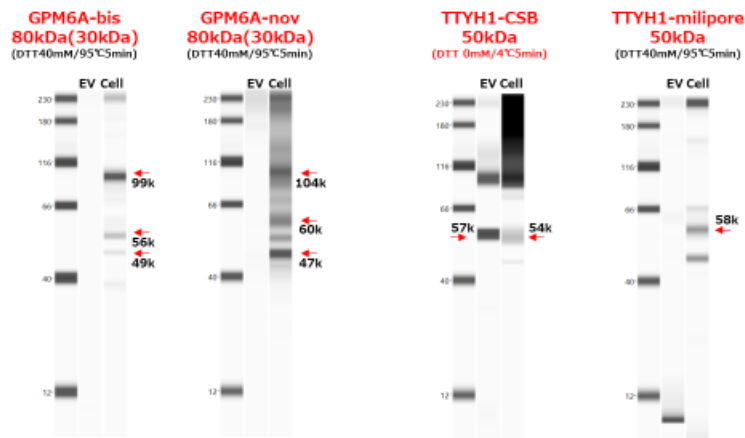
3

### ■ GPM6A

- ・Bis(Bioss)社抗体は比較的特異的にGPM6Aを検出できそうだったが、EVで検出されなかった
- ・Nov(Novus)社抗体は非特異が多いため、Bis抗体の方が良いと考える

### ■ TTYH1

- ・CSB(cusabio)社抗体は特異的で、ミリポア社抗体でも検出できた60kDa弱のバンドを確認できた
- ・非還元条件にてEVでの発現も確認できた



## 表 1 : アストロサイト由来エクソソームマーカー

4

### ■結果

Simple Westernでの検出では、PTPRZ1、TTYH1、SLC1A3がAC由来EVサンプルで検出できた  
 その上、PTPRZ1、TTYH1は非還元条件で検出可能であった

表 抗体リスト

マーカー名	会社	品番	ホスト	希釈液	DTT濃度(mM)	反応条件(°C)	抗体評価	EV発現	分子量
PTPRZ1	Abcam	ab126497	Rabbit	Ab2	0	4	○	○	>250kDa(160-175k)
PTPRZ1	MilliporeSigma	HPA015103-25UL	Rabbit	Ab2	0	4	○	○	>250kDa(160-175k)
CSPG5	SANTACRUZ	sc-398051	Mouse	Mf	40	95	○	×	40-60kDa
CSPG5	MilliporeSigma	SAB2100493	Rabbit	Mf	40	95	△	×	40-60kDa
SLC1A3	MilliporeSigma	MABN794	Mouse	Mf	40	95	△	×	60kDa(120k)
SLC1A3	CST	5684S	Rabbit	Ab2/Mf	40	95	○	×	60kDa(120k)
SLC1A3	Miltenyi	130-095-822	Mouse	Ab2	40	4	○	○	60kDa(120k)
(GFAP)	Abcam	ab7260	Rabbit	Ab2	40	95	○	△	50kDa
GPM6A	Novus	NBP1-81799	Rabbit	Mf	40	95	△	×	30kDa(80kDa)
GPM6A	Bioss BIS	bs-10757R	Rabbit	Ab2	40	95	○	×	30kDa(80kDa)
TTYH1	MilliporeSigma	WH0057348M4	Mouse	Ab2	0	4	△	×	50kDa
TTYH1	Cusabio CSB	PA867139LA01HU	Rabbit	Ab2	0	0	○	○	50kDa

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