

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：15501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21219

研究課題名（和文）骨格筋由来エクソソームを介したフレイルによる認知症発症メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of dementia by frailty via skeletal muscle-derived exosomes

研究代表者

富永 直臣（Tominaga, Naomi）

山口大学・大学院医学系研究科・助教（テニュアトラック）

研究者番号：90891507

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）：フレイルによって認知症発症リスクがあることが示唆されているもののそのメカニズムは不明なままである。本研究では、エクソソームを中心とした臓器間コミュニケーションに注目し、フレイルによる認知症発症メカニズムの解明を目指す。本研究では、若齢・老齢マウス骨格筋から筋芽細胞を単離し、初代培養を樹立した。培養した筋芽細胞から筋繊維に分化させた後、エクソソームの回収法も樹立した。分離・濃縮したエクソソームを解析したところ、1粒子当りのタンパク質濃度に差が見られ、糖鎖修飾にも違いがあることを明らかにした。本研究は、老化によってエクソソームの性質変化が老化関連疾患に関与していることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、老化によって分泌されるエクソソームの性質が大きく変化していることが明らかとなった。細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たすエクソソームの性質が臓器間連関に大きく影響していると考えられる。本研究から、老化に伴うエクソソームの性質変化が老化関連疾患の解明や老化の新たな診断法の開発に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：Frailty has been suggested to increase the risk of developing dementia, the mechanism remains unclear. In this study, we focused on intra-organ communication coordinated by exosomes and aim to elucidate the mechanism of dementia caused by frailty. In this study, we isolated myoblasts from young and aged mouse skeletal muscle. I established primary cultures of myoblasts. I also established a collecting method of exosomes from myofiber that differentiated from myoblast. The exosomes were investigated. It was found that young and aged mouse derived-exosome have differences in protein concentration per particle, as well as differences in glycosylation. This study suggests that aging-induced alterations in the properties of exosomes are involved in aging-related diseases.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム 骨格筋 老化

## 1. 研究開始当初の背景

エクソソーム (細胞外小胞: Extracellular Vesicles: EVs) は、様々な細胞から分泌される 100nm 程度の小胞で、内部には DNA、マイクロ RNA など様々な分子が内包されている。細胞から分泌されたエクソソームは、細胞に取り込まれ、内包された情報を伝達することで細胞間コミュニケーションに重要な役割を果たしていることが、近年の研究で明らかとなってきた。例えば、がん細胞由来のエクソソームが血液脳関門 (BBB) を破壊することでがんの脳転移を促進することが明らかになっている [1]。この研究での重要な発見は、がん細胞が特異的に持つと思われるメカニズムは、正常細胞が本来持つ能力が増強され発現していると考えられるところにある。エクソソームは、がん、2 型糖尿病、アルツハイマー病など多くの疾患に関わるだけでなく、免疫制御など生理機能にも関与している。さらにエクソソームは、細胞間のみならず臓器間コミュニケーションを通して生体恒常性を維持していると考えられている。このようなエクソソームによる生体恒常性の破綻は、様々な疾患の原因になることが示唆されている。がん、認知症、フレイルなどの疾患は、老化に伴い発症する。つまり、老化は様々な疾患の重要な要因である。しかし、老化の分子・細胞レベルのメカニズムは十分に理解されていない。超高齢社会において、老化による個体機能の低下は、個人の QOL の低下のみならず社会的影響も非常に大きい。エクソソームを中心とした臓器間コミュニケーションダイナミクス理解を通じた、様々な疾患に関与する老化のメカニズム理解は、生物学的にも疾患治療学的にも求められている。

骨格筋は、体重の約 20% を占める大きな組織である。骨格筋は老化に伴って筋力が低下し続けると、フレイルと呼ばれる社会的活動に影響が出る状態に至る。興味深いことに、フレイルによる活動低下や転倒による寝たきりなどのリスクの他に、認知症発症リスクとの関連が示唆されている [2]。アルツハイマー病患者や脳の灰白質萎縮を持つ患者ではフレイルになりやすく、骨格筋と認知機能には強い相互関連があると考えられる [3]。しかし、骨格筋老化に伴って起こるフレイルがどのように認知症発症に寄与しているか明らかになっていない。興味深いことに、血清中のエクソソーム量は運動 [4] や老化 [5] によって変化することが報告されている。また、老化による BBB 破壊と認知症発症に関連があることが示唆されているがメカニズムは依然として不明である [6]。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、骨格筋由来エクソソームに注目し、老化による骨格筋機能低下を起因とするエクソソームの変質とそれが及ぼす認知症発症メカニズムの解明を目指す。最終ゴールは、エクソソームに着目した臓器間コミュニケーションダイナミクス解明を通じて、老化メカニズムを理解し超高齢社会における QOL 改善や創薬に寄与することである。

## 3. 研究の方法

### (1) マウス筋芽細胞初代培養の確立と筋繊維への分化法の確立

C57BL/6 系統のオス・メスマウス、8 - 9 週齢を若齢、14 - 15 か月齢を老齢として用いた。それぞれのマウスから骨格筋を回収し、細かく裁断する。0.2% コラゲナーゼ I - DMEM 溶液に移し、37 °C、1 時間程度振とうを行う。単一細胞になった溶液を、セルストレイナーに通過させる。セルストレイナーを通過させた溶液は、1400xg、10min で遠心する。その後、2% FBS-DMEM に懸濁・遠心し、細胞を回収する。回収した細胞を 20% FBS-DMEM に再懸濁し、マトリゲルコートした培養皿に回収した細胞を播種し、3 日間、37 °C、5% CO<sub>2</sub> で培養を行う。増殖した細胞を新しい培養皿に播種し、2% 馬血清を含む培地で分化誘導し、筋繊維へと分化させた。

### (2) 初代培養筋繊維からのエクソソーム回収

分化した筋繊維を、10mL の PBS (-) で 2 回洗浄する。その後、エクソソーム回収用培地に変更し、2 日間培養する。2 日後、上清を回収し、新しいエクソソーム回収用培地を加え 2 日間培養し、上清を回収する。回収した上清は、2000xg、10 分で遠心後、上清を回収する。さらに、上清を 10000xg、10 分で遠心し、上清を回収する。遠心後の上清は、0.22 μm フィルターを通過させる。処理した上清は、110000xg、70 分で遠心し、エクソソームを濃縮する。濃縮したエクソソームは、VideoDrop による粒子径・粒子数計測、microBCA によるタンパク質濃度測定、電子顕微鏡によるエクソソーム濃縮を確認した。

### (3) レクチンプロット法によるエクソソーム糖鎖修飾の確認

回収したエクソソームは、8 種類のレクチンを用いて、エクソソームの糖鎖修飾を確認した。回収したエクソソームをウェスタンプロットサンプルバッファーに懸濁し、98 °C、5 分で処理する。10% ポリアクリルアミドゲルを用いて泳導し、PVDF 膜に転写した後、レクチンを用いて染色する。

### (4) 組織透明化法の確立

心臓から PBS (-) および 4% パラフォルムアルデヒドで還流し、脳を摘出する。摘出した脳は、

CUBIC-L を用いて脱脂を行った。その後、CD31、SMA に対する抗体及び二次抗体で染色後、CUBIC-R を用いて組織透明化を行った。組織の観察は、光シートレーザー顕微鏡である Ultra Microscop II を用いて撮像し、3D に再構成を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 老齢・若齢マウスの骨格筋から筋芽細胞を単離し、筋繊維に分化させた(図1)。老齢・若齢マウスともに筋繊維へ分化することを確認した。

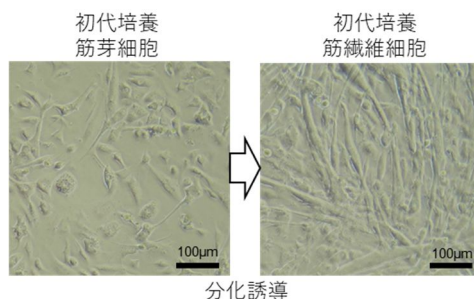


図1 マウス筋芽細胞初代培養と分化誘導による筋線維細胞

(2) 前述の分化させた筋繊維から、超遠心法を用いてエクソソームを単離・濃縮した(図2)。粒子数・粒子径を測定した結果、単位量当たりの違いはなかった。一方、タンパク質濃度を測定すると、老齢マウス由来エクソソームでは1粒子当たりのタンパク質濃度が極端に高いことが明らかとなった。電子顕微鏡による確認において、粒子形状に違いはなかった。

透過型電子顕微鏡によるEVsの観察

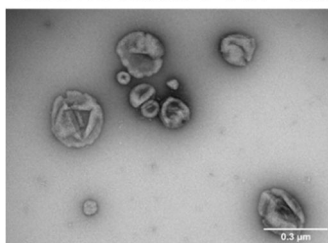


図2 エクソソームの電子顕微鏡像

(3) N型糖鎖修飾を認識するレクチン5種類とO型糖鎖修飾を認識する3種類のレクチンを用いて、エクソソームタンパク質の糖鎖修飾の違いを確認した。その結果、3種類のN型糖鎖修飾を認識するレクチンでバンドパターンに違いがみられた。30kDa付近と55kDa付近のバンドが、老齢で減弱していた。つまり、加齢に伴って特定のタンパク質の糖鎖修飾が失われていることが明らかとなった。今後、このタンパク質の同定を行っていく。

(4) 脳を透明化後、血管マーカーであるCD31、SMAを用いて染色し、Ultra Microscop IIを用いて撮像した。その結果、血管を染色し3次元に再構成した(図3)。今後、エクソソームを染色し、脳内での局在を可視化する技術を確立していく。

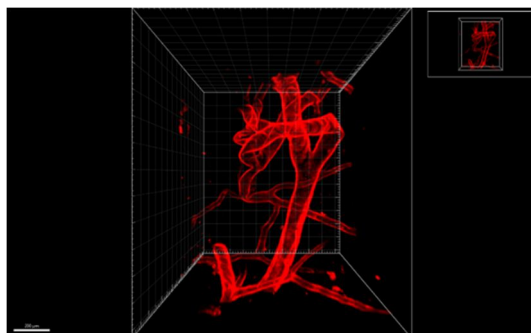


図3 マウス脳透明化技術を用いた脳血管3D再構成像

以上の結果から、加齢により骨格筋から分泌されるエクソソームは性質が大きく変化していることが示唆された。糖鎖修飾は、臓器局在を変化させることが明らかになっている[7]。骨格筋から分泌されたエクソソームが加齢により連関する臓器が変化していることが考えられる。雌雄差はなかった。今後、in vivoにおける臓器間コミュニケーション変化の解明を行っていく。

<引用文献>

- [1] Nat Commun. 2015 Apr 1;6:6716. doi: 10.1038/ncomms7716.
- [2] J Am Med Dir Assoc. 2016 Oct 1;17(10):881-8. doi: 10.1016/j.jamda.2016.05.013.
- [3] Arch Gerontol Geriatr. 2021 Jan-Feb;92:104268. doi: 10.1016/j.archger.2020.104268.
- [4] J Extracell Vesicles. 2015 Jul 2;4:28239. doi: 10.3402/jev.v4.28239. eCollection 2015.
- [5] Sci Rep. 2017 May 2;7(1):1342. doi: 10.1038/s41598-017-01386-z.
- [6] Neuron. 2015 Jan 21;85(2):296-302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032.
- [7] J Extracell Vesicles. 2020 Jan 13;9(1):1713527. doi: 10.1080/20013078.2020.1713527.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Tominaga Naomi	4. 巻 13
2. 論文標題 Anti-Cancer Role and Therapeutic Potential of Extracellular Vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 6303 ~ 6303
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13246303	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 -

〔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
---------	---------