

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440041

研究課題名(和文) アルツハイマー病治療のためのエクソソーム様スフィンゴ糖脂質含有リボソームの創出

研究課題名(英文) Exosome-like synthetic liposomes containing glycosphingolipids for therapy of Alzheimer's disease

研究代表者

湯山 耕平 (Yuyama, Kohei)

北海道大学・先端生命科学研究院・特任准教授

研究者番号：80415546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：神経細胞株由来エクソソームはスフィンゴ糖脂質(GSL)依存的にアミロイドbetaを除去する性質をもつ。マウス脳由来の初代培養細胞が分泌するエクソソームのGSL解析を行なった結果、ニューロン由来エクソソームのGSL含量はグリア由来エクソソームと比較して顕著に高く、シアル酸結合GSLの割合が高いなどの特徴がみられた。このGSL構成を模したリボソームを作製しAbeta除去効率を評価したが、エクソソーム類似の効果は認められなかった。Abeta結合の標的となるGSL集積ドメインの形成は他の脂質の影響も受けることから、エクソソーム膜の総合リピドミクスを参考にした人工エクソソーム作製が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：Exosome is a subtype of extracellular vesicle, released from various cells including brain neurons. Neuronal cell line (N2a)-derived exosomes can bind amyloid-beta peptide (Abeta) in GSL-dependent manner and clear it through transporting into microglia. In this study, we validated that mouse neuronal exosomes, not glial ones, had abundant GSLs and could capture Abeta. Infusion of the neuronal exosomes into APP transgenic mice decreased Abeta and amyloid depositions, similar to previously reported neuroblastoma-derived exosomes. However, synthetic liposomes containing neuronal GSLs had no potency to bind Abeta. Future challenge is to construct exosome-like liposomes referred to total lipidomics data of neuronal exosomes.

研究分野：神経化学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 アルツハイマー病 アミロイドbeta スフィンゴ糖脂質



図 1 マウス脳細胞由来エクソソームに含まれるスフィンゴ糖脂質プロファイル (上) 系列別 (下) 付加されるシアル酸の個数別

(2) 各種脳細胞から放出されるエクソソームに対する AB 結合

ニューロン、アストロサイト、ミクログリア由来エクソソームをガラスチャンパー底面に固着させた後、25 $\mu$ M AB 溶液を加え、37 $^{\circ}$ C で3時間インキュベートした後、固定して顕微鏡観察した。その結果、ニューロン由来のエクソソームには顕著な AB の結合が認められたが、グリア由来エクソソームへの結合はみられなかった(図 2)。また、各種エクソソームと 25 $\mu$ M 合成 AB を混合し 24 時間インキュベートした後、混合液中のアミロイド量を測定した。その結果ニューロン由来エクソソームを添加した溶液ではアミロイド量の産性促進がみられたが、グリア由来エクソソームにはこのアミロイド産性促進効果は認められなかった。AB との結合能力とアミロイド産性促進能力は、ニューロン由来エクソソームに特有のものであると考えられる。また、ニューロン由来エクソソームを EGCase 処理し、表面 GSL 糖鎖を切断すると AB 結合、アミロイド形成促進効果が抑制された。また、sialidase 処理によってシアル酸を切断した場合もアミロイド形成能が消失したことから、神経細胞由来エクソソームの AB 結合能はシアル酸付加 GSL(ガングリオシド)糖鎖依存的であると示唆される。

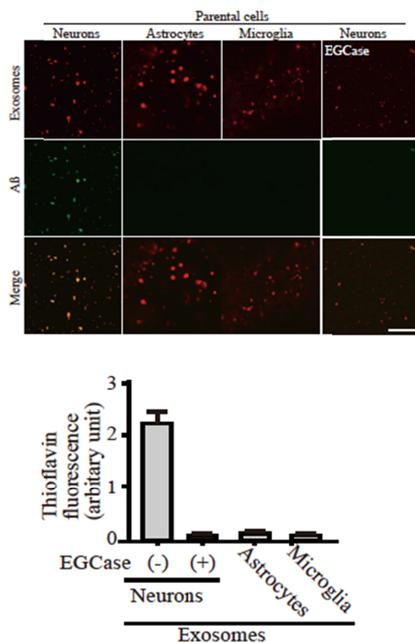


図 2 脳細胞由来エクソソームに対する AB 結合実験(上)と AB アミロイド産生量測定 (下)

(3) マウス初代培養細胞由来エクソソームのアルツハイマー病モデルマウス脳への投与

12 月齢アルツハイマー病モデルマウスの海馬領域へ各種脳細胞由来エクソソームを 2 週間持続投与した。その結果、ニューロン由来エクソソームを投与した海馬では反対側の海馬と比較して、AB アミロイド沈着面積が減少した(図 3)。また脳組織を溶解し AB 量を ELISA で測定したところ主要な AB 分子種である AB1-40、AB1-42 とともにニューロン由来エクソソーム投与海馬で減少していた。一方、グリア由来エクソソーム投与では、このような AB 濃度、アミロイド沈着への影響は認められず、生体での AB クリアランス効果もニューロン由来エクソソームに特異的であると考えられる。

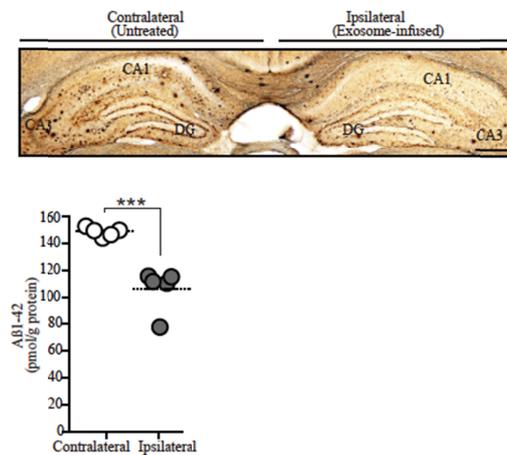


図 3 海馬 AB に対するニューロン由来エクソソーム投与の効果 (上) AB 免疫組織染色、右側が投与側海馬、AB 免疫陽性面積が減少している。(下)海馬組織 AB 濃度

(4) エクソソーム様リポソームの AB クリアランス効果

グリア細胞由来エクソソームと比較してニューロン由来エクソソームが特に多く含んでいた GM2、GM1、GT1、GD3 をそれぞれ最終濃度 2.5mM を含有したリポソームを作製した。作製したリポソームと AB との結合を評価したが、明確な結合は認められなかった。また、各種リポソームをアルツハイマー病モデルマウスの海馬に投与し、海馬組織 AB 濃度と AB アミロイド沈着を評価したが、未投与側海馬と差が認められなかった。リポソームへの AB 結合がみられなかった原因としては、リポソーム作製に用いた分子種以外の GSL が AB 結合に関与している可能性が考えられる。また、AB 結合の標的となる GSL 集積ドメインに形成は、周辺の脂質成分(コレステロールやスフィンゴミエリンなど)に影響を受けることがわかっている。エクソソームに含まれる GSL 以外の脂質解析データも取得し、そのプロファイルを模したリポソーム(人工エクソソーム)の作製が今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yuyama K., Igarashi Y. Physiological and Pathological Roles of Exosomes in the Nervous System. *Biomolecular Concepts*, 2016, 7, 53-68, 査読有  
DOI: 10.1515/bmc-2015-0033

湯山耕平、五十嵐靖之、エクソソームによるアミロイド 蛋白質除去作用、細胞、2016、48号、44-47、査読無  
URL:<http://www.fujisan.co.jp/product/982/b/1232616/>

Yuyama K., Sun H., Usuki S., Sakai S., Hanamatsu H., Mioka T., Kimura N., Okada M., Tahara H., Furukawa J., Fujitani N., Shinohara Y., and Igarashi Y. A potential function for neuronal exosomes: sequestering intracerebral amyloid- $\beta$  peptide. *FEBS Lett.*, 589, 2015, 84-88. 査読有 DOI: 10.1016/j.febslet.2014.11.027

Yuyama K., Sun H., Sakai S., Mitsutake S., Okada M., Tahara H., Furukawa J., Fujitani N., Shinohara Y., Igarashi Y. (2014) Decreased Amyloid- Pathologies by Intracerebral Loading of Glycosphingolipid-enriched Exosomes in Alzheimer Model Mice. *J. Biol. Chem.* 289, 2014, 24488-24498, 査読有  
DOI: 10.1074/jbc.M114.577213

〔学会発表〕(計 6 件)

湯山耕平、アルツハイマー病予防・治療のためのエクソソーム機能利用、第 16 回日本再生医療学会総会、2017 年 3 月 8 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

湯山耕平、アルツハイマー病予防のためのスフィンゴ脂質含有細胞外ベシクル、第 9 回セラミド研究会学術集会、2016 年 10 月 28 日、東京ユビキタス協創広場 CANVAS(東京都中央区)

湯山耕平、神経細胞由来エクソソームのアミロイド  $\beta$  クリアランス効果、第 34 回日本認知症学会学術集会、2015 年 10 月 3 日、リンクステーションホール青森(青森県青森市)

Yuyama K. Function of ganglioside- and sphingolipid-linked exosome secretion in sequestering Alzheimer 's amyloid- $\beta$ , 56th International Conference on the Bioscience of lipids, 2015 年 9 月 23 日, Puerto Iguazú (Argentina)

湯山耕平、アミロイド  $\beta$  蛋白質代謝におけるスフィンゴ糖脂質含有細胞外顆粒エクソソームの役割、第 33 回日本糖質学会、2015 年 8 月 11 日、名古屋大学豊田講堂(愛知県名古屋市)

湯山耕平、神経細胞由来エクソソームのアミロイド  $\beta$  蛋白質除去効果、第 1 回 Japanese Society of Extracellular Vesicles (JSEV)、2014 年 8 月 29 日、グラン

ドプリンスホテル広島 (広島県広島市)

〔図書〕(計 1 件)

湯山耕平、五十嵐靖之「パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線～シグナル伝達からがん、免疫、神経疾患との関わり、創薬利用まで～」(NTS 出版)2017 年発行、第 5 章第 2 節 pp175-185

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: エクソソーム産生促進剤  
発明者: 向井克之, 湯山耕平, 五十嵐靖之  
権利者: 株式会社ダイセル, 国立大学法人北海道大学  
種類: 特許権  
番号: 特願 2017-48977  
出願年月日: 2017 年 3 月 14 日  
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ  
<http://biomem.pharm.hokudai.ac.jp>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯山 耕平 (YUYAMA, Kohei)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究所・特任准教授  
研究者番号: 80415546