

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：82674

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860274

研究課題名(和文)神経炎症におけるエクソソームの役割と作用機序の解明

研究課題名(英文)Function and mechanism of exosome in neuroinflammation

研究代表者

川上 恭司郎(Kawakami, Kyojiro)

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：90589227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経変性疾患に深く関与する神経炎症において、活性化ミクログリアから分泌される膜小胞、エクソソームが果たす役割の解明を目的とし、実験を行った。その結果、ミクログリア細胞(BV-2細胞株)から分泌されるエクソソームに含まれるタンパク質組成はLPS処理により変化することを見出した。その中でも変化が顕著であったヒストン分子については、そのものの投与では神経細胞(PC12細胞株)に障害性を持つことが分かったが、LPS処理したBV-2細胞由来のエクソソームを投与しても大きな変化は確認できなかったことから、分化後のPC12細胞や初代培養神経細胞に処理するなどのさらなる検討を要するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neuroinflammation is profoundly involved in neurodegenerative diseases. We aim to elucidate the role of exosomes secreted from activated microglia in neuroinflammation. We found that protein composition in exosomes secreted from BV-2 microglia cells was altered by LPS treatment, among which histone molecules showed a remarkable increase. Treatment with histone molecules damaged PC12 neuronal cells, but exosomes derived from LPS-treated BV-2 cells showed no apparent cytotoxic effect. Further investigation using differentiated PC12 cells or primary cultured neurons will be required to elucidate the role of histones expressed on exosomes in neuroinflammation.

研究分野：生化学、薬学

キーワード：エクソソーム ミクログリア 神経炎症 プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

ミクログリアは中枢神経系において免疫機能を担っている細胞である。正常時は非活性の状態にあり、シナプスの維持に役立っているとされている。中枢神経系に傷害または病態が起こるとミクログリアは病変部に遊走、活性化し、死滅した細胞や細胞片を貪食によって除去する役割を担っている。一方で、ミクログリアの過剰な活性化により引き起こされる神経炎症は、アルツハイマー病・パーキンソン病等の神経変性疾患の発症に関与しているものと考えられている。アルツハイマー病においては病変部には活性化ミクログリアの集積が認められる。活性化ミクログリアはインターロイキン-1 や TNF- などの炎症性サイトカインなどの液性因子を放出することで神経細胞に対して障害的に働く。

エクソソームは、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた膜小胞がさらに陥入することにより形成される直径 40-100 nm の膜小胞であり、エクソソームを含む多小胞体のエキソサイトーシスによって細胞外に分泌される。近年、細胞から分泌される膜小胞エクソソームに含まれる RNA・タンパクが移入されると、細胞機能が変化することが示され、エクソソームは新規の細胞間情報伝達手段として注目されている。

神経細胞とグリア細胞間のコミュニケーションは中枢神経系の機能維持、神経変性疾患の発症に重要な役割を担っている。最近になり、このコミュニケーションにサイトカイン等の液性因子の他にエクソソームが関与している可能性が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、LPS 等により活性化されたミクログリアから分泌されたエクソソームを単離し、それらの神経細胞障害性を検討する。さらに、エクソソームのプロテオーム解析を行い、細胞障害に関与するタンパクを同定し、活性化ミクログリア由来のエクソソームの神経炎症における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) LPS により活性化した BV-2 ミクログリア細胞から培地中に分泌されたエクソソームを超遠心法で単離する。
- (2) 単離したエクソソームのプロテオーム解析を行い、ミクログリアの活性化に伴うタンパク質組成の変化を明らかにし、神経細胞障害に関わる候補タンパク質を選定する。
- (3) 単離したエクソソームを神経細胞のモデルである PC12 褐色細胞腫細胞に投与し、その取り込みを確認するとともに、神経細胞障害性を検討する。

4. 研究成果

【1. ミクログリア細胞からのエクソソームの単離】

BV-2 細胞を LPS で処理し翌日培地を回収した。培地を超遠心してエクソソームを単離した後、粒径を qNano ナノパーティクル計測器により測定したところ、通常のエクソソームと同様に 120-140nm にピークを持つ粒径分布を得た(図 1)。LPS 濃度の違いによる粒径分布の差はみられなかった。さらに qNano により培地中のエクソソームの量を計測したところ、LPS の濃度が増加すると細胞あたりの分泌エクソソーム量が増加する傾向があることが分かった(図 2)。

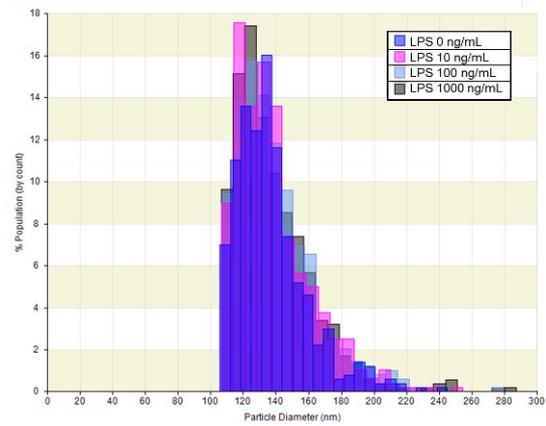


図 1. BV-2 細胞由来エクソソームの粒径測定

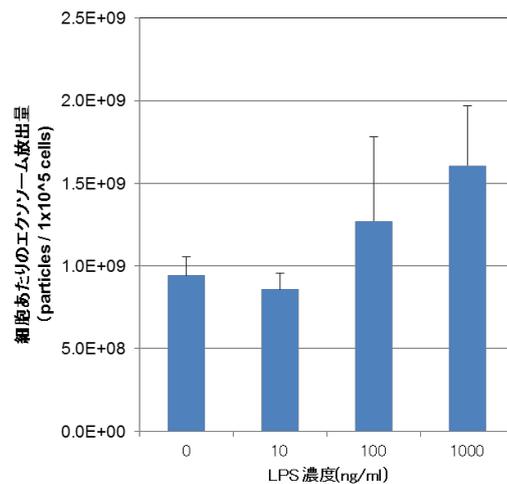


図 2. 細胞当たりのエクソソームの放出量

【2-1. エクソソームに含まれるタンパク質のプロファイリング】

低濃度(10 ng/mL)LPS 処理と未処理の BV-2 細胞より得たエクソソームをトリプシン消化後、iTRAQ で標識することにより定量的プロテオーム解析を行った。その結果、1.5 倍以上の発現増加が見られたものが 10 種類同定された。中でもヒストン分子の増加が顕著であった(表 1)。

表 1. iTRAQ 法によるエクソソームのプロテオーム解析 (1.5 倍以上増加したもの)

Accession Number	Protein Name	Gene Symbol	115:114 LPS 10/LPS 0
P62806	Histone H4	Hist1h4a	6.7973
Q8R1M2	Histone H2A.J	H2afj	5.9515
P84228	Histone H3.2	Hist1h3b	2.878
P28665	Murine globulin-1	Mug1	2.3359
P68373	Tubulin alpha-1C chain	Tuba1c	1.7603
P07901	Heat shock protein HSP 90-alpha	Hsp90aa1	1.7283
Q8VDN2	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1	Atp1a1	1.5912
P52480	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Pkm2	1.5654
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	Ywhaz	1.5614
P62874	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(T) subunit beta-1	Gnb1	1.5389

【2-2. プロテオーム解析結果の検証】LPS を低・中・高濃度 (10、100、1000 ng/mL) 処理した BV-2 細胞の培養液から超遠心により回収したエクソソームについて、ヒストン分子のウェスタンブロット解析を行った。その結果、プロテオーム解析結果と同様にヒストン H3 分子の増加が確認された(図 3)。

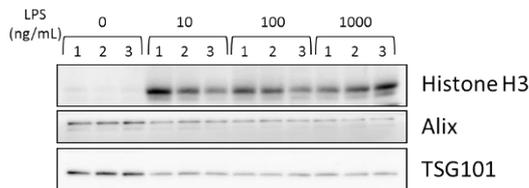


図 3. BV-2 細胞由来エクソソーム中タンパク質のウェスタンブロット解析 (Alix・TSG101: エクソソームマーカー)

【3. ミクログリア由来エクソソームの神経細胞障害性の検討】

LPS を低・中・高濃度処理した BV-2 細胞の培養液から回収したエクソソームを神経細胞モデルである PC12 細胞に投与し、細胞障害性を検討した。また、ヒストン分子そのものによる処理も行い神経細胞に対する障害性を観察した。その結果、LPS 処理した細胞由来のエクソソーム投与ではいずれの LPS 濃度においても変化が見られなかったが、ヒストンで高濃度処理した細胞では処理 3 日後には神経細胞の死滅が観察された (図 4、5)。

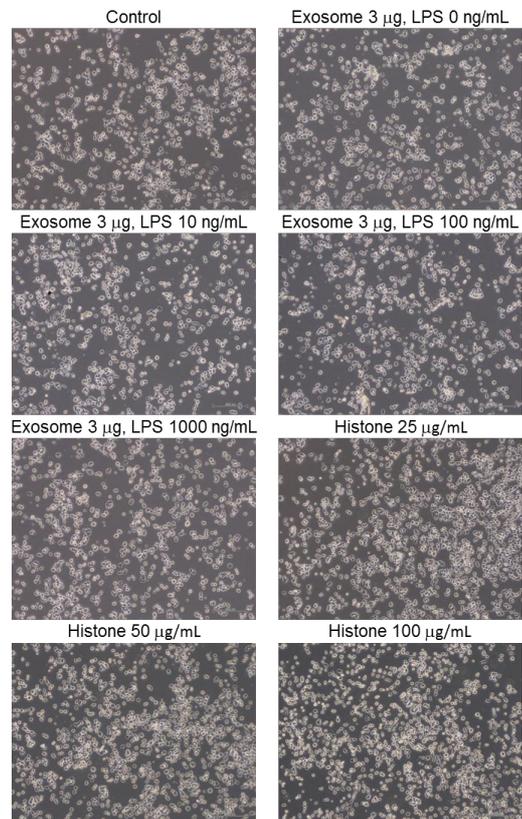


図 4. PC12 細胞に BV-2 由来エクソソームまたはウシ胸腺ヒストンを添加して 1 日後の形態

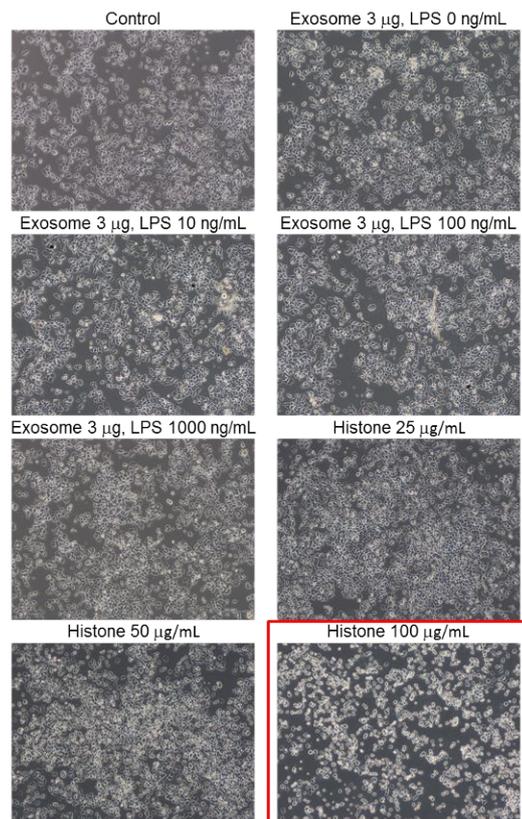


図 5. PC12 細胞に BV-2 由来エクソソームまたはウシ胸腺ヒストンを添加して 3 日後の形態。100 µg/mL のヒストン処理に PC12 細胞の死滅が観察された (赤枠)。

以上の結果、ミクログリア細胞から分泌されるエクソソームに含まれるタンパク質組成は LPS 処理により変化することを見出した。その中でも変化が大きかったヒストン分子については、そのものの投与では神経細胞障害性を持つことが分かったが、LPS 処理した BV-2 細胞由来のエクソソームを神経細胞に投与しても大きな変化は確認できなかった。このことから、分化後の PC12 細胞、初代培養神経細胞に処理するなどのさらなる検討を要するものと考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Tsumoto H, Miura Y, Deguchi T, Ito M. Integrin 4 and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance. *Int J Oncol.* 査読有 2015, 47, 384-390.
doi: 10.3892/ijo.2015.3011.

[学会発表](計 1 件)

Ito M, Kato T, Kawakami K, Mizutani K, Fujita Y, Kameyama K, Deguchi T. Identification of exosomal markers for taxane-resistance and progression of prostate cancer. *International Society for Extracellular Vesicles 2015.* 2015.4.22-26. Washington D.C. (USA)

[その他]

ホームページ等

老化バイオマーカー研究 研究チーム 研究チーム紹介 東京都健康長寿医療センター研究所

http://www.tmghig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/rouka_biomarker.html

川上恭司郎の研究ページ (K.K Lab)

<http://kyojiro.com>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 恭司郎 (KAWAKAMI, Kyojiro)

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: 9058922