

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07817

研究課題名（和文）エクソソームを利用したアルツハイマー病の新規診断法の開発

研究課題名（英文）Development of novel diagnostic system using exsomes

研究代表者

伊藤 雅史（Ito, Masafumi）

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：80393114

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、アルツハイマー病（AD）患者血清からエクソソームを精製し、プロテオーム解析により新規バイオマーカーを同定することを目的とした。検体としてAD患者および健常者の血清を用いた。フォスファチルジセリンアフィニティ法により精製したエクソソームのプロテオーム解析により、AD患者で増減するタンパク質を15個同定した。エクソソームマーカータンパク質に対する抗体により精製したエクソソームのラベルフリー定量プロテオーム解析により、AD患者で増減するタンパク質を13個同定した。今後は、これらバイオマーカー候補について詳細な検証を行い、血清中エクソソームを用いたADの新規診断法の開発を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会を迎えているわが国では認知症の早期診断は喫緊の課題である。本研究では、血清中のエクソソームに焦点を当て、アルツハイマー病の新規バイオマーカーの探索を行った。本研究により、アミロイド、リン酸化タウなど既知のバイオマーカー以外の候補タンパク質を同定した。本研究を進展させることにより、将来的には血清中のエクソソームを用いたアルツハイマー病の診断が可能になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to purify exosomes from serum and identify novel biomarkers for Alzheimer's disease (AD) by proteomic analysis. Sera from AD patients and healthy subjects were used as samples. (1) Proteomic analysis of exosomes purified by the phosphatidylserine affinity method using stable isotope labeling identified 15 proteins that were significantly increased or decreased in AD patients. (2) Proteomic analysis of exosomes purified by antibodies against exosome marker proteins using label-free strategy identified 13 proteins that were significantly increased or decreased in AD patients. We will validate the significance of these selected biomarker candidates and develop a novel serum exosome-based diagnostic system for AD.

研究分野：内科学、分子生物学

キーワード：エクソソーム 細胞外小胞 アルツハイマー病 診断法

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは直径 50-150nm 程度の膜小胞である。前期エンドソームが内向きに陥入すると腔内に多数の小胞を含む多胞体が形成され、それが細胞膜と融合し細胞外に分泌された小胞がエクソソームである。エクソソームは由来する細胞の特徴を反映し体液中に存在することから、血液・尿中エクソソームは、新たなタイプのバイオマーカーとして注目されている。

アルツハイマー病の原因として、アミロイドβ (Aβ)、リン酸化タウ (p-Tau)、脳内のインスリンシグナルの異常等が知られている。2015 年、末梢血から単離した脳由来エクソソーム中 Aβ・p-Tau の検出によりアルツハイマー病の診断ができる可能性が初めて報告され(参考文献 1) その後 IRS (insulin receptor substrate: インスリン受容体基質) による診断の可能性も示されているが(参考文献 2) 追試した報告はない。これらの研究では、沈殿法により単離したエクソソームを細胞特異的な膜タンパクに対する抗体で免疫沈降した後に ELISA を行っているが、この方法では血液中に存在する Aβ・p-Tau 等の混入は不可避であり、エクソソーム中のレベルを測定していることにはならない。

2017 年、京都府立大学のグループは血液中 p-Tau を超高感度 ELISA で測定することにより(参考文献 3)、2018 年、島津製作所と国立長寿医療研究センターのグループは血液中の Aβ 関連ペプチドを質量分析で解析することにより(参考文献 4) アルツハイマー病の診断ができる可能性を報告している。いずれも、血液中のエクソソームではなく、遊離型として存在する微量の p-Tau・Aβ 関連ペプチドを測定している。

最近になり、ホスファチジルセリン (PS) に結合する分子 (Tim4) を用い、PS を膜表面に有するエクソソームを金属イオン依存的に捕捉した後に、キレート剤で溶出することにより、簡便かつ高効率に高純度エクソソームを単離することが可能となった (PS アフィニティ法)。

実際に、PS アフィニティ法で血清から単離したエクソソームについてプロテオーム解析を行うと、血清タンパク質の混入が激減し、エクソソームタンパク質の検出数が飛躍的に向上することを確認している。

本研究では、血清成分の混入が最小化された高純度エクソソームに含まれるタンパク質のプロテオーム解析を行い、同定される新規診断マーカーの候補を検出することにより、アルツハイマー病・MCI (軽度認知機能障害) と対照症例の鑑別が可能かどうかを検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、アルツハイマー病患者の血清から単離したエクソソームのプロテオーム解析を行い、新規診断マーカーの候補を同定する。続いて、同定したマーカー候補タンパク質の検出システム構築した後、多検体での解析を行い、アルツハイマー病・MCI (軽度認知機能障害) と対照症例の鑑別における臨床的有用性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

【検体】

アルツハイマー病患者検体 (48 例) と年齢構成をそろえた健常者 (20 例) の血清は BioIVT 社より購入した。

【エクソソームの精製】

血清を 10,000xg, 4℃, 30 分遠心し、夾雑物を沈殿させた。次にその上清を 0.22μm のフィルターを通すことで、大きな粒子などを除いた。その後、下記の 2 種類の方法でエクソソームを精製した。

(1) フォスファチジルセリン (PS) アフィニティ法:

ビオチン化ラベルをした T-cell immunoglobulin domain and mucin domain-containing protein 4 (Tim4) 分子 (富士フィルム和光純薬) をストレプトアビジン磁気ビーズに結合させ、0.22μm フィルターを通した血清と室温 1 時間、攪拌下で反応させた。反応後、TBST により洗浄を行い、EDTA-PBS 溶液により Tim4 からエクソソームを遊離させた (参考文献 5)。

(2) エクソソームマーカー抗体による精製:

ビオチン化ラベルをした CD9、CD63、CD81 抗体 (富士フィルム和光純薬) をそれぞれストレプトアビジン磁気ビーズに結合させたのち、磁気ビーズを混合し、0.22μm フィルターを通した血清と室温 1 時間、攪拌下で反応させた。反応後、TBST により洗浄を行い、RIPA バッファーによりビーズに結合したエクソソームを溶出した。

【エクソソームのプロテオーム解析】

(1) iTRAQ 法:

PS アフィニティ法で精製したエクソソームを用いた。エクソソームはトリプシンで in solution digestion を行った後、iTRAQ 試薬 (SCIEX) による安定同位体標識を行った。標識はマニュアルに従って行った。

(2) ラベルフリー法:

エクソソームマーカー抗体により精製したエクソソームを用いた。エクソソームは S-Trap 法 (ProtiFi) のマニュアルに従いトリプシン消化を行った。

それぞれの方法より得たペプチドは SDB Stage-Tip にて脱塩後、UltiMate 3000 RSLCnano と Q Exactive (Thermo Fisher Scientific) により nano LC-MS/MS 解析を行った。取得されたデータは Proteome Discoverer Software (Thermo Fisher Scientific) にて解析し、タンパク質の同定と定量比較を行った。

【サンドイッチ ELISA】

エクソソームを検出するためにサンドイッチ ELISA を構築した。捕捉分子として Tim4 を MaxiSorp ELISA White プレート (Thermo Fisher Scientific) に吸着させ、TBST で洗浄後、血清と反応させた。反応後のプレートは標的とするタンパク質に対するビオチン化標識抗体を検出抗体として反応させ、次に Streptavidin-ALP (Jackson ImmunoResearch) を反応させた後、CDP-Star (Thermo Fisher Scientific) を基質として、化学発光を EnVision プレートリーダー (PerkinElmer) で検出し、各検体のシグナル強度を比較した。

4. 研究成果

【(1) iTRAQ 法による定量プロテオーム解析】

市販のアルツハイマー病および対照症例の血清をそれぞれ 5 検体ずつプールしたものをを用いて、PS アフィニティ法により高純度エクソソームを単離した。このエクソソームをトリプシン消化し、安定同位体標識法である iTRAQ 法によりペプチドを標識した後、nano LC-MS/MS にてプロテオーム解析することで、タンパク質を 613 個同定した。同定したタンパク質のうちアルツハイマー病患者で 1.5 倍以上増加したものが 4 個、低下したものが 11 個選出され、新規エクソソームマーカー候補タンパク質とした (表 1)。

また、そのうち膜タンパク質を標的として 1 つの候補タンパク質に対して、PS アフィニティ分子とのサンドイッチ ELISA を構築するため、検討を行った (図 1)。構築したサンドイッチ ELISA を用いて、複数の患者および対照検体で評価したが、群間で有意差は得られなかった (図 2)。

表 1 AD 患者血清由来エクソソームにおいて増減するタンパク質
左: AD 患者で 1.5 倍以上に増加、右: AD 患者で 2/3 倍以下に低下

タンパク質名	タンパク質名
Oncoprotein-induced transcript 3 protein	P-selectin
B-lymphocyte antigen CD20	regulator complex protein LAMTOR1
Transferrin receptor protein 1	Isoform 3 of Coronin-1C
Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1	14-3-3 protein theta
	Glutathione S-transferase omega-1
	caveolae-associated protein 2
	pleckstrin
	Claudin-5
	Ras-related protein Rab-8B
	Ribonuclease inhibitor
	Protein lifeguard 3

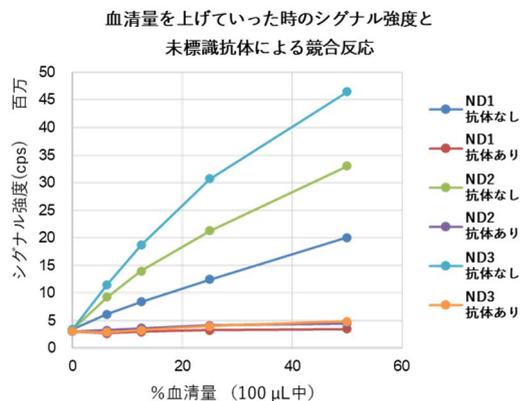
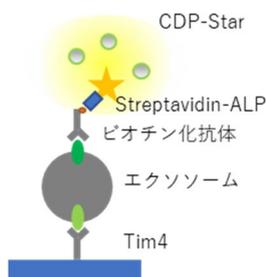


図 1. サンドイッチ ELISA の検討

左：概略図、右：未標識抗体による競合反応

未標識抗体なし群では血清量に応じてシグナル強度が増加するが、未標識抗体あり群ではシグナル強度の増加が消失する。ND は Normal Donor を表す。

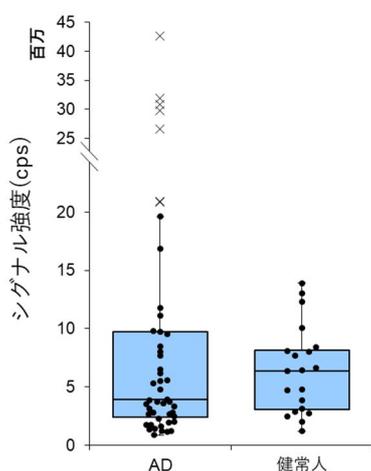


図 2. サンドイッチ ELISA による候補タンパク質の検出

AD 患者 48 検体、健常人 20 検体を測定した

【(2)ラベルフリー法による定量プロテオーム解析】

エクソソームマーカータンパク質に対する抗体により精製する方法を用いて、アルツハイマー病患者および同年代の健常者の各 10 人の血清より個別にエクソソームを精製し、プロテオーム解析を行い、ラベルフリー定量解析によりアルツハイマー病患者で変化するタンパク質を探索した。その結果、アルツハイマー病患者血清由来エクソソームで、健常者と比較して 1.5 倍以上変動する 13 個のタンパク質を同定した (表 2)。

表 2 AD 患者血清由来エクソソームにおいて増減するタンパク質
左：AD 患者で 1.5 倍以上に増加、右：AD 患者で 2/3 倍以下に低下

タンパク質名
Structural maintenance of chromosomes protein 1A
Immunoglobulin lambda variable 3-16
ADP-ribosylation factor 4
Alpha-2-antiplasmin
Alpha-1-antitrypsin
Decorin
Kallistatin
Matrix Gla protein
Protein Z-dependent protease inhibitor
Neuronal membrane glycoprotein M6-a

タンパク質名
Immunoglobulin heavy variable 2-26
Protein 4.1
Protein disulfide-isomerase

今後はこれらのマーカー候補について多検体での確認と、臨床的有用性の検証を行い、血清中のエクソソームを用いたアルツハイマー病の診断法の開発を目指す。

5 . 参考文献

1. Fiandaca, M. S. et al. Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes: A case-control study. *Alzheimers. Dement.* 11, 600–7.e1 (2015)
2. Kapogiannis, D. *et al.* Dysfunctionally phosphorylated type 1 insulin receptor substrate in neural-derived blood exosomes of preclinical Alzheimer's disease. *FASEB J.* 29, 589–596 (2015)
3. Tatebe, H. et al. Quantification of plasma phosphorylated tau to use as a biomarker for brain Alzheimer pathology: pilot case-control studies including patients with Alzheimer's disease and down syndrome. *Mol. Neurodegener.* 12, 63 (2017)
4. Nakamura, A. et al. High performance plasma amyloid- β biomarkers for Alzheimer's disease. *Nature* 554, 249–254 (2018)
5. Kawakami, K. et al. Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies. *Sci. Rep.* 11, 15000 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Iinuma K, Kawakami K, Mizutani K, Fujita Y, Yamaguchi T, Ito M, Kumano T, Matsuo M, Nakano M, Koie T, Ito M, Kato T	4. 巻 41(5)
2. 論文標題 miRNA-93 in Serum Extracellular Vesicles Before and After Low Dose Rate Prostate Brachytherapy.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 2411-2418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muramatsu-Maekawa Y, Kawakami K, Fujita Y, Takai M, Kato D, Nakane K, Kato T, Tsuchiya T, Koie T, Miura Y, Ito M, Mizutani K.	4. 巻 18(3)
2. 論文標題 Profiling of Serum Extracellular Vesicles Reveals miRNA-4525 as a Potential Biomarker for Advanced Renal Cell Carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Genomics Proteomics.	6. 最初と最後の頁 253-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20256	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 -
1. 著者名 Hishida S, Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Takai M, Iinuma K, Nakane K, Tsuchiya T, Koie T, Miura Y, Ito M, Mizutani K.	4. 巻 81(9)
2. 論文標題 Proteomic analysis of extracellular vesicles identified PI3K pathway as a potential therapeutic target for cabazitaxel-resistant prostate cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate.	6. 最初と最後の頁 592-602
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pros.24138	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Horie K, Koie T, Umezawa K, Tsumoto H, Miura Y, Katagiri Y, Miyazaki T, Ohsawa I, Mizutani K, Ito M.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Diagnostic potential of serum extracellular vesicles expressing prostate-specific membrane antigen in urologic malignancies	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94603-9	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 -

1. 著者名 Taku Kato, Kosuke Mizutani, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Hidetoshi Ehara, Masafumi Ito	4. 巻 6(7)
2. 論文標題 CD44v8-10 mRNA contained in serum exosomes as a diagnostic marker for docetaxel resistance in prostate cancer patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e04138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2020.e04138	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 -

1. 著者名 Kengo Horie, Kyojiro Kawakami, Yasunori Fujita, Yoko Matsuda, Tomio Arai, Natsuko Suzui, Tatsuhiko Miyazaki, Takuya Koie, Kosuke Mizutani, Masafumi Ito	4. 巻 98(10)
2. 論文標題 Serum Exosomal Gamma-Glutamyltransferase Activity Increased in Patients with Renal Cell Carcinoma with Advanced Clinicopathological Features	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 734-742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kawakami, K., EDO, N., Morita, K., Ishikawa, T., Onose, H., Fukumori, T., Tsumoto, H., Umezawa, K., Miura, Y., Fujita, Y., Ohsawa, I., Ito, M.
2. 発表標題 Proteomic analysis of serum extracellular vesicles derived from follicular thyroid cancer patients
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川上 恭司郎, 藤田 泰典, 加藤 卓, 堀江 憲吾, 古家 琢也, 梅澤 啓太郎, 津元 裕樹, 三浦 ゆり, 片桐 恭雄, 宮崎 龍彦, 大澤 郁朗, 水谷 晃輔, 伊藤 雅史
2. 発表標題 前立腺特異的膜抗原 (PSMA) を発現する細胞外小胞の測定系構築と前立腺および腎がんの診断における臨床的有用性
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 水谷晃輔、菱田勢始、川上恭司郎、藤田泰典、加藤卓、高井学、飯沼光司、中根慶太、土屋朋大、三浦ゆり、伊藤雅史、古家卓也
2. 発表標題 細胞外小胞のプロテオーム解析によるカバジタキセル耐性因子の解明
3. 学会等名 第30回泌尿器科分子・細胞研究会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	川上 恭司郎 (Kawakami Kyojiro) (90589227)	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 (82674)	
研究分担者	水谷 晃輔 (Mizutani Kosuke) (80397356)	岐阜大学・医学部附属病院・准教授 (13701)	

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