

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790993

研究課題名（和文）exosomeは髄液のバイオマーカーになりうるか

研究課題名（英文）Evaluation of exosomes in cerebrospinal fluid

研究代表者

上野 弘貴（UENO HIROKI）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：30457238

研究成果の概要（和文）：髄液中の粒子を、粒子径計測器を用いて測定したところ、exosomeの粒子径に近似する粒子が $3.4 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^{11}$ /mlの密度で存在していた。一方 exosome中に存在すると考えられる miRNA を electropherogram にて検討し、平均 857pg/ul の RNA と考えられるシグナルが検出され、mirna アレイチップ解析では 200 種類以上の miRNA が同定された。また髄液については exosome の表面抗原を認識する IgM 型抗体をクロスリンカーとして exosome を濃縮できる可能性が示唆された。これらのことから髄液中の exosome に存在する miRNA を神経疾患の新規指標として活用できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed particles (average diameter ~ 100 nm) in cerebrospinal fluid (CSF) by nanopore-based particle detection system and detected around billion particles per ml of CSF. Electropherograms demonstrated RNA presumably derived from exosomes in CSF with average of ~900pg/ul and analysis using miRNA array chip could identify more than 200 species of miRNAs. We also explored the possibility of IgM type antibody for superficial antigens on exosome as cross-linker that can precipitate exosomes of CSF. These results indicate that miRNAs reside in exosome of CSF are novel candidate for biomarkers of neurological disorders.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：バイオマーカー、脳神経疾患、神経科学、RNA

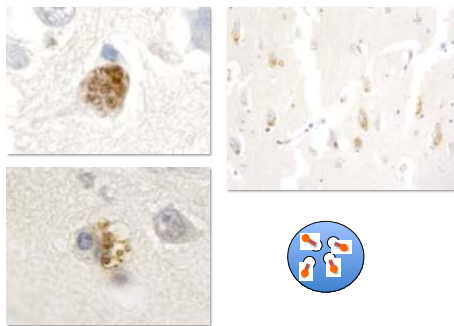
## 1. 研究開始当初の背景

代表研究者が所属する研究室では、ヒト海馬に関する分子病理学的検討の過程で、ESCRT（endosomal sorting complex required for transport）パスウェイに関与す

る分子 CHMP2B が、アルツハイマー病患者の海馬に高頻度に出現する顆粒空胞変性と称される構造物の特異的なマーカーであることを、世界に先駆けて見いだした（Yamazaki et al. Neuroscience letter

2010)。CHMP2B などの ESCRT パスウェイに関連する分子群は、酵母の細胞内構造物である multivesicular bodies (MVB)の構成タンパクとして解析されてきたものである。MVB と顆粒空胞変性は形態学的に相同であり、構成タンパクとして CHMP2B を共有していることは、顆粒空胞変性が MVB に由来する構造物であることを示唆する。MVB については最終的にリソソームと結合して分解に至る経路 (Filimonenko M et al. J Cell Biol. 2007 ;179(3):485-500) と、細胞膜と結合して内包する小胞 (vesicle) を細胞外に放出する経路 (上図右) とが知られており、後者の vesicle はとくに exosome と呼ばれている。exosome は一般的なウイルス粒子とサイズが同程度の脂質二重膜から成る分泌性の vesicle である。粒子径が小さいためこれまで存在が明らかでなかったが、現在あらゆる体液中に豊富に存在することが明らかになっている。最近急速に解析が進んでいる miRNA のキャリアの一つが exosome であり、各種体液中の exosome は新規バイオマーカーを提供する試料と成り得るものである。脳内に MVB に類似する病理学的変化を見いだしたことから、髄液中の exosome が放出されている可能性が高いと考えた。

(上図、左下図；顆粒空胞変性は



multivesicular bodies:MVB (右下図) に存在する CHMP2B が陽性であることから multivesicular bodies が肥大したものが顆粒空胞変性の本態と考えられた。Exosome は MVB に内包される vesicle が細胞外に放出されたものと考えられている)

## 2. 研究の目的

本研究では神経疾患の診断に重要であるものの十分な疾患情報を得ることが困難であった髄液に関して、その中に含まれる exosome を新たな解析対象とすることにより髄液の診断価値をさらに高くすることを目的としたものである。特に体液中の miRNA の大多数は exosome 中に含まれていると考えられており exosome の回収を通じ

て多種類の miRNA に関する生体情報をバイオマーカーとすることができるのかを検討する。

## 3. 研究の方法

### 1) exosome 濃度の測定

血球分画を遠心分離した後の髄液中の粒子 (粒子径 50~10,000nm) を、電気抵抗ナノパルス法で個々にカウントするナノパーティクル計測器 qNano を用いて計測した。

### 2) 髄液中 RNA の測定

髄液中の RNA を electropherogram にて解析し、RNA 長に対する RNA の相対量を明らかにするとともに塩基数が小さい small RNA (miRNA) の検出を試みた。

### 3) mirna アレイチップ解析

東レの mirna アレイチップ (miRBASE v9.1) を用いて髄液中の miRNA を網羅的に解析した。

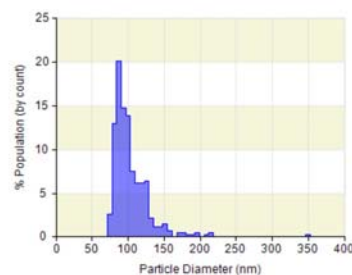
### 4) IgM 抗体を用いた exosome の回収

phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate (PIP2) に対する IgM 抗体を用いて exosome 間をクロスリンクさせることにより、沈降係数を大きくする。これにより通常の遠心条件で exosome を回収できるかを検討する。

## 4. 研究成果

髄液中の微小粒子を、粒子径計測器を用いて測定したところ、平均粒子径 99.6~121.5nm の粒子が  $3.4 \times 10^8 \sim 1.1 \times 10^{11}/\text{ml}$  の密度で存在していた。またその粒度分布は exosome のそれと一致するものであった。

髄液中エクソソームカウント

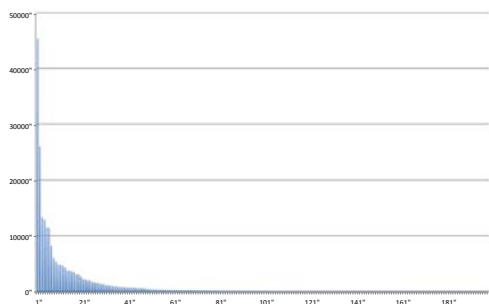


(図；髄液を exosome counter にて粒度分布を調べた結果。他の体液中の exosome と同様の分布を呈しており 80nm 付近にピークを認める)

一方 exosome 中に存在すると考えられる RNA を electropherogram にて検討し、平均 857pg/ul の miRNA と考えられるシグナルが検出された。ただし泳動のピークは多峰性であり、多くが 18S にピークを有し、約 3 割の case において一部のピークが miRNA に相当する 25nt 付近に検出された。次に mirna アレイチ

ップにて髄液中の miRNA の網羅的な解析を行った。

### 髄液中miRNAの相対量



(図; miRNA を相対量の多いものから順に表示。横軸は順位)

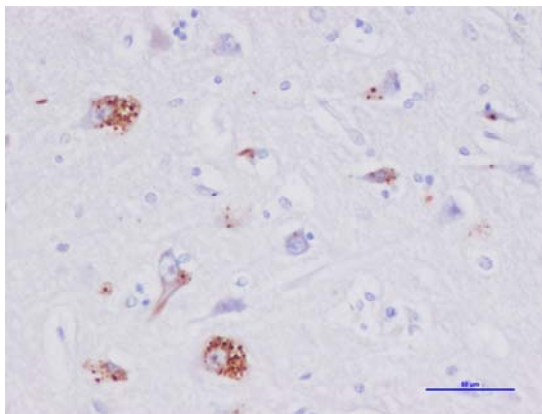
チップでは 221 種の miRNA が検出され、このうち 18 種は原液では測定限界を超える高濃度であった (前図)。

以上のことから髄液中には一定量の exosome が存在し、その中に含まれる複数の miRNA は現在の一般的なアレイチップで充分検出可能であることが明らかになった。

予備的な検討では従来の exosome 分画回収方法に則り髄液を 2,000g、10,000g、100,000g で段階的に遠心し、exosome を回収できることを見出していたが、超遠心を要することからルーチンでの検討が困難であった。われわれは exosome を内包する multivesicular bodies に由来する顆粒空胞変性が phosphatidylinositol (4,5)bisphosphate

(PIP2) に対する抗体で特異的に標識されることを見出していることから、5価の IgM 型抗 PIP2 抗体 (2C11) で exosome をクロスリンク可能であると推定し、実際の髄液を用いて検証した。

(下図; アルツハイマー病患者の海馬を IgM 型抗 PIP2 抗体 (2C11) で免疫染色し、顆粒空胞変性の intraluminal vesicle が特異的に染色された。Exosome はこの intraluminal vesicle が細胞外に放出されたものと考えられていることから PIP2 は exosome の膜構成



成分の一つと考えられる)

PIP2 抗体 10  $\mu$ l 添加後にインキュベートし

15,000 g で遠心した沈殿物を CD63 に対する抗体で western blot したところ、コントロールではバンドを認めなかったが、コントロール群でバンドが検出された。



(左図; PIP2 に対する IgM 型抗体 (2C11) を用いた髄液の免疫沈降の実験左のレーンは髄液中に 2C11 を加えて exosome のクロスリンクを図り、遠心後に exosome のマーカである CD63 に対する抗体で western blot したもの。右はコントロール。抗体依存的に exosome が沈降したと考えられる。)

2C11 抗体をクロスリンカーとして髄液中の exosome を濃縮できる可能性が示唆された。

これまで髄液検査の検査データとしては、髄液 (総) 蛋白、(髄液中) 細胞数の他、オリゴクローナルバンド、ミエリンベースックプロテインなど項目が限られている。最近では髄液中のタウやプリオン蛋白に関する定量的な評価が行われるようになってきているが、網羅的な解析は未だ困難である。

今回の検討で髄液中に多量の exosome が存在し、それに由来すると考えられる miRNA が回収できることが明らかになった。疾患ごとに増減する miRNA の同定には至っていないが、今後疾患特異的な miRNA のレポーターを同定することにより診断の一助となることが期待される。

### 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 8 件)

1. Ueno H, Matsumoto M. Neuropharmacokinetic heterogeneity of mefloquine in the treatment of progressive multifocal leukoencephalopathy. Intern Med. 2012;51(16):2259. DOI:10.2169/intermalmedicine.51.8079
2. Sugihara K, Maruyama H, Morino H, Miyamoto R, Ueno H, Matsumoto M, Kaji R, Kitaguchi H, Yukitake M, Higashi Y, Nishinaka K, Oda M, Izumi Y, Kawakami H. The clinical characteristics of

spinocerebellar ataxia 36: A study of 2121 Japanese ataxia patients. *Mov Disord.* 2012 ;41:1158-63. DOI:10.1002/mds.25092

3. 梅本勇基, 上野弘貴, 原 直之, 中村毅, 大槻俊輔, 柳瀬哲至, 山脇健盛, 松本昌泰. 「多発性巨大軟部腫瘍を認めた脳腱黄色腫症の1例」 *日本内科学会雑誌*. 2012 ;101(5):1397-400.
4. Naito K, Ueno H, Sekine M, Kanemitsu M, Ohshita T, Nakamura T, Yamawaki T, Matsumoto M. Akinetic Mutism Caused by HIV-associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy was Successfully Treated with Mefloquine: A Serial Multimodal MRI Study. *Intern Med.* 2012;51(2):205-9. DOI:10.2169/internalmedicine.51.6253
5. 島田さやか, 上野弘貴, 山崎文之, 杉山一彦, 安富浩子, 関根真悠, 大下智彦, 倉重毅志, 中村 毅, 西原広史, 山脇健盛, 栗栖 薫, 松本昌泰「ステロイド療法が奏功した中枢神経原発リンパ腫様肉芽腫症の1例」 *Brain Nerve.* 2012 Jan;64(1):85-7.
6. 金光宗一, 上野弘貴, 内藤かさね, 関根真悠, 大下智彦, 中村 毅, 山脇健盛, 松本昌泰「両側視床病変が遅発性に出現した悪性リンパ腫関連傍腫瘍性辺縁系脳炎の1例」 *Brain Nerve.* 2012 ;64(1):71-7.
7. Tanitame K, Iwakado Y, Akiyama Y, Ueno H, Ochi K, Otani K, Takasu M, Date S, Awai K. Effect of age on the fractional anisotropy (FA) value of peripheral nerves and clinical significance of the age-corrected FA value for evaluating polyneuropathies. *Neuroradiology.* 2012 54(8):815-21. DOI: 10.1007/s00234-011-0981-9.
8. Ueno H, Kobatake K, Matsumoto M, Morino H, Maruyama H and Kawakami H. Severe brain atrophy after long-term survival seen in siblings with familial amyotrophic lateral sclerosis and a mutation in the optineurin gene: a case series. *Journal of Medical Case Reports.* 2011;5(1):573.

DOI:10.1186/1752-1947-5 -573.

[学会発表] (計0件)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
上野 弘貴 (UENO HIROKI)  
広島大学・病院・病院助教

研究者番号 : 30457238

(2)研究分担者 ( )

研究者番号 :

(3)連携研究者 ( )

研究者番号 :