

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

1. 研究開始当初の背景

エクソソーム(exosome)は、様々な細胞から放出されるナノベシクルであり、特定の分子群を含有・結合し細胞-細胞間連絡を媒介することが知られている。我々は、ニューロン(神経細胞株 N2a)由来のエクソソームに、アルツハイマー病(AD)の原因因子であるアミロイドβペプチド(Aβ)が結合することを明らかにした。また、この結合はエンドグリコセラミダーゼ(EGCase)による糖鎖切断処理で失われることから、エクソソーム表面上に発現するスフィンゴ糖脂質(Glycosphingolipid, GSL)の糖鎖依存的であることを発見した。GSL、特にシアル酸を含む GSL(ガングリオシド)の集積部に Aβ が結合することは、人工脂質膜を用いた研究等で多数報告されている。エクソソーム膜では細胞膜に比べて GSL 糖鎖が高密度に集積しており、このため Aβ が結合しやすい状態にあると考えられる。さらに我々の研究では、ニューロン由来エクソソームが脳内貪食細胞のミクログリアに取り込まれること、エクソソームに結合した Aβ はミクログリア内で分解除去されることを見出した。これらの結果から、エクソソームは、細胞外の Aβ を捕捉してミクログリアまで運搬し除去するという Aβ クリアランス機能をもつことが示唆され、神経細胞由来のエクソソームの投与や産生亢進は Aβ 除去を通してアルツハイマー病治療に繋がる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、エクソソームの Aβ クリアランス機能を利用した AD 治療用リポソーム(人工エクソソーム)の創出を目的として、下の課題を行なった。

(1) 脳細胞由来エクソソームの Aβ 捕捉能力とその分子機構を調べるために、マウス脳から調整したニューロン、ミクログリア、アストロサイトの糖脂質プロファイルを解析した。また、それぞれのエクソソームに対する Aβ の結合性を調べた。

(2) Aβ 除去作用を保持する人工エクソソームの開発を目指し、Aβ 結合性の高いエクソソームと同等の GSL 含量のリポソームを作製した。また作製したリポソームの Aβ 結合能力、Aβ クリアランス能力を評価した。

3. 研究の方法

マウス脳から初代培養細胞を調整した。ニューロンは胎生 15 日の大脳皮質から調整し、培養 1 週間後にエクソソーム回収を行った。グリア細胞(アストロサイト及びミクログリア)は生後 2 日のマウス大脳から調整し、培養 2 週間後に震盪法によりアストロサイトとミクログリアを分離した。分離から 2 日後にエクソソームを回収した。

培養上清からのエクソソームの調整は、超

遠心法を用いて行い、ナノパーティクルアナライザーを用いてサイズと粒子濃度の評価を行なった。

GSL のプロファイル解析は質量分析法を用いた。EGCase によってエクソソームの GSL 糖鎖を切断した後、Glycoblot によって捕捉し、MALDI-TOF MS で解析した。

Aβ 結合の評価は、合成 Aβ1-40 を用い、調整したエクソソームまたはリポソームを試験管内で Aβ と混合した後、一定時間インキュベートし、混合液中で生成したアミロイド繊維をチオフラビン法で定量した。また、ガラス面に吸着させたエクソソームに蛍光標識エクソソームを暴露した後、蛍光顕微鏡観察を行った。

マウス脳へのエクソソーム及びリポソームの投与は、浸透圧ミニポンプと脳インフュージョンキット(Alzet 社)を用いて、脳室または海馬への局所投与を行った。アルツハイマー病モデルマウスは、ヒト APP^{SweInd} 遺伝子導入マウスの 12 月齢を用いた。

リポソームの作製はバルガム法を用いて、GSL とともにコレステロール、スフィンゴミエリンを含有するリポソームを作製した。

4. 研究成果

(1) マウス脳から調整した培養ニューロンとグリア(アストロサイト、ミクログリア)を用いて、エクソソーム GSL 解析を行った。その結果、ニューロン由来エクソソームの GSL 含有量は約 0.62nmol/mg protein であり、アストロサイト(約 0.25nmol/mg protein)やミクログリア(約 0.1nmol/mg protein)と比較して 顕著に高かった。また、GSL プロファイルを見ると、ニューロン由来エクソソーム中には高度にシアル酸の付加された GSL 分子(ガングリオ系列)の含量が高く、シアル酸が 3 個付加した GT1 はニューロン由来エクソソームのみに存在した(図 1)。またニューロンやアストロサイト由来のエクソソームはガングリオ系列が多数を占めるのに対して、ミクログリア由来エクソソームはグロボ系列、ラクト系列が多いという特徴もみられた。

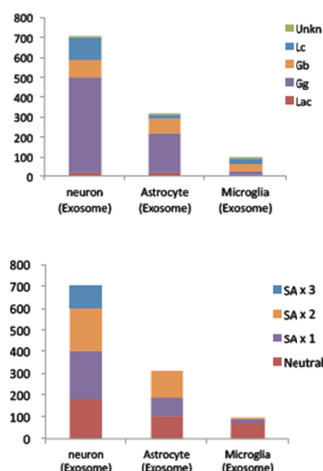


図 1 マウス脳細胞由来エクソソームに含まれるスフィンゴ糖脂質プロファイル (上) 系列別 (下) 付加されるシアル酸の個数別

(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 μ 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 μ 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)糖鎖依存性であると示唆される。

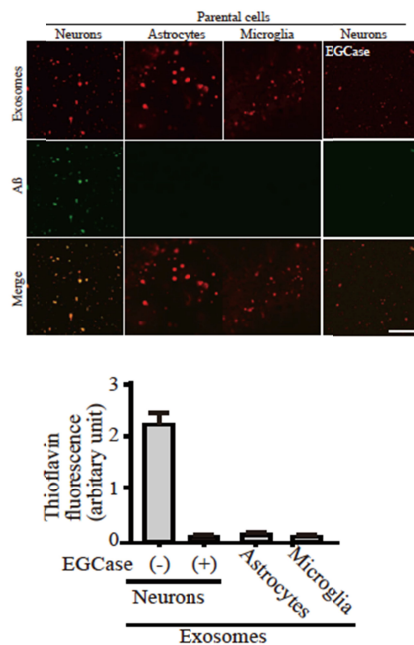


図 2 脳細胞由来エクソソームに対する AB 結合実験(上)と AB アミロイド産生量測定 (下)

(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。

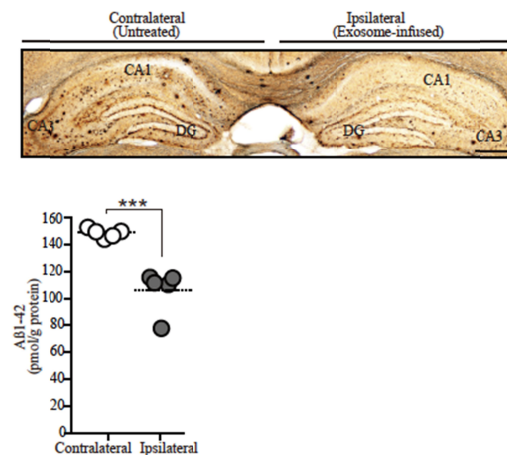


図 3 海馬 AB に対するニューロン由来エクソソーム投与の効果 (上) AB 免疫組織染色、右側が投与側海馬、AB 免疫陽性面積が減少している。(下)海馬組織 AB 濃度

(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- β 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 β 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- β , 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 β 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 β 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