

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14342

研究課題名(和文) 認知症における脳内エクソソームの役割の解明

研究課題名(英文) The role of brain exosomes in cognitive diseases

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・研究部長

研究者番号：80393114

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)：細胞から分泌されるエクソソームは由来する細胞の特徴を反映することから、新たなタイプのバイオマーカー、細胞間情報伝達手段として注目されている。本研究では、マウス凍結脳からのエクソソーム単離法を改良した後に、ヒトの凍結脳からエクソソームを単離できること、脳エクソソームにはニューロン・グリア細胞由来のエクソソームが含まれていること、アルツハイマー病患者の脳エクソソームにはアミロイドが存在することを確認し、ヒト脳におけるエクソソーム研究の基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：Exosomes that are secreted from cells reflect the molecular signature of cells from which they are derived. Therefore, exosomes are considered to be a novel type of biomarker as well as tool for intercellular communication. In the present study, we first improved the isolation method of exosomes from mouse frozen brain tissues. Then, we found that (1) exosomes can be isolated from human brain tissues, (2) brain exosomes consist of those derived from neuron and glial cells, and (3) brain exosomes isolated from the brain of Alzheimer's disease patients contain amyloid beta, providing the basis for exosome research in human brain.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム 認知症 アルツハイマー病

## 1. 研究開始当初の背景

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 40-150 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。エクソソームの表面には細胞膜タンパクが発現し、中には細胞質タンパク・microRNA (miRNA) が含まれる。エクソソームは元の細胞の特徴を反映し、血液・尿等の体液中に存在することから、体液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期待されている。さらに、エクソソーム中のタンパク・miRNA が移入されると細胞機能が変化することから、エクソソームは細胞間情報伝達手段としても注目されている。

我々は、これまでに PSMA (前立腺特異的膜抗原) に対する抗体を用いることにより前立腺細胞由来エクソソームを血液から単離・検出できること、ドセタキセル耐性前立腺がん細胞由来エクソソームで発現が増加しているタンパクとして Integrin  $\beta 4$ 、Vinculin、P-gp 等を報告している。

脳に関連するエクソソームの研究としては、ニューロン由来のエクソソームに APP が含まれること、エクソソームがニューロン・グリア間の情報伝達に関与すること等が報告されていたが、ヒトの脳におけるエクソソームの役割は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、高齢者ブレインバンクに登録されている認知症症例の剖検凍結脳組織からエクソソームを単離した後に、ニューロン・グリア由来のエクソソームを単離し、認知症における脳内エクソソームのバイオマーカー・治療標的としての可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 既報の方法 (J Biol Chem. 2012, 287, 43108-43115、以下従来法とする) と改良法 (後述) に基づきマウス脳組織を処理した後、超遠心法と密度勾配遠心法により脳組織からエクソソームを単離した。

(2) 単離したマウス脳エクソソームにおけるエクソソームマーカーおよびニューロン・ミクログリア・アストロサイト・オリゴデンドロサイトマーカーの発現をウエスタンブロット解析により検討し、電顕による形態観察を行った。

(3) 高齢者ブレインバンクから提供されたヒト凍結脳組織から改良法を用いて脳エクソソーム単離を行い、マウス同様にエクソソームマーカーおよびニューロン・ミクログリ

ア・アストロサイト・オリゴデンドロサイトマーカーの発現を検討した。

(4) 神経病理所見のない症例とアルツハイマー病症例の脳から単離したエクソソームについてアミロイド のウエスタンブロット解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 脳エクソソーム単離法の最適化

従来法 (図 1) で単離したエクソソームについてエクソソームマーカーのウエスタンブロット解析を行った。その結果、Flotillin-2 以外のエクソソームマーカーはほとんど検出されなかった (図 2)。

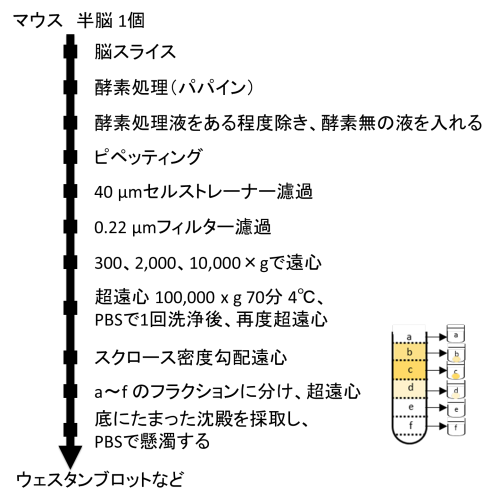


図 1 従来法

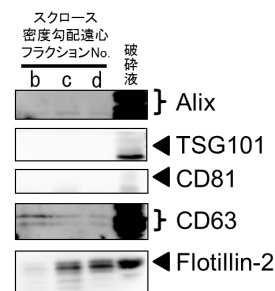


図 2 従来法により調製したエクソソームにおけるエクソソームマーカーの検出

そこで、脳組織の処理方法の改良を試みた。その結果、消化酵素をパパインからコラゲナーゼに変更することにより Flotillin-2 以外のエクソソームマーカーを検出することが可能となった (図 3、4)。

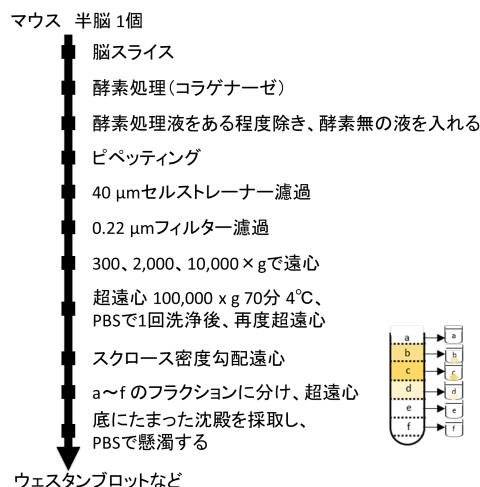


図 3 改良法

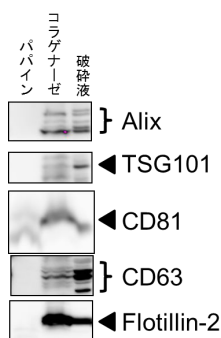


図 4 使用する消化酵素によるエクソソームマーカー検出の差異

(2) 改良法により単離したエクソソームの解析

改良法により単離したエクソソームにおいてエクソソームマーカー(図 5)およびニューロン・ミクログリア・アストロサイト・オリゴデンドロサイトマーカー(図 6)のウエスタンプロット解析を行い、各種マーカーが検出されることを確認した。また、フラクション b・c・dについて電子顕微鏡観察を行い、40-150 nm とされるエクソソームと同程度の大きさの粒子を確認した(図 7)。

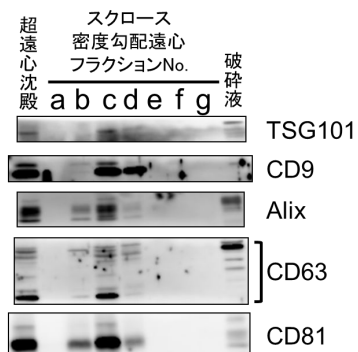


図 5 改良法により調製したエクソソームにおけるエクソソームマーカーの検出

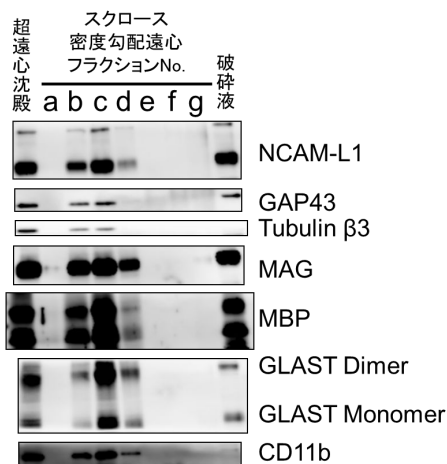


図 6 改良法により調製したエクソソームにおけるニューロン・グリアマーカーの検出  
ニューロン: NCAM-L1, GAP43, Tublinβ3、オリゴデンドロサイト: MAG, MBP、アストロサイト: GLAST、ミクログリア: CD11b

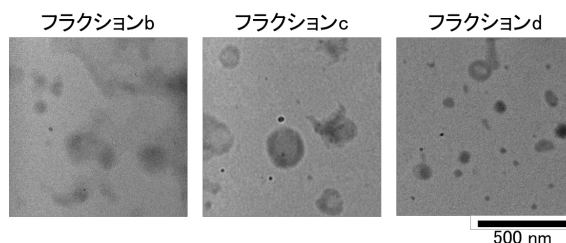


図 7 改良法により調製したエクソソームの電子顕微鏡による形態観察

(3) ヒト凍結脳からのエクソソームの単離

改良法でマウス脳と同様にヒト凍結脳からエクソソームの単離が可能であることを検証した。その結果、エクソソームマーカー(図 8)、ニューロン・グリアマーカー(図 9)がともに検出され、ヒト凍結脳からもエクソソームの単離が可能であることを確認した。

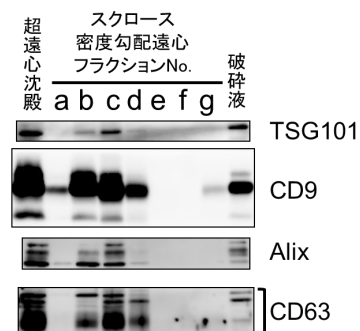


図 8 ヒト脳より単離したエクソソームにおけるエクソソームマーカーの検出

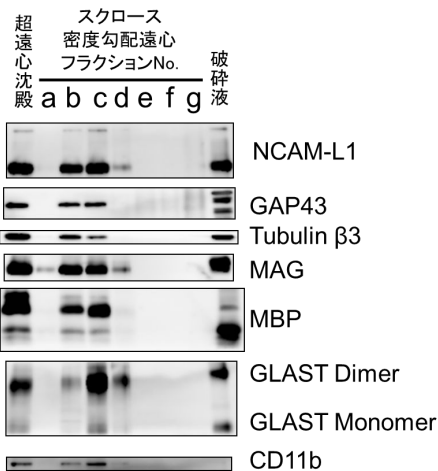


図 9 ヒト脳より単離したエクソソームにおけるニューロン・グリアマーカーの検出

#### (4) アルツハイマー病患者脳からのエクソソームの単離とアミロイド の検出

アルツハイマー病患者の脳エクソソームにアミロイド が存在しているかどうかの検証を行った。神経病理所見のない症例(コントロール)とアルツハイマー病症例の脳からエクソソームを単離し、アミロイド の検出を行った結果、アルツハイマー病患者由来の脳エクソソームのみでアミロイド が検出された(図 10)。

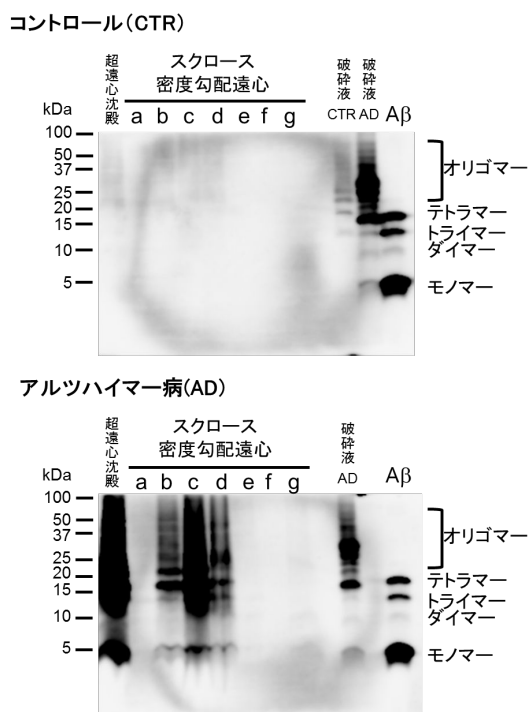


図 10 アルツハイマー病患者脳由来エクソソームにおけるアミロイド の検出

以上の結果から、ヒトの凍結脳からエクソソームを単離できること、脳エクソソームにはニューロン・グリア細胞由来のエクソソームが含まれていること、アルツハイマー病患者の脳エクソソームにはアミロイド が存在することを確認し、ヒト脳におけるエクソソーム研究の基盤を確立した。今後、ニューロン・グリア由来エクソソームを単離し、さらに詳細な解析を行う予定である。

#### 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 3 件)

Kawakami K, Fujita Y, Matsuda Y, Arai T, Horie K, Kameyama K, Kato T, Masunaga K, Kasuya Y, Tanaka M, Mizutani K, Deguchi T, Ito M, Gamma-glutamyltransferase activity in exosomes as a potential marker for prostate cancer, BMC Cancer、査読有、17、2017、316  
doi: 10.1186/s12885-017-3301-x.

Kawakami K, Fujita Y, Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Tsumoto H, Miura Y, Deguchi T, Ito M, Integrin β4 and vinculin contained in exosomes are potential markers for progression of prostate cancer associated with taxane-resistance, Int J Oncol., 査読有、47、2015、384-390  
doi: 10.3892/ijo.2015.3011.

Kato T, Mizutani K, Kameyama K, Kawakami K, Fujita Y, Nakane K, Kanimoto Y, Ehara, H, Ito, H, Seishima, M, Deguchi, T, Ito M, Serum exosomal P-glycoprotein is a potential marker to diagnose docetaxel-resistance and select taxoid for prostate cancer patients., Urol Oncol., 査読有、33、2015、385.e15-20  
doi: 10.1016/j.urolonc.2015.04.019.

〔学会発表〕(計 6 件)

水谷晃輔、川上恭司郎、藤田泰典、堀江憲吾、亀山紘司、伊藤雅史、出口隆、抗 PSMA 抗体ビーズにより採取した前立腺癌関連エクソソームのプロテオーム解析、第 26 回泌尿器科分子・細胞研究会、2017 年 03 月 10 日～2017 年 03 月 11 日、全労済ソレイユ(大分県・大分市)

水谷晃輔、川上恭司郎、藤田泰典、堀江憲吾、亀山紘司、伊藤雅史、出口隆、腎癌細胞株由来 exosome の定量的プロテオーム解析、第 1 回 Liquid Biopsy 研究会、2017 年 01 月 21 日、京王プラザホテル(東京都・新宿区)

川上恭司郎, 藤田泰典, 松田陽子, 新井富生, 堀江憲吾, 亀山紘司, 加藤卓, 榎永浩一, 粕谷豊, 田中雅嗣, 水谷晃輔, 出口隆, 伊藤雅史, エクソソーム上 - グルタミルトランスフェラーゼ活性の前立腺がん前立腺肥大の鑑別における有用性、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日 ~ 2016 年 12 月 02 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Ito M, Kawakami K, Fujita Y, Matsuda Y, Arai T, Horie K, Kameyama K, Kato T, Masunaga K, Kasuya Y, Tanaka M, Deguchi T, Mizutani K, Exosomal gamma-glutamyltransferase activity as a marker for prostate cancer, 2016 ASEM annual meeting, 2016 年 10 月 20 日 ~ 2016 年 10 月 24 日, Asilomar Conference Center, Monterey, USA

川上恭司郎, 藤田泰典, 堀江憲吾, 水谷晃輔, 亀山紘司, 加藤卓, 粕谷豊, 榎永浩一, 松田陽子, 出口隆, 伊藤雅史, エクソソーム上の - グルタミルトランスフェラーゼ活性は前立腺がんのマーカーとなる、第 8 回日本 RNA i 研究会・第 3 回日本細胞外小胞学会、2016 年 08 月 31 日 ~ 2016 年 09 月 02 日、グランドプリンスホテル広島 (広島県・広島市)

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 年 4 月 22 日 ~ 2015 年 4 月 26 日, 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.tmgig.jp/J\\_TMIG/kenkyu/team/rouka\\_biomarker.html](http://www.tmgig.jp/J_TMIG/kenkyu/team/rouka_biomarker.html)

## 6. 研究組織

### (1) 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・研究部長  
研究者番号: 80393114

### (2) 連携研究者

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

藤田 泰典 (FUJITA, Yasunori)  
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: 30515888

田中 雅嗣 (TANAKA, Masashi)  
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・協力研究員  
研究者番号: 60155166

### (3) 研究協力者

藤崎 健人 (FUJISAKI, Kento)