

令和元年6月13日現在

機関番号：82674

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08754

研究課題名(和文) 神経炎症におけるエクソソーム上ヒストンの役割の解明

研究課題名(英文) Mechanism of exosomal histone 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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は神経炎症時に脳内のミクログリアから放出されるエクソソームの特徴を明らかにすることを目的とし、LPS処理し炎症を惹起した培養ミクログリア細胞から放出されたエクソソームのプロテオーム解析を行い、エクソソーム内で発現変化を示すタンパク質を同定した。炎症時に放出されるエクソソームが培養ミクログリア細胞を活性化することを確認した。マウス脳組織内に存在するエクソソームの単離法を改良するとともに、細胞特異的脳エクソソームを免疫沈降法により単離できることを確認した。以上、神経炎症に伴い脳内ミクログリアから放出されるエクソソームの役割の理解に必要な基盤的な情報と方法論を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳内の細胞から放出されるエクソソームの役割はいまだ不明な点が多いが、エクソソームは標的細胞へ到達し、その細胞での遺伝子発現を変化させること等が報告されている。アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患で脳内におこる変化はエクソソームにも影響を与えるものと予想される。今回得られた基盤的な情報と方法論は、神経炎症に伴いミクログリアから分泌されるエクソソームの役割の解明および神経変性疾患の病態の理解に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we aimed to understand the characteristics of exosomes released upon neuroinflammation from microglia in brain. First, we performed proteomic analysis of exosomes released from cultured microglial cells after LPS stimulation and identified proteins whose expressions were altered by the treatment. Second, we confirmed that exosomes released from activated microglial cells activated naive microglial cells. Lastly, we modified and developed exosome isolation methods from mouse brain and also found that cell-specific exosomes can be isolated from mouse brain by the immunocapture method. These findings will provide a basis for understanding the role of exosomes released from microglia upon neuroinflammation.

研究分野：実験病理学

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 50-150 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。近年、エクソソーム内に含まれる RNA やタンパク質が他の細胞に移入されると、その機能が変化することが報告され (J Biol Chem. 2010, 285, 17442)、エクソソームは新たなタイプ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。例えば、オリゴデンドロサイト細胞が神経伝達物質により刺激された時に分泌されるエクソソームが神経細胞に取り込まれると、エクソソーム内の成分が神経細胞内で機能することが示されている (PLoS Biol. 2013, 11, e1001604)。さらには、神経細胞株由来のエクソソームが細胞外のアミロイド を凝集させ、ミクログリア細胞株への貪食を促進することが示されている (J Biol Chem. 2012, 287, 10977)。

我々は LPS によるミクログリア細胞の活性化に伴いエクソソームで発現変化を示すタンパク質をプロテオーム解析により明らかにし、ヒストン分子の増加を見出している。LPS による活性化によりミクログリアから放出されるエクソソームはエクソソーム上のヒストンをはじめとしたタンパク質の変化が、細胞障害性の一因を担っているのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では神経炎症時に脳内のミクログリアから放出されるエクソソームの特徴を明らかにすることを目的として、活性化によりミクログリア細胞から分泌されるエクソソームのタンパク質組成が変化するか、活性化ミクログリア細胞から分泌されるエクソソームに細胞活性化能があるかについて検討するとともに、脳内のミクログリア細胞から放出されたエクソソームを単離するための基礎検討として、脳エクソソーム単離法を改良し、脳からの細胞特異的エクソソームの単離を試みた。

## 3. 研究の方法

### 【活性化ミクログリア細胞由来エクソソームのプロテオーム解析】

- (1) 未処理および LPS、アミロイド または IL-4 で処理した BV2 マウスミクログリア細胞株の培養液から超遠心法によりエクソソームを単離した。
- (2) エクソソームをトリプシンで消化し、ペプチドを iTRAQ 法でラベルした後、プロテオーム解析を行い、それぞれの処理により発現が変化するタンパク質を同定した。

### 【活性化ミクログリア細胞由来エクソソームの細胞活性化能の検討】

- (1) 未処理および LPS 処理した BV2 細胞の培養液から超遠心法によりエクソソームを単離した。
- (2) エクソソームを無血清培地で BV2 細胞に加え、翌日に培養液を回収した。
- (3) 培養液中の TNF- 濃度を ELISA により測定した。

### 【マウス凍結脳からのエクソソームの単離】

- (1) Perez-Gonzalez らの方法 (J Biol Chem. 2012, 287:43108) に基づき脳エクソソームを調製した。凍結脳をスライスしたのち、パパインまたはコラゲナーゼを添加した培養液にて 37 でインキュベートした後、ピペッティングした。
- (2) 40  $\mu\text{m}$  および 0.22  $\mu\text{m}$  のフィルターにかけた後、遠心 (300、2,000、10,000 x g) を行った。
- (3) 遠心後の上清から超遠心法により粗脳エクソソームを単離した。
- (4) 粗脳エクソソームからスクロース密度勾配遠心または免疫沈降法により精製脳エクソソームを単離した。

#### 4. 研究成果

##### 【活性化ミクログリア細胞由来エクソソームのプロテオーム解析】

###### (1) プロテオーム解析によるプロファイリング

無血清培地で培養した BV2 細胞を LPS、アミロイド または IL-4 で処理し、翌日回収した培養液から超遠心法によりエクソソームを単離した。エクソソームをトリプシンで消化してからペプチドを iTRAQ で標識した後、プロテオーム解析を行ったところ、約 1000 個のタンパク質が検出された。定量解析によりそれぞれの処理で発現量が変化するタンパク質を同定した。

###### (2) LPS 刺激により発現誘導されるタンパク質の選抜

LPS、アミロイド または IL-4 で処理した BV2 細胞から放出されたエクソソームで発現変化を示したタンパク質の中から、共通して変化するタンパク質を除き、LPS 処理のみで変化するタンパク質を選抜した。その結果、増加するタンパク質として 11 個、低下するタンパク質として 15 個が同定された (表 1)。

表 1 BV2 細胞由来エクソソームにおいて LPS 処理のみで増減するタンパク質  
左：1.5 倍以上に増加、右：2/3 倍以下に低下

タンパク質名	タンパク質名
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 5	Docking protein 3
Monocyte differentiation antigen CD14	Syntenin-1
Integrin alpha-5	MLV-related proviral Env polyprotein
Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	60S ribosomal protein L27a
Solute carrier family 2, facilitated glucose transporter member 1	Isoform Beta-5B of Integrin beta-5
Cytochrome b-245 heavy chain	60S ribosomal protein L17
Hydroxycarboxylic acid receptor 2	Coiled-coil domain-containing protein 50
Isoform 2 of Sodium bicarbonate cotransporter 3	calpain-5
opioid growth factor receptor	Tetraspanin-14
Beta-parvin	Frizzled-7
Tumor necrosis factor alpha-induced protein 2	60S ribosomal protein L28
	Multivesicular body subunit 12B
	60S ribosomal protein L11
	60S ribosomal protein L15
	arrestin domain-containing protein 1

##### 【活性化ミクログリア細胞由来エクソソームの細胞活性化能の検討】

LPS 処理したミクログリア細胞から放出されたエクソソームがミクログリア細胞を活性化するかを培養液中の TNF- $\alpha$  を測定することにより検討した。その結果、LPS 処理 BV2 細胞由来のエクソソームを添加した BV2 細胞の培養上清では、未処理細胞由来のエクソソームを添加した細胞の培養上清より TNF- $\alpha$  濃度が上昇していた (図 1)。このことから LPS 刺激により放出されるエクソソームにはミクログリア細胞の活性化能があることが分かった。

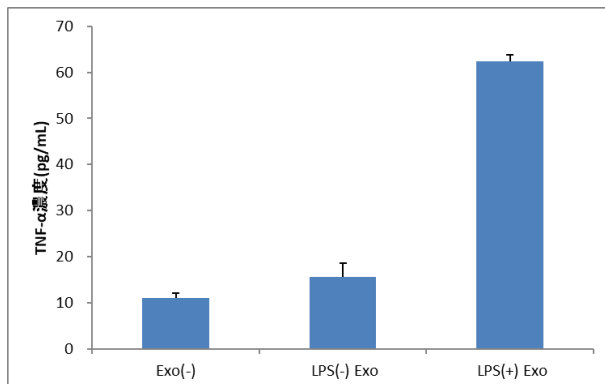


図 1 LPS 処理エクソソーム添加時の培地中 TNF- $\alpha$  濃度  
Exo(-) : エクソソーム未添加、LPS(-)Exo : LPS 未処理細胞由来エクソソーム添加、  
LPS(+ )Exo : LPS 処理細胞由来エクソソーム添加

## 【マウス凍結脳からのエクソソームの単離】

### (1) マウス凍結脳からのエクソソームの単離

脳内のミクログリアから放出されたエクソソームを単離するための基礎検討として、2012年に報告された方法でマウスの凍結脳から脳エクソソームの単離を試みた。しかしながら、ウェスタンブロット解析でエクソソームマーカー等を調べたところ、収量および純度が不十分であることが判明した(図2)。そこで、様々な実験条件を検討した結果、酵素処理の方法を最適化することによりエクソソームの特徴を保持した脳エクソソームを十分量単離することが可能となった(図3)。

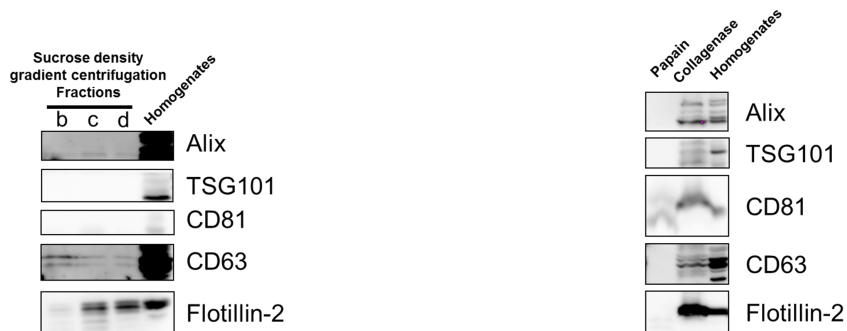


図2 既報の方法による脳エクソソームの単離

図3 改良法による脳エクソソームの単離  
Papain:従来法、Collagenase:改良法

### (2) 免疫沈降による細胞特異的脳エクソソームの単離

細胞特異的脳エクソソームの単離法を確立する目的で、免疫沈降法による単離を試みた。超遠心法により単離した粗脳エクソソームにアストロサイトの表面マーカーであるGLASTに対する抗体を結合させた磁気ビーズを加え免疫沈降した後、ウェスタンブロット解析でCD9を検出した。その結果、精製脳エクソソームにエクソソームマーカーが検出され、アストロサイト特異的脳エクソソームの単離が確認された(図4)。今後、この方法を用いて、脳内のミクログリア細胞から放出されたエクソソームの単離を行う予定である。

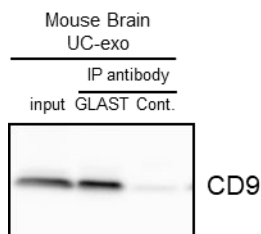


図4 抗GLAST抗体を用いた免疫沈降によるアストロサイト特異的脳エクソソームの単離

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3件)

川上恭司郎、藤田泰典、伊藤雅史、次世代がん検査技術への新しいアプローチ：エクソソームによるがんの診断、*ファインケミカル*、査読無、47、2018、33-38

Kawakami Kyojiro, Fujita Yasunori, Matsuda Yoko, Arai Tomio, Horie Kengo, Kameyama Koji, Kato Taku, Masunaga Koichi, Kasuya Yutaka, Tanaka Masashi, Mizutani Kosuke, Deguchi Takashi, Ito Masafumi, 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

Horie Kengo, Kawakami Kyojiro, Fujita Yasunori, Sugaya Maki, Kameyama Koji, Mizutani Kosuke, Deguchi Takashi, Ito Masafumi, Exosomes expressing carbonic anhydrase 9 promote angiogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*、査読有、492、2017、356-361、DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.08.107.

### 〔学会発表〕(計 10件)

川上恭司郎、藤田泰典、松田陽子、新井富生、西村誠、松川美保、三浦ゆり、津元裕樹、伊藤雅史、膵がん細胞株由来エクソソームを用いたプロテオーム解析による膵がんマーカー探索、第41回日本分子生物学会年会、2018

藤田泰典、川上恭司郎、伊藤雅史、敗血症モデルマウスにおける単球・マクロファージ由

来エクソソームの解析、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

Ito M, Kawakami K, Horie K, Fujita Y, Matsuda Y, Arai T, Kameyama K, Kato T, Masunaga K, Kasuya Y, Tanaka M, Deguchi T, Mizutani K., Gamma-glutamyltransferase activity in exosomes as a marker for prostate and renal cell cancers., International Society for Extracellular Vesicles 2017、2017

川上恭司郎、藤田泰典、伊藤雅史、エクソソームを用いた前立腺がん診断法の開発、第 6 回 TOBIRA 研究交流フォーラム、2017

川上恭司郎、藤崎健人、藤田泰典、吉田雅幸、伊藤雅史、脳エクソソーム単離法の改良とアミロイド の検出、第 9 回日本 RNAi 研究会・第 4 回日本細胞外小胞学会、2017

宮崎優輝、藤田泰典、川上恭司郎、永田喜三郎、伊藤雅史、マクロファージ RAW264.7 細胞から放出されるエクソソームの定量プロテオーム解析、2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会）、2017

藤崎健人、川上恭司郎、藤田泰典、吉田雅幸、伊藤雅史、脳エクソソーム単離法の改良とアミロイド の検出、2017 年度生命科学系学会合同年次大会（第 40 回日本分子生物学会年会）、2017

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と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

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

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 RNAi 研究会・第 3 回日本細胞外小胞学会、2016

〔図書〕(計 1 件)

川上恭司郎、藤田泰典、伊藤雅史、シーエムシー出版、早期発見・予防に向けた次世代がん検査技術の最前線：第 12 章 エクソソームによる泌尿器がんの診断、2019、pp.107-116

〔その他〕

ホームページ等

東京都健康長寿医療センター研究所 (<https://www.tmghig.jp/research/>)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。