

令和 3 年 6 月 28 日現在

機関番号：34509

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06674

研究課題名（和文）覚醒剤・麻薬中毒状態における脳内Exosomeの統合オミクス解析

研究課題名（英文）Multi-omics analysis of brain exosomes on drug abuse

研究代表者

山下 琢矢（Yamashita, Takuya）

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：10645203

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）：4-メトキシアμφエタミン(4-MeO AP)を曝露させたヒト神経細胞由来Exosome (HN-EXO)のプロテオーム解析を実施した結果、AP暴露群と比較して4-MeO AP暴露群において、抗炎症に関与する蛋白質(Thioredoxin-like protein 1, Latexin)の発現上昇が認められた。さらに、両群間におけるHN-EXOのリピドームを解析した結果、4-MeO AP暴露群において、抗炎症に関わる脂肪酸であるドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリンの発現減少が認められた。以上、乱用薬物の種類によって神経細胞由来Exosomeが惹起する炎症応答は異なる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では覚せい剤に類似した構造を持つ薬物が、Exosomeを介して脳内炎症応答を惹起するメカニズムの一端を明らかにした。世界のExosome研究において類似の結果報告はないことから、独自性の高い研究であるといえる。また、危険ドラッグの蔓延は社会問題であり、より強力な法整備を行う上での重要なエビデンスとなるものであり、社会的意義は非常に高い。

研究成果の概要（英文）：Anti-inflammatory related proteins (Thioredoxin-like protein 1, Latexin) expression were increased in exosomes derived human nerve cells on 4-methoxy amphetamine (4-MeO AP) abuse group compare to AP group. Moreover, phosphatidylcholines containing docosahexaenoic acids were reduced in exosomes derived human nerve cells on 4-MeO AP abuse group compare to AP group. In this study, we showed the difference inflammatory response induced by nerve cell-derived exosomes depends on the types of drugs.

研究分野：法中毒

キーワード：Exosome 危険ドラッグ 統合オミクス

1. 研究開始当初の背景

Exosome は直径 50-200 nm の脂質二重膜小胞であり、その脂質膜には産生細胞由来の膜蛋白質が、内部には同細胞由来の蛋白質・ mRNA ・ miRNA などが内包されている。近年、神経培養細胞が産生する Exosome がアルツハイマー病モデルマウスの脳内アミロイド β 濃度を低下させること (Yuyama K et al. J Biol Chem, 2014)、免疫担当細胞由来の Exosome が脳内ミエリン鞘の修復すること (Aya D. Pusic et al. Glia, 2014) など、産生細胞から離れた様々な細胞へ影響を及ぼすことが明らかになりつつある。この特性はがんにおいても顕著であり、日本医療研究開発機構のプロジェクト (国立がんセンター研究所主導) では大腸がんや乳がんなど 13 種類のがん細胞由来 Exosome 特異的な miRNA をバイオマーカーとして組み合わせ、各種がんの超早期診断に結び付けようという試みが今まさに進められており、臨床応用が始まっている。このように、従来までブラックボックスであった細胞間コミュニケーションの情報伝達担体として機能している Exosome はこれまでの生命科学を見直させるパラダイムシフトとなりうる。特に、脳では神経伝達と Exosome による情報伝達が複雑に交差している可能性が高く、その詳細なメカニズムを紐解くためには膨大な基礎科学データの収集・分析が不可欠である。

2. 研究の目的

そこで申請者は「細胞間コミュニケーションの一翼を担う Exosome が脳内においてどのような分子メカニズムによって機能し、生命現象にどの程度寄与するのか？」という学術的問いに挑むべく、本申請研究を考案した。本申請研究では覚醒剤・麻薬中毒状態で放出される Exosome が脳の恒常性に及ぼす影響を統合オミクス (プロテオミクス・リポミクスなど) 解析により明らかにすることを目的とする。現在、精力的に Exosome 研究は進められているものの、その多くは内包される miRNA に着目した研究である。Exosome は標的とする細胞に接着して取り込まれ、内包する分子が生理活性を示すと考えられている。従って、細胞接着の起点となる Exosome の膜蛋白質や膜脂質組成を明らかにすることはもちろんの事、Exosome 内部の蛋白質や脂質関連分子を詳細解析することも Exosome の機能・動態を理解する上で極めて重要である。

3. 研究の方法

使用した乱用薬物

本研究では覚せい剤アンフェタミン (AP) とメタンフェタミン (MA) と麻薬 (MDMA, MDA)、およびフェネチルアミン類 (4-MeO AP, 4-MeO MA, 4-F AP, 4-F AP) を使用した。

ヒト神経細胞由来 Exosome の抽出

ヒト神経芽細胞腫である SH-SY5Y をレチノイン酸とホルボールエステルで神経細胞様に分化させた (ヒト神経細胞モデル) 後、各化合物を添加して、24 時間後の培養上清中 Exosome をポリマー沈殿法により濃縮・抽出した。

Exosome の基礎物性・生理活性評価

Exosome の粒子径を、動的光散乱法と顕微鏡観察で評価した。また、Exosome の粒子数を ELISA 法にて測定した。さらに Exosome 上に発現するマーカー蛋白質分布と炎症関連蛋白質の発現を各蛋白質に対する抗体を用いて解析した。

Exosome に含まれるホスファチジルコリン分子種のリピドミクス解析

各薬物に暴露後のヒト神経細胞から抽出した細胞由来 Exosome に含まれるホスファチジルコリンをメタノール・クロロホルム混液で抽出乾固し、LC-MS/MS 解析した。

4. 研究成果

乱用薬物を暴露したヒト神経細胞由来 Exosome の基礎物性・生理活性評価

まず AP、MA、4-MeO AP、4-MeO MA、4-F AP、4-F MA、MDMA、MDA の 7 種の乱用薬物をそれぞれ暴露したヒト神経細胞由来 Exosome を抽出後、その粒子径を測定した。その結果、粒子径は 100-200 nm で、電子顕微鏡観察でも同様の結果であることが確認できた。次に、その Exosome の粒子数を Exosome のマーカー蛋白質を標的とした ELISA 法で測定した結果、4-MeO AP 暴露群において最も粒子数が減少することが明らかとなった(図 1)。

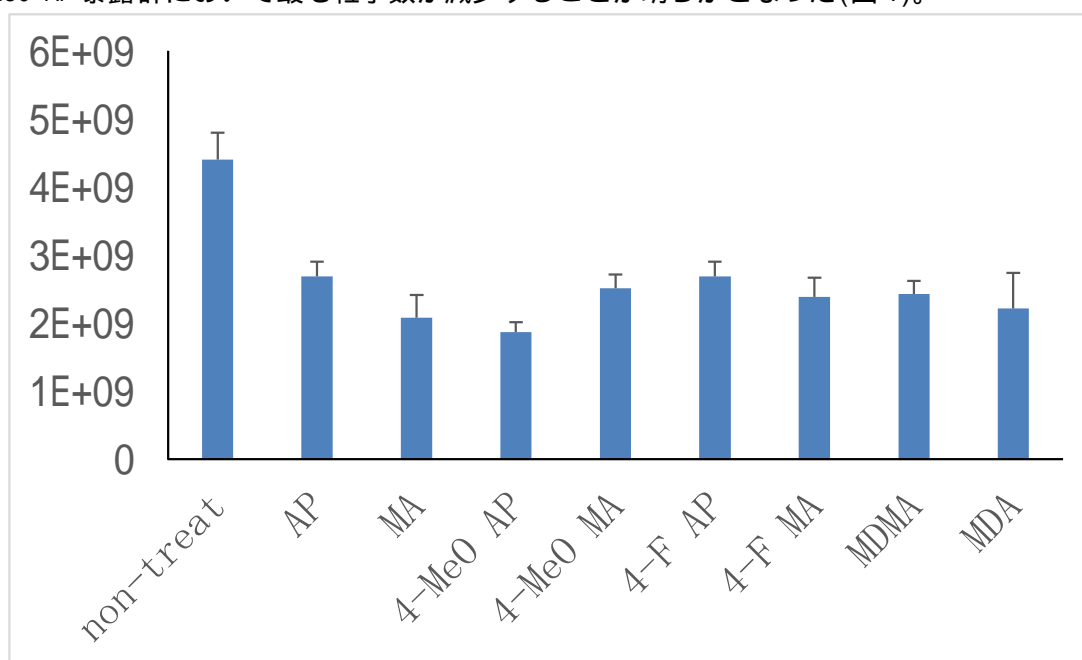


図 1. 乱用薬物によるヒト神経細胞由来 Exosome の粒子数変動評価
(1 × 10⁶ 細胞あたりの粒子数)

そこで、特徴的な表現型を示した 4-MeO AP に着目して、AP と 4-MeO AP 暴露群における Exosome 上のマーカー蛋白質、ならびに炎症関連蛋白質の発現量を評価した。その結果、両群において ALIX やテトラスパニンなど、小胞形成や細胞接着に関わる Exosome マーカー蛋白質が減少しており、さらに、4-MeO AP 暴露群では AP 暴露群と比較して Thioredoxin-like protein 1 や Latexin といった抗炎症に関与する蛋白質の発現が減少していた。

4-MeO AP を暴露したヒト神経細胞由来 Exosome に含まれるホスファチジルコリン分子種のリピドミクス解析

AP と 4-MeO AP 暴露したヒト神経細胞由来 Exosome ホスファチジルコリン分子種 (PC(C16:0/C16:0)、PC(C16:0/C18:1)、PC(C16:0/C18:0)、PC(C16:0/C20:4)、PC(C18:0/C18:1)、PC(C16:0/C22:6)、PC(C18:0/C20:4)、PC(C18:0/C22:6)、PC(C18:1/C20:4)、PC(C18:1/C22:6)、PC(C18:0/C18:0) の 11 種) を LC-MS/MS で解析した。その結果ドコサヘキサエン酸を含むホスファチジルコリン分子種の含有量減少が認められた(図 2)。

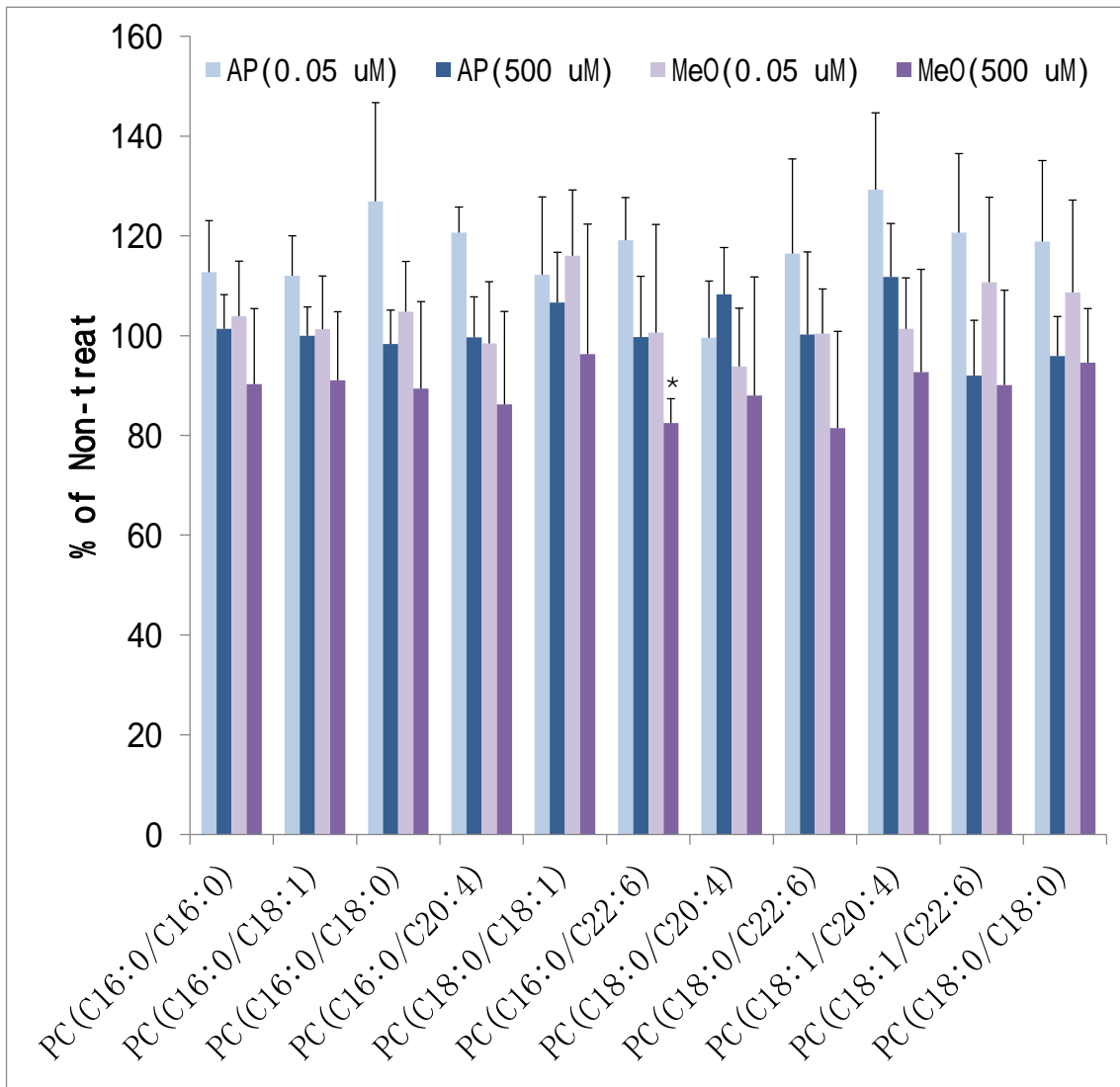


図 2. 乱用薬物によるヒト神経細胞由来 Exosome に含まれるホスファチジルコリン分子種量の比較 (*: <math>P < 0.05</math> vs non-treat)

以上の結果は、覚醒剤・麻薬中毒状態の神経細胞由来 Exosome による脳内の炎症応答惹起、つまり各神経活動の活性化を想起させる。精神依存形成の根幹であるシナプス可塑性の進展と神経炎症は極めて密接な関係があることは既知であるが、覚醒剤・麻薬中毒状態の神経細胞由来 Exosome が脳内の炎症応答を惹起する可能性を示すデータは新規である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 1. Yamashita T, Kamada H, Kanasaki S, Nagano K, Inoue M, Higashisaka K, Yoshioka Y, Tsutsumi Y, Tsunoda S.	4. 巻 74(10)
2. 論文標題 Ephrin type-A receptor 2 on tumor-derived exosomes enhances angiogenesis through the activation of MAPK signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmazie	6. 最初と最後の頁 614-619
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1691/ph.2019.9474	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村田海里, 藤原純平, 山下琢矢, 糟谷史代
2. 発表標題 アンフェタミン類によるヒト神経細胞モデル由来Exosomeの性質変化
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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