

令和 3 年 4 月 19 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2018～2020

課題番号：18KT0072

研究課題名（和文）小胞体ストレス検知システムによる新規難病発症予測法の開発

研究課題名（英文）Prediction of disease progression by analyzing endoplasmic reticulum stress sensor system

研究代表者

細井 徹（Hosoi, Toru）

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・教授

研究者番号：40379889

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）：近年、小胞体ストレスが様々な病気の発症要因となる可能性が報告されている。本研究では、小胞体ストレスによって惹起される生体のストレス応答システムとその検知方法の解明について検討を行った。私たちは、細胞内に比べて細胞外に分泌されるエクソソームに小胞体ストレスで上昇するspliced XBP1が多くの割合で含まれていることを見出した。従って、エクソソームにspliced XBP1が格納されることでストレス伝達に寄与している可能性が示唆されると同時にエクソソームのspliced XBP1を検出することで将来的には生体のストレス状態をモニターできる可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは血液中にも分泌されることから、小胞体ストレス負荷された生体のエクソソームのspliced XBP1を検出することで小胞体ストレスを検知できる可能性があることが示唆された。本発見の応用として、将来的には、未病や小胞体ストレスによる病気の発症を検知できる可能性が示唆された。私たちの実験結果は、培養細胞レベルでの基礎的検討結果であり、今後これらの応用試験の検証を行っていく必要がある。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that endoplasmic reticulum stress may be involved in various diseases. In this study, we investigated the stress response system of the living body caused by endoplasmic reticulum stress and its detection. We found that exosomes secreted extracellularly contained a higher proportion of spliced form of XBP1 that is elevated by endoplasmic reticulum stress compared to intracellular compartment. Therefore, it is suggested that the storage of the spliced form of XBP1 in exosomes may contribute to stress transmission, and at the same time, it may be possible to monitor the stress state of the living body by detecting spliced form of XBP1 in exosomes in the future.

研究分野：中枢神経薬理学

キーワード：小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

様々なストレス負荷に対して、生体は恒常性維持機構を作動させることでホメオスタシスを一定に保とうとする。しかし、生体がこれらのストレス負荷に対応できなくなり、恒常性が維持できなくなった時、病気の発症に至る。したがって、このようなストレスによる生体の応答機構を解明することで、病気の発症機構を明らかにすることができると考えられる。そこで本研究では、生体のストレス応答に共通に関わり、ストレス応答に根源的役割を担う「小胞体」に着目することで、複雑な要因によって発症する様々な病気の発症機序を解明し、病気の発症を事前に検知することを目指した。

2. 研究の目的

生体はストレス環境下では、まず適応反応を引き起こし、ストレス負荷に対して対抗処置機構を作動させる。本研究では、このようなストレス応答の一つとして、細胞内のタンパク質の折り畳みを担うオルガネラである「小胞体」に着目した。小胞体ストレスとは「小胞体内に折り畳み不完全なタンパク質が蓄積した状態」のことを言い、このようなストレスによる異常タンパク質の蓄積は細胞にとって不都合な状態となり、病気の発症に至る。(Science 2011, 334:1081-1086)。実際に、申請者は、新規小胞体ストレス軽減薬が、小胞体ストレスによる肥満や生活習慣病に対して治療効果があることを見出しており、小胞体ストレスと病気の発症は密接に関わると考えられる(EMBO Mol Med. 2014, 6:335-346)。そこで本研究では、「小胞体ストレス」に着目し、ストレス負荷時に「小胞体」を発信基地として惹起される「小胞体ストレス応答」を検知することでの病態検知・解明を目指した。現在、小胞体ストレスによって細胞外へ発せられる小胞体ストレスシグナル分泌システムについては不明な点が多く残されている。そこで今回特に、小胞体ストレスにより細胞外に分泌される因子の同定を試み、小胞体ストレスを検知することを目指した。

本研究では細胞外に遊離される「小胞体ストレス応答シグナル」を血液レベルで検出する方法(エクソソームや miRNA 解析を利用)が解明できれば、病態を未然に検知でき、さらにその応答シグナルによる臓器間コミュニケーションが解明できれば、難病の発症機序解明にも貢献できると考えた。そこで本研究では、ストレスによる細胞外分泌因子を明らかにすることで小胞体ストレス関連疾患の検知・発症機構解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) マウスに小胞体ストレスを誘発させる(小胞体ストレス誘起試薬 tunicamycin 投与)ことにより血液中エクソソームに含まれるタンパク質の発現に関して nano LC-MS/MS 解析を行いタンパク質の同定を行った。さらに、小胞体ストレス誘発試薬により血液中で発現変動する miRNA の網羅的解析を行い、新規小胞体ストレスマーカーの探索を行った。

(2) 培養細胞から分泌されるエクソソームを単離し、エクソソーム中に含まれる小胞体関連分子(XBP1, unspliced XBP1, spliced XBP1)の発現変動を RT-PCR 法で検討した。エクソソームの単離は、ExoQuick-TC を用いて行い、回収の 24 時間前にはエクソソームを枯渇させた FCS で細胞を培養した。小胞体ストレスセンサータンパク質である IRE1 を過剰発現させて活性化させ、XBP1 のスプライシング反応を惹起させた時のエクソソーム中の小胞体関連分子(XBP1, unspliced XBP1, spliced XBP1)の発現変動を検証した。

4. 研究成果

- (1) 小胞体ストレス負荷したマウスの血液中において、発現変動のある因子の探索を試みた。小胞体ストレス負荷は小胞体ストレス誘起試薬であるツニカマイシンを腹腔内投与し小胞体ストレスを誘導させ、24 時間後の血液中において発現変動するタンパク質を検討した。銀染色による解析の結果、いくつかの因子が小胞体ストレスによって変動することが確かめられた。そこで、これらの候補因子について nano LC-MS/MS 解析を行いタンパク質の同定を行った。その後、本候補因子に関して、特異的抗体を用いた解析を行ったが、再現性よく小胞体ストレスによって変動することが確認できなかった。

次にツニカマイシンを腹腔内投与し小胞体ストレスを誘導させ、24 時間後の血液中において発現変動する miRNA のレベルを網羅解析スクリーニングシステムにて検討した。その結果、いくつかの miRNA において小胞体ストレス誘起試薬の処理で誘導もしくは抑制される可能性を示すデータが得られた。そこで今後、これらの因子の発現について確認すべく、個別に設計した miRNA 用のプライマーを用いた qPCR アッセイによる確認を行った。しかし、qPCR アッセイによる確認の結果、網羅解析スクリーニングシステムで挙がってきた因子の再現性をうまく取ることができなかった。別ロットの個体での検討やタイムコースなど小胞体ストレス誘起試薬の処理条件を変えての検討など、様々な検討を行ったが、網羅解析スクリーニングシステムで挙がってきた因子の再現性をうまく取ることができなかった。

- (2) 培養細胞から分泌されるエクソソームにおける小胞体ストレス応答因子の発現を検討した。マウスのすい臓由来細胞である MIN6 細胞のエクソソームにおける XBP1 の発現を検討した。その結果、MIN6 細胞のエクソソームには XBP1 の mRNA が発現しており、XBP1 が取り込まれていることが明らかになった。さらに、MIN6 細胞のエクソソームには、spliced XBP1 がより多く取り込まれることが明らかになった。そこで小胞体ストレスセンサータンパク質である IRE1 を HEK293T 細胞に過剰発現させて活性化させて、XBP1 のスプライシング反応を惹起させた時のエクソソーム中の unspliced XBP1 および spliced XBP1 の発現変動を検討した。その結果、エクソソーム中の XBP1 は細胞中の XBP1 より、多く spliced XBP1 が取り込まれることが明らかになった。

まとめ

マウス個体レベルでの *in vivo* 解析では、個体差などの要因でなかなか再現性よく検出できる因子の同定には至ることができなかった。しかし、培養細胞を用いた検討では、エクソソームに新たに、spliced XBP1 が含まれることが明らかになった。エクソソームは血液中にも存在している。従ってこれらのことより、小胞体ストレスにより血液中に分泌されたエクソソームに spliced XBP1 が多く含まれることでストレス応答・ストレス伝播に関わる可能性もある。すなわち spliced XBP1 は細胞内においては転写因子として作用してストレス応答に関わることから、分泌されたエクソソーム因子 (spliced XBP1) が他の細胞に取り込まれてストレス応答を惹起している可能性も考えられる。これらの検討事項は今後の課題と考えられる。本検討結果により、血液因子による小胞体ストレス検知システム開発の基盤となる結果が提供できたと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bastawy EM, Ahmed RR, Abd El-Hafeez AA, Abd El-Hady FK, Hosoi T, Ozawa K, El-Ganzuri MA.	4. 巻 71
2. 論文標題 Grapefruit juice exerts anti-osteoporotic activities in a prednisolone-induced osteoporosis rat femoral fracture model, possibly via the RANKL/OPG axis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cytotechnology	6. 最初と最後の頁 769-783
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10616-019-00321-6	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 該当する

1. 著者名 Hosoi T., Nakashima M., and Ozawa K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Incorporation of the Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Spliced Form of XBP1 mRNA in the Exosomes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 1357
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2018.01357.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hosoi T., Kimura H., Yamawaki Y., Mori K., and Ozawa K.	4. 巻 508
2. 論文標題 Immobilization stress induces XBP1 splicing in the mouse brain.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 516-520
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.167	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 與田 優香理, 細井 徹, 中島 美衣子, 松浦 武典, 小澤 光一郎
2. 発表標題 臍臓 細胞のアルツハイマー病関連神経細胞死への影響
3. 学会等名 第58回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藏本滉平, 細井 徹, 田中景吾, 野村靖幸, 小澤光一郎
2. 発表標題 p62とアミロイド前駆体蛋白質 (APP) のC末端断片を発現させたときに起きる凝集体および小胞形成
3. 学会等名 第135回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田 萌々恵, 松浦 武典, 細井 徹, 松崎 周, 杉山 礼隆, 児玉 尚士, 小澤 光一郎
2. 発表標題 ストレス負荷によるグリア細胞からのadenosine遊離と神経細胞におけるレプチン抵抗性形成機構の解析
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤颯斗, 細井 徹, 長谷川由貴, 松村奈美, 小澤光一郎
2. 発表標題 病態時におけるグリア-ニューロンインターアクションを介した肥満発症機構の解明 レプチン抵抗性のメカニズムの解明
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中島 美衣子, 細井 徹, 與田優香理, 小澤 光一郎
2. 発表標題 膀胱 細胞由来エクソソームの神経細胞死抑制効果の検討
3. 学会等名 第134回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018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
---------	---------