

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2019～2020
 課題番号：19K23943
 研究課題名（和文）抗体に依存しない血中神経由来EV分離法を用いた認知症血液バイオマーカーの開発

 研究課題名（英文）Development of blood biomarkers for dementia using antibody-independent isolation of neuron-derived EVs in blood

 研究代表者
 赤嶺 祥真（Akamine, Shoshin）

 大阪大学・キャンパスライフ健康支援センター・特任助教（常勤）

 研究者番号：00846222
 交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は血中の細胞外小胞(EV)から、大きさ・密度という物理的特性に基づいて神経由来のEVを分離する手法を開発するものである。大きさ基準の分離法はサイズ排除クロマトグラフィー分画法(SEC法)を、密度基準の分離法はイオジキサノール密度勾配分画法(IDG法)を採用した。SEC法は従来と同水準の分離能であったが、IDG法の高解像度化に成功し、従来よりも細かく血漿中のEVを分画する事が可能となった。その結果、ひとつの神経由来蛋白が特定の分画中にもみ存在している事が分かった。これは、神経由来EVが「特定の密度・サイズ」を有しており、他の血漿EVと異なる物理的性質を持つことを示していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 認知症や統合失調症などの精神神経疾患は、脳脊髄液検査や頭部MRI検査などの侵襲性やコストが高い検査のみ実用化されており、血液を用いた身体への負担が低い検査は殆ど存在しない。血液中に微量に存在する神経由来の細胞外小胞(EV)を分離し、その内容を解析する事で、脳で起きている変化を血液検査で窺い知る事が出来るようになる。神経由来EVの分離には主に抗体を用いたアプローチがなされてきたが、非特異的な結合が大きな課題であった。本研究ではこのような非特異的結合に関する問題を密度・サイズによる分離という別の角度から解決しようと試み、神経由来EVの存在する密度帯・サイズ帯を特定した。

研究成果の概要（英文）：This research aims to develop a method to separate neuron-derived extracellular vesicles (EVs) from blood based on physical characteristics (i.e., size and density). The size-exclusion chromatography fractionation (SEC) method was used for size-based separation, and the iodixanol density gradient fractionation (IDG) method was used for density-based separation. The SEC method has the same level of separation performance as the conventional method, but the IDG method has succeeded in achieving higher resolution, making it possible to fractionate EVs in plasma more finely than before. This improvement made it possible that particular neural-derived protein was detected only in specific fractions. This result may indicate that neuron-derived EVs have a "specific density and size" and have different physical properties from other plasma EVs.

研究分野：神経科学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム 認知症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞 (Extracellular Vesicle; EV) は、細胞から放出される 50 ~ 1000nm 程度の大きさの小胞であり、脂質二重膜構造を持ち、蛋白や核酸を含む。EV 放出機構はほぼ全ての細胞に共通して存在し、生理的には細胞間コミュニケーションや物質輸送に利用されていると考えられている。分泌する細胞によって EV 中の蛋白や脂質などの内容構成は異なっており、また EV 自身の大きさや密度も親細胞により異なる。

EV は末梢血中にも存在するが、中でも中枢神経系由来 EV に注目が集まっている。EV の構成物は脂質二重膜で守られ外環境の影響を受けにくいいため、親細胞の状態を反映していると考えられている。従って、末梢血中の神経細胞由来 EV (Neuron-Derived EV; NDE) を分離精製する事ができれば、末梢血から中枢の神経細胞の状態を推し量る、「脳のリキッドバイオプシー」が可能となる。(Ravi et al. NEJM 2018)

血液から NDE を分離するためには、血液に大量に含まれる非 EV 性蛋白や脂質を除去し、かつ中枢神経系以外に由来する EV も取り除く必要がある。現在提唱されている NDE 分離法は、ポリマー沈殿法により血中 EV を濃縮し、その後神経膜蛋白の L1CAM をターゲットとした免疫沈降で NDE を分離するものである。しかしこの分離法では NDE のみならず非神経性 EV や蛋白も共分離されてくるため、精度の高い解析が困難となっている。これは免疫沈降法と EV の性質の相性によるものである。EV は界面活性剤により容易に破壊される。免疫沈降法では界面活性剤による洗浄で非特異的結合を減らす戦略が通常採られるが、NDE 分離ではこれを用いる事ができず、その結果純度が低下する。

EV を分離する際には一般的に超遠心法が用いられてきた。しかし、超遠心法にも 2 つの問題点が存在する。1 点目は、血漿を超遠心処理すると、同時に可溶性蛋白や一部のリポ蛋白 (LDL コレステロールなど) も分離されてしまうことである。2 点目は、神経由来 EV と他の臓器由来 EV を分取できないことである。既存の手法では「EV の純粋な分離」および「神経由来 EV の分離」を両立する事が非常に困難となっている。

2. 研究の目的

本研究では、末梢血から「大きさ」と「密度」という互いに異なる物理的性質により EV を高精度に分画し、「どの大きさ・密度の範囲において神経 EV が存在するか」を明らかにする。具体的には、「大きさ」に基づくサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 法による分画と、「密度」に基づくイオジキサノール密度勾配遠心 (IDG) 法による分画を組み合わせることで二次元的な分画を構成し、神経特異的蛋白の存在量比から神経 EV 分画を特定する。これにより、抗原抗体反応に依存せず、非特異的な蛋白混入が少ない NDE 分離法を開発する。

3. 研究の方法

健常成人の血液を、サイズ排除クロマトグラフィーおよびイオジキサノール密度勾配遠心を用いて「大きさ」と「密度」の 2 つの物理的性質で分画する。

EV は蛋白や脂質とは大きさまたは密度が異なる。また EV 自体も、由来する細胞により大きさと密度が異なる。この二つの性質を利用し、「EV と蛋白・脂質を分離する」と「NDE と他の臓器由来 EV を分離する」ことを同時に達成できるようになる。

更に、分離した EV を「大きさ」と「密度」に基づいて細かく分画する。EV の大きさや密度は親細胞種によって異なると考えられるため、これにより特定の細胞集団に絞った EV 解析が可能となる。

(1) EV 分離・分画法の高解像度化

IDG 法の高解像度化の検討

”tilted tube rotation” 法を用いて従来の EV 用 IDG 法の高解像度化を試みた。この手法は機械を用いて無段階の密度勾配を形成する手法で、解像度および再現性の高い密度勾配分離を実現する事が可能となる。

SEC 法の高解像度化の検討

市販の SEC カラム (qEV original) を用いて高解像度化を試みた。

(2) 分画した EV の蛋白分析

NDE 分画の特定

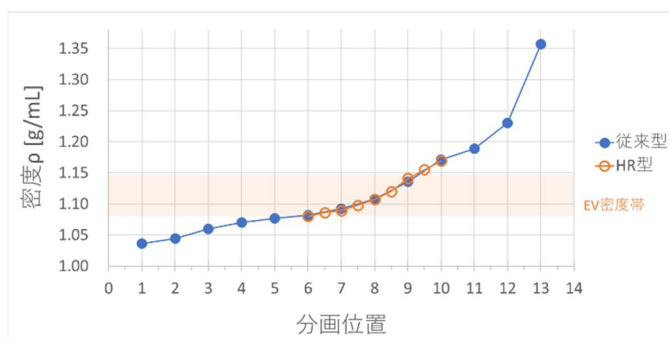
複数の分画のうち、神経特異的な蛋白が存在している分画を immunoblot により探索した。神経特異的な蛋白の候補は、血漿 EV を高純度に分離しプロテオーム解析した既報のデータから、Human Proteome Atlas などの外部データベースを用いて脳特異的・神経特異的なものを探索し、標的として用いた。

NDE 分画中の tau 量の測定

神経細胞の主な骨格蛋白のひとつである tau に注目し、この存在量を超高感度 ELISA である Simoa platform を用いて測定した。

4. 研究成果

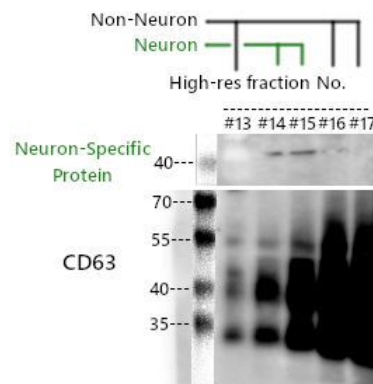
まず、"tilted tube rotation" 法を用いて IDG 法の高解像度化を試みた。EV の密度帯である 1.08-1.13g/mL を分離幅として、密度媒体であるイオジキサノールの濃度や密度勾配の形成パラメータを最適化し、CD9 や CD63 などの EV 関連蛋白によりその性能を検証した。その結果、血漿 EV の存在する密度帯を 9 分画に細分する事が再現性をもって可能であることが分かった。



次いで SEC 法の最適化を試みたが、IDG 法に比べて市販カラムを用いた SEC 法による分画では分離能が十分でなく、部分的な改善にとどまった。そのため、高解像度化 IDG 法を主に

採用し、従来型 SEC 法を補助的に用いることで血漿からの神経由来 EV 分離を試みた。

その結果、1つの神経由来蛋白(エンドソーム由来、細胞内に局在)を血漿 EV の特定分画において immunoblot を用いて検出することができた。血中には大量の非神経由来 EV が存在するが、神経由来 EV 分画のピーク(神経由来蛋白によって評価)と非神経由来 EV のピーク(CD63 によって評価)は異なっていた。このことから、神経由来 EV と非神経由来 EV の密度帯が異なっており、本分画法がこれらを分離するのに有効であることが示唆された。



次いで血漿中神経由来 EV 分画のバイオマーカー化を試みるため、IDG 法で分離した神経由来 EV 分画中の tau 濃度測定を試みた。一定の蛋白量が得られたがその中の tau は定量限界未満であった。血漿 EV を SEC 法により分離して高感度 ELISA 法測定すると血漿 EV 中 tau は定量可能であったため、IDG 法の収率が SEC 法に比べて低いと考えられた。

本研究では血漿中に神経由来 EV が存在する事を IDG 法により検証し、神経由来蛋白が検出できる事を示した。この分画法により神経特異的なバイオマーカー開発が更に推進されるものと期待される。今後は血漿中から得た神経由来 EV 分画の蛋白構成を更に分析し、主に存在する神経由来蛋白を特定しそのバイオマーカー化を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 赤嶺 祥真, 丸谷 典子, 柳田 寛太, 金山 大輔, 工藤 喬
2. 発表標題 ヒト血漿中におけるEVIに保護された神経タウ蛋白の存在証明
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会学術集会
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
---------	---------