

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23700435

研究課題名（和文）

神経細胞由来エクソソームの脳内除去機構

研究課題名（英文）

Clearance of neuronal exosomes in brain

研究代表者

湯山 耕平 (YUYAMA KOHEI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・特任助教

研究者番号：80415546

研究成果の概要（和文）：エクソソームは、様々な細胞から放出される細胞外ナノ顆粒であり、脳神経細胞からも分泌される。エクソソームには細胞機能に不要なタンパク分子が多く含まれ、その役割の一つは不要物質の廃棄であると考えられている。本研究では、細胞の外に出されたエクソソームを処理する脳内の機構を明らかにすることを目的として、培養細胞およびマウスを用いた実験によって、エクソソームの取り込み細胞を検索した。その結果、脳内貪食細胞のミクログリアが、エクソソームの取り込みとエクソソーム結合分子の分解除去に関与していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Exosome is a subtype of extracellular vesicle, released from various cells including brain neurons. A well known function of exosome is to remove obsolete or misfolded proteins from cells, however, the mechanism how exosomes are processed in extracellular space of brain remained unclear. In this study, we searched type of cells, which can uptake neuronal exosomes, and found that microglia can uptake the exosomes and degrade the exosome-associated proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経化学・神経薬理学

キーワード：エクソソーム、中枢神経系、アルツハイマー病

1. 研究開始当初の背景

エクソソーム(exosome)は、さまざまな種類のほ乳類細胞から放出・分泌される直径 50-100 nm の二重膜の細胞外顆粒である。形成経路の概略は図 1 に示すように、まずエンドソーム膜の一部が内腔側への陥入し、intraluminal vesicle (ILV) となり、multivesicular body (MVB) と呼ばれる多胞体が形成される。続いて、通常 MVB はリソソームまで輸送され融合し ILV はリソソーム中で分解されるが、MVB の一部は細胞表面まで運ばれ細胞膜と融合し、その結果、ILV が細胞の外へ放出される。この細胞外に出さ

れた ILV がエクソソームと呼ばれる。近年、数種の神経細胞由来の細胞株、初代培養脳神経細胞から放出されること(Faure et al, *Mol. Cell. Neurosci.* **31**, 642-8, 2006)、また脳脊髄液(羊)から検出されることが報告され、神経細胞からのエクソソーム放出が明らかとなっている。また、初代培養神経細胞からのエクソソーム放出は脱分極刺激により亢進し神経活動依存的であることが報告されているが、その放出の生理的意義については現在不明である。ただエクソソーム放出量が、エンドサイトーシス経路が障害されてエンドソーム内に未分解分子が蓄積された条件下

で、顕著に増加すること、またそれらの未分解蛋白質、脂質がエクソソームに結合していることが見いだされており(Yuyama et al, *J. Neurochem.* **105**, 217-24, 2008, Vingtdex et al, *J. Biol. Chem.* **282**, 18197-205, 2007)、エクソソーム分泌が細胞内分解経路の障害から自身を守る役割を担う機構であるとの考察がなされている。分裂能をもたない分化細胞である神経細胞を、分解系の障害から救済するための機能として、この機構の存在は興味深い。しかし、一旦脳内で細胞外へと放出されたエクソソームの運命については報告がない。分解系に障害を負った神経細胞から出されたエクソソームの場合、不要になった未分解の分子が結合しているため、親細胞以外の細胞がエクソソームを回収、処理する役割を担っている可能性が考えられる。

また神経細胞由来のエクソソームには、神経変性を引き起こす数種の蛋白質が結合していることが報告されている。アルツハイマー病の主要病理である老人斑の構成分子アミロイド β 蛋白質 (A β , Rajendran et al, *PNAS* **103**, 11172-7, 2006)、パーキンソン病関連蛋白質である α -synuclein (Emmanouilidou et al, *J. Neurosci.* **30**, 6838-51, 2010)、クロイツフェルト・ヤコブ病の原因分子であるプリオン蛋白質 (PrP, Fevrier et al, *PNAS*, **101**, 9683-8, 2004)である。特に A β に関しては、神経細胞モデルの分化型 PC12 細胞から放出されるエクソソームが、神経毒性の高い重合 A β の形成を促進することが明らかとなっている (Yuyama et al, *J. Neurochem.* **105**, 217-24, 2008)。本研究課題では、エクソソーム除去の役割を担う細胞種が明らかとなった場合、これらエクソソーム結合性の神経変成疾患関連蛋白質の分解・除去に関しても解析を行う。これら疾患関連分子の新規分解経路が明らかとなった場合、創薬・治療法開発に役立てることができると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景をふまえ本研究課題では、脳神経細胞由来エクソソームの脳内除去機構を明らかにする目的で、培養神経細胞由来のエクソソームを採取し、それらを取り込み・分解する脳内細胞種を同定する。また、その細胞へのエクソソームの取り込み機構を解析する。さらにエクソソーム結合性の神経変性疾患関連分子(A β 等)の、エクソソーム取り込み細胞での分解・除去について解析を行い、疾患の病態形成機構および治療への応用について考察する。

3. 研究の方法

(1) 神経細胞由来エクソソームの回収

神経細胞腫 Neuro2a (N2a)およびマウス大

脳皮質初代培養ニューロン(調整後7日)の培養性から連続的な超遠心によりエクソソームを回収した。

(2) 培養細胞を用いたエクソソーム取り込み細胞の検索と取り込み機構の解析

N2a または初代培養ニューロン由来のエクソソームを、PKH26 を用いて蛍光標識した。蛍光標識エクソソームを、ミクログリア由来細胞株 BV-2、ラット初代培養ミクログリア、マウス大脳皮質初代培養ニューロンに暴露し、37°C、3時間インキュベートした後、取り込まれたエクソソームを共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。得られた蛍光像をもとに画像解析で細胞内蛍光強度を解析し、エクソソームの取り込み量を算出した。

取り込み細胞種を同定した後、エクソソーム表面に存在するガングリオシド GM1 (GM1) および phosphatidylserine (PS) を、それぞれコレラ毒素 B サブユニット (CTB) およびアネキシン V (AV) で結合させることでマスクし、取り込みへの影響を解析した。

(3) マウス脳へエクソソーム注入によるエクソソーム取り込み細胞種の解析

PKH26 標識 N2a 由来エクソソームを、マウス脳海馬部位へインジェクションし4時間放置した後、脳を摘出し切片を作製した。脳切片を、ニューロン、ミクログリア、アストロサイトのマーカー抗体を用いて免疫組織染色し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。エクソソーム蛍光が、各マーカー抗体で染色されたどの細胞種と共局在しているか観察した。

(4) エクソソーム結合性 A β の代謝に関する解析

合成 A β 40 および A β 42 を、エクソソームと混合した後5時間インキュベートし、エクソソーム結合性 A β を作製した。このエクソソーム結合性 A β を、エクソソーム取り込み細胞に暴露させた後、細胞への A β 取り込み量を ELISA 法で測定した。

4. 研究成果

(1) 神経細胞由来エクソソーム

N2a およびマウス大脳皮質初代培養ニューロンを用い、培地交換から48時間後に培養上清中のエクソソームを、連続的な遠心(Thery et al, *Curr. Protoc. Cell. Biol.*, **3**, 1-29, 2006)により回収した。このエクソソーム画分からは、エクソソームマーカーの蛋白質(Alix, Tsg101)およびガングリオシド GM1 (GM1) が検出された。また、この画分を密度分離したところ、これまで報告されているエクソソームの密度と同等の画分から Alix、Tsg101、GM1 が回収されることを確認した。さらにこの画分を電子顕微鏡観察したところ、直径30~100nmの二重膜顆粒であった(図1)。この粒子サイズは動的光散乱装置を用

いた解析によっても確認された。これはこれまで報告されているエクソソームの粒子径と一致する。N2a およびマウス大脳皮質初代培養ニューロンのマーカー分子含有量、密度、形態および粒子径はほぼ同等であった。

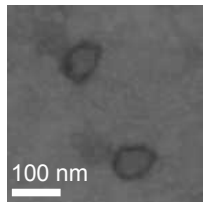


図 1. N2a 由来エクソソーム

(2)エクソソーム取り込み細胞

(1)で回収したエクソソームを、生細胞染色用の脂質親和性試薬 PKH で蛍光標識した。取り込み細胞候補として、由来細胞であるニューロンと脳内食細胞であるミクログリアを選び、実験には、マウスミクログリア由来細胞株 BV-2、ラット初代培養ミクログリア、マウス大脳皮質初代培養ニューロンを用いた。これらの細胞の培養液に標識エクソソームを添加、3時間インキュベートした後、固定して蛍光観察を行った。その結果、BV-2 と初代培養ミクログリアでエクソソーム蛍光が観察された。ニューロン内ではこの蛍光はほとんど観察されなかった(図2)。神経細胞由来エクソソームの取り込みは、主としてミクログリアが担っていると考えられる。

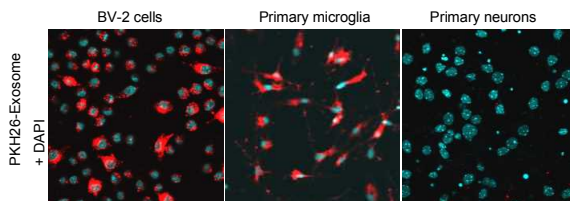


図 2. ミクログリアによる神経細胞由来エクソソーム(赤色)の取り込み

培養系の実験で明らかになったミクログリアの取り込みが、生体内でも起こっていることを確認するために、PKH 標識エクソソームのマウス脳へのインジェクション試験を行った。標識エクソソームを野生型マウス脳の海馬部位にマイクロインジェクションし、4時間飼育室内に放置した。その後、パラホルムアルデヒド溶液を用いて還流固定を行い、脳を摘出した。海馬部位を横断する面の組織切片を作成し、ニューロンマーカーの betaIII tubulin、ミクログリアマーカーの Iba1、アストロサイトマーカーの GFAP に対する抗体で蛍光染色を行った。蛍光観察の結果、エクソソーム蛍光は、Iba1 蛍光と顕著に共局在していた。tubulin および GFAP との共局在はほとんど観察されなかった。神経細胞

由来エクソソームは、生体内(脳内)においてもミクログリアに取り込まれることがわかった。

(3)エクソソームの取り込み機構

ミクログリアによるアポトーシス細胞の取り込みは、細胞表面の PS を、グリアに発現

する受容体が認識して行われる。最近の研究で、免疫細胞由来のエクソソーム表面(脂質二重層の外側)に PS が発現していることが報告された。今回の研究で、神経細胞由来のエクソソーム表面における PS の存在の有無を確認するために蛍光標識した PS 結合蛋白 AV で染色したところ顕著な蛍光が観察された。この結果から、エクソソーム表面に PS が存在することがわかり、次にこの PS がミクログリアへの取り込みに関与するかどうか試験を行った。PKH 標識 N2a 由来エクソソーム表面の PS を AV によって予め被覆し、ミクログリア(BV-2 および初代培養ミクログリア)への取り込みに対する影響を観察したところ、AV 処理によって、取り込みが有意に抑制された(図3)。CTB を用いたエクソソーム表面に発現している GM1 の被覆は、取り込みに影響を与えなかった。これらの結果から、部分的にはあるが、神経細胞由来エクソソームのミクログリアへの取り込みには PS が関与していると考えられる。

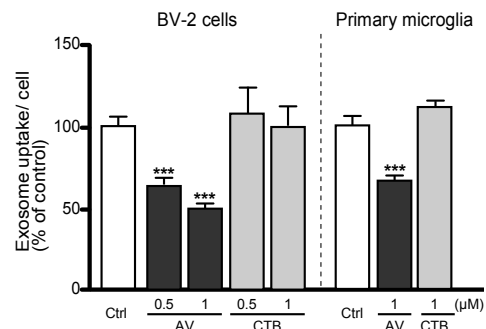


図 3. 神経細胞由来エクソソームのミクログリアへの取り込みにおけるフォスファチジルセリン(PS)の関与

(4)エクソソーム結合性 AB のミクログリアでの分解

まず始めに今回の研究課題では、神経細胞由来エクソソームと AB との結合の有無を解析した。エクソソームを吸着させたスライドガラスに、蛍光標識 AB 溶液を滴下し一定時間 37°C でインキュベートした。洗浄後、蛍光観察を行ったところ、エクソソームには明らかに AB (AB1-40 および AB1-42) が結合した。また、エクソソームと合成 AB モノマーを試験管内で混合した後、一定時間インキュベートし、混合溶液中の重合した AB、アミロイド線維化した AB の濃度を、アミロイド標識蛍

光試薬であるチオフラビンを用いて測定した。その結果、神経細胞由来エクソソームは混合した AB の線維化を促進させることがわかった。また、この AB とエクソソームの混合物を電子顕微鏡で観察したところ、エクソソームとともに典型的なアミロイド線維が観察され、線維断端がエクソソーム表面と接している像も観察された(図4)。これらの結果から AB はエクソソームと相互作用し、少なくとも一部はアミロイド線維のかたちでエクソソームと結合し存在することがわかった。

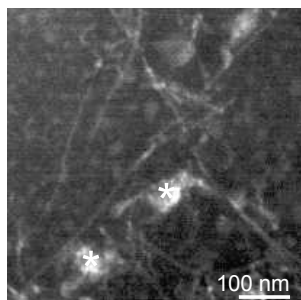


図4. エクソソームによる AB の線維化
*; エクソソーム

次に、AB を、エクソソームと混合した状態としない状態でミクログリア培養系に添加し、一定時間インキュベートした後、取り込まれた AB 量を測定し比較した。その結果、エクソソームと混合した AB の取り込み量は、エクソソーム無しと比べて大幅に増加した(図5)。この結果は、エクソソームが、AB のミクログリアによる取り込みを促進することを示している。

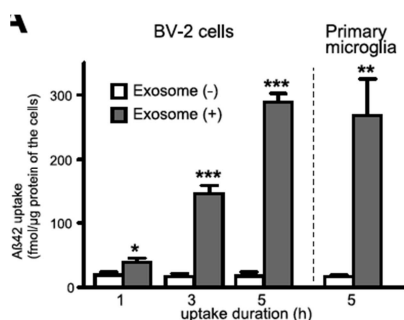


図5. エクソソームによるミクログリアへの AB 取り込みの促進

今回の研究からは、(1)神経由来エクソソームはミクログリアに選択的に取り込まれること、(2)AB が神経由来エクソソーム表面に吸着された状態でミクログリアに取り込まれ分解処理されることが、明らかになった。(2)の結果は、脳内における AB の新規クリアランス機構の存在を示唆するものである。アルツハイマー病の日本における患者数は、

100 万人規模で存在し、加齢性疾患という性質上、高齢化社会の発展に伴い患者数はさらに増加すると推定されている。さらに、これらの疾患は認知症が付随することから社会への負担も大変大きく、高齢化社会のピークを迎える 2050 年前後に確実な社会実装効果をもたらすために、診断・治療法開発のための早急な研究が必要である。本研究では、アルツハイマー病の発症メカニズムの中核である脳内 AB 濃度の増加に影響を与える可能性のある因子として、エクソソームを見出した。今回得られた知見を応用すると、新たなメカニズムに基づく(例えば、エクソソームの産生量調節)治療法、創薬の開発につながることを期待できる。

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 1 件)

Yuyama K., Sun H., Mitsutake S., and Igarashi Y. (2012) Sphingolipid-modulated exosome secretion promotes clearance of amyloid- β by microglia. *J. Biol. Chem.* 287(14):10977-89 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① 湯山耕平, 孫慧, 光武進, 五十嵐靖之. セラミド代謝依存性エクソソーム分泌がアミロイド β 蛋白質分解に与える影響. 第 5 回セラミド研究会学術集会 (2012. 10. 11) (ユビキタス協創広場 CANVAS, 東京)

② Kohei Yuyama, Hui Sun, Susumu Mitsutake, Yasuyuki Igarashi. Sphingolipid-modulated exosome release supports clearance of Alzheimer's amyloid. The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care (2012. 10. 2) (Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan)

③ 湯山耕平, 柳澤勝彦. 神経細胞 endocytosis 障害による GM1 ガングリオシド誘導性アミロイド β 蛋白質重合の促進 第 29 回日本認知症学会 (2011. 11. 6) (ウインク愛知・愛知県名古屋)

④ Kohei Yuyama, Yasuyuki Igarashi. Sphingolipid metabolism modulates exosome release from neurons: Its involvement in degradation of Alzheimer's amyloid. The 9th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care (2011. 9. 29) (Hokkaido University, Sapporo, Hokkaido, Japan)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：アミロイドβ 関連疾患用の医薬とそのスクリーニング技術

発明者：湯山耕平、五十嵐靖之、光武進、吉田哲也

権利者：北海道大学、塩野義製薬(株)

種類：特許

番号：J111137193

出願年月日：平成 23 年 10 月 14 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://biomem.pharm.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

湯山 耕平 (YUYAMA KOHEI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院

・特任助教

研究者番号：80415546

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし