

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 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：2013～2014

課題番号：25890012

研究課題名(和文) 神経系exosomeに内包する新規レビー小体認知症関連ncRNAの同定と機能解明

研究課題名(英文) Identification and elucidation of functional relationship between neuronal exosomal ncRNA and Lewy body dementia

研究代表者

河原 裕憲 (Kawahara, Hironori)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員

研究者番号：00424177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：Exosomeは種々の細胞から分泌される小胞であり、神経系においても新たな細胞間情報伝達手段であると考えられている。しかし、特に刺激依存的なneuronal exosomeの伝播・情報伝達機構は全く明らかにされていない。そこで、マウス初代神経培養からIP3刺激依存的に分泌されるexosomeから新規lncRNAsと蛋白質を網羅的に同定した。さらに、Rpn1がexosomeを介した α -synucleinの伝播と伝播先のglia細胞での発現増強を誘導する分子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Exosome is not only signal small vesicle which is utilized as cell-cell communication in various cells but also in neuronal cells. However, it remains unclear that the mechanisms by which neuronal exosomes are propagated within neuronal cells, particularly under IP3-stimulation. Novel lncRNAs (long non-coding RNAs) and proteins which were incorporated into IP3-stimulated exosomes were identified in mouse primary neurons. α -synuclein was efficiently incorporated into exosomes by Rpn1, and then efficiently transferred to glia cells via exosomes.

研究分野：神経科学一般

キーワード：exosome α -synuclein IP3 ncRNA 脳神経疾患

1. 研究開始当初の背景

(1) レビ - 小体型認知症は第二の認知症と言われ、アルツハイマー病に次いで、約 20%の割合を占める。病理所見は中脳黒質や橋の青斑核にレビ - 小体と呼ばれる封入体が観察され、不明瞭ながら大脳でもみられる。このレビ - 小体の主要成分として同定されたのが、 α -synuclein 蛋白質である (Spillantini et al, Nature, 1997)。しかし、 α -synuclein 封入体の蓄積やその分子作用機序には不明な点が多い。よって、レビ - 小体型認知症の治療薬開発につながる基礎臨床研究が必要であり、重要な因子の α -synuclein に注目した。これまで α -synuclein 過剰発現細胞株に Ca^{2+} 透過剤である ionomycin 添加によって放出される exosome 内に α -synuclein が存在する報告があった (Emmanouilidou et al, J Neurosci, 2010)。この exosome 内に miRNA を含む non-coding RNA (ncRNA) も内包されているが、その機能解析は殆ど行われていなかった。

2. 研究の目的

「 IP_3 - Ca^{2+} signal \rightarrow neuronal exosome \rightarrow 神経系細胞間情報伝達」機構を明らかにする。

(1) マウス初代神経細胞由来の neuronal exosome に内包する ncRNAs を同定し、neuronal exosome を介して放出され glia を活性化する ncRNA を同定し、その分子機序を明らかにする。

(2) 多面的アプローチとして、 IP_3 刺激によりマウス neuronal exosome に内包される蛋白質を同定し α -synuclein と挙動を共にする蛋白質の機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 新規 ncRNA と蛋白質の探索 ; IP_3 刺激でマウス neuronal exosome に選択的に内包され

てくる ncRNA (lncRNA も含む) 蛋白質を次世代シーケンス、質量分析でそれぞれ網羅的に探索した。

(2) Glia 活性 ncRNA、蛋白質の選定 ; まずは exosome を受け取ったマイクログリア細胞の活性化を指標に、 IP_3 刺激由来 exosome に内包されている蛋白質の同定を qPCR によって解析した。

(3) *in vivo* での解析 ; Rpn1 の Tg マウスを作製し組織学的解析を行う。また、患者脳脊髄液中の exosome を精製し、内在する RNA を qPCR で解析した。

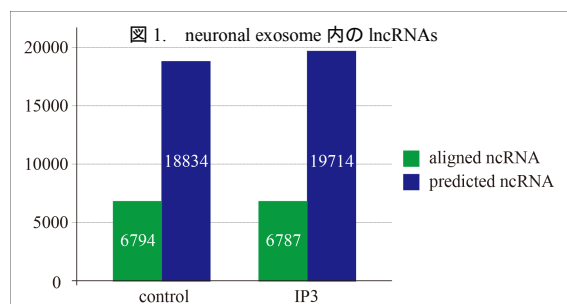
4. 研究成果

(1) 新規 lncRNA の同定 ;

マウス初代神経細胞を大量に培養して、 IP_3 刺激を加えそこから放出される exosome を回収した。その後 RNA を精製し、bioanalyzer で解析した結果、1000bp 以下の短い RNA が顕著に内包されていた。また、これらは RNase 処理後の exosome から回収されたことから、実際に exosome 内在性の RNA であった。

そこで、これらを次世代シーケンサーによって網羅的に解析した (図 1)。

結果、アライメントできた lncRNA は非刺激群 (control) と IP_3 刺激群でそれぞれ 6794 種と 6787 種だった、またゲノム配列から予想される lncRNA はそれぞれ 18834 種と 19714 種に上った。

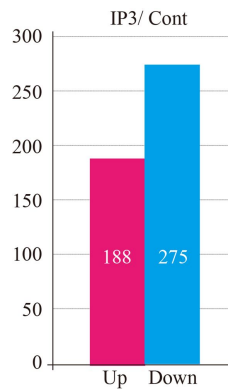


さらに、 $\text{FDR} \leq 0.001$ & $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$ の範

図内で IP₃ 刺激群と非刺激群の発現異差は図 2 の通りで、刺激群で増加した lncRNA は 188 種で減少は 275 種だった。

Log2Ratio の上位 32 種の内 94% は新規 lncRNA であり、全てクローニング完了し、glia 細胞活性化 lncRNA を同定中である。

図 2. neuronal exosome 内の lncRNAs のうち IP₃ 刺激群で増加、減少したものの



(2) 多面的アプローチから、先行した結果で、IP₃ 刺激由来 exosome に内包される蛋白質として Rpn1 を同定した。Rpn1 は刺激依存的に α -synuclein RNA を exosome にリクルートした。この機能は Rpn1 が exosome 内で Ribonucleoprotein 複合体 (RNP complex) を形成することが IP-qPCR (免疫沈降 - 定量 PCR) などから明らかとなった。

さらに、Rpn1 によって exosome が伝播した先の glia 細胞 (マイクログリア、オリゴデンドロサイト) で α -synuclein の発現が増強された。

また、Rpn1 の Tg マウスを作製し、脳内での α -synuclein の発現を確認中であり、Rpn1 Tg において glia 細胞で α -synuclein の発現が増強されうる傾向が観察されており、現在、 α -synuclein Tg とのダブル Tg でも確認中である。

一方、パーキンソン病患者由来脳脊髄液から exosome を精製し RNA を抽出した結果、 α -synuclein RNA が対象群と比べて顕著に増加していた。

以上より、Rpn1 が α -synuclein に関して「IP₃ -

Ca²⁺ signal → neuronal exosome → 神経系細胞間情報伝達」を担う重要な分子であることを強く示唆された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

河原 裕憲, 奥野 龍禎, 望月 秀樹, 華山 力成 “神経系エキソソームを介した新規グリア細胞応答因子の探索” 第 37 回 神経科学学会 2014 年 9 月 11 日 横浜市

河原 裕憲, 奥野 龍禎, 望月 秀樹, 華山 力成 “神経系エキソソームを介した新規グリア細胞応答因子の探索” 脳内環境 夏の workshop 2014 年 7 月 24 日 名古屋市

河原 裕憲, 華山 力成 “神経系エキソソームを介した新規グリア細胞応答因子の探索” 脳内環境 夏の workshop 2013 年 8 月 29 日 京都市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

河原 裕憲 (KAWAHARA HIRONORI)
大阪大学・免疫学フロンティア研究センター
ー・研究員
研究者番号：00424177

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし