

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713020

研究課題名(和文)分泌膜小胞エクソソームの生理機能と標的細胞の解明

研究課題名(英文)Physiological functions of exosomes and identification of their target cells

研究代表者

華山 力成(Hanayama, Rikinari)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：40403191

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは様々な細胞が放出する膜小胞で、分泌細胞と標的細胞の間で蛋白質やRNAなどを受け渡す媒体である。特に脳神経系においてエクソソームは種々の細胞から放出されるが、私達は神経細胞から放出されたエクソソームが、脳内の免疫細胞であるミクログリアに補体成分C3を発現させることにより、神経軸索・シナプスの剪定を促進することを見出した。また、エクソソームの膜表面に露出しているリン脂質ホスファチジルセリンと特異的に結合するTim4蛋白質を用いることで、高純度なエクソソームを再現性よく回収する方法の開発に成功し、従来の方法では同定できなかった数多くのエクソソーム上の蛋白質やRNAの同定を可能にした。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are membrane vesicles released by various cells and are thought to deliver proteins, RNAs, etc. between secretory cells and target cells. In particular, exosomes are released from various cells in the cerebral nervous system (CNS), but we have found that exosomes released from neurons promote pruning of neuronal dendrites and synapses by inducing complement C3 in the target microglia, immune cells in CNS. In addition, we succeeded in developing a novel method for isolating highly purified exosomes with high reproducibility by using Tim4 protein that specifically binds to the phospholipid phosphatidylserine exposed on the surface of exosomes, which lead to the identification of many proteins and RNAs on exosomes that had never been identified by the conventional isolation methods.

研究分野：免疫学、神経免疫学、細胞生物学

キーワード：エクソソーム 神経細胞 ミクログリア 神経免疫応答 シナプス剪定 高純度精製法

1. 研究開始当初の背景

近年、免疫細胞や神経細胞など多くの細胞がエクソソームと呼ばれる直径 30-100nm の小型膜小胞を放出することにより、離れた細胞まで情報を伝達する機構が注目されている。エクソソームは脂質二重膜に囲まれた膜小胞で、分泌細胞由来の膜蛋白質と細胞質成分で構成され、分泌細胞と標的細胞の間で蛋白質や脂質を交換する重要なメッセンジャーであると考えられているが、その生理機能はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

エクソソームには生体内抗原や抗原ペプチド/MHC 複合体が含まれており、細胞間での抗原情報の交換や免疫細胞の活性化など様々な免疫応答を制御する可能性が示されている。更にエクソソームの内側には、分泌細胞由来の mRNA や microRNA が存在することが明らかとなり、細胞間の遺伝情報伝達や腫瘍細胞による免疫抑制誘導に関与すると考えられている。ところが、これらの実験では培養上清から精製し濃縮されたエクソソームが用いられており、このような現象が生体内で本当に起きているのかは未だに分かっていない。そこで本研究では、(1)生体内におけるエクソソームの生理機能と標的細胞を解明するとともに、(2)今後のエクソソーム研究に有用なエクソソームの高純度精製法の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1)脳神経系には、神経細胞やアストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアなどの様々な細胞が存在するが、いずれの細胞もエクソソームを放出する。私達は、これらの細胞が放出したエクソソームが、いずれの場合でも脳内の免疫細胞であるミクログリアを主な標的細胞にしていることを見出した。ミクログリアは、神経軸索や神経シナプスの刈り込み(剪定)を行うことで、発生過程における神経回路網の再構築のみならず、学習や記憶などに関わる脳の可塑性に関与していると考えられているが、エクソソームがミクログリアの刈り込み能を制御するかどうかは不明である。そこで、まず培養細胞系でこの過程の再構築を試みる。未分化の PC12 細胞(神経細胞系の培養細胞株)を神経成長因子(NGF)存在下の無血清培地で培養すると、軸索が伸長しシナプス様の構造を形成する。その後、培地から NGF を抜くと軸索変性が引き起こされる。NGF を抜いた無血清培地では軸索変性だけでなく細胞も死滅するが、血清入りの培地に置換すると、軸索変性のみが生じ、細胞は生存して再び増殖する。そこでこの系を用いて、PC12 細胞とミクログリア細胞株(MG6)を共培養し、MG6 細胞に変性軸索を貪食させることで、軸索剪定を引き起こさせる。次に、神経細胞由来のエクソソームを MG6 細胞に加えるこ

とで、MG6 細胞の軸索剪定能にどのような影響を及ぼすかを検討する。

(2) 現在エクソソームの精製には、超遠心法や PEG 沈殿法などによる濃縮が行われているが、これらの方法は不純物も一緒に濃縮する為、エクソソームの蛋白質や RNA の解析には不適當であり、高純度に精製する方法が求められている。エクソソームの脂質二重膜では膜リン脂質ホスファチジルセリン(PS)が外側に露出しており、PS 受容体である Tim4 が特異的に結合する。そこで、Tim4 の細胞外領域にヒト抗体 Fc 領域を結合した融合蛋白質を作成し Protein A ビーズと架橋する事により、エクソソームのアフィニティー・ビーズを作製する。Tim4 の結合はカルシウム依存的である為、結合したエクソソームは EDTA により溶出可能である。この方法を用いて、マクロファージや脂肪細胞が放出するエクソソームを培養上清から精製し、蛋白質や RNA を質量分析や RNA シークエンス、マイクロアレイにより同定する。

4. 研究成果

(1)生体内で軸索やシナプスの剪定は神経活動依存的に生じることが知られている為、塩化カリウム刺激で PC12 細胞から放出されるエクソソームの効果を検討した。すると、このエクソソームをあらかじめ取り込んだ MG6 細胞は、軸索剪定能が亢進することが分かった。そこで、DNA マイクロアレイを用いて、エクソソームによって MG6 細胞に発現誘導された遺伝子を探したところ、補体成分である C3 が顕著に誘導された。実際に、抗 C3 阻害抗体を MG6 細胞に作用させると、エクソソームによる軸索剪定能の亢進を阻害した。以上の結果から、神経細胞から放出されたエクソソームが、脳内の免疫細胞であるミクログリアに補体成分 C3 を発現させることによって、軸索・シナプス剪定を促進することが明らかになった。以前より、発生過程のシナプス競合において、勝者が敗者を淘汰する為に、punishment signal を放出すると考えられているが、本研究によりその実体は、神経活動依存的に放出されたエクソソームではないかという可能性を示した。

(2)Tim4 アフィニティー法を用いて、ヒト白血球細胞から放出されたエクソソームを精製し、その純度を超遠心法や PEG 沈殿法により精製したエクソソームと比較したところ、Tim4 アフィニティー法は他の方法に比べ 10~100 倍以上に高純度なエクソソームを再現性よく回収できることが明らかとなった。その結果、これまで同定することができなかったエクソソーム上の蛋白質や RNA を数多く同定することが可能となった。以上の結果から、Tim4 アフィニティー法の有用性が示され、エクソソームを簡易かつ高純度に精製する方法の開発に成功した。

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5件)

Matsuzaki K, Fujita K, Jingushi K, Kawashima A, Ujike T, Nagahara A, Ueda Y, Tanigawa G, Yoshioka I, Ueda K, Hanayama R, Uemura M, Miyagawa Y, Tsujikawa K, Nonomura N. MiR-21-5p in urinary extracellular vesicles is a novel biomarker of urothelial carcinoma. Oncotarget. 14969 (2017) 査読有

Song, Hanayama R. Mechanisms of lysosomal exocytosis by immune cells. Chronic Inflammation. Miyasaka M. and Takatsu K. ed. (Springer) 369-375 (2016) 査読有

Nakai Y, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N, Naruse K, Sadamura Y, Hanayama R. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. Sci Rep. 6, 33935 (2016) 査読有

Bahrini I, Song J, Diez D, Hanayama R. Neuronal exosomes facilitate synaptic pruning by up-regulating complement factors in microglia. Sci Rep. 5, 7989 (2015) 査読有

Hanayama R. Autoimmune Diseases and the Role of MFG-E8. MFG-E8 and Inflammation. Wang P. ed. (Springer) 97-117 (2014) 査読有

[学会発表](計15件)

華山 力成
自己炎症疾患の発症機序とエクソソームの役割
第52回 インスリン研究会, 特別講演, 東京 2017年2月4日

華山 力成
神経系エクソソームの機能と病態
第9回 金沢脳腫瘍セミナー, 特別講演, 金沢 2017年1月28日

Hanayama R.
Mechanisms of hemophagocytosis and heterolysis by phagocytes.
第45回 日本免疫学会大会, シンポジウム, シンポジウム, 沖縄 2016年12月7日

華山 力成
神経系エクソソームを介した認知症・運動障害の発症機序
第51回 慶応ニューロサイエンス研究会, シンポジウム, 東京 2016年10月29日

華山 力成
エクソソームを介した多系統萎縮症の発症機序
パーキンソン病コンgres, シンポジウム, 京都 2016年10月7日

華山 力成
神経由来エクソソームによるグリア細胞の機能制御とその病態
第89回 日本生化学会大会, シンポジウム, 仙台 2016年9月25日

Hanayama R.
Regulation of glial functions by neuronal exosomes and its disorder
第3回 日本細胞外小胞学会, 招待講演, 広島 2016年9月1日

華山 力成
神経由来エクソソームによるグリア細胞の機能制御とその病態
第2回 シヌクレイン研究会, 特別講演, 大阪 2016年7月25日

華山 力成
免疫細胞と健康寿命
第58回 日本老年医学会学術集会, 特別講演, 金沢 2016年6月9日

華山 力成
神経由来エクソソームによるグリア細胞の機能制御とその病態
日経バイオテクセミナー, シンポジウム, 東京 2016年6月6日

華山 力成
神経由来エクソソームによるグリア細胞の機能制御とその病態
第121回 日本解剖学会総会, ランチョンセミナー特別講演, 福島 2016年3月29日

華山 力成
貪食細胞による自己炎症疾患の発症機序
第68回 筑波大学免疫学セミナー, 招待講演, 筑波 2016年3月17日

華山 力成
貪食細胞による自己炎症疾患の発症機序
第1回 Diabetes and Cardiovascular

Disease Conference, 特別講演, 東京
2016年1月22日

Hanayama R.

Mechanisms of hemophagocytosis and
heterolysis by phagocytes.

7th IFRc International Symposium,
シンポジウム, 大阪 2016年1月21日

華山 力成

神経由来エクソソームによるグリア細胞の機能制御とその病態

BMB2015, ランチョンセミナー特別講演, 神戸 2015年12月1日

〔図書〕(計7件)

吉田 孟史、**華山 力成**, 第3章 エクソソームによる貪食細胞への生理作用
パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線 (NTS) 99-106
(2017)

河原 裕憲、**華山 力成**, 第2章 神経系エクソソームによる細胞間情報伝達
パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線(NTS)81-8 (2017)

吉田 孟史、**華山 力成**, エクソソームの生理的機能の解明に向けた基盤技術の開発
十全医学会雑誌 (2017)

華山 力成, エクソソームによる免疫機能の制御機構
Labcab (理科研) 18:5-7 (2017)

華山 力成, エクソソーム:エクソソームを介した神経突起剪定の制御機構
脳内環境辞典 (メディカルドゥ) 32-3
(2017)

華山 力成, 免疫系におけるエクソソームの役割
和光純薬時報 (和光純薬) 84(1) :1-4
(2016)

石止 貴将、**華山 力成**, マクロファージによる慢性炎症応答:血球貪食症候群の発症機序
BIO Clinica 慢性炎症と疾患 (北隆館) 4(2):3-6 (2015)

〔産業財産権〕

出願状況 (計1件)

名称: Tim タンパク質結合担体、当該担体を用いた細胞外膜小胞及びウイルスの取得方

法、除去方法、検出方法並びに当該担体を含むキット

発明者: **華山力成**、他3名

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-246876,
PCT/JP2015/083505

出願年月日: 平成26年12月5日

国内外の別: 国内及び国外

取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://immunology.w3.kanazawa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

華山 力成 (HANAYAMA, Rikinari)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授

研究者番号: 40403191

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

河原 裕憲 (KAWAHARA, Hironori)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・助教

吉田 孟史 (Yoshida, Takeshi)

金沢大学・医薬保健研究域医学系・助教

中井 渉 (NAKAI, Wataru)

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任研究員

石止 貴将 (ISHIDOME, Takamasa)

大阪大学・生命機能研究科・大学院生

宮竹 佑治 (MIYATAKE, Yuji)

大阪大学・医学系研究科・大学院生