

128. 神経変性疾患に対する血液由来バイオマーカーの開発

武内 敏秀

*京都大学 化学研究所 生体機能設計化学研究領域

Key words : 神経変性疾患, エクソソーム, シャペロン, バイオマーカー

緒言

アルツハイマー病 (AD)、パーキンソン病 (PD)、ポリグルタミン病 (PolyQ 病) などの神経変性疾患は、いずれも有効な治療法に乏しい難病である。高齢化社会を迎えた我が国においては、これら疾患患者数の大幅な増加が予想されており、診断・治療法の開発が急務である。とりわけ神経変性疾患に対するバイオマーカーは、疾患状態の定量的評価を可能とすることで新薬開発に重要な役割を担うことが期待されるだけでなく、早期治療介入による先制医療の実現に必須であることから、その開発が強く求められている。

多くの神経変性疾患では、タンパク質の凝集・蓄積が疾患の発症に深く関与する。近年、このタンパク質凝集を引き起こす要因として、原因タンパク質自身の凝集性遺伝子変異に加え、生体内プロテオスターシス維持機構の機能低下が考えられている。これは、分子シャペロンやユビキチン-プロテアソーム分解系、オートファジー分解系などに代表される、タンパク質凝集を抑制する生体内防御機構であるが、加齢や疾患に伴うその機能低下が疾患発症や病態進行に密接に関わることが報告されている¹⁾。

以前、著者らは、エクソソームと呼ばれる細胞外小胞の一種が、生体内プロテオスターシスの維持に重要な役割を果たしていることを報告した²⁾。エクソソームは、血液や尿中に豊富に存在し、タンパク質や miRNA など様々な生理活性分子を内包していることが知られている。このような背景から、神経変性疾患において、特に血液中エクソソームの分泌状態や内包分子の変容が明らかとなれば、エクソソーム分泌の生体防御的役割に着目した初めての血液バイオマーカー開発の可能性が拓かれる。そこで本研究では、神経変性疾患モデルを用い、疾患におけるエクソソーム分泌の変容を明らかにすることを目的として実験を行った。

方法および結果

神経変性疾患の一つである PolyQ 病は、ほぼ単一の遺伝的要因のみが大きく発症に関わることから、他の神経変性疾患と比較して、発症や病態進行における環境因子の影響が小さく、分子生物学的解析に適している。また PolyQ 病は、特定の遺伝子変異の導入によりヒト疾患病態を再現するノックインマウス (脊髄小脳変性症 1 型) がすでに樹立されており³⁾、これを解析することでヒト病態に近い結果が期待できる。そこで本研究では、神経変性疾患として PolyQ 病に注目し、その細胞およびマウスモデルを用いて疾患におけるエクソソーム分泌の変容を調べた。

1. エクソソーム分泌数の解析

ドキシサイクリン (Dox) の制御下に凝集性 PolyQ 融合タンパク質 Q81-EGFP を発現する Tet-On 型 HEK293 細胞 (Q81-EGFP-HEK 細胞) を樹立し、その細胞培地から超遠心法によりエクソソーム画分を精製した (図 1A、B)。対照として、凝集性をほとんど示さない短鎖 PolyQ 融合タンパク質を発現する細胞 (Q19-EGFP-HEK 細胞) も樹立し、同様にエクソソーム画分を精製した。これらのエクソソーム画分に対し、ナノ粒子解析装置 NanoSight を用いて粒子数および粒子径の測定を行った。その結果、Q81-EGFP を発現する細胞の培地から得られたエクソソーム画分中には、Q19-EGFP 発現細胞と比較して、エクソソームに相当する粒子径の粒子がより多く検出された (図 1C)。また、Q81-EGFP-HEK 細胞においては、Dox の添加により Q81-EGFP を発現させた場合にのみ、エクソソーム分泌数の増加が観

*現所属：大阪大学 大学院医学系研究科 神経難病認知症探索治療学寄附講座

察された (図 1D)。このことから、凝集性 PolyQ タンパク質を発現する細胞において、エクソソーム分泌が亢進していることが示唆された。

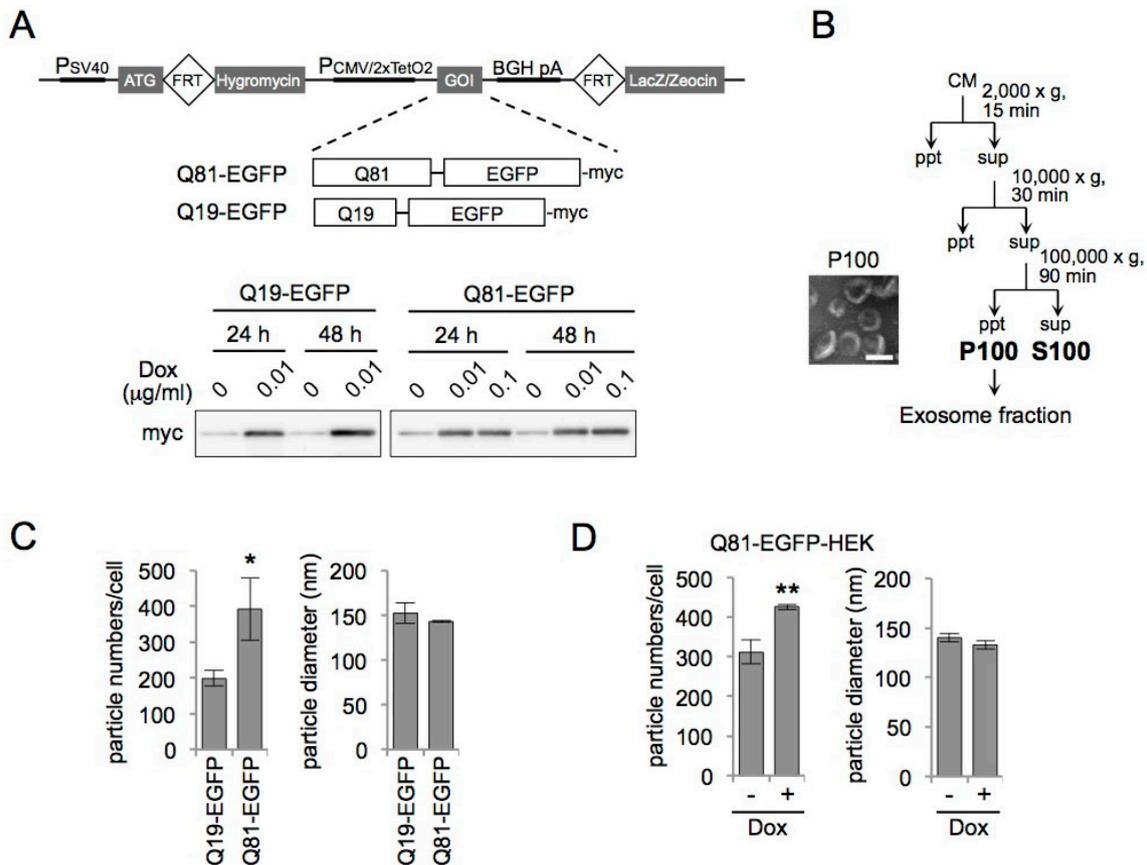


図 1. エクソソーム分泌数の解析

(A) ドキシサイクリン (Dox) の制御下に PolyQ タンパク質 (Qn-EGFP, n=81 or 19) を発現する HEK293 細胞株 (上)。Dox の添加による PolyQ タンパク質の発現誘導を確認した (下)。(B) 超遠心法によるエクソソームの精製プロトコール。超遠心後に得られるペレット画分 (P100) にエクソソームが濃縮される (左下の透過型電子顕微鏡写真、Scale bar: 100 nm)。(C) PolyQ 発現細胞由来エクソソーム画分に含まれる粒子数 (左) と粒子径 (右) の測定。Q81-EGFP 発現細胞はより多くの粒子を分泌する。(D) Dox 添加の有無による Q81-EGFP 細胞由来 P100 画分内粒子数 (左) および粒子径 (右) の変化。Dox 添加により Q81-EGFP の発現を誘導すると分泌粒子数が増加する。Error bar: standard deviation. *p < 0.05, **p < 0.01 (Student's *t*-test) .

2. エクソソーム関連タンパク質のプロテオーム解析

PolyQ 病モデル動物として、脊髄小脳変性症 1 型ノックインマウス (SCA1-KI) を用いた。このマウスは、生後およそ 5~7 週齢で運動障害を示し始めることが知られている³⁾。本研究では、発症後の SCA1-KI 雌マウス (14 週齢および 26 週齢) から血清を採取し、サイズ排除クロマトグラフィーカラム (EV Second) によりエクソソーム画分を精製した。同様に野生型マウスを用い、血清からエクソソーム画分を精製した。これらのエクソソーム画分に対し、LC-MS/MS 測定による定量プロテオーム解析を行った。同定されたタンパク質のうち、Gene Ontology 解析により Cellular Component において Extracellular exosome とタグづけされているタンパク質に注目して解析した (図 2A)。その結果、14 週齢では 246 種、26 週齢では 511 種のエクソソームタンパク質が同定された。これらのタンパク質に関

し、ヒートマップ解析を行ったところ、いずれの週齢においても野生型マウス群と SCA1-KI マウス群の間に明確な差は見られなかった (図 2B)。一方、Volcano plot からは、野生型マウスに対して SCA1-KI マウスで増加しているタンパク質が多数確認され、この傾向は特に 26 週齢マウスで顕著であった (図 2C)。実際、野生型に比べて SCA1-KI マウスで 2 倍以上増加したタンパク質は、14 週齢では 24 種 (全体の 9.8%)、26 週齢では 115 種 (同 22.5%) であり、経時的な増加傾向が確認された。また、そのうち 4 種がいずれの週齢においても共通して増加していることが明らかとなった。

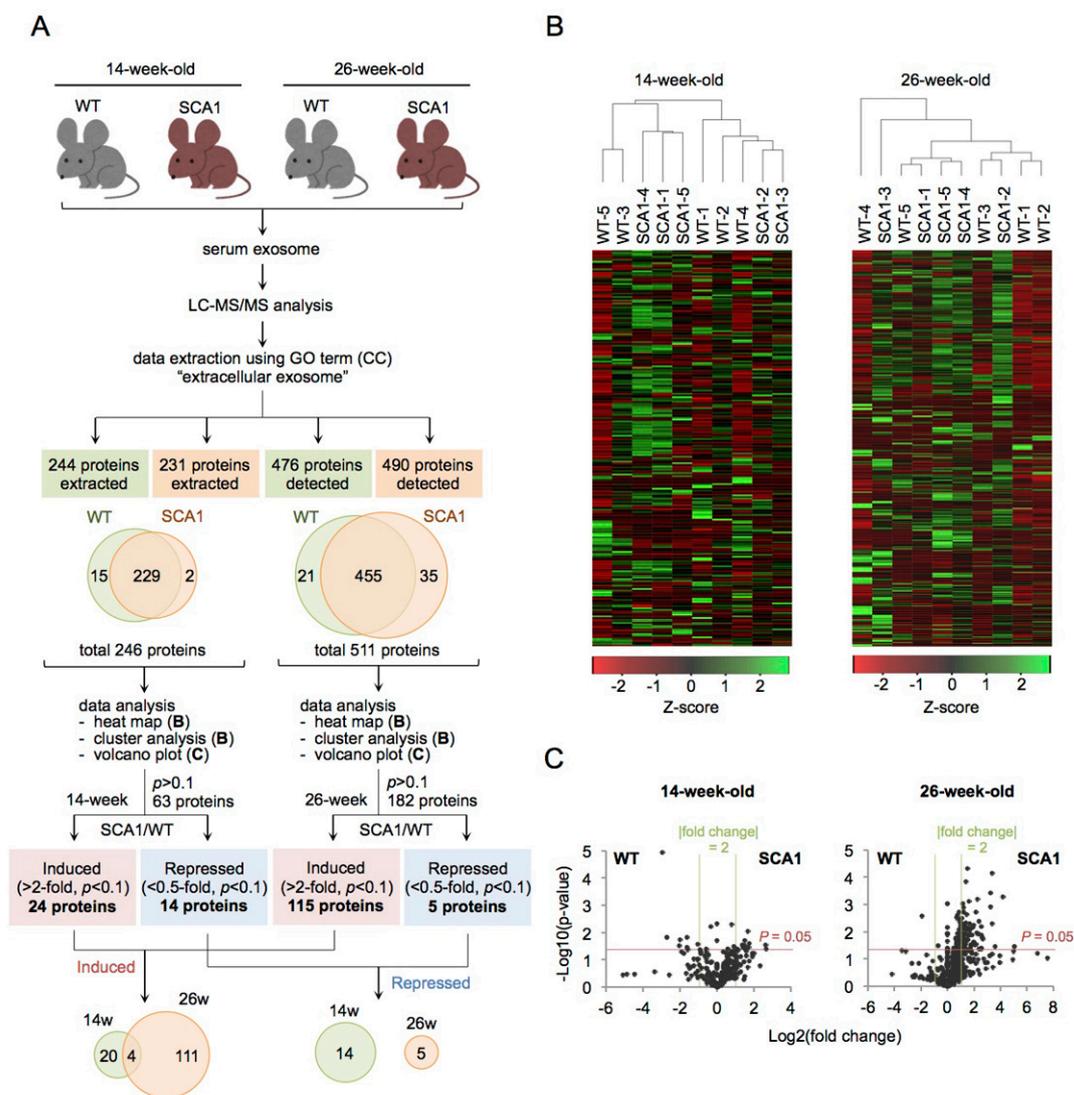


図 2. エクソソーム関連タンパク質のプロテオーム解析

(A) プロテオーム解析の流れ図。14 週齢および 26 週齢の野生型および SCA1-KI マウス (各群雌 5 匹ずつ) の血清エクソソームについてプロテオーム解析を行った。(B-C) 同定されたタンパク質のクラスター解析およびヒートマップ解析 (B)、および volcano plot 解析 (C)。

考 察

PolyQ 病モデル細胞の解析から、凝集性 PolyQ タンパク質発現細胞におけるエクソソーム分泌数の亢進が明らかとなった。また、PolyQ 病モデルマウスの解析から、発症後個体における血清中エクソソームプロテオームの変容が確認

された。以上の結果は、疾患におけるエクソソーム分泌の変容という、著者の仮説を支持するものである。今後、発症前個体も含めた解析、および疾患の重症度と変動因子との相関性などの詳細な解析を行うことにより、PolyQ 病の血液由来バイオマーカーの開発を進めていく予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域の二木史朗教授と国立精神・神経医療研究センター神経研究所疾病研究第四部の永井義隆室長（現大阪大学大学院医学系研究科教授）である。最後に、本研究をご支援頂きました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Voisine C, Pedersen JS, Morimoto RI. Chaperone networks: tipping the balance in protein folding diseases. *Neurobiol Dis.* 2010 Oct;40(1):12-20. doi: 10.1016/j.nbd.2010.05.007. Epub 2010 May 21. Review. PubMed PMID: 20472062;PubMed Central PMCID: PMC3429345.
- 2) Takeuchi T, Suzuki M, Fujikake N, Popiel HA, Kikuchi H, Futaki S, Wada K, Nagai Y. Intercellular chaperone transmission via exosomes contributes to maintenance of protein homeostasis at the organismal level. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015 May 12;112(19):E2497-506. doi: 10.1073/pnas.1412651112. Epub 2015 Apr 27. PubMed PMID: 25918398; PubMed Central PMCID: PMC4434695.
- 3) Watase K, Weeber EJ, Xu B, Antalffy B, Yuva-Paylor L, Hashimoto K, Kano M, Atkinson R, Sun Y, Armstrong DL, Sweatt JD, Orr HT, Paylor R, Zoghbi HY. A long CAG repeat in the mouse Scn1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron.* 2002 Jun 13;34(6):905-19. PubMed PMID: 12086639.