

軽度認知障害の運動介入による改善メカニズムの解明 —脳内 Exosome 解析を切り口とした新たなアプローチ—

山下 琢矢* 長野 一也*

ELUCIDATION OF THE MECHANISMS OF IMPROVEMENT OF MILD COGNITIVE IMPAIRMENT BY EXERCISE INTERVENTION

Takuya Yamashita and Kazuya Nagano

Key words: exosome, extracellular vesicles, senescence, SASP, PC12.

緒 言

現在、認知症の予備群である軽度認知障害 (mild cognitive impairment; MCI) への積極的な運動介入が実施され、一部の患者で改善効果が認められている²⁾。これは運動によって、脳内血流量が増加することで、神経新生が亢進することや神経炎症が抑制されることが大きな要因と考えられている。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは、いまだ明らかになっていない。

MCI の発症には複合的な要因が絡んでいると考えられるが、特に MCI 患者のほとんどは高齢者であることから、体内に蓄積した老化神経細胞の関与は疑う余地がない。老化細胞は生体内で「細胞老化」を起こして不可逆的に細胞増殖を停止した細胞であり、さまざまな炎症性タンパク質を分泌することが知られている。このような細胞老化の表現型は SASP (senescence-associated secretory phenotype) と呼ばれ、老化細胞から分泌された SASP 因子は周囲の組織に慢性的な炎症を引き起こすことから、あらゆる加齢性疾患の要因と

なっていることが示唆されている⁹⁾。運動介入による MCI の改善メカニズムを詳細に解析するためには、この SASP 因子を考慮した神経細胞老化と運動量/筋肉量の関連性を評価する必要があるものの、血液脳関門の存在が障壁となり、基礎研究が進んでいない。そこで我々は、この点を打破できる強力なツールとして、Exosome に注目した。

Exosome は細胞間コミュニケーションを担う分子輸送担体として、体内のあらゆる場所に存在し、血液脳関門をも透過することができる^{4,5)}。更に普段の生命活動のみならず、がんやアルツハイマー病など疾患の発症・悪化を制御する^{3,6)}。特に最近、老化細胞から分泌された Exosome がレシピエント細胞のテロメア調節に寄与していることが示唆されるなど、Exosome が細胞老化の伝播についても、極めて重要な働きをすることが明らかになりつつある¹⁰⁾。そこで、本研究では神経細胞-骨格筋芽細胞の MCI に関する情報伝達メカニズム解析を目的に、強制的に老化させた L6 ラット骨格筋芽細胞由来の Exosome が PC12 ラット神経細胞モデルに及ぼす影響と Exosome の構成分子を分

* 和歌山県立医科大学薬学部病態解析学研究室 Department of Pathological and Health Science, School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan.

析した。

方 法

A. TGF- β (transforming growth factor β) を活用した老化骨格筋芽細胞モデルの作成

L6ラット骨格筋芽細胞はあらかじめ Exosome を除去した10%ウシ胎児血清を含有した Dulbecco's modified Eagle's medium (L6培養液) で継代培養した。2 ng/ml の TGF- β を含む L6培養液で L6 を72時間培養し、細胞増殖抑制作用が確認できたものを老化骨格筋芽細胞モデル (老化 L6) とした。

B. 老化 L6由来 Exosome の精製と基礎物性評価

老化 L6の培養上清を3000 $\times$ g で15分間遠心分離してデブリスを除去した後、ポリマー沈殿法で汎用される ExoQuick-TC を添加し4 $^{\circ}$ C で12時間静置した。更に1500 $\times$ g で30分間遠心分離して Exosome のペレットを回収した。そして、精製した各 Exosome のタンパク質量を micro BCA 法により定量比較した。更に、各 Exosome の粒子径とゼータ電位をゼータサイザーにて解析し、比較評価した。

C. 老化 L6由来 Exosome が PC12ラット神経細胞モデルの神経突起伸長に及ぼす影響

コラーゲン処理した培養 dish に PC12 を 5×10^4 cells/well で播種し、24時間後に nerve growth factor (NGF) を含有した分化用 medium へ置換した。更に、同時に老化 L6由来 Exosome (SASP-Exo)、ならびに通常の L6由来 Exosome (L6-Exo) を添加し、24時間培養した。神経突起の長さは Motic analyzer により計測した。

D. 各種 Exosome を作用させた PC12に含まれる脂肪酸分子種の LC-MS/MS 比較解析

Exosome 溶液に10 mM 酢酸アンモニウム溶液とメタノール・クロロホルム溶液 (メタノール:クロロホルム = 1:2 (v/v)) を1 ml ずつ等量加えて、ボルテックスミキサーで攪拌した。その後、3000 $\times$ g で30分間遠心分離し、水層とクロロホルム層の分離を確認して、クロロホルム層を回収した。更に、水層も除去し、残ったペレットに10 mM 酢酸アンモニウム溶液とメタノール・クロロホルム溶液 (メタノール:クロロホルム = 1:2

(v/v)) を再度、1 ml ずつ等量加えて、上述の抽出操作を繰り返した。すべてのクロロホルム層を試験管にまとめて、窒素乾固し、メタノールで再溶解した後、10000 $\times$ g で15分間遠心分離した上清を LC-MS/MS サンプルとした。LC-MS/MS は ABSCIEX 社製 QTRAP5500システムを用いた。プレカラムは大阪ソーダ社製 CAPCELL PAK C18UG120 ガードカトリッジ (2.0 mm I.D. $\times$ 10 mm)、分析カラムは同社の CAPCELL PAK C18UG120 (2.0 mm I.D. $\times$ 150 mm) を使用した。解析対象とした脂肪酸分子種は C16:0/C18:0/C18:1/C18:2/C20:4/C20:5/C22:6 の7種とし、それぞれ MRM モード (ESI ネガティブ) で解析した。その他、LC グラジエントや MRM トランジションなど詳細な分析条件は筆者らがこれまで報告してきた論文に準拠した¹⁾。

E. 統計解析

図2Bに示す PC12の神経突起長の比較評価において、NGF+ 群と他群 (NGF-, NGF+/SASP-Exo, NGF+/SASP-Exo/L6-Exo) の有意差は Dunnett's test により多重検定した。また、図4に示す PC12 の遊離脂肪酸分子種プロファイル解析においても、NGF+/SASP-Exo 群と他群 (NGF-, NGF+, NGF+/SASP-Exo/L6-Exo) の有意差は Dunnett's test により多重検定した。

結 果

A. SASP-Exo と L6-Exo の基礎物性解析

精製した Exosome がこれまでに報告のある性状を維持していることを確認するために、SASP-Exo と L6-Exo の粒子径とゼータ電位を測定した (図1)。その結果、100~300 nm の粒子径であり、

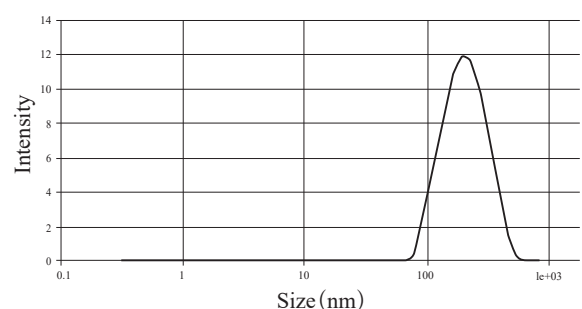


図1. SASP-Exo の粒子径
Fig.1. Particle size of SASP-Exo.

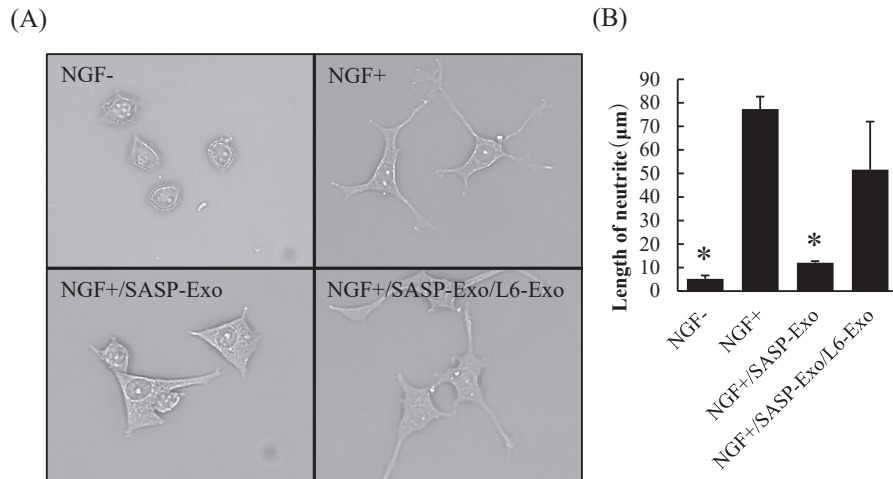


図2. SASP-Exo と L6-Exo による PC12神経突起伸長への影響

Fig.2. Effects of SASP-Exo/L6-Exo on NGF induced neurite outgrowth of PC12 cells.

(A) PC12 cells treated with 50 ng/ml NGF together with SASP-Exo/L6-Exo. (B) The length of neurite extending from the cell was measured with Motic images plus.

Data are shown as means and standard deviations ($n = 3$). Differences between the NGF+ and target groups were compared using Dunnett's test. * $P < 0.05$ (NGF+ vs NGF+/SASP-Exo).

ゼータ電位は負電荷であった。

B. SASP-Exo が PC12ラット神経細胞モデルの神経突起伸長に及ぼす影響

老化した骨格筋芽細胞の細胞内情報を搭載した Exosome が、神経分化へどのような影響を及ぼすか明らかにする目的で、分化誘導時に SASP-Exo のみを添加した NGF+/SASP-Exo 群、SASP-Exo と L6-Exo を共添加した NGF+/SASP-Exo/L6-Exo 群における PC12の神経突起伸長距離を比較評価した(図2)。その結果、NGF+/SASP-Exo 群は NGF 添加で誘導される神経突起伸長を著しく阻害すること (Dunnett's test : $P < 0.05$) が明らかになった。一方、NGF+/SASP-Exo/L6-Exo 群はこの神経突起伸長を阻害しなかった (Dunnett's test : $P > 0.05$)。

C. 各種 Exosome を作用させた PC12に含まれる脂肪酸分子種プロファイルの解析

遊離脂肪酸は多くの細胞シグナルを惹起するアゴニストになり、生体応答に大きな影響を与える。そこで、本検討では SASP-Exo が誘導した PC12 の神経分化阻害作用はどのようなメカニズムで引き起こされたのかを推定するための基礎情報収集を目的に、各種 Exosome を作用させた PC12に含まれる脂肪酸分子種プロファイルを LC-MS/MS により同定・解析した。その結果、良好な MRM クロマトグラムが得られ、精度高く分析すること

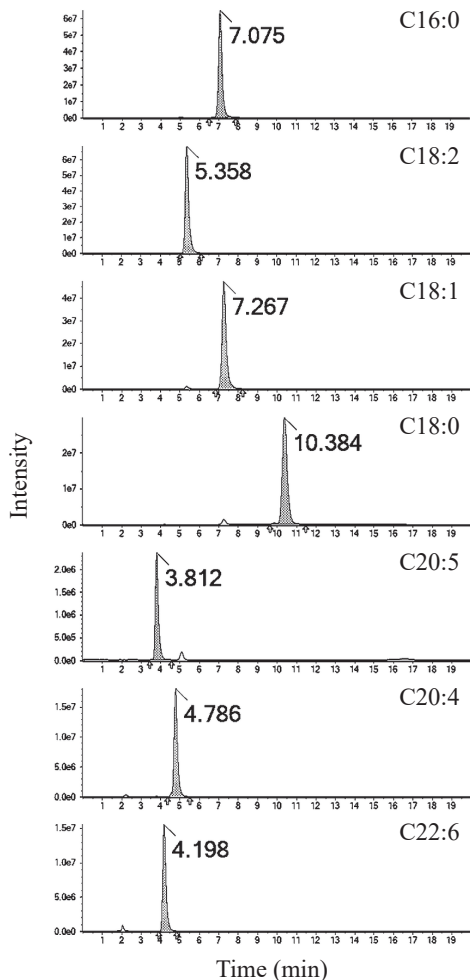


図3. PC12の遊離脂肪酸 MRM クロマトグラム

Fig.3. MRM chromatogram of free fatty acids in PC12 cells.

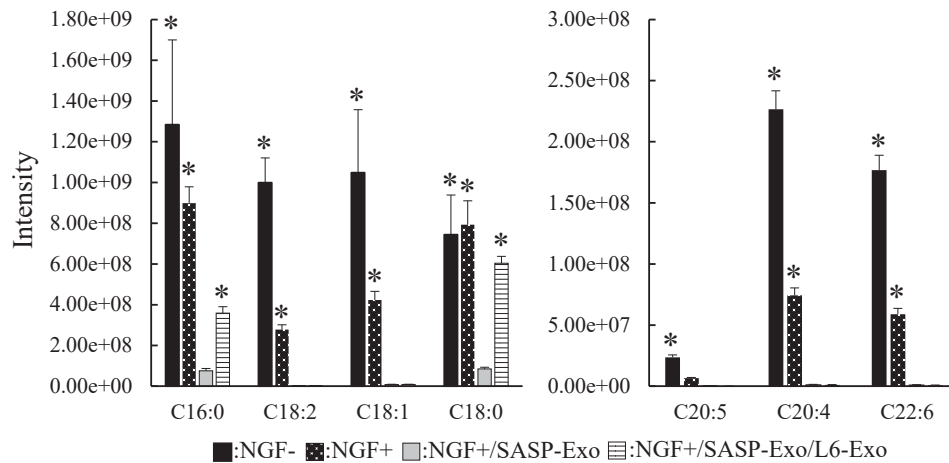


図4. SASP-Exo と L6-Exo を作用させた PC12 の遊離脂肪酸分子種プロファイル

Fig.4. Free fatty acid profile of PC12 cells treated SASP-Exo and L6-Exo.

Free fatty acids extracted from exosomes were analyzed by LC-MS/MS.

Data are shown as means and standard deviations (n = 3). Differences between the NGF+/SASP-Exo and target groups were compared using Dunnett's test. * $P < 0.05$ (NGF+/SASP-Exo vs NGF-, NGF+/SASP-Exo vs NGF+, NGF+/SASP-Exo vs NGF+/SASP-Exo/L6-Exo).

ができた (図3)。

更に、各種脂肪酸分子種の存在比率を比較解析した結果を図4に示す。SASP-Exo を作用させた PC12 ではすべての脂肪酸種の存在量が減少していた (Dunnett's test : $P < 0.05$)。一方で、SASP-Exo と L6-Exo を同時に作用させた PC12 では C16:0 と C18:0 量の回復が認められた (Dunnett's test : $P < 0.05$)。

考 察

かつては、成体の脳で神経細胞は再生しないとされてきた。しかし、ヒトの成体脳でも神経幹細胞による神経新生が確認され、現在は、脳に何らかの損傷が起こったときの代償機構として神経新生機構が存在していると考えられている⁸⁾。更に、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患、もしくはうつ病や統合失調症等の精神疾患では、神経幹細胞の機能や神経新生が低下していることが報告され、これらの疾患の病態への関与が示唆されている⁷⁾。それゆえ、神経変性疾患や精神疾患における神経新生障害が新たな治療標的として注目されている。

本検討では、老化した骨格筋芽細胞由来の Exosome が神経細胞の突起伸長を阻害することを明らかにした。特に、老化していない骨格筋芽細胞由来の Exosome を共添加することで、この作

用が認められなかったことから、神経新生障害に骨格筋芽細胞由来の Exosome が大きく関与していることが示唆された。これまで、骨格筋由来の Exosome は神経新生の促進を誘導するという知見は散見されていたが、その骨格筋芽細胞が老化することで、神経新生に対する Exosome が真逆になるという報告例は皆無である。更に、我々は上記の作用が神経細胞内の遊離脂肪酸量の増減を伴って起こることを示し、特に老化していない骨格筋芽細胞の Exosome は主要な飽和脂肪酸である C16:0 と C18:0 量を回復させることが判明した。C16:0 と C18:0 は脳内の最も主要な構成脂肪酸であり、細胞膜構成成分として、細胞増殖時に必須である。特に今回は *in vitro* で24時間という短時間作用における脂肪酸種変動しか追えていないため、不飽和脂肪酸の変動をとらえきれなかった可能性がある。ただ、少なくとも多くの脂肪酸種が変動したということは骨格筋芽細胞由来の Exosome が脂肪酸合成酵素をはじめとした脂質関連酵素群の発現を調節したことが推察される。本検討では今後、これらの酵素群の変動実態を明らかにし、本メカニズムの解明につなげたい。

『第36回若手研究者のための健康科学研究助成成果報告書』 pp.21~26においても川西範明博士らが、レジスタンス運動は神経細胞の増殖に関連する microRNA の循環 Exosome 内の発現量を増

加させることを報告し、運動トレーニングによるうつ病の予防あるいは改善に循環 Exosome が重要な役割を担う可能性が示されたことを考慮すると、骨格筋由来 Exosome が MCI の原因となる脳内の軽微な神経損傷を修復する指令を神経細胞に伝達し、その結果、神経新生を伴って、脳機能を改善している可能性が考えられる。将来的に骨格筋由来 Exosome がどのようなシグナルをどこに、どれだけ伝えたのかを詳細に明らかにすることができれば、MCI のみならず、アルツハイマー型認知症を含めた神経脱落に関連する神経変性疾患や神経疾患の画期的な治療法開発につながる事が期待できる。

総 括

本研究により、老化した骨格筋芽細胞由来の Exosome は神経細胞分化を抑制し、その神経細胞内のすべての脂肪酸種を減少させることが明らかになった。更に、老化していない骨格筋芽細胞由来の Exosome はその神経細胞分化抑制を解消し、一部の脂肪酸種量を回復させた。したがって、MCI の発症・改善には、骨格筋芽細胞由来の Exosome が一部関与し、更に、その老化状態が影響する可能性が示された。

謝 辞

本研究は、公益財団法人明治安田厚生事業団による第 37 回若手研究者のための健康科学研究助成のご支援を賜

り実施いたしました。関係者の皆様に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Aizawa F, et al. (2019): N-3 fatty acids modulate repeated stress-evoked pain chronicity. *Brain Res*, **1714**, 218-226.
- 2) Erickson KI, et al. (2011): Exercise training increases size of hippocampus and improves memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(7), 3017-3022.
- 3) Hood JL, et al. (2009): Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Lab Invest*, **89**(11), 1317-1328.
- 4) McDonald MK, et al. (2014): Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. *Pain*, **155**(8), 1527-1539.
- 5) Mustapic M, et al. (2017): Plasma extracellular vesicles enriched for neuronal origin: a potential window into brain pathologic processes. *Front Neurosci*, **11**, 278.
- 6) Rajendran L, et al. (2006): Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(30), 11172-11177.
- 7) Reif A, et al. (2006): Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry*, **11**(5), 514-522.
- 8) Richards LJ, et al. (1992): De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, **89**(18), 8591-8595.
- 9) Rodier F, et al. (2011): Four faces of cellular senescence. *J Cell Biol*, **192**(4), 547-556.
- 10) Wang Z, et al. (2016): The crosstalk of telomere dysfunction and inflammation through cell-free TERRA containing exosomes. *RNA Biol*, **13**(8), 690-695.