

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 難治性疾患実用化研究事業  
(英語) Practical Research Project for Rare / Intractable Diseases

研究開発課題名： (日本語) 神経由来エクソソームを介した多系統萎縮症の発症機序の解明  
(英語) Elucidation of the pathogenesis of multiple system atrophy by neuronal exosomes

研究開発担当者 (日本語) 医薬保健研究域医学系 教授 華山 力成  
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Medicine, Institute of Medical, Pharmaceutical and Health Sciences, Professor, Rikinari Hanayama

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

私達は、多系統萎縮症の発症原因の候補として、神経細胞由来エクソソームによる SNCA mRNA のオリゴデンドログリアへの水平伝播機構に着目し、この過程を促進する分子と抑制する分子を同定した。そこで本研究では、この発見を踏まえて、多系統萎縮症の病態解明と、克服に結び付く早期診断法・治療法の開発を試みる。

### ① 髄液エクソソームにおける SNCA mRNA の増加の検討

大阪大学医学部神経内科 (望月秀樹教授) で採取した多系統萎縮症患者 5 名、対照群の正常圧水頭症患者 5 名の髄液検体を用いて、エクソソームを精製し、その髄液エクソソーム中に含まれる SNCA mRNA 量を定量 PCR 法により測定したところ、正常圧水頭症では SNCA mRNA 量が平均 50 コピーであるのに対し、多系統萎縮症では平均 350 コピーと 7 倍程に増加しており、t 検定で  $P < 0.05$  と有意な増加であることを見出した。

### ② 促進分子、抑制分子の遺伝子多型の検討

促進分子には共分子が存在することを明らかにし、この分子が促進分子による SNCA mRNA のエクソソームへの取り込みを大きく増強することを見出した。多系統萎縮症患者の血液サンプルを用いて促進分子、共分子、抑制分子の遺伝子発現に変化があるかを検討したところ、多系統萎縮症患者 3 名のうち 1 名の患者で抑制分子の遺伝子発現が大きく低下していることが明らかとなった。そこで、この患者の抑制分

子ゲノム遺伝子に変異があるかを検索し、第一イントロンに CCGCCCCTTC という塩基配列が挿入されていることを見出した。

### ③ 病態モデルの樹立と予防・治療法の検討

促進分子、共分子と抑制分子を用いた病態モデル(マウス・ハエ)の樹立を行った。マウスにおいては、促進分子 Tg マウスの作製が完了し、共分子 Tg マウスが作製中である。ハエにおいては、促進分子 Tg ハエ、共分子 Tg ハエ、それらのダブル Tg ハエの作製が完了した。促進分子と共分子のダブル Tg ハエにおいて、SNCA mRNA のグリア細胞への集積を見出した。SNCA TG ハエとも掛け合わせたトリプル Tg ハエを作製中である。抑制分子 KO はマウス・ハエともに作製を開始した。

We focused on the mechanism of horizontal propagation of SNCA mRNA to oligodendroglia by neuronal exosomes as a candidate for the cause of the occurrence of multiple system atrophy (MSA), and identified the molecule that promotes this process and the molecule that suppresses this process. Therefore, in this research, based on this discovery, we will try to elucidate the pathology of MSA and develop early diagnostic and therapeutic methods.

#### ① Increase of SNCA mRNA in cerebrospinal fluid exosomes.

Exosomes were purified from cerebrospinal fluid samples of 5 patients with MSA collected by the Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine (Professor Hideki Mochizuki), and 5 patients with normal pressure hydrocephalus as the control group. When the amount of contained SNCA mRNA in the exosomes was measured by quantitative PCR method, SNCA mRNA amount was 50 copies on average for normal pressure hydrocephalus, whereas average number of SNCA mRNA was increased by about 7 in MSA ( $P < 0.05$ , Student *t* test).

#### ② Examination of genetic polymorphism of promoting molecule and suppressing molecule

We found that a co-molecule exists which interacts with the promoting molecule and found that this molecule greatly enhances uptake of SNCA mRNA into exosomes by promoting molecule. We investigated whether gene expression of the promoting molecule, co-molecule, or suppressing molecule in blood sample of patient with MSA was affected. As a result, in 1 patient out of 3 patients with MSA, expression of the suppressing molecule was greatly reduced. Therefore, we searched whether there was a mutation in the suppressing molecule genomic of this patient and found that a nucleotide sequence of CCGCCCCTTC was inserted in the first intron.

#### ③ Establishment of disease model and examination of preventive and therapeutic methods

We established a animal model (mouse / fly) using promoting molecule, co-molecule and suppressing molecule. For mice, production of promoting molecule Tg mice is completed and co-molecule Tg mice are under construction. In flies, production of promoting molecule Tg flies, co-molecule Tg flies, their double Tg flies was completed. We found accumulation of SNCA mRNA in glial cells in double Tg flies of promoting molecules and co-molecules. We are making triple Tg flies multiplied also with SNCA TG flies. The suppressing molecule KO was started to be produced for both mouse and fly.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 3件、国際誌 3件）

1. 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. 2016, 84(1), 1-4
2. 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. 2016, 6, 33935
3. 華山力成. エクソソームによる免疫機能の制御機構. Labcab. 2017, 18, 5-7
4. 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. 2017, 14969
5. 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. 2017, 32-33
6. Yoshida T, Ishidome T, Hanayama R. High purity isolation and sensitive quantification of extracellular vesicles using affinity to TIM4. Curr Protoc Cell Biol. 2017, in press

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Regulation of glial functions by neuronal exosomes and its disorder, 口頭, 華山力成, 第3回 日本細胞外小胞学会, 2016/9/1, 国内
2. 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, 口頭, 華山力成, 第89回 日本生化学会大会, 2016/9/25, 国内
3. 自己炎症疾患の発症機序とエクソソームの役割, 口頭, 華山力成, 第52回 インスリン研究会, 2017/2/4, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

(4) 特許出願

希望なし