

4. 脳内外をつなぐ細胞外小胞の可能性について

牧之段 学*, 鳥塚 通弘*, 竹田 奨*, 岩田 仲生*

抄録: がん研究領域において顕著な進展を遂げた細胞外小胞の研究が、精神医学の分野でも注目を集めている。特に、エクソソームと称される細胞間コミュニケーションに不可欠な細胞外小胞は、多様な生物学的物質を内包しており、それらの生体における役割が明らかにされている。脳由来のエクソソームは末梢血からの抽出が可能であり、これを「脳リキッドバイオプシー」とよび、精神医学領域における診断的価値について広く議論されている。自閉スペクトラム症においては、脳内外の免疫細胞の活性化が報告されているが、その背景病理は依然として不明である。本稿では、エクソソームが示す血液脳関門の高い透過性を踏まえ、これらの粒子が脳内外の免疫細胞に働きかけ、脳内外において同様の免疫応答を引き起こす可能性について考察する。さらに、脳実質よりも血液脳関門が脆弱な領域に位置する脳境界マクロファージが、脳内外の免疫応答にどのように関与しているのかについても説明する。

日本生物学的精神医学会誌 35 (2) : 78-81, 2024

Key words : extracellular vesicle, exosome, CAMs, autism, blood brain barrier

はじめに

うつ病、統合失調症、自閉スペクトラム症などの精神疾患では脳内外において免疫異常が認められるが、脳は血液脳関門によって守られて「免疫特権」をもつともいわれ、脳内と脳外の免疫反応が同一の機序で生じているのかは不明なままである。もし脳内と脳外で同一の機序が存在するのなら、臓器によらないゲノムやエピゲノムの規定によるのか、あるいは脳内外の免疫細胞に作用する共通分子が存在するのか、などの仮説が立てられる。筆者らは後者の仮説に基づき、細胞外小胞のひとつであるエクソソームを候補として研究を進めている。本稿では、精神医学におけるエクソソーム研究の概要を説明し、この小胞が脳内外において共通して免疫細胞に働きかける可能性について述べる。

1. エクソソームとは

エクソソームは細胞外小胞のうち、直径 30 ~

150 nm の脂質二重膜で囲まれた小胞で、エキソサイトーシスによって細胞から細胞外に分泌される。細胞外小胞にはエクソソームのほか、マイクロベシクル (直径 100 ~ 1,000 nm)、アポトーシス小体 (直径 50 ~ 5,000 nm) などが含まれる。エクソソームはエンドサイトーシスによって細胞内に形成されたエンドソームを基にして作られ、それらが細胞膜と融合して細胞外に放出されることから、mRNA, miRNA, lncRNA, DNA, タンパク質、代謝産物などの多種多様な細胞成分を含む。よって、これらの性質を調べることでエクソソームの放出元となった親細胞を同定することも可能である。この特徴は、同じく細胞間コミュニケーションを司るサイトカインなどとは大きく異なる点である。たとえば、精神疾患に罹患した患者の血漿において、炎症性サイトカインのひとつであるインターロイキン 6 の発現が高値となることがあるが、このインターロイキン 6 の放出元を脳や筋肉などと特定することはできない。

Extracellular vesicles : bridging the inside and the outside of the brain

* 藤田医科大学 精神神経科学講座 (〒 470-1192 愛知県豊田市杏掛町田楽ヶ窪 1-98) Manabu Makinodan, Michihiro Toritsuka, Tsutomu Takeda, Nakao Iwata : Department of Psychiatry, Fujita Health University. 1-98, Dengakugakubo, Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi 470-1192, Japan

【牧之段 学 E-mail : manabu.makinodan@fujita-hu.ac.jp】

2. 精神神経疾患のエクソソーム研究

精神神経疾患エクソソーム研究の特徴のひとつとして、血液脳関門によって守られる脳への出入りの容易さを利用する点が挙げられる。脳は血管内皮細胞やアストロサイトの突起、ペリサイトなどからなる血液脳関門によって脳外から守られており、通常末梢血などに存在する多くの脳外の粒子は脳内への侵入が阻害される。また、脳内の粒子は脳外への流出が制限されており、直径 30 ~ 150 nm の脂質二重膜で囲まれた小胞が血液脳関門の間隙を縫って出入りできるとは考えにくい。近年、血液脳関門は各種トランスポーターなどを発現し、動的に粒子の出入りを制限することが明らかになっており、エクソソームの脳内外への移動の容易さに関する知見は乏しいものの、細胞間を潜り抜けるような単純な機序ではないと考えられている¹²⁾。いずれにしても、エクソソームは何らかの理由で脳から“選ばれて”その内外への移動が許された粒子といえるかもしれない。精神神経疾患の研究対象としてエクソソームが注目され始めたのは、脳由来のエクソソームが末梢血から抽出可能であり、脳内の様子を血液サンプルから検討できるというのが理由である。この手法は、血液から脳の生体検査が可能ということで、脳リキッドバイオプシーとよばれる。脳の神経細胞由来エクソソームは表面抗原の L1CAM が、脳のアストロサイト由来エクソソームは表面抗原のグルタミン酸トランスポーターがそれぞれ用いられ、単離される。精神神経疾患ではアルツハイマー型認知症の脳由来エクソソーム研究が進んでおり、神経細胞由来エクソソームのアミロイド β やリン酸化タウを用い、アルツハイマー型認知症のみならず軽度認知障害の段階でも高い精度で診断できるまでになっている(疾患群ではアミロイド β およびリン酸化タウの発現量が顕著に増加)。精神疾患としては、うつ病や統合失調症に関する研究報告は少なくないが、自閉スペクトラム症のエクソソームに関する研究はあまり進んでいない。

3. 自閉スペクトラム症のエクソソーム研究

4 ~ 12 歳の自閉スペクトラム症児の血清中には、年齢・性別を一致させた定型発達児よりも数多くのエクソソームが血清中に含まれ、ミトコンドリア DNA 含有量が多かったと報告されている¹³⁾。同研究においては、これらの血清エクソソームをヒトミクログリア培養液に加えたところ、自閉スペクトラ

ム症児由来のエクソソームは定型発達児のものよりインターロイキン 1β 発現量を有意に増加させたという¹³⁾。ミトコンドリア DNA はマクロファージなどの単球系細胞において炎症反応を亢進させることが示されていることから²⁾、自閉スペクトラム症児で過剰となったエクソソームのミトコンドリア DNA がヒトミクログリアでのインターロイキン 1β の発現量増加につながっているかもしれないと考察されている¹³⁾。一方、自閉症症状を呈す脆弱 X 症候群 (fragile X syndrome) のモデルマウスである *Fmr1* ノックアウトマウスでは、アストロサイトのミトコンドリア機能低下やアストロサイト由来エクソソーム内のミトコンドリア構成物の減少が報告されている³⁾。これらの結果を踏まえると、自閉スペクトラム症児ではミトコンドリアの恒常性が破綻し、放出エクソソーム内のミトコンドリア DNA が増加して単球系細胞の炎症性サイトカイン発現が増加するのかもしれない。脳由来エクソソームを調べたものとしては、2.5 ~ 6 歳の自閉スペクトラム症児 100 名と年齢・性別を一致させた定型発達児 60 名から、表面抗原 L1CAM を用い脳神経細胞由来エクソソームの lncRNA microarray と RNA-seq を施行した研究がある。1418 の mRNAs, 1745 の lncRNAs, 11 の miRNAs の発現量が 2 群間で異なり、自閉スペクトラム症児ではこれらの大半で発現量が低下していたという。そして、これらの RNA 発現量低下のほとんどが神経細胞や糖鎖関連であった¹¹⁾。自閉スペクトラム症に関しては、間葉系幹細胞から放出されるエクソソームの機能を利用した治療法の開発を目的とした研究が進められている。間葉系幹細胞は間葉系細胞への分化能のほか、周囲の免疫細胞の機能を強力に調節する作用をもつが、ここにエクソソームが介在する⁵⁾。健常者の骨髄間葉系幹細胞から抽出したエクソソームを自閉症モデルの BTBR マウスや *Shank3b* ノックアウトマウスに経鼻注入すると自閉症様症状が改善したと報告されている^{9, 10)}。これらの自閉症モデルマウスでは、脳と末梢血で同様の免疫異常が生じていることから^{4, 8)}、ヒトエクソソームを脳に作用すべく経鼻注入しているものの、末梢血の免疫系を同様に調節する可能性はある。多発性硬化症も同様に脳と末梢で同様の免疫異常が生ずるが、モデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎マウスの末梢血管(尾静脈)内にヒトエクソソームを投与しても行動や脳病理が改善したと報告されている⁶⁾。これらはエクソソームの血液脳関門透過性を踏まえると理にかなっている。

以上のように、エクソソームは、血液から脳由来

の生検が可能な利点に加えて、血中エクソソームを網羅的に解析することで脳内外の親細胞の病態を把握できる点も魅力である。さらに、エクソソームの脳内移行性を利用した治療法開発につながる可能性もある。他方、上述のように自閉スペクトラム症などの精神疾患では多発性硬化症などの自己免疫性疾患と同様に脳内外の全身の免疫異常をもつため、脳を守る血液脳関門の機能が破綻して脳外の免疫異常が脳内にも及ぶと推論されてきたが、不明なままである。筆者らはマウスを用い、拘束水浸ストレスや電気ショックストレス、隔離飼育ストレスなどの負荷をかけ、末梢血の免疫細胞が脳内に侵入するのかを細胞移植などにより検討したが、脳実質に侵入する細胞は確認できなかった。また、血液脳関門の機能をデキストランの末梢血管内投与により調べたが、やはり細胞体と同様、脳実質への侵入を確認できず、各種ストレスによる液性分子に対する血液脳関門の機能低下すら確認できなかった。しかしながら、デキストランの脳実質への侵入は認めなかったものの、血管壁に沿った細胞群には集積していることが明らかになり、これらの細胞群に注目することになった（未発表データ）。

4. 中枢神経関連マクロファージ (CNS-associated macrophages)

従来ミクログリアを調べる際には“脳”切片を染めて観察したり、“脳”からミクログリアの表面抗原によって抽出したりして解析してきた。しかし、Masuda らが脳の骨髄系細胞は脳実質のミクログリアと脳実質外の脳血管周囲腔や髄膜に存在するマクロファージ (CNS-associated macrophages : CAMs) から構成されることをシングルセル解析などによって明らかにしたのは⁷⁾、これらは異なる挙動を示す、分けて検討すべき2つの細胞群となった。脳実質ミクログリアも CAMs も胎生期 9.5 日目に胚外卵黄嚢から新生血管を通り神経管に生着する。髄膜マクロファージのうち軟膜マクロファージは脳血管周囲腔マクロファージと同様に、生着後は長期にわたり生存し、のちの各組織に侵入してくる造血幹細胞由来細胞と入れ替わることはほとんどないが、硬膜マクロファージは一部入れ替わるとされ¹⁾、この事実から硬膜の血液脳関門は軟膜より弱いと考えられる。血液からの侵入のしにくさでは、脳実質>脳血管周囲腔=軟膜>硬膜と考えられるため、仮に精神疾患モデルで捉えられる脳の免疫異常が末梢血中にも存在する何らかの共通粒子によるとすると、

“脳”の免疫病理を検討する際には、脳実質に限定せず、脳血管周囲腔、軟膜、硬膜も対象とするのがよいかもしれない。また、上流の共通粒子として脳内外の移動が容易なエクソソームを研究対象とすることは必然だと思われる。

おわりに

エクソソーム研究はがん領域での進歩が著しいが、精神疾患研究においても大きな注目を集めつつある。血液脳関門の高い透過性を活用したりキッドバイオプシーの利点のみならず、親細胞の同定が可能だという点も近年の仮説によらないデータ駆動型研究に適している。また、本稿では述べなかったが、エクソソームは標的細胞を操作することも可能なため、エクソソームが内包する物質を適切な細胞群に輸送する優れたツールにもなりうる。今後、さまざまな精神疾患のエクソソーム研究が進展することを期待している。

本論文に記載した筆者らの研究に関してすべて倫理的配慮を行っている。住友ファーマ株式会社、協和キリン株式会社から研究助成を受けている。

文 献

- 1) Amann L, Masuda T, Prinz M, et al (2023) Mechanisms of myeloid cell entry to the healthy and diseased central nervous system. *Nat Immunol*, 24 : 393-407.
- 2) Collins LV, Hajizadeh S, Holme E, et al (2004) Endogenously oxidized mitochondrial DNA induces in vivo and in vitro inflammatory responses. *J Leukoc Biol*, 75 : 995-1000.
- 3) Ha BG, Heo JY, Jang YJ, et al (2021) Depletion of mitochondrial components from extracellular vesicles secreted from astrocytes in a mouse model of fragile X syndrome. *Int J Mol Sci*, 22 : 410.
- 4) Ikawa D, Makinodan M, Iwata K, et al (2017) Microglia-derived neuregulin expression in psychiatric disorders. *Brain Behav Immun*, 61 : 375-385.
- 5) Kou M, Huang L, Yang J, et al (2022) Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for immunomodulation and regeneration : a next generation therapeutic tool? *Cell Death Dis*, 13 : 580.
- 6) Li Z, Liu F, He X, et al (2019) Exosomes derived from mesenchymal stem cells attenuate inflammation and demyelination of the central nervous system in EAE rats by regulating the polarization of microglia.

- Int Immunopharmacol, 67 : 268-280.
- 7) Masuda T, Amann L, Monaco G, et al (2022) Specification of CNS macrophages subsets occurs postnatally in defined niches. *Nature*, 604 : 740-748.
- 8) Pangrazzi L, Cerilli E, Balasco L, et al (2024) N-acetylcysteine counteracts immune dysfunction and autistic-related behaviors in the Shank3b mouse model of autism spectrum disorders. *bioRxiv*, doi : 10.1101/2024.03.13.584809
- 9) Perets N, Hertz S, London M, et al (2018) Intranasal administration of exosomes derived from mesenchymal stem cells ameliorates autistic-like behaviors of BTRR mice. *Mol Autism*, 9 : 57.
- 10) Perets N, Oron O, Herman S, et al (2020) Exosomes derived from mesenchymal stem cells improved core symptoms of genetically modified mouse model of autism Shank3B. *Mol Autism*, 11 : 65.
- 11) Qin Y, Cao L, Zhang J, et al (2022) Whole-transcriptome analysis of serum L1CAM-captured extracellular vesicles reveals neural and glycosylation changes in autism spectrum disorder. *J Mol Neurosci*, 72 : 1274-1292.
- 12) Ramos-Zaldivar HM, Polakovicova I, Salas-Huenuleo E, et al (2022) Extracellular vesicles through the blood-brain barrier : a review. *Fluids Barriers CNS*, 19 : 60.
- 13) Tsiloni I, Theoharides TC (2018) Extracellular vesicles are increased in the serum of children with autism spectrum disorder, contain mitochondrial DNA, and stimulate human microglia to secrete IL-1 β . *J Neuroinflammation*, 15 : 239.

■ ABSTRACT

Extracellular vesicles : bridging the inside and the outside of the brain

Manabu Makinodan, Michihiro Toritsuka, Sho Takeda, Nakao Iwata

Department of Psychiatry, Fujita Health University

The study of extracellular vesicles, particularly important in cancer research, is now attracting attention in psychiatry. In particular, exosomes, which are critical for intercellular communication, encapsulate a wide variety of biological substances. Brain-derived exosomes can be extracted from peripheral blood, a process referred to as “brain liquid biopsy”, which is being widely discussed for its diagnostic potential in psychiatry. In autism spectrum disorders, activation of immune cells both inside and outside the brain has been reported, but the underlying pathophysiology remains unclear. This review explores the possibility that exosomes, due to their high permeability across the blood-brain barrier, could affect immune cells inside and outside the brain, potentially triggering similar immune responses in both regions. The involvement of CNS-associated macrophages, which are located in brain-boundary areas more vulnerable to the blood-brain barrier than in the brain parenchyma, is also discussed. These explanations underscore the potential of exosomes as a key player in the understanding and diagnosis of psychiatric disorders through their interaction with immune processes.

(Japanese Journal of Biological Psychiatry 35 (2) : 78-81, 2024)
