

藤森科学技術振興財団 研究実施概要報告書

(西暦) 2025 年 4 月 30 日

公益財団法人藤森科学技術振興財団
理事長 藤森 明彦 殿

藤森科学技術振興財団の助成金による研究が終了しましたので、下記のとおり報告をいたします。

所属機関: 大阪大学大学院医学系研究科遺伝学

職 名: 特任助教(常勤)

氏 名: 南 聡



【提出書類】

(1) 研究実施概要報告書(本紙)

添付書類(A4 版 3 枚以内): 研究状況を示す写真等の資料

(2) 収支報告書

添付書類: 助成金を充当した経費の領収書

領収書を添付しない場合: 支払一覧表と支払部門担当者確認署名

⑤

(1)テーマ

※スペースが足りない場合は、枠を追加いただいて構いません。

エクソソームを用いたオートファジーモニタリング方法の開発

(2)本研究の期間

(西暦) 2024 年 4 月 ～ 2025 年 3 月

(3)本研究の目的

オートファジーは、細胞内の不要な構成要素や老化・異常タンパク質を選択的に分解・再利用する、高度に保存された細胞内恒常性維持機構である。この機構は、細胞の生存維持、分化、代謝制御、さらに老化応答や各種ストレス応答に至るまで、幅広い生理機能に関与している。近年、オートファジー機能の破綻が、神経変性疾患、心血管疾患、慢性腎臓病、がん、感染症、代謝性疾患など、極めて多様な病態の発症や進展に密接に関与することが明らかとなった。これらの発見を契機に、オートファジーを標的とした創薬研究は世界的に活発化しており、疾患治療における新たなフロンティアとして注目を集めている。

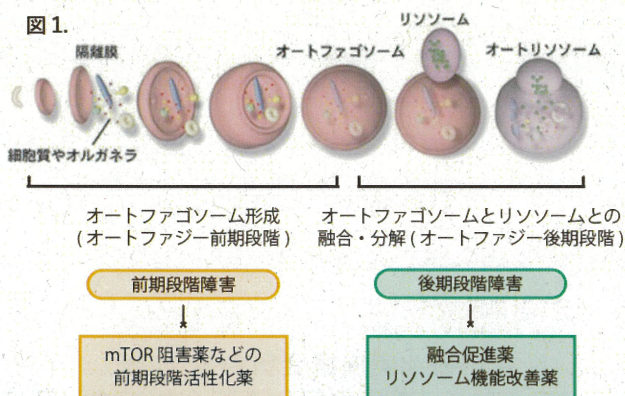
しかし、オートファジー活性を生体内で動的かつ非侵襲的にモニタリングする技術は未だ確立されていない。現在広く用いられているオートファジー評価手法は、主に細胞や組織サンプルを用いた侵襲的な解析に依存しており、これが臨床応用に向けた大きな障壁となっている。特に、創薬開発の段階において、患者個々のオートファジー活性状態を迅速かつ精密に評価する技術の欠如は、適切な治療対象の選別や、治療効果予測の難しさを引き起こしている。

オートファジーの進行過程は、誘導・隔離膜形成を担う「前期段階」と、オートファゴソーム成熟・リソソームとの融合・分解を担う「後期段階」に大別される。申請者を含む近年の研究により、疾患によってはこれらの段階のいずれか一方のみが選択的に障害されること、特に後期段階障害時に前期促進薬を投与すると逆に病態が悪化する可能性があることが明らかとなった。このため、オートファジー活性を単に総体として評価するのではなく、各段階ごとの活性を個別に正確に把握したうえで、段階特異的な治療戦略を立案することが必須であると考えられる(図1)。

このような背景のもと、本研究では、細胞から分泌される微小小胞であるエクソソームに着目した。エクソソームは、直径約 30～150 nm の脂質二重膜構造を持ち、細胞内分子(タンパク質、RNA、脂質など)を豊富に内包して体液中に分泌される。特に尿中エクソソームは、腎尿路系細胞に由来する割合が高く、腎臓病態の変化を高感度かつ特異的に反映する可能性が指摘されている。

申請者は、予備検討において、オートファジー関連分子がエクソソームの量および内容物に劇的な変化をもたらすことを見出しており、これに基づき、エクソソームを用いたオートファジー活性の段階別モニタリング手法の開発を着想した。具体的には、オートファジー活性の前期および後期それぞれに特異的な変化を示すエクソソーム内分子マーカーを探索し、尿中エクソソームを解析することにより、腎臓におけるオートファジー各段階の活性状態を非侵襲的かつ段階別に評価する技術の確立を目指す。

本研究が成功すれば、オートファジー活性の簡便かつリアルタイムな非侵襲的モニタリングが可能となり、オートファジー創薬の臨床応用推進に寄与するのみならず、腎疾患、神経変性疾患、代謝性疾患など、オートファジー異常が関与する多様な疾患における個別化医療や予後予測の高度化にも大きく貢献することが期待される。さらに、将来的には、各組織・細胞種特異的エクソソームマーカーの同定・応用を通じて、体内各臓器におけるオートファジー異常の組織別プロファイリングが可能となり、疾患横断的な個別最適化治療戦略の構築にもつながるものと考えられる。



(4) 本研究の概要

本研究では、オートファジー活性を段階別に非侵襲的に評価する新たな手法の開発を目指した。

オートファジーは、細胞内の不要物や異常タンパク質を選択的に分解・再利用する機構であり、細胞の恒常性維持に不可欠な役割を担っている。加齢、神経変性疾患、慢性腎臓病、がん、感染症、代謝異常症など、多様な疾患群の発症・進展にオートファジーの異常が関与することが近年明らかとなり、オートファジー制御を標的とした新たな治療戦略が世界的に注目されている。オートファジーの進行過程は、隔離膜形成による誘導段階(前期)と、オートファゴソーム成熟およびリソソームとの融合・内容物分解を行う段階(後期)に大別される。近年の知見により、疾患によってはこれらの段階のうち特定の段階のみが選択的に障害されること、また後期段階障害時に前期促進剤を投与すると病態を悪化させるリスクがあることが明らかとなっている。このため、オートファジー全体の総体的な活性を測定するだけでは不十分であり、段階別にオートファジー活性を正確にモニタリングする手法の確立が、適切な治療介入と個別化医療の推進に不可欠と考えられる。しかし現状では、オートファジー活性を生体内で段階別に、かつ非侵襲的に測定する方法は存在せず、これが創薬開発や臨床応用の大きな障壁となっている。

本研究では、この課題の解決に向け、エクソソームに着目した。エクソソームは、細胞由来のタンパク質、RNA、脂質などを内包し、血液、尿、唾液などほぼすべての体液中に存在する直径 30–150 nm の細胞外小胞である。特に尿中エクソソームは、腎尿路系細胞に由来する割合が高く、腎臓の病態変化を鋭敏かつ特異的に反映する可能性がある。また、申請者自身の予備研究により、オートファジー活性の変動がエクソソームの分泌量や搭載分子の構成に大きな影響を及ぼすことが示唆されていた。

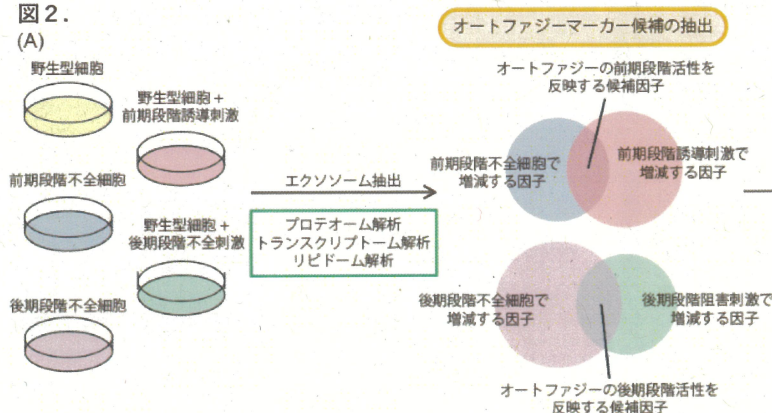
そこで、まずオートファジー可視化細胞モデルとして、オートファジー各段階に特異的な活性変動を人為的に誘導した。具体的には、前期段階ではオートファジー誘導に関与する Atg9、Atg7 の遺伝子ノックダウン、ならびに栄養飢餓刺激や mTOR 阻害薬(ラパマイシン)投与を行った。一方、後期段階ではオートファゴソーム-リソソーム融合を担う Stx17 のノックダウン、リソソーム酸性化阻害剤(クロロキン、バフィロマイシン A1)負荷、さらには飽和脂肪酸(パルミチン酸)負荷によるリソソーム機能障害モデルを作成した。

各種処理後に得られた細胞培養上清からエクソソームを単離し、ナノ粒子トラッキング解析(NTA)、電子顕微鏡観察により粒径・形態を確認したうえで、エクソソーム中タンパク質の網羅的解析(プロテオーム解析)およびウェスタンブロット解析を実施した(図 2)。これらの解析により、オートファジーの各段階に応じてエクソソーム中に含まれる特定タンパク質の発現パターンが変化することが明らかとなった。特に、後期障害においては、オートファジー選択的基質である p62(SQSTM1)のエクソソーム中濃度が顕著に上昇することが確認された。また、腎尿細管管腔側細胞膜に局在するイオンチャネル型膜タンパク(仮称:タンパク X)も後期障害に伴い尿中エクソソームでの発現量が増加することが示され、これらがオートファジー後期障害を鋭敏に反映する有力なバイオマーカー候補であることが示唆された。

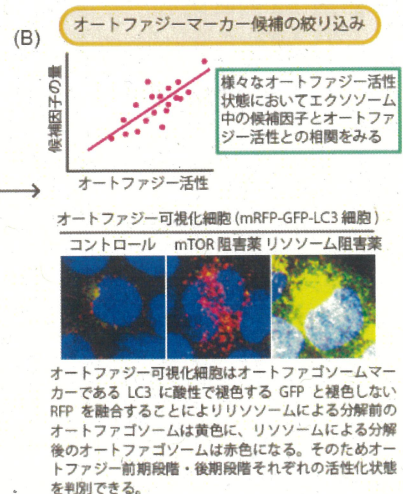
本研究によりエクソソーム中の p62 およびタンパク X を指標とすることで、オートファジー活性を前期・後期段階別に非侵襲的にモニタリングできる可能性が実証された。この技術の確立は、オートファジー創薬の個別化治療応用、腎疾患や神経変性疾患における新たな診断技術の開発、さらには疾患横断的なオートファジー異常の臨床的可視化という観点からも大きな意義を有するものであり、今後の展開が強く期待される。

図 2.

(A)



(B)



(5) 本研究の内容及び成果

本研究では、オートファジー活性の段階別非侵襲的評価法の確立を目的とし、エクソソームに着目して以下のアプローチを行った。

まず、オートファジー活性を可視化可能な培養腎尿細管細胞を用いた *in vitro* モデルを確立した。この細胞系に対して、オートファジー前期および後期段階それぞれを特異的に操作するため、前期段階ではオートファジー誘導関連遺伝子である Atg5 および FIP200 の siRNA ノックダウンに加え、栄養飢餓刺激、mTOR 阻害薬ラパマイシンの投与を行い、オートファジー初期過程の促進および抑制を誘導した。一方、後期段階に対しては、オートファゴソームとリソソームの融合に必須の SNARE ファミリータンパク質 Stx17 のノックダウン、リソソーム酸性化阻害剤(バフィロマイシン A1) 負荷、さらに飽和脂肪酸(パルミチン酸)処理を行い、リソソーム機能障害を誘導した。各種処理後、培養上清からエクソソームを超遠心法および市販キットを併用して単離・精製し、ナノ粒子トラッキング解析(NTA)や電子顕微鏡観察により粒径や形態を確認した。さらに、エクソソームからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット解析ならびに網羅的プロテオーム解析(LC-MS/MS)を実施し、オートファジー各段階に応じたエクソソーム内タンパク質の変動を精密に評価した。

これらの解析により、以下の主な成果を得た。

1. p62(SQSTM1)を指標とするオートファジー後期障害マーカーの同定: リソソーム機能が障害された条件(バフィロマイシン A1 負荷、パルミチン酸処理)において、エクソソーム中の p62 濃度が有意に上昇することが確認された(図 3A)。一方、前期段階障害条件(Atg5、FIP200 ノックダウン)では、p62 のエクソソーム中発現には大きな変動が認められなかった。これらの結果から、細胞内に蓄積した p62 がリソソーム分解障害に伴い、エクソソームを介して細胞外へ排出されるという新たな代償機構が示唆された。

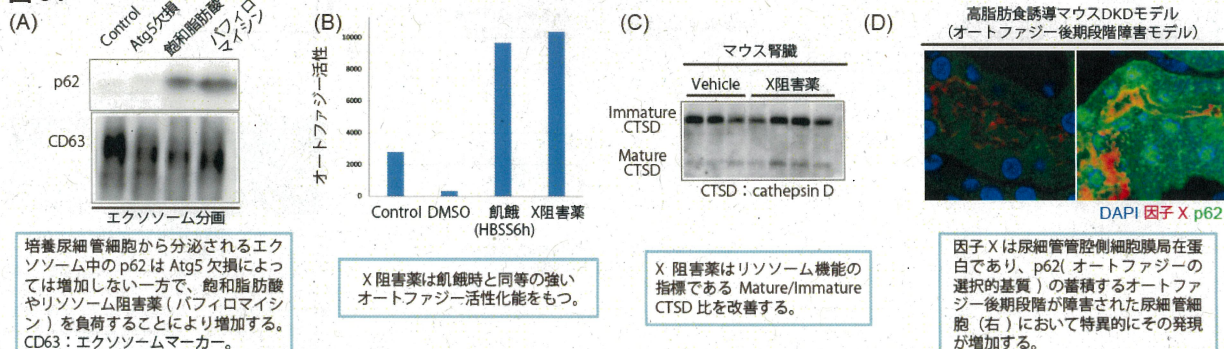
これにより、p62 はオートファジー後期障害を鋭敏に反映するバイオマーカーとなり得ることが明らかとなった。さらに、p62 排出は細胞の生存戦略の一部として積極的に利用されている可能性も示唆され、オートファジー障害応答の理解に新たな視点を提供する重要な知見となった。

2. タンパク X を指標とする後期障害マーカーの同定: 腎尿細管管腔側に局在するイオンチャネル型膜タンパクであるタンパク X についても、後期障害時において細胞膜およびエクソソーム中での発現量がいずれも増加することが確認された(図 3C・3D)。この発現変動は、バフィロマイシン A1 負荷、飽和脂肪酸負荷など複数の後期障害モデルに共通して観察され、タンパク X がオートファジー後期破綻と密接に関与することを示唆している。さらに、タンパク X 阻害薬を投与したところ、リソソーム機能が著明に回復し、オートファジー後期障害が改善されることが明らかとなった(図 3B)。これらの知見は、タンパク X が単なる障害マーカーではなく、リソソーム機能や細胞極性維持の制御において重要な役割を果たしている可能性を示しており、今後の機能解析や疾患モデル応用に向けたさらなる検討が期待される。

3. マーカー測定系構築に向けた基盤整備: 本研究では、p62 およびタンパク X を標的とする高感度定量系(ELISA 法応用)の構築に向けた開発基盤も整備した。現在、抗体の最適化や標準曲線作成に取り組んでおり、今後、これらマーカーの検出系の精度向上と、臨床検体を用いた実証研究を進める予定である。これによりオートファジー活性を段階別に迅速かつ非侵襲的にモニタリングできる技術の実用化が期待される。

以上より、本研究は、エクソソーム中の特定タンパク質(p62 およびタンパク X)を用いて、オートファジー活性を前期・後期段階別に非侵襲的にモニタリングする基盤的知見を世界で初めて確立した。本成果は、オートファジー創薬の臨床応用を加速するとともに、腎疾患、神経変性疾患、代謝疾患など多様な疾患領域における個別化医療の発展に貢献することが期待される。

図 3.



(6) 本研究の考察

本研究では、オートファジー活性の段階別非侵襲的モニタリングを可能にする新たな手法として、エクソソーム中の分子マーカーに着目し、その有用性を検討した。特に、オートファジー後期段階に障害が生じた際にエクソソーム中濃度が上昇する p62 およびタンパク X を、後期障害を鋭敏に反映する分子指標として同定したことは、本分野において極めて意義深い成果である。従来、オートファジー活性の評価は、LC3-II の蓄積量やオートファゴソーム数の観察など、細胞や組織を直接操作する侵襲的手法に依存してきた。しかし、このような方法では生体全体の動的なオートファジー活性をリアルタイムで非侵襲的に把握することは困難であり、特にヒトにおける応用には大きな制約があった。このため、オートファジーを標的とした創薬研究が進展する一方で、臨床応用への橋渡しには限界が存在していた。

本研究は、細胞が生理的・病理的状态に応じて情報をエクソソームに搭載し体液中に分泌するという特性を活用し、エクソソームを「非侵襲的かつリアルタイムで情報を取得できるプラットフォーム」として利用する新たなアプローチを提案した。特に、尿、血液など容易に採取できる体液中のエクソソームを対象とすることで、生体負担をかけずにオートファジー活性をモニタリングできる可能性を示した点は、臨床応用に向けた大きな前進であり、先駆的な意義を持つ。

さらに重要な点として、本研究はオートファジー活性を単一の尺度で評価するのではなく、前期(誘導・隔離膜形成)と後期(融合・分解)という異なる段階に分けて評価することの必要性を明確に示した。近年の研究により、後期障害が主体となる病態において前期促進薬を投与すると、未成熟なオートファゴソームの過剰蓄積を招き、かえって病態が悪化する可能性が指摘されている。このため、創薬応用を見据える上では、オートファジーの総合的な活性だけでなく、段階別の活性状態を精緻に把握することが不可欠である。

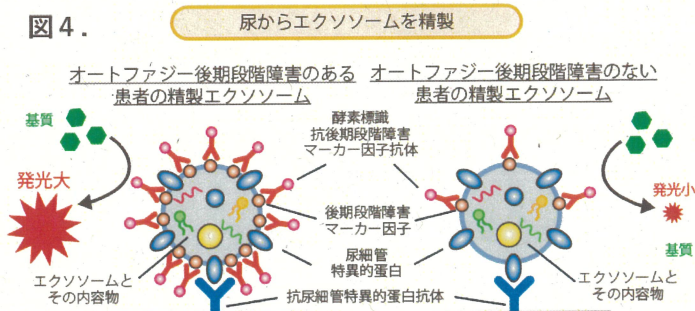
本研究で同定された p62 およびタンパク X は、いずれもオートファジー後期障害を鋭敏に反映することが示された。p62 は選択的オートファジー基質であり、リソソーム分解不全時に細胞内で蓄積し、それがエクソソームを介して細胞外に排出されるという新たな代償機構が示唆された。一方、タンパク X は細胞膜に局在するイオンチャネル型タンパクであり、後期障害に伴いその発現が増加するとともに、阻害薬によるリソソーム機能回復が確認されたことから、単なる障害マーカーにとどまらず、リソソーム機能維持に機能的に関与している可能性が高い。これらの知見は、今後、前期障害を鋭敏に検出できるマーカーが同定されれば、オートファジー活性を包括的かつ段階別に正確に評価できる診断体系の構築が可能になることを示唆している。

特に腎臓領域においては、尿という容易に採取可能な体液を介して腎尿細管由来のエクソソームを解析できるという利点があり、実際の臨床応用に向けた技術的な実装可能性が極めて高い。加えて、エクソソーム表面には細胞種特異的なマーカーが存在することから、将来的には腎臓に限らず、各臓器・細胞種ごとにオートファジー活性を非侵襲的に可視化することも期待される。これにより、腎疾患のみならず、神経変性疾患、代謝性疾患、がんなど、さまざまな病態における個別化医療の推進に大きく貢献する可能性がある。

一方で、本研究にはいくつかの限界も存在する。まず、得られた成果は主に培養細胞を用いた *in vitro* モデルに基づいており、*in vivo* (生体内)におけるマーカーの有用性については今後検証が必要である。特にマウスモデルやヒト由来検体を用いた検討を通じて、マーカーの頑健性や疾患特異性を評価し、臨床応用に耐える指標であることを確認する必要がある。また、p62 やタンパク X がどのような機構で選択的にエクソソームに搭載されるのか、その分子メカニズムの解明も今後の重要な課題である。エクソソーム内貨物選別機構の理解が進めば、さらに高い特異性と精度を持ったバイオマーカー開発にもつながると期待される。

今後は、オートファジー可視化マウスモデルやヒト尿検体を用いた検証実験を進めるとともに、p62 およびタンパク X を標的とした高感度かつ簡便な ELISA 測定系の確立を目指す(図 4)。さらに、各種疾患モデルにおいて、オートファジー活性の段階別障害プロファイルを網羅的に解析し、創薬標的や治療効果予測マーカーとしての実用化に向けた研究を推進する予定である。本研究は、エクソソームを利用したオートファジー段階別モニタリングという、これまでにない新しい診断・創薬基盤技術の構築に向けた重要な第一歩を示したものであり、今後の応用展開に対する期待は極めて大きいと考えられる。

図 4.



⑤

(7)共同研究者(所属機関名、役職、氏名)

該当なし

(8)本研究の成果の公表先

本研究の成果は、現在、オートファジーとエクソソームに関する国際誌への投稿準備を進めている。
また、国内外の関連学会(例:日本細胞生物学会、日本腎臓学会、国際オートファジー会議など)において
成果発表を予定している。

[注]この報告書を当財団のホームページ等に掲載します。予めご了承ください。