

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

大阪大学大学院医学系研究科 特任助教（常勤） 南 聡

1. はじめに

オートファジー-リソソーム系は、細胞内恒常性を維持する中核的な分解機構であり、タンパク質や脂質の品質管理を通じて細胞機能を支えている。この系は単なる分解経路にとどまらず、細胞の代謝適応、ストレス応答、さらには細胞運命決定にも関与する統合的な制御システムとして機能している。近年、この系の破綻が加齢や肥満、糖尿病、慢性腎臓病など多様な疾患の発症・進展に関与することが明らかとなり、その機能評価および制御は基礎研究から臨床応用に至るまで極めて重要な課題となっている。

しかしながら、オートファジー活性やリソソーム機能を生体内で非侵襲的かつ動的に評価する手法は未だ確立されていない。従来の評価は主として組織学的解析や細胞内分子マーカーに依存しており、時間的な変化を追跡することが困難である。また、オートファジーは形成、輸送、融合、分解といった多段階の過程から構成される複雑なシステムであるため、単一の指標ではその機能状態を正確に反映することが難しい。このような背景から、細胞外からオートファジー・リソソーム機能を読み出す新たな概念の構築が求められている。

本研究は当初、「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」を目的として開始された。細胞外小胞（extracellular vesicles）は細胞間情報伝達の担い手として注目されており、その内容物が細胞内状態を反映する可能性が示唆されていることから、非侵襲的評価系として有望であると考えられていた。

一方、解析を進める過程で、脂質負荷条件下にお

ける細胞外への物質放出が、従来想定していたエクソソーム経路のみでは説明できず、リソソームが細胞膜と融合して内容物を直接放出する「リソソーマルエクソサイトーシス」^[1-2]が重要な役割を担うことが明らかとなった。さらに、この分泌機構がオートファジー・リソソーム系のマスターレギュレーターである TFEB^[3]により制御されることを見出した。

以上を踏まえ、本研究ではエクソソームを含む細胞外分泌機構という当初の枠組みを維持しつつ、その本質的分子基盤としてリソソーマルエクソサイトーシスに着目することで、細胞内分解系の機能状態を細胞外から読み出す新たなオートファジーモニタリング法の確立を目的とした。

2. 方法

本研究では、リソソーマルエクソサイトーシスの分子機構および細胞外へ放出される分子の特性を多面的に解析するため、培養細胞およびマウスモデルを用いた統合的アプローチを採用した。

培養細胞として近位尿細管上皮細胞を用い、代謝ストレスモデルとしてパルミチン酸による脂質負荷条件を設定した。このモデルは、細胞内に脂質が蓄積し、リソソーム機能障害およびオートファジー異常を誘導することが知られており、病態再現性の高い系である。

TFEB 活性は、そのリン酸化状態および核内移行を指標として評価した^[4]。具体的には、核分画ウエスタンブロッティングおよび免疫蛍光染色を用いて、TFEB の細胞内局在変化を定量的に解析した。また、TFEB 標的遺伝子の発現解析により、そ

の転写活性の変化を検証した。

リソソーム機能については、LAMP1 などのリソソームマーカーの局在および数の変化を評価し、リソソームの量的および空間的再編成を解析した。さらに、リソソームエクソサイトーシスの評価として、リソソーム膜タンパクの細胞膜局在への移行、および細胞外への内容物放出量を指標とした。

細胞内構造変化については電子顕微鏡を用いて詳細に観察し、特にリソソーム内に形成される multilamellar bodies の出現頻度および蓄積量を定量化した。

さらに、細胞外に放出される脂質分子を網羅的に同定するため、質量分析を用いたリピドミクス解析を実施し、リソソーム由来脂質の分子種および特徴を明らかにした。

in vivo 解析として脂質負荷条件を再現したマウスモデルを用い、組織学的解析、免疫染色および電子顕微鏡解析を通じて、TFEB 活性とリソソーム機能異常の関連を検討した。

3. 結果

脂質負荷条件下において、TFEB の脱リン酸化および核内移行が時間依存的に誘導され、TFEB 標的遺伝子群の発現上昇が確認された。これに伴い、リソソーム数の増加および細胞周辺部への再配置が観察され、リソソーム動態が大きく再編成されることが示唆された(Fig. 1)。

このようなリソソーム動態の変化に対応して、リソソーム膜タンパクの細胞膜への局在が増加し、リソソームと細胞膜の融合が促進されることで、リソソームエクソサイトーシスが顕著に亢進した。この過程は TFEB 活性に依存しており、TFEB 機能を抑制するとエクソサイトーシス活性は著明に低下した。

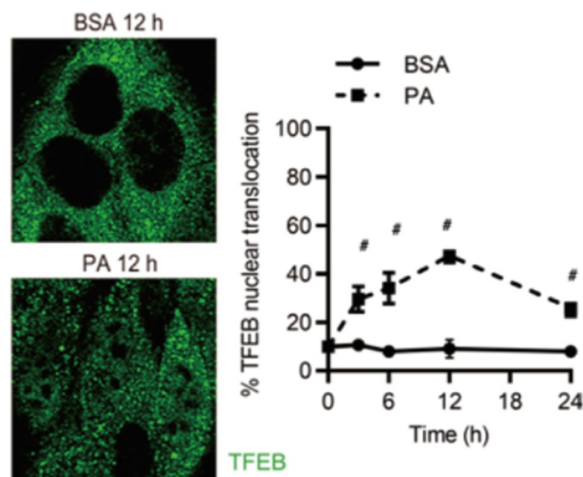


Fig. 1 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷すると TFEB が核内移行する

一方で、脂質負荷によりリソソーム内にはリン脂質が過剰に蓄積し、電子顕微鏡解析により特徴的な multilamellar bodies の形成が確認された。これらの構造は脂質の層状蓄積を反映するものであり、リソソーム機能障害の指標と考えられる。興味深いことに、TFEB 活性化に伴いこれらの構造は減少し、同時に細胞外へのリン脂質放出量が増加したことから、リソソーム内に蓄積した脂質がリソソームエクソサイトーシスを介して排出されることが明らかとなった (Fig. 2)。

リピドミクス解析の結果、細胞外に放出される脂質は特定のリン脂質群に富み、その分子プロフィールはリソソーム特異的脂質である bis(monoacylglycero)phosphate (BMP) ^[5] に特徴的な分布と一致した。このことから、BMP がリソソームエクソサイトーシスの主要な放出成分である可能性が強く示唆された。

さらにマウスモデルにおいても同様の傾向が認められ、TFEB 活性低下に伴うリソソーム内脂質蓄積の増加および細胞障害の増悪が確認された。これらの結果は、TFEB 依存的なリソソームエクソサイトーシスが生体内においても重

要な役割を担うことを示している。

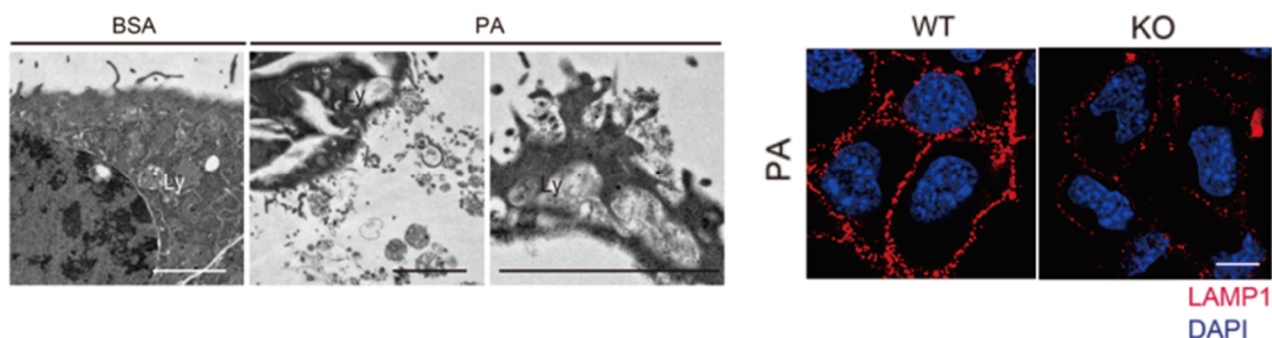


Fig. 2 (左) 培養尿細管細胞にパルミチン酸を負荷した電子顕微鏡画像

パルミチン酸を負荷した尿細管細胞ではリソソーム内容物を細胞外に放出するリソソーマルエクソサイトーシスが盛んにおこなわれている。

(右) 野生型尿細管細胞 (WT) と TFEB ノックアウト尿細管細胞 (KO) の細胞膜上の LAMP1 (リソソームマーカー) 染色。

細胞膜上の LAMP1 の存在はリソソーマルエクソサイトーシスを示す。

WT ではパルミチン酸負荷後リソソーマルエクソサイトーシスが盛んに生じているが、KO ではリソソーマルエクソサイトーシスがほとんど起こっていない。

4. 考察

本研究は、細胞外小胞を介したオートファジーモニタリングという当初の研究枠組みに対し、その分子基盤としてリソソーマルエクソサイトーシスが中心的役割を担うことを明らかにした点に新規性がある。特に、エクソソームを含む細胞外分泌機構の解析を進める過程で、リソソーム由来分泌という経路が主要な寄与因子として浮かび上がったことは、細胞外小胞研究の概念そのものを再考させる重要な知見である。

従来、リソソームは細胞内分解の最終段階を担う比較的静的なオルガネラとして理解されてきた。しかし本研究の結果は、リソソームが分解にとどまらず、細胞外への物質排出を通じて細胞内環境を調整する能動的な制御系として機能することを示している。すなわち、リソソームは「分解」と「排出」を統合した動的オルガネラとして位置づけ直す必要がある。

特に注目すべき点は、脂質負荷条件下において

リソソーム内に蓄積したリン脂質が multilamellar bodies として構造化され、TFEB 依存的に細胞外へ排出されるという一連の過程である。この現象は、リソソーム機能が飽和あるいは破綻に近づいた際に作動する代償的排出機構と解釈できる。すなわち、細胞は過剰に蓄積した脂質を単に分解するだけでなく、分解しきれない場合には細胞外へ排出することで恒常性を維持しようとする可能性が示唆される。

さらに、これらの排出脂質の主要構成成分として BMP が同定されたことは、リソソーム特異的脂質代謝と細胞外分泌を結びつける重要な発見である。BMP はエンドリソソーム系に特異的に存在し、脂質分解酵素の活性化や膜ダイナミクスの制御に関与することが知られている。本研究の結果は、BMP が単なる構造脂質ではなく、リソソーム機能状態を反映する“シグナル分子”として機能する可能性を示唆するものである。

また、TFEB が本過程を制御する中心的因子と

して機能する点も重要である。TFEBはオートファジーおよびリソソーム生合成を統合的に制御する転写因子であり、その活性化は細胞の分解能力を増強する。本研究では、TFEB 活性化によりリソソーマルエクソサイトーシスが亢進し、結果として細胞内に蓄積した脂質が効率的に排出されることが示された。このことは、リソソーマルエクソサイトーシスが単なる分泌現象ではなく、オートファジー-リソソーム系全体の機能状態を反映する統合的アウトプットであることを意味する。

この観点から、本研究で同定された BMP を中心とするリソソーム由来脂質は、従来の細胞内指標に依存しない非侵襲的バイオマーカーとして極めて有望である。特に、体液中の脂質プロファイルとして測定可能である点は、臨床応用に向けた大きな利点となる。すなわち、本研究はオートファジー機能を「細胞外から読み出す」という新たな概念を提示するものであり、これまで困難であった生体内オートファジー活性の評価に新たな道を開くものである。

一方で、本研究にはいくつかの課題も残されている。まず、細胞外に検出される BMP がどの程度リソソーム由来であるか、また他の分泌経路や細胞種からの寄与をどのように区別するかが重要な検討課題である。さらに、リソソーマルエクソサイトーシスとエクソソーム分泌との相互関係、あるいはそれぞれが担う生理的役割の分担についても、今後詳細な解析が必要である。

以上より、本研究はリソソームを中心とした細胞内分解系と細胞外分泌機構を統合的に捉える新たな枠組みを提示し、オートファジー研究およびリソソーム研究に新たな視点を提供するものであるとともに、非侵襲的診断法および創薬標的探索に向けた重要な基盤を構築するものである。

5. 結論

本研究により、細胞外小胞を介したオートファジーモニタリングの分子基盤として、リソソーマルエクソサイトーシスが重要な役割を担うことが明らかとなった。特に、TFEB により制御されるリソソーム由来分泌経路を介して、リソソーム内に蓄積した脂質が細胞外へ排出されることが示され、この過程は細胞内のオートファジー・リソソーム機能状態を反映する動的指標となり得ることが示唆された。さらに、細胞外に放出される脂質の主要成分として BMP が同定され、これらリソソーム由来分子は非侵襲的にオートファジー機能を評価する新規バイオマーカーとなる可能性がある。以上より、本研究は、細胞外分泌機構を基盤とした新たなオートファジーモニタリング法の概念を提示し、その実用化に向けた重要な基盤を提供するものである。

6. 参考文献

- [1] Ballabio A, Bonifacino JS; Lysosomes as dynamic regulators of cell and organismal homeostasis, *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 21, (2020), 101-118.
- [2] Reddy A, Caler EV, Andrews NW; Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes, *Cell*. 106, (2001), 157-169.
- [3] Medina DL, Paola SD, Peluso L, et al; Lysosomal calcium signalling regulates autophagy through calcineurin and TFEB, *Nat Cell Biol.* 17, (2015), 288-299.
- [4] Settembre C, Di Malta C, Polito VA, et al; TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis, *Science*. 332, (2011), 1429-1433.
- [5] Gallala HD and Sandhoff K; Biological

function of the cellular lipid BMP—BMP as a key activator for lysosomal lipid degradation, *Neurochem Res.* 36, (2011), 1594-1600.

7. その他成果発表等

- ・ Minami S. “Lipid metabolism dysfunction–induced lysosomal fragility disrupts autophagy and promotes acute kidney injury progression” World Congress of Nephrology, Yokohama, Japan, Mar. 29th, 2026.
- ・ Minami S. “Lipid metabolism dysfunction–induced lysosomal fragility disrupts autophagy and promotes acute kidney injury progression”

International Symposium on Protein and Organelle Lifetime Regulation, Nara, Japan, Nov. 1st, 2025.

- ・ Minami S. “Autophagy in Life-omics: Cellular Purification Opens the Door to Overcoming Kidney Disease ” The 1st International Symposium on Life-omics Research, Suita, Japan, Jan. 17th, 2025.

8. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究助成を賜りました公益財団法人 島津科学技術振興財団に深くお礼申し上げます。