

細胞外微粒子に起因する生命現象の解明と
その制御に向けた基盤技術の創出
平成 30 年度採択研究代表者

2018 年度
実績報告書

華山 力成

金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所
教授

微粒子による生体応答の相互作用の解明と制御

§ 1. 研究成果の概要

我々の体内には、様々な細胞から産生されるエクソソームなどの内因性微粒子や、環境中から取り込まれるエアロゾルなどの外因性微粒子が存在する。これらの微粒子に対する生体応答を担う主役は、最初に微粒子を取り込む貪食細胞である。貪食細胞は、まず恒常性を維持する為の防御性炎症を引き起こすが、長期的影響や内因性・外因性微粒子に対する応答の相乗効果により、周辺環境を破壊する傷害性炎症へと移行し、神経変性や肺炎・喘息などの疾患を引き起こす。しかし、炎症がどのように味方から敵へと変化するのかが解明されておらず、医学的に重要な課題である。そこで本研究では、エクソソーム検出法やエアロゾル分級法など、我々が持つ微粒子解析技術を更に高度化するとともに、生体内における解析技術を新たに創出することで、エクソソームやエアロゾルに対する生体応答に共通する原理の発見や、両者の相乗効果による生命現象を解明し制御することを目指す。本年度は、エクソソームとエアロゾル解析の基盤となる技術開発に取り組んだ。



● 一細胞由来エクソソームの高精度・高感度解析技術の開発

これまで我々は、Tim4 を用いたエクソソーム高感度検出法を開発したが、Tim4 を改変することで、更に 10 倍以上高感度に検出する技術を開発した。また、Tim4 をマイクロウエ

ルアレイチップに固相化することで、1細胞が放出するエクソソームを捉え、その放出量を定量化することに成功し、細胞間でエクソソーム放出量にバラツキがあることを見出した。

● エクソソーム生成の分子機構の解明

Tim4を用いた高感度ELISA法で遺伝子欠損スクリーニングを行い、エクソソーム放出を制御する主要分子を同定した。この分子を癌細胞で欠損させると、癌の進展を阻害することを見出した。また、この分子の結合分子を質量分析で網羅的に同定した。更に、Tim4-ELISA法で薬剤スクリーニングを行い、癌細胞によるエクソソームの放出量を-80%にまで低下させる薬剤を同定し、特許出願を行った（特願2018-245015）。

● 細胞特異的エクソソーム解析用マウスの開発

上記のエクソソーム放出に関わる主要分子を細胞特異的に欠損させ、エクソソーム放出を効率良く阻害する遺伝子改変マウスを作製し、実際にエクソソーム放出が阻害されていることを確認した。また、エクソソーム特異的マーカーであるCD63に光変換型蛍光レポーターつなげた遺伝子ベクターを作製し、培養細胞系でエクソソームを光刺激で自在に標識できることを確認し、この遺伝子ベクターを導入したマウスを作製した。

● エアロゾルの生体内解析技術の開発

エアロゾルの生体内ダイナミクスを解明するための分級・捕集および追跡法の開発として、①エアロゾル細胞暴露実験系の構築、②大気エアロゾルのサンプリングと粒子径毎化学成分分析、③マクロファージ細胞への微粒子投与実験を実施した。具体的には、モデル粒子の発生、大流量に対応した高効率プラズマ荷電法と静電分級法の開発および凝縮・捕集装置の開発に取り組んだ。また、実大気エアロゾルの捕集を行い、その化学成分の粒子径依存性を解析した。さらに、培養細胞へのエアロゾル直接暴露システムを導入し、マクロファージ細胞への直接暴露実験にも着手した。

● 細胞による対微粒子応答の解明

貪食細胞による傷害性炎症の機序の1つとして、リソソーム開口放出による加水分解酵素の放出機構を明らかにした。この過程を制御する分子 myoferlin を同定し、その欠損で傷害性炎症が大きく減弱することを見出した。また、貪食細胞に多量のエクソソームを取り込ませることにより、myoferlin を介した加水分解酵素の放出が促進することを見出した。

【代表的な原著論文】

1. Yuji Miyatake, Tomoyoshi Yamano and Rikinari Hanayama, “Myoferlin-mediated lysosomal exocytosis regulates cytotoxicity by phagocytes”, The Journal of Immunology, 201(10), pp3051-3057, 2018
2. Tomoya Tamadate, Takaaki Orii, Hidenori Higashi, Yoshio Otani, Mikio Kumita and Takafumi Seto, “Conformation-dependent dynamics of macromolecular ions in the gas phase under an electrostatic field: A molecular dynamics simulation”, Aerosol Science and

Technology, 53(3), pp260–267, 2019

3. Satoru Tada, Tatsusada Okuno, Mikito Shimizu, Yoshiaki Sakai, Hisae Sumi-Akamaru, Makoto Kinoshita, Kazuya Yamashita, Eri Sanda, Chi-Jing Choong, Akiko Namba, Tsutomu Sasaki, Toru Koda, Kazushiro Takata, Shigeru Miyagawa, Yoshiaki Sawa, Yuji Nakatsuji and Hideki Mochizuki. “Single injection of sustained-release prostacyclin analog ONO-1301-MS ameliorates hypoxic toxicity in the murine model of amyotrophic lateral sclerosis”, *Sci. Rep.*, 9(1), 5252, 2019

§ 2. 研究実施体制

(1) 華山グループ

① 研究代表者: 華山 力成 (金沢大学新学術創成研究機構ナノ生命科学研究所 教授)

② 研究項目

(A1) 一細胞由来エクソソームの高精度・高感度解析技術の開発

(A2) エクソソーム生成の分子機構の解明

(A3) 細胞特異的エクソソーム解析用マウスの開発

(C1) 微粒子の生体内動態・応答の解明

(C2) 細胞による対微粒子応答の解明

(C3) 対微粒子応答とその相互作用の制御法の開発

(2) 瀬戸グループ

① 主たる共同研究者: 瀬戸 章文 (金沢大学理工研究域 教授)

② 研究項目

(B1) エアロゾルの生体内解析技術の開発

(C1) 微粒子の生体内動態・応答の解明

(C3) 対微粒子応答とその相互作用の制御法の開発

(3) 望月グループ

① 主たる共同研究者: 望月 秀樹 (大阪大学大学院医学系研究科 教授)

② 研究項目

(A2) エクソソーム生成の分子機構の解明

(C1) 微粒子の生体内動態・応答の解明

(C3) 対微粒子応答とその相互作用の制御法の開発