

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

2019年度
実績報告書

2017年度採択研究代表者

秋吉 一成

京都大学工学研究科
教授

糖鎖を基軸とするエクソソームの多様性解析と
生体応答・制御のための基盤研究

§ 1. 研究成果の概要

本研究では、エクソソームの多様性を表す指標としてのエクソソーム表層糖鎖に着目し、その糖鎖プロファイリング技術の確立と糖鎖基盤分離システムの開発を行う。さらに、表層糖鎖の情報をコードしたエクソソームの新規サブクラス分類手法を提案し、エクソソーム糖鎖を介したシグナル伝達・生理機能の分子メカニズム解析とその制御のための基盤技術開発研究を推進している。

今年度は、様々な細胞系、分化過程、分離手法により、エクソソームを含む細胞外小胞表層の糖鎖のプロファイルの解析を広範に実施した。その結果、提案しているレクチンアレイ糖鎖解析により糖鎖構造は顕著に変化することを明らかにし、エクソソームを含む細胞外小胞の多様性、不均一性の新規指標として表層糖鎖が有用であることを実証するデータがさらに蓄積してきた。また、間葉系幹細胞由来エクソソームは間葉系幹細胞マーカーを提示しており、品質管理のマーカーとして、あるいは、骨細胞や神経細胞への分化過程での分化マーカーとなり得ることを明らかにした。さらに、健常者血清とアルツハイマー病患者血清由来エクソソームの糖鎖プロファイルを比較すると異なるパターンが見られ、あるタンパク質の発現が健常者血清と比べてアルツハイマー病患者血清で増加することを明らかにした。

レクチンアレイ解析の結果に基づき、レクチンを利用した細胞外小胞の分離精製手法として、レクチン結合ビーズ法および独自のレクチン固定化スポンジモノリスカラムを作製し、糖鎖認識を利用した分離精製手法の開発も進んでいる。さらに、イオン交換カラムを利用した高純度エクソソーム精製法により、機能の異なるエクソソームの分離精製が可能であることが明らかになった。

エクソソーム糖鎖を介した生体応答機能の解析では、糖鎖遺伝子を活用した糖脂質リモデリングがん細胞とその産生エクソソームの機能について検討している。リモデリングがん細胞からのエクソソームには、確かに対応するガングリオンドが顕著に増加しており、また、それにともない高レベ

ルのインテグリンを含有していることが明らかになった。ガン形質変換、がん転移などにおけるがん由来エクソソームの糖脂質の機能について検討を進めている。一方、エクソソームの細胞取り込みを促進しえる新たな手法も開発した。

【代表的な原著論文】

1. A. Shimoda, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, “Exosome surface glycans reflect osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: Profiling by an evanescent field fluorescence-assisted lectin array system”, *Scientific Reports*, 9, 11497, 2019
2. N. Hashimoto, S. Ito, A. Tsuchida, R.H. Bhuiyan, T. Okajima, A. Yamamoto, K. Furukawa, Y. Ohmi, K. Furukawa, “The ceramide moiety of disialoganglioside (GD3) is essential for GD3 recognition by the sialic acid-binding lectin SIGLEC7 on the cell surface”, *J Biol Chem.*, 294(28), 10833–10845, 2019
3. R. Mizuta, Y. Sasaki, R. Kawasaki, K. Katagiri, S. Sawada, S. Mukai, K. Akiyoshi, “Magnetically Navigated Intracellular Delivery of Extracellular Vesicles Using Amphiphilic Nanogels”, *Bioconjugate Chem.*, 30, 8, 2150–2155, 2019

§ 2. 研究実施体制

(1) 京大(秋吉)グループ

- ① 研究代表者:秋吉 一成 (京都大学大学院工学研究科 教授)
- ② 研究項目
 - ・エクソソーム表層の糖鎖プロファイリング手法の確立
 - ・エクソソーム糖鎖の多様性に基づく分離、分類手法の確立と機能制御法の開発

(2) 産総研グループ

- ① 主たる共同研究者:平林 淳 (産業技術総合研究所 特任上席研究員)
- ② 研究項目
 - ・エクソソーム膜の糖鎖関連アレイ解析手法の確立術の開発
 - ・エクソソーム機能操作のための基盤技術開発

(3) 三重大グループ

- ① 主たる共同研究者:瀬尾 尚宏 (三重大学大学院医学系研究科 特任講師)
- ② 研究項目
 - ・限外濾過法とイオン交換法によるマウス細胞傷害性 T 細胞 (CTL) 細胞外小胞の大量分離
 - ・分離されたマウス CTL 細胞外小胞の糖鎖解析および標的特異性の解明

(4) 中部大グループ

- ① 主たる共同研究者:古川 鋼一 (中部大学生命健康科学部 教授)
- ② 研究項目
 - ・糖脂質リモデリングがん由来エクソソームの生体応答解析

(5) 京大(大塚)グループ

- ① 主たる共同研究者:大塚 浩二 (京都大学大学院工学研究科 教授)
- ② 研究項目
 - ・糖鎖認識に基づくエクソソームの高選択分離法の開発