

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

2017年度採択研究代表者

2019年度 実績報告書

澤田 誠

名古屋大学環境医学研究所
教授

シグナルペプチド:細胞外微粒子機能の新規マーカー

§ 1. 研究成果の概要

環境中の微粒子は様々な生体作用を誘発し同時に生体もエクソソームと呼ばれる生体由来微粒子を産生して防御反応などの生体応答が生じる。私たちは独自に開発したホットメルト-質量分析法でこのエクソソーム中に多量のペプチド分子が含まれていることを見出した。検出されたペプチドの中には種々の生物活性を持つものがあり、エクソソームが担う生体調節機構の一端を担っている可能性がある。そこで、(1) 微粒子を効率よくとり出せる技術と組み合わせて質量分析を行って特異的なペプチドを同定する、(2) 細胞間の調節機能を担っているペプチドの本態を明らかにし領域が目指している細胞外微粒子に起因する生命現象の解明に貢献、さらに、(3) ペプチドなどの高分子を効率よくエクソソームに封入する技術を使ってエクソソームが持っている標的化機能を利用した新規な生体機能制御法の開発を目指して研究を行う。

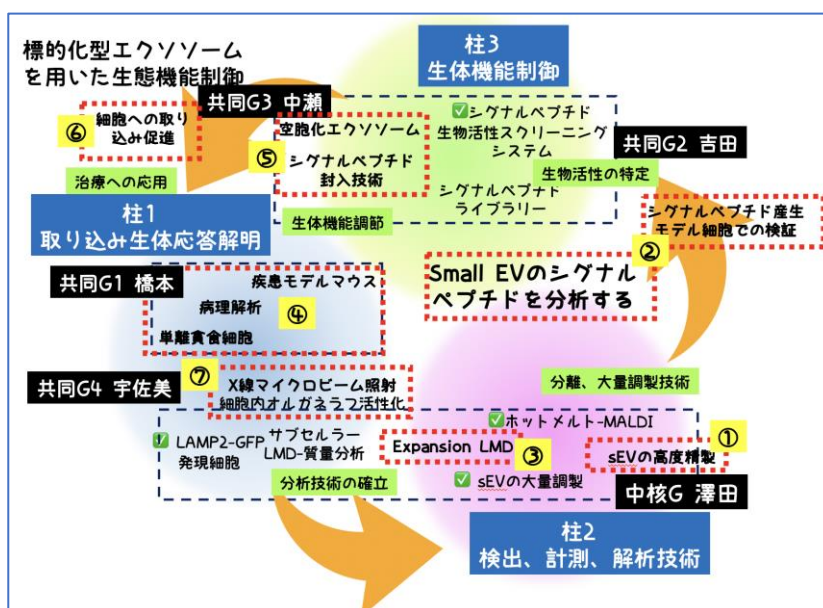
右図は研究計画の項目を図示したものだが、2019年度は中瀬 G が独立 G として加わり、赤点線枠で囲った①～⑦の項目について検討して計画に沿った進展が得られた。

具体的に、①精製に実績のあるチームより供給いた

だいた sEV に匹敵する sEV の高度精製が可能となった、②クルード生体成分では難しかった同定シグナルペプチドの配列分析をモデル細胞システムで実証できた、③Expansion 技術を改良することによって目的成分を保持しサイズを 10 倍に拡張する Expansion-LMD が可能となった、④疾患モデルマウスでの解析が進捗し、肺洗浄液から細胞を回収、炎症性変化の詳細を検討した、⑤空胞化エクソソームの高効率化に成功した、⑥中瀬 G の参画によりエクソソームの標的細胞への取り込みの高効率化技術について検討を始めた、⑦X 線マイクロビーム照射によりエクソソーム産生に関わる脂質修飾酵素活性に変化が生じ、エクソソームの組成や産生量を調節できる可能性を示すことができた、など成果が得られた。

これらの各要素技術が順調に開発できてきたことから、次年度から後半の3年を迎えるにあたり、当初計画通りこれまで行ってきた各グループの技術を融合して有用な生物活性を持ったシグナルペプチドを空胞化エクソソームに封入して生体機能の調節が可能かどうかのテーマへの取り組みを開始する。その1例として、抗炎症作用を持つシグナルペプチドや抗腫瘍作用を持つシグナルペプチドを空胞化エクソソームに封入し、エクソソーム取り込み促進技術により病態モデルまたは培養細胞に取り込ませて細胞機能の変化を調べ、そのバリデーションを中核 G のホットメルト-MALDI 法で行う、などに挑戦する。

【代表的な原著論文】



1. Tomoya Takenaka, Shinya Nakai, Miku Katayama, Mami Hirano, Natsumi Ueno, Kosuke Noguchi, Tomoka Takatani-Nakase, Ikuo Fujii, Susumu S. Kobayashi* and Ikuhiko Nakase*, "Effects of gefitinib treatment on cellular uptake of extracellular vesicles in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells", *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 572, pp. 118762, 2019
2. Ikuhiko Nakase, Miku Katayama, Yoshihide Hattori*, Miki Ishimura, Shunsuke Inaura, Daisuke Fujiwara, Tomoka Takatani-Nakase, Ikuo Fujii, Shiroh Futaki, and Mitsunori Kirihata*, "Intracellular target delivery of cell-penetrating peptide-conjugated dodecaborate for boron neutron capture therapy (BNCT)", *Chemical Communications*, vol. 55, No. 93, pp. 13955-13958 (2019)
3. Yoko Hirata, Yuki Ito, Madoka Takashima, Kazuya Yagyū, Kentaro Oh-hashī, Hiromi Suzuki, Kenji Ono, Kyoji Furuta, Makoto Sawada. Novel Oxindole-Curcumin Hybrid Compound for Antioxidative Stress and Neuroprotection. *ACS Chem Neurosci*. 2020 Jan 2;11(1):76-85.

§ 2. 研究実施体制

(1) 「澤田(中核)」グループ

①研究代表者:澤田 誠 (名古屋大学環境医学研究所 教授)

②研究項目

- ・質量分析によるバルクエクソソームのペプチドプロファイル分析
- ・ホットメルト LMD 技術で細胞内顆粒を切り出す手法の開発
- ・エクソソーム回収精製及び大量調製:協力機関コスモバイオ

(2) 「橋本(共同研究 G1)」グループ

①主たる共同研究者:長谷川 好規 (名古屋大学大学院医学系研究科 教授)

②研究項目

- ・非生物性微小粒子誘導肺傷害モデルマウスの作成
- ・モデルマウスからの貪食細胞、および、免疫細胞の分離

(3) 「吉田(共同研究 G2)」グループ

① 主たる共同研究者:吉田 徹彦 (東亜合成(株)先端科学研究所 所長)

②研究項目

- ・エクソソーム内包シグナルペプチドの生物活性の解析
- ・シグナルペプチドの合成と安定化修飾
- ・ECEx の作成

(4) 「中瀬(共同研究 G3)」グループ

①主たる共同研究者:中瀬 生彦 (大阪府立大学大学院理学系研究科 教授)

②研究項目:細胞外微粒子の形成・分泌・細胞内移行に関わる分子細胞生物学的な機序解明と化学的な制御

- ・非生体性微粒子の細胞内移行・シグナル伝達誘導の機序解明(G1(橋本 G)、G2(吉田 G)と連携)
- ・関連細胞からの細胞内顆粒形成放出過程(シグナルペプチド関与)の機序解明(G1(橋本 G)、G2(吉田 G)と連携)
- ・細胞外微粒子への機能性分子修飾技術(G1(橋本 G)、G2(吉田 G)と連携)
- ・改変型細胞外顆粒の作製及び封入技術(G2(吉田 G)と連携)

(5) 「宇佐美(共同研究 G4)」グループ

①主たる共同研究者:宇佐美 徳子 (高エネルギー加速器研究機構 講師)

②研究項目

- ・モデル貪食細胞へのX線マイクロビーム照射による細胞内小胞の除去
- ・転移性がん細胞のX線マイクロビーム照射による形質変化とエクソソーム分析