

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

2020年度 年次報告書

秋吉 一成

京都大学大学院 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、さらに、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目的としている。本年度は、エバネッセント波蛍光励起検出法によるレクチンマイクロアレイを用い、高感度なエクソソーム表層の糖鎖構造解析技術を確立した。由来細胞(20種類)、細胞外小胞のサイズ、回収方法(4種類)の違いにより表層糖鎖パターンが異なることを明らかにし、そのレクチンアレイパターンを細胞外小胞の多様性、不均一性を表す新規指標となることを提案した。また、健常者、及びアルツハイマー病患者血清からエクソソームを分離精製し、レクチンマイクロアレイで糖鎖プロファイリングを行った。その結果、統計的に13種のレクチンに顕著に差が見られ、特にCD61(インテグリン b3)と呼ばれる血小板に特異的に発現N型糖鎖付加部位をもつ糖タンパク質の糖鎖の変化が確認された。さらに、Tim4-CD63抗体はアルツハイマー患者の診断能として、極めて高い値を示した。アルツハイマーの病態理解につながるとともに、アルツハイマー診断に貢献する新たな知見であると考えられる。レクチンを利用したエクソソームの分離精製手法開発では、レクチン固定化多孔性高分子(スポンジモリス、SPM)を用いた、非特異吸着の少ないカラムを作成する条件を明らかにし、細胞外小胞のサブクラス分離に有用であることを明らかにした。エクソソーム機能操作のための基盤技術開発では、細胞外手法の表層糖鎖を様々なグリコシダーゼを用いてトリミングすることで、糖鎖リモデリング細胞外小胞を調製し得ることをレクチンアレイ解析により明らかにし、細胞との相互作用を制御し得ることを明らかにした。

§ 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:舘野 浩章 (産業技術総合研究所、研究グループ長)
- 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

【代表的な原著論文情報】

H. Odaka, K. Hiemori, A. Shimoda, K. Akiyoshi, H. Tateno, Platelet-derived extracellular vesicles are increased in sera of Alzheimer's disease patients, as revealed by Tim4 based assays, *FEBS Open Bio.*, 11, 741-752(2020)

S. Sawada, Y. T. Sato, R. Kawasaki, J. Yasuoka, R. Mizuta, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Nanogel hybrid assembly for exosome intracellular delivery: Effects to endocytosis and fusion by exosome surface polymer engineering, *Biomater. Sci.*, 8, 619-630 (2020)

R. Ishikawa, S. Yoshida, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Preparation of engineered extracellular vesicles with full-length functional PD-1 membrane proteins by baculovirus expression system, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526, 967-972 (2020)