

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

2021 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。

これまでに、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、そのレクチンアレイパターンを細胞外小胞(EV)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。本年度は、EV 表層糖鎖の酵素によるリモデリングを追跡する手法として、レクチンマイクロアレイが有用であることを明らかにした。この糖鎖リモデリング EV により、細胞への導入効率や体内動態を制御可能であることを見出した。また、膵がん患者血清エクソソームの解析を行い、患者血清由来 EV は膵がんの腫瘍依存的に増加し、従来の膵がんマーカーである CA19-9 とは異なる病態の膵がんバイオマーカーとなり得ること、CD63 陽性 EV は膵がんに対して高い診断能を示すことが明らかになった。さらに、CA19-9 と組み合わせることで、膵がんの再発の予測や早期膵がんの診断にも活用できる可能性があることがわかった。

レクチン固定化多孔性高分子を利用した EV 分離精製開発では、課題であった EV の非特異吸着を親水性ポリマーPVP をブロッキング剤として用いることで解決し得ることを見出した。また、このカラムで分離された EV のプロテオーム解析を行い、溶出した EV の構成タンパク質群が大きく異なることが明らかとなり、膜表面糖鎖種に基づく EV のサブクラス分離が可能であることが示唆された。また、限外濾過法(Ultrafiltration)と陰イオン交換法(Ion-exchange)を用いた EV の大量調製法(UFIE 法)は、動物種の違いや細胞の違いによらず、培養上清からエクソソームやマイクロベシクルを分離精製し得る汎用性の高い手法であ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、分離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細胞分子工学研究部門 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
 - ・種々の細胞培養上清を用いた、限外濾過法とイオン交換法によるエクソソーム調製
 - ・エクソソームの機能に多大な影響を与えるタンパク質の同定とその機能探索

(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 特任教授)
- 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
 - ・レクチン固定化 SPM 充填カートリッジの作製と評価
 - ・レクチン固定化 SPM 充填カラムのアフィニティー評価
 - ・SARS-CoV-2/Spike Protein の選択的吸着

【代表的な原著論文情報】

- 1) Shimoda A, Miura R, Tateno H, Seo N, Shiku H, Sawada SI, Sasaki Y, Akiyoshi K. Assessment of Surface Glycan Diversity on Extracellular Vesicles by Lectin Microarray and Glycoengineering Strategies for Drug Delivery Applications. *Small Methods*. 2022 Feb;6(2):e2100785. doi: 10.1002/smtd.202100785.

- 2) Odaka H, Hiemori K, Shimoda A, Akiyoshi K, Tateno H. CD63-positive extracellular vesicles are potential diagnostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma. *BMC Gastroenterol.* 2022 Mar 28;22(1):153. doi: 10.1186/s12876-022-02228-7.
- 3) Hayashi Y, Yimiti D, Sanada Y, Ding C, Omoto T, Ogura T, Nakasa T, Ishikawa M, Hiemori K, Tateno H, Miyaki S, Adachi N. The therapeutic capacity of bone marrow MSC-derived extracellular vesicles in Achilles tendon healing is passage-dependent and indicated by specific glycans. *FEBS Lett.* 2022 Apr;596(8):1047-1058. doi: 10.1002/1873-3468.14333.
- 4) Seo N, Nakamura J, Kaneda T, Tateno H, Shimoda A, Ichiki T, Furukawa K, Hirabayashi J, Akiyoshi K, Shiku H. Distinguishing functional exosomes and other extracellular vesicles as a nucleic acid cargo by the anion-exchange method. *J Extracell Vesicles.* 2022 Mar;11(3):e12205. doi: 10.1002/jev2.12205.
- 5) Mizuta R, Sasaki Y, Katagiri K, Sawada S, Akiyoshi K, Reversible conjugation of biomembrane vesicles with magnetic nanoparticles using a self-assembled nanogel interface: Single particle analysis using imaging flow cytometry, *Nanoscale Adv.*, 2022; 4, 1999-2010. doi: [10.1039/D1NA00834J](https://doi.org/10.1039/D1NA00834J)