

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「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」  
研究課題「微粒子による生体応答の相互作用の  
解明と制御」

## 研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2025年03月

研究代表者：華山 力成  
(金沢大学 ナノ生命科学研究所  
教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

本研究では、エクソソームやエアロゾルに関する解析技術を高度化し、生体内解析技術を創出することで、両者に対する生体応答に共通する原理の発見や、両者の相互作用による生命現象の解明と制御に取り組んだ。華山は、一細胞／一粒子エクソソームの高精度・高感度解析技術を確立し、エクソソーム生成を制御する分子と薬剤を同定した。この分子の欠損によりエクソソーム放出を細胞特異的に阻害するモデルマウスを作製し、癌進展におけるエクソソームの新機能を発見した。更に望月と共同で、脳神経由来エクソソームによる  $\alpha$ -Synuclein (Syn) mRNA の伝播機構と多系統萎縮症との関連を見出した。望月は更に新たな微粒子として  $\alpha$ -Syn Fibril やミトコンドリアの機能を見出した。瀬戸は、エアロゾルへの細胞応答を解析するツールとして、微粒子の分級・捕集・追跡を可能とするエアロゾル細胞曝露システムを構築した。このシステムとマウス肺胞内投与実験から、エアロゾルにより好中球や肺胞上皮細胞からエクソソームの放出が誘発され、エアロゾルの貪食除去や排出促進などの生体防御を担うことを発見した。更に改変エクソソームにより、生体内免疫応答を自在に制御する技術を確立し、連携企業とともにエクソソーム創薬の実現に向け展開している。

また、1年間研究期間では、我々が開発したエクソソームの高精度・高感度解析技術を活用して、(株)ソニーと1粒子エクソソームを解析できる超解像フローサイトメーターの共同開発を実施した。

### (2) 顕著な成果

#### <優れた基礎研究としての成果>

##### 1.

概要: エクソソームの高精度・高感度解析技術を開発し、それを用いてエクソソーム生成を制御する主要分子として TSG101 を同定した。TSG101 の細胞特異的欠損により、生体内でのエクソソーム機能を解析し、癌の進展においてエクソソームが血管新生・転移・骨髄抑制・癌細胞の軟化を引き起こす分子機序を発見した。また、脳において神経細胞由来エクソソームが、多系統萎縮症や遺伝性 ATTR アミロイドーシスなどの神経変性疾患の発症を引き起こす機序を見出した。

##### 2.

概要: 実大気環境下に存在する微粒子を分級・捕集し、サイズ毎の化学組成を解析する手法を確立した。また肺胞表面を模擬した気液界面 (ALI) エアロゾル曝露実験系を構築し、エアロゾルの細胞応答を追跡する新たなシステムを開発した。実大気微粒子を模擬したモデル粒子を肺胞上皮細胞ならびにマクロファージに投与し、その細胞応答に与える粒子種、濃度、粒子形状などの影響を解析することで、肺胞細胞系と生体外微粒子の免疫学的相互作用を明らかにした。

##### 3.

概要: 肺胞に侵入した酸化鉄ナノ粒子が、好中球の浸潤とエクソソーム分泌を誘導し、好中球由来エクソソームが、マクロファージによる酸化鉄ナノ粒子の貪食除去と炎症の収束を促進することを発見した。また、非晶質シリカナノ粒子を取り込んだ肺胞上皮細胞が、エクソソーム分泌によりシリカを細胞外へと排出し再取り込みを阻害することで、上皮細胞の癌化を防いでいることを明らかにした。

##### 4.

概要: 現在世界で実用レベルに達しているのは NanoFCM 社の機器のみであるが、海外製品で高価な上、汎用性が低い(2色染色のみ、細胞と同時検出できない)機器である。我々は(株)ソニーとの共同開発により、Spectral Cell Analyzer ID7000 に、405nm-SSC 検出器の追加、励起パワーの高出力化、送液速度の低速度化、送液系フィルタの導入、電気ノイズの低減、アプリケーションの開発、解析プロトコルの確立などを行い、エクソソームと細胞を同時に検出でき、最大 44 色を自動測定可能な機器を開発した。2025 年内に上市する予定である。

#### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

##### 1.

概要:従来法より千倍以上にエクソソームを高感度検出できる技術を開発し、連携企業から世界販売を開始した。この解析技術を用いて既存薬化合物ライブラリーからエクソソームの分泌抑制剤と促進剤を同定し国際特許出願・各国移行を行った。今後、エクソソーム分泌抑制剤は癌転移や神経変性などに関わる悪玉エクソソームの產生抑制に、促進剤は組織修復や再生などに関わる善玉エクソソームの產生促進へと応用されることで、エクソソーム創薬の実現に貢献すると期待される。

## 2.

概要:分級捕集法の開発により調整した微粒子は、サイズ・化学成分が特定された標準試料として、領域内連携に繋がった。また、エアロゾル細胞曝露システムについては、呼吸器系細胞における様々な外因性微粒子への細胞応答を解析するシステムとして民間企業において製品化を行った。さらに、エアロゾルの気中動態解析や捕集技術は、エアロゾル感染対策技術の開発に寄与した。

## 3.

概要:複数の免疫制御分子を同時に発現させることで免疫制御機能を高めた改変エクソソームの開発を行い、「がん細胞のみを特異的に攻撃する免疫細胞」や「自己免疫疾患・アレルギーのみを特異的に抑制する免疫細胞」などを、体内に効率的に作り出す新規免疫制御法を開発した。今後、様々な疾患や感染症に対する効果的かつ副作用のないエクソソーム創薬の実現を目指す。

### <代表的な論文>

#### 1.

概要:Lyu et al., *Journal of Extracellular Vesicles*, e70035 (2025)

テトラスパニンとのキメラ分子作製により、T 細胞の活性化に必要な、①抗原-MHC 複合体、②補助シグナル、③サイトカインを同時に発現する改変エクソソームを開発した。特に、がん抗原を載せたエクソソームは、がん細胞を攻撃する細胞傷害性 T 細胞を特異的に活性化し、強力な抗がん効果を発揮した。

#### 2.

概要:Amma C et al., *Environ Geochem Health*, 45:5879-5891(2023). 大気環境の異なる地域(川崎市、福江島)の PM<sub>2.5</sub> に含まれる金属の成分分析と肺胞上皮細胞への炎症誘導機構について解析した。その結果、PM<sub>2.5</sub> は採取した地域により、異なる炎症誘導能を有すること、また、PM<sub>2.5</sub> に含まれる金属成分のうち、イオン状態ではなく、特に粒子状態の銅が、肺胞上皮細胞への高い炎症誘導能を示していることを見出した。その成果として、微粒子中の金属成分の採取法ならびに解析・評価法が確立され、細胞への微粒子曝露システムの設計に反映した。

#### 3.

概要:Choong Chi-Jin et al., *Autophagy*, 17(10):2962-2974 (2021). ミトコンドリアストレスを加えた際に、ミトコンドリアが細胞外に放出されることを見出し、特にミトファジー機能が低下している時に顕著に見られることを見出した。ストレスを加えない定常培養状態でもこの放出は見られ、ミトコンドリア品質管理機構としては、ミトファジーと両輪で働いている事を示した。更に、パーキンソン病を起こす Parkin 遺伝子の疾患変異を有する患者由来の線維芽細胞では、細胞外に放出するミトコンドリア量が増加している事を示し、疾患との関連が示唆された。

## § 2 研究実施体制

### (1)研究実施体制

#### 1.研究チームの体制について

##### ① 「華山」グループ

研究代表者:華山 力成(金沢大学ナノ生命科学研究所 教授)

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

A4. 超解像フローサイトメーターによる単一微粒子解析技術の確立

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

主たる共同研究者:瀬戸 章文(金沢大学理工研究域 教授)

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. 微粒子の動態・応答の制御法の開発

③ 「望月」グループ

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)

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

④ 「井田」グループ

主たる共同研究者:井田 大貴(名古屋大学大学院工学研究科 特任准教授)

研究項目 C2. 細胞による対微粒子応答の解明

⑤ 「濱田」グループ

主たる共同研究者:濱田 隆宏(岡山理科大学理学部 准教授)

研究項目 C2. 細胞による対微粒子応答の解明

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本研究を通して、代表者が目指すエクソソーム創薬を実現するネットワークが形成された。特にさきがけ研究者の山野(変換エクソソーム)、小嶋(RNA 内包化)、井田(1粒子解析)、佐藤雄(表面性状解析)とは今後も協力して高機能エクソソーム製剤の開発を進めてゆく。富士フィルムとは 2019 年よりアドバイザリーコンサルティング契約を結び、エクソソーム解析試薬の開発やその世界展開で密接に協力している。富士フィルムを通じ、世界のトップ研究者との独自のネットワークを確立している。また、日産化学とはエクソソーム分泌抑制剤・促進剤から変換エクソソーム開発まで計 6 件の国際特許を共同出願し、強力なパートナーとなっている。更にソニーと1粒子エクソソーム解析に用いる超解像フローサイトメーターの開発を開始し、2025 年中の世界販売を目指している。これらを通して、Made in Japan によるイノベーションを創出し、世界のエクソソーム創薬を先導する展開を目指す。

瀬戸は、エアロゾルの発生・分級・捕集・分析技術に関して、従来のネットワークを更に発展することができた。国際連携として、ナノ粒子の挙動評価について、ミネソタ大学 Chris Hogan 教授、捕集技術について、韓国成均館大学 Taesung Kim 教授などと密接なネットワークを構築した。領域内では、同チーム内における融合研究をはじめとして、領域内他チーム(「吉森」チーム、「澤田」チームなど)への微粒子試料提供を通じて様々な連携が実現できた。さらに、民間企業については、パナソニック・ダイキン・三機工業・ニッタなどとの室内環境における空気浄化技術、トヨタ紡織・アイシンなどとの空間デザイン技術などについて、それぞれ強固なネットワークが形成された。