

研究終了報告書

「内因性微粒子の放出と細胞間伝播の現場を可視化する技術の開発」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：白崎 善隆

1. 研究のねらい

生体を構成する細胞は様々な方法を用いて相互情報交換を行い、高次構造の形成、恒常性の維持、機能発現制御を行っている。特に空間的に離れた細胞間における情報交換においては、可溶性タンパク質群やホルモン、脂質メディエーターなど様々な種類の液性分子を介した相互作用が中心であると考えられてきた。これらの液性因子を介した細胞間相互作用の特徴は、各々の分子特異的な受容体が発現している細胞に対して作用できることであるが、発信細胞と受容細胞の距離が遠くなるほど拡散や分解、周辺組織への吸収によって実行濃度が速やかに低下し、やがて活性化下限濃度を下回り情報は届かなくなる。しかしながら、近年エクソソームを初めとする内因性微粒子が液性因子同様に細胞の活性化に関与し得る科学的証拠が報告されている。特に2007年に Jan Lötvald らが明らかにしたエクソソームによる miRNA や mRNA の伝達が受容細胞の遺伝子発現を制御し得る発見は内因性微粒子による細胞間相互作用の重要性を明らかにした。このような内因性微粒子は、粒子内外にシグナル因子を濃縮したまま受容細胞に伝達できる、言わば手紙や小包のようにコミュニケーションを媒体していると考えられる。内因性微粒子は、その生成過程が異なると推定される複数種が存在する。細胞質成分を内包した微粒子の代表であるエクソソームはエンドソームが貫入、分断して多胞体を形成し、これが細胞膜に融合することで細胞外に分泌されると考えられている。微小小胞体は細胞質成分が細胞膜から直接出芽・分断することで生成される。また、アポトーシスでは、細胞質が分断化したアポトーシス小体が生成される。さらに、細胞内ではオートファジーにより細胞質成分を含有した小胞オートファゴソームや、細胞質成分は内包してはいないが大量の輸送・分泌小胞が存在している。これらは、近年着目されている制御されたネクローシス様細胞死(パイローシス、ネクロプトーシスなど)に伴う細胞膜開孔や細胞溶解によって細胞外に放出され、内因性微粒子になり得る。これらの内因性微粒子は、超遠心法等による粒子サイズや膜成分、膜に局在する抗原分子によって分類されているが、生成過程による違いを明確に区別するマーカーが同定されておらず、各種内因性微粒子が果たす機能の差などが明確になっていない。

この課題に対して、本研究は、内因性微粒子の生成・放出過程と細胞間伝播の現場を1細胞粒度で実時間可視化することで、多様な内因性微粒子の分類およびその機能差を見出すことを目指した。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は①細胞から放出された内因性微粒子の性状を1粒子毎に解析可能とし、②1細胞の細胞内膜動態や細胞状態と細胞外への微粒子放出動態を同時に観察して、生成過程に則した微粒子の分類を可能とする解析プラットフォームを開発することで、内因性微粒子の生理機能に迫る解析方法を確立することを目指して行われた。細胞から放出される内因性微粒子には多胞体(MVB)に由来するエクソソーム、細胞膜から直接出芽する microparticle, apoptotic bodies の他、近年では ectosome, migrasome など形成過程を異とする様々な種類が報告されるようになった。近年ではこれら内因性微粒子はまとめて細胞外小胞、“Extracellular Vesicles (EVs)”と呼ばれている。EVs の放出量は細胞種の違いや細胞への刺激の有無によって変化することが知られているが、細胞の状態と EVs の放出、さらには放出された EVs の性状を関連付けて議論することは、その生理的機能を明らかにするために重要である。そこで本研究では、研究テーマ①として、「内因性微粒子の1粒子解析技術の確立」を行なった。この技術は、抗体を用いた EVs 外葉に存在する抗原の捕捉および染色を全反射照明蛍光顕微鏡上で行うことで EVs の1粒子単位でのリアルタイム検出を可能とした。次に、研究テーマ②「内因性微粒子生成・放出過程可視化技術の確立」として、確立したリアルタイム EVs 検出技術を1細胞隔離培養が可能な微細加工技術ウェルアレイチップ上で行うことで1細胞の EVs 放出動態のライブセルイメージングを行うとともに、高速共焦点顕微鏡によって EVs 放出が確認された細胞の細胞内膜動態の観察を行なった。これらの研究成果により、均一に EVs を産生すると思われていた培養細胞においても、EVs の産生量や産生のタイミングにおいて細胞間の不均一性が存在することが明らかとなった。

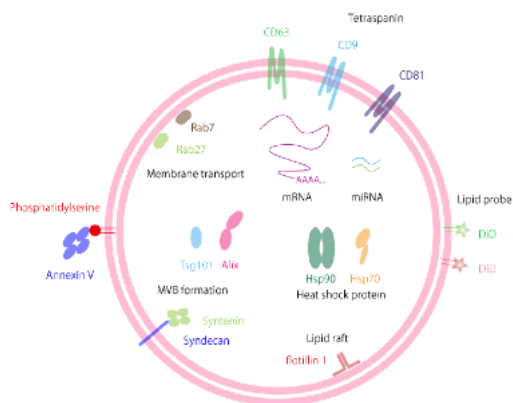
(2) 詳細

研究テーマ①「内因性微粒子の1粒子解析技術の確立」

1. EVs 捕捉のターゲット分子の探索

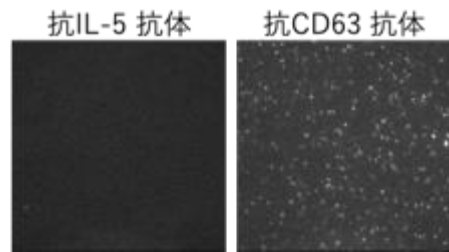
EVs の捕捉および染色を非破壊的に行うため、EVs の膜表面に露出している標的分子の文献探索を多なした。結果、EVs への局在が示唆されている多くのマーカー分子は EVs の内葉または内腔に存在していた。Syndecan は膜貫通タンパク質であったが MVB 成熟の過程で ILV の外側が刈り込まれるため、表面に残存する部分に対応した抗体が存在せず、抗原として採用できなかった。これらの検討から、EVs の捕捉/染色には Tetraspanin である

CD9、CD63、CD81、および EVs 外葉への露出が期待されるホスファチジルセリン (PS)を標的とすることにした。



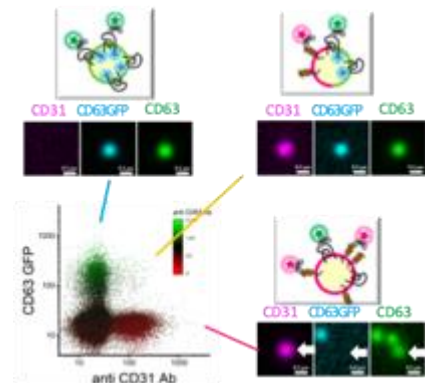
2. EVs 効率的捕捉条件の確立

EVs の1粒子捕捉条件を実験的に検証するため、EGFP 標識 CD63 を強制発現させた線維肉腫細胞株 HT1080(がん研究所 芝清隆博士提供)の培養上清を用いて、各種 Tetraspanin に対する抗体および PS と結合する Tim-4 組み換えタンパク質をコートしたガラス表面での粒子結合数を1分子全反射照明蛍光顕微鏡によって測定した。結果、抗 CD9,CD63 抗体および Tim-4 で効率よく EVs を捕捉できることが示された。



3. 多重染色による EVs の多様性の確認

次に捕捉した EVs に対して、表面抗原の染色により EVs の多様性を1粒子分解能で検証した。本研究では、1細胞由来の EVs をライブセルイメージングとの同時計測を目指すため、捕捉と染色を並行してリアルタイムに行い、全反射照明蛍光顕微鏡によって、ガラス表面に捕捉した粒子のみを検出することを試みた。右図では、CD63EGFP を強制発現した HT1080 細胞とヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC の共培養上清を測定した例であるが、HT1080 由来の EVs (CD63GFP 陽性:シアン)と HUVEC 由来 EVs (CD31 陽性:マゼンダ)を異なるクラスターとして識別できることが確認された。



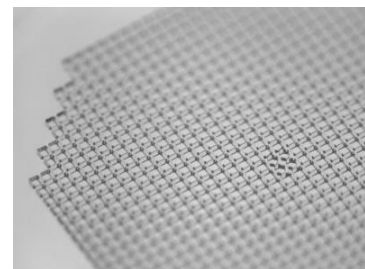
以上の検討から、Tetraspanin や PS に対する抗体等を用いた蛍光免疫アッセイに基づき EVs を捕捉・染色し、全反射照明蛍光顕微鏡によって検出することで、1粒子 EVs 計測が可能であると実証された。

研究テーマ②「内因性微粒子生成・放出過程可視化技術の確立」

研究テーマ①の成果を受け、研究テーマ②では1細胞からの EVs の放出動態の時系列観察技術の開発を行なった。

1. 全反射照明・共焦点蛍光観察に適した微細加工ウェルアレイチップの開発

研究代表者はこれまでの研究において、サンドイッチ蛍光免疫染色法と全反射照明蛍光顕微鏡を組み合わせることで、1細胞からのサイトカイン放出を実時間で観察する方法 Live-cell imaging of secretion activity (LCI-S)を開発していた。LCI-S を用いたサイトカインに用いた場合、検出されるシグナルは細胞の周辺に局在する。しかしながら、EVs は捕捉効率が低く、サイトカインに比べて局在が弱かった。

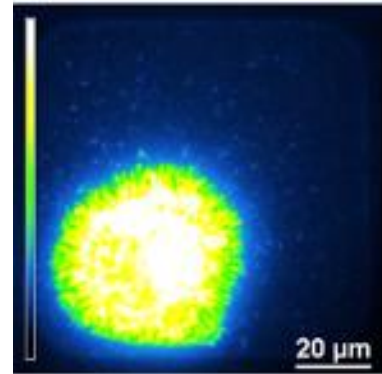


そのため、本研究では1細胞からの EVs の XY 方向の拡散を区画化するための微細加工ウェルアレイチップの開発をおこなった。本研究では、細胞の EVs 放出を可視化するのに十分な広さの抗体結合底面を有し(80 μm 四方)、全反射照明蛍光観察および共焦点蛍

光観察の障害にならない(低自家蛍光、低屈折率)材料である非晶性フッ化炭素樹脂(サイトップ™, AGC 社)を用いた微細加工ウェルアレイチップの作成に成功した。

2. LCI-S を用いた EVs 放出動態の1細胞解析

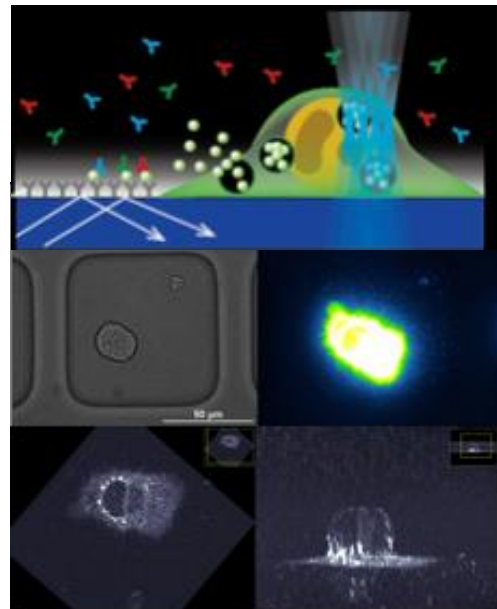
次にこのウェルアレイチップを用いて、1細胞からの EVs 放出の可視を試みた。右図は研究テーマ①-2 で用いた CD63-EGFP 発現 HT1080 の EVs 放出を可視化した様子 (EGFP 蛍光強度を疑似カラーで表示) である。広範な明るい領域は細胞が接着した部分であり、細胞膜上の CD63 や migrasome であると考えられる。一方、細胞が接着していない領域にもいくつか輝点が見られ、これらは細胞から放出された遊離性の EVs であると考えられた。研究テーマ①-2 で見られた EVs はバルク培養上清に遊離



していたと考えられることから、本研究では遊離性 EVs に着目して放出動態を多数の細胞から測定し、EVs 産生動態の細胞間不均一性、EVs 産生動態の細胞状態依存性について調べた。結果、比較的均一な遺伝的背景を持つと期待される株化培養細胞においても、EVs の産生量には細胞間の不均一性が存在することが明らかとなった。また、ウェルアレイチップに播種された直後の細胞はあまり EVs を産生せず、細胞毎に異なるタイミングで EVs の産生を亢進させることが見出された。EVs の産生が亢進した際の細胞の状態を明視野像で確認すると、ウェル底面に生着した細胞が細胞体を丸く変形させるタイミングや細胞分裂前後、さらには細胞死を起こす直前などにあることが散見された。これらの観察事実から、EVs 産生は細胞がストレスに曝されることで亢進していると推測された。

3. LCI-S と高速共焦点顕微鏡の併用による EVs 放出現場の直接観察の試み

EVs 産生亢進時には、MVB の形成や細胞膜融合の促進、もしくは細胞膜からの EVs 出芽の促進が生じていると期待される。そこで、LCI-S による EVs 産生動態の可視化と高速共焦点顕微鏡による細胞内膜動態の3次元蛍光観察を可能とした顕微鏡システムを構築した。現在、本システムにより蛍光標識 CD9/CD63 の細胞内局在の撮像に成功しており、EVs 放出亢進時における細胞内 EVs 生成・放出現場の直接観察を進めている。



LCI-S と高速共焦点顕微鏡による CD9 陽性 EVs の放出動態と細胞内局在の同時観察の例

3. 今後の展開

本さきがけ研究により、EVs の産生動態においても1細胞間の集団的・時間的ばらつきが存在することが明らかになった。さらに、EVs の産生は細胞が分裂、細胞死、ストレス応答といった状態遷移のタイミングで亢進している可能性が提示された。本さきがけ研究によって開発された技術は、今後、これらの異なる状態遷移において産生される EVs の性状の異質性や産生制御機構の解明に資すると期待される。

4. 自己評価

本さきがけ研究では、これまで未知であった個々の細胞における細胞外小胞の産生動態に着目し、その様相を明らかにしようとする挑戦的なものであった。研究者が LCI-S により明らかにした個々細胞の細胞外小胞産生の集団的・時間的多様性は、サイトカインなどの他の細胞間情報伝達因子の産生動態の多様性と共通であることが見出された。本研究では、さらに個々の細胞の集団的・時間的多様性の障壁を乗り越え、細胞内から細胞外に細胞外小胞が生成・放出される瞬間をも可視化しようと試みている。本研究期間において、計測技術の基盤開発を達成することができた。今後、この技術を様々な細胞、分子標的薬に応用し、細胞外小胞の多様性の解明に貢献することが期待される。

個人型研究プロジェクトであるさきがけ研究において、本研究では研究者が得意とする顕微鏡技術および微細加工技術の開発にエフォートと研究費を集中することで、本報告にある研究成果を得られたと考えられる。一方で、本研究の進展にはマーカー分子を蛍光標識した細胞材料が大きな役割を果たした。これらの材料をご提供頂いた領域アドバイザー芝先生(がん研究所)、領域内共同研究者小嶋先生(東京大学)への感謝の意をここに表したい。

本研究により応用開発を進めた1細胞分泌実時間イメージング技術(Live-cell imaging of secretion activity)は、益々重要性が高くなる1細胞計測技術、特に細胞間相互作用に着目した計測技術として発展することが期待され、細胞外微粒子研究のみならず、世界的課題となっている Covid19 の感染拡大や重症化メカニズムの解明およびその制御に資する基盤技術となると期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. Mai Yamagishi, Osamu Ohara, Yoshitaka Shirasaki. Microfluidic Immunoassays for Time-Resolved Measurement of Protein Secretion from Single Cells, Annual Review of Analytical Chemistry, 13:6.1-6.18,2020

細胞間相互作用に重要な役割を果たす液性因子の測定は、細胞状態の探索や生理状態を特定するための基本的な方法である。近年の、高感度イムノアッセイとマイクロ流体技術を組み合わせた技法の進歩は、個々の細胞からも分泌された体液性因子を定量することを可能とした。当該文献では、単一細胞からのタンパク質分泌のための時間分解アッセイプラットフォームの現状に焦点を当て最近の技術をレビューするとともに、システムバイオロジーの

観点から、時間分解免疫測定の今後の展望についても議論した。

2.Yoshitaka Shirasaki, Osamu Ohara, Challenges in Developing Protein Secretion Assays at a Single-Cell Level, Handbook of ELISPOT : Methods and Protocols, Methods Mol. Biol., 1808, 2018

細胞からの液性因子の分泌は、細胞間相互作用にとって重要なプロセスである。細胞間相互作用を明らかにする可能性から、タンパク質分泌アッセイは免疫学者にとって不可欠なツールである。しかしながら、システム生物学的に細胞社会全体のダイナミクスと恒常性を理解するためには、分泌された分子を媒介とする細胞間相互作用を再検討する必要がある、リアルタイムでタンパク質分泌をモニターすることが求められるようになった。当該文献では、特に細胞集団としての機能発現を社会学の観点から俯瞰し、タンパク質分泌アッセイの最近の進歩と将来の方向性をレビューした。

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・CSHL Gene Expression & Signaling in the Immune System 2020 Meeting

(2020年10月16日, オンライン) 選抜口頭発表

Novel cell recovery method “ChronoS” revealed a gene set transiently expressed within early phase of ILC2’s immune response

Yumiko Tanaka, Yoshitaka Shirasaki, Mai Yamagishi, Takashi Kamatani, Kaede Miyata, Nobutake Suzuki, Osamu Ohara, Kazuyo Moro, Hiroki Kabata, Koichi Fukunaga, Sotaro Uemura

・EMBO Workshop Cell death in immunity and inflammation (Oct. 8th 2019, Crete, Greece)

選抜口頭発表

Single-cell imaging of DAMPs release during necroptosis

Yoshitaka Shirasaki

・第6回日本細胞外小胞学会(2019年10月25日, 東京)

オーラルプレゼンテーション賞 受賞

全反射照明法を用いた1粒子実時間イムノアッセイによるEV性状・放出動態解析

白崎 善隆

・ISEV2019 (2019年4月26日, 京都)

選抜口頭発表

Development of a live-cell imaging technique for secretion activity of extracellular vesicles of individual cells

Shirasaki Y, Tsukada K, Suzuki N, Minamisawa T, Yamagishi M, Kosaka N, Ochiya T, Ohara O, Shiba K, Uemura S