

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05182

研究課題名(和文)人工細胞膜との特異的膜融合を利用するエクソソーム膜タンパク質の高感度計測法

研究課題名(英文)An assay for surface proteins on exosomes based on membrane fusion with an artificial cell membrane

研究代表者

東海林 敦 (Shoji, Atsushi)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：90459850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：直径が100 nm程度のエクソソームはあらゆる細胞から分泌されている。エクソソームには分泌元の細胞情報が集積されており、これを取り込んだ他の細胞は、その機能をエクソソームの種類に応じて変化する。また、細胞の種類や状態により含有される細胞情報が異なるものとされている。しかしながら、これを理解するための分析方法は十分に発展していない。本研究では、エクソソーム表面のタンパク質に着目し、その種類や量を計測するための方法を提案した。この方法では、人工細胞膜にエクソソームを膜融合させることで、特別な前処理を必要としなくとも、イムノアッセイの原理で膜タンパク質を計測できるようにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の状態に応じて変化するエクソソームの質変化を捉えることで、細胞間のコミュニケーションを理解する一助になる。エクソソームを分離精製することは難しく、エクソソームの膜タンパク質を解析する方法は未成熟である。エクソソームと人工細胞の膜融合を利用することで、これまでの計測技術の課題を一挙に解決できるものの、膜融合の現象は実験的確認が得られていない。本研究では、膜融合を観察するための新しい方法論を提案し、これを利用してエクソソームの膜タンパク質の解析法を提案した。ガン細胞から分泌されるエクソソームの膜タンパク質解析により、ガン診断の早期発見と、個別化医療が可能になるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes with a diameter of about 100 nm are secreted by all cell types. There are many kinds of cellular information elements, such as protein, DNA, RNA, in exosomes. Other cells that have taken up the information change their functions according to the type of exosomes. Cellular state is believed to alter the exosomal components, but the detail has not been revealed because analytical methods for the components have not been fully developed. In this study, we tried to develop a quantification method for membrane proteins on exosomes surface. This method is based on a membrane fusion of exosomes with an artificial cell membrane. This membrane fusion enable us to develop an immunoassay for membrane proteins in exosomes without any special pretreatment.

研究分野：分析化学

キーワード：人工細胞膜 エクソソーム グラミシジン チャネル活性 イムノアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞膜の一部から構成される 50 -150 nm の膜小胞であり、すべての細胞から分泌される。ガン細胞から分泌されるエクソソームには、分泌元のガン細胞の情報が集約されている。そのため、ガン細胞エクソソームの膜に存在するタンパク質の種類や量から、ガンの種類や進行状況を把握できると考えられている。そのため、がん細胞由来エクソソームの膜タンパク質を高感度かつ網羅的に計測する技術開発は、社会から強く要求されているガン診断の早期発見と、ガンの進行状況に合わせて治療方針を決定する個別化医療に貢献できると期待されている。しかしながら、そのような計測法の技術開発は難しく、高度なガン治療の実現には程遠い。ガン細胞由来エクソソームの膜タンパク質を計測する難しさの主な理由は、エクソソームの回収と膜タンパク質の検出である。その主な理由を下記に示す。

エクソソームは壊れやすく、血液から効率よく回収できない (超遠心分離で 10% 未満)。クロマトグラフィーでは、血液中の巨大複合タンパク質を除去しきれない。すべての細胞がエクソソームを分泌しており、血液中に含まれるガン細胞由来エクソソームは、そのうちのわずかに数% 程度しかない。さらに、正常細胞エクソソームとガン細胞エクソソームを分離する技術もない。エクソソームの膜タンパク質には、膨大な種類の膜タンパク質が存在する。

## 2. 研究の目的

ガン細胞由来エクソソームのみが選択的に標的細胞と膜融合する人工細胞膜を創製する。人工細胞にガン細胞エクソソームを選択的に膜融合させることで、わずか 4-5 nm のナノ薄膜にエクソソーム膜タンパク質を高濃度で濃縮できる。さらに膜融合で取り込まれた膨大な種類の膜タンパク質のうち、標的となる膜タンパク質をイムノアッセイの原理で測定する。それにより、エクソソーム同士の分離は必要とせずに、血液中の正常細胞由来エクソソームを除去し、数% 程度しかないガン細胞エクソソームのみを効率よく回収できるものと期待される。また、人工細胞膜のリン脂質のフォスホコリン基には、非特異的吸着を抑制する特性があることから、血液中の夾雑物質を除去できる。しかしながら、生体内でエクソソームが人工細胞と選択的に膜融合されると信じられているものの、この現象を実験的に示した例は 1 例のみであり、その詳細は明らかにされていない。そこで、人工細胞膜とエクソソームの膜融合を評価する方法を構築し、膜融合の現象の理解に役立て、選択的膜融合を人工的に再現する。これをもとに、イムノアッセイの原理で標的となるエクソソーム膜タンパク質計測に発展させる。

## 3. 研究の方法

人工細胞膜とエクソソームの膜融合を評価する方法を構築するために、支持脂質二分子膜を用い、グラミシジンのチャネル電流を指標とし膜融合を評価した。人工細胞膜の脂質組成や pH 条件により、膜融合がどのように変化するか調べた。支持脂質二分子膜にエクソソームを膜融合させた後、エクソソーム膜タンパク質の抗体をこの膜に添加し、イオン電流の応答を計測した。

## 4. 研究成果

### 4 - 1 エクソソームとの膜融合により塩化するグラミシジンチャネルのコンダクタンス値

人工細胞膜 (支持脂質二分子膜) にグラミシジンを包埋させた後、エクソソームを添加したところ、エクソソームの個数に応じてコンダクタンス値が増加した (図 1)。このコンダクタンス値の増加が膜融合によるものであることを示すために、人工細胞膜をフォスファチジルコリン (中性電荷の脂質) とカチオン脂質で作製し、これにエクソソームを添加した。エクソソームの膜にはコレステロールが豊富に含まれていることが知られているため、膜融合によりエクソソーム由来のコレステロールが人工細胞膜に移行するものと考えられる。エクソソーム膜融合後に脂質二分子膜内のコレステロールと結合し、ナノポアを形成するアンホテリシン B を添加した。その結果、ナノポア形成に基づくコンダ

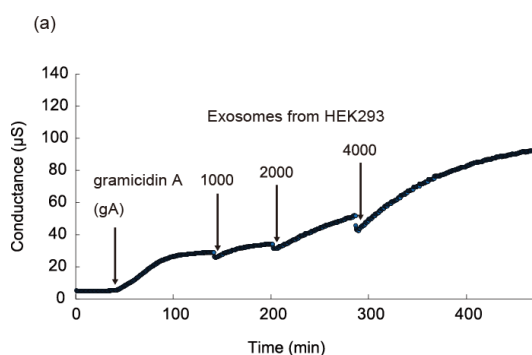


図 1. エクソソームによるコンダクタンス値の変化

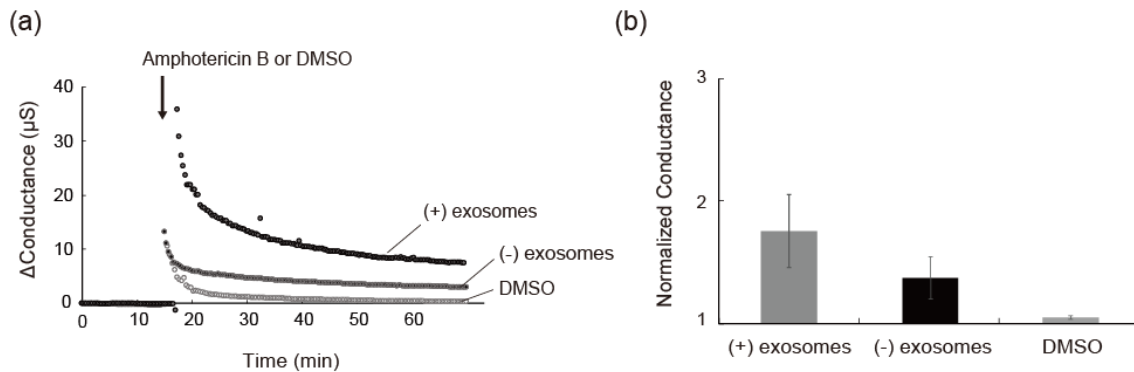


図 2. エクソソーム添加後の人工細胞膜にアンホテリシン B のコンダクタンス

クタンス値の増加が確認された (図 2)。このことから、グラミシジンとエクソソームを添加した際に得られたコンダクタンス値の上昇は膜融合に基づくものであることが示された。

#### 4 - 2 エクソソーム膜融合によるコンダクタンス値変化の原理

膜融合によるコンダクタンス値増加現象の原理を明らかにするため、張り合わせ法により作製した平面脂質二分子膜を用い、シングルチャネルレベルでエクソソーム膜融合の前後で変化するグラミシジンチャンネルの活性を評価した (図 3)。グラミシジンを包埋させた人工細胞膜において、矩形波状のチャンネル電流を示すシングルチャネル活性を確認した後、エクソソームを膜

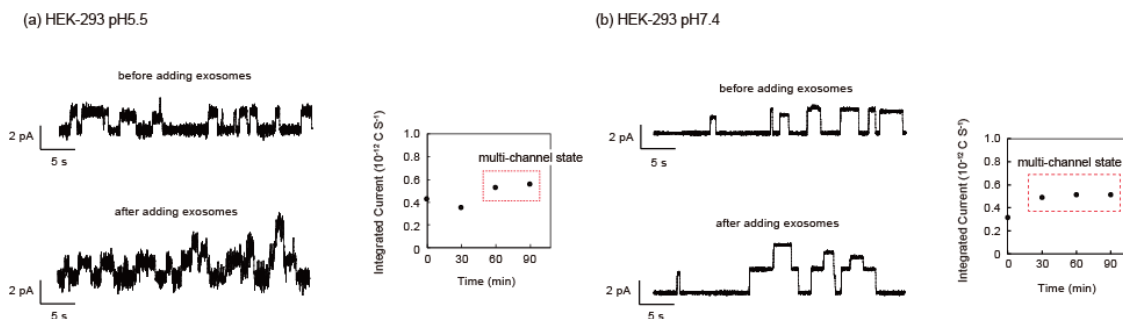


図 3. エクソソーム膜融合の前後におけるグラミシジンのシングルチャネル計測

融合させると、必ずマルチチャネルの電流応答が確認された (図 3)。また、エクソソーム膜融合の前後でグラミシジンチャンネル活性に変化が見られなかった。これらのことから、以下のような原理で (図 4) 人工細胞膜にエクソソームを膜融合させた際にコンダクタンス値が変化するものと考えられる。膜融合するエクソソームの個数に応じて、人工細胞膜が変調し、バルク中に残存しているグラミシジンが人工細胞膜に取り込まれる。

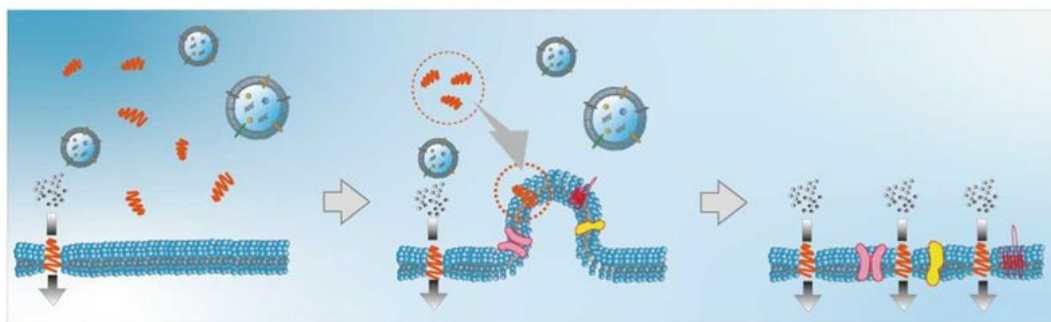


図 4. グラミシジンのチャンネル活性増強現象の原理

#### 4 - 3 pH により変化する膜融合現象

エクソソームと人工細胞膜の膜融合を pH 条件によりどのように変化するのか調べた。HEK293 細胞よりも、MCF-7 細胞から分泌されたエクソソームの方が人工細胞膜と膜融合しやすいことがわかった。また、弱酸性条件下の方がエクソソームの膜融合が促進されることを明らかにした。

様々な細胞から分泌されるエクソソームを用い、異なる pH で膜融合を評価したところ、pH によりエクソソームの膜融合に選択性があることを見出した。また、人工細胞膜の脂質組成によっても、膜融合が制御されていることが分かってきた。

#### 4 - 4 エクソソーム膜タンパク質の検出

エクソソーム膜融合後に、エクソソーム膜タンパク質の抗体を添加すると、グラミシジンのチ

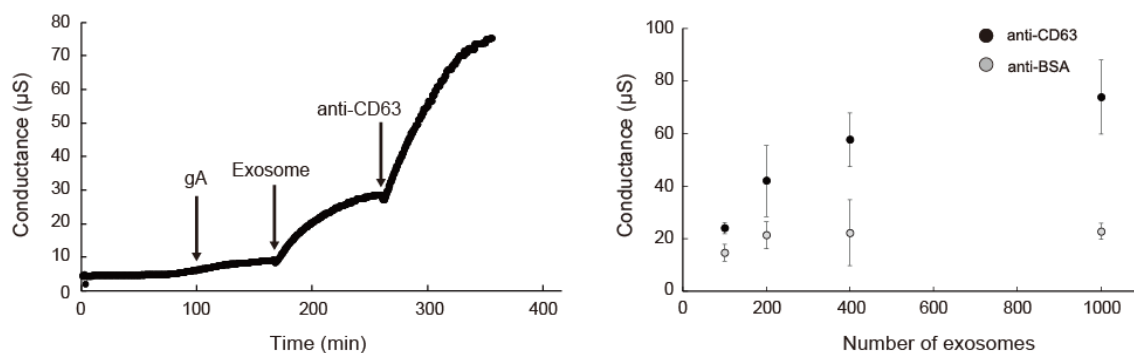


図5 エクソソーム膜タンパク質 CD63 の計測

ヤネル電流が増大した。グラミシジンを通過するイオン（1秒間に  $10^5$ - $10^6$  個）量に基づく電流値を指標として、膜界面の抗原抗体反応を計測することになるため、シグナル増幅能を有する優れた計測技術であることが期待される。この計測法では、わずかに 100 個程度のエクソソームを検出できるものであり、これまでに提案されてきた計測技術よりも感度が高いことがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

|   |                      |
|---|----------------------|
| 1. 著者名<br>Nishio M, Teranishi Y, Morioka K, Yanagida A, Shoji A.  | 4. 巻<br>150          |
| 2. 論文標題<br>Real-time assay for exosome membrane fusion with an artificial lipid membrane based on enhancement of gramicidin A channel conductance | 5. 発行年<br>2020年      |
| 3. 雑誌名<br>Biosensors and bioelectronics   | 6. 最初と最後の頁<br>111918 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.bios.  | 査読の有無<br>有           |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難  | 国際共著<br>該当する         |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>寺西 佑莉奈, 西尾 将人, 森岡 和太, 柳田 顕郎, 東海林 敦              |
| 2. 発表標題<br>膜融合によるグラミシジンシングルチャネル活性変化を利用するエクソソームのキャラクタリゼーション |
| 3. 学会等名<br>令和元年度日本分析化学会関東支部若手交流会                           |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>東海林 敦, 西尾 将人, 森岡 和太, 柳田 顕郎         |
| 2. 発表標題<br>エクソソーム膜融合によるグラミシジンチャネル活性増強のメカニズム解明 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第68年会                       |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>東海林 敦, 西尾 将人, 森岡 和太, 柳田 顕郎                  |
| 2. 発表標題<br>イオンチャネル電流をシグナルとして用いるエクソソーム - 人工細胞膜の膜融合アッセイ法 |
| 3. 学会等名<br>第36 回イオンクロマトグラフィー討論会                        |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>西尾 将人, 森岡 和夫, 柳田 顕郎, 東海林 敦           |
| 2. 発表標題<br>人工脂質二分子膜を利用するエキソソームのリアルタイム膜融合アッセイの構築 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第67年会                         |
| 4. 発表年<br>2018年                                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中野 沙紀, 柏木 寿実, 森岡 和夫, 柳田 顕郎, 東海林 敦      |
| 2. 発表標題<br>濃度勾配形成マイクロ流体デバイスを用いるコラーゲン分解酵素の迅速な活性評価法 |
| 3. 学会等名<br>第31回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS2018)       |
| 4. 発表年<br>2018年                                   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森田 健司, 西尾 将人, 森岡 和夫, 柳田 顕郎, 東海林 敦         |
| 2. 発表標題<br>側面ポイント発光ファイバーを光源とする蛍光観察システムの開発と細胞アッセイへの応用 |
| 3. 学会等名<br>日本分析化学会第67年会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>A. Shoji, M. Sugawara  |
| 2. 発表標題<br>The signal amplification based on gramicidin A channels for sensitive immune-sensing |
| 3. 学会等名<br>2018 China-Japan-Korea symposium on Analytical Chemistry (招待講演) (国際学会)               |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

世界初！！人工細胞膜とエクソソームの膜融合の観察に成功～細胞間コミュニケーションの解明に大きく前進～  
<https://www.toyaku.ac.jp/pharmacy/newsttopics/pdf/c40f748c762f3944339415d58a3cb996c2cd4c9a.pdf>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|