

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2023

課題番号：17H06242・20K20297

研究課題名（和文）細胞間生命情報伝達を担う新規膜小胞の生物物理化学特性の解明

研究課題名（英文）Biophysical and Biochemical Characterization of Novel Membrane Vesicles Responsible for Intercellular Biological Signaling

研究代表者

石井 則行（Ishii, Noriyuki）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：10261174

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,700,000円

研究成果の概要（和文）：エクソソームは細胞間コミュニケーションに重要な細胞外小胞（EVs）で、マイクロベシクルと区別が難しい。本研究では、多胞体（MVBs）に焦点を当て、透過型電子顕微鏡法を用いて、エクソソームの分離、分画・調製を最適化した。塩を殆ど含まないビス-トリス緩衝液条件下での分画により、～50 nmの特異的な集団が観察され、さらに免疫電子顕微鏡法によってCD63の存在も確認された。一方で、EVsの分画・調製を密度勾配超遠心分離法から限外ろ過法へ移行を試み、再生セルロース膜を用いた連続法が有効であることを示した。最適な条件下でのインタクトなEVsの分離と特性解析は、医学生物学的応用のための重要な基盤となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞（EVs）をナノコロイドとして認識し、医学生物学分野で見過ごされていた物理化学的課題を明らかにしました。電子顕微鏡法による条件最適化で、EVsを細胞から放出されたインタクトな状態で分離・調製する条件を確立しました。エクソソーム（small EVs）研究の共通基盤として幅広く活用が期待されます。さらに、限外ろ過法の連続的適用を考案し、その過程でsmall EVsにも赤血球のような変形能が示唆されました。レオロジー的な解明が望まれます。EVsに適した電子染色試薬の開発も進めました。EVsの研究は、細胞間通信の理解、疾患の診断・治療、薬物送達、生態系への影響等に革新的な貢献が期待されます。

研究成果の概要（英文）：Exosomes, important extracellular vesicles (EVs) for intercellular communication, are difficult to distinguish from microvesicles. This study focused on multivesicular bodies (MVBs) and optimized the isolation, fractionation, and preparation of exosomes through stepwise direct observation using transmission electron microscopy (TEM). Fractionation under low-salt Bis-Tris buffer conditions revealed a specific population of approximately 50 nm. Furthermore, the presence of CD63, known to be one of the exosome markers, was confirmed by immunoelectron microscopy. Additionally, an attempt was made to transfer EV isolation and preparation from density gradient ultracentrifugation to tangential flow filtration, demonstrating the effectiveness of a continuous filtration method using regenerated cellulose membranes with different molecular weight cut-offs (MWCO). The isolation and characterization of intact EVs under optimal conditions are critical for biomedical applications.

研究分野：生物物理学、物性基礎、電子顕微鏡解析

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム/エキソソーム マイクロベシクル 生体分子 ナノコロイド 透過型電子顕微鏡 ランタノイド酢酸塩 動的光散乱

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 当時、exosomes の日本語表記は「エキソソーム」と「エクソソーム」とが混在しており、研究者の間でばらつきがありました。どちらも同じ膜小胞を指していました。やがて「エクソソーム」の表記が一般的となりましたが、開口放出 (exocytosis) を「エキソサイトーシス」と表記するケースが多かったことから、これに倣って、私は、本研究課題申請において「エキソソーム」の表記を採用していました。(ここでは、「エクソソーム」と表記します。)

(2) エクソソームの生成メカニズムやその役割についての理解が深まりつつありました。エクソソームは細胞間の情報伝達手段として機能し、タンパク質、脂質、RNA (マイクロ RNA) 等の多様な分子を運ぶことで注目されていました。がん、神経変性疾患、免疫応答等、さまざまな病態におけるエクソソームの役割が研究され、多くの新しい知見が報告されていました。血液や尿中のエクソソームを利用した非侵襲的なバイオマーカーの探索が進められ、これにより、がんやその他の疾患の早期診断や治療モニタリングが可能になると期待されていました。

(3) エクソソームの分離・精製技術は進化し、高度な超遠心分離法やサイズ排除クロマトグラフィー、免疫親和性で捕捉する方法等が利用されていました。しかし、これらの技術には改良の余地があり、特に他の膜小胞 (マイクロベシクルやアポトーシス小体) との分別が課題でした。一般的に、エクソソーム: 内部小胞体から多胞体を経て放出される小胞 (サイズ: 30 ~ 150 nm)、マイクロベシクル: 細胞膜から直接出芽する小胞 (100 ~ 1000 nm)、アポトーシス小体: アポトーシス (細胞死) 過程で形成される小胞 (500 ~ 2000 nm) と分類されています。これらの膜小胞はサイズ (重なる範囲がある) や生成機構が異なるものの、分離・精製技術の限界により完全に区別するのは難しい状況にあります。当時 (一部現在も) では、粒径平均が ~ 100 nm をピークに分布する膜小胞をエクソソームとして扱うことが多く、分離・精製できないのは研究者の技量不足と考えられることもありました。(その後、エクソソームやマイクロベシクル等を区別せず、細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EVs) として取り扱うことが国際的な学会から推奨されています。)

(4) エクソソームと他の膜小胞を分離するための技術的な課題としては、以下のような点が挙げられます。サイズの重なり: エクソソームとマイクロベシクルのサイズ範囲が一部重なるため、サイズによる分離が難しい。マーカーの同定: エクソソーム特有のマーカー (例えば、CD63、CD81、CD9) を利用して分離する方法が開発されていましたが、完全な分離は難しい。純度の確保: 分離したエクソソームの純度を確認するための標準化された方法が確立されていませんでした。このような状況を踏まえ、エクソソーム研究は多くの可能性を秘めつつも、技術的な課題に直面していた時期といえます。

### 2. 研究の目的

エクソソームは、細胞から放出される膜小胞であり、血液や尿等の体液中に安定に存在しています。従前、エクソソームは細胞内の不要な物質を排出する「ごみの運搬車」と考えられていましたが、マイクロ RNA を含むことが明らかになり、その作用によって送達先の細胞の性質が変化することが判明しました。エクソソームは細胞間のコミュニケーションにおいて重要な役割を果たしています。本研究は、生物物理学と物理化学の視点から、エクソソームを含むナノスケールの EVs の特性を明らかにすること、具体的には、細胞から放出されたエクソソーム (small EVs) をそのままの (インタクトな) 状態で分離し、特性を詳細に解析します。これにより、がん等の疾患の早期発見や新薬の開発に役立てることを目指し、以下の項目を重点的に検討します。

(1) 生物物理学的解析に適したエクソソームの分離精製、調製法を開発します。これにより、エクソソームをインタクトな形態で取り扱い、その特性をより正確に解析します。既存の分離精製法の課題を克服し、より高感度かつ信頼性の高い手法を確立します。

(2) エクソソームが細胞間コミュニケーションに果たす役割を明らかにするために、その機能を生物物理学および物理化学的視点から詳細に解析します。具体的には、マイクロ RNA や他の特定分子の存在を調査し、細胞間通信におけるエクソソームの役割を特定します。

(3) 疾患細胞由来のエクソソームと健常なエクソソームとの比較を通じて、疾患に特異的な形状、機能、成分を特定します。また、疾患の早期診断や治療モニタリングに役立つエクソソームのバイオマーカーとしての可能性を探究します。

(4) 多様な成分と性質を有するエクソソームを規格分類化するための基盤技術を開発します。これにより、疾患に特異的なエクソソームの特徴を明確にし、その分類に基づいて個別化された治療法や予防策の開発に貢献します。

### 3. 研究の方法

エクソソームがナノスケールのコロイド粒子であることを踏まえ、コロイド化学やナノ物性、

物理化学の視点から分析を行います。異なる種類の細胞株の培養上清に、独自に開発した分離技術 (PCT/JP2017/013999、特許 6853983) を適用し、エクソソーム同定法の開発とその分離調製法の一般化および高度化に挑戦します。具体的には、ショ糖密度勾配超遠心分離法によって分画した各フラクションに対し、ナノ粒子径計測、動的光散乱 (DLS) 測定、電子顕微鏡 (TEM) 解析等を行い、形態、粒径とその分布様式、荷電 (ゼータ電位) 等のデータを収集し、物理化学的特性を総合的に解明します。また、がん等の疾患に特異的な生物物理学的特性を持つエクソソームに対し、X線溶液散乱実験を行い、脂質二重膜の構造を解析します。また、興味深い特徴を示すエクソソーム含有フラクションに対しては、適宜、TEM解析やウェスタンブロット (イムノブロット) 検出、DLS測定を行います。エクソソームの規格分類化を目指し、併行して人工膜小胞の形成および制御技術の開発を進め、医学的視点の研究にフィードバックし、疾患・病態プロファイリングに新たな評価軸を加え、早期診断等に利用可能な技術レベルに達するように挑戦します。

(1) ヒト胎児腎臓 293FT 細胞株 (以下、HEK293FT) は Invitrogen から購入し、Flp-In T-Rex ヒト胚性腎臓 293 細胞株 (以下、HEK293)、Blasticidin、および Zeocin は Thermo Fisher Scientific から入手しました。ヒト肝癌由来 Hep G2 細胞株は JCRB 細胞バンクから調達しました。胎児牛血清 (FBS) は Hyclone Laboratories Inc. および Thermo Fisher Scientific から、Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) は Sigma-Aldrich Corp. から取り寄せました。CD63 に対するモノクローナル抗体 (抗 CD63 IgG) は Santa Cruz Biotechnology Inc. から購入し、免疫ブロット実験で使用するために濃度を 1.0 mg/ml に調製し、100 倍に希釈しました。マウス抗体に対するウサギ抗マウス IgG 抗体 (HRP 標識) は Chemicon International Inc. から調達し、濃度を 5.7 mg/ml に調製し、免疫ブロット実験で 1,500 倍に希釈して使用しました。細胞の樹脂包埋に使用する LR ホワイトは London Resin Co., Ltd. から購入しました。

(2) 本研究では生育の速い細胞株、HEK293FT を使用しましたが、一部のデータには HEK293 細胞も含まれています。また、肝癌細胞株 Hep G2 も使用しました。HEK293FT、HEK293 および Hep G2 細胞は、10% FBS を添加した DMEM (10% FBS-DMEM) で培養しました。HEK293 細胞にはさらに 10  $\mu$ g/ml Blasticidin と 100  $\mu$ g/ml Zeocin が加えられました。培養は CO<sub>2</sub> 濃度 5%、湿度を保った 37 °C の環境で行い、細胞が 90% コンフルエントになるまで続けました。FBS 由来の EVs を除去するため、10% FBS-DMEM で増殖中の細胞は、PBS (-) または 5 mM MgCl<sub>2</sub> 含有 PBS (+) で 3~5 回洗浄した後に、引き続き、同じ培養条件下で、血清不含有の DMEM 中で 24 時間または 48 時間培養しました。この間に、エクソソームを含む EVs の分泌が促進されました。

(3) 細胞の樹脂包埋と超薄切片の作製では、まず、HEK293FT 細胞を Eppendorf Centrifuge 5702R を用いて、1,000 rpm、4 °C で 3 分間遠心分離しました。次に、細胞を 20 mM PBS (-) で洗浄し、4 °C で 2 時間、3% パラホルムアルデヒドと 0.5% グルタルアルデヒドを含む 20 mM PBS (-) で固定しました。その後、20 mM PBS (-) で 3 回洗浄し、細胞を 2% 寒天培地に包埋しました。寒天ゲルは 1 mm 角に切り分けられ、エタノール濃度を順次上げる (50%、70%、80%、90%、95%、および 99.5%) ことで脱水しました。各ステップの脱水時間は 4 °C で 15 分間とし、その後、LR ホワイトレジンと 99.8% エタノールを 1:1 で混合し、4 °C で 2 時間静置しました。次に、比率を 3:1 として 2 時間 (または一晩) 静置し、最後に 9:1 の比率で 2 時間 (2 回繰り返し) 静置しました。これらの処理を行った寒天ゲルをゲル化カプセルに封入し、50 °C で 24 時間重合しました。超薄切片は、ウルトラミクロトーム LEICA EM UC7 (Leica Camera AG Wetzlar) を使用し、速度 1.0 mm/s、厚さ 70~80 nm (FEED) で薄切しました。切片は、TEM 用の 300 メッシュ銅製グリッドに掬いました。

(4) 細胞培養上清 (CM) は、血清不含有の DMEM で 24 時間培養した後に回収し、0.22  $\mu$ m フィルターユニット (Merck Millipore) でろ過して細胞残渣を除去しました。ろ過後の CM は、Merck Millipore の Amicon Ultra-4 遠心ろ過ユニット (molecular weight cut-offs (MWCO): 10 kDa) を用いて 4 °C、6,000  $\times$ g で 30 分間遠心濃縮し、濃縮した CM に 25 mM ビストリス緩衝液 (pH 6.5) を 4 ml 加え、同様の条件で再度濃縮しました。この手順を 3 回繰り返し、最終容量を 0.25~0.5 ml に調製しました。次に、超遠心分離のために、Ultra-Clear 遠心チューブ (Beckman Coulter, Inc.) に 60% から 10% まで 10% 刻みのショ糖層を 2 ml ずつ重層し、上述の濃縮サンプルを重ね、Optima L-100 XP (Beckman Coulter, Inc.) を用いて、4 °C、21,000 rpm (75,600  $\times$ g) で 5 時間超遠心分離しました。分離後、ペリスタルティックポンプ MP-1000 (Tokyo Rikakikai Co., Ltd.) を使用して遠心チューブの底部から約 1 ml ずつ分画を回収しました。得られた分画は、脱ショ糖処理せずにそのまま使用しました。各分画のショ糖濃度は、携帯型糖度計 No.1 (分析糖度 0~32%) および No.2 (28~62%) (Pica Seiko Co., Ltd.) または携帯型ブリックスメーター BX-1 (Kyoto Electronics Manufacturing Co., Ltd.) を使用して屈折率を測定し、校正曲線から密度を決定しました。浸透圧は、Digital Micro Osmometer, Osmomat3000D (Gonotec GmbH) を用いて測定しました。ゼータ電位は ZECCOM (Microtec Co., Ltd.) および NanoSight NS500 (Spectris Co., Ltd.) を使用して測定しました。

(5) ウェスタンブロットは、まず、各分画から 25  $\mu$ l を分取し SDS-電気泳動 (12%ゲル) を行いました。次に、タンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Bio-Rad Laboratories, Inc.)

に転写し、PVDF 膜は 0.1% Tween-20 を含む 5% スキムミルク-PBS 中で 1 時間ブロッキングしました。CD63 に対する一次抗体を用いて免疫反応を 4 晩一晩行い、その後 HRP 標識の二次抗体と 3 時間反応させました。化学発光信号は Clarity Western ECL substrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) を使用し、ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories, Inc.) システムで検出しました。

(6) エクソソームを含む EVs は、TEM (FEI Tecnai G2 F20, FEI Company) を使用して観察しました。薄いアモルファスカーボン膜で覆われた TEM 400 メッシュ銅製グリッドは、予めグロー放電装置 HDT-400 (JEOL Ltd.) を使用して親水化処理しました。ショ糖密度勾配超遠心分離から得られたエクソソーム含有分画を 10 倍に希釈し、数  $\mu\text{l}$  をこれらのグリッド上に慎重に載せ、1% 酢酸ウラニル溶液で 30~40 秒間ネガティブ染色しました。TEM 像は、FEI Tecnai F20 を加速電圧 120 kV で運転し、低電子線量条件下で Gatan Retractable Multiscan Camera (Gatan, Inc.) により、5,000 倍および 50,000 倍 (免疫電子顕微鏡用) の倍率で記録しました。

(7) 免疫電子顕微鏡法は、まず、22~24% (w/v) のショ糖を含む 25 mM ビストリス緩衝液 (pH 6.5) 分画から 10  $\mu\text{l}$  をカーボングリッド上に載せ、20% パラホルムアルデヒド (PFA) を 1.1  $\mu\text{l}$  添加し、最終濃度が 2% PFA になるように調製し、室温で 20 分間静置しました。この過程で、グリッド表面が乾燥しないように注意し、次に、20% (w/v) のショ糖を含む 25 mM ビストリス緩衝液 (pH 6.5) (Buffer A) で 5  $\mu\text{l}$  ずつ 2 回洗浄し、その後 25 mM ビストリス緩衝液 (pH 6.5)、20% (w/v) ショ糖、および 50 mM グリシン (Buffer B) で 5  $\mu\text{l}$  ずつ 3 回洗浄しました。ブロッキングのために、Buffer B を追加した後、1.4~3.9 mg/ml の牛血清アルブミン (BSA) 5  $\mu\text{l}$  を加え、10 分待ち、余分な水分を除去した後、一次抗体のマウス抗 CD63 IgG を含む 5  $\mu\text{l}$  の液滴をグリッドに滴下し、室温で 30 分間静置しました。その後、グリッドを Buffer A で 5  $\mu\text{l}$  ずつ 4 回洗浄し、最終洗浄ではグリッドが乾燥しないように Buffer A を 10  $\mu\text{l}$  残しました。その後、直径 6 nm の金ナノ粒子で標識されたヤギ抗マウス IgG (2 次抗体) 3  $\mu\text{l}$  を添加し、室温で 30 分間静置しました。グリッドを Buffer A で 5  $\mu\text{l}$  ずつ 5 回洗浄した後、1% 酢酸ウラニル溶液で 30 秒間ネガティブ染色し、免疫電子顕微鏡法により観察しました。

(8) TEM 画像からの粒子サイズ分布解析は、まず、FEI Tecnai F20 で DigitalMicro-graph (Gatan Inc.) を使用して撮影した TEM 画像を TIF ファイル形式に変換し、ImageJ 1.48v のユーティリティソフトによって以下の処理を行いました。TEM 画像は、等化ヒストグラムアルゴリズムを使用してコントラストを強調し、画像上で確認された円形のターゲットを背景層から容易に選択および抽出できるようにしました。円形物質の境界は、[Adjust/Threshold] 機能により二値化され、その際、大津法を選択しました。画像処理中、ホコリや明確に区別可能な断片は破棄しました。円形物質が背景層から明確に分離されると、その面積、標準偏差、および Feret 径を [Analyze/Analyze Particles] コマンドによって分析しました。TEM 画像は目視では、容易に図形が円形か楕円形か判別でき、楕円の長軸の向き (長さ) も認識できますが、コンピュータでは X 軸と Y 軸方向でそれぞれ目標図形を別々に計算します。従って、楕円の長軸の長さを Feret 径と定義します。Feret 径は、特定のオブジェクトの大きさを測定するもので、通常、指定された方向に沿ったオブジェクトの最大幅を表します。具体的には、その方向に垂直な 2 つの平行な平面が物体に接する点の距離として定義されます。従って、3 次元の場合の Feret 径は、指定された方向に沿って物体を制限する 2 つの平行平面間の最大距離となります。顕微鏡画像解析で、三次元 (3D) オブジェクトの投影に適用される場合、Feret 径は、二次元 (2D) 平面上の投影に対する、2 つの平行接線の間の距離と定義されます。得られたデータテーブルは Microsoft Excel ファイル形式で保存し、粒子サイズの頻度分布は Excel の [Frequency] 機能を利用して計算しました。分布グラフは KaleidaGraph 4.5J (Hulinks Inc.) を使ってプロットしました。

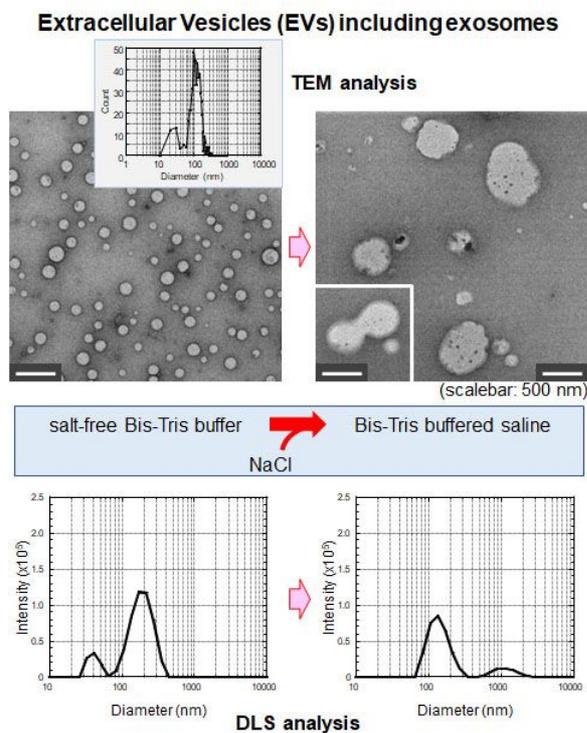


図 1 電子顕微鏡法直接評価による EV 調製の最適化

(9) EVs のサイズ分布は、DLS 法により測定しました。光散乱アナライザーである DynaPro

NanoStar (Wyatt Technology Corp.) および DelsaMax Core (Beckman Coulter, Inc.) を使用しました。DLS 法は、液相中の粒子の特性、特に粒子サイズのようなナノ粒子の流体力学的特性を評価するための一般的な手法であり、試料溶液中の粒子のブラウン運動による光散乱の強度を測定し、時間の経過に伴う変化率に変換します。このデータから、一般的に球状を仮定して、ストークス・アインシュタインの式および自己相関関数の手法により、粒子直径 (サイズ) が計算されます。測定には、エクソソームを含む分画から 4~10  $\mu\text{l}$  が使用され、分画毎に 5 秒間の 3~5 回の測定からそれぞれ独立した平均値が計算されます。測定温度は 20 で、照射レーザーの波長は 660.9 nm でした。DLS 分析は、粒子のサイズ測定に一般的に使用される効果的な手法ですが、生物起源の膜小胞では、散乱強度が一定であるとは限らないため、本研究では、DLS 分析は各分画内の粒子サイズ分布の全体的なパターンおよびその傾向を確認するために使用しました。個々の膜小胞の (正確な) 測定値について言及するものではありません。

#### 4. 研究成果

(1) エクソソームを主要な成分とする EVs の特性について、まずは、「生物物理学的解析に適した膜小胞の調製方法」(PCT/JP2017/013999、特許 6853983) により分画し、その性質等进行分析・検討しました。ナノサイズの EVs をナノコロイドとして認識することで、医学や生物学分野で見過ごされていた物理化学的側面を明らかにし、EVs を細胞から放出されたインタクトな状態で分離・調製し、電子顕微鏡法による直接観察を行いながら、その条件を最適化しました (図 1)。この条件は革新的であり、エクソソーム研究を下支えする基盤技術としての活用が期待されますが、既存の (一部の経済的な) 体制には不都合な側面もあり、影響力の高い国際的な学術誌での発表は困難でした。しかし、昨年、その成果を国際的なジャーナルで公開することが実現しました。

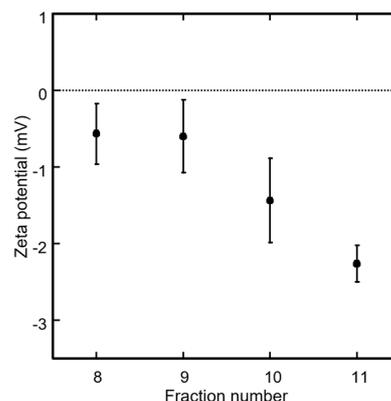


図 2 HEK293FT 由来 small EVs 含有分画の平均ゼータ電位 (標準誤差付き)

(2) 細胞種や生育状況の異なる細胞培養上清から調製した各分画について、物理化学的特性を分析しました。図 2 に、small EVs が確認された各分画のゼータ電位の測定結果 (平均値および標準誤差) から一部を示しました。緩衝液の pH と EVs の平均荷電の絶対値の大小の関係から分散安定性を評価し、TEM 像で確認された small EVs の形状や分散・分布状況と相関があることが確認されました。また、予備的試行段階では、X 線溶液散乱実験において、脂質二重膜の構造を反映した高 q 領域で、特異な挙動を示す分画が観察されました。その要因については、今後の詳細な検証が必要です。

(3) 前述の分離条件では密度勾配超遠心分離法を採用しましたが、操作が煩雑過ぎるとのコメントがありました。そのため、超遠心機の使用を再検討し、より簡便に、異なる MWCO の限外ろ過法を連続適用する手法も開発しました。その過程で、エクソソーム (small EVs) は再生セルロース膜を透過しますが、同じ粒径分布のポリスチレンビーズや荷電の要因を考慮して試験したシリカビーズは透過しませんでした。small EVs のみが、再生セルロース膜を透過することが明らかとなり、エクソソーム (small EVs) にも赤血球と同様な“変形能”が備わっていることが示唆されました (未発表)。今後はレオロジー的な観点からの評価が必要と考えています。

(4) また、膜小胞に適した電子染色試薬に関する検証報告はこれまでに無く、酢酸ウラニル溶液が標準使用されています。しかしながら、酢酸ウラニル溶液は強酸性のため、膜構造に侵襲的に作用し、また、核燃料の国際規制物資として管理規制対象となっているため、代替可能な新しい電子染色試薬の開発が必要でした。ランタノイド系酢酸塩について、初めて体系的に評価し、一部の成果を論文として発表しました。

#### <引用文献>

N. Ishii\*, K. Noguchi, M.J. Ikemoto, M. Yohda, T. Odahara, Optimizing exosome preparation based on size and morphology: Insights from electron microscopy, *Microsc. Microanal.*, **29**(6)、2023、2068 - 2079

N. Ishii\*, Systematic investigation of lanthanoid transition heavy metal acetates as electron staining reagents for protein molecules in biological transmission electron microscopy, *Microsc. Microanal.*, **28**(3)、2022、780 - 789

N. Ishii\*, T. Odahara, Investigation of the efficacy of lanthanoid heavy metal acetates as electron staining reagents for biomembrane vesicles, *Microsc. Microanal.*, **29**(6)、2023、2080 - 2089

N. Ishii\*, C-shaped dipper: A novel useful auxiliary tool for preparation of specimen grids for transmission electron microscopy, *Microsc. Res. Tech.*, **86**(4)、2022、431 - 438

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishii Noriyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 C shaped dipper: A novel useful auxiliary tool for preparation of specimen grids for transmission electron microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy Research and Technique	6. 最初と最後の頁 431 ~ 438
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jemt.24283	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ishii Noriyuki	4. 巻 28
2. 論文標題 Systematic Investigation of Lanthanoid Transition Heavy Metal Acetates as Electron Staining Reagents for Protein Molecules in Biological Transmission Electron Microscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 780 ~ 789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1017/S1431927622000411	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -
1. 著者名 Ishii Noriyuki	4. 巻 1
2. 論文標題 Folding and Binding Properties of Human Complement Receptor Type 1 Extracellular Domain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peripheral Membrane Proteins	6. 最初と最後の頁 105-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5772/intechopen.75120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikemoto Mitsushi J., Aihara Yukine, Ishii Noriyuki, Shigemori Hideyuki	4. 巻 46
2. 論文標題 3,4-Dihydroxybenzalacetone Inhibits the Propagation of Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Effect via Secretory Components from SH-SY5Y Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 599 ~ 607
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b22-00727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishii Noriyuki, Noguchi Keiichi, Ikemoto Mitsushi J, Yohda Masafumi, Odahara Takayuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Optimizing Exosome Preparation Based on Size and Morphology: Insights From Electron Microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 2068 ~ 2079
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/micmic/ozad103	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Ishii Noriyuki, Odahara Takayuki	4. 巻 29
2. 論文標題 Investigation of the Efficacy of Lanthanoid Heavy Metal Acetates as Electron Staining Reagents for Biomembrane Vesicles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microscopy and Microanalysis	6. 最初と最後の頁 2080 ~ 2089
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/micmic/ozad107	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 石井則行、池本光志、小田原孝行
2. 発表標題 エクソソーム研究における電子顕微鏡直接観察による評価の重要性
3. 学会等名 2019年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井則行、池本光志、小田原孝行
2. 発表標題 細胞外膜小胞の調製における電子顕微鏡直接観察による評価の重要性
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井則行
2. 発表標題 Folding and binding properties of peripheral extracellular domain of human complement receptor type 1
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石井則行、池本光志、小川昌克、小田原孝行
2. 発表標題 エキソソームの本質解明に迫る分離調製法 生物物理学的解析に適した新規調製法の開発に成功
3. 学会等名 つくばソフトマター研究会2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 池本光志、相原幸音、石井則行、繁森英幸
2. 発表標題 膜小胞を介したポリフェノール抗酸化活性発現機構の検討
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井則行、池本光志、小川昌克、竹口雅樹、三石和貴、橋本綾子、山田悟史、川崎政人
2. 発表標題 エキソソームの本質解明に迫る分離調製法：医療工学応用を指向した生体ナノ構造体解析技術と次世代クライオ電子顕微鏡開発を実現する拠点構築に向けた調査研究
3. 学会等名 第2回 TIA「かけはし」成果報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井則行、池本光志
2. 発表標題 食の安全を実現する感染症診断技術開発を指向したエクソソーム調製法の開発
3. 学会等名 「知」の集積と活用 の場 産学官連携協議会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Noriyuki Ishii、Mitsushi Ikemoto、Takayuki Odahara
2. 発表標題 A Novel Approach for Preparing Fractionation of Extracellular Membrane Vesicles Suitable for Biophysical Analyses
3. 学会等名 5th Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井則行、池本光志、小田原孝行
2. 発表標題 生物物理学的解析に適した膜小胞（エクソソーム）の分離調製
3. 学会等名 ConBio2017 (2017年度 生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池本光志、相原幸音、石井則行、繁森英幸
2. 発表標題 ポリフェノール抗酸化作用の細胞間伝播
3. 学会等名 ConBio2017 (2017年度 生命科学系学会合同年次大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 米倉功治、石井則行
2. 発表標題 次世代型クライオ電子顕微鏡解析技術の開発とそれを基盤とする早期医療診断と健康維持増進を実現するエキソソーム診断技術の創生
3. 学会等名 第2回 21世紀イノベーションリーダーワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹口雅樹、三石和貴、橋本綾子、山田悟史、川崎政人、石井則行、池本光志、小川昌克
2. 発表標題 医療工学応用を指向した生体ナノ構造体解析技術と次世代クライオ電子顕微鏡開発を実現する拠点構築に向けた調査研究
3. 学会等名 第9回 TIAシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 池本光志、石井則行
2. 発表標題 細胞分泌時の物理化学的特性を反映したエキソソームの新規調製法の開発
3. 学会等名 第8回 化粧品開発展アカデミックフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石井則行、池本光志、小田原孝行
2. 発表標題 生物物理学的解析に適した膜小胞（エキソソーム）の分離調製
3. 学会等名 第17回 産総研・産技連 LS-BT合同研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹口雅樹、三石和貴、橋本綾子、Li Xiaoguang、山田悠介、篠田晃、守屋俊夫、高橋知里、石井則行、原本悦和、岩崎憲治、原田彩佳
2. 発表標題 液体セル電子顕微鏡法のソフトマテリアル研究への応用探索
3. 学会等名 第7回 TIA「かけはし」成果報告会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計7件

産業財産権の名称 透過型電子顕微鏡の観察試料の積載具、及び透過型電子顕微鏡の試料作製方法	発明者 石井則行、丸田節雄	権利者 産総研、日新 イーエム株式会 社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-173124	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 透過型電子顕微鏡観察試料作成方法及びそのための工具	発明者 石井則行	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/041235	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 立体像観察方法及びこれに用いる試料グリッド	発明者 石井則行	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/045834	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 透過型電子顕微鏡観察試料用工具	発明者 石井則行	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-203033	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 立体像観察方法及びこれに用いる試料グリッド	発明者 石井則行	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-226381	出願年 2019年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 生物物理学的解析に適した膜小胞の調製方法	発明者 石井則行、池本光志	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-510600	出願年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 生物物理学的解析に適した膜小胞の調製方法	発明者 石井則行、池本光志	権利者 国立研究開発法 人産業技術総合 研究所
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2017/13999	出願年 2017年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計3件

産業財産権の名称 透過型電子顕微鏡観察試料用工具	発明者 石井則行	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、7246090	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 生物物理学的解析に適した膜小胞の調製方法	発明者 石井則行、池本光志	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、6853983	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 立体像観察方法及びこれに用いる試料グリッド	発明者 石井則行	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、7304098	取得年 2023年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (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
---------	---------