

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560427

研究課題名(和文)エクソソームによって分泌される細胞間化学シグナルに関する研究

研究課題名(英文)Exosome-mediated intercellular chemical signals

研究代表者

上田 実(Ueda, Minoru)

東北大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60265931

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文):細胞間情報伝達に關与する生理的に重要な化学シグナルの探索は困難とされる。本研究では、細胞間情報伝達機構として注目されているエクソソームに着目し、それに内包される細胞間化学シグナルの探索を検討した。

ヒト培養細胞、ならびに植物組織浸出液中からエクソソームの分離を検討したが、低分子化合物の質量分析には、内容物として含まれる核酸類などの分離を予備検討する必要があることが分かった。今後は、より多くの小分子シグナルを含有すると期待できる病態患者サンプルを用いるエクソソーム分析が必要である。

研究成果の概要(英文):The search for novel bioactive substance becomes more difficult. We focused on an exosome which is known as a liposomal transport system between cells like a "message in a bottle" between cell. We purified mammalian liposome and tried to analyze the involved secondary metabolites. However, the huge amount of biomolecules, such as RNAs, make the MS-analysis difficult.

研究分野：天然物有機化学

キーワード：エクソソーム 天然物 生理活性物質 低分子 分泌 輸送

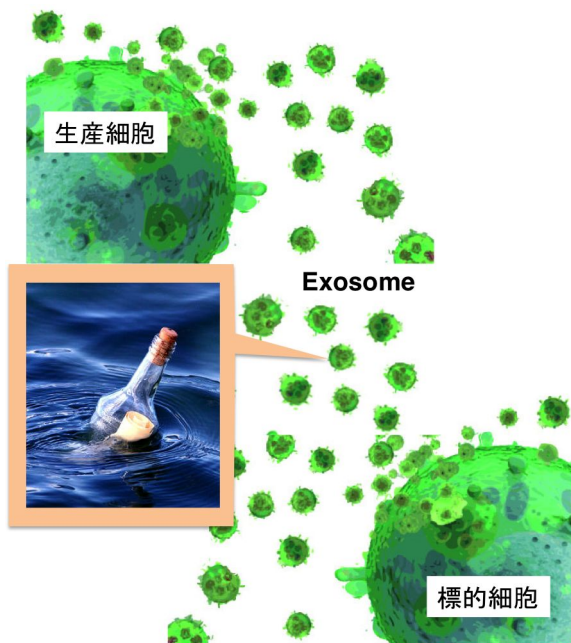
### 1. 研究開始当初の背景

プロスタグランジンや各種生理活性ペプチドなど、生理的に重要な意味を持つ内因性リガンド分子の探索は天然物化学・ケミカルバイオロジーのみならず、医学・生理学研究においても極めて重要である。しかし、生理活性試験に基づくこれらの探索研究はますます期待値の低いリスクな研究課題となっており、新規物質の探索には、何らかの新しい戦略が求められている。

一方で、細胞間シグナルは生産細胞で合成された後、なんらかの手段で細胞外に分泌される必要がある。これには放出型輸送体(トランスポーター)が関与することが良く知られているが、近年、細胞間シグナル(マイクロRNAやタンパク質)の生産細胞からの放出に、エクソソームと呼ばれる脂質二重膜層で形成される40-100 nmサイズの分泌顆粒が関与することが明らかになってきた(*J. Cell Sci.*, 2000, 113, 3365; *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2004, 16, 415; 2009, 21, 575)。エクソソームは、“Message in a Bottle”のように細胞間の化学的メッセンジャーを輸送してシグナル伝達に参与する(下図)。エクソソーム中に含まれる小分子化合物を分析すれば、細胞間シグナル伝達に参与する新規シグナル分子を効率よく同定できると考えられる。

これまでの生理活性物質探索は、生物組織や生物個体の抽出エキスを生物材料とする分離に基づいて行われてきた。しかし生体を構成する細胞は極めて多様性に富むため、首尾良く組織抽出物の大量入手が可能となっても、抽出物からの探索研究は著しく困難である。あるいは、化学シグナルを生合成する生産細胞を培養細胞として入手できたとしても、これにはやはり極めて多様な成分が含まれており探索・精製の困難さは大差ない。

本研究では、細胞が生理的条件下において化学シグナルの放出に用いる機構を利用する。エクソソームは、細胞から分泌された脂質二



重膜層で形成される小胞であり、細胞間の“Message in a Bottle”として、体内の離れた細胞や組織にタンパク質やマイクロRNAなどの情報分子を伝達している。細胞間情報伝達に重要な役割を果たすエクソソーム(Exosome)は、細胞間化学シグナルを高い選択性で含んでいると期待できるため、未知の小分子化学シグナル探索のソースとしては理想的である。ただし、エクソソームの分離・精製や、微量内容物の分離・分析などには、高度な分離・分析技術が必要である。これまでエクソソーム中の低分子リガンドの探索については報告がないが、力量ある天然物化学者が探索に関与することで、大きな進展が期待できる

### 2. 研究の目的

新規生理活性物質の探索は年々難しくなっている。特に、細胞間情報伝達に参与する生理的に重要な化学シグナルの探索には、膨大なコストが掛かるようになっている。本申請では、近年、細胞間情報伝達機構として注目されているエクソソーム(Exosome)に着目し、それに内包される細胞間化学シグナルを探索する。

エクソソームは細胞から分泌された脂質二重膜層で形成される小胞であり、細胞間の“Message in a Bottle”として、体内の離れた細胞や組織にマイクロRNAやタンパク質などのシグナル分子を伝達している。これまで、エクソソーム中の小分子の分析は行われたことがなく、細胞間で伝達されているエクソソーム中に含まれる小分子から新規化学シグナルの発見を目指す。

### 3. 研究の方法

ヒト培養細胞(HEK293T,T47D,Caki-1)培地、ならびに植物組織浸出液中からエクソソームを分離する。市販キットを用いた濃縮後に、エクソソームのマーカー分子を指標としてエクソソームを精製する。前処理によって生体高分子を除去した後に、エクソソーム内容物中の配糖体分子をボロン酸アフィニティーカラムを装備したUPLC-TOF-MSで分析する。また同時に、イオントラップMSでの分析を併用し、フラグメント解析から配糖体分子を同定する。同様に、ITC-TOF MSを用いるエクソメタボローム(Exo-metabolome)解析を行い、ペプチドなどの他の小分子化合物に関しても分析を行う。化学シグナルと考えられる小分子が発見できれば、高性能NMRなどを併用して構造決定を行う。

### 4. 研究成果

ヒト培養細胞(HEK293T,T47D,Caki-1)培地、ならびに植物組織浸出液中からエク

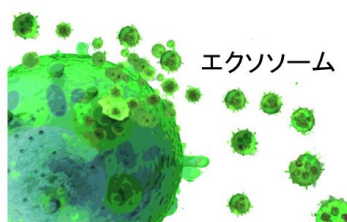
ソソームの分離を検討した。

申請者の研究室で所有するヒト培養細胞 (HEK293T, T47D, Caki-1) 培地より、エクソソームの分離を検討する。培養細胞のベースとなっている腫瘍細胞は、エクソソーム分泌が盛んであることが知られており (Vaccine, 2002, 20, A28)、研究用のエクソソーム供給源として最適であると考えた。

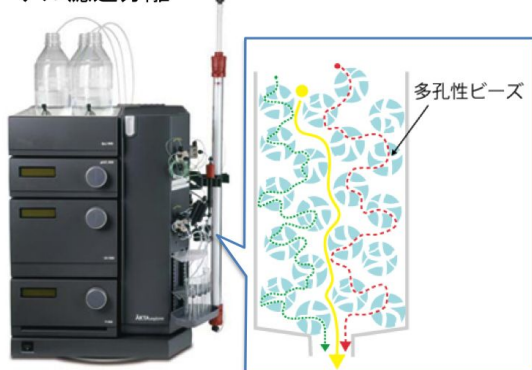
エクソソーム分離には、まず通常の市販キットを使用した。これらは、複数回の超遠心操作による沈殿濃縮や、限外濾過膜を使用した方法、抗体結合磁気ビーズを利用したアフィニティー精製などに基づくものであり、まずはこれらの既存法に則った分離を行った。

一方で、検討課題となるのは精製画分中のエクソソーム純度である。純粋なエクソソームを分離できなければ、得られた化学シグナルが、培地中に放出されたもの、あるいは死細胞内容物に由来するものである可能性も否定できない。通常は、エクソソームのマーカー分子を指標として、精製度の確認を行うが (エクソソーム由来のマーカー分子は Exocarta データベース <http://www.exocarta.org/> で調べることが出来る)、この方法では上記のような不純物混入の有無を判断できない。

本研究では、エクソソームの分離にゲルろ過クロマトグラフィーを用いる新規精製法を検討した (下図)。多糖成分 (デキストラン、アガロースなど) からなるゲルろ過担体は、エクソソームのような脂質膜小胞に対する親和性が低く、実際に人工膜小胞であるリポソームの分離にも使用される (例えば、Anal. Biochem., 1978, 90, 809)。エクソソームの大きさは 100 nm 以下であり、サイズ排除クロマトグラフィーによる分離が有効に機能する。サイズ分離によって上記に由来する小分子



ゲル濾過分離



成分を排除し、マーカー分子の定量により、上記既存法との精製度の差を評価した。その結果、超遠心分離法、ゲルろ過法、アフィニティークロマト法の比較検討では、アフィニティー法が良好な結果を与えることがわかった。

しかし、得られたエクソソーム画分は、低分子化合物の分析に使用できるほどの量ではなかった。収量の問題以上に、低分子化合物の質量分析には、内容物として含まれる核酸類などとの分離を予備検討する必要があることが分かった。

近年、ほ乳動物神経細胞から分泌されるエクソソームにカンナビノイド類が含まれることが報告された。エクソソームによる脂溶性低分子の分泌は、今後重要性を増す研究分野と考えられる。今後は、より多くの小分子シグナルを含有すると期待できる病態患者サンプルを用いるエクソソーム分析が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

- 1) 上田実 グリーンイノベーションのための分子テクノロジー「グリーンイノベーションのための分子ナノテクノロジー拠点形成」招待講演)2014年9月22日 慶應義塾大学
- 2) 上田 実「生物の謎に挑むケミカルバイオロジー」第5回CSJ化学フェスタ(依頼講演)2015年10月15日 タワーホール船堀

〔図書〕(計 3 件)

- 1) 上田 実著、上村大輔編、「天然物の化学-魅力と展望」、東京化学同人(2016)。
- 2) 上田 実著、杉本直己編著「生体分子化学-基礎から応用まで」講談社サイエンティフィック、(2016)。
- 3) 上田 実編著、「CSJ カレントレビュー 19 生物活性分子のケミカルバイオロジー: 標的同一と作用機構」、化学同人(2015)。

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 実 (UEDA, Minoru)  
東北大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：60265931

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：