

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H06255

研究課題名(和文)環境擾乱法を用いた細胞外分泌小胞の分化

研究課題名(英文)Differentiating extracellular vesicles by environmental disturbance method

研究代表者

芝 清隆 (Shiba, Kiyotaka)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 蛋白創製研究部・部長

研究者番号：40196415

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外小胞は、脂質二重膜で囲まれた袋状の構造体である。脂質二重膜は、細胞外小胞を放出する親細胞の膜成分に由来するので、各種のチャンネル分子をもち、ダイレクトな脂質二重膜の物質透過も考慮に入れると、外部環境擾乱に応じて、水分子や生体高分子の細胞外小胞内への流入、小胞外への放出をおこなうと考えられる。実際、唾液から採取された細胞外小胞は、感度のよい超遠心密度勾配法で展開すると、密度の異なるいくつかのサブクラスに分けることができる。ここでは、個体間の外部環境の差を反映した細胞外小胞の密度の変動から、細胞外小胞を分化する新たな手法を開発し、細胞外小胞の新たなサブクラス化を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液が含む1,429種のタンパク質のサブクラス化の情報を利用した、各種疾患に対する唾液診断法の開発が、今後進められると期待できる。同定したタンパク質の中には、SLC44A4、PMSA、CEACAM8/CD66b、Serum amyloid A-1 protein (SAA1)といった、広く知られている診断マーカーが含まれており、これらのマーカータンパク質は、細胞外小胞の積荷として体液中の存在している可能性が極めて高く、細胞外小胞にウィンドウを絞ったサンドイッチELISAの開発などにおいても、本研究の結果が利用されていくものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) in body fluids constitute heterogeneous populations, which mirror their diverse parental cells as well as distinct EV-generation pathways. Here, by prolonging ultracentrifugation time to 96 h and fractionating EVs both by floating up or spinning down directions, we allowed 111 EV protein markers from the whole saliva of three healthy volunteers to attain equilibrium. Interestingly, the determined buoyant densities of the markers drifted in a specimen-specific manner, and drift patterns differentiated EVs into at least two subclasses. One class carried classical exosomal markers, such as CD63 and CD81, and the other was characterized by the molecules involved in membrane remodeling or vesicle trafficking. Distinct patterns of density drift may represent the differences in generation pathways of EVs.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞外小胞 EV 生体膜 エクソソーム 診断学 細胞間相互作用 膜小胞 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

生化学的な解析手法が誕生した 1940 年代には、既に細胞から放出される小さな粒子についての報告が複数あるが、本格的なこれら脂質二重膜で囲まれた「細胞外小胞」の研究が開始するのは、実験技法が成熟する 1980 年前後となる。「マトリックス小胞」「アポトーシス小体」「マイクロ粒子」「エクソソーム」「プロスタソーム」などのいろいろな名称が、生物学の各領域で「細胞外小胞」として与えられ、それぞれ独立にその性質解析が、今世紀に入るまで息長く続けられてきた。

2007 年に発表された「エクソソームが核酸分子の細胞間交換のキャリアとして機能している」ことを示した論文 (Valadi, Nat Cell Biol, 2007) は、「エクソソームの再発見」とも呼ばれ、それまであまり交流のなかった、幅広い生物学領域での細胞外小胞の研究者、また、細胞外核酸の研究者、さらには、工学分野のナノ研究者らを集結させ、爆発的な細胞外小胞の研究の広がりへと導いた。現在では、細胞外小胞を介した細胞間のコミュニケーションが、正常組織の発生・分化や、がん、神経疾患、免疫疾患などの各種疾病の原因・進展の根底に関わっていることは、もはや疑いの余地はなく、またこのような基礎研究に支えられて、細胞外小胞を診断、治療、予防に使おうとする、新しい医療分野が誕生しつつある。

このようにこの十余年の間に、急激に進展してきた細胞外小胞研究ではあるが、前世紀の研究では、いわゆる細胞外小胞に相当する因子が、いろいろな分野で独立に定義されてきたことから分かるように、実はその生成機構も、性状も全く異なるヘテロな集団が「細胞外小胞」と呼ばれている。多様な細胞外小胞の中で、特に大きさが小さく、後期エンドソーム由来で生成されるものを、「エクソソーム」と呼ぶ場合が多いが、小さな細胞外小胞が全て後期エンドソーム由来で生成されるわけでもなく、後期エンドソーム由来のエクソソームに特異的な分子マーカーも定まっていないのが現状である。後期エンドソーム経路以外にも、細胞膜からの直接出芽、細胞突起構造からの放出、オートファジー経路の経路、そして、アポトーシスやピロトーシスなどの制御された細胞死から放出経路など、多数の細胞外小胞経路が存在しており、放出される細胞外小胞も、直径数十 nm から数ミクロンといった、広いダイナミックレンジで存在する。

ヘテロな細胞外小胞の層別化は、2007 年からのエクソソームブームでの解決すべき大きな課題の 1 つであったが、残念なことに未だにその全体像は全く分かっていない (2018 年の国際細胞外小胞学会の白書, J Extcell Vesicles, 2018 に詳しい)。これは、可視光波長をまたぐ広いダイナミックレンジで存在する細胞外小胞を、いかに定量的に観測するかといった、細胞外小胞の観察法そのものがまだ十分に成熟していないことに起因する。既存の粒子解析法に加えて、新しい分析法がさらに開発されない限り、細胞外小胞の全体像の解明は達成できず、ひいてはこのことが、細胞外小胞をベースとした医療の発展の阻害要因ともなる。このような背景のもと、研究代表者は、細胞外小胞の外部擾乱に対する反応性の違いから、細胞外小胞を分類化するといい、これまでにない全く新しいコンセプトに基づく細胞外小胞分類法の開発に取り組んだ。

2. 研究の目的

細胞外小胞は、脂質二重膜で囲まれた袋状の構造体である。脂質二重膜は、親細胞の膜成分に由来するので、各種のチャンネル分子をもち、ダイレクトな脂質二重膜の物質透過も考慮に入れると、外部環境に応じて、水分子や生体高分子の細胞外小胞内への流入、小胞外への放出をおこなうと考えられる。実際、唾液から採取された細胞外小胞は、感度のよい超遠心密度勾配法で展開すると、密度の異なるいくつかのサブクラスに分けることができる。外部環境の違いは、個体間の差が大きいと考えられるので、個体間での細胞外小胞の密度の変動のパターンから細胞外小胞を差別化する新たな手法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

健康人ボランティア3名から採取した安静時唾液をソースとし、iodixanolの連続密度勾配の中を、100,000 gで96時間超遠心をかけ、唾液の含む各種細胞外小胞を、その密度により展開した。超遠心はチューブの上部に試料を上層して始める「下方」遠心と、チューブの底部から細胞外小胞を浮きあげる「上方」遠心の両方を同時におこなった。展開後の試料を10分画に分け、各分画の160,000 g x 120分超遠心の沈殿物が含むタンパク質を質量分析により網羅的に解析した(図1)。同定されたタンパク質のうち、「上方」と「下方」で共に同じ密度分画に回収されたものを平衡位置に達した細胞外小胞由来のタンパク質とみなし、3名全ての唾液から検出された111種類のタンパク質について、その密度分析のパターンを解析した。

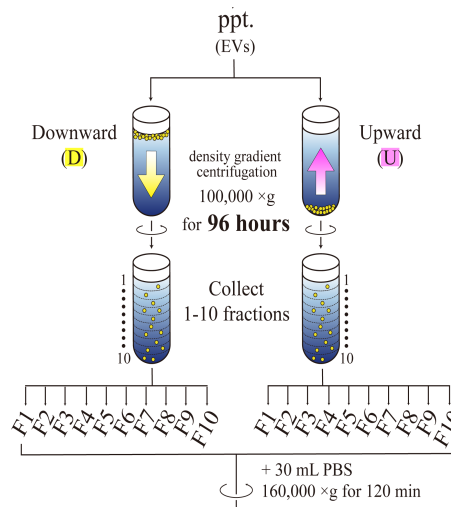


図1 細胞外小胞の集団を密度勾配遠心で「下方=D」と「上方=U」に展開した後、それぞれの10分画を質量分析解析する。

また、細胞外小胞の外部環境を人為的に変換するために、濃度の異なるiodixanolの一定時間露出した細胞外小胞粗分画を高感度超遠心密度勾配法で展開した。

4. 研究成果

健康人安静時唾液の3つの検体から調製した粗細胞外分画を、高感度密度勾配超遠心法で10分画に展開し、それぞれの分画が含むタンパク質を質量分析法にて網羅的に解析し1,429種のタンパク質を同定した(がん研究会の植田幸嗣博士の協力を得た)。密度勾配超遠心法においては、試料を遠心力で沈める「下方」遠心と、チューブの底から浮きあげさせる「上方」遠心の両方をおこない、同一検体の、「下方」「上方」遠心で、同じ密度分画におちついたものを、「平衡に達した」ものとしてみなし、3つの検体全てに検出される「平衡に達したタンパク質111種」をその後の解析に用いた(図2)。細胞外小胞の密度は、外部環境に影響を受け

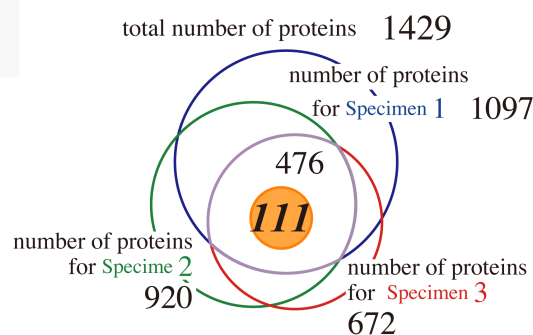


図2 健康人ボランティアから採取した唾液3検体を図1の方法で密度展開し、合計で1429種のタンパク質を同定。上方と下方展開で同一密度に位置し、3検体共に同定された111種に焦点をあてて解析を進めた。

やすいために、111種のタンパク質の多くは、3つの検体で、それぞれ異なる密度位置で平衡に達していた。タンパク質の到達密度のパターンを解析すると、それらは、大きく「IA-1」「IA-2」「IB」型に分けることができた(国立成育センターの岡村浩司博士の協力を得た)。「IA-1」サブクラスは16のタンパク質から構成され、CD9、CD63、CD81、CD14など、しばしばエクソソームマーカーとして利用されるタンパク質が含まれ、これらは全て膜に埋め込まれるタンパク質であった(図3)。

「IA-2」サブグループは59のタンパク質から構成され、これらタンパク質がもつ機能は、膜のリモデリングや小胞輸送に関わる因子(STX3, VAMP8, RAB7A, ARF3, RALB)、細胞骨格のリモデリングに関わる因子(EZR, RDX, MSN, CFL1, GSN, RHOG, CLICなど)、アネクシンタンパク質、基礎免疫(抗菌ペプチドを含む)関連タンパク質、代謝酵素などである。「IA-2」サブグループの特徴は、膜には強く結合していないと考えられているタンパク質で、分泌に必要なシグナル配列ももっていないことである。29種の「IB」

タンパク質には、3つの検体間での密度の違いが観察されず、第3の細胞外小胞サブグループに由来するタンパク質と考えられる。

このように、「検体間の密度のドリフト」パターンの違いを通して多様性集団である細胞外小胞を整理してみると、従来の分類とは異なるサブクラスが見えてくることが分かった。これらのサブクラスの細胞外小胞が、どのような生成経路から産生されたものかについては、今度のさらなる研究をまたなければならぬが、いわゆるエクソソームを代表しているように見える「IA-1」サブクラスと、膜のダイナミクスに関連した因子を多く含む「IB-2」サブクラスが、本手法で見事に分離されたことは、今後の細胞外小胞研究の展開に大きなインパクトを与えることは間違いない。

詳細な機構解明はさらに時間が必要となるが、本

研究で得られた唾液が含む1,429種のタンパク質のサブクラス化（111種のコアタンパク質以外のタンパク質についても、どのサブクラスに近いかを容易に調べることができるようなデータシートを論文に添付している。なお最終論文は査読中）（図4）の情報を利用した、各種疾患に対する唾液診断法の開発が、今後進められると期待できる。そういった意味では、今回同定したタンパク質の中に、SLC44A4、PMSA、CEACAM8/CD66b、Serum amyloid A-1 protein (SAA1) といった、広く知られている診断マーカーが含まれていることが驚きである。これらのマーカータンパク質は、細胞外小胞の積荷として体液中の存在している可能性が極めて高く、細胞外小胞にウィンドウを絞ったサンドイッチELISAの開発などにおいても、本研究の結果が利用されていくものと期待できる。

検体間の密度差は、細胞外小胞が外的環境の影響を受けやすいことを反映しているものと考えられるが、その駆動力が何かについては今後の研究をまたなければならない。本研究では、単離後の細胞外小胞の外部浸透圧を人為的に変化させるなどして、細胞外小胞の密度を変える試みを精力的におこなったが、統計的に有意な差を出すにはいたっていない。密度変化は、in vivo環境でのみ生じる可能性もあり、今後の課題として研究を継続していきたい。

図4 各サブクラスへの近似性を示すような同定タンパク質全体造を図示したチャート。リストからタンパク質名を索引可能。

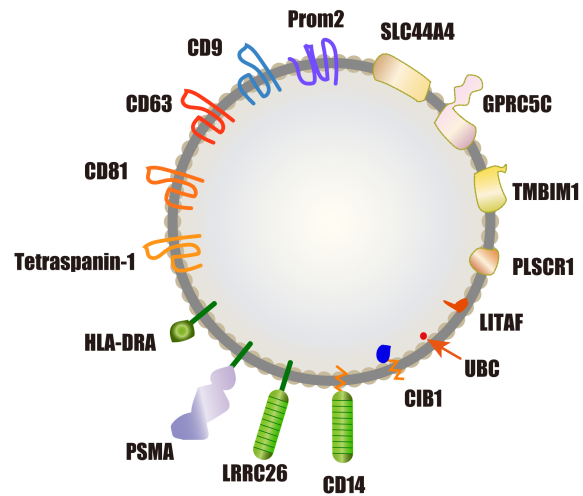
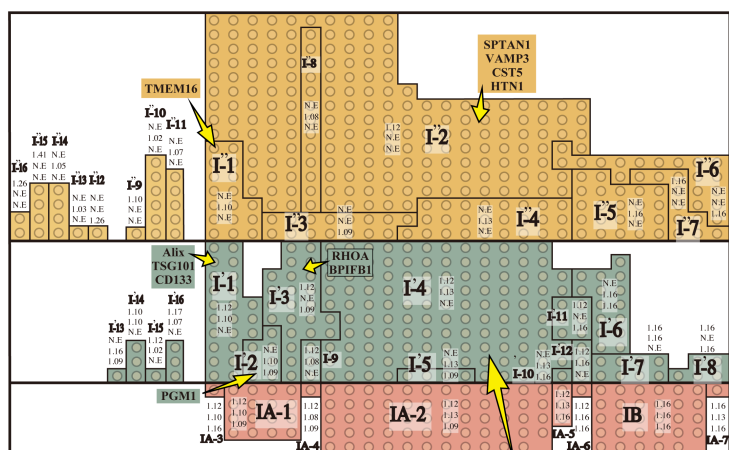
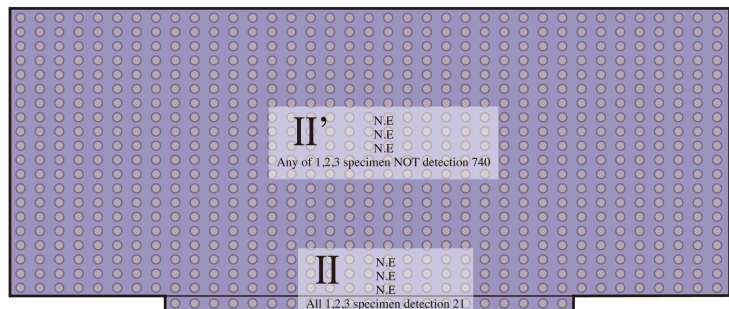


図3 IA-1 サブタイプに分類された16種は、古典的なエクソソームタンパク質を多く含み、膜に結合するタンパク質から構成される。



N.E. : Not Equilibrium (include detection and NOT detection)
 : All 1,2,3 specimen Not Equilibrium
 : Only one specimen Equilibrium
 : Two specimen Equilibrium
 : All 1,2,3 specimen Equilibrium

IA-1: Group name
 1.12: Specimen 1 density [g/ml]
 1.10: Specimen 2 density [g/ml]
 1.09: Specimen 3 density [g/ml]

LCPI RAB8A CST3
 CDC42 RAB10 DEFA1
 RAB11A LTF
 PGK1 ARF4 MPO
 ALDOA ARF6 TMP
 RALA SLP1 LGALS3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumura S, Minamisawa T, Suga K, Kishita H, Akagi T, Ichiki T, Ishikawa Y, Shiba K	4. 巻 8
2. 論文標題 Subtypes of tumour cell-derived small extracellular vesicles having differently externalized phosphatidylserine	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Extracell Vesicles	6. 最初と最後の頁 1579541
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20013078.2019.1579541	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 Iwai, K., Yamamoto, S., Yoshida, M. & Shiba, K.	4. 巻 1660
2. 論文標題 Isolation of extracellular vesicles in saliva using density gradient ultracentrifugation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 343-350
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-4939-7253-1_27.	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 Yoshida, M., Hibino, K., Yamamoto, S., Matsumura, S., Yajima, Y. & Shiba, K.	4. 巻 115
2. 論文標題 Preferential capture of EpCAM-expressing extracellular vesicles on solid surfaces coated with an aptamer-conjugated zwitterionic polymer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biotechnol Bioeng.	6. 最初と最後の頁 536-544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bit.26489.	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 平賀智豊、南澤宝后子、松村幸子、芝清隆
2. 発表標題 唾液含有微粒子の特徴と微粒子由来のRNA抽出条件についての検討
3. 学会等名 第5回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松村幸子、南澤宝美后、市川雄貴、芝清隆
2. 発表標題 ナノ粒子を利用したエクソソームサブタイプの簡便な検出法の開発
3. 学会等名 第5回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida, M., Hibino, K., Matsumura, S., Minamisawa, T., Iwai, K., Yamamoto, S. & Shiba, K,
2. 発表標題 Capturing EpCAM-positive extracellular vesicles by programmable bio-surface.
3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 芝 清隆
2. 発表標題 ナノテクノロジーと液性診断
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	植田 幸嗣 (Ueda Koji)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	岡村 浩司 (Okamura Koji)		