

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K13029

研究課題名(和文)エクソソーム表面糖鎖と細胞の相互作用機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the interaction of exosome surface glycans and target cells

研究代表者

下田 麻子(Shimoda, Asako)

京都大学・工学研究科・特定研究員

研究者番号：90712042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞表面を覆う糖鎖は、細胞の種類や状態で変化する他、タンパク質の品質管理、ウイルスや細菌の感染、細胞間の情報伝達などあらゆる生命現象に深く関わっている。細胞が分泌するナノサイズの膜小胞(エクソソーム)は新たな細胞間情報伝達のツールとして注目されており、その表面のタンパク質や脂質も糖鎖修飾されているが、エクソソームの糖鎖の機能についてはほとんどわかっていない。本研究課題ではエクソソームの表面糖鎖をレクチンアレイにて網羅的に解析することで、細胞の種類や分化過程で特異的な糖鎖のパターンを割り出すことに成功した。また、エクソソーム表面糖鎖が細胞への取り込み機構に関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームと細胞との相互作用に関する知見はエクソソーム表面に発現するタンパク質と細胞表面の受容体との相互作用やエクソソーム膜と細胞膜との融合による内包物質の伝達に関する報告がほとんどであり、糖鎖に着目した例はほんのわずかである。また、エクソソームの糖鎖解析は質量分析を用いてエクソソームの構造を破壊して行う手法が主であるが、本研究では初めてレクチンアレイを用いて非破壊状態でエクソソーム表面の糖鎖パターンを解析し、細胞の種類や状態によって変化することを報告した。この結果より、エクソソームの表面糖鎖解析は疾患の早期診断や予後の予測に有用であると予想される。

研究成果の概要(英文)：Glycans, which are mainly present on cell surfaces, play important biological roles including cell attachment, differentiation, cancer metastasis, infection, and molecular recognition. Exosomes are attracted attention as a new tool in cell-to-cell communication. Functions of exosome molecules such as proteins and micro RNAs are becoming clarified, however, little is known about the role of surface glycans on exosomes. In this study, surface glycans on exosomes from various kinds of cells were analyzed using an evanescent-field fluorescence-assisted lectin array system and their glycan patterns were compared with each other. The glycan patterns changed depending on cell types (normal or cancer) and states (undifferentiated or differentiated) and the surface glycans on exosomes were involved in cellular uptake.

研究分野：生体機能高分子、細胞外小胞

キーワード：細胞外微粒子 エクソソーム 糖鎖 レクチンアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの体は細胞同士が情報を伝達することで生命を維持している。逆に、がん化をひきおこすような物質やウイルスなどの病原体に感染するとそれらの情報が正常細胞に伝わり、異常状態へと変わっていく。この情報を伝達するツールとして近年注目を集めているのがエクソソームである。エクソソームはあらゆる細胞が分泌する脂質二重膜で囲まれた小胞であり、内部にタンパク質や生体内で遺伝子発現抑制に重要な働きを示す micro RNA (miRNA) を保持している。興味深いことに、がん細胞由来のエクソソームが正常細胞へと運ばれるとがん化を促進する一方で、母乳に含まれるエクソソームは胎児の健康を維持するような miRNA が含まれるといったように、エクソソームは由来細胞の特徴をコピーして周りの細胞に影響を及ぼしているのである。これらの特徴から、エクソソームは核酸やタンパク質を効率的に目的部位へ運ぶ、生体由来のドラッグデリバリーキャリアとしての応用が期待されている。一方で、エクソソームは生体由来であるがゆえに多様性を示す集団であり、分離、精製、解析手法には未だ多くの課題が残されている。

細胞膜表面にはタンパク質や脂質が多数存在している。さらに細かく見てみると、それらには糖鎖と呼ばれる糖が鎖状につながった物質が結合している。糖鎖は糖の種類や結合様式により無数の組み合わせが可能であり、タンパク質や脂質の物性や機能は糖鎖によりコントロールされていると言える。エクソソーム表面にも糖鎖は存在しており、細胞との相互作用や細胞の種類によりそのパターンが異なることが予想されるが、タンパク質や核酸の解析に比べて複雑であるためにほとんどその機能は解明されていない。本研究では、様々な細胞からエクソソームを単離し、その表面糖鎖を解析、比較することでエクソソーム糖鎖と細胞との相互作用機序の解明を目指した。

2. 研究の目的

未分化および分化誘導(骨芽、脂肪、神経)間葉系幹細胞、がん細胞からエクソソームを単離し、発現している糖鎖のパターンを解析、比較することで各エクソソームに特異的な糖鎖のパターンを割り出し、細胞取り込み機構との関連性を調べる。一般的な糖鎖解析は質量分析を用いて糖鎖を切断したものを解析するため、エクソソームの構造を破壊して測定しなければならないが、本研究では糖鎖を特異的に認識するレクチンをスライドガラスに並べたマイクロアレイを用いることで、エクソソーム表面糖鎖を非破壊の状態に網羅的な解析を可能とし、各種エクソソームの比較を効率的に行えると考えられる。細胞の種類や状態に応じた特異的な糖鎖パターンの変化を見つけ、新たなバイオマーカーとして応用できるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの単離

未分化の間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) はヒト脂肪由来 MSC (Adipose tissue-derived stem cells: ADSC)、ヒト骨髄由来 MSC (Bone marrow-derived stem cells: BMSC) を用い、がん細胞はヒト胃がん細胞株 AGS (Human Stomach Adenocarcinoma cell line)、ヒト前立腺がん細胞株 PC-3 (Human prostate cancer cell line) を用いた。各細胞を 70-80% コンフルエントになるまで培養後に血清由来のエクソソームが含まれていない培地へと交換し、さらに 48 時間培養した。培養上清を回収し、300 g × 10 分、2,000 g × 10 分、10,000 g × 30 分遠心後、上清を 120,000 g × 100 分超遠心分離にかけた。得られた沈殿を Phosphate Buffered Saline (PBS) で懸濁し、これをエクソソーム溶液とした。また、がん細胞については 2,000 g × 10 分、10,000 g × 30 分の遠心の際に得られた沈殿分画も PBS に懸濁し -80°C で保存した。数種類の市販のエクソソーム回収キットを用いて同様にエクソソームを単離し、超遠心分離法との比較に用いた。

ADSC は脂肪分化および骨芽分化、BMSC は神経分化誘導に用いた。脂肪分化および神経分化は市販の分化誘導培地 (StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit: Thermo Fisher Scientific, Mesenchymal Stem Cell Neurogenic Differentiation Medium: PromoCell) でそれぞれ 14, 10 日培養し、超遠心分離にてエクソソームを回収した。骨芽分化誘導は MSC 培養用培地である StemPro® MSC SFM XenoFree (Thermo Fisher Scientific) に β -Glycerophosphate, L-Ascorbic Acid, Dexamethasone: Sigma-Aldrich) を添加して 21 日間培養し、超遠心分離にてエクソソームを回収した。

(2) エクソソームの物性評価

回収したエクソソームは Micro BCA タンパク質アッセイにて濃度を測定した。物性評価として、ウエスタンブロッティングによるエクソソームマーカータンパク質 (CD63, CD81) の発現確認、ナノトラッキング法 (NTA) による粒径測定、透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察を行った。

(3) レクチンマイクロアレイを用いたエクソソーム表面糖鎖の解析

各細胞から回収したエクソソームを Cy3 NHS Ester Mono-reactive Dye (GE ヘルスケア) を用いて蛍光標識した。図 1 に示すフコース、マンノース、シアル酸、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、ガラクトースを認識する 45 種類のレクチン (各レクチン n=3) を並べたレクチンマイクロアレイ (LecChip™; GlycoTechnica) へサンプルを添加し、室温で一晩静

置した。GlycoStation™ Reader 2200 (GlycoTechnica)にて蛍光画像を取得し、GlycoStation® Tools Pro Suite 1.5 (GlycoTechnica)を用いて蛍光シグナルの解析を行った。



図1 LecChip™レイアウト

(4) ADSC エクソソームの細胞取り込み

シアル酸を認識するレクチンである siglec (sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin) を発現する HeLa 細胞を用いてエクソソーム表面糖鎖が細胞への取り込みに関与しているかどうかを検討した。HeLa 細胞をガラススペースディッシュに播種し、PKH26 (Sigma-Aldrich) で蛍光修飾した ADSC エクソソームを添加し 4 時間後に共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また、あらかじめ細胞に抗シグレック抗体、シアル酸を添加して 30 分インキュベート後にエクソソームを添加することで取り込みが阻害されるかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの機能評価

ADSC, BMSC, AGS, PC-3, 脂肪分化 ADSC, 骨芽分化 ADSC, 神経分化 BMSC からエクソソームを回収した。粒径は 150-200 nm であり、脂質二重膜で囲まれた小胞が観察できた。また、エクソソームマーカーであるテトラスパニン(CD63, CD81)の発現を確認した。がん細胞に関しては、2,000 g および 10,000 g の低速遠心で得られる細胞外微粒子についても機能評価を行い、超遠心 (120,000g) で得られるエクソソームとの比較を行った。その結果、平均粒径は 2,000 g が最も大きく、次に 10,000 g、120,000g の順となった。TEM 観察では 10,000 g のサンプルにおいても 120,000g のサンプルで見られるようなサイズの小胞が観察された。エクソソームマーカーの発現量は 120,000g が最も多く、次に 10,000 g、2,000 g の順となった。

(2) レクチンマイクロアレイによるエクソソーム表面糖鎖解析

本研究で用いたレクチンマイクロアレイはエバネッセント波蛍光励起型であり、ガラスの表面から 100-200 nm 程度の近い領域のものを検出することから、レクチンに反応しないサンプルが残っていても洗浄操作にて除く必要がないのが特徴である。糖鎖とレクチンは比較的弱い相互作用であるため、洗浄操作のいらぬこの装置を用いることでエクソソームの構造を壊すことなくかつ少量のサンプルで表面糖鎖を測定することができた。

各細胞のエクソソームおよび元の細胞の細胞膜分画を抽出し、それぞれレクチンマイクロアレイにて表面糖鎖解析を行った。45 種類のレクチンへの結合強度の全体的な傾向で比較するために主成分分析を行ったところ、今回のサンプルではがん細胞のカテゴリーと間葉系幹細胞のカテゴリーに分けることができ、さらには未分化と分化でも詳細に分けることができた。骨芽細胞分化においては骨芽分化誘導 ADSC エクソソームにおいて ADSC エクソソームよりも強く結合するレクチンを数種類同定することができたため、新たな骨芽分化を判別するマーカーとしてエクソソーム表面糖鎖が有用であることが示唆された。この結果について特許出願を行い、現在論文投稿中である。

がん細胞に関しては 2,000 g、10,000 g、120,000g それぞれの細胞外微粒子の表面糖鎖解析を行った。エクソソームマーカータンパク質の発現量やサイズが異なったように表面糖鎖パターンにも違いが見られた。各サイズの細胞外微粒子で特異的な表面糖鎖パターンを見つけることで、定義が曖昧であったエクソソームとマイクロベシクル (低速遠心で得られる微粒子) の精製、分離に応用できると考えている。

さらに、市販のキットと超遠心分離法で得られるエクソソームの表面糖鎖パターンの比較も

行った。2種類の市販キットと超遠心法で表面糖鎖解析を行ったところ、それぞれ違う糖鎖パターンが見られた。超遠心分離法は現在スタンダードな手法であり、低速遠心で除いた比較的大きな集団以外の全ての細胞外微粒子を回収する一方で、市販のキットはそのうちのある特定の集団を単離する手法であることからこのような違いが見られたと考えられる。超遠心法で回収したサンプルは密度勾配遠心により精製が可能であるが、操作の際にサンプルのロスが生じるため、あらかじめ大量に培養しておく必要がある。エクソソームの中のある集団で強く反応するレクチンを今後特定すれば、新たな精製方法が確立できると思われる。

(3) エクソソーム表面糖鎖と細胞との相互作用

ADSC 由来エクソソームの糖鎖パターンから 45 種類のレクチンの中で特にシアル酸認識レクチンへの結合が強いことがわかったので、エクソソーム表面のシアル酸が細胞表面にあるレクチンに結合し取り込まれるのではないかと考えた。そこで、エクソソームの細胞への取り込み機構の1つとして表面のシアル酸が関与しているかどうかを確認した。まずはシアル酸を認識するレクチンである siglec の種類の1つである siglec3 (CD33)が発現している HeLa 細胞へ ADSC エクソソームが取り込まれることを共焦点顕微鏡にて観察した。次に、細胞表面の siglec に結合するシアル酸や抗 siglec 抗体をあらかじめ添加しておいた後にエクソソームを添加すると取り込みが抑制されるかどうかを確認したところ、阻害剤の濃度に依存して取り込み量が減少した。このことから、細胞への取り込みへの表面糖鎖関連が示唆された。さらに、マウスに蛍光修飾エクソソームを皮下投与してリンパ節を取り出したところ、CD11b 陽性抗原提示細胞に特異的に取り込まれ、その中でもシグレック陽性細胞に選択的であることがわかった。この結果をエクソソームの表面糖鎖をレクチンアレイにより解析した初めての例として論文にまとめた(雑誌論文(1))。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

(1) A. Shimoda, Y. Tahara, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi. Glycan profiling analysis using evanescent-field fluorescence-assisted lectin array: Importance of sugar recognition for cellular uptake of exosomes from mesenchymal stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 491, 2017, 701-707. 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) A. Shimoda, K. Akiyoshi, Glycan profiling analysis of extracellular vesicles from mesenchymal stem cells (MSCs) and osteogenic MSCs, ISEV 2017, May 18-21 (2015), Toronto, Canada

(2) 下田麻子、田原義朗、澤田晋一、佐々木善浩、秋吉一成、間葉系幹細胞エクソソームのレクチンアレイ糖鎖解析と細胞相互作用機序、第 36 回日本糖質学会年会、2017 年 7 月 19 日 - 7 月 21 日、旭川市民文化会館(北海道、旭川市)

(3) 下田麻子、田原義朗、澤田晋一、佐々木善浩、秋吉一成、レクチンマイクロアレイによるエクソソーム表面糖鎖の解析、第 9 回日本 RNAi 研究会/第 4 回細胞外小胞学会、2017 年 8 月 30 日 - 9 月 1 日、グランドプリンスホテル広島(広島県、広島市)

(4) 下田麻子、秋吉一成、レクチンアレイによるエクソソーム表面糖鎖解析と細胞応答、2017 年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017 年 12 月 6 日 - 12 月 9 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)

(5) A. Shimoda, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Analysis of surface glycans on extracellular vesicles using lectin array and roles of their glycans in cellular recognition, ISEV2018, May 2-6 (2018), Barcelona, Spain

〔図書〕(計 2 件)

(1) 下田麻子、秋吉一成、先端医学社、“エクソソーム糖鎖とその機能”、炎症と免疫、vol.26、No.4、2018、88 (25-28)

(2) 下田麻子、秋吉一成、化学同人、“細菌が分泌するエクソソーム”、医療を変えるエクソソーム - 生体機能から疾患メカニズム、臨床応用まで -、2018、240 (105-112)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 多能性幹細胞を骨芽細胞へと分化誘導することにより得られうる 細胞集団から骨芽細胞

を検出する方法、及びその方法のために用いられるキット

発明者：秋吉一成、下田麻子

権利者：京都大学

種類：特許

番号：特願 2018-043297

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。