

令和 6 年 4 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H02581

研究課題名(和文) エクソソームの可逆的被包化と単一粒子解析

研究課題名(英文) Reversible encapsulation of exosomes for single particle analysis

研究代表者

江島 広貴 (Ejima, Hirotaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：00724543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは様々な細胞が分泌する直径100 nm程度の細胞外小胞である。薬物送達や体液診断への応用が期待されているが、脂質二重膜からなる不安定かつ極小サイズの粒子であるため扱いが難しいという課題がある。本研究ではエクソソームを金属-ポリフェノール錯体で被覆することで安定化できることを示した。また、被覆層を金ナノ粒子で高密度に修飾する手法も確立した。金ナノ粒子を担持したエクソソームからは単一粒子に由来するラマンスペクトルを得ることができた。同じ細胞株から精製したエクソソーム由来のスペクトルであっても違いがみられたことから、エクソソームの多様性を解析するための有効な手法になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは細胞から細胞へ物質を届けている天然のナノキャリアであるから、この機能をハイジャックして人工的な薬物送達キャリアへと改変することは将来的に有望である。薬物送達や体液診断などの医療応用の実現にむけて、特にエクソソームが不安定であることが課題となっている。本研究ではエクソソームを被覆することで安定性を向上し、また簡単な操作で脱被覆して元のエクソソームに戻すことができる手法を開発した。本研究で開発した手法は特別な装置を用いずに実現可能であるから、安定性や分析手法が不足しているエクソソームの研究において広く利用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are extracellular vesicles approximately 100 nm in diameter that are secreted by various cells. They are expected to have applications in drug delivery and liquid biopsy, but their handling is difficult due to their extremely small particle size and unstable nature of lipid-bilayer membranes. This study demonstrated that it is possible to stabilize exosomes by coating them with metal-phenolic network. Additionally, a method was established to densely modify the coating layer with gold nanoparticles. From the gold nanoparticle-bearing exosomes, it was possible to obtain Raman spectra derived from single particles. Since differences were observed even in spectra derived from exosomes purified from the same cell line, this technique is considered effective for analyzing the diversity of exosomes.

研究分野：生体ナノ粒子、バイオメテック材料

キーワード：細胞外小胞 金属-ポリフェノール錯体

1. 研究開始当初の背景

体内では細胞が分泌した様々な小胞が循環しており、その分布は血液のみならず、尿や唾液、汗などの体液中に及ぶ。こうした細胞外小胞の中でもエクソソームは直径 30-100 nm 程度の粒径分布を持つ小胞である。エクソソームはタンパク質や核酸を内包し(図 1)、細胞間情報伝達を担っている。近年、疾患特異的細胞から分泌されたエクソソームの構成分子がバイオマーカーとして注目されている。例えば、悪性黒色腫細胞が放出するエクソソームには TYRP2、VLA-4、MET などのタンパク質が高濃度に含まれており、これらは転移能を予測するためのバイオマーカーとして有用である^[1]。他にも、マウスの細胞培養液から採取したエクソソームに電気穿孔法によって siRNA を封入し、細胞採取元と同一のマウスへと静脈注射し、脳選択的に siRNA を送達してタンパク質をロックダウンすることに成功している^[2]。

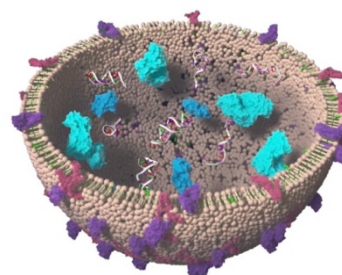


図 1. エクソソームの模式図

2. 研究の目的

エクソソームは細胞から細胞へ物質を届けている天然のナノキャリアであるから、この機能をハイジャックして人工的な薬物送達キャリアへと改変することは将来的に有望である。薬物送達や体液診断などの医療応用が先行しているが、エクソソームは脂質二重膜からなる不安定かつ極小サイズの粒子であるためハンドリングが難しいという課題がある。例えば、内包物の漏出、脂質二重膜の融合や脂質分子の交換、プラスチック容器表面への吸着等が頻繁に起こる^[3]。エクソソームを長期保存すると粒径が変化し、化学的に変性する場合がある^[3]。経験的に、体液や細胞培養液からエクソソームを精製したら、冷凍庫に長期間保存せず、できるだけ早めに実験に用いる方が良いと言われている。そこで本研究ではこれまで独自に開発してきた生体適合性かつ可逆的なコーティング技術^[4]をエクソソーム用途にはじめて適用し、エクソソームの安定性向上を目的として研究を行なった。さらに、被覆されたエクソソームの用途探索を行なった。

3. 研究の方法

L929 細胞 (マウス線維芽細胞)、MCF-7 細胞 (ヒト乳がん由来細胞)、MCF-10A 細胞 (非腫瘍性ヒト乳腺上皮細胞) を培養した。FBS 由来エクソソームの混入を防ぐために、血清フリーの培地で 24 時間培養した後、細胞培養液を採取した。PEG 沈殿法、サイズ排除クロマトグラフィーまたは超遠心法によって細胞培養液からエクソソームを精製した。

エクソソーム分散液にタンニン酸水溶液 (TA, 40 mg/mL, 23.5 mM)

と $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Fe^{3+} , 5 mg/mL, 18.5 mM) を、それぞれ 2 μL ずつ加えた。さらに 200 μL の MOPS 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) を加え、ボルテックスミキサーによって 10 秒間攪拌した。その後、孔径 0.22 μm のフィルターで濾過し、ナノセップ遠心ろ過デバイス (300 kDa MWCO, Pall Corporation) を用いて濃縮、洗浄し、MOPS 緩衝液 (10 mM, pH 7.4) で再懸濁した。1 mg/mL の PEG-チオール (PEG-SH) または FITC-PEG-SH を分散液に加えることで、MPN 被覆エクソソームを PEG 化した。10 mM の塩化金(III)水溶液を 5 μL の添加することで、エクソソーム表面で Au^{3+} イオンをその場還元し金ナノ粒子を生成させた (図 2)。

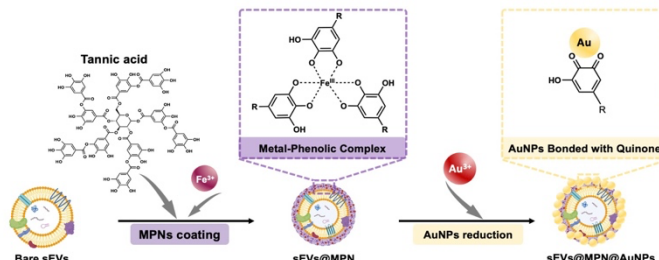


図 2. エクソソームの金属-ポリフェノール錯体 (MPN) による被覆と金イオンのその場還元

4. 研究成果

動的分散の結果、MPN 被覆によってエクソソームの粒径は $61 \pm 15 \text{ nm}$ から $90 \pm 3 \text{ nm}$ に増加したことがわかった。この粒径は PEG 化によりさらに増加し、 $126 \pm 13 \text{ nm}$ になった。タンニン酸が負電荷をもつため、表面のゼータ電位は MPN 被覆により -18.2 mV から -30.3 mV に減少したが、PEG 化すると -12.4 mV へと増加した。これは中性の PEG 鎖が MPN の負電荷を一部遮蔽したためである。被覆前後のエクソソームを透過型電子顕微鏡およびクライオ透過型電子顕微鏡によって観察した。MPN 被覆前のエクソソームは、クライオ透過型電子顕微鏡では $50 \sim 100 \text{ nm}$ の直径を持つ球形として観察された一方、透過型電子顕微鏡では乾燥による収縮のため、くぼみをもつ皿型の粒子として観察された。MPN 被覆後のエクソソームはクライオ透過型電子顕微鏡像、透過型電子顕微鏡像、共に球形を保っており、被覆によってエクソソームの膜が硬くな

り、形状の変化が起こらなくなったと考えられる。表面修飾に用いる PEG-SH の分子量を 2, 6, 10 kDa と変化させたと、それに伴って透過型電子顕微鏡で観察される表面 PEG 層の厚みも 17, 43, 80 nm と増加した。PEG 化によるエクソソームの安定性向上を確認するため、凍結融解サイクルを経た後に、DLS で粒径分布を測定した (図 3)。MPN によって被覆していない裸のエクソソームでは、フラグメント化を反映した約 10 nm の小さなピークと、凝集体に対応する約 1-10 μm のピークが出現した。一方で、PEG 化 MPN 被覆エクソソームでは凍結融解サイクルを 10 回経た後も粒径はほとんど変化しなかった。

凍結融解処理を施した際に、エクソソームから内包物が漏出するかどうかを確認するために、リアルタイム定量ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR) によって、5 つの mRNA (GAPDH, CD63, CD81, CD9, EpCAM) を定量した。MPN による被覆前後でこれら 5 つの mRNA 量はほぼ同じ値を示した。MPN で被覆していないエクソソームでは、5 回の凍結融解サイクル後に上記 5 つの mRNA 量が大幅に減少したことから、mRNA の漏出が起きたことが確かめられた。一方で MPN で被覆したエクソソームでは 5 回の凍結融解サイクルを経ても、mRNA の漏出は起きなかった。これらの結果は MPN 被覆することでエクソソームの安定性が向上することを示した。

MPN の脱被覆条件を検討するために、MPN 被覆エクソソームの分散液に EDTA を添加し、誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) によって残存する Fe 量を分析した。その結果、20 分の処理で 95% 以上の MPN が分解することがわかった。エクソソームは細胞遊走を誘発することが知られている。MCF-7 細胞に、MCF-7 細胞から分泌されたエクソソームを添加して、細胞遊走能の変化をスクラッチアッセイによって評価した。裸のエクソソームを添加した際の MCF-7 細胞の遊走能を 100% とすると、MPN 被覆エクソソームを添加した際は 36%、PEG 化 MPN 被覆エクソソームを添加した際は 5% 以下であった。しかし、MPN 被覆を分解すると遊走能は 57% まで回復した。これらの結果より、MPN 被覆は可逆的であり、脱被覆後もエクソソームはその生理活性を所定の割合で維持していることを示した。

MPN 被覆エクソソームに塩化金(III)を添加するとエクソソーム表面に直径 5~10 nm 程度の金ナノ粒子が高密度に析出した (図 4)。MPN 被覆を施していないエクソソームに塩化金(III)しても金ナノ粒子は析出しなかったことから、MPN 中のポリフェノールが Au^{3+} イオンをその場還元したことで、金ナノ粒子が生成したことがわかった。金ナノ粒子修飾エクソソームの分散液を Si 基板上にキャストしラマンスペクトルを測定したところ、タンパク質、核酸、リン脂質由来のスペクトルが得られた (図 5)。スペクトル測定において集光したレーザー径は基板上で約 1 μm であり、走査型電子顕微鏡で別途観察した基板上での分布数から、この測定で得られたスペクトルはエクソソーム単一粒子に由来すると考えられる。この手法で多数の試料からラマンスペクトルを測定したところ、同じ細胞株から精製したエクソソーム由来のスペクトルであっても多様性がみられた。また、主成分分析によってクラスタリングしたところ、MCF-7 細胞および MCF-10A 細胞由来のエクソソームを識別できる可能性が示された。

本研究ではエクソソームに MPN 被覆法を適用するための実験条件を確立した。エクソソームはヘテロな粒子集団であるため、従来の分析では集団の平均値を評価している。一方、本研究で得られた金ナノ粒子修飾エクソソームでは一粒子のエクソソームに由来するラマンスペクトルを得ることができた。取得したラマンスペクトルは多次元データである他に様々な分子に由来するスペクトルが複雑に重なっているため、多変量解析の手法である主成分分析と線型判別分析を順次適用して分析することで、エクソソームの性状や由来の違いの判別がスコアプロット上で可能となることを示した。本研究で開発したエクソソームの修飾手法と分析手法は特別な装置を用いずに実現可能であり、安定性や分析手法が不足しているエクソソームの研究において一助となることが期待される。

<引用文献>

[1] Melanoma Exosomes Educate Bone Marrow Progenitor Cells toward a Pro-Metastatic Phenotype through MET, H. Peinado, M. Aleckovic, S. Lavotshkin, I. Matei, B. Costa-Silva, G. Moreno-Bueno, M. Hergueta-Redondo, C. Williams, G. Garcia-Santos, C. Ghajar, A. Nitadori-Hoshino, C. Hoffman, K. Badal,

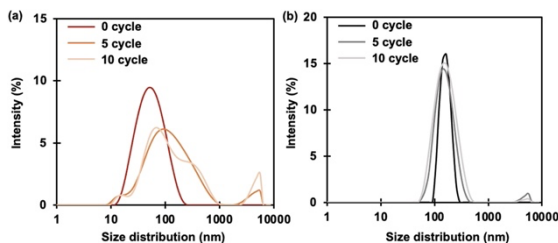


図 3. 凍結融解サイクルによる粒径分布の変化。(a) エクソソーム (b) PEG 化 MPN 被覆エクソソーム

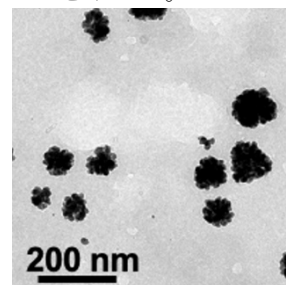


図 4. 金ナノ粒子を担持した MPN 被覆エクソソームの TEM 像

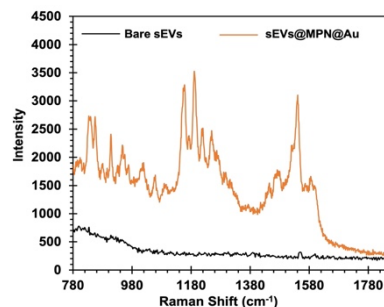


図 5. 被覆前のエクソソームと金ナノ粒子を担持した MPN 被覆エクソソーム由来ラマンスペクトル

- B. A. Garcia, M. K. Callahan, J. Yuan, V. R. Martins, J. Skog, R. N. Kaplan, M. S. Brady, J. D. Wolchok, P. B. Chapman, Y. Kang, J. Bromberg, D. Lyden, *Nat. Med.*, **18**, 883–891 (2012)
- [2] Delivery of siRNA to the Mouse Brain by Systemic Injection of Targeted Exosomes, L. Alvarez-Erviti, Y. Seow, H. Yin, C. Betts, S. Lakhali, M. J. A. Wood, *Nat. Biotech.*, **29**, 341–345 (2011)
- [3] Effects of Storage Temperature on Airway Exosome Integrity for Diagnostic and Functional Analyses, R. Maroto, Y. Zhao, M. Jamaluddin, V. L. Popov, H. Wang, M. Kalubowilage, Y. Zhang, J. Luisi, H. Sun, C. T. Culbertson, S. H. Bossmann, M. Motamedi, A. R. Brasier, *J. Extracell. Vesicles*, **13**, 1359478 (2017)
- [4] One-Step Assembly of Coordination complexes for versatile film and particle engineering, H. Ejima, J. J. Richardson, K. Liang, J. P. Best, M. P. van Koeveerden, G. K. Such, J. Cui, F. Caruso, *Science*, **341**, 154–157 (2013)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Bohan Cheng, Sifan Lu, Wenting Liao, Chenyu Wang, Joseph J. Richardson, Hirotaka Ejima	4. 巻 14
2. 論文標題 Tannic acid-inspired star polymers for functional metal-phenolic networks with tunable pore sizes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 14466-14470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D2NR02682A	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 Joseph J. Richardson, Wenting Liao, Jincai Li, Bohan Cheng, Chenyu Wang, Taku Maruyama, Blaise L. Tardy, Junling Guo, Lingyun Zhao, Wanning Aw, Hirotaka Ejima	4. 巻 12
2. 論文標題 Rapid assembly of colorless antimicrobial and anti-odor coatings from polyphenols and silver	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05553-9	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 該当する

1. 著者名 Chenyu Wang, Kenta Kimura, Jincai Li, Joseph Jacob Richardson, Mitsuru Naito, Kanjiro Miyata, Takanori Ichiki, Hirotaka Ejima	4. 巻 -
2. 論文標題 Polydopamine Mediated Surface Functionalization of Exosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemNanoMat	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnma.202100078	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Chenyu Wang, Hirotaka Ejima
2. 発表標題 Polydopamine-mediated surface functionalization of extracellular vesicles
3. 学会等名 第17回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hirotaka Ejima
2. 発表標題 Adsorption and adhesion properties of bioinspired polyphenolic molecules
3. 学会等名 The 48th IUPAC World Polymer Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021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
研究分担者	重藤 真介 (SHIGETO Shinsuke) (10756696)	関西学院大学・理学部・教授 (34504)	

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
---------	---------