

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12645

研究課題名(和文) 骨芽細胞由来細胞外小胞の糖鎖による分類と細胞応答

研究課題名(英文) Classification of osteoblast-derived extracellular vesicles by glycans and cellular responses

研究代表者

下田 麻子 (Shimoda, Asako)

京都大学・医学研究科・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：不均一な性質のナノ～マイクロサイズの微粒子の集団である細胞外小胞を分離する指標として表面糖鎖に注目した。本研究では間葉系幹細胞および骨芽細胞に分化誘導した細胞から細胞外小胞を回収し、その糖鎖パターンをレクチンマイクロアレイおよび一粒子解析によって比較した。その結果、骨芽分化前後で表面糖鎖パターンは変化し、さらに骨芽細胞から分泌する細胞外小胞と石灰化に關与する基質小胞でも違いが見られた。今後は表面の糖鎖によって細胞との相互作用がどのように変化するかを評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞外小胞の糖鎖解析に関する報告例はその他の構成成分であるタンパク質、脂質、核酸に比べて少なく、レクチンマイクロアレイ法による解析は糖鎖のパターンを少量のサンプルで網羅的に解析する手法として有用である。さらに、一粒子解析を行うことでより詳細な評価が可能となり、細胞外小胞の不均一性の解明やバイオマーカーの特定に応用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on surface glycans as indicators for classifying extracellular vesicles (EVs), which are nano- to micro-sized particles with heterogeneous properties. In this study, EVs from mesenchymal stem cells (MSCs) and osteoblast differentiated MSCs were collected and their glycan patterns were analyzed using lectin microarray and single particle analysis. The glycan patterns were different in accordance with the cell origin and types of vesicles (EVs or matrix vesicles which play important roles in bone mineralization). Future studies are needed to fully understand the interaction between EVs and cells depending on EV surface glycans.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：細胞外小胞 糖鎖解析 レクチンマイクロアレイ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞外小胞は、由来する細胞の情報をコピーし、周囲や遠くの組織へと伝える役割を担っており、疾患の診断や治療、創薬まで多岐にわたる応用研究が盛んに行われている。一方で、細胞外小胞は生体由来であるためサイズや組成、機能が均一でない微粒子の集合体であり、それらを分離・精製する技術は未だ確立していない。

細胞膜上にある脂質やタンパク質の表面は糖鎖で覆われており、生命維持に必須な構成因子として知られている。細胞外小胞表面にある糖鎖も細胞との相互作用に重要な役割を果たしていると考えられるが、核酸やタンパク質と比べて糖鎖は構造が複雑で解析に時間と熟練した技術を必要とするため、研究例が少ないのが現状である。そこで、細胞外小胞の表面の糖鎖を簡便に高感度で検出する手法としてレクチンマイクロアレイ法に着目し、由来細胞やサイズを分類する指標として糖鎖パターンの解析が有用であると考えた。

2. 研究の目的

細胞外小胞および石灰化に関与する基質小胞の2種類の小胞を分泌する骨芽細胞に着目し、その糖鎖パターンを比較する。これらの小胞はその分泌経路や骨代謝における機能は不明な点が多く、また糖鎖が示す役割についてはほとんど知られていない。そこで、細胞外小胞が糖鎖を介し、骨代謝関連細胞への相互作用がどのように行われているかを明らかにする。さらに、表面糖鎖を改変することにより、細胞への機能がどのように変化するかを評価する。まずはヒト脂肪由来間葉系幹細胞またはマウス頭蓋冠由来細胞を用いて骨芽細胞へと分化誘導し、分化前後で糖鎖パターンがどう変化するかを評価する。細胞外小胞は培養上清から、基質小胞は細胞外マトリックスからコラゲナーゼ処理により回収し、特性を評価する。

3. 研究の方法

(1) 細胞外小胞(基質小胞)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)を用い、マウス頭蓋冠由来細胞はMC3T3-E1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細胞外小胞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1度Phosphate Buffered Saline (PBS)で洗浄後に再度120,000 g × 100分超遠心分離にかけ、沈殿をPBSへ懸濁した。超遠心分離法以外に市販の回収キットを用いた単離も行った。

骨芽分化誘導はADSC, MC3T3-E1それぞれ専用の骨芽細胞分化培地を用いて21日間培養し、上清から細胞外小胞を超遠心分離にて回収した。また、基質小胞は培養上清を除いた後に細胞をPBSで洗浄し、コラゲナーゼ処理により細胞外マトリックスから回収した。

(2) 細胞外小胞(基質小胞)の物性評価

回収した細胞外小胞(基質小胞)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、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細胞外小胞(基質小胞)表面糖鎖の解析

Cy3 NHS Ester Mono-reactive Dye (GEヘルスケア)を用いて細胞外小胞(基質小胞)を蛍光標識した。各糖鎖を認識する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。

(4) イメージングフローサイトメーターによる細胞外小胞(基質小胞)の一粒子解析

レクチンマイクロアレイ法ではサンプルの表面糖鎖を網羅的に解析するが、イメージングフローサイトメーターはレクチンと細胞外小胞(基質小胞)の表面糖鎖との相互作用を一粒子レベルで解析することが可能である。まずは、がん細胞や血漿、未分化の間葉系幹細胞と数種類のレクチンおよび細胞外小胞に多く発現するテトラスパニンとの相互作用を解析した。細胞外小胞の蛍光標識には脂質膜を染色するExoSparkler Exosome Membrane Labeling Kit-Deep Red (同仁化学)を使用した。

4. 研究成果

(1) 細胞外小胞(基質小胞)の物性評価

図1にサイズ測定の結果を示す。day0(未分化)およびday21(骨芽分化)ともに150-170 nm前後の粒径であった。

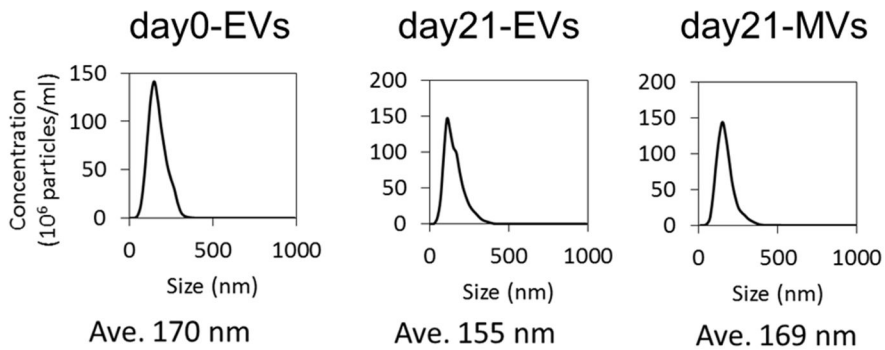
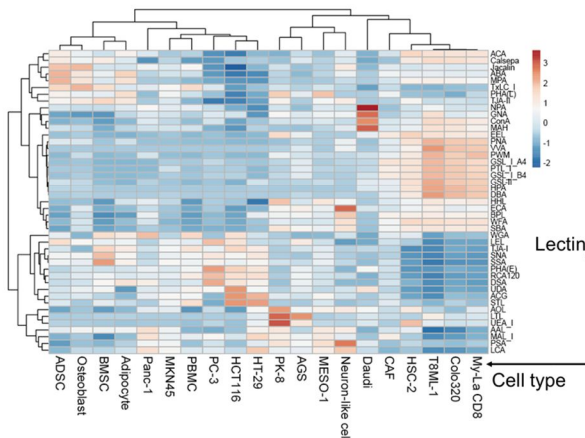


図1 NTAによる細胞外小胞（基質小胞）の粒径測定（EV：細胞外小胞，MV：基質小胞）

(2) レクチンマイクロアレイを用いた細胞外小胞（基質小胞）表面糖鎖の解析

がん細胞、免疫細胞、間葉系幹細胞（未分化および分化）由来の約20種類の細胞外小胞（基質小胞）と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。その結果、細胞の種類、細胞外小胞のサイズや回収方法の違いによってその糖鎖パターンは異なることがわかった（図2a）。また、骨芽分化誘導前後で数種類のレクチンへの結合が強くなることから、分化マーカーとしても糖鎖パターン解析は有用であることが示唆された。また、骨芽分化誘導21日後に得られた細胞外小胞と基質小胞でも糖鎖パターンに違いが見られたことから（図2b）、糖鎖を介した細胞との相互作用において、この違いが影響するのではないかと示唆された。

(a)



(b)

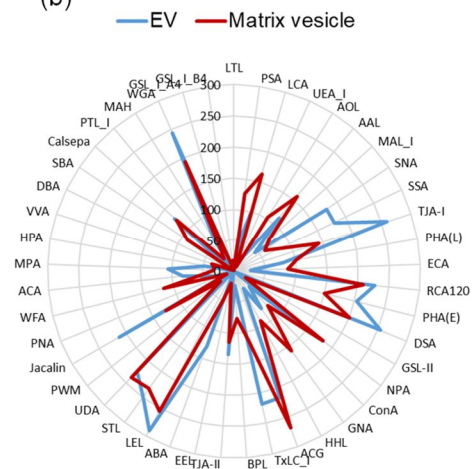


図2 (a) 20種類の細胞から回収した細胞外小胞のレクチンマイクロアレイ解析結果，(b) MSCから骨芽分化誘導した細胞から回収したEVとMVの糖鎖パターン比較

(3) イメージングフローサイトメーターによる細胞外小胞（基質小胞）の一粒子解析

まずは未分化の間葉系幹細胞由来の細胞外小胞を用いて、シアル酸やフコース、マンノースなどを認識するレクチン数種類との相互作用を解析した。レクチンマイクロアレイの結果同様に各レクチンとの結合強度に違いが見られた。骨芽細胞誘導ADSCおよびMC3T3-E1の細胞外小胞と基質小胞においては、それぞれ回収量が少なかったためにシアル酸認識レクチン1種類のみにて比較を行った。その結果、どちらの細胞でも細胞外小胞と基質小胞とレクチンとの共有割合が異なっていることがわかった。今後はさらにレクチンの種類を増やし、レクチンマイクロアレイの結果を合わせて表面糖鎖の違いが細胞との相互作用に及ぼす影響を明らかにする。



図3 イメージングフローサイトメーターによるADSC由来基質小胞とレクチンとの相互作用解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Kanao Eisuke, Wada Shuntaro, Nishida Hiroshi, Kubo Takuya, Tanigawa Tetsuya, Imami Koshi, Shimoda Asako, Umezaki Kaori, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari, Adachi Jun, Otsuka Koji, Ishihama Yasushi	4. 巻 94
2. 論文標題 Classification of Extracellular Vesicles Based on Surface Glycan Structures by Spongy-like Separation Media	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 18025 ~ 18033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.2c04391	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 Shimoda Asako, Akiyoshi Kazunari	4. 巻 40
2. 論文標題 Surface Glycan Profiling of Extracellular Vesicles by Lectin Microarray and Glycoengineering for Control of Cellular Interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pharmaceutical Research	6. 最初と最後の頁 795 ~ 800
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11095-023-03511-2	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 下田 麻子、館野 浩章、秋吉 一成	4. 巻 95
2. 論文標題 糖鎖を基軸とするエクソソームの多様性解析と生体応答・制御	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 136 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950136	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 Shimoda Asako, Miura Risako, Tateno Hiroaki, Seo Naohiro, Shiku Hiroshi, Sawada Shin ichi, Sasaki Yoshihiro, Akiyoshi Kazunari	4. 巻 6
2. 論文標題 Assessment of Surface Glycan Diversity on Extracellular Vesicles by Lectin Microarray and Glycoengineering Strategies for Drug Delivery Applications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Small Methods	6. 最初と最後の頁 2100785 ~ 2100785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/smt.202100785	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 Seo Naohiro, Nakamura Junko, Kaneda Tsuguhiko, Tateno Hiroaki, Shimoda Asako, Ichiki Takanori, Furukawa Koichi, Hirabayashi Jun, Akiyoshi Kazunari, Shiku Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinguishing functional exosomes and other extracellular vesicles as a nucleic acid cargo by the anion exchange method	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Extracellular Vesicles	6. 最初と最後の頁 12205 ~ 12205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jev2.12205	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 Odaka Haruki, Hiemori Keiko, Shimoda Asako, Akiyoshi Kazunari, Tateno Hiroaki	4. 巻 22
2. 論文標題 CD63-positive extracellular vesicles are potential diagnostic biomarkers of pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	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) 10.1186/s12876-022-02228-7	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 下田 麻子、秋吉 一成	4. 巻 92
2. 論文標題 細胞外小胞・エクソソームのグライコミクス	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 336-342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2020.920336	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 Shimomura T, Seino R, Umezaki K, Shimoda A, Ezo T, Ishiyama M, Akiyoshi K.	4. 巻 32
2. 論文標題 New Lipophilic Fluorescent Dyes for Labeling Extracellular Vesicles: Characterization and Monitoring of Cellular Uptake	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioconjugate Chem.	6. 最初と最後の頁 680-684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.1c00068	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 下田麻子、澤田晋一、佐々木善浩、秋吉一成
2. 発表標題 細胞外小胞の表層糖鎖プロファイリングによる多様性評価
3. 学会等名 第9回 日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 下田麻子
2. 発表標題 細胞外小胞の表層糖鎖プロファイリングと機能
3. 学会等名 第32回フォーラム・イン・ドージン 生命現象に関わる細胞外小胞体の多彩な役割 - ヴェールを脱ぐエクソソーム - (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Asako Shimoda, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi
2. 発表標題 Analysis of heterogeneity of surface glycans on extracellular vesicles by lectin array
3. 学会等名 Pacifichem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 馬場嘉信、柳田 剛、加地範匡	4. 発行年 2021年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 244
3. 書名 AI・ナノ・量子による超高感度・迅速バイオセンシング	

1. 著者名 中野 明彦、吉森 保、華山 力成	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 210
3. 書名 EVs 細胞外小胞の生物学	

1. 著者名 吉岡祐亮、落谷孝広 / 編	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 199
3. 書名 決定版エクソソーム実験ガイド	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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