

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20567

研究課題名（和文）表面化学構造に基づくエクソソームのサブクラス分離

研究課題名（英文）Sub-classification of exosome based on the superficial chemical structure

研究代表者

久保 拓也（Kubo, Takuya）

京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：20374994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,900,000円

研究成果の概要（和文）：医薬品分野、環境分野、合成化学分野においては、近年の分析検体数の増加にともない、作業時間の短縮と低コスト化が求められている。そこで、我々は工業レベルで合成されている汎用の材料に着目し、高速・高選択性・低コスト・低環境負荷を実現する新規分離剤である多孔性高分子（スポンジモノリス）の開発を着想した。

本研究では、スポンジモノリスの数十マイクロン以上の細孔に基づく透過性及びタンパク質固定化機能を利用して、細胞外小胞（エクソソーム）や新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を対象として、スポンジモノリスの分離場としての可能性について実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今後、同手法を用いることで、エクソソームの構造解析や機能解明が加速し、また、細胞培養液あるいは種々の生体試料中からの効率的なエクソソーム分離技術開発を促進することが期待できる。さらに、本法はエクソソームにとどまらず、ウイルス等の生体関連ナノ粒子の分離に好適である。本材料は、通常の硬質の分離基材とは異なり、極めて柔軟性の高い材料であることから、ニーズに応じた形状、サイズの分離場を構築することが容易であり、今後、ユニバーサルデザイン性を利用した様々な応用研究並びに実用化が期待される。

研究成果の概要（英文）：We focused on the specific separation of glycoproteins by the recognition of sugar chains using a spongy monolith (SPM) as a separation medium. As a fundamental study, we prepared SPMs modified with a few lectins for lectin affinity chromatography (LAC). After packing the modified SPM into the column, the adsorption selectivity due to the lectin affinity was evaluated. Additionally, the collecting procedures were also optimized by changing the elution conditions.

Additionally, new SPMs were developed for the separation of an extracellular vesicle, exosome and a corona virus, SARS-CoV-2. In former case, the specific lectins were immobilized onto a SPM and the selective separation of exosomes were successfully achieved. In case of the virus separation, an antibody was modified onto a SPM for the selective adsorption of a spike protein on SARS-CoV-2. Then, we finally achieved to selective concentration of SARS-CoV-2 from a pseudo salivary sample.

研究分野：分離化学

キーワード：スポンジモノリス エクソソーム コロナウイルス クロマトグラフィー 固相抽出

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞外小胞のひとつであるエクソソームが生物学、医学の分野で注目されており、特に、生体由来のナノキャリアとして、DDS や再生医療分野での利用においても関心が高まっている (Pharmacol. Ther. 174, 63-78, 2017; Cell. Physiol. 232, 1660-1668, 2017)。これまで、mRNA や miRNA などの核酸や膜タンパク質の機能解析が精力的に行われており、最近では糖鎖や脂質についても含有種が明らかとなってきた (J. Control. Release 228, 179-190, 2016; Prog. Lipid Res. 66, 30-41, 2017)。一方で、エクソソームの構成化学種とその機能の相関は明らかになっておらず、エクソソームの構成化学種に基づくサブクラス分離、解析が可能となれば、エクソソームの機能解明が飛躍的に進展することは間違いない。その第一の方策として、エクソソームの表面化学構造に基づく高選択的な分離を提供する普遍的な手法の開発が急務である。

一般的なエクソソームの分離精製手法としては超遠心法が採用されているが、サイズのみ依存する超遠心法では、構成化学種や界面特性を規定できない (Proc. Natl. Acad. Sci. 2016, 113, E968-77; Sci. Rep. 2016, 6, 23550)。また、抗体クロマトグラフィー (Theranostics. 7, 789-804, 2017) や脂質認識磁気ビーズ (Sci. Rep. 6, 33935, 2016) では、化学構造に基づく分離が可能となっているが、スループットの面で超遠心法に匹敵するほどの能力は期待できない。

そのため、これらの既存の分離手法とは異なり、膜化学構造に対する選択性と試料量に依存しないユニバーサルな分離場開発が求められており、テーラーメイドなりリガンド固定が可能なハイスループット様の新規プラットフォームの創成が望まれ、その実現によって表面化学構造に基づくサブクラス分離とその応用研究の進展が期待できる (図1)。

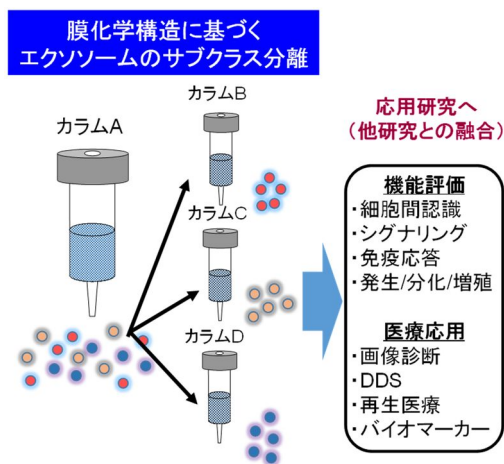


図1. エクソソームの表面化学構造に基づくサブクラス分離。

2. 研究の目的

(1) エクソソームの選択的分離

エクソソームは、同一の細胞から産生された場合でも、構成する分子群が異なる不均一な分子集団であるとも言われており、エクソソーム研究において、多種多様なエクソソームの化学特性に基づく分離手法の確立が急がれている。そこで本研究では、エクソソームの化学特性を規定する条件の一つである糖鎖構造に着目し、膜表面の糖鎖構造を利用した新規分離手法の開発を目指した。糖鎖分離手法の一つに、レクチンアフィニティークロマトグラフィー (LAC) があるが、従来の LAC 用カラムは、分離基材の細孔が小さく、100~200 nm のエクソソームの目詰まりが懸念される。

そこで、新規分離材として高通水性のスポンジ状媒体であるスポンジモノリス (SPM) の利用を着想した。SPM は、poly(ethylene-co-glycidylmethacrylate)を基材としたモノリス状骨格から成り、エポキシ基を持つため、アミノ基を有する任意のリガンドの固定化が可能である。また細孔のサイズが 10~100 μm であることから、エクソソームの分離に適していると考えられる。本研究ではエクソソームの表面糖鎖に着目し、特徴的な表面糖鎖を選択的に捕捉可能なレクチンをリガンドとして、さらに、超高通水性の分離剤として SPM を分離基材とすることで、高選択的かつハイスループットなエクソソーム分離法開発を目指した。基礎検討として、いくつかのレクチンを固定化したスポンジモノリスを作製し、糖タンパク質の選択的分離の可能性について詳細に評価した。次に、SPM とエクソソームの非特異吸着を防ぐために、ブロッキング剤を検討した。さらに、直接レクチンを固定した系でのエクソソームの LAC 測定を行った。また、エクソソーム回収量増加などを目的とし、HPLC を用いたエクソソーム LAC 測定を行い、最後に得られたエクソソームのプロテオーム解析を行った。

(2) コロナウイルスの選択的分離

新型コロナウイルス (SARS-CoV-2) は、表面の spike protein がヒト体内の受容体タンパク質 ACE2 と結合することにより感染する。ここで、spike protein がウイルスの表面に露出していることに着目し、spike protein を標的とした抗体を SPM に固定化することで SARS-CoV-2 を選択的に吸着できると考えた。実用的には、SPM に SARS-CoV-2 陽性者からの唾液試料等を通液することにより、SPM にウイルスのみを選択的に吸着させることで、ウイルスの濃縮・検出が可能になり、PCR 検査の前処理に利用できることが考えられる。

本研究では、SPM に対して SARS-CoV-2 の spike protein に対する抗体を固定化した新規 SPM 基材 (AS-SPM) を作製し、汎用のカートリッジに充填した。得られたカートリッジを用いて、

固相抽出による spike protein に対する吸着・脱着選択性を評価した。また、最適な吸着条件を検討したのち、SARS-CoV-2 の選択的な濃縮を目指した。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの選択的分離

以下に示す手順で、SPM に対してレクチンの固定化を行った。ピペットチップに SPM を充填し、メタノール 500 μ L、純水 500 μ L、リン酸塩緩衝生理食塩水 (PBS) 500 μ L をそれぞれ通液して SPM を洗浄した後、sambucus sieboldiana agglutinin (SSA) 溶液または concanavalin A (ConA) 溶液 (2 mg/mL) 100 μ L を封入し、ピペットチップ両端をシーリングして 24 時間、40 $^{\circ}$ C でインキュベートした。同様に、HPLC 用カラムに充填した SPM についてもレクチンを固定化した。作製したレクチン固定化 SPM チップに、ブロッキング剤を 100 μ L 通液させることでブロッキングを行った。ブロッキング剤には、5% PVP + 0.05% tween20 in PBS を用いた。

(2) コロナウイルスの選択的分離

PBS で 833 μ g/mL に希釈した anti-spike protein RBD (30 μ L) を長さ 5 mm、直径 2 mm の SPM に対して注入し、40 $^{\circ}$ C のオープンで 24 h インキュベートし AS-SPM を作製した。その後、AS-SPM に 5% w/v PVP (0.05% w/v tween 20 PBS 溶液, 50 μ L) を注入し 1 h 静置することでブロッキングを行った。この AS-SPM に対して 50 μ g/mL spike protein, lysozyme, lactoferrin, 50 U/mL amylase 混合溶液 (0.5 M NaCl PBS 溶液, 15 μ L) を注入し、30 min 静置した後溶出させ、through 試料とした。続けて 0.5 M NaCl PBS (15 μ L) を合計 2 回通液し、wash1, 2 試料とした。回収した溶出液を LC で分析し、ピーク面積を比較することで回収率を測定した。

4. 研究成果

(1) エクソソームの選択的分離

糖タンパク質に対する保持容量検討

レクチン固定化 SPM カラムに対し、糖タンパク質の注入量を変化させながら LAC 測定を行うことで、保持容量を検討した。SSA に対しては糖タンパク質に transferrin を使い、haptensugar に lactose を使用した。また、ConA に対しては glucose oxidase を糖タンパク質として使い、haptensugar として methyl α -D-mannopyranoside を使用した。糖タンパク質がレクチン固定化 SPM カラムに保持され、移動相に haptensugar を添加することで溶出することが確認された。また、試料注入量が増えることで、一部のタンパク質が SSA-SPM, Con A-SPM に保持されず溶出していることが確認された。そこで、このクロマトグラムから得られたピーク面積をもとに、溶出したタンパク質量を算出した。SSA-SPM, ConA-SPM の両カラムにおいて、試料注入量を増加させても、SPM に保持される糖タンパク質量は一定の値で増加が止まった。このことから、頭打ちの値が保持量の最大値と考え、それぞれの SPM 保持容量を次のように推定した。

SSA-SPM: 0.15 nmol/column (12 μ g/column); ConA-SPM: 0.38 nmol/column (60 μ g/column)

エクソソームの選択的分離

作製したナノ粒子であるマンノース含有 liposome を用いて ConA-SPM の LAC 測定を行った。ナノ粒子である liposome に対しても、糖鎖に基づいた分離が可能であることが示唆された。

次に、作製したレクチン固定化 SPM を用いて、エクソソームの LAC 測定を行った。得られたクロマトグラムを図 2 に示す。クロマトグラムから、エクソソームが一部 SPM に保持され溶出したことが示唆された。このクロマトグラムに基づいて、エクソソームを through (0~5 min), elution (10~15 min) において分取した。

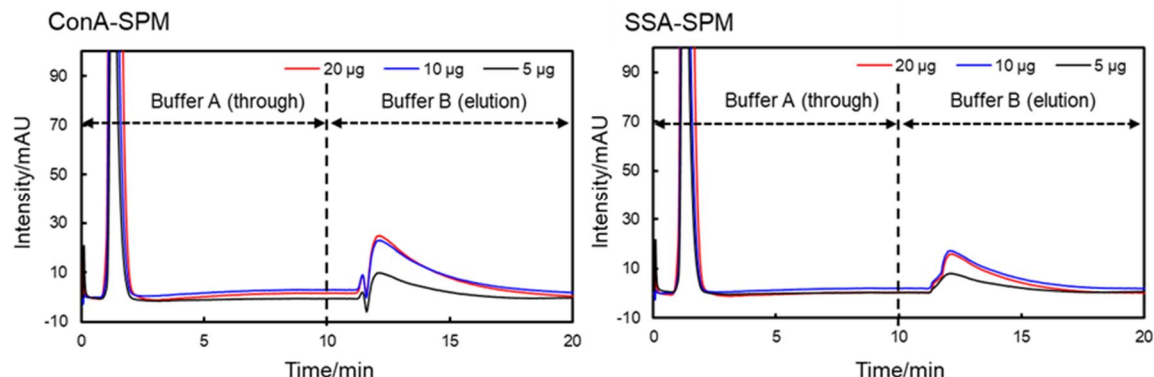


図 2. LAC によるエクソソームのクロマトグラム。

プロテオーム解析

エクソソーム中のタンパク質を同定し、それぞれの試料中で得られたタンパク質の種類数を図 3 に示す。図から分かるように、通過前のエクソソームと through において多くのタンパク質

が一致していた。また elution ではそのうちの一部のタンパク質が同定された。また, ConA では 9 種類, SSA では 17 種類のタンパク質がそれぞれ elution でのみ同定された。

さらに, SSA elution, ConA elution で同定されたタンパク質に対して volcano plot を作成した。その結果, 多くのタンパク質において有意な差が確認された。これは, ConA-SPM と SSA-SPM が異なるタンパク質プロファイルをもつエクソソームを保持, 溶出しているためであると考えられる。このことから, 表面糖鎖構造によって, エクソソームの構成タンパク質群が異なることが示唆された。また, エクソソームのマーカータンパク質で膜貫通タンパク質である CD9, CD81 の相対量を比較した。通液前のエクソソームに比べ, SSA elution, ConA elution において CD81 に対する CD9 の相対量が増加していた。これは, CD9 のみが糖鎖修飾を受けることに起因すると考えられる。この結果から, 糖鎖に基づいた選択的分離がなされたことが示唆された。

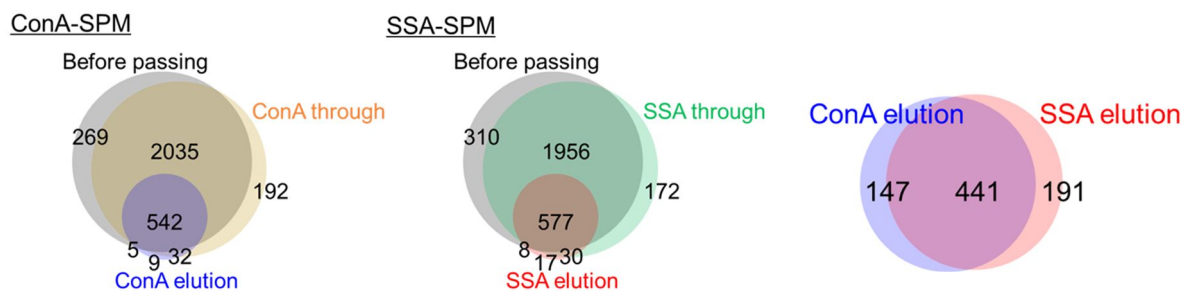


図 3 . 各フラクションで同定されたタンパク質数 .

(2) コロナウイルスの選択的分離

回収した溶出液を LC で分析し, ピーク面積を比較することで回収率を測定した。その結果を図 4 に示す。Spike protein, lactoferrin, amylase, lysozyme の回収率はそれぞれ 9.1, 78.4, 88.5, 93.6% であり, spike protein の回収率のみが明確に低いことが確認された。すなわち, 今回作製した AS-SPM は spike protein 選択性を持つことが確認された。

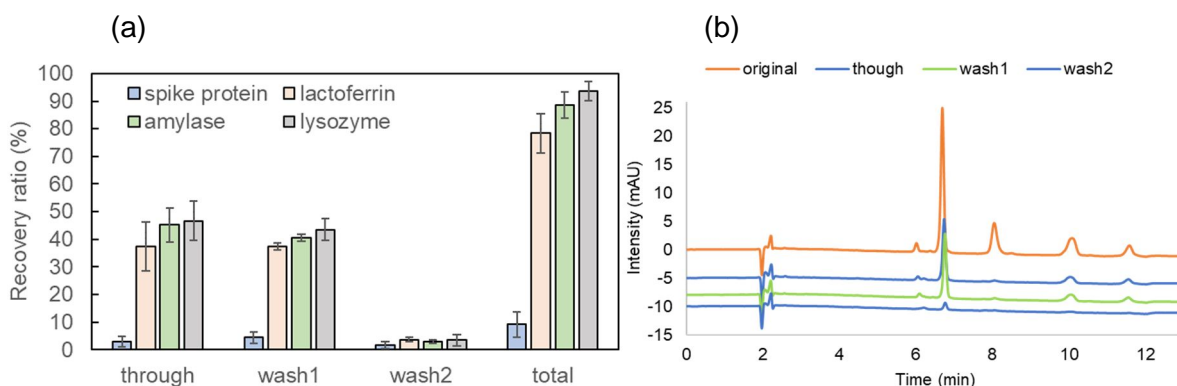


図 4 . AS-SPM 通液後の各タンパク質 (a) 回収率及び (b) クロマトグラム (n = 3).

次に, AS-SPM, BSA-SPM に対して 0, 102, 104 PFU/15 μ L のウイルス溶液 (15 μ L) をそれぞれ通液し通過試料とし, 溶媒である 0.05% w/v tween 20 PBS (30 μ L) で洗浄し洗浄試料とした。その後ウイルス溶解液として buffer AVL (140 μ L \times 2 回) を通液し, 溶出試料とした。各試料及び通液前濃度のウイルス溶液 (未処理) に対して quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) を行い, ウイルスの RNA コピー数を定量し回収率を算出した。

各溶出液の RNA コピー数を図 5 に示す。AS-SPM において, 通液前 (未処理) の RNA コピー数と比べて通過及び洗浄試料での RNA コピー数が小さく, SARS-CoV-2 の吸着が確認された。また, 溶出での RNA コピー数が未処理と類似しており, SPM に吸着していた SARS-CoV-2 が溶解し RNA を回収できたことが確認された。対して BSA-SPM では, 溶出での RNA コピー数が未処理と比較して明らかに小さく, SARS-CoV-2 の吸着量が小さいことが示唆された。BSA-SPM においても通過及び洗浄試料での RNA コピー数が小さいが, これは溶液を SPM から押し出す際に全量を出し切ることが難しくロスが生じている可能性などが原因として考えられる。さらに, ウイルス選択性を評価するために, 同手法を用いて, ロタウイルスに対する選択性を評価した。その結果, 同じく図 5 に示すように, ロタウイルスでは選択的な吸着は見られず。溶出, 洗浄分画にほぼ全量が溶出した。

以上のことから、SPM を基材とした AS-SPM は、SARS-CoV-2 を選択的に吸着することが示されたことから、今後、実試料の濃縮基材としての応用研究進展が期待できる。

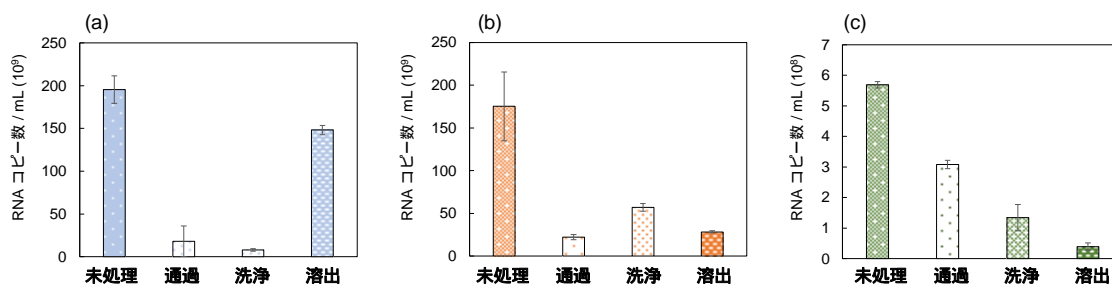


図5. AS カートリッジを用いたウイルスの分離 .

(a) AS カートリッジを用いた SARS-CoV-2 処理前後の RNA コピー数, (b) BSA カートリッジを用いた SARS-CoV-2 処理前後の RNA コピー数, (c) AS カートリッジを用いたロタウイルス処理前後の RNA コピー数.

以上の結果から、親水性ポリマーである PVP でレクチン固定化 SPM の疎水性表面をブロッキングしたカラムを汎用の HPLC システムに導入し、エクソソームに対する LAC 測定を行った。その結果、エクソソームの一部がそれぞれのカラムに選択的に保持され、移動相への hapten 糖の添加によって、保持されたエクソソームを回収することに成功した。さらに、回収したエクソソームについて、LC-MS/MS によるプロテオーム解析を行ったところ、それぞれのカラムから溶出したエクソソームの構成タンパク質群が大きく異なることが明らかとなった。これらの結果から、膜表面糖鎖種に基づくエクソソームのサブクラス分離に成功したことが示唆された。今後、同手法を用いることで、エクソソームの構造解析や機能解明が加速し、また、細胞培養液あるいは種々の生体試料中からの効率的なエクソソーム分離技術開発を促進することが期待できる。さらに、本法はエクソソームにとどまらず、ウイルス等の生体関連ナノ粒子の分離に好適である。本材料は、通常の硬質の分離基材とは異なり、極めて柔軟性の高い材料であることから、ニーズに応じた形状、サイズの分離場を構築することが容易であり、今後、ユニバーサルデザイン性を利用した様々な応用研究並びに実用化が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 久保拓也*, 加藤誠也, 下田麻子, 石川良賀, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, 大塚浩二	4. 巻 62
2. 論文標題 エクソソームのサブクラス分離へ向けたレクチン固定化スポンジ基材の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分析化学	6. 最初と最後の頁 731-735
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/bunsekikagaku.69.731	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 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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Shuntaro WADA, Toyohiro NAITO, Takuya KUBO, Koji OTSUKA
2. 発表標題 Effective separation of exosomes based on surface species by spongy monolithic media
3. 学会等名 PacifiChem2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田 峻太郎, 金尾 英佑, 久保 拓也, 足立 淳, 石濱 泰, 秋吉 一成, 大塚 浩二
2. 発表標題 スポンジモノリスを用いたエクソソームの表面糖鎖構造に基づく選択的分離
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 和田 峻太郎, 久保 拓也, 秋吉 一成, 大塚 浩二
2. 発表標題 エクソソームの表面構造に基づく選択的分離手法の開発
3. 学会等名 第28回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Kubo, Seiya Kato, Toyohiro Naito, Kazunari Akiyoshi, Koji Otsuka
2. 発表標題 Selective separation of an extracellular vesicle, exosome by recognition of surface sugar chains using a spongy monolith
3. 学会等名 Pacifichem2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takuya Kubo, Tetsuya Tanigawa, Toyohiro Naito, Kazunari Akiyoshi, Koji Otsuka
2. 発表標題 Rapid and Effective Separation of Targeting Proteins/Glycoproteins using a Macroporous Sponge Monolith in Liquid Chromatography
3. 学会等名 Analyticon-2020, Virtual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久保拓也, 大塚浩二
2. 発表標題 多孔性高分子カラム(スポンジモノリス)を用いた細胞外小胞及びコロナウイルスの選択的分離
3. 学会等名 第33回クロマトグラフィー科学会議(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takuya Kubo
2. 発表標題 Innovative Separation Platform via Spongy Monoliths for Proteins, Antibodies, EVs, Viruses, and Cells
3. 学会等名 SLAS2023 International Conference and Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2023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	佐藤 雄介	東北大学・理学研究科・准教授	
	(Sato Yusuke)		
	(90583039)	(11301)	

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