

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640094

研究課題名(和文)ヘテロなエクソソーム集団を読み取る吸着界面の創製

研究課題名(英文)Adsorption behaviors of exosomes on surfaces of various properties

研究代表者

松村 幸子 (Matsumura, Sachiko)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・特任研究員

研究者番号：90414052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞はエクソソームと呼ばれるベシクル(粒子)を放出し、細胞間でコミュニケーションしている。エクソソームは血液や尿などの体液に含まれており、がんなどの疾患の診断や治療に利用できる可能性がある。しかし、その精製方法や分析方法はまだ確立されていない。本研究では基板表面へのエクソソームの吸着の様子を調べ、基板の種類やエクソソームの種類によって吸着の仕方が異なることを明らかにした。これにより、基板吸着を利用してエクソソームの性質を見分けられる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles including exosomes are recognized as novel intercellular communication vehicles, and it has been revealed that they play significant roles in various diseases processes. Therefore, they are appreciated as a potential biomarker or target for the diagnosis and therapy. However, the purification and characterization of exosomes is still insufficient. In this study, adsorption behaviors of exosomes were examined on surfaces of various properties using atomic force microscopy. Adsorption behaviors of exosomes were different depending on the surfaces properties and cell lines, indicating that the difference in adsorption on the surfaces can be available for characterization of exosomes.

研究分野：生体関連化学、ナノバイオ

キーワード：エクソソーム 癌 ナノ粒子 走査プローブ顕微鏡 表面科学 細胞外ベシクル

1. 研究開始当初の背景

細胞は、細胞外ベシクルと呼ばれる脂質二分子膜からなるベシクルを放出し、細胞間でコミュニケーションしていることが明らかになってきた。細胞外ベシクルは、想定される生成機構によってマイクロベシクルとエクソソームに大きく二分され、エクソソームは粒径 40-100 nm のベシクルである。エクソソームは、分泌した親細胞に由来する核酸や脂質、タンパク質をもっており、あらゆる体液に含まれている。エクソソームは体液によって近くの細胞だけでなく遠くの細胞にも運ばれ、エクソソームがもつ miRNA などの情報は、別の細胞に取り込まれたあと、その細胞内で機能発現することで細胞の性質を変えてしまうことが報告されている。このようなエクソソームによる細胞間情報伝達は、がんの進展や転移だけでなく、他の疾患にも関与していることが続々と明らかになっている。そこで、体液中のエクソソームを利用した診断(リキッドバイオプシー)や治療に期待が高まっている。しかし、エクソソームはあらゆる細胞から放出され、一つの細胞株が放出するものでも均一ではない。その精製法は発展途上であり、一般的に行われている超遠心を利用した精製では、様々なサイズの粒子や物質が含まれている。このような混合物が“エクソソーム”として研究に用いられているのが現状である。このヘテロな集団の中身を理解し、性質の違いによって分けることができれば、診断や治療に向け、より詳細な情報の抽出や応用展開が可能になると期待される。またデバイスを開発する上では、使用する材料表面とエクソソームの相互作用を理解することも重要である。

2. 研究の目的

材料表面へのエクソソームの吸着挙動を調べ、エクソソームの性質を簡便に見分けるために、基板表面へのベシクルの吸着挙動の違いを利用できるか調べる。

3. 研究の方法

エクソソームを二次元に展開して吸着させるため、性質の異なる種々の基板表面を作製した。汎用性の高いガラス基板をもとに、シランカップリング剤による表面処理を行った。基板表面が正電荷あるいは負電荷となることを期待し、末端の官能基がアミノ基あるいはカルボキシル基のものを作製した。またガラスと性質の似た親水性基板としてマイカ(雲母)と、疎水性基板としてグラファイト(HOPG)も用いた。水の接触角を測定し、それぞれの基板表面の疎水性度を見積った。

エクソソームは、がん細胞株の培養上清から回収し、遠心およびフィルター操作後、超遠心によって粗精製し、さらに平衡密度勾配

遠心によって精製した。各精製画分に含まれる粒子の数やサイズをナノ粒子トラッキング法で調べた。またウェスタンブロットによってエクソソームマーカータンパク質の発現を調べ、エクソソームが濃縮されている画分を選定した。

エクソソーム画分の溶液を作製した基板に滴下し、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて吸着物を溶液中で観察した。吸着した個々のベシクルの数やサイズ、また形状を調べた。次に、抗体を用いて表面分子を金ナノ粒子でラベルし、大気中でAFM観察した。さらに異なるがん細胞株からエクソソームを回収し、作製した基板を用いて細胞株によるエクソソームの吸着の違いを比較した。

4. 研究成果

エクソソームマーカーのタンパク質が高発現している精製画分では、エクソソームに相当するサイズのベシクルが基板に吸着していた(図1)。それぞれの基板における吸着数を比較すると、正電荷をもつ基板で吸着数が多く、負電荷の基板では吸着量が減少した。また疎水的な基板では吸着が抑制される傾向がみられた。親水性基板では、マイカ上では一部のベシクルが平坦につぶれて広がって吸着していたが、親水化ガラス上ではベシクルの吸着そのものが抑制されるという興味深い結果が得られた。接触角では両基板に違いはみられないものの、ナノレベルでの

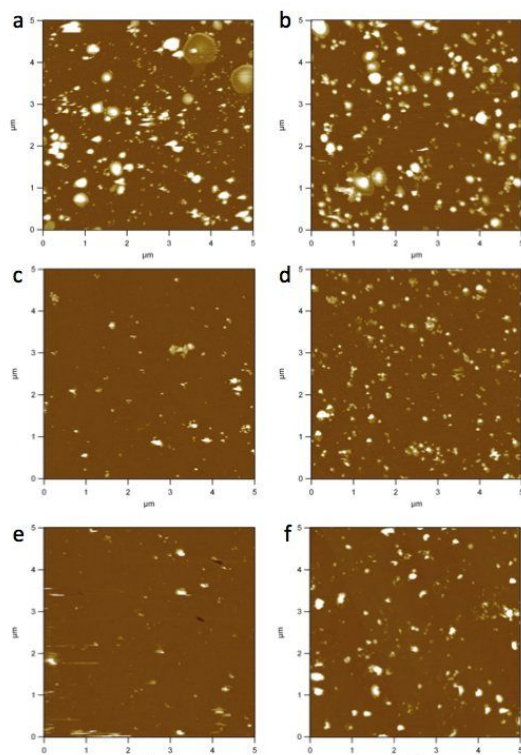


図1. 種々の基板に吸着したエクソソームの液中AFMイメージ。マイカ(a)、正電荷マイカ(b)、負電荷ガラス(c)、正電荷ガラス(d)、親水化ガラス(e)、HOPG (f)。

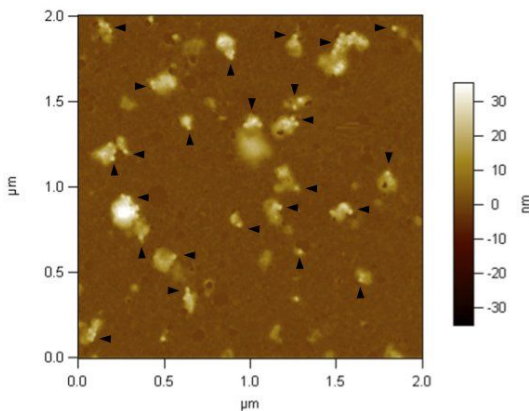


図2 . エクソソームマーカータンパク質の抗体を用いて金ナノ粒子ラベルしたエクソソームの大気中 AFM イメージ。金ナノ粒子を矢頭で示す。ほとんどの吸着物に金ナノ粒子が結合しており、エクソソームであることを示している。

表面ラフネスの違いや、水酸基の数などが影響していると推察される。このように基板の性質によって、吸着しやすさが異なり、また吸着時の形状にも違いがあることがわかった。

つぎに基板に吸着した物質を、エクソソームマーカータンパク質の抗体を用いて金ナノ粒子でラベルし、大気中 AFM で観察した(図 2)。ほとんどの吸着物に金ナノ粒子が結合しており、エクソソームであることが示された。同様に、他の分子に対する抗体でもラベル化が可能であり、基板上に吸着した分子を同定することが可能になった。

異なる細胞株から回収したエクソソームを用いて、基板への吸着挙動の違いを比較した。3つの細胞株に由来するエクソソームを比較したところ、基板に吸着したときにベシクルが著しく変形する細胞株があることがわかった(図 3)。この細胞株のエクソソームは、他のエクソソームがあまり吸着しない基板に対して、ベシクルとは異なる形状のものが多く吸着することも確認された。

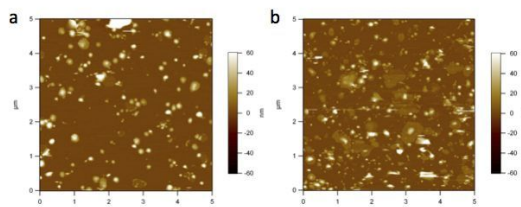


図 3 . 異なる細胞株に由来するエクソソームの液中 AFM イメージ。(a) HT1080 (CD63-mcherry)細胞株、(b) H1650 (CD63-EGFP)細胞株。(b)では吸着したベシクルの多くが、脂質二分子膜状に展開している。

このように、基板表面の性質によってエクソソームの吸着数や形状に違いがみられ、また由来する細胞株によってその吸着に違いがあることがわかった。基板への吸着にはベシクルの表面性状や固さなどが反映していると考えられ、また本来のベシクルの性質だけでなく、夾雑物あるいは劣化状態などが反映されている可能性もある。溶液中のサイズ測定ではわからない情報が基板吸着によって得られることが示され、“エクソソーム”の性質や状態を基板吸着から推測できる可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

松村 幸子、南澤 宝美后、菅 加奈子、芝 清隆、AFM characterization of adsorption of exosomes derived from cancer cell lines onto various material surfaces、第 1 回日本細胞外小胞学会、2014 年 8 月 29 日、グランドプリンスホテル広島 (広島県広島市)

松村 幸子、南澤 宝美后、菅 加奈子、芝 清隆、細胞外ベシクル (エクソソーム) のグラフアイト、マイカ基板等への吸着と AFM による評価、第 1 回ナノカーボンバイオシンポジウム、2014 年 9 月 2 日、名古屋大学東山キャンパス (愛知県名古屋市)

松村 幸子、芝 清隆、Characterization of exosomes purified from cancer cell lines: On their adsorption properties、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

南澤 宝美后、松村 幸子、芝 清隆、密度分画法によるエクソソームと miRNA の差分化とその多様性、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Shiba K, Minamisawa T, Suga K, Hibino K, Yamamoto S, Yoshida M, Matsumura S、Capturing extracellular vesicles on solid surfaces、ISEV2015、2015 年 4 月 23 日、Washington DC, USA

山本 恵史、南澤 宝美后、松村 幸子、芝 清隆、密度勾配遠心法と AFM を用いたヒト唾液中エクソソームの性質解析、第 7 回日本 RNAi 研究会 第 2 回日本細胞外小胞学会、2015 年 8 月 26 日、グランドプリンスホテル広島 (広島県広島市)

山本 恵史、岩井 千弥、吉田 光孝、南澤 宝美后、松村 幸子、芝 清隆、矢島 安朝、ヒ

ト唾液由来エクソソームと細胞株由来エクソソームの比較、第 19 回日本顎顔面インプラント学会 総会・学術大会、2015 年 11 月 28 日、ホテルメルキュール横須賀(神奈川県横須賀市)

Hibino K, Yamamoto S, Minamisawa T, Suga K, Yoshida M, Matsumura S, Shiba K、Sub-classification of exosomes based on their surface markers by the programmed bio-surface、第 25 回日本 MRS 年次大会、2015 年 12 月 9 日、横浜市開港記念会館(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

がん研究会がん研究所蛋白創製研究部ホームページ

<http://molcraft.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松村 幸子 (MATSUMURA, Sachiko)

がん研究会・がん研究所・特任研究員

研究者番号：90414052