

表面構造に基づくエクソソームのサブクラス分離技術を開発

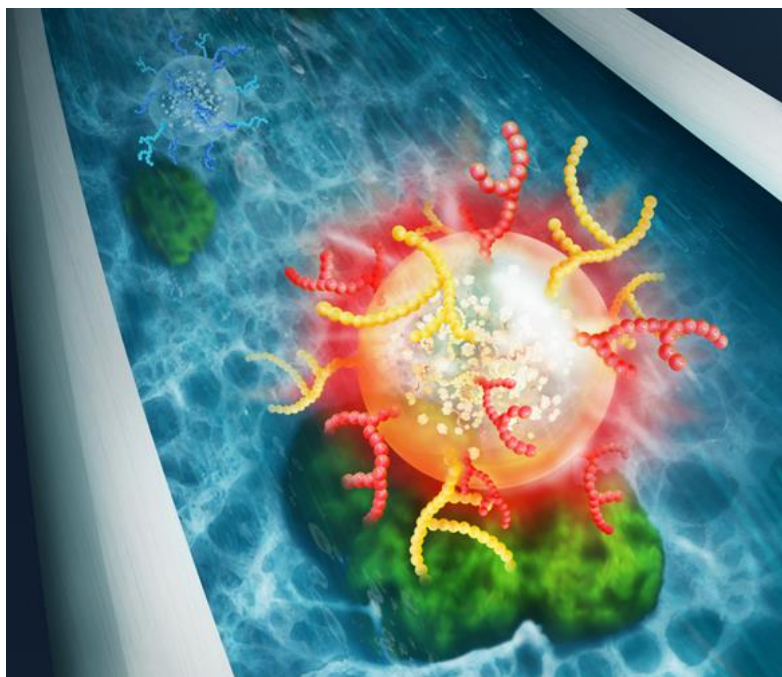
—糖鎖が示すエクソソームの多様性を解明—

概要

エクソソームはあらゆる細胞から放出される直径 50-150 nm の微粒子であり、細胞同士が情報伝達するための“手紙”として機能しています。この手紙には、産生細胞の情報（RNA やタンパク質）が内包されており、これらを読み解くことで疾患の早期診断や治療に繋がると期待されています。一方、現行の回収法では、内容物が異なるエクソソームを分類することなく回収するため、個々のエクソソームが持つ真の生物学的意義は未だ明らかになっていません。

京都大学大学院薬学研究科と医薬基盤・健康・栄養研究所（NIBIOHN（ニビオン））の連携講座・実践創薬研究プロジェクトに所属する金尾 英佑助教、石濱 泰教授、足立 淳連携教授らの研究グループ、同大学大学院工学研究科の久保 拓也准教授、大塚 浩二教授、和田 俊太郎（研究当時：修士課程学生）らの研究グループ、秋吉 一成教授らの研究グループは、エクソソームの表面に結合している糖鎖^[註 1]を認識してエクソソームを分類することができるスポンジ状高分子分離媒体を開発し、同じ細胞に由来するエクソソームでもその表面糖鎖によって働きが異なることを明らかにしました。従来のエクソソーム研究においては、エクソソームをその特性や機能で分類することが困難であり、本発明はこのボトルネックを解消する普遍的な手法になることが期待されます。

本研究成果は、2022 年 12 月 13 日に米国の国際学術誌「*Analytical Chemistry*」にオンライン掲載され、カバーピクチャー（学術誌の表紙絵）に採択されました（下図）。



1. 背景

エクソソームは、細胞から放出される直径 50-150 nm (ナノメートル：10 億分の 1 メートル) の微粒子であり、細胞間のコミュニケーションを支える“手紙”のような役割を果たしています。この手紙には、エクソソームを放出する細胞 (以下「産生細胞」といいます。) に由来する様々な生体分子が内包されており、血中や尿、体液を介して体中を駆け巡ることで目的の細胞に情報を伝えています。そのため、個々の細胞が放出するエクソソームの特徴や機能を掴むことができれば、疾病の高感度なバイオマーカー^[注 2]や新しい治療法への応用が可能になります。一方で、現行の回収法は超遠心法^[注 3]を始めとするサイズに基づいた手法が主流であり、回収されるエクソソームはその機能や特性に応じて分類された形ではなく、異なる形状や異なる種類の産生細胞から放出されたエクソソームが混在した不均一な状態になってしまいます。この不均一性がエクソソームの本当の特性や機能を知る上での大きな妨げとなっており、これをいかにして分類するか (サブクラス化) が、エクソソームの真の生物学的機能を明らかにする上で重要です。

エクソソームは脂質膜表面に存在する分子が手紙の“宛先”の役割を果たしており、表面分子によるサブクラス化は有効な手段のひとつとされています。そこで本研究では、これまであまり注目されてこなかった表面糖鎖に着目し、エクソソームを糖鎖によって分類する新規分離手法を開発しました。

2. 研究手法・成果

糖鎖の分離手法として、糖鎖認識タンパク質 (本研究ではレクチン) を固定相に用いた LAC (レクチンアフィニティクロマトグラフィー)^[注 4]という手法が知られていますが、従来の LAC 用分離基材は細孔が小さく、エクソソームのような微粒子はその細孔よりも大きいので、目詰まりし、透過することができません。今回、私たちは 10-100 μm という従来の基材よりも大きな貫通孔によって高通水性を実現したスポンジ様高分子分離基材 (以下「スポンジモノリス」といいます。) を独自に開発し、LAC 用分離基材とすることで、この課題を解決しました。このスポンジモノリスは、大きな貫通孔によってエクソソームの目詰まりを防ぐだけでなく、スポンジモノリスの原料となる化学物質『poly(ethylene-co-glycidylmethacrylate)』の表面のエポキシ基を介して任意の生体リガンド (本研究ではレクチン) を固定化することができる点も特徴となっています (図 1)。

本研究では、二つのレクチン、具体的には、シアル酸認識能を有するニホンニワトコレクチン (*Sambucus sieboldiana* lectin ; SSA) とマンノース認識能を有するコンカナバリン A (Concanavalin A ; ConA) をモデルに、それぞれのレクチンを固定化したスポンジモノリスを作製し、培養細胞 (HEK293 細胞) から超遠心法で回収したエクソソームのサブクラス分離を試みました。その結果、各レクチンに対応する特定の表面糖鎖を持つエクソソームを、形状を損なうことなく“無傷”の状態での回収することに成功しました。さらに、プロテオーム解析によって SSA で回収したエクソソームと ConA で回収したエクソソームで構成タンパク質やその機能が大きく異なることを見出しました。これらの結果は、同じ細胞から回収したエクソソームであっても、その表層糖鎖によって役割が異なることを実証するものであり、スポンジモノリスはエクソソームを表面分子の種類によって分類する上での有効な選択肢であることを明らかにしました。

3. 波及効果、今後の予定

本手法は糖鎖以外にもあらゆる表面分子に適用可能であり、エクソソーム研究のボトルネックとなる不均一性の解消と、真の生物学的意義の解明を果たす上で重要な意義を持ちます。また、特異的な機能を持つエクソソームを選択的に濃縮するデバイスとしても期待できるため、エクソソームをバイオマーカーに利用した診断の精度・感度

向上にも繋がります。

4. 研究プロジェクトについて

本研究は科学技術振興機構（JST）戦略的創造研究推進事業 CREST（課題番号：JPMJCR17H2）、同さきがけ（課題番号：JPMJPR18H2）、日本学術振興会科学研究費補助金（課題番号：JP21K14652, JP20K20567）、NIBIHON R2～R3 年度若手研究員による新規研究の助成を受けて行われました。

<用語解説>

注1 糖鎖：“糖”が“鎖”のように連なった物質を指し、細胞やエクソソーム表面の脂質、あるいはタンパク質等に結合している。細胞の種類や状態によってその構造が大きく異なり、細胞間認識や免疫応答などのあらゆる生命現象、がんを始めとする多くの疾病と密接に関与している。

注2 バイオマーカー：特定の疾患の有無や、その進行状態を示す目安となる生理学的指標のこと。

注3 超遠心法：遠心力によって比重の異なる物質を回収する手法。エクソソームは、生体試料（尿、血液、唾液、培養上清）中に存在するタンパク質や他の細胞外小胞とはサイズが異なるため、超遠心法を用いて精製されることが多い。

注4 LAC（レクチン・アフィニティ・クロマトグラフィー）：レクチン（酵素や抗体以外のタンパク質で、糖鎖と結合する能力を有するもの）を不溶性の基材に固定化した、吸着体のカラムを用いて行う分離精製手法。レクチンはその種類によって認識する糖鎖が異なるため、固定化したレクチンの特異性に基づいて特定の糖鎖構造を持つ分子や物質を回収することができる。

<研究者のコメント>

本研究は、薬学研究科・工学研究科・医薬健康研の学際的な連携があってようやく達成できた成果です。今後は、本技術を基軸にエクソソームの真の機能解明に迫るとともに、エクソソームを利用した病態診断、治療、薬物送達など様々な技術へと展開して行く予定です。（金尾）

<論文タイトルと著者>

タイトル： Classification of Extracellular Vesicles Based on Surface Glycan Structures by Spongy-like Separation Media（スポンジ状分離媒体を用いた表面糖鎖構造に基づく細胞外小胞の分類）

著者： 金尾 英佑, 和田 俊太郎, 西田 紘士, 久保 拓也, 谷川 哲也, 今見 考志, 下田 麻子, 梅崎 香織, 佐々木 善治, 秋吉 一成, 足立 淳, 大塚 浩二, 石濱 泰

掲載誌： *Analytical Chemistry* DOI : <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.2c04391>

<イメージ図>

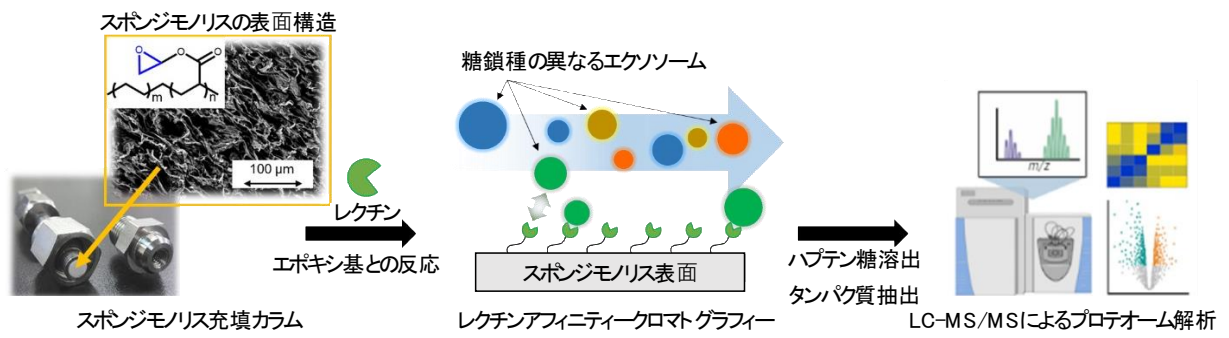


図1 研究の概要.