

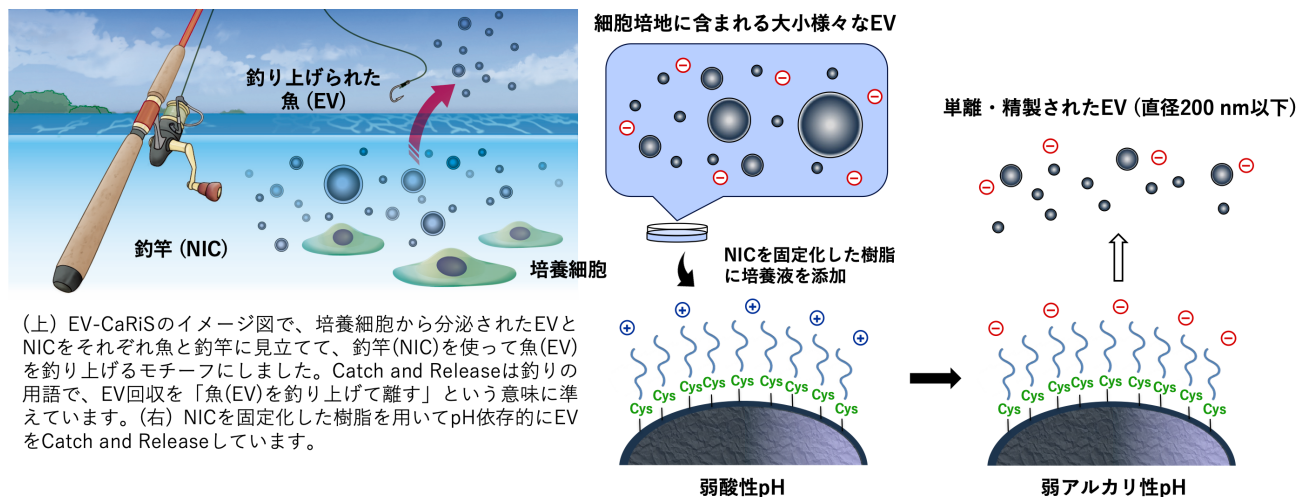
# 高価な装置を必要としない細胞外小胞のキャッチ&リリース単離法の開発

## —pH 応答性電荷反転型曲率認識ペプチドの利用—

### 概要

京都大学大学院薬学研究科の河野健一 助教(責任著者)、松崎勝巳 同教授、葛馬佑樹 修士課程学生(研究当時)、細川健太 修士課程学生、吉尾航一 学部生、大杉悠斗 学部生らの研究グループと、京都大学高等研究院物質-細胞統合システム拠点(iCeMS)の藤原敬宏 特定准教授、および東京大学大学院理学系研究科の横山文秋 特別研究員は、pH 制御による細胞外小胞 (EV) の新規単離法: Extracellular Vesicle Catch and Release isolation System (EV-CaRiS)を開発しました。

EV は細胞から分泌される負電荷を帯びた直径 50–200 nm 未満の高度な曲率を有する脂質微粒子であり、重要な遺伝子やタンパク質を内包しているため、生物学および医学的研究において重要な標的となっています。EV-CaRiS は、溶液の pH に応じて電荷が反転する曲率認識ペプチド (Net-charge Invertible Curvature-sensing peptide: NIC)を用いた EV 単離法で、弱酸性 pH ではペプチドが正電荷を帯びて EV を捕捉し、弱アルカリ性 pH では負電荷に電荷反転することで EV がペプチドから解離し、夾雑物が共存する培地から EV を単離します。3 種類のヒト細胞株から EV 単離に成功し、既存手法の超遠心分離法と比べても 1/3 以下の時間で 3 倍高い EV 収量が得られました。単離した EV は元来有する免疫活性や抗がん活性を示すことが確認され、新規 EV 単離法の有用性を実証できました。この成果から EV の捕捉基板を用いたイメージング技術や内包物の解析技術に応用することが期待されます。本研究成果は、米国の国際学術誌「*Analytical Chemistry*」に掲載されるに先立ち、オンライン版 (日本時間: 2024 年 2 月 26 日付、00:00) に掲載されました (下図)。



## 1. 背景

細胞外小胞 (EV) は、様々な細胞から分泌される負に帯電した直径 50–200 nm の脂質ナノ粒子であり (ナノメートル: 10 億分の 1 メートル)、細胞間コミュニケーションで重要な役割を果たしています。EV に内包されているタンパク質やシグナル分子、核酸などが、生物学分野のみならず医学分野でも重要な研究対象として注目されており、病気の診断やワクチン開発への応用などバイオテクノロジー面で幅広く活用されています。しかしながら、EV 単離方法には依然として改善の余地があります。既存手法では、超遠心分離法<sup>[注 1]</sup>や免疫沈降法<sup>[注 2]</sup>などが汎用されてきましたが、前者は作業に長時間を要するだけでなく、過度な重力負荷による EV の凝集や形状変化を引き起こす可能性があります。また後者は、抗体を用いて EV 表面の抗原を高感度で検出できる反面、抗原欠損体の EV 単離には向かないデメリットがあります。そこで、本研究では新たに創製した電荷反転型曲率認識ペプチドを用いた、pH 制御による EV 新規単離法: Extracellular Vesicle Catch-and-Release Isolation System (EV-CaRiS)を開発し、単離した EV の機能性評価を行うことで、その有用性を示しました。

EV は直径が 50–200 nm と極めて小さいために、EV を構成する膜が高度に湾曲しています。EV に共通して見られる湾曲した膜 (曲率膜) を認識するのが両親媒性<sup>[注 3]</sup>の曲率認識ペプチド<sup>[注 4]</sup>であり、EV 表面の抗原の有無に関わらず短時間で EV に結合する性質があります。EV の結合・解離を人為的に制御するため、pH に応じて正味の電荷<sup>[注 5]</sup>が変化する曲率認識ペプチド (Net-charge Invertible Curvature-sensing peptide: NIC) を開発しました。具体的には、弱酸性 pH では NIC が正電荷を帯びて静電的相互作用により負電荷を帯びている EV 膜に近接しやすくなり、脂質膜上の間隙に結合することで EV を捕捉します。一方、弱アルカリ性 pH では NIC が負電荷に電荷反転することで EV 膜との静電的反発により EV が NIC から解離します。NIC を直径 100  $\mu\text{m}$  の比較的大きなアガロース樹脂 (マイクロメートル: 100 万分の 1 メートル) に固定することで、弱アルカリ性 pH で EV は樹脂上の NIC に捕捉 (キャッチ) され、細胞の培地に含まれる雑多な夾雑物は洗い落とされます。その後、弱アルカリ性 pH の緩衝液に置換することで EV が樹脂上の NIC から解離 (リリース) しますので、EV を含む上清を回収して EV の単離精製が完了する仕組みです。先行研究で EV を基板上に捕捉する技術はありましたが、捕捉後に EV を無傷の状態 で解離させる技術は十分に開発が行われていませんでした。本研究では、EV の Catch and Release を簡便に行えるところに既存手法との差異があります。

## 2. 研究手法・成果

### (研究手法について)

ペプチドは Rink アミド樹脂を用いて Fmoc 固相合成法によって合成しました。伸長反応後に樹脂から切り出し、逆相液体クロマトグラフィーおよびエレクトロスプレーイオン化法でペプチドの純度確認と質量分析を行いました。ペプチドを固定化したアガロース樹脂を用いて細胞培養液から EV を単離し、ナノ粒子追跡解析法で EV 粒子数濃度を、ELISA と WST-8 試験によりサイトカイン分泌誘導および抗がん活性を評価しました。

### (研究成果について)

まず、哺乳類細胞に由来する EV の一種であるエクソソームをモデルとした人工脂質膜小胞での評価系では、pH 6 条件下で人工脂質膜小胞の 80% を捕捉し、pH 10 (正味の pH: ~9) の条件に置き換えた際に、捕捉した小胞の内の 70% を解離していることが分かりました。小胞の膜破壊は見られず、直径 200 nm 以下の人工膜小胞を無傷の状態 で回収できることを明らかにしました。さらに、哺乳類細胞だけでなく微生物に由来する EV 膜を模倣した負電荷の人工脂質膜小胞や、電荷を持たない人工脂質膜小胞に対しても回収能力が認められました。これは、ペプチドが両親媒性構造を取る性質があるため、正と負の電氣的な相互作用は脂質膜小胞とペプチド

を引き寄せる誘引力として働くのに対して、疎水性相互作用はペプチドが小胞の脂質膜間隙に挿入することで結合状態を維持するため、脂質膜小胞の捕捉力として働くからです。

次に、3種類の細胞株（ヒトがん細胞株：HeLa, PANC-1, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞：MSC-R37）の培養液からのEV単離を試みました。その結果、既存手法で汎用されている超遠心分離法と比べて3倍高いEV収量が得られ、全ての操作に要する時間は合計1.5時間と従来の1/3程度で完了しました。単離した全種EVにおいてマクロファージに対するサイトカインのTNF $\alpha$ の分泌誘導が確認され、MSC-R37由来のEVはPANC-1細胞に対して抗がん活性を示しました。さらにEVバイオマーカーである4回膜貫通型の膜タンパク質・テトラスパニン(CD63 および CD81)抗体を用いたEVの免疫染色で1分子イメージングへの応用にも成功しました。この研究を通して、電荷反転型曲率認識ペプチドを基盤とする新規EV単離法の有用性と単離したEVが機能活性を有することを実証できました。

### 3. 波及効果、今後の予定

本手法は、精製カラムによるEVのハイスループット単離システムの構築や、マイクロウェルアレイチップを用いたEVの蛍光イメージング技術と内包物のハイスループット解析への応用が期待されます。また、哺乳類細胞由来のEVのみならず、微生物由来のEVやウイルス粒子の解析に向けた研究展開も視野に入れていきます。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業・若手研究（代表 河野健一）（課題番号：21K15254）、および一般財団法人 伊藤忠兵衛基金（代表 河野健一）（課題番号：なし）に関する研究の一環として、助成を受けて実施されました。

#### <用語解説>

[注1] 超遠心分離法：強力な遠心力によって溶液中に浮遊している分子を沈降させる手法です。分子の大きさや性質によって沈降係数が異なるので、段階的に遠心力を変えながら目的物を単離精製します。また、分子の沈降挙動を解析することで溶質の形状や分子量、分散・会合状態などの情報を明らかにすることもできます。

[注2] 免疫沈降法：抗原と抗体の親和性を利用して、溶液中から抗原を特異的に分離する方法です。磁性粒子やアガロース樹脂などの支持体に抗体を固定化することが多いです。

[注3] 両親媒性：水になじむ親水性と油になじむ疎水性(親油性)の双方を兼ね備えた性質を両親媒性と呼びます(図1)。親水性と疎水性のアミノ酸が規則正しく並んだ配列をもつペプチドは、脂質膜などに結合した際に、親水性アミノ酸に富む新水面と疎水性アミノ酸に富む疎水面を形成しながら螺旋状に巻いた構造を取ります。脂質膜の表層は水と油の中間相に相当するため、両親媒性構造を形成するペプチドは集積しやすい傾向にあります。

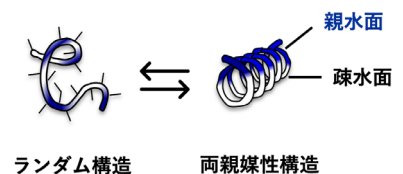


図1 両親媒性構造を取るペプチドのイメージ図

[注4] 曲率認識ペプチド：湾曲した膜は、膜の構成成分である脂質分子間に間隙構造(脂質パッキング欠損部位)を有しており、粒径が小さいほど膜の脂質パッキング欠損部位の数は増大します(図2)。曲率認識ペプチドは脂質パッキング欠損部位に結合する性質があるので、平面膜よりも高曲率膜のEVに強く結合します。右図では、曲率認識ペプチドが脂質パッキング欠損部位に結合する際に、ランダム構造から螺旋状の構造を形成

して脂質の隙間構造にはまり込みます。Nitrobenzoxadiazole (NBD)は脂質膜などの疎水性環境下で蛍光を強く発する性質がある蛍光色素で、蛍光強度の変化からペプチドがEVなどの膜小胞に結合する指標として用いています。

[注5] 正味の電荷：ペプチドを構成するアミノ酸はそれぞれ異なる構造の側鎖を有しているため、等電点が異なります。正味の電荷は、あるpHにおける各アミノ酸の電荷量の総和を指しており、ペプチド全体で見た時の正電荷もしくは負電荷の代数和を議論するとき用います。

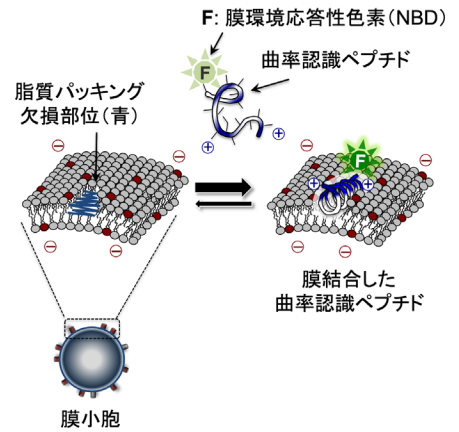


図2 曲率認識ペプチドの膜小胞結合のイメージ図

### <研究者のコメント>

本研究を遂行するにあたり、多くの方にご協力いただきました。この場を借りて深く感謝申し上げます。研究のコンセプトは、今までに無かった汎用性と簡便性を兼ね備えたEV新規単離法の開発でした。様々な研究グループの努力によってEV単離法は日々進化しています。しかし、使用機器の経済コストや複雑性から手法の汎用性と簡便性を両立することが課題でした。本手法は、超遠心機などのような特殊な実験機器がなくても、一般の研究室が入手可能な試薬や材料だけで誰がいつでも簡便にEVの単離精製を行えることが最大のポイントです。今後も本技術を活かしてEVの機能解明や応用に向けて研究を展開していきたいと思えます。(河野)

### <論文タイトルと著者>

タイトル：Extracellular-vesicle catch-and-release isolation system using a net-charge invertible curvature-sensing peptide (電荷反転型曲率感知ペプチドを用いた細胞外小胞単離システム)

著者：河野 健一、葛馬 佑樹、吉尾 航一、細川 健太、大杉 悠斗、藤原 敬宏、横山 文秋、松崎 勝巳

掲載誌：Analytical Chemistry DOI：10.1021/acs.analchem.3c03756