

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「細胞外微粒子」  
研究課題「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・制御のための基盤研究」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2023年 3月

研究代表者：秋吉 一成  
(京都大学大学院工学研究科、教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1) 実施概要

細胞糖鎖は、発生、免疫、感染、がん化などの様々な生体応答に関わっており、エクソソーム糖鎖も生命現象に重要な役割を果たしていることが考えられる。本研究では、これまで未解明なエクソソーム糖鎖の構造多様性と機能に関するバイオサイエンスを進展させ、糖鎖を基軸とした分離、計測、解析技術の開発、エクソソームの誕生からその組織、細胞内輸送における役割と機能、さらに医療応用に向けた研究を推進した。具体的には、1) エクソソームの多様性を表す指標としてのエクソソーム表層糖鎖に着目した糖鎖プロファイリング技術の確立、2) 糖鎖基盤分離システムの開発、3) エクソソーム糖鎖を介したシグナル伝達・生理機能の分子メカニズム解析、さらに、4) エクソソーム糖鎖機能操作のための基盤技術開発研究を目的とした。

新規糖鎖プロファイリング技術として、エバネッセント波蛍光励起検出法によるレクチンマイクロアレイを用い、高感度なエクソソーム表層の糖鎖構造解析技術を確立した。様々な細胞系、分化過程、分離手法により生成したエクソソームの表層糖鎖のプロファイルのレクチンアレイ解析を行い、細胞外小胞の多様性、不均一性の新規指標として、表層糖鎖のパターン(糖鎖プロファイル)が有用であることを世界に先駆けて明らかにした(京大秋吉 G)。

開発したレクチンマイクロアレイ法を用いて、間葉系幹細胞や iPS 細胞由来エクソソームの糖鎖解析により新規な分化マーカーレクチンを見出した(京大秋吉 G、産総研館野 G)。アルツハイマー病患者血清由来エクソソームの糖鎖解析から新規なマーカータンパク質が見出された(産総研館野 G)。さらに、血清由来細胞外小胞(EV)は、従来の膵がんマーカーである CA19-9 とは異なる病態の膵がんバイオマーカーとなり得ること、また、CD63 陽性 EV と CA19-9 と組み合わせることで、早期膵がんの診断にも活用できることを明らかにした(産総研館野 G)。

レクチンを利用したエクソソームの分離精製手法として、レクチン固定化多孔性高分子(スポンジモリス、SPM)を作成し、糖鎖認識を利用した新規分離精製手法を開発した(京大太塚 G、秋吉 G)。カラムで分離されたエクソソームのプロテオーム解析を行い、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り、膜表面糖鎖種に基づくエクソソームのサブクラス分離が可能であることが示唆された。また、限外濾過法(Ultrafiltration: UF)と陰イオン交換法(Ion-exchange: IE)を用いた機能的な高純度エクソソームの大量調製法(UFIE 法)を開発した(三重大瀬尾 G、京大秋吉 G)。動物種の違いや細胞の違いによらず、培養上清からエクソソームやマイクロベシクルを分離精製し得る汎用性のある新規な手法であることを明らかにした(三重大瀬尾 G)。

生体応答解析においては、糖鎖遺伝子を活用して世界初の糖脂質リモデリングエクソソームの調製に成功した(三重大古川 G)。特に GD3 ガングリオシド高発現エクソソームでは、テトラスパニンやインテグリン含量が増加し、GD3 がエクソソームへの物質のソーティングに関与していることを見出した(三重大古川 G、京大秋吉 G)。また、GD3 や GD2 高発現エクソソームは、がん細胞の悪性化や転移に関与する可能性が示唆された(中部大古川 G)。

エクソソームの機能操作に関しては、エクソソーム表層糖鎖を糖鎖切断酵素や糖鎖転移酵素を用いて、テーラーメイドにリモデリングし得ることを、レクチンマイクロアレイ法により明らかにした。さらに、エクソソームの細胞取り込みを表層糖鎖の違いにより、制御し得ることを明らかにした(京大秋吉 G)。

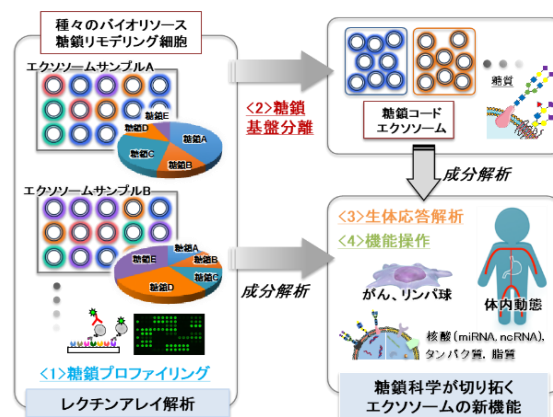


図1 本研究の概要

## 実施概要

### (2) 顕著な成果

#### < 優れた基礎研究としての成果 >

#### 1. エクソソーム表層糖鎖解析における新手法の開発と新規多様性指標の提案

概要: 新規エクソソーム表層糖鎖解析のためのエバネセント励起検出レクチンマイクロアイ法を開発し、エクソソーム集団の糖鎖プロファイリングパターンが、細胞外小胞の多様性、不均一性の新規指標として有用であることを世界に先駆けて明らかにした。

#### 2. 糖鎖遺伝子操作による糖脂質リモデリングエクソソームの構築と生物学的機能解明

概要: 糖鎖遺伝子操作により糖脂質リモデリングエクソソームの構築に成功した。特に転移性の高い GD3/GD2 高発現細胞から産生されるエクソソームは、インテグリンが顕著にソーティングされること、また、培養標的細胞へ添加することで、がん形質の増強や細胞シグナルの増強が認められ、エクソソーム中の糖脂質の生物学的機能を初めて明らかにした。

#### 3. エクソソーム表層糖鎖リモデリング手法の開発と糖鎖による細胞間相互作用の解明

概要: 糖加水分解酵素や糖転移酵素を活用して、エクソソームの表層糖鎖を改変する手法を確立した。様々な種類の糖鎖コードを有するエクソソームを用いることで、受け手側の細胞の種類とエクソソーム表層糖鎖の組み合わせによって相互作用は異なること、また臓器への集積量も違いが見られることを見出し、細胞間相互作用において糖鎖の重要性を明らかにした。

#### < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

#### 1. 糖鎖プロファイリングによる新規糖鎖マーカーの探索と疾患診断への応用

概要: ヒト iPS 細胞由来エクソソームには、ヒト iPS 細胞表面糖鎖マーカーが提示されることを見だし、エクソソーム表層糖鎖が再生医療に用いる細胞治療製品の品質管理に有効であることを明らかにした。また、アルツハイマー病やすい臓がん患者の血清由来エクソソームの糖鎖プロファイリングにより疾患の早期診断においてもエクソソームの表層糖鎖が有用であることを示した。

#### 2. 高純度エクソソームの大量調製法の開発

概要: 超遠心法を含む現行の調製法では、エクソソーム、マイクロベシクル、アポトーシス小体などの様々な細胞外小胞から、機能を有するエクソソームを高濃度で大量に調製することは難しく、医療応用に向けて解決すべき課題である。本研究で、限外濾過による細胞外小胞の濃縮と除タンパク後、イオン交換法を用いる方法により、培養上清から機能を有するエクソソームを大量にしかも高純度(99.97%以上)で分取できる初めての手法を開発した。

#### 3. 新規レクチン固定化エクソソーム分離手法の開発

概要: レクチンを利用した細胞外小胞の分離精製手法として、レクチン固定化多孔性高分子(スポンジモリス、SPM)を作成し、レクチンとの相互作用(糖鎖認識)を利用した新規分離精製手法を開発した。カラムで分離されたエクソソームのプロテオーム解析を行い、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り、膜表面糖鎖種に基づくエクソソームのサブクラス分離が可能であることを初めて明らかにした。

#### < 代表的な論文 >

1. Shimoda A, Miura R, Tateno H, Seo N, Shiku H, Sawada SI, Sasaki Y, Akiyoshi K. Assessment of Surface Glycan Diversity on Extracellular Vesicles by Lectin Microarray and Glycoengineering Strategies for Drug Delivery Applications. *Small Methods*. 2022 Feb;6(2):e2100785. IF: 14.188

概要: エバネセント波蛍光励起検出レクチンマイクロアレイを用いたエクソソーム表層の糖鎖構造解析技術を確立した。エクソソーム表層糖鎖のプロファイルパターンが、細胞外小胞の多

様性、不均一性の新規指標として有用であることを明らかにした。また、糖加水分解酵素や糖転移酵素を活用して、エクソソームの表層糖鎖を改変する手法を確立し、得られる様々な種類の糖鎖コードエクソソームにより、細胞への取り込みや臓器への集積量が制御し得ることを明らかにした。

2. Seo N, Nakamura J, Kaneda T, Tateno H, Shimoda A, Ichiki T, Furukawa K, Hirabayashi J, Akiyoshi K, Shiku H. Distinguishing functional exosomes and other extracellular vesicles as a nucleic acid cargo by the anion-exchange method. *J Extracell Vesicles*. 2022 Mar;11(3):e12205. IF: 21.224

概要：限外濾過法と陰イオン交換法を用いた細胞外小胞の大量調製法を開発し、動物種の違いや細胞の違いによらず、培養上清からエクソソームやマイクロベシクルを分離精製し得る汎用性の高い手法であることを明らかにした。また、分離されたエクソソームまたはマイクロベシクルの組成(プロテオーム、RNA・DNA、糖鎖解析)、病理学および生理学的機能を詳細に解析し、従来にない新規な知見を見出した。

3. Seo N, Shirakura Y, Tahara Y, Harada N, Ikeda H, Akiyoshi K, Shiku H. Activated CD8<sup>+</sup> T Cell extracellular vesicles prevent tumor progression by targeting of lesional mesenchymal cells. *Nature Communications*. 2018; 9:435. IF: 14.919

概要：マウスキラーT細胞が放出するエクソソームは、腫瘍内でがん間質の間葉系細胞を傷害することにより、がんの浸潤や転移能を阻害することを世界に先駆け見出した。このキラーT細胞エクソソームは、間葉系細胞に取り込まれやすい特性を有すること、また、細胞傷害miRNAやタンパク質を含有していることを明らかにした。キラーT細胞エクソソームの選択的細胞取り込み作用における糖鎖機能研究への端緒となった。

4. Yesmin F, Furukawa K, Kambe M, Ohmi Y, Bhuiyan RH, Hasnat MB, Mizutani M, Tajima O, Hashimoto N, Kaneko K, Furukawa K: Extracellular vesicles released from ganglioside GD2-expressing melanoma cells enhance malignant properties of GD2-negative melanomas. *Sci. Rep.* 2023; 13: 4987. IF: 4.997

概要：ガングリオシド改変メラノーマ細胞株(特にGD2発言細胞)から分泌されるエクソソームの、細胞増殖能、浸潤能、接着能などの癌形質増強作用を示すとともに、標的細胞内のシグナル活性化作用を明らかにした。また、エクソソームが標的細胞に作用する際に、エクソソーム表面のGD2及びインテグリンが協働して必須の役割を果たすことが示された。

## §2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

### ① 「京大(秋吉)」グループ

研究代表者: 秋吉 一成 (京都大学工学研究科・教授)

研究項目

- ・ エクソソーム表層の糖鎖プロファイリング手法の確立
- ・ エクソソーム糖鎖の多様性に基づく分離、分類手法の確立と機能制御法の開発

### ② 「産総研」グループ

主たる共同研究者: 舘野 浩章 (国立研究開発法人産業技術総合研究所・細胞分子工学研究部門 研究グループ長)

研究項目

- ・ 細胞培養上清由来エクソソーム糖鎖プロファイリング技術の開発
- ・ ヒト血清由来エクソソーム糖鎖プロファイリング技術の開発
- ・ エクソソームサブpopulationの糖鎖プロファイリング技術の開発

### ③ 「三重大瀬尾」グループ

主たる共同研究者: 瀬尾尚宏 (三重大学大学院・医学系研究科・特任講師)

研究項目

- ・ 限外濾過法とイオン交換法による培養上清からエクソソーム様 EV 及びマイクロベシクル様 EV の単離
- ・ エクソソーム様 EV とマイクロベシクル様 EV のプロテオーム解析、レクチンアレイ解析、脂質分析、mRNA 解析、miRNA 解析、DNA 分析、ゼータ電位測定、培養細胞への取り込み能検討、尾静脈注射後の臓器分布の検討

### ④ 「中部大学」グループ

主たる共同研究者: 古川 鋼一 (中部大学生命医科学研究科 教授)

研究項目

- ・ 糖脂質リモデリングがん由来エクソソームの生体応答解析
- ・ 癌関連糖脂質によるエクソソームの生成・分泌制御作用の検討

### ⑤ 「大塚」グループ

主たる共同研究者: 大塚 浩二 (京都大学大学院工学研究科 教授)

研究項目

- ・ 新規レクチンカラムの開発
- ・ レクチンカラムを用いたナノ小胞の選択的分離
- ・ レクチンカラムを用いたエクソソームの表面糖鎖に基づく選択的分離

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

京大秋吉 G は、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリング手法を活用して、さきがけ研究第1期生の高橋博士のグループや京都大学大学院医学研究科の岸本曜助教のグループと共同研究を進めている。また、中部大学古川 G が確立してきた糖鎖合成系酵素遺伝子の人為的操作により樹立したいくつかの糖鎖欠損マウス、ヒトおよびマウスの糖鎖リモデリング細胞をグループ内外に提供、共有して、エクソソームの糖鎖機能の解明に貢献している。CREST 研究鈴木グループと糖脂質ガングリオシドのイメージングに関する共同研究も行っている。