

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「シグナルペプチド:細胞外微粒子機能
の新規マーカー」

研究終了報告書

研究期間 2017年10月～2023年3月

研究代表者: 澤田 誠
(名古屋大学環境医学研究所、教授)

§1 研究実施の概要

(1) 実施概要

我々は独自技術(ホットメルト-質量分析法)により細胞外微粒子(EVs)中に極微量含まれる特殊ペプチド(シグナルペプチド, SP)が存在すること、SPは種々の生物活性を持つものが多いことを示した。これらの現象は EVs が持つ生体調節機構の一端を担っている可能性があることから、

- 1) LMD や質量分析を基盤とする新規な EVs の分取及び成分分析技術を確立 [柱 2]、
 - 2) 外来性微粒子による病態モデル動物やモデル細胞を用いて生体応答メカニズム解明[柱 1]、
 - 3)人工改変微粒子に SP を封入しモデル動物に投与して生体機能制御を試みる [柱 3]
- を目指して研究を進めた。

本プロジェクトでの研究で以下の成果が得られた。

- ① 生体材料からの EVs の高度精製法の検証(中核 G; 中瀬 G、秋吉 T から比較試料提供)中核 G で調製した EVs は ER 成分などのコンタミがなく分析に十分耐えうることを示した
- ② モデル細胞システムを用いて SP が EVs 中に存在することを実証(中核 G Ono et al BBRC, 2021; 吉田 G 作製のモデル細胞を利用)遺伝子導入によって本来産生しない SP を持つタンパク質を発現させた細胞から調製した EVs に SP が内包されることを示した
- ③ EVs に移行する SP フラグメントの違いを発見(中核 G)ER 膜状の挙動が異なるタンパク質を発現する3種類の細胞を使って EVs に移行する SP フラグメントの特性を見出した。
- ④ 細胞の活性化状態によって EVs への SP 移行が変動することを発見(中核 G)マクロファージなど複数の活性化状態をもつ細胞では SP の移行が SEV-LEV 間で変動することを見出した。
- ⑤ 通常細胞由来 EVs からバイオマーカーとなりうる SP を検出(中核 G; 橋本 G, 中瀬 G から細胞提供)3種類の悪性度の異なるがん細胞から共通の SP を検出、含有量ががんの悪性度に相関する可能性を発見した。
- ⑥ 通常細胞由来 EVs から細胞種特異的な SP を検出(中核 G)神経系細胞に特異的に発現する SP を EVs に見出した。⑤の成果と合わせて EVs 中の SP ががん細胞の由来臓器と悪性度の指標となる可能性を見出した。
- ⑦ 通常細胞由来 EVs からの SP のノックダウンによる検証(中核 G)EVs の SP が由来するタンパク質合成を siRNA により阻害することにより減少することから、EVs 中の SP が由来タンパク質の遺伝子からの転写→翻訳産物であることを示した。
- ⑧ CaM が SP の EVs への輸送を仲介することを発見(Ono et al Int J Mol Sci, 2022 (ほか) SP フラグメントが CaM と結合することを EVs 抽出物の免疫沈降や混合結合実験によって示した。SP の EVs への輸送メカニズムの解明に寄与した。
- ⑨ 多変量解析による SP のプロファイリングで病態マーカー候補を同定(中核 G; 吉田 G との共同研究)アルツハイマー病患者脳脊髄液から分離した EVs 中の SP のうち病態マーカーとなる SP 4種類を多変量解析により同定した。
- ⑩ ホットメルト LMD 技術で細胞内顆粒を切り出す手法の開発(中核 G) ペプチド類を質量分析で検出するためにタンパク保持 x10 倍 Expansion 技術を開発、切り出した小片で呼吸器疾患のマーカーとなる傷害ミトコンドリア DNA の検出に成功した。
- ⑪ 非生物体微粒子誘導マウスモデルの作成と炎症因子解析(橋本 G; 中瀬 G との共同)異なる物性のシリカ微粒子を用いて複数のマウス肺傷害モデルの作成と炎症像の解析に成功した。
- ⑫ モデルマウス肺組織の食細胞での非生物体微粒子の細胞内局在と生体反応の分析(橋本 G; Inoue et al, Part Fibre Toxicol 2021) 外来性微粒子による生体の免疫反応の機序として、食細胞での NOX2 を介したエンドソーム内 ROS シグナルが寄与する事が判明した。
- ⑬ 非生物性微小粒子刺激による肺細胞の EVs 分泌応答の制御(橋本 G) 微粒子曝露刺激に肺細胞が反応して EV 分泌プロファイルが変化しケモカインの発現誘導が生じる事が判明した。
- ⑭ 微粒子起因性肺傷害を抑制する機能性ペプチドとタンパクの発見とそれらを搭載した EV を用いた治療法の開発(橋本 G) NOX2阻害ペプチドと Meflin がシリカ誘導肺傷害に対しても組織防衛的に働くことを発見した。Meflin の保護作用は Gdf10 を介して起こることを示した (Suzuki et al, 2022 Am J Res Cel Mol Biol)。
- ⑮ 呼吸由来 EV 中のミトコンドリア DNA: 臨床病態を反映する新たなバイオマーカー(橋本 G) 呼吸から EV を回収する手法を開発し、呼吸器疾患の病態を反映するバイオマーカーとして有用である可能性を示した。
- ⑯ ヒト肺由来臨床検体のレポジットリ(橋本 G) 喫煙や粉じん暴露歴の臨床情報と紐づけられた肺疾患患者肺由来の肺胞洗浄液を採取し、このうち 120 余検体を用いて含有される微粒子の FACS 解析を東京大学医科研石井 G と共同研究で進行中。

- ⑰ シグナルペプチドの新規生理活性機能解析(吉田 G; 中核 G と共同) SP ライブラリーをスクリーニングし5種類の有用な性質を持つ SP を同定、特許申請を行なった。
- ⑱ DDS としての新奇エクソソーム創出に基づく生体制御(吉田 G; 中瀬 G と共同) S1PR1 膜貫通領域ペプチドで細胞を処理すると 55% 内容タンパク質を減少させることを発見、DDS 担体として有効性が高い EVs を作り出すことに成功した(特許出願: 2019-008474)
- ⑲ 非生体性微粒子の細胞内移行・シグナル伝達誘導の機序解明(中瀬 G; 橋本 G と共同) 細胞由来 SEV が非生体性微粒子による細胞傷害を抑制することを発見した。
- ⑳ 細胞外微粒子への機能性分子修飾技術(中瀬 G) 膜透過性ペプチド sC18 を SEV 膜に疎水性基を用いて結合するとマクロピノサイトーシスが誘導されることを見出した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. SP が EVs に内包されることを発見(Ono et al BBRC, 2021 ほか)

概要: SP 強制発現モデル細胞「T-REx293 AspALP」から EVs を調製し、MALDI-MS/MS 分析を行ったところ、融合タンパク質 (APP_{sp}-SEAP) から生じる APP_{sp} 配列のシグナルペプチドペプチダーゼ (SPPase) で切断された C 末8アミノ酸断片「LAAWTARA」が検出できた。この結果は SP が EVs に内包されることを示した初めての論文となった。さらに、遺伝子導入をおこなっていない通常細胞由来の EVs からもそれぞれの細胞に特徴的な SP が検出でき、それらは元遺伝子のノックダウンにより減少することから、タンパク質翻訳の過程で生じる SP が EVs に移行すると考えられる。

2. CaM が SP の EVs への輸送を仲介すること(Ono et al Int J Mol Sci, 2022 ほか)

概要: タンパク質の種類によって SP 配列が細胞質側になるもの (II 型) と ER 内部側になるもの (I 型) があるが EVs へ移行する SP フラグメントは細胞質側にある配列の SPPase 切断断片 (I 型は C 末フラグメント、II 型は N 末フラグメント) であることを発見した。さらに SP フラグメントが CaM と結合することを EVs 抽出物の免疫沈降や混合結合実験によって示した。CaM は多胞体膜や分離した EVs に存在することから、CaM が SP の EVs への移行を仲介していると考えられる。

3. 肺傷害から細胞を守る Meflin と Gdf10 の発見(Suzuki et al, 2022 Am J Res Cell Mol Biol)

概要: 間葉系幹細胞に発現する分子 Meflin がシリカ誘導肺傷害やその後生じる繊維化に対して防御的に働くことを発見した。そこで Meflin 欠損細胞との比較トランスクリプトーム解析を行ったところ、Meflin に制御されて肺線維芽細胞から分泌されるサイトカイン Gdf10 を発見、Gdf10 欠損マウスの解析よりシリカ誘導肺傷害に対して Gdf10 が防御的に働くことが分かった。更に Meflin を HEK 細胞に発現させた HEK-Meflin 細胞は Meflin を表出する EV を分泌することを発見した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. ホットメルト LMD 技術で細胞内顆粒を切り出す手法 Expansion-LMD の確立

概要: 新技術の Expansion-LMD を開発した。ペプチド類を質量分析で検出するためにタンパク保持できる x10 倍 Expansion 技術を確立、切り出した小片で呼吸器疾患のマーカーとなる傷害ミトコンドリア DNA の検出に成功した(投稿準備中)。この技術は文科省新学術領域「マルチスケール脳」の計画班において神経細胞のシナプス形成部位で特に精神疾患で変異が認められることが予想されている樹状突起スパイン(大きさが約 100nm 程度)の切り出し技術として取り上げられ、技術支援班の技術として採用された。

2. 呼気からの EVs 回収と呼吸器疾患バイオマーカーとしてのミトコンドリア DNA の検出

概要: 呼気凝集液 (EBC) 回収キット R-tube を用い、安静呼吸 10 分間で回収した EBC 約 1ml から PS アフィニティー法で精製を行い粒子径中央値 100nm の EVs を分離することができた。分離した EVs には呼吸器疾患の臨床病態を反映するミトコンドリア由来 DNA が含まれていることから、健常人ボランティアおよび慢性肺疾患患者から EBC を回収し EVs 中の mtDNA 濃度を比較検討した結果 mtDNA の EVs 濃度が疾患で低下していることが判明した。呼気は非侵襲的に繰り返し分析ができるため分析は臨床的価値が高い。

3. 質量分析の限界を突破して医療・創薬に応用する前処理装置. 澤田 誠. JASIS 2018. 2018. 9, 千葉での発表、展示

概要: 代表者らが開発したホットメルト-LMD 技術およびホットメルト-MALDI 分析法について JASIS(Japan Analytical & Scientific Instruments Show 分析展(日本分析機器工業会)と科学機器展(日本科学機器協会)の合同展の統一名称)で紹介した。両技術は本プロジェクトの基本的技術に関するもので、細胞外微粒子の動態や成分分析に有用であると考えられるが、同展示会では製薬系企業、CRO など医療分析系企業の他、食品関係、環境分析、素材分析などの企業研究者から広く興味を持たれた。一部の企業からは応用開発について問い合わせをいただいている。バイオ・医療分野以外にも利用できる可能性があり、社会的に波及効果が高いと判断した。

(なお、この技術は国内外の複数の装置特許、フィルム特許、分析法特許として申請、現在半数程度が特許取得済み)

< 代表的な論文 >

1. Kenji Ono, Mikio Niwa, Hiromi Suzuki, Nahoko Bailey Kobayashi, Tetsuhiko Yoshida and Makoto Sawada. Secretion of signal peptides via extracellular vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 560: 21-26, 2021

概要: SP 強制発現モデル細胞「T-REx293 AspALP」から EVs を調製し、MALDI-MS/MS 分析を行ったところ、融合タンパク質 (APP_{sp}-SEAP) から生じる APP_{sp} 配列のシグナルペプチドペプチダーゼ (SPPase) で切断された C 末 8 アミノ酸断片「LAAWTARA」が検出できた。SP フラグメントは導入した遺伝子の発現誘導によって増大することから EVs に含まれる SP フラグメントは導入した遺伝子のタンパク質翻訳時に生じたものである事がわかった。この結果は SP が EVs に内包されることを示した初めての論文となった。

2. Kenji Ono, Mikio Niwa, Hiromi Suzuki, Nahoko Bailey Kobayashi, Tetsuhiko Yoshida and Makoto Sawada. Signal Sequence-Dependent Orientation of Signal Peptide Fragments to Exosomes. *Int J Molecular Sciences Int J Mol Sci* 23(6): 3137, 2022.

概要: タンパク質の種類によって SP 配列が細胞質側になるもの (II 型) と ER 内部側になるもの (I 型) があるが EVs へ移行する SP フラグメントは細胞質側にある配列の SPPase 切断断片 (I 型は C 末フラグメント、II 型は N 末フラグメント) であることを発見した。さらに SP フラグメントが CaM と結合することを EVs 抽出物の免疫沈降や混合結合実験によって示した。CaM は多胞体膜や分離した EVs に存在することから、CaM が SP の EVs への移行を仲介していると考えられる。

3. Masahide Inoue, Koji Sakamoto, Atsushi Suzuki, Shinya Nakai, Akira Ando, Yukihiro Shiraki, Yoshio Nakahara, Mika Omura, Ikuhiko Nakase, Atsushi Enomoto, Ikuhiko Nakase, Makoto Sawada, and Naozumi Hashimoto. Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages. *Particle and Fibre Toxicology* 18, Article number: 21 (2021)

概要: ナノシリカ誘導マウス肺傷害モデルにおいて粒子貪食後にエンドソーム内部の ROS レベルが貪食早期に増加することを発見した。貪食細胞のエンドソーム ROS 生成に係る NADPH オキシダーゼ 2 (NOX2) の選択的阻害作用ペプチドによりエンドソーム ROS 上昇を抑制したところ、Raw 細胞におけるシリカ粒子貪食後のケモカイン誘導を完全に抑制した。以上より、外来性微粒子による生体の免疫反応の機序として、貪食細胞での NOX2 を介したエンドソーム内 ROS シグナルが寄与する事が判明した。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

1) 「澤田(中核)」グループ

① 研究代表者: 澤田 誠 (名古屋大学環境医学研究所、教授)

② 研究項目

- ・ 全体の統括とホットメルト-LMD およびホットメルト-質量分析による知見の検証
- ・ 質量分析による SEV のペプチドプロファイル分析と新たな生物学的役割の解明
- ・ ホットメルト LMD 技術で細胞内顆粒を切り出す手法の開発
- ・ SEV 回収精製及び大量調製: 協力機関コスモバイオ

2) 「橋本(共同研究 G1)」グループ

① 主たる共同研究者: 橋本 直純 (名古屋大学大学院医学系研究科、准教授)

② 研究項目

- ・ 非生物体微粒子誘導炎症モデルマウスにおける細胞外微粒子の解析
- ・ モデルマウスの貪食細胞における非生物体微粒子による変化の解析
- ・ モデルマウスに対する改変型細胞外顆粒投与条件の検討と治療効果の検討

3) 「吉田(共同研究 G2)」グループ (2017.10~2021.3)

① 主たる共同研究者: 吉田 徹彦 (東亜合成株式会社、フェロー、先端科学研究所所長)

② 研究項目

- ・ シグナルペプチドの新規生理活性機能解析
- ・ シグナルペプチドの合成と安定化修飾
- ・ DDS としての新奇エクソソーム(内包物が軽量化された人工軽量化エクソソーム (iLE: induced Light-weight Exosome)) の創出

4) 「中瀬(共同研究 G3)」グループ (2018.4~2021.3)

① 主たる共同研究者: 中瀬 生彦 (大阪府立大学大学院理学系研究科 教授)

② 研究項目: 細胞外微粒子の形成・分泌・細胞内移行に関わる分子細胞生物学的な機序解明と化学的な制御

- ・ 非生物体微粒子の細胞内移行・シグナル伝達誘導の機序解明 (G1(橋本 G)、G2(吉田 G)と連携)
- ・ 関連細胞からの細胞内顆粒形成放出過程(シグナルペプチド関与)の機序解明 (G1(橋本 G)、G2(吉田 G)と連携)
- ・ 細胞外微粒子への機能性分子修飾技術 (G1(橋本 G)、G2(吉田 G)と連携)
- ・ 改変型細胞外顆粒の作製及び封入技術 (G2(吉田 G)と連携)

5) 「宇佐美(共同研究 G4)」グループ (2017.10~2020.3)

① 主たる共同研究者: 宇佐美 徳子 (高エネルギー加速器研究機構、講師)

② 研究項目

- ・ モデル貪食細胞へのX線マイクロビーム照射による細胞内小胞の除去
- ・ 転移性がん細胞のX線マイクロビーム照射による形質変化とエクソソーム分析

(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

当チームが本課題で実施している研究に関連したチーム外との研究連携は以下の7つの技術的要素に分類でき、それらが相互に関連した連携ネットワークとなっている。

1. ホットメルト-質量分析技術関連(中核 G)
2. レーザーマイクロディセクション関連分取技術(中核 G)

3. バイオマーカー探索研究(中核 G)
4. シグナルペプチド関連技術(吉田 G・中核 G)
5. エクソソームを用いた DDS 技術(中瀬 G・吉田 G)
6. 基礎医学・臨床研究(橋本 G)
7. マイクロ X 線細胞操作技術(宇佐美 G)

研究連携に関与する研究機関、産業界メンバー(カッコ内の数字は上記の技術分類に対応)

- ・ ベーリンガーインゲルハイム社(1,2)
- ・ ファイザーグローバル(1, 2)
- ・ アスカット株式会社、ラクオリア創薬株式会社(2)
- ・ JSR 株式会社(1,3)
- ・ 京都大学 iPS 研究所・武田製薬(1,4,5)
- ・ 島津製作所、昭和精機株式会社、ルシール株式会社(2,1)
- ・ C Bmed GmbH (3, 4)
- ・ 大阪大学微生物病研究所高等共創研究院・京都大学 iPS 細胞研究所(4)
- ・ 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター(4)
- ・ 東京大学大学院農学生命科学研究科(4,5)
- ・ 製薬企業 X(4,5)
- ・ Department of Biochemistry, University of Cologne (5)
- ・ School of Pharmacy, Cardiff University (5)
- ・ University of Toronto・Sunnybrook Research Institute (5)
- ・ 内分泌内科 (6,1,2)
- ・ 産婦人科 (6,1,3)
- ・ 量子化学研究機構(7)
- ・ 大分看科大(7)

特に、非生体由来の微粒子による肺毒性とその治療法の検討に関しては、大気中に含まれる粉じんをサイズ別に分級し日本各地から獲得・成分分析を進めている金沢大学環日本海域環境研究センターの瀬戸・猪股より領域内共同研究として待機粉じんを提供いただき、大気中微粒子の物性とマウスモデルを用いた臓器毒性の関係を分析、大気汚染による健康被害の治療標的の探索を進めている。

また、肺由来の微粒子の分析については、東京大学医科学研究所石井研究室と共同研究を開始している。これまでに臨床情報と紐づいた肺胞洗浄液 120 検体に含有される微粒子に表出される核酸・脂質膜・糖鎖などを標識して微粒子 FACS で計測し、臨床特徴との比較検討をおこなっている。

