

# 平成 30 年度 TIA 連携プログラム探索推進事業「かけはし」

## 調査研究報告書(公開版)

【研究題目】 ナノニードルを用いた生細胞からのエクソソーム含有多胞性エンドソームの単離

【整理番号】 TK18-009

【代表機関】 国立研究開発法人物質・材料研究機構

【調査研究代表者（氏名）】 山崎智彦

【TIA 内連携機関：連携機関代表者】

国立研究開発法人産業技術総合研究所 中村 史

【TIA 外連携機関】

早稲田大学理工学術院生命医科学科 竹山春子教授

【報告書作成者】 山崎智彦

【報告書作成年月日】 平成 31 年 3 月 26 日

【連携推進（具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等）】

本調査研究は、ナノニードルを用いて、生細胞からエクソソームを内包する多胞性エンドソームを選択的に単離する基盤技術を開発することを目的として活動を行った。昨年度の調査研究では、新規開発した融合蛋白質と抗体固定化 AFM カンチレバー型ナノニードルを用いて融合蛋白質が局在する小胞を細胞内から選択的に単離することが可能であることを示した。本年度は、本技術を応用し、疾病やガンの診断材料として着目されているエクソソームを細胞から直接取り出すことに取り組んだ。

研究会を 2 回開催し、参画者の成果について密な議論を行うことで、生きている細胞内から選択的にエクソソームを取り出すといった斬新なアイデアの基盤技術を確立した。

基盤技術を世界標準の技術として実現するためには、微量のエクソソーム中からのタンパク質やマイクロ RNA の微量抽出技術と高感度解析技術が必要である。これらの技術を有する研究者をメンバーに加えた連携の拡大を目指して、学会等において広報活動を行った。

NIMS 山崎は、本研究内容について平成 30 年度キャノン財団研究助成プログラム「産業基盤の創生」に応募した。採択には至らなかったが、審査員のコメントを参考に大型予算獲得を引き続き目指す。

【調査研究内容（実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果）】  
（背景・課題）

近年、細胞間の情報伝達手段として癌の転移や診断において広く着目されているエクソソームは後期エンドソーム中に出芽することによって形成される多胞性エンドソームの中に存在する 30–100nm の小胞であり、細胞内因子を含んだ状態で細胞外へ放出される。放出されたエクソソームは別の細胞に取り込まれることにより、エクソソーム内に含まれたマイクロ RNA や蛋白質などの因子が伝播され、細胞間での情報伝達が行われている。また、エクソソーム内のマイクロ RNA や蛋白質を解析することにより、疾患の診断ができることが報告されている。

体液や細胞培養液からのエクソソームの分離では、細胞外小胞である微小小胞体、アポトーシス小体からエクソソームを分離することが困難であり、エクソソームの単離が課題となっている。本調査研究においては、生きている細胞からエクソソームを内包する多胞性エンドソームを

選択的に細胞外に取り出す基盤技術を開発することを目的とした。多胞性エンドソームを生きている細胞内からナノニードルを用いて選択的に取り出せる本技術は、多胞性エンドソーム内に形成されたエクソソームを他の細胞外小胞のコンタミネーションなしに取り出すことができる画期的な技術となる。

#### (成果)

エクソソームを内包する多胞性エンドソームを AFM カンチレバー型ナノニードルから取り出すために、標的となるタンパク質を同定した。小胞の形成や小胞間の物質移動に関与している膜タンパク質である Ras-related protein (Rab タンパク質) は数十種類のアリソフォームが存在している。文献調査を行い、多胞性エンドソームの形成に関与している Rab タンパク質 10 種類について、抗体染色による細胞内局在解析を行った。また、生細胞中での Rab タンパク質の挙動を明らかとするためにクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (EGFP) と Rab タンパク質との融合タンパク質を発現させるプラスミドベクターを構築し、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549 に遺伝子導入を行い、共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、選択した RAB タンパク質のうち 3 種類において、細胞内に小胞様のリングが観察され、またエクソソームのマーカータンパク質である CD63 との共局在が観察された。細胞内の多胞性小胞を選択的に単離するための標的タンパク質としての Rab タンパク質が同定され、Rab タンパク質を特異的に捕捉することで細胞内から多胞性小胞を取り出すことができる可能性が示された。

次に、ナノニードルを用いた多胞性小胞の単離を行った。1 度の操作で多数の多胞性小胞を単離するために、3 mm 角に数万本配列したナノニードルアレイを用いた生細胞からの多胞性小胞の単離を試みた。プロテイン A 由来の Z ドメインがタンデム構造に配置した ZZ ドメインを持つ直径 30 nm 程のリポソームを修飾したナノニードルを用いて抗 EGFP 抗体もしくは抗 Rab タンパク質抗体を固定したナノニードルを準備した。この抗体固定ナノニードルをエクソソームマーカーである CD63 に赤色蛍光タンパク質を融合発現させた細胞に挿入し、抜去する操作を行い、ナノニードルを蛍光観察した。蛍光観察の結果、ナノニードル表面に赤色タンパク質由来の蛍光分子が観察された。以上の結果からナノニードルを用いて多胞性小胞の膜上に存在する Rab タンパク質を標的として小胞を捕捉することで、生きている細胞からエクソソームを含む多胞性小胞を単離できることが示唆された。

#### 学会発表

1. 山崎智彦、中村史 “ナノニードルによる生きている細胞からの細胞内小胞の単離” 第 2 回 TIA かけはし 成果報告会 (2018 年 7 月 4 日 東京大学武田ホール)
2. 山崎智彦 “ナノニードルを用いた生細胞からのエクソソーム含有多胞性エンドソームの単離” 第 3 回 TIA/TLSK ライフイノベーションワークショップ (2018 年 11 月 28 日 つくば国際会議場) (招待講演)
3. 本多裕基、松本雄太、山崎智彦、中村史 “抗体修飾ナノニードルを用いた生細胞からのエンドソーム抽出” 日本化学会 第 99 春季年会 (2019 年 3 月 16 日 甲南大学)

#### 【今後の活動予定】

2 年間の調査研究において、エクソソームを生きている細胞内から選択的に取り出す基盤技術を確立した。本基盤技術をエクソソーム解析の世界標準の技術として実現するためには、大型外部予算を獲得し、エクソソーム抽出専用装置の開発を実施する。