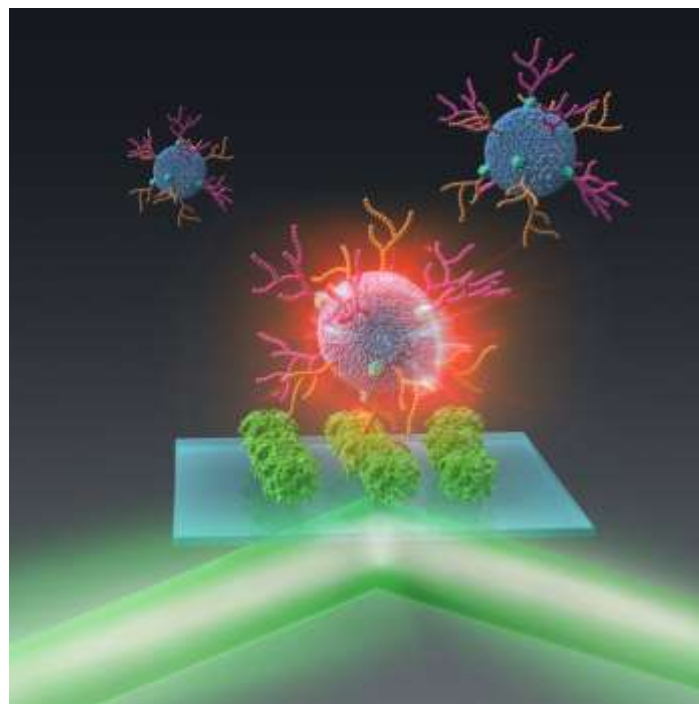


表層糖鎖パターン解析による細胞外小胞の多様性評価 —糖鎖を改変し、細胞との相互作用を制御する—

概要

京都大学大学院工学研究科 下田麻子特定研究員、秋吉一成教授らの研究グループは、国立研究開発法人産業技術総合研究所館野浩章研究グループ長、三重大学瀬尾尚宏特任講師、珠玖洋特定教授との共同研究により、新規細胞間情報伝達機構や生体由来のナノキャリアとして注目されている細胞外小胞（Extracellular vesicles; EV）^[注1]について、その表層糖鎖のパターンが EV の多様性の指標となり得ること、そして EV の細胞間相互作用に重要なことを明らかにしました。糖鎖^[注2]は細胞の特徴を表す「細胞の顔」とも呼ばれ、他の細胞、細菌、ウイルス、毒素との結合に重要な役割を果たしています。本研究では、エバネッセント波励起型蛍光検出レクチンマイクロアレイ法^[注3]を用いて、EV の表層糖鎖のパターン解析を網羅的に行い、分泌する細胞の種類や粒子のサイズ、EV の回収方法^[注4]の違いによってその糖鎖パターンが異なることを見出しました。さらに、糖鎖切断酵素や糖転移酵素を用いて表層糖鎖を改変することで、細胞との相互作用を制御できることがわかりました。本研究で提案する EV の多様性の新規指標は、EV の品質管理や標準化のひとつの指針となり、また、特定の EV 集団を分離、精製する手法の開発、疾患のバイオマーカー^[注5]探索、さらに、ドラッグデリバリーシステム^[注6]開発へと繋がるのが期待されます。

本研究成果は 2021 年 12 月 1 日に独科学誌『Small Methods』に Early View としてオンライン掲載されました。



レクチンマイクロアレイ法により EV 表層糖鎖パターンを解析することで EV の多様性を評価する

1. 背景

細胞外小胞（EV）は細胞から分泌される直径数十～数百ナノメートルの細胞外微粒子であり、血液や尿、唾液などのあらゆる体液に存在しています。EV は産生する細胞に由来する核酸やタンパク質を含み、細胞から細胞へと情報を伝達する役割を担っており、さまざまな生命現象（免疫、発生、分化、老化など）や疾患（がん、神経疾患など）に深く関わっていることが明らかになってきました。細胞の種類によってその組成が違うのはもちろんのこと、生体由来であるために同じ細胞からも不均一な性質の EV が分泌されることが報告されていますが、これらの分離精製技術や多様性を評価する指標はまだ十分に確立されていません。

EV の主な構成分子として脂質、タンパク質、核酸が挙げられますが、研究グループはこれまであまり注目されていなかった糖鎖に着目しました。糖鎖は細胞の種類や状態の変化に応じてそのパターンが異なることから、特に疾患のバイオマーカーとしての有用性が明らかになっています。細胞から分泌された EV の表面は糖鎖によって覆われており、糖鎖を介した EV と細胞との相互作用や疾患特異的な糖鎖構造に関する研究も報告されつつありますが、依然として糖鎖の役割については不明な点が多く残されています。EV の表層糖鎖は、その顔としてさまざまな生命現象に関わっていることが予想されます。EV の糖鎖科学の進展が、その分離、計測、解析技術などの基礎研究からその応用研究において革新をもたらす可能性があります。

2. 研究手法・成果

本研究グループは、エバネッセント波励起型蛍光検出レクチンマイクロアレイ法を用いて EV 表面の糖鎖を網羅的に解析しました。この方法は4 5種類の様々な糖鎖を認識するレクチン^[注 7]を並べたスライドガラスに蛍光標識した EV を添加するだけで高感度に表層の糖鎖パターンを解析できることが特徴です（図 1）。まずは、正常細胞やがん細胞を含む 20 種類の細胞から回収した EV の糖鎖パターンを比較したところ、細胞の種類によってそのパターンが異なることがわかりました。また、①EV の平均粒径が異なる集団（large EV, middle EV, small EV）、②異なる4 種類の方法で回収した EV についても粒子のサイズや回収方法によって糖鎖パターンに変化が見られました。この結果は、EV の表層糖鎖パターンを細胞外小胞の多様性、不均一性を表す新規指標となることを意味しています。

次に、EV 表面糖鎖を糖鎖切断酵素で処理することで、表面がシアル酸、ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、マンノースを多く含む4 種類の表層糖鎖トリミング EV を作製しました。レクチンマイクロアレイ解析により、EV の表層糖鎖が確かに切断され、様々な糖鎖の顔を持つ EV が作成されることがわかりました。また、糖鎖を付加する酵素である糖転移酵素を用いることで、シアル酸糖鎖が付加された EV の調製にも成功しました。このように糖鎖切断酵素や酵素転移酵素を用いることで、EV の顔である表層糖鎖を簡便に操作し得る手法を開発しました（図 2）。

最後に、表層糖鎖を改変した EV と細胞との相互作用を評価しました。まず、培養細胞を用いた系において蛍光標識した4 種類の EV を各種細胞に添加し、その取り込み量を比較したところ、EV 表面糖鎖や取り込む細胞の種類によって導入効率が異なることわかりました。次に、4 種類の EV をマウスへ静脈投与し2 4 時間後の各臓器への分布を調べたところ、EV 表面糖鎖のリモデリングにより組織移行を制御できることを見出しました。これは、EV をドラッグデリバリーシステムに利用するための重要な知見と考えられます。

3. 波及効果、今後の予定

本研究では、EV 表面糖鎖パターン解析が EV の多様性を評価する新規指標となり得ることを明らかにしました。研究グループは以前間葉系幹細胞^[注 8]由来 EV の表面糖鎖解析と、細胞への取り込みに糖鎖が関与する

ことを報告していましたが、その他の種類の細胞由来の EV との比較や EV の多様性と糖鎖パターンとの関係性については詳細な検討を行っていませんでした。

今後は、EV の特定の表層糖鎖パターンをもつ集団の分離・精製法の開発や特定の疾患のバイオマーカー探索に応用できると考えられます。また、EV を臨床研究に用いる際に重要な品質管理、標準化においても表面糖鎖パターン解析は有用であり、糖鎖を基盤とした分離技術は特定の機能をもつ EV を高純度に得る新規手法となることが期待されます。

4. 研究プロジェクトについて

● 科学技術振興機構（JST） 戦略的創造研究推進事業 CREST 「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」（研究代表者：秋吉一成、JPMJCR17H2）

<用語解説>

注1. 細胞外小胞（Extracellular vesicles; EV）

細胞が分泌する、脂質二重膜で囲まれた直径数十～数百ナノメートルの微粒子。内部に含まれる核酸やタンパク質などの情報伝達物質を運ぶことから、がんの早期診断や治療への応用が期待されている。

注2. 糖鎖

単糖が鎖状につながった物質であり、細胞のタンパク質や脂質に結合している。細胞の種類や状態（がん化など）により変化し、細胞間認識、免疫応答、感染などあらゆる生命現象に関わっている。

注3. エバネッセント波励起型蛍光検出レクチンマイクロアレイ法

糖結合タンパク質であるレクチンをスライドガラスに固定化し、蛍光標識したサンプルを添加して各レクチンへの蛍光強度を測定する。糖への特異性が異なるレクチンへの結合を解析することで、サンプルの部分的な糖鎖構造を推定することができる。全反射する条件で発生するエバネッセント光を励起光として利用するエバネッセント波励起型蛍光検出レクチンマイクロアレイは、スライドガラスから<200 nm の領域のみを検出する。測定前の洗浄操作が不要で高感度な検出が可能である。

注4. EV の回収方法

EV を回収する最も標準的な方法は超遠心分離法である。超遠心分離法では基本的に EV のあらゆる集団を回収する。現在はさまざまな市販のキットが販売されており、これらは EV に多く含まれるタンパク質や脂質に特異的に結合する分子を用いて分離する手法やサイズに基づいて分離する手法を用いている。超遠心分離法と異なり、ある一部分の集団のみが回収される。

注5. バイオマーカー

がんや特定の疾患の診断や進行度合いを判断する指標のこと。体液中の EV の核酸やタンパク質はがん早期診断のバイオマーカーとして注目されている。

注6. ドラッグデリバリーシステム

より効率的・効果的に薬物を作用させるため、最小限の量の薬物を必要なタイミングで標的となる場所

へと運ぶための技術。

注7. レクチン

糖鎖に結合するタンパク質。植物、動物、微生物に存在し特定の糖鎖構造を認識する。

注8. 間葉系幹細胞

骨髄や脂肪組織などに由来する体性幹細胞。骨、脂肪、軟骨、神経などさまざまな種類の細胞へと分化することができるため、再生医療分野で注目されている。

<研究者のコメント>

本研究では特定の機能を持つ EV を抽出する手法のひとつとして EV 表層糖鎖のパターン解析が有用であることを示しました。EV の医療応用で課題となっている品質管理や標準化においても糖鎖は重要な役割を担っていると考えられます。今後は生体試料由来 EV を用いて疾患のバイオマーカー探索などを行っていく予定です。

<論文タイトルと著者>

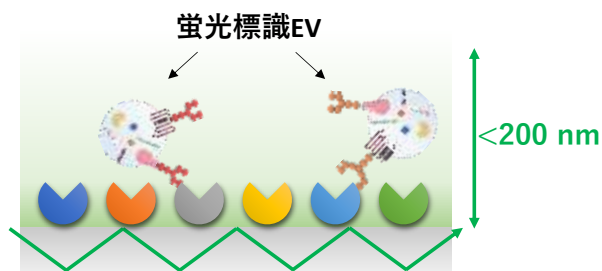
タイトル：Assessment of surface glycan diversity on extracellular vesicles by lectin microarray and glycoengineering strategies for drug delivery applications (レクチンマイクロアレイによる細胞外小胞表面糖鎖の多様性評価と糖鎖工学を基盤としたドラッグデリバリーシステム応用)

著者：Asako Shimoda, Risako Miura, Hiroaki Tateno, Naohiro Seo, Hiroshi Shiku, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, and Kazunari Akiyoshi

掲載誌：Small Methods DOI：https://doi.org/10.1002/smtd.202100785

< 参考図表 >

(A)

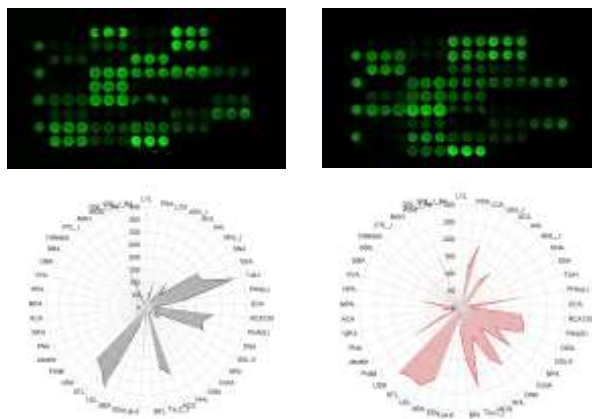


エバネッセント波を励起光とすることにより、
基盤から<u>200 nm</u>の領域のみを検出



洗浄操作なしにEV表面糖鎖を高感度に検出

(B)



蛍光強度から各レクチンへの結合パターンを取得

図1 エバネッセント波励起型蛍光検出レクチンマイクロアレイ法を用いたEV表面糖鎖解析

(A) 蛍光標識したEVをレクチンが45種類固定化されたスライドガラスへ添加し、(B) 一晩静置後に各レクチンへ結合した蛍光強度を解析

》 : 糖鎖トリミング 》 : 糖鎖付加

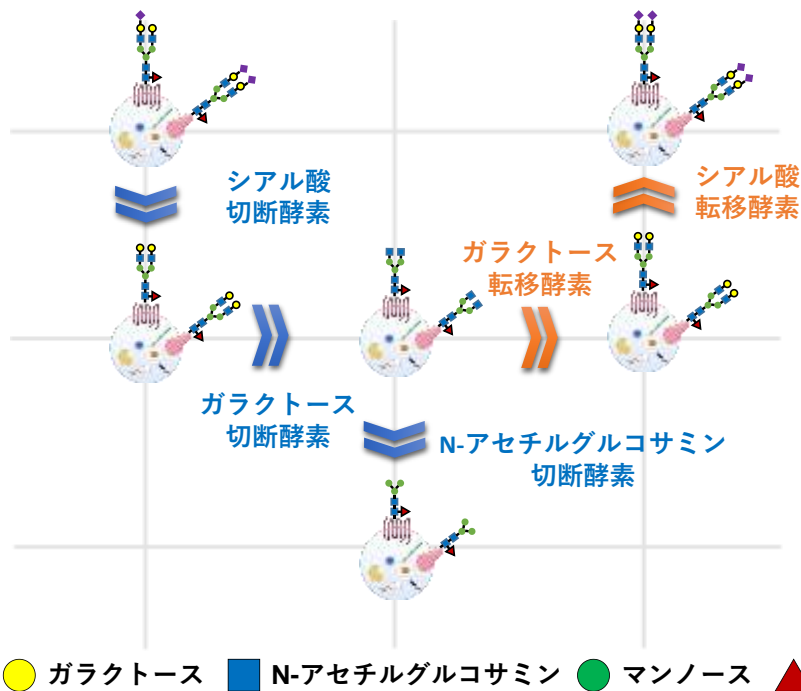


図2 糖鎖切断酵素と糖転移酵素を用いた EV 表面糖鎖リモデリング

EV の表面が①シアル酸 (control)、②ガラクトース (Gal)、③N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、マン
ノース (Man) の4種類のEVを作製