

補助事業番号 2020M-139

補助事業名 2020年度 細胞から分泌される細胞外小胞体の経時的かつ網羅的な解析法に関する研究 補助事業

補助事業者名 大阪大学 岡本行広

1 研究の概要

細胞から分泌される細胞外小胞体(エクソソーム、微小小胞体など)は、バイオマーカーとしてもドラッグデリバリーの材料としても注目されている。

しかし、バイオマーカーとして利用するためには、細胞外小胞体自体や細胞外小胞体を構成する分子の分離方法の改善が求められている。

また、ドラッグデリバリーの材料として利用するためには、細胞外小胞体の特性は未知であるため、特性を明らかにする必要がある。そこで、細胞外小胞体に関する分離ならびに分析方法に関して研究を実施し、細胞外小胞体ならびに疑似細胞外小胞体の膜特性を明らかにした。また、細胞外小胞体構成分子の電気泳動分離が期待できる泳動液の開発に成功した。

2 研究の目的と背景

細胞から分泌される細胞外小胞体(エクソソーム、微小小胞体など)は、体液に含まれており、細胞由来の情報を含んでいるためがん診断のバイオマーカーとして有望視されている。また、生検と異なり、非侵襲的に試料を得ることが可能である点も、がん診断に用いる材料として適している。しかし、現状、細胞外小胞体の分析には、煩雑な手操作や超遠心分離機などの特別な装置を必要とし、結果を得るために数十時間～数日必要とする。

このため、操作時間の短縮が必要である。また、現状の方法は、細胞外小胞体に含まれる分子に着目しているため、最終的に得られる情報量が少ない。そこで、正確な診断のためにも、細胞外小胞体を構成する分子はもちろん、細胞外小胞体自身の物性に関する情報も加味することで、より正確な診断が可能になると考えられる。そこで、細胞外小胞体や疑似細胞外小胞体を作製し、その膜特性を解析することを第一の目的とする。

また、細胞外小胞体自体の分離や細胞外小胞体を構成する分子の分離を第二の目的とする。この際、分離された細胞外小胞体の同定には、本目的で解析した膜特性の情報を活用することを目的とする。

そこで、申請者が研究を行ってきたマイクロチップ電気泳動や脂質小胞体の膜物性に関する実績を活用し、以下の項目を実施し、細胞外小胞体の分析システム(チップ、キット)を確立することを目的とする。

- (1)細胞外小胞体や細胞外小胞体を構成する分子の分離を可能なチップの作製
- (2)分離された細胞外小胞体の膜物性(流動性)の解明

3 研究内容

(1)細胞から分泌される細胞外小胞体の経時的かつ網羅的な解析法に関する研究の開発

(URL) <http://www.membranome.jp/B-ICE/member/70/233.html>

細胞外小胞体に関して、その膜物性値は未知な点が多い。この細胞外小胞体の膜物性値を明らかにすると、その数値自体が細胞外小胞体を特徴づけるものになり得る。

そこで、膜特性を蛍光プローブを用いて解析した結果、細胞外小胞体(ミルクエクソソーム)の脂質膜はゲル相を呈する膜と比較し、高い流動性を示した。また、膜流動性と膜極性値の二値をプロットした結果、細胞外小胞体は図に示すような相分離を呈していると示差される結果が得られた。

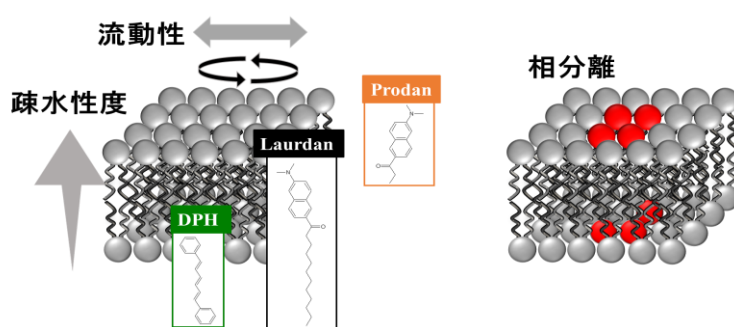


図1 細胞外小胞体の膜特性解析手法と、細胞外小胞体が呈する相分離

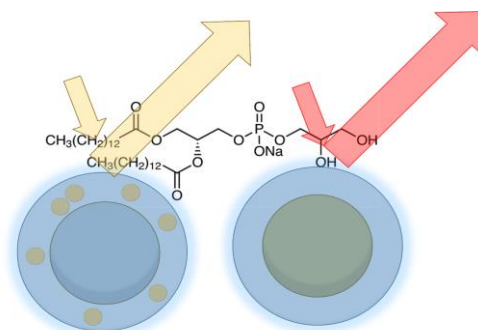


図2 細胞外小胞体の脂質膜の高感度解析法

さらに、細胞外小胞体の中にも稀有な小胞体が存在する可能性もある。そこで、表面増強ラマン(SERS)解析を脂質膜解析へ応用可能とする研究を実施した。その結果、異なるサイズ、異なる水濡れ性を有する金ナノ粒子を用いると、脂質分子の階層的な解析を高感度に可能であることを実証した。

これらの知見を活用し、そのほかにも、DDSを指向し、細胞外小胞体のモデル物質を作製し、抗酸化物質を内包した脂質小胞体の作製ならびに抗酸化能の評価、 dendリマーを有する脂質集合体の作製などを報告している。

また、分離の点では、細胞外小胞体のゼータ電位測定や粒径分布を明らかにするとともに、細胞外小胞体自体の分離を試みた。また、細胞外小胞体を構成する分子を溶解し、電気泳動可能

な溶液を検討・作製し、これに成功した。そして、親水性物質ならびに疎水性物質のモデル化合物に対して、電気泳動分離に成功した。

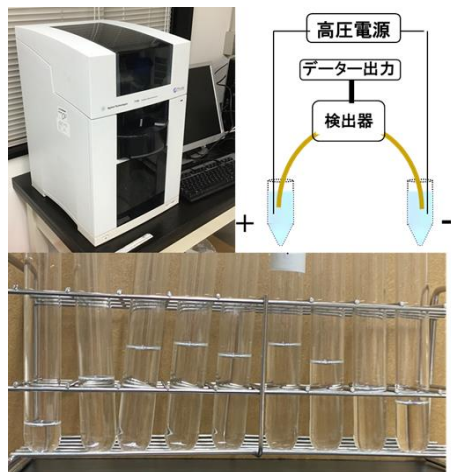


図 3
電気泳動装置(左)ならびに電気泳動装置構成図(右)そして、開発した泳動液(下)

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

細胞から分泌される細胞外小胞体に関する研究は、生命現象の解明を始めとする基礎研究、細胞外小胞体をバイオマーカーとして利用した診断への応用研究、ドラッグデリバリーキャリア (drug delivery system: DDS)材料の開発に繋がると考えられている。つまり、本研究を実施することで、基礎から応用までカバーし、医療から実社会へ貢献できると考えられる。

本研究期間内で、細胞外小胞体の膜物性を明らかにした。また、この物性値に基づいて、疑似細胞外小胞体の作製を実施した。さらに、細胞外小胞体を構成する分子を溶解し、電気泳動可能な媒体の開発に成功した。

これらの成果より、今後の展望として、膜物性値や膜構成分子の同定に基づいたDDSキャリアーの開発、膜物性値に基づく細胞外小胞体の同定、膜物性値の変化による疾患診断などに展開できる可能性がある。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

これまでに、生体分子の分離分析法に関する研究を実施してきた。その中で特に分離場のサイズ効果(分離場がマイクロメートルサイズになると現れる現象)を活用した電気泳動を軸に分離に関する研究を実施してきた。近年は、分離場として脂質膜の特性に着目し、これを活用した研究を併せて実施している。この際、脂質膜の特性・特徴を分析し、理解する必要がある。このため様々な脂質膜に関して膜特性を分析してきた。

今回の研究は、細胞外小胞体に焦点をあてて、その膜特性を明らかとするとともに、細胞外小胞体自体や細胞外小胞体を構成する分子の分離を目的としている。つまり、これまでの研究成果を活用するとともに、それを発展させ、基礎学問を支える技術・診断への応用・DDSキャリアー開発のための基礎知見の取得といった実用を視野に入れた研究となっている。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

1. Miftah Faried, Keishi Suga, Yukihiro Okamoto, and Hiroshi Umakoshi, MEMBRANE, 45 (4), 187-192 (2020)
2. Miftah Faried, Seiya Ando, Keishi Suga, Yukihiro Okamoto, and Hiroshi Umakoshi, Chem. Lett. 2020, 49, 1107-1110
3. Jin Han, Yosuke Iimure, Yukihiro Okamoto, Keishi Suga, and Hiroshi Umakoshi, Chem. Lett, 50, 187-190 (2021)
4. Jin Han, Misaki Amau, Yukihiro Okamoto, Keishi Suga, and Hiroshi Umakoshi: Investigation of Quercetin Interaction Behaviors with Lipid Bilayers: Toward Understanding its Antioxidative Effect within Biomembrane, Journal of Bioscience and Bioengineering, in press.
5. Jin Han, Keita Hayashi, Yukihiro Okamoto, Keishi Suga, Hiroshi Umakoshi, Biochemical Engineering Journal, Volume 164, 15, 2020, 107794
6. Keishi Suga, Daiki Matsui, Nozomi Watanabe, Yukihiro Okamoto, and Hiroshi Umakoshi: Novel Insight into Exosomal Membrane: from Viewpoints of Membrane Fluidity and Polarity, Langmuir, in press.
7. 岡本行広、薬物輸送システム材料としてのナノバブルとリポソームの複合体、ぶんせき、2020年10号, 378.
8. 岡本 行広、抽出および高感度検出剤としてのナノ液滴in マイクロ液滴の可能性 ぶんせき、2021, 7,353.

7 補助事業に係る成果物

(1)補助事業により作成したもの

★★★★★★ (URL) 該当なし

(2)(1)以外で当事業において作成したもの

☆☆☆☆☆☆ (URL) 該当なし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名: 大阪大学基礎工学部 (オオサカダイガクキソコウガクブ)

住 所: 〒560-8531 大阪府豊中市待兼山町1-3

担 当 者: 役職名 准教授 (ジュンキョウジュ)

担 当 部 署: 物質創成専攻 化学工学領域
(ブッシツソウセイセンコウ カガクコウガクリョウイキ)

E - m a i l: okamoto@cheng.es.osaka-u.ac.jp

U R L: 所属機関(研究室等)HPのトップページのURL

<http://www.membranome.jp/B-ICE/result/result01.html>

<http://www.membranome.jp/B-ICE/member/70/233.html>