

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「微粒子による生体応答の相互作用の解
明と制御」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者：華山 力成
(金沢大学 ナノ生命科学研究所 教
授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

本研究では、エクソソームやエアロゾルに関する解析技術を高度に進化させるとともに、生体内解析技術を創出することで、両者に対する生体応答に共通する原理の発見や、両者の相互作用による生命現象の解明と制御に取り組んだ。華山は、一細胞／一粒子エクソソームの高精度・高感度解析技術を確立し、エクソソーム生成を制御する分子と薬剤を同定した。この分子の欠損によりエクソソーム放出を細胞特異的に阻害するモデルマウスを作製し、癌進展におけるエクソソームの新機能を発見した。更に望月と共同で、脳神経由来エクソソームによる α -Synuclein (Syn) mRNA の伝播機構と多系統萎縮症との関連を見出した。望月は更に新たな微粒子として α -Syn Fibril やミトコンドリアの機能を見出した。瀬戸は、エアロゾルへの細胞応答を解析するツールとして、微粒子の分級・捕集・追跡を可能とするエアロゾル細胞曝露システムを構築した。このシステムとマウス肺胞内投与実験から、エアロゾルにより好中球や肺胞上皮細胞からエクソソームの放出が誘発され、エアロゾルの貪食除去や排出促進などの生体防御を担うことを発見した。更に改変エクソソームにより、生体内免疫応答を自在に制御する技術を確立し、連携企業とともにエクソソーム創薬の実現に向け展開している。

本研究で得られた具体的な成果を下記に示す。

(A1) 一細胞由来エクソソームの高精度・高感度解析技術の開発

- ・従来法を改良し、エクソソームの回収率と精製純度を向上させた研究試薬を製品化した。
- ・本技術を用いて超解像顕微鏡により一粒子エクソソームを可視化するキットが製品化された。
- ・本技術を用いて超解像フローサイトメーターの共同開発を開始し、製品化を目指している。

(A2) エクソソーム生成の分子機構の解明

- ・エクソソーム生成制御分子を同定し、細胞特異的に欠損させるモデルマウスを作製した。
- ・この生成制御分子の欠損により、癌進展におけるエクソソームの新機能を明らかにした。
- ・エクソソーム分泌抑制剤と促進剤を同定し、国際特許出願・各国移行を行った。

(A3) 細胞特異的エクソソーム解析用マウスの開発

- ・細胞特異的にエクソソームを蛍光標識できるマウスを作製した。
- ・このマウスを用いて特定の細胞由来エクソソーム上の特異的表面分子を同定した。

(B1) エアロゾルの生体内解析技術の開発

- ・気液界面での微粒子の細胞応答解析のためのエアロゾル細胞曝露システムを製品化した。
- ・大気環境中微粒子の湿式捕集・分析法を確立した。

(C1) 微粒子の生体内動態・応答の解明

- ・エクソソームによる多系統萎縮症と遺伝性 ATTR アミロイドーシスの発症機序を見出した。
- ・PM_{2.5} が自然免疫応答の調節分子の発現を誘導する事を明らかにした。
- ・新たな内因性微粒子として、ミトコンドリア放出機構が神経変性に関与することを見出した。

(C2) 細胞による対微粒子応答の解明

- ・高速・高解像度原子間力顕微鏡による一粒子エクソソーム解析で様々な機能を報告した。
- ・走査イオンコンダクタンス顕微鏡による一粒子エクソソームの解析・操作技術を確立した。
- ・植物においても細胞外小胞が細胞間情報伝達機構として機能していることを見出した。

(C3) 対微粒子応答とその相互作用の制御法の開発

- ・肺における非晶質シリカや酸化鉄ナノ粒子とエクソソームとの相互作用を解明した。
- ・脳において酸化マンガンナノ粒子が特定の脳領域に蓄積することを MRI で可視化した。
- ・免疫応答を制御する改変エクソソームを開発し、国際特許出願・各国移行を行った。

(2) 顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. エクソソームによる癌進展・神経変性の発症機序を解明

概要: エクソソームの高精度・高感度解析技術を用いて、エクソソーム生成を制御する主要分子として TSG101 を同定した。TSG101 の細胞特異的欠損により、生体内でのエクソソーム機能を解析し、癌の進展においてエクソソームが血管新生・転移・骨髄抑制・癌細胞の軟化を引き起こす分子機序を発見した。また、脳において神経細胞由来エクソソームが、多系統萎縮症や遺伝性 ATTR アミロイドーシスなどの神経変性疾患の発症を引き起こす機序を見出した。

2. エアロゾルの分級・捕集・追跡技術を確立

概要: 実大気環境下に存在する微粒子を分級・捕集し、サイズ毎の化学組成を解析する手法を確立した。また肺胞表面を模擬した気液界面エアロゾル曝露実験系を構築し、エアロゾルの細胞応答を追跡する新たなシステムを開発した。実大気微粒子を模擬したモデル粒子を肺胞上皮細胞ならびにマクロファージに投与し、その細胞応答に与える粒子種・濃度・粒子形状などの影響を解析することで、肺胞細胞系と生体外微粒子の免疫学的相互作用を明らかにした。

3. エクソソームとエアロゾルに対する生体応答とその相互作用を解明

概要: 肺胞に侵入した酸化鉄ナノ粒子が、好中球の浸潤とエクソソーム分泌を誘導し、好中球由来エクソソームが、マクロファージによる酸化鉄ナノ粒子の貪食除去と炎症の収束を促進することを発見した。また、非晶質シリカナノ粒子を取り込んだ肺胞上皮細胞が、エクソソーム分泌によりシリカを細胞外へと排出し再取り込みを阻害することで、上皮細胞の癌化を防いでいることを明らかにした。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. エクソソームの高感度検出・分泌制御技術を開発

概要: 従来法より千倍以上にエクソソームを高感度検出できる技術を開発し、連携企業から世界販売を開始した。この解析技術を用いて既存薬化合物ライブラリーからエクソソームの分泌抑制剤と促進剤を同定し国際特許出願を行った。今後、エクソソーム分泌抑制剤は癌転移や神経変性などに関わる悪玉エクソソームの産生抑制に、促進剤は組織修復や再生などに関わる善玉エクソソームの産生促進へと応用されることで、エクソソーム創薬に貢献すると期待する。

2. エアロゾル細胞曝露システムを開発

概要: 分級捕集法の開発により調整した微粒子は、サイズ・化学成分が特定された標準試料として、領域内連携に繋がった。また、エアロゾル細胞曝露システムについては、呼吸器系細胞における様々な外因性微粒子への細胞応答を解析するシステムとして民間企業において製品化を行った。さらに、エアロゾルの気中動態解析や捕集技術は、エアロゾル感染対策技術の開発に寄与した。

3. 改変エクソソームによる免疫制御技術を開発

概要: 複数の免疫制御分子を同時に発現させ免疫制御機能を高めた改変エクソソームの開発を行い、「がん細胞のみを特異的に攻撃する免疫細胞」や「自己免疫疾患・アレルギーのみを特異的に抑制する免疫細胞」などを、体内に効率的に作り出す新規免疫制御法を開発した。様々な疾患や感染症に対する効果的かつ副作用のないエクソソーム創薬の実現を目指す。

＜代表的な論文＞

1. Lyu et al., Surface-engineered extracellular vesicles to modulate antigen-specific T cell expansion for cancer immunotherapy. bioRxiv (2023), doi:10.1101/2023.09.25.559260, Preprint

概要: T 細胞の活性化に必要な、①抗原-MHC 複合体、②補助シグナル、③サイトカインを同時に発現する改変エクソソームを開発した。特に、がん抗原を載せたエクソソームは、がん細胞を攻撃する細胞傷害性 T 細胞を特異的に活性化し、強力な抗がん効果を発揮した。

2. Amma C et al., Copper in airborne fine particulate matter (PM_{2.5}) from urban sites causes the upregulation of pro-inflammatory cytokine IL-8 in human lung epithelial A549 cells. Environ Geochem Health, 45:5879-5891(2023).

概要:大気環境の異なる地域(川崎市、福江島)の PM_{2.5} に含まれる金属の成分分析と肺胞上皮細胞へ炎症誘導機構について解析した。その結果、PM_{2.5} は採取した地域により、異なる炎症誘導能を有すること、また、PM_{2.5} に含まれる金属成分のうち、イオン状態ではなく、特に粒子状態の銅が、肺胞上皮細胞への高い炎症誘導能を示していることを見出した。その成果として、微粒子中の金属成分の採取法ならびに解析・評価法が確立され、細胞への微粒子曝露システムの設計に反映した。

3. Choong Chi-Jin et al., Alternative mitochondrial quality control mediated by extracellular release. Autophagy, 17(10):2962-2974 (2021).

概要:ミトコンドリアストレスを加えた際に、ミトコンドリアが細胞外に放出されることを見出し、特にミトファジー機能が低下している時に顕著に見られることを見出した。ストレスを加えない定常培養状態でもこの放出は見られ、ミトコンドリア品質管理機構としては、ミトファジーと両輪で働いている事を示した。更に、パーキンソン病を起こす Parkin 遺伝子の疾患変異を有する患者由来の線維芽細胞では、細胞外に放出するミトコンドリア量が増加している事を示し、疾患との関連が示唆された。

§2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「華山」グループ

研究代表者:華山 力成(金沢大学ナノ生命科学研究所 教授)

研究項目 A1. 一細胞由来エクソソームの高精度・高感度解析技術の開発

A2. エクソソーム生成の分子機構の解明

A3. 細胞特異的エクソソーム解析用マウスの開発

C1. 微粒子の生体内動態・応答の解明

C2. 細胞による対微粒子応答の解明

C3. 対微粒子応答とその相互作用の制御法の開発

② 「瀬戸」グループ

主たる共同研究者:瀬戸 章文(金沢大学理工研究域 教授)

研究項目 B1. エアロゾルの生体内解析技術の開発

C1. 微粒子の生体内動態・応答の解明

C3. 微粒子の動態・応答の制御法の開発

③ 「望月」グループ

主たる共同研究者:望月 秀樹(大阪大学大学院医学系研究科 教授)

研究項目 A2. エクソソーム生成の分子機構の解明

C1. 微粒子の生体内動態・応答の解明

C3. 対微粒子応答とその相互作用の制御法の開発

④ 「井田」グループ

主たる共同研究者:井田 大貴(名古屋大学大学院工学研究科 特任准教授)

研究項目 C2. 細胞による対微粒子応答の解明

⑤ 「濱田」グループ

主たる共同研究者:濱田 隆宏(岡山理科大学理学部 准教授)
研究項目 C2. 細胞による対微粒子応答の解明

(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

本研究を通して、代表者が目指すエクソソーム創薬を実現するネットワークが形成された。今後も協力して高機能エクソソーム製剤の開発を進めてゆく。富士フイルムとは 2019 年よりアドバイザー契約を結び、エクソソーム解析試薬の開発やその世界展開で密接に協力している。富士フイルムを通じ、世界のトップ研究者との独自のネットワークを確立している。また、日産化学とはエクソソーム分泌抑制剤・促進剤から改変エクソソーム開発まで計 6 件の国際特許を共同出願し、強力なパートナーとなっている。更に、一粒子エクソソーム解析に用いる超解像フローサイトメーターの開発を開始し、数年以内の世界販売を目指している。、これらを通して、**Made in Japan** によるイノベーションを創出し、世界のエクソソーム創薬を先導する展開を目指す。

瀬戸は、エアロゾルの発生・分級・捕集・分析技術に関して、従来のネットワークを更に発展することができた。国際連携として、ナノ粒子の挙動評価については、ミネソタ大学、捕集技術について、韓国成均館大学などと密接なネットワークを構築した。領域内では、同チーム内における融合研究をはじめとして、領域内他チームへの微粒子試料提供を通じて様々な連携が実現できた。さらに、民間企業については、パナソニック・ダイキン・三機工業・ニッタなどとの室内環境における空気浄化技術、トヨタ紡織・アイシンなどとの空間デザイン技術などについて、それぞれ強固なネットワークが形成された。