

2019年度研究実施報告書

(対象期間 2019年11月13日～2020年3月31日)

担当課題 : ヒト組織由来エクソソームの糖鎖プロファイリングによる新しいバイオマーカーの探索

研究機関名 : 国立大学法人北海道大学

研究責任者 : 西村紳一郎 shin@sci.hokudai.ac.jp

【1. 実施内容】

実施項目1 ヒト臓器由来エクソソーム糖鎖データベース構築に向けた基盤技術の確立

1-1 研究目的

ヒト組織由来エクソソーム糖鎖データベースを構築するため、エクソソーム作製のための基本的な方法とそれらの糖鎖プロファイリング技術を確立する。本基盤技術とデータベースを活用して鋭敏な診断用バイオマーカーも有効な治療法も存在しない特発性肺線維症などの難病を含む多くの疾患における新しい診断技術と治療法を開発することを主たる目的とする。

1-2 研究概要・要旨

臓器・組織の糖鎖プロファイリングならびにそれらの培養細胞からのエクソソーム作製法とその糖鎖構造プロファイリング法を確立した。

1-3 実施内容、結果、成果等

健康な（正常）ヒト臓器由来培養細胞からのエクソソーム作製法とその糖鎖構造プロファイリング法（細胞由来エクソソーム糖鎖解析プロトコル）を確立するため、マウスおよびヒトがん培養細胞を用いてエクソソーム調製プロトコルを種々検討した。

その結果、ヒト培養細胞由来エクソソームの糖鎖構造を解析・同定するにあたり、その基本的な構造情報として（1）細胞全体の糖鎖プロファイル（whole *N*-glycan profile）、（2）細胞膜表面糖鎖のプロファイル（surface *N*-glycan profile）、さらに、（3）実際に単離精製したエクソソームの糖鎖（exosomal *N*-glycan profile）を確保する必要があること、また、（4）エクソソームを放出・エンリッチする方法や培地などの諸条件を統一する必要があることなどを明らかにした。

実施項目2 特発性肺線維症のバイオマーカー探索

2-1 研究目的

肺線維化病態マウス組織検体（全20検体）で前年度初歩的な解析で確認した糖鎖構造を確定して指標とするバイオマーカー探索研究をさらに進展させる。

1-2 研究概要・要旨

正常マウスおよび医薬基盤研チームにより作製された肺線維化病態マウス臓器・組織試料を用いて糖鎖構造解析を行い疾患特異的な糖鎖構造を探索した。

1-3 実施内容、結果、成果等

肺線維化病態マウス肺組織サンプル（医薬基盤研チームより供与された特発性肺線維症病態マウス肺組織凍結粉碎試料、DBA/2Crslc および MRL-lpr/lpr : BLM 投与群とコントロールを含めて全 20 検体）すべてについての糖鎖プロファイリングを完了した。

その結果、マウスにおける病態組織（細胞）全体の糖鎖プロファイル (*N*-glycan profiles from whole lung tissue) を初めて獲得した。IPF 疾患マウスに特異的な糖鎖群における発現レベルの顕著な上昇を確認した（実施項目 1 の研究成果と合わせて論文投稿に向けて準備中）。

実施項目 3 マウスの主要臓器由来エクソソーム糖鎖データベース構築に向けた基盤技術の確立

3-1 研究目的

正常マウス臓器・組織由来培養細胞からのエクソソーム作製法とその糖鎖構造プロファイリング法（マウス細胞由来エクソソーム糖鎖解析プロトコル）を確立する。この新たなプロトコルによってマウスの主要臓器・組織由来エクソソームの糖鎖構造のプロファイリングを開始する。正常なマウス臓器・組織についての網羅的エクソソーム糖鎖情報が獲得できれば、マウス血液中のエクソソーム糖鎖プロファイルとの比較から由来臓器・組織を推測する実証試験を実施する。「研究項目 2：特発性肺線維症のバイオマーカー探索」への応用を視野に研究を進める。

3-2 研究概要・要旨

マウス培養細胞由来エクソソームの糖鎖解析プロトコルを確立した。マウスの主要臓器・組織由来エクソソームの糖鎖構造のプロファイリングを開始した。

3-3 実施内容、結果、成果等

実施項目 1 で得られた「ヒト培養がん細胞由来エクソソームの糖鎖構造解析」の結果を踏まえて、マウス肺がん細胞（3LL）をモデルとして、（1）エクソソームを調製する際の培地血清由来エクソソーム（FBS exosomes）の影響を評価すると同時に、（2）細胞全体の糖鎖プロファイル（whole *N*-glycan profile）と実際に単離精製したエクソソームの糖鎖プロファイル（exosomal *N*-glycan profile）の違いを比較した結果、ヒト培養がん細胞で観察されたと同様の傾向があることを確認した。また、（3）超遠心法に代わるエクソソームの簡便・迅速エンリッチ法について比較検討し、それぞれの処方におけるメリット・デメリットを明らかにした。さらに、（4）正常マウスの主要臓器・組織・細胞の糖鎖解析を開始した（2020 年 2 月）。エクソソームの標準的な糖鎖解析法に関する最初の論文投稿に向けて準備中。

【2. 外部発表、論文投稿等】

本研究課題に関連する論文を含む。

1. Soma O., Hatakeyama S., Yoneyama T., Saito M., Sasaki H., Tobisawa Y., Noro D., Suzuki Y.,

Tanaka M., Nishimura S-I., Harada H., Ishida H., Tanabe K., Satoh S., Ohshima C., “Serum *N*-glycan profiling can predict biopsy-proven graft rejection after living kidney transplantation” *Clin. Exp. Nephrol.* **24**, 174-184 (2020)

【3. 知財化について】

特になし。