

細胞外小胞の効率的分離のための機能性マイクロ粒子の創出

Development of Functional Microparticles for Efficient Isolation of Extracellular Vesicles

助成年度 令和7年度研究助成
助成番号 MZR2025002
研究期間 2025/04/01 ~ 2026/03/31
代表研究者 長瀬 健一 (Kenichi Nagase)
広島大学 大学院医系科学研究科

キーワード エクソソーム, 機能性粒子, 温度応答高分子

1. 研究の背景と目的

細胞外小胞 (Extracellular Vesicles; EVs) は、エクソソームを含む脂質二重膜からなるナノサイズの小胞であり、タンパク質、核酸および脂質などの生理活性物質を含有し、細胞間情報伝達に重要な役割を果たしている。近年、細胞外小胞は単なる細胞由来産物ではなく、生体機能の制御に関与する重要な情報伝達媒体として認識されるようになった。そのため、がんや神経変性疾患などの疾患バイオマーカーとして注目されるとともに、核酸医薬やタンパク質医薬の送達キャリアとしても期待されている。さらに、細胞外小胞を利用したリキッドバイオプシーや再生医療への応用研究も活発に進められており、高純度かつ高活性な細胞外小胞を効率的に回収する技術の重要性が高まっている。

現在、細胞外小胞の分離には超遠心分離法、サイズ排除クロマトグラフィー、膜ろ過法などが広く用いられている¹⁾⁻³⁾。しかし、これらの方法は長時間の操作を要することや、細胞外小胞以外

の粒子が混入しやすいこと、分離過程で細胞外小胞の構造や機能が損なわれる可能性があることなどの課題を有している。また、生体試料中には由来や機能の異なる多様な細胞外小胞が共存しているため、疾患由来細胞外小胞など特定の標的細胞外小胞のみを選択的に分離することは容易ではない。そのため、高い選択性と回収効率を有し、かつ温和な条件下で標的細胞外小胞を分離できる新たな技術の開発が求められている。

本研究では、温度変化に応答して可逆的に伸縮する温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) と、細胞外小胞表面タンパク質を認識するペプチドリガンドを組み合わせた機能性マイクロ粒子を開発し、温度変化のみで細胞外小胞の捕捉および放出を制御する新しい分離精製技術の創出を目的とした (図1)。特に、一部のがん細胞由来エクソソームに高発現する HER2 を標的とし、標的細胞外小胞の選択的な分離・回収の可能性について検討した。温度応答性高分子の伸縮挙動を利用してリガンド

の露出・遮蔽を制御することで、従来法よりも簡便かつ温和な条件で細胞外小胞を分離できる技術基盤の構築を目指した。

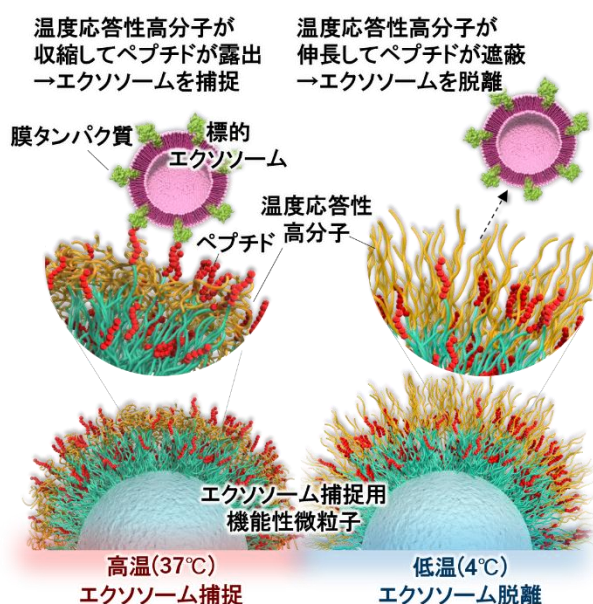


図1 細胞外小胞分離のための機能性微粒子

2. 研究の内容・方法

本研究では、温度変化のみで標的細胞外小胞の捕捉および放出を制御できる機能性マイクロ粒子の開発を行った。分離担体として平均粒径 4 μm のシリカビーズを用い、その表面に温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) および細胞外小胞表面タンパク質を認識するペプチドリガンドを固定化した。ペプチドリガンドには、一部のがん細胞由来エクソソームに高発現する HER2 に特異的に結合するペプチドを用いた(図2)。

本機能性マイクロ粒子では、PNIPAAm の温度応答特性を利用して細胞外小胞との結合性を制御した。PNIPAAm は低温条件では水和して伸長し、高温条件では脱水和により収縮するため、高温ではペプチドリガンドが露出し、標的細胞外小胞と結合する。一方、低温では伸長した高分子鎖がペプチドリガンドを覆うことで細胞外小胞との相互作用を抑制する。このように、温度変化のみで

細胞外小胞の捕捉および放出を制御する機構を設計した。

評価実験では、HER2 を高発現する乳がん細胞株 SK-BR-3 の培養上清から回収したエクソソームをモデル細胞外小胞として用いた。作製した機能性マイクロ粒子をリン酸緩衝液 (PBS) 中に懸濁し、37℃または 4℃に保持した状態でエクソソームを添加した。1 時間反応後、上清中に残存するタンパク質濃度を測定することでエクソソーム捕捉率を評価した。また、HER2 発現エクソソームの選択的な捕捉を確認するため、上清中の HER2 タンパク質量をウェスタンブロッティングにより解析した。

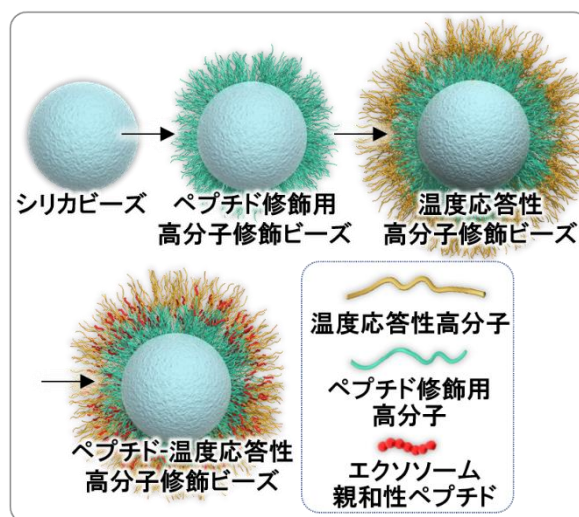


図2 機能性微粒子の作製方法

3. 研究の成果

開発した機能性マイクロ粒子を用いて、HER2 高発現乳がん細胞株 SK-BR-3 由来エクソソームの捕捉特性を評価した。その結果、37℃条件では 4℃条件と比較して有意に高いエクソソーム捕捉率が得られた。さらに、ウェスタンブロッティングにより上清中の HER2 タンパク質量を測定したところ、37℃条件において HER2 タンパク質量の減少が認められ、HER2 発現エクソソームが選択的に捕捉されていることが確認された。

これらの結果から、温度応答性高分子 PNIPAAm

の相転移を利用することにより、表面に固定化したペプチドリガンドの認識能を温度依存的に制御できることが明らかとなった。高温条件では標的細胞外小胞を効率的に捕捉し、低温条件では捕捉を抑制できることから、本手法は温度変化のみを利用して細胞外小胞の捕捉・放出を制御できる新しい分離精製技術として有効であることが示された。

また、本手法は抗体結合体の解離や極端な pH 変化を必要とせず、温和な条件下で細胞外小胞を回収できる点に特徴がある。そのため、細胞外小胞の構造および生理活性を維持したまま回収できる可能性が高く、従来の超遠心分離法や膜分離法を補完する新たな分離プラットフォームとして期待される。

さらに、本研究で構築した機能性マイクロ粒子は、ペプチドリガンドを変更することで様々な疾患関連マーカーを発現する細胞外小胞へ展開可能であると考えられる。したがって、本技術はがん診断用バイオマーカーの解析、疾患特異的細胞外小胞の回収、および細胞外小胞を利用した創薬研究への応用が期待される。

4. 結び

本研究では、温度応答性高分子とペプチドリガンドを組み合わせた機能性マイクロ粒子を開発し、温度変化のみを利用した標的細胞外小胞の分離精製が可能であることを示した。本成果は、細胞外小胞を温和な条件下で回収可能な新規分離技術の基盤となるものであり、今後の診断・創薬研究への応用が期待される。

5. 今後の研究方向性・課題

本研究では、温度応答性高分子とペプチドリガンドを組み合わせた機能性マイクロ粒子により、温度変化のみを利用した標的細胞外小胞の選択的捕捉が可能であることを示した。今後は、細胞外小胞の回収率および純度のさらなる向上を目

的として、温度応答性高分子の分子量や表面密度、ならびにペプチドリガンドの固定化条件を最適化する予定である。

6. 参考文献

- 1) S.Z. Shirejini, F. Inci, The Yin and Yang of exosome isolation methods: conventional practice, microfluidics, and commercial kits *Biotechnol. Adv.*, 54, 107814 (2022)
- 2) T. Liangsupree, E. Multia, M.L. Riekkola, Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles, *J. Chromatogr. A*, 1636, 461773 (2021)
- 3) I. Kimiz-Gebologlu, S.S. Oncel, Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake *J. Contr. Release*, 347, 533-543 (2022)

7. 論文・発表

- 1) K. Nagase and H. Kanazawa, Temperature-modulated separation of therapeutic cells, viral vectors, and exosomes using functional polymers, *Anal. Sci.* 41, 1251-1267 (2025)
- 2) K. Nagase, Innovative bioseparation technologies employing thermoresponsive polymer interfaces *Polym. J.*, 58, 181-205 (2026)
- 3) K. Nagase, Effective separation of next-generation therapeutics using thermoresponsive polymers, *35th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA2025)*, July, 14th 2025
- 4) K. Nagase, Innovative separation methods of next-generation therapeutics using thermoresponsive polymer modified

interfaces, *ISNM2025-18th International Symposium on Nanomedicine*, Dec, 1st 2025

- 5) K. Nagase, Temperature-modulated Separation of Next-generation Medicines Using Thermoresponsive Functional Polymers, *PacifiChem2025*, Dec, 18th 2025

8. その他

本研究に助成を賜った一般財団法人向科学技術振興財団の関係各位に厚く御礼申し上げます。