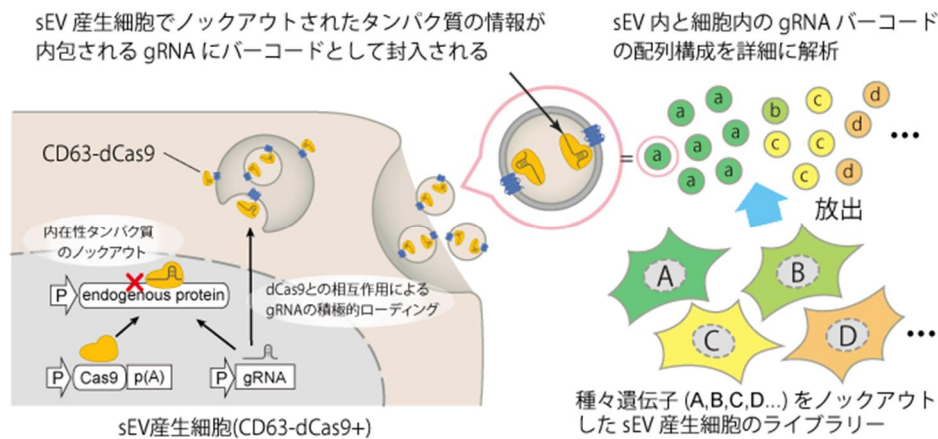


東京大学  
科学技術振興機構 (JST)

## 細胞外小胞の放出制御因子を網羅的に解析する方法を開発 ——CRISPR gRNA で「バーコード化」した細胞外小胞を活用して——

### 発表のポイント

- ◆細胞間コミュニケーションの重要な媒体であり、狙った場所に薬を運ぶドラッグキャリアなどとしても期待される小型の細胞外小胞(small EVs, sEV)の放出を制御する因子を、CRISPR gRNA で「バーコード化」した sEV を利用して網羅的に解析する手法を開発しました。
- ◆これまでは、細胞を別々のウェルに播種し、その中でそれぞれの因子が sEV の放出に影響を与えるかを個別に評価するのが典型的な手法でしたが、本研究で開発した手法により、1つのフラスコ内で数千もの遺伝子が sEV の放出に与える影響を一斉に解析可能になりました。また、これまで不明な点が多かった sEV の亜集団ごとの放出制御の違いも明らかになりました。
- ◆本研究で得られた大量のデータをもとに、sEV の基礎生物学の大きな進展が見込める他、sEV が重要な役割を果たす疾患の治療法の開発や、疾患治療用の sEV の効率的生産法の開発などにつながることを期待されます。



本研究で開発した sEV 放出制御因子の網羅的解析法(CIBER screening 法)の概略

### 概要

東京大学大学院医学系研究科の小嶋良輔准教授、國武厚貴特任研究員(研究当時:東京大学大学院薬学系研究科大学院生)、東京大学大学院薬学系研究科の水野忠快助教、浦野泰照教授(東京大学大学院医学系研究科兼任)らによる研究グループは、小型の細胞外小胞(small Extracellular Vesicles, sEV, 注 1)の放出を制御する因子を網羅的に解析する新手法、CIBER screening 法を開発しました。本研究では、細胞内で遺伝子のノックアウト(KO)に用いる CRISPR/Cas9 システム(注 2)のガイド RNA(gRNA)を、sEV 内に核酸バーコードとして封入する手法を開発し、このバーコード配列を次世代シーケンサー(注 3)によって一斉解析することで、sEV の放出制御因子の網羅的な探索を実現しました。本手法を用いて、sEV の放出制御因子を多数発見するとともに、これまで不明な点が多かった、異なる sEV の亜集団(注 1)に特異的な放出制御因子を見出すことにも成功しました。

## 発表内容

sEV は、生体内で細胞間コミュニケーションを媒介する重要な役割を果たします。がんなどの種々の疾患において、sEV が病態の進展に関与することが報告されていることから、特定の細胞からの sEV の放出の阻害が疾患治療戦略になり得ると考えられている他、sEV は、天然由来のドラッグキャリアなどとしても注目されており、その効率的な生産方法が求められています。このような背景から、sEV の放出過程を理解し、制御可能にすることは、基礎・応用の両面から重要です。一方、これまでの sEV 放出制御因子の探索法は、細胞を別々のウェルに播種し、タンパク質の発現や活性を 1 つ 1 つ変化させ、放出される sEV の放出量を個別に評価する、という手法が主流でした (図 1 上)。しかしながら、sEV の放出過程は、様々な因子によって複雑に制御されており、このような古典的な手法を用いて sEV の放出を制御する因子を包括的に理解することは困難でした。

このような背景において本グループでは、CRISPR/Cas9 システムにおいて遺伝子の KO に用いる gRNA を“バーコード”として封入した sEV を活用することで、sEV の放出を制御する因子を網羅的かつ sEV の亜集団特異的に、高効率に解析する新方法、“CIBER screening”法を開発しました。本手法は、古典的な手法とは異なり、1 つのフラスコ内で、数千種類の遺伝子が sEV の放出に与える影響を網羅的に解析可能にするものです (図 1 下)。

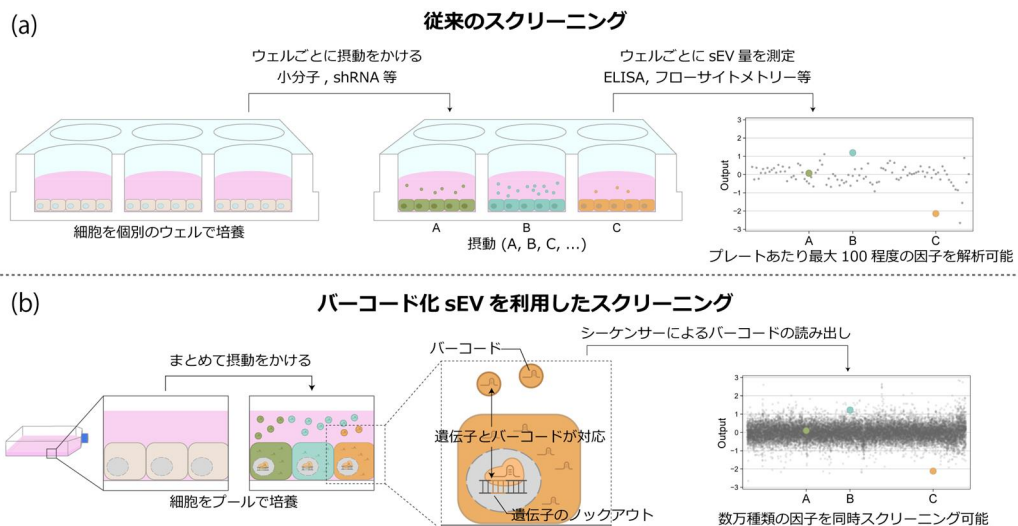


図 1: sEV の放出制御因子の評価法に関して、従来法と本研究で開発された手法(CIBER screening 法)の比較。

(a) 従来法。別々のウェルに細胞を播種し、個別に評価を行うため、効率が悪い。(b) CIBER screening 法。「バーコード化」した sEV を用いることで、1 つのフラスコ内で、数千以上の因子を超並列解析可能。

本グループは、まず、標的遺伝子を KO する際に使用する Cas9 の gRNA を、EV マーカータンパク質(CD63)に融合した dead Cas9 (dCas9, 注 2)との相互作用によって、sEV 内に積極的に封入する手法を開発しました(図 2 左)。これにより、sEV 内に封入された gRNA の配列を読み出すことで、これを放出した細胞においてどのような遺伝子が KO されていたのか、ということを追跡でき(gRNA による sEV の「バーコード化」)、またその sEV 内の gRNA を定量することで、当該遺伝子が KO された細胞から放出される sEV の量を推定することが可能になります(図 2 右, 図 1 下)。1 つのフラスコ内にそれぞれ異なる遺伝子が KO された細胞のプール(数千種類以上)を用意し、細胞内と、そこから放出される sEV 内の gRNA バーコードの組成比を次世代シーケンサーによって一斉に解析することで、sEV の放出制御因子を網羅的に解析することが可能になりました。

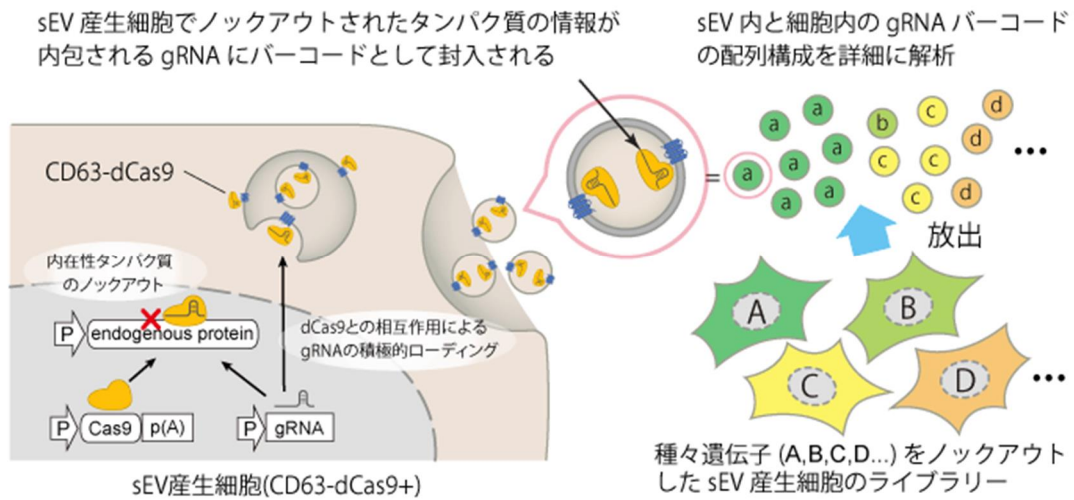


図 2: 本研究で開発した CIBER screening 法の概略。

細胞内で遺伝子のノックアウトに利用した CRISPR gRNA を sEV 内にバーコードとして封入する。sEV 内と細胞内の gRNA バーコードの配列構成を比較解析することで、sEV 放出制御因子の網羅的抽出が可能になる。

また、一般に、sEV は表面に発現するタンパク質や、膜組成が異なる亜集団の集合体であることが知られていますが、異なる sEV 亜集団の放出がそれぞれどのような形で制御されているかはほとんどわかっていませんでした。本グループは、代表的な sEV マーカーとして知られる CD63 と CD9 に着目し、CD63<sup>+</sup> の sEV と CD9<sup>+</sup> の sEV にそれぞれ gRNA バーコードを搭載して別個に CIBER screening を行い、その結果を様々なバイオインフォマティクス(注 4)の手法を駆使して解析することで、CD63<sup>+</sup> sEV は多胞体由来のいわゆる“エクソソーム”が多い一方で、CD9<sup>+</sup> sEV は細胞膜から直接出芽する“エクトソーム”が多いことや、後者の放出が細胞周期に同期していることなどを明らかにしました(図 3)。

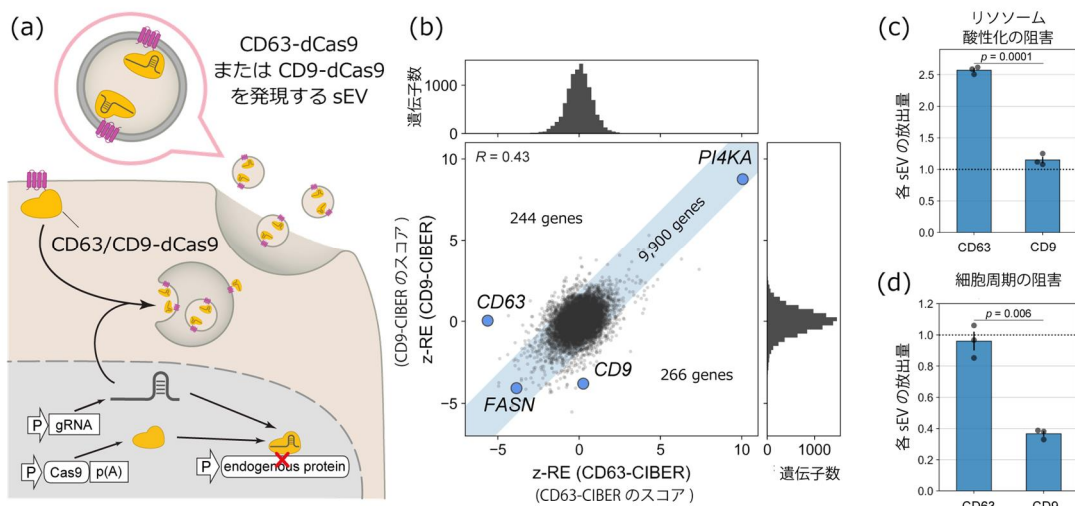


図 3: CIBER screening による CD63<sup>+</sup> sEV と CD9<sup>+</sup> sEV の放出制御因子の比較。

(a) 測定系の概略。(b) CD63 CIBER-screening と CD9 CIBER screening の結果の比較。それぞれの sEV 亜集団の放出に同じように影響を与える因子、異なる形で影響を与える因子がそれぞれ存在する。(c) “エクソソーム”が多い CD63<sup>+</sup> sEV の放出は、細胞のリソソーム活性に大きく影響される。(d) CD9<sup>+</sup> sEV の放出は細胞周期を止めると減少する。

本研究で開発した CIBER screening 法は、sEV の基礎生物学研究を大きく前進させ得る情報を大量に提供する他、今後様々な細胞に適用することで、sEV が関与する種々の疾患の治療法の開発につながることを期待されます。また、sEV が、ドラッグキャリアや、抗炎症作用を持つ薬剤として注目されていることも鑑みると、将来的に治療に応用可能な sEV の効率的生産法の開発などにつながることも見込まれます。

## 発表者・研究者等情報

東京大学

大学院医学系研究科

小嶋 良輔 准教授

國武 厚貴 特任研究員

研究当時：東京大学 大学院薬学系研究科 博士課程大学院生

大学院薬学系研究科

水野 忠快 助教

浦野 泰照 教授

兼任：東京大学 大学院医学系研究科 教授

## 論文情報

雑誌名：Nature Communications

題名：Barcoding of small extracellular vesicles with CRISPR-gRNA enables comprehensive, subpopulation-specific analysis of their biogenesis/release regulators

著者名：Koki Kunitake, Tadahaya Mizuno, Kazuki Hattori, Chitose Oneyama, Mako Kamiya, Sadao Ota, Yasuteru Urano, Ryosuke Kojima\*

DOI：10.1038/s41467-024-53736-x

URL：<https://www.nature.com/articles/s41467-024-53736-x>

## 研究助成

本研究は、JST 創発的研究支援事業(課題番号：JPMJFR214N)、JST 戦略的創造研究推進事業 さきがけ(課題番号：JPMJPR17H5)、JST 戦略的創造研究推進事業 CREST(課題番号：JPMJCR19H1, JPMJCR23B7)、Human Frontier Science Program (課題番号：CDA-00008/2019-C)、科研費 学術変革 B(課題番号：24H00868)、新世代研究所 ATI 研究助成 の支援により実施されました。

## 用語解説

(注 1) small Extracellular Vesicles (sEV)とその亜集団：細胞外小胞(EV)の中でも、直径 30-200 nm 程度の EV は、small EV(sEV)と呼ばれます。sEV は、多胞体由来のいわゆる“エクソソーム”や、細胞膜由来の“エクソソーム”などの亜集団の不均一な集合体と考えられます。sEV の代表的なマーカータンパク質としては、CD9, CD63, CD81 などのテトラスパニン(4 回膜貫通型膜タンパク質の総称)などが挙げられますが、それぞれのマーカータンパク質はすべての粒子に同じように発現しているわけではなく、粒子ごとに個性があることが知られています。

(注2) CRISPR/Cas9 システム、dCas9 : DNA を切断する酵素である Cas9 と、Cas9 を標的 DNA にリクルートする gRNA を共発現することで、狙った遺伝子を KO することが可能なゲノム編集技術です。dCas9 は、DNA 切断活性を持たないが、gRNA には結合する Cas9 の変異体であり、本研究では gRNA に対する RNA 結合タンパク質として利用しています。

(注3) 次世代シーケンサー : 数百万~数億以上の核酸配列を同時に配列決定可能なシーケンサーであり、本研究では gRNA バーコードの組成を一斉解析するのに用いています。

(注4) バイオインフォマティクス : 生命科学と情報学・統計学などの融合分野の1つ。本研究では、CIBER screening によって得られた大量の情報と、既知のタンパク質間・遺伝子間ネットワークの情報などを網羅的に比較解析することで、sEV の放出に重要な生物学的プロセスを抽出しています。

## 問合せ先

(研究内容については発表者にお問合せください)

東京大学大学院医学系研究科  
准教授 小嶋 良輔 (こじま りょうすけ)  
Tel : 03-5841-3568 E-mail : kojima@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院医学系研究科 総務チーム  
Tel : 03-5841-3304 E-mail : ishomu@m.u-tokyo.ac.jp

東京大学大学院薬学系研究科 庶務チーム  
Tel : 03-5841-4702 E-mail : shomu@mol.f.u-tokyo.ac.jp

科学技術振興機構 広報課  
Tel : 03-5214-8404 E-mail : jstkoho@jst.go.jp

<JST 事業に関すること>  
科学技術振興機構 創発的研究推進部  
東出 学信 (ひがしで たかのぶ)  
Tel : 03-5214-7276 E-mail : souhatsu-inquiry@jst.go.jp