

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08477

研究課題名(和文)がん転移治療のための新規オーダーメイド型転移臓器指向性エクソソーム製剤の開発

研究課題名(英文)Development of siRNA delivery system using exosome targeting for metastasis organs for cancer metastasis therapeutics

研究代表者

樫川 舞 (Hazekawa, Mai)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10509186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究において、がん細胞が産生するエクソソームはがん細胞の転移先臓器への指向性を規定する可能性が示された。そこで、本研究ではメラノーマ肺転移モデルマウスの自己血清よりエクソソームを抽出し、siRNAを導入した自己成分を素材としたエクソソーム製剤を調製し、自家移植後の肺転移に対する治療効果を検討することを目的とした。その結果、がんマウス血清由来のエクソソームは、正常マウス血清由来エクソソームと比較して肺への集積量が高く肺指向性キャリアとして有用であることがわかった。さらに、メラノーマ自然転移モデルにおける自己エクソソーム製剤投与群の肺転移コロニー数は、コントロール群と比較して有意に減少した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、核酸キャリア開発において、個別化医療の基盤研究の一つとして、自己の生体由来成分を利用した核酸キャリアの創出を目指し、がん種および転移先がカスタム可能なオーダーメイド型システムの構築に成功した。本研究の独自性は、自己の生体成分を利用することによる免疫原性の軽減だけでなく、キャリア自体がすでに転移先の臓器を指向し、従来のエクソソームの機能である遠隔の他の細胞にRNAを運び情報を伝える性質を最大限に生かしたキャリア設計から治療戦略にあり、他の研究グループではこれまで実施されてこなかった独自の基盤研究技術開発に至った。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are small membrane vesicles containing functional biomolecules that can be horizontally transferred to recipient cells. It has been known that molecules present on tumor-derived exosomes are 'addressing' them to specific organ. The purpose of this study was to prepare siRNA delivery system using exosome derived from autologous serum of melanoma lung metastasis in mice model, which is 'addressing' to specific organ. Melanoma lung metastasis model mice were treated with exosome transfected siRNA intravenously after surgical removal of the tumor in the hind limb induced by the subcutaneous injection of B16/BL6. The number of lung metastatic tumor cells of exosome treatment group was significantly decreased compared with control. These results suggested that autologous serum-derived exosomes of melanoma-bearing mice can be used potentially as an efficient siRNA delivery carrier for melanoma lung metastasis targeting.

研究分野：難治性疾患のためのテーラーメイド型薬物標的技術開発

キーワード：エクソソーム siRNA メラノーマ 転移がん 指向性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を用いたこれまでの実験で、癌細胞が分泌するエクソソーム(直径約 30~100 nm の細胞外分泌小胞)が、癌細胞自身と同一の経路を経て、血行性・リンパ行性転移、さらには転移先臓器への指向性を規定している可能性を証明してきた (Kawakubo, Hazekawa, et al, *J Oral Biosci*, 2016)。また、同様の現象が、口腔癌のみならず多くの癌種でも生じていることが、現在までに多数報告されている (Hoshino, et al, *Nature*, 2015)。エクソソームには、mRNA、microRNA、DNA 等の核酸分子の他、蛋白質や脂質などの多種多様な機能性分子が含まれ、それらの分子は、脂質二重膜に囲まれることで体液中でも安定的に存在している。また、取り込まれた細胞の内部で、それら内包分子群は活性型として機能していることが分かっており、エクソソームの細胞間情報伝達ツールとしての意義は大きい。すなわち、「エクソソームは、核酸や蛋白質などの物質を安定した状態で届けるための天然の DDS 製剤である」と言える。しかしながら、がん研究において、エクソソームの役割やエクソソームに内包される成分は注目されていたものの、エクソソームの顆粒自体の機能に関する研究やがん細胞由来エクソソームの転移臓器指向性を利用するキャリア開発に関する研究はほとんどなされていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、ポリ乳酸・グリコール酸共重合体 PLGA に代表される生分解高分子を素材した薬物送達技術の開発を進めており、特に難治性疾患であるがん転移治療薬開発を目指し、人工核酸や活性ペプチドを含有するナノキャリア設計により安全な素材でがん細胞選択的な薬物送達技術開発に精力的に取り組んできた。過去の検討において、卵巣癌腹膜播種(転移)治療薬、siRNA-PLGA ハイブリッドミセル製剤の局所製剤としての有用性を見出した。腹腔内投与を想定し、免疫細胞・がん細胞の両方に発現する標的遺伝子の発現抑制により、炎症抑制とがん細胞の増殖・転移抑制の相加的作用により、顕著な治療効果を得た。しかしながら、他のがん種にも対応可能な薬物送達技術開発のためには、静脈内投与が可能な剤形で、抗原性が低い剤形で、標的細胞選択的に送達される粒子設計が次なる課題として残された。そこで、課題となった抗原性の低い設計については自己成分であること、標的細胞選択的な送達技術については、自己成分の中でその素材自身が指向性を有することを満たすエクソソームは、課題解決が期待できる薬物キャリアとなり得ると考え、がん細胞由来の自己血清由来エクソソームを薬物キャリアとする癌転移治療のための【天然の DDS 製剤】を確立すべく、内容物を加工したエクソソームの自家移植を行うことで癌転移巣の制御を行う治療法の分子基盤確立を目指す。

3. 研究の方法

研究1 転移マウスモデルの血清由来エクソソームの単離とその臓器指向性評価

(1) 肺自然転移マウスモデルの作成

マウスメラノーマ細胞株 B16/BL6 を 6 週齢雌性 C57BL/6 マウスの皮下に 2×10^5 個移植し、28 日後に腫瘍切除を行い、さらに 14 日後に開胸し、肺転移コロニー数を評価した。

(2) 自己エクソソームの単離

転移マウスモデルより採血を行い、その血清からエクソソーム抽出キットを使用してエク

ソソームを抽出した。得られたエクソソームの同定にはウェスタンブロッティングによりテトラスパニン類 CD9、63、81 の発現と粒度分布については Nanosight を用いて評価した。

(3) 自己エクソソームの臓器指向性の検討

抽出したエクソソームに蛍光色素インドシアニングリーン (ICG) を封入し、分子イメージング装置を用い、マウスに尾静脈内投与後の各種臓器への集積性を評価した。

研究2 自己エクソソーム製剤の調製と転移モデルマウスを用いた薬効評価

(1) 自己エクソソームへの遺伝子導入 (自己エクソソーム製剤の調製) とその製剤評価
自己エクソソームへ遺伝子導入は、遺伝子導入試薬 Lipofectamine を用いた。In vitro 評価として、マウスメラノーマ細胞株 B16/BL6 にエクソソーム製剤添加後、ウェスタンブロッティングでタンパク量を定量した。

(2) 自己エクソソーム製剤の臓器指向性とその薬効評価

製剤の体内分布評価には、Alexa488 標識 siRNA を封入したエクソソーム製剤を静脈内投与により自家移植し、分子イメージング装置によりエクソソームおよび siRNA の肺への集積量を蛍光強度で評価した。対象は正常マウス血清由来エクソソームに封入した自己エクソソーム製剤とした。次に薬効評価では、エクソソーム製剤を自家移植した転移モデルマウスにおいて、その転移コロニー数の計測、生存率の評価を行った。

4. 研究成果

研究1 転移モデルマウスの血清由来エクソソームの単離とその臓器指向性評価

抽出したエクソソームにはテトラスパニン類の発現が認められ、約 50 ~ 150nm の粒子であることが確認できた。しかしながら、血清、尿など生体成分の由来により抽出されるエクソソームのテトラスパニン類の発現の割合に違いが認められることが明らかとなった。転移モデルマウスの血清から抽出したエクソソームは、正常マウス血清から抽出したエクソソームよりも肺指向性があることが明らかとなった。体内 (主要臓器) 全体のエクソソームの分布としては血液量の多い臓器が最も多く、高い順から肝、腎、脾、肺の順であった。

研究2 自己エクソソーム製剤の調製と転移モデルマウスを用いた薬効評価

血清より抽出したエクソソームには遺伝子導入試薬による一般的な方法で siRNA の導入に成功した。エクソソームは、細胞実験において、これまで使用してきた siRNA-高分子からなるコンジュゲートミセルよりも高効率で細胞内に導入され、細胞親和性が非常に高いことが明らかとなった。さらに、肺自然転移モデルマウスによる薬効評価についてはメラノーマの標準治療薬である抗 PD-1 抗体やダカルバジンよりも有意な治療効果が確認でき、本製剤は、メラノーマの肺転移治療に有用な製剤であることが明らかとなった。肺指向性についても、がんマウス血清由来エクソソーム製剤は、正常マウス血清由来エクソソーム製剤と比較し、有意に肺集積性が高い結果が得られた。

本研究により、転移臓器を指向するがん由来エクソソームの核酸キャリアとしての有用性に関する新たな知見が得られた。今後は、転移先を指向する根拠となるがん由来エクソソームの表面分子の特定や本来エクソソーム内に有している miRNA の除去方法、血清エクソソームからがん由来エクソソームの選択的抽出方法の確立など、さらに詳細な知見を得ることで、今後のエクソソームを用いた薬物送達技術開発の発展に繋がりたいと強く考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimada Y, Hazekawa M	4. 巻 2174
2. 論文標題 Developing a model for an siRNA delivery system by cancer implantation into zebrafish circulation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Bio	6. 最初と最後の頁 263-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0759-6_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 樋川 舞	4. 巻 3(14)
2. 論文標題 Glypican-3を標的とした核酸医薬を用いた卵巣がん腹膜転移治療の有用性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 71-74
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 樋川 舞	4. 巻 34
2. 論文標題 自己成分由来エクソソームを用いたがん転移治療のための核酸医薬の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 55-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 樋川 舞	4. 巻 2
2. 論文標題 がん転移治療のための転移臓器指向性自己血清エクソソーム製剤の有用性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 165-167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 櫛川 舞	4. 巻 35
2. 論文標題 自己成分由来エクソソームを用いたがん転移治療のための核酸医薬の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 63-70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 櫛川 舞	4. 巻 2
2. 論文標題 がん転移治療のための転移臓器指向性自己血清エクソソーム製剤の有用性	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 79081
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 櫛川 舞	4. 巻 44
2. 論文標題 がん転移治療のための転移臓器指向性エクソソーム製剤の開発	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 594-595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.
2. 発表標題 Specific recognition for target cells using Fab'-PLGA/siRNA-PLGA mixed micelles
3. 学会等名 7th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.
2. 発表標題 Development of siRNA delivery system using exosome derived autologous component in melanoma lung metastasis mice model
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樫川舞、西中川拓也、安河内（川久保）友世、中島学
2. 発表標題 メラノーマ転移モデルを用いた自己血清エクソソーム製剤に関する検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.
2. 発表標題 Autologous serum-derived exosomes to deliver siRNA to melanoma cell in lung metastasis
3. 学会等名 78th FIP world congress of pharmacy and pharmaceutical sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.
2. 発表標題 Development of siRNA delivery system using exosome derived autologous component in melanoma lung metastasis mice model
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 檜川舞、西中川拓也、安河内(川久保)友世、中島学
2. 発表標題 メラノーマ自然転移モデルを用いた自己血清エクソソーム製剤に関する検討
3. 学会等名 日本薬剤学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mai Hazekawa, Takuya Nishinakagawa, Tomoyo Kawakubo-Yasukochi, Manabu Nakashima
2. 発表標題 Autologous serum-derived exosomes to deliver siRNA to melanoma cell in lung metastasis
3. 学会等名 78th FIP world congress of pharmacy and pharmaceutical sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 医薬組成物及びその製造方法	発明者 檜川舞	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-143848	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

福岡大学薬学部免疫・分子治療学研究室ホームページ https://www.cis.fukuoka-u.ac.jp/~lab00011/index.html

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------