

令和 元年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19390

研究課題名(和文) 血中滞留性の高い細胞外小胞画分の探索・同定とその生理機能の解明

研究課題名(英文) Exploration of extracellular vesicles with long blood retention time and evaluateion of its physiological function

研究代表者

高橋 有己 (Takahashi, Yuki)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：00547870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は、エキソソームと呼ばれる細胞外小胞をはじめとした多様な種類の細胞由来微粒子を放出していることが最近明らかとなり注目されている。本研究では、細胞から放出される微粒子を種々の方法で分画した後、各画分の血中滞留性を評価することで血中滞留性の高い細胞由来微粒子を探索した。その結果、細胞から放出される、血中滞留性の高い微粒子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新規の血中滞留性の高い細胞由来微粒子の発見に成功した。このような微粒子は、生体内で未知の機能を有している可能性が存在することから、新規の細胞機能の発見につながる可能性がある。また、このような血中滞留性の高い細胞由来微粒子の性質を明らかとすることができれば、優れたデリバリーキャリアの創出も可能になり、優れた治療法の開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, it was found that cells release various types of cell-derived particles such as vesicles known as exosomes. In this study, cell-derived particles with long retention time in blood was explored by evaluating blood circulation half-life of cell-derived particle samples prepared by separation using various methods. As a result, cell-derived particles with long retention time in blood was found.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：細胞由来小胞 エキソソーム ルシフェラーゼ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞が分泌する細胞外小胞 (extracellular vesicle; EV) は、その産生細胞に由来するタンパク質・核酸・脂質等の分子を内包している。EV はその産生機構から、アポトーシスの進行に伴い形成されるアポトーシス小体、細胞膜が出芽するような形で放出される microvesicle、多胞体 (multivesicular body) が細胞膜と融合することで放出される exosome (エキソソームあるいはエクソソーム) とに大別される。中でも exosome が内包する micro RNA (miRNA) がその取込み細胞に送達されることが明らかとされて以降、その生理機能の解明を目的とした検討が行われ、exosome をはじめとした EV が介する細胞間の情報伝達が癌の転移・浸潤、免疫応答や炎症反応、アルツハイマー病などさまざまな局面において重要な役割を果たしている可能性があるが示されている。

一方で、以下に記述するように、研究代表者らをはじめとした体内動態特性を評価した検討において、体外から静脈内に投与された EV の大部分はマクロファージに取り込まれることで血中から速やかに消失することが明らかとなっている。このような動態特性は血液中には種々の細胞から分泌された EV が存在し様々な機能を果たしているという報告との整合性は低い。その理由としては、体内においては多数の細胞から多数の EV が放出される一方で、速やかにマクロファージに取り込まれることで消失するという平衡関係が成り立っているために、血中には EV がある程度多数存在するとも考えられる。しかしながら、このような平衡関係のもとにある EV がその生理機能を発揮するのは困難とも考えられる。一方で、細胞から放出される小胞がすべて均一な性質を有する、ということも想定しづらいことから、放出された EV の大部分は速やかにマクロファージに取り込まれるものの、一部マクロファージに取り込まれにくい EV が存在しており、そのような画分が血中に存在するとともに、生理機能の発現に重要な役割を果たしているのではないかと、という仮説も成立する。

内因性の細胞間物質輸送機構である exosome は天然のデリバリーキャリアであることから、これを利用したドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が期待されている。研究代表者はこれまでに、exosome を利用した DDS の開発を目的として、その体内動態情報を解析してきた (J Biotechnol, 2013; J Pharm Sci, 2015, 2017; J extracellular Vesicles, 2015; Eur J Pharm Biopharm, 2016; Eur J Pharm Sci, 2016; Biomaterials, 2016)。その結果、発光性レポータータンパク質 *Gaussia* luciferase (gLuc) と、エキソソーム移行性タンパク質 Lactadherin (LA) の融合タンパク質、gLuc-LA を利用した exosome 標識法を開発し、gLuc-LA 標識された exosome をマウス尾静脈内に投与したところ、投与された大部分の exosome はマクロファージに取り込まれることで速やかに血中より消失することを見出した。一方で、その血中濃度推移を分析すると、速やかに消失した後比較的緩やかに消失するという二相性のプロファイルを示すことも明らかとなったことから、回収し投与した exosome の多くは血中滞留性の低いものであったが、高い血中滞留性を示す exosome (あるいは EV) が極少量混在していたのではないかと推察された。

そこで予備的検討として、高用量の gLuc-LA 標識 exosome を投与したマウスから投与 1 時間後に血清を回収し、これを別のマウスへと投与しその血中濃度推移を評価した。その結果、このような血清を投与したマウスにおいて、持続的な血中濃度推移が得られた。一方で、培養細胞より回収した gLuc-LA 標識 exosome を血清と混合後に投与しても持続的な血中濃度推移は得られなかった。従ってこの結果は、マウスに投与して一定時間経過後に回収された血清中には、高い血中滞留性を示す画分が多く残存していたため、これを別のマウスに投与することで高い血中滞留性が得られたことを示すのではないかと考えられた。以上のような背景から、細胞が分泌する EV の中には高い血中滞留性を示す画分が存在するのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

Exosome をはじめとした EV が生体内において果たす役割は近年注目を集めており、その機能解明を目的とした検討が盛んに行われている。一方で、そのような検討においては、段階遠心により microvesicle やアポトーシス小体を除いたのち、超遠心により沈降させることで回収した画分が exosome として用いられることが多い。しかしながら、このような方法により回収される exosome については、実際に生体内で機能している exosome の実態を反映するとも限らない。

生体内における EV の機能を考慮すると、マクロファージに取り込まれずに血中に比較的長期に存在可能な EV が、遠隔臓器・組織に作用可能な EV ではないかと想定できるが、このような視点からの検討は存在しない。研究代表者の経験をもとに着目した、高い血中滞留性を示す EV の画分についての詳細が明らかとなることで、EV の機能解明を目的とした研究に大きな影響を与えるのではないかと期待した。また、高い血中滞留性を示す EV の組成や物性を評価することで、その高い血中滞留性を可能とする要因が明らかとなれば、種々の DDS の開発においてしばしば大きな問題となっているマクロファージによる取込みの回避を可能とする DDS の処方への参考になりうることから、DDS の開発に有用な指針を与えるのではないかと期待した。そこで本研究では、血中での滞留性を評価項目として高い血中滞留性を示す EV の画分の探索・同定を行うこととした。

3. 研究の方法

・細胞

モデルの細胞としてマウスメラノーマ細胞株 B16BL6 細胞を用いた。B16BL6 細胞は、10%の牛胎児血清を添加したダルベッコ変法培地を用いて、37 度、5 %CO₂ の湿潤環境にて培養を行った。

・遺伝子導入

以前の検討にて構築した gLuc-LA をコードしたプラスミド DNA である pCMV-gLuc-LA は、定法にて調製した。B16BL6 細胞への pCMV-gLuc-LA の遺伝子導入は、PEI Max を用いて行った。

・分画用の培養上清サンプルの回収

gLuc-LA を遺伝子導入して 4 時間後に、B16BL6 細胞の培地を無血清のダルベッコ変法培地に変更し、さらに 24 時間培養した。その後、培養上清を回収し、300g で 5 分遠心、2000g で 10 分遠心することで、細胞の死骸を除去した。

・遠心操作による分画

上記で調製した分画用培養上清サンプルを、30,000g で 1 時間、100,000g で 1 時間、200,000g で 6 時間、と順次遠心操作を行い、各遠心段階で得られた沈殿物を回収した。最終的に 200,000g で 6 時間遠心した後の上清画分もサンプルとした。

・密度勾配による分画

上記で調製した分画用培養上清サンプルを、OptiPrep にて調製した密度勾配緩衝液の上に重層し、100,000g で 18 時間遠心後、上から段階的にフラクションを回収した。

・限外濾過による処理

それぞれの操作で得られた画分について、さらに 100kDa の MWCO 膜を有する限外濾過カラムを用いて、何らかの粒子に結合している gLuc-LA と、フリーの可溶性タンパク質として単独で存在する gLuc-LA (分子量：約 60kDa) とを分離した。

・サイズ排除クロマトグラフィーによる分画

セファクリルを担体としたサイズ排除クロマトグラフィーに、上記で調製した分画用培養上清サンプルをアプライし、溶出駅をフラクション化して回収することで分画を行った。

・血中滞留性の評価

雄性の 5 週齢の ICR マウスに、上記の検討で回収したそれぞれのサンプルを尾静脈より投与した。投与後、経時的に採血を行った。回収した血液サンプルは、4 度にて 2 時間以上静置した後、8000g で 20 分遠心することで血清を得た。回収した血清サンプルを、ピッカジーンデュアル試薬と混合した後、得られる発光強度をルミノメーターで測定し、各時点でのルシフェラーゼ活性を測定した。あらかじめ測定しておいた投与液のルシフェラーゼ活性で各時点のルシフェラーゼ活性を除き、その値を時間軸にプロットすることにより、各サンプルの血中濃度推移プロファイルを作成し、そのデータを基に血中滞留性を評価した。

・透過型電子顕微鏡観察

各サンプルをフォルムバル/カーボン被覆 TEM グリッドに滴下し、風乾した後、1%グルタルアルデヒドで固定した。固定後、リン酸緩衝液にて洗浄した後、酢酸ウランでネガティブ染色を行った。このサンプルを透過型電子顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

・遠心操作による分画結果

各段階で得られたサンプルの血中滞留性を評価したところ、より強い力で遠心することで得られた沈殿物、すなわちサイズ・密度の小さい粒子ほど、高い血中滞留性を示すことが明らかとなった。遠心操作により得られるサンプルの中では、200,000g で 6 時間遠心した後の上清画分が最も高い血中滞留性を示した。

・密度勾配による分画結果

密度勾配により分画したところ、大きく分けて密度が軽い範囲 (1.03 g/ml 前後) および密度が大きい範囲 (1.09 g/ml 前後) の 2 か所にピークが得られた。そこでこの 2 か所のサンプルの血中滞留性を評価したところ、密度の小さいサンプルの方が高い血中滞留性を示すことが明らかとなった。

・サイズ排除クロマトグラフィーによる分画の結果

サイズ排除クロマトグラフィーによる分画を試みたが、明確に分離されるフラクションは認められなかった。従って、サイズ排除クロマトグラフィーによる分画は困難と考え、サイズ排除クロマトグラフィーで分画を試みたサンプルの血中滞留性については評価しなかった。

・限外濾過によりフリータンパクを除去したサンプルの評価

上記の検討において、200,000g で 6 時間遠心した後の上清画分が高い血中滞留性を示すことが明らかとなった。しかしながら、このような画分の中には、何らかの粒子に結合している gLuc-LA のみならず、他の粒子等には結合せずフリーの可溶性タンパク質として単独で存在する gLuc-LA も含まれていることが想定された。そこで、フリーの可溶性タンパク質として単独で存在する gLuc-LA よりも十分大きいカットオフ値を有する限外濾過膜を用いて、200,000g で 6 時間遠心後の上清画分中に存在するフリーの gLuc-LA を除去した。限外濾過膜を透過したサンプルおよび、限外濾過膜を通過しなかったサンプル両者の血中滞留性を評価したところ、限外濾過膜を透過したサンプル、すなわちフリーの gLuc-LA の血中滞留性は低かった一方で、限

外濾過膜を通過しなかったサンプルの血中滞留性は、限外濾過操作前のサンプルより上昇していた。これは 200000g で 6 時間遠心した後の上清画分には、血中滞留性の高いナノ粒子に結合した gLuc-LA および、血中滞留性の低いフリーの gLuc-LA タンパク質とが混在していたためと推察できた。以上の結果より、血中滞留性の高いナノ粒子の調製に成功したことから、このフラクションについて電子顕微鏡観察を行った。その結果、この画分には 10 ~ 20nm 程度の粒子径を有する、非常に小さなナノ粒子が含有されていた(図)。

以上の結果より、細胞から放出される血中滞留性の高いナノ粒子の調製法の確立に成功した。

得られた情報は細胞由来微粒子の研究に重要な知見となりえる。また、細胞由来微粒子においては、基本的にはサイズが小さく密度が低いもののほど高い血中滞留性を示すこととも明らかとなった。この結果は、リポソーム等の人工微粒子を利用した、ドラッグデリバリーキャリアの開発においても非常に有用な知見となりえる。

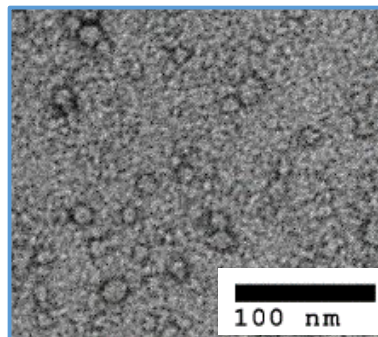


図: 血中滞留性の高い細胞由来ナノ粒子の透過型電子顕微鏡観察画像

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yamashita T, Takahashi Y, Takakura Y. Possibility of Exosome-Based Therapeutics and Challenges in Production of Exosomes Eligible for Therapeutic Application. Biol Pharm Bull. 2018, 41, 835-842. doi: 10.1248/bpb.b18-00133.

Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Morishita M, Nishikawa M, Takakura Y. Role of extracellular vesicle surface proteins in the pharmacokinetics of extracellular vesicles. Mol Pharm. 2018, 15, 1073-1080. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00950.

〔学会発表〕(計 5 件)

高橋有己、Charoenviriyakul Chonlada、西川元也、高倉喜信 Gag タンパク質によるエクソソーム内部標識法の開発とエクソソーム体内動態の評価。第 9 回日本 RNA i 研究会/第 4 回日本細胞外小胞学会 JSEV、2017 年 8 月 30 日 9 月 1 日(広島県、広島市)

服部将太、高橋有己、山下拓真、西川元也、高倉喜信 エクソソームの回収効率に及ぼす培地体積の影響。第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017 年 7 月 6 日-7 日(京都府・京都市)

高橋有己 細胞外小胞エクソソームを基盤とした疾患治療法の開発。第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2017 年 10 月 21 日-22 日(京都府・京都市)

服部将太、高橋有己、山下拓真、西川元也、高倉喜信 培地体積の最適化による効率的なエクソソームの回収。第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、2017 年 10 月 21 日-22 日(京都府・京都市)

高橋有己、松本明宏、山本晶、高倉喜信 特異的標識法の開発に基づく血中内因性エクソソームの体内動態解析。日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月 21 日-23 日(千葉県・千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.kyoto-u.ac.jp/byoyaku/index.html>

6 . 研究組織

該当無し

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。