

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K18386

研究課題名(和文) エクソソーム内へのメッセンジャーRNAソーティング技術の開発とDDSへの応用

研究課題名(英文) mRNA sorting into exosomes and its application for drug delivery

研究代表者

曾宮 正晴 (Somiya, Masaharu)

大阪大学・産業科学研究所・助教

研究者番号：50788974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソーム内にmRNAを内封する方法を開発するため、当初はエクソソームタンパク質に結合するRNAアプタマーを利用する手法を想定していたが、この手法がうまく作動しなかったため、他の方法を検討した。その結果、ウイルスタンパク質とmRNAを発現させることでエクソソーム内にmRNAを内封し細胞外に分泌させ、さらにこのエクソソームが他の細胞に取り込まれてレポーター遺伝子を発現可能なことを明らかにした。さらにmRNAに改変を加えることで、小分子によって標的細胞内でのmRNAの発現を制御可能なことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは細胞間の情報伝達に寄与していると考えられており、RNAなどの生体高分子を細胞内に送達して治療効果を得る、ドラッグデリバリーシステムとして期待されている。本研究では、目的のmRNAを効率的にエクソソーム内に内封し、細胞内に取り込まれて実際に機能させることに成功した。さらにmRNA発現を小分子で制御可能なことを示した。さらにエクソソームの細胞内取り込み機構を詳細に解明するための新たな実験系の開発にも成功した。本研究の知見を利用することで、エクソソームのDDSへの利用がさらに進むと期待できる。

研究成果の概要(英文)：First, encapsulation of mRNA into exosomes by using exosome protein-binding aptamer was not successful for unknown reason. Then we switched the strategy to use viral proteins to encapsulate specific mRNA into exosomes. By using this method, it was confirmed that mRNA was encapsulated into exosomes and secreted. The mRNA-encapsulated exosomes were internalized by recipient cells and reporter gene was functionally delivered. Furthermore, mRNA expression in the recipient cells can be controlled by small molecules by combining mRNA and RNA aptamer technology.

研究分野：生物学

キーワード：エクソソーム mRNA アプタマー DDS

## 1. 研究開始当初の背景

細胞から分泌されるエクソソームには、マイクロ RNA(miRNA)やメッセンジャーRNA(mRNA)といった RNA 分子が含まれていることが 2007 年に報告された(Valadi et al., Nat. Cell Biol., 2007)。この発見以降、多くの研究者が、RNA がどのようにエクソソーム内に取り込まれているのかを解明することに挑戦している。例えば、YBX 1(Shurtleff et al., eLife, 2016)や Annexin 2A(Hagiwara et al., FEBS Lett., 2015)といった RNA 結合タンパク質が、miRNA のエクソソーム内への移行に関与していることが一部、明らかになっている。しかしながら、そのメカニズムの全容はいまだ謎に包まれている。

一方で、エクソソーム自体が RNA の細胞間のやりとりに使用されていることから、エクソソームを RNA のドラッグデリバリーシステム(DDS)へ応用しようという試みがある。miRNA や siRNA といった RNA 分子を医薬品として使用する動きが活発になっており、実際にいくつかの臨床試験が進行しているが、いまだに大きな課題なのは、効率的な DDS が必要な点であると言われている(Kanasty et al., Nat. Material., 2013)。エクソソームを RNA 送達用の DDS に応用する試みはこれまでにいくつか報告されており、2012 年には樹状細胞由来のエクソソームに電気穿孔法によって siRNA を内封するという技術が報告された(Alvarez-Erviti et al., Nat. Biotechnol., 2011)。しかしながら、電気穿孔法による siRNA の内封は、効率・再現性ともに低く、実用的な方法でないということが後に報告されている(Kooijmans et al., J. Control. Release, 2013)。申請者は独自に、エクソソームの RNA 送達への応用に取り組んできたが、本研究では、エクソソームの DDS としての可能性をさらに押し広げるためには、mRNA をエクソソーム内にパッケージングすることが必要だと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内で発現させた mRNA をエクソソーム内に効率的にソーティング・パッケージングする技術を開発することである。さらにこの技術を用いて、任意の遺伝子の mRNA を内封したエクソソームを DDS のキャリアとして使用し、少なくとも細胞レベルでエクソソームによる mRNA 送達を実証することを目指す。

従来、RNA のエクソソーム内へのパッケージング機構が不明であったが、本研究では人工的に改変したタンパク質および mRNA を組み合わせることで、エクソソーム内への RNA のソーティングを人為的に引き起こすことを目指す。このような研究は従来報告されておらず、独創的である。さらに本技術が実現できれば、従来は非常に困難であった、細胞間のエクソソームを介した情報伝達を簡便に測定・定量できるレポーターアッセイも可能になるため、エクソソーム研究のさらなる進展に大きく寄与する可能性もある。本研究では、エクソソームの mRNA 送達キャリアとしての機能を解析するための、細胞内取り込みおよび細胞内動態を定量的に評価する実験系の開発にも取り組んだ。

## 3. 研究の方法

当初は、RNA 結合タンパク質をエクソソームタンパク質に融合させ、これをエクソソーム分泌細胞に発現させることで、任意のレポーター遺伝子の mRNA をエクソソーム内に内包させる方法を検討した。また任意の mRNA をエクソソーム内に内包させるために、RNA ウイルス由来のタンパク質を用いることも検討した。さらに、エクソソーム内に内包させる mRNA にリボザイム配列を挿入し、低分子化合物によってレシピエント細胞内での遺伝子発現制御が可能かどうかを検証した。上記方法で得られたドナー細胞由来エクソソームを、レシピエント細胞に添加し、レポーター遺伝子の発現を指標に、mRNA 送達効率を評価した。

また、エクソソームによる内放物送達を評価する方法として、分割ルシフェラーゼを利用して内放物放出の瞬間を定量的に測定する実験系の構築、エクソソームがレシピエント細胞の膜と融合するとレポーター遺伝子発現を誘導する実験系の構築、を試みた。

## 4. 研究成果

当初は、数種類の RNA 結合タンパク質(RBP)をエクソソームタンパク質と融合し、RBP 認識配列をもつ mRNA をエクソソーム内にソーティングする方法を検討したが、いずれの方法でもエクソソーム内に mRNA をソーティングすることができなかった。その原因として、mRNA の局在の問題が考えられる。つまり核内で転写され、核外に輸送された mRNA が、エクソソームタンパク質の RBP にまで輸送されるメカニズムが無いために、結果として mRNA のエクソソーム内へのソーティングができない、という事が考えられた。そこで戦略を変更し、RNA ウイルスのように RNA を細胞外に分泌することを目指し、ウイルス由来のタンパク質を RBP として利用して RNA のエ

エクソソーム内へのソーティングができるかどうかを検証した。その結果、ある RNA ウイルスのタンパク質をドナー細胞に発現させることで、任意の RNA をエクソソーム内にソーティングし、細胞外に分泌出来ることが確認できた。

しかしながら、この方法で分泌された mRNA は、レシピエント細胞に取り込まれるものの、mRNA がコードするレポーター遺伝子の発現は確認できなかった。その原因として、エクソソーム自体が持つレシピエント細胞との膜融合活性が十分でなく、エンドサイトーシスによってレシピエント細胞に取り込まれても、エンドソームやリソソームといった分解系に取り込まれ、機能していないことが考えられた。そこで、ウイルス由来の膜融合タンパク質をドナー細胞に共発現する事で、エクソソームに膜融合活性を付与する事とした。その結果、膜融合たんぱく質を共発現するエクソソームは、mRNA を細胞外に分泌させ、レシピエント細胞においてレポーター遺伝子を発現させることに成功した。さらに、mRNA 配列に低分子化合物の存在下で自己分解を誘導するリボザイム配列を組み込むと、レシピエント細胞内での遺伝子発現を、小分子の有無でコントロールできることも実証できた。これらの結果から、ウイルス由来の RBP および膜融合タンパク質をドナー細胞に発現させると、任意の mRNA をエクソソーム内に内封し、レシピエント細胞内で発現可能な技術が実証できた。さらにレシピエント細胞内での遺伝子発現を制御する技術を組み合わせることができた。

エクソソームを mRNA 送達 DDS として利用するにあたり、エクソソームがレシピエント細胞内でどのように内放物を放出するのかを明らかにすることは重要である。従来、エクソソームのレシピエント細胞内での細胞内動態を解析する簡便な定量アッセイ系は無かったが、本研究で 2 つのアッセイ系を構築した。すなわち、分割ルシフェラーゼの相補性を利用して、発光タグをエクソソーム内タンパク質に付与し、レシピエント細胞にもう一方の発光サブユニットを発現させ、エクソソーム内包タンパク質がレシピエント細胞内に放出されると細胞から発光が生じる、というアッセイ系 (Somiya and Kuroda, Anal Chem, 2021 ; 図 1 左) エクソソームのルーメン側に露出しているタンパク質に転写活性化ドメインを付与し、エクソソームがレシピエント細胞の細胞膜と融合すると、転写活性化ドメインが細胞質に放出され、レポーター遺伝子の発現を誘導する (Somiya and Kuroda, bioRxiv, 2021 ; 図 1 右) という 2 つの実験系である。これら 2 つの異なる実験系を利用すると、エクソソーム自体が持つ膜融合活性・内放物放出活性は非常に低く、各アッセイ系の検出限界以下であった事、エクソソームにウイルス由来の膜融合タンパク質を発現させることで膜融合活性は飛躍的に向上する事、が明らかとなった。以上の結果は、外来性の膜融合タンパク質無しでは、エクソソーム自体の物質送達能は一般に考えられているほど高くなく、膜融合活性や内放物放出を促す何らかの改変が必要不可欠であることを示す重要な知見であると考えられる。

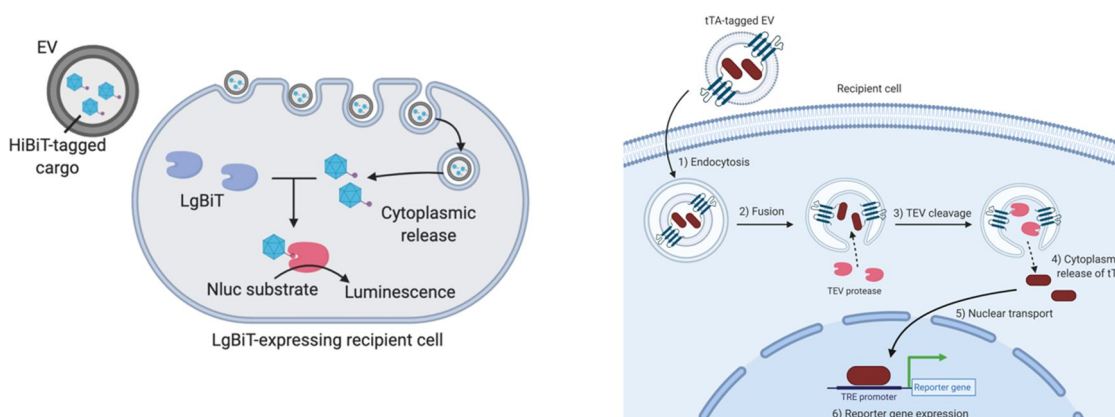


図 1 エクソソームの細胞内動態と内包物放出を解析する実験系の概要

(左)ルシフェラーゼ相補性を利用したアッセイ (右)転写活性化ドメインを利用したアッセイ

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 93
2. 論文標題 Real-Time Luminescence Assay for Cytoplasmic Cargo Delivery of Extracellular Vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5612 ~ 5620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c00339	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 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 93
2. 論文標題 Real-Time Luminescence Assay for Cytoplasmic Cargo Delivery of Extracellular Vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5612 ~ 5620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.1c00339	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 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 -
2. 論文標題 Reporter gene assay for membrane fusion of extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.02.16.431359	査読の有無 無
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 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 15
2. 論文標題 Virus-mimicking nanocarriers for the intracellular delivery of therapeutic biomolecules	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 1163 ~ 1165
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2217/nnm-2020-0078	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 Somiya Masaharu, Sakaeda Kanako, Ishii Yuta, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Cytoplasmic delivery of small interfering RNA by photoresponsive non-cationic liposomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 102488 ~ 102488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2021.102488	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 Somiya Masaharu	4. 巻 -
2. 論文標題 Where does the cargo go?: Solutions to provide experimental support for the "extracellular vesicle cargo transfer hypothesis"	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Communication and Signaling	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12079-020-00552-9	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 曾宮正晴、黒田俊一	4. 巻 45
2. 論文標題 エンベロープウイルスやエクソソームを利用した ドラッグデリバリーシステムの開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 膜	6. 最初と最後の頁 222-227
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 無
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 Somiya Masaharu, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 140
2. 論文標題 DDS Nanocarriers Mimicking Early Infection Machinery of Viruses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 147 ~ 152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.19-00187-2	査読の有無 無
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 Qiushi Liu, Masaharu Somiya, Masumi Iijima, Kenji Tatematsu, and Shun'ichi Kuroda	4. 巻 7
2. 論文標題 A hepatitis B virus-derived human hepatic cell-specific heparin-binding peptide: identification and application to a drug delivery system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 322-335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8BM01134F	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 Somiya Masaharu, Sakaeda Kanako, Ishii Yuta, Kuroda Shun'ichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Cytoplasmic delivery of small interfering RNA by photoresponsive non-cationic liposomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Drug Delivery Science and Technology	6. 最初と最後の頁 102488 ~ 102488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2021.102488	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11件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Masaharu Somiya
2. 発表標題 Extracellular vesicles for the delivery of therapeutic biomolecules
3. 学会等名 ITU MBG Congress (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾宮正晴、黒田俊一
2. 発表標題 細胞外小胞エクソソームのRNA送達技術への応用
3. 学会等名 日本癌学会第78回学術総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾宮正晴、黒田俊一
2. 発表標題 エンペロープウイルスやエクソソームを利用したドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 日本膜学会第41年会会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾宮正晴、黒田俊一
2. 発表標題 ウイルス外皮タンパク質を含む細胞外小胞を利用したドラッグデリバリーシステムの開発
3. 学会等名 第6回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾宮正晴、柴田佳那子、黒田俊一
2. 発表標題 非カチオン性リポソームと光増感剤を利用したsiRNAの細胞質内送達
3. 学会等名 第31回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾宮正晴、黒田俊一
2. 発表標題 ウイルスやエクソソームを応用した高機能DDS開発の取り組み
3. 学会等名 次世代医工学研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 曾宮正晴
2. 発表標題 食品中および人工のナノ粒子と細胞との相互作用に関する最新の知見
3. 学会等名 佐賀県工業技術センター、技術ワークショップ事業、食品・化粧品の機能性セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 曾宮正晴
2. 発表標題 ウイルス骨格やエクソソームを利用した薬物送達技術の開発
3. 学会等名 日本生物工学会・次世代アニマルセルインダストリー研究部会 設立記念シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaharu Somiya, Shun'ichi Kuroda
2. 発表標題 Development of extracellular vesicle-based drug delivery systems by cellular engineering
3. 学会等名 JAACT2020（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 曾宮正晴、黒田俊一
2. 発表標題 機能性ペプチドによる細胞質内薬物送達の効率化と評価系の確立
3. 学会等名 日本薬学会141会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 曾宮正晴, 黒田俊一
2. 発表標題 細胞外小胞のレシピエント細胞内での内包物放出を定量化するアッセイ系の開発
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会JSEV学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 H. Li, M. Somiya, K. Tatematsu, and S. Kuroda	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 316
3. 書名 Methods Molecular Biology 2059 Drug Delivery Systems	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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