

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03390

研究課題名(和文) ヒトウイルス受容体を介した血液脳関門突破機構に基づくエクソソームの脳細胞標的化

研究課題名(英文) Brain-targeting of exosomes based on the virus receptors-mediated transport at the human blood-brain barrier

研究代表者

立川 正憲 (TACHIKAWA, Masanori)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授

研究者番号：00401810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト血液脳関門が有する「エクソソーム輸送システム」を解明し、血液脳関門透過機能と脳細胞への輸送標的化機能を備えたドラッグキャリア創製のための基盤を構築することを目的とした。具体的には、網羅的プロテオミクスによるエクソソーム構成タンパク質のプロファイリング、ヒト脳微小血管内皮細胞におけるエクソソームの輸送特性の解明を進めるとともに、エクソソーム輸送評価系として三次元血管網モデルの構築に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子性中枢疾患治療薬の脳への効率的な薬物送達を実現するためには、血液脳関門突破の方法論の確立に加え脳実質細胞への輸送標的化の技術開発が不可欠である。本研究は、がん細胞などから放出されるエクソソームとウイルスの細胞膜透過機構における類似性に基づいて、エクソソームがもつ血液脳関門透過能と脳細胞への輸送標的化能の仕組みに迫るといった学術的意義がある。さらに脳への送達に不可欠なドラッグキャリアの開発基盤が創造されるという社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：This research project aims to unveil the exosomes transport systems at the human blood-brain barrier and to establish the basis of the blood-brain barrier-permeable and central nervous systems-targeting drug carriers development. We have done the protein profiling of exosomes by comprehensive proteomics, the clarification of exosomes transport mechanisms in human brain microvessel endothelial cells as well as the construction of three-dimensional model of brain microvasculature as an evaluation tool of the blood-brain barrier exosomes transport.

研究分野：薬物動態学

キーワード：血液脳関門 エクソソーム 輸送系

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 核酸・ペプチド・タンパク質性高分子中枢薬の脳への薬物送達キャリアとしてのエクソソーム

高分子(核酸・ペプチド・タンパク質)をモダリティとする中枢疾患治療薬の開発において、脳毛細血管内皮細胞を実体とするヒト血液脳関門(Blood-Brain Barrier, BBB)をどう突破させるかが鍵となる。さらに、高分子性中枢疾患治療薬の標的となる脳実質細胞への薬物送達を実現するためには、血液脳関門の透過技術に加え、神経細胞やグリア細胞への「輸送標的化」の基盤技術開発が重要である。

エクソソームは、細胞から放出される直径 100nm 前後のナノ粒子であり、内包する核酸やタンパク質を、異なる細胞種間で選択的に輸送する機能を持つことから、薬物送達の脳標的化を実現するキャリアとして注目されている。これまでの報告では、原発がん細胞から放出されるエクソソームが、将来の転移先組織に輸送され、転移先の組織微小環境を変える前転移ニッチを形成すること(*Nature* 527:329-335, 2015)、及び脳転移性乳がん細胞が放出するエクソソームが血液脳関門へ高活性に輸送されること(*Nat Commun* 6:6716, 2015)が示されている。従って、脳転移性末梢がん細胞が放出するエクソソームが有する血液脳関門透過能と脳細胞標的化機能を利用して、高分子薬物の中枢薬物送達を実現する可能性がある。

(2) 血液脳関門におけるエクソソーム輸送システム

研究代表者の立川らは、Aebersold らが開発した網羅的定量プロテオミクス(SWATH 法, *Mol Cell Proteomics* 11:O111.016717, 2012)とクロスリンク法を用いて、ヒト脳微小血管内皮細胞(hCMEC/D3 細胞)において、ヒトメラノーマ細胞由来エクソソームと相互作用し得る膜タンパク質候補を同定し、その中にはウイルス受容体として機能することが知られている膜タンパク質が含まれていることを見出した(*Mol Pharm* 16:292-304, 2019)。細胞へのウイルス感染には、ウイルス表面タンパク質と、宿主細胞膜上の受容体との結合による内在化、それに続く宿主細胞内でのウイルス粒子の再構成が重要な役割を果たす。ウイルス感染細胞から放出されるウイルス粒子は、宿主のエンドソーム膜タンパク質を含む(*J Gen Virol* 95:2166-2175, 2014)こと、ウイルス脳感染には脳細胞指向性があることから、本研究では、ウイルスとエクソソームの細胞内動態の類似性に着目し、仮説「がん細胞などから放出されるエクソソームは、ウイルス受容体を介した脳毛細血管内皮細胞への高い内在化活性及び脳細胞への輸送標的化の特性を有する」を着想した。一般に、ウイルスの脳内感染には、ヒトとげっ歯類で種差が存在することを考慮すると、研究代表者らがヒト脳微小血管内皮細胞で同定したウイルス受容体は、ヒト特異的な BBB エクソソーム輸送の分子機構を説明すると推察される。従って、血液脳関門におけるエクソソーム輸送システム(図 1)を、ヒトに特化して解明する本研究は、げっ歯類を中心に解析が進んできたエクソソーム体内動態制御機構の解明研究に一石を投じる可能性がある。

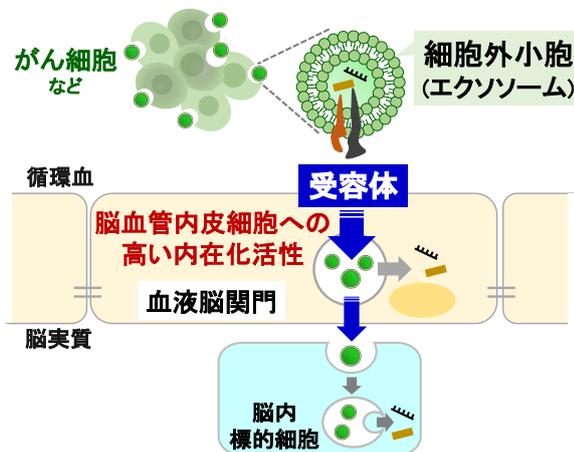


図 1 想定されるヒト血液脳関門(Blood-Brain Barrier, BBB)におけるエクソソーム輸送システム

2. 研究の目的

本研究は、ウイルス受容体を中心としたエクソソーム輸送受容体を介する「血液脳関門エクソソーム輸送システム」を、ヒトに特化して解明し、血液脳関門透過・脳細胞への輸送標的化機能を備えたドラッグキャリア創製のための基盤を構築することを目的とした。具体的には、仮説(図 1)「脳転移性がん細胞などから放出されるエクソソームは、ウイルス受容体を介した脳毛細血管内皮細胞への内在化及び脳細胞への輸送標的化の特性を有する」に基づいて、エクソソームの血液脳関門輸送システムと脳細胞への輸送指向性が生み出される仕組みを解明し、エクソソームをキャリアとして用いた、脳細胞への高分子薬送達の学術的基盤を構築することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞外小胞 (エクソソーム) (以下、EVs) 画分の単離及びヒト脳血管内皮細胞における EVs 輸送機能解析

ヒトメラノーマ SK-Mel-28 細胞、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞、ヒト胎盤絨毛がん由来細胞 BeWo 細胞の培養上清を回収し、超遠心分離法を用いて沈殿物から EVs 画分を回収した。回収した EV 画分の物理化学的特性を解析するため、ゼータサイザーを用いて EVs 画分の粒子径分布及び表面電荷を計測した。ヒト脳血管内皮細胞への EV 内在化活性は、*in vitro* BBB モデルであるヒト脳微小血管内皮細胞(hCMEC/D3)への PKH67 で蛍光標識した EVs の取り込み量で評価した。ヒト脳血管内皮細胞への EVs 内在化における EVs 受容体候補分子の寄与の解析には、RNA 干渉によるノックダウン法を用いた。脳血管内皮細胞における EVs の経細胞輸送を評価するために、hCMEC/D3 細胞をトランスウェル上で単層培養し、PKH67 で蛍光標識した EVs を apical 側に加え

て、hCMEC/D3 細胞に取込ませた後に、basal 側に放出される EVs 由来の蛍光を計測した。

(2) 網羅的プロテオミクスによる EVs 構成タンパク質の発現アトラスの作成

血液脳関門における EVs 受容体を同定するためには、EVs 上のリガンドをタンパク質レベルで同定し、受容体との相互作用を明らかにすることが重要である。EVs 上のリガンド候補を解析するため、EVs 画分のトリプシン消化を行い、高分解能質量分析装置(LC-MS/MS)を用いてタンパク質発現プロファイルを解析した。

(3) マイクロ流体デバイスを用いた 3 次元血管網の構築とエクソソームの検出

コインサイズのチップ内に、細胞外マトリックスゲルを挟んで培養液を流すメディア流路を配置したマイクロ流体デバイスを用いた。具体的には、ゲル内に、血管内皮細胞モデルとして汎用されているヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC 細胞) と線維芽細胞を混合したフィブリンゲル、又はヒト脳血管内皮細胞とペリサイト、アストロサイトを混合したフィブリンゲルを注入し、間質流を発生させた状態で共培養することで 3 次元血管網を形成させた。

4. 研究成果

(1) ヒト脳血管内皮細胞における EVs 輸送機能解析

ヒトメラノーマ SK-Mel-28 細胞、ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 細胞、及びヒト胎盤絨毛がん由来細胞 BeWo 細胞から回収した EVs 画分の平均粒子径は約 130~140nm、ゼータ電位は約-30~-35mV であり、エクソソームの物理化学的特性を有していることが示された。SK-Mel-28 細胞及び SH-SY5Y 細胞由来の PKH67 標識 EVs 画分を用いて、hCMEC/D3 細胞への取り込み活性及び温度依存性を解析した結果、EVs の細胞内取り込みは、37°C と比較して 4°C において有意に低下した。なお SH-SY5Y 細胞由来 EVs の hCMEC/D3 細胞への取り込みは、マクロピノサイトーシス阻害剤の共存下では有意な低下を示さなかった。hCMEC/D3 細胞をトランスウェル上で培養することで細胞層を形成させ、SH-SY5Y 細胞由来の PKH67 標識 EVs 画分を apical 側に添加して一定時間経過後には、細胞内及び basal 側に蛍光が検出された。従って、SH-SY5Y 細胞由来 EVs は脳血管内皮細胞を経細胞的に輸送されることが示された。このとき細胞内及び basal 側の蛍光強度は、37°C と比較して 4°C において有意に低下した。PKH67 標識した BeWo 細胞由来 EVs の hCMEC/D3 細胞への内在化活性は、BeWo 細胞自身への内在化活性と比較して hCMEC/D3 細胞において有意に高く、ヒト脳血管内皮細胞において高い内在化活性を有するヒト胎盤由来 EVs を同定した。以上の結果から、SK-Mel-28 細胞、SH-SY5Y 細胞及び BeWo 細胞由来の EVs はヒト脳血管内皮細胞への高い内在化活性を示し、EVs の BBB 輸送システムには脳毛細血管内皮細胞内へのエネルギー依存的な輸送機構が関与することが示唆された。

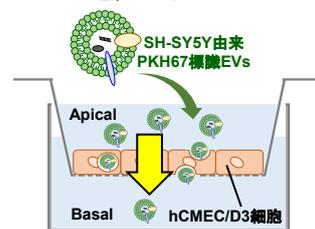


図 2 ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y 由来 EVs のヒト血液脳関門 経細胞輸送の模式図

(2) 網羅的プロテオミクスによる EVs 構成タンパク質の発現アトラスの構築

網羅的プロテオミクスの手法を用いて、SK-Mel-28 細胞及び BeWo 細胞から回収した EVs に発現するタンパク質 (約 3000 分子) を網羅的に同定した。パスウェイ解析や文献情報をもとに、EVs 画分から同定した分子と相互作用する報告のある受容体を抽出し、ヒト脳微小血管内皮細胞上の EVs 受容体候補について、絞り込みを行った。さらに候補受容体に対する阻害剤の存在下、または RNA 干渉によるノックダウン法によって、hCMEC/D3 細胞への取込みにおける各受容体の寄与を解析した。解析結果をもとに、BeWo 細胞由来 EVs の hCMEC/D3 細胞への内在化に膜輸送体 MFSD2A が関与するとの仮説を立て、siRNA ノックダウンを行った。その結果 hCMEC/D3 細胞への BeWo 細胞由来 EVs の取込みにおいて有意な低下は示されず、MFSD2A の寄与は低いことが示唆された。

(3) マイクロ流体デバイスを用いた 3 次元血管網の構築と EVs の検出

マイクロ流体デバイス内に、HUVEC 細胞と線維芽細胞を混合したフィブリンゲル又は、ヒト脳血管内皮細胞、アストロサイト及びペリサイトを混合したフィブリンゲルを注入して培養することで血管内皮細胞同士が自己組織化し、蛍光標識デキストランの血管内灌流が繰り返し可能な 3 次元血管網が構築された。さらに、3 次元血管の内径とゲル内に播種する総細胞数との間との相関性、及びゲル内の総細胞数に対する血管内皮細胞数の割合との間における相関性を明らかにし、*in vivo* 脳微小血管に近い培養条件を決定した。以上から、マイクロ流体デバイスを用いたヒト 3 次元微小脳血管網のプロトタイプ作成に成功した。HUVEC 細胞及び線維芽細胞から構築した 3 次元血管網に対し、PKH67 標識した BeWo 細胞由来 EVs をマイクロ流体デバイス内のメディア流路に灌流させた結果、血管壁に沿って EVs 由来の蛍光シグナルが検出され、EVs の血管内分布の可視化に成功した。本研究から、マイクロ流体デバイスを用いた 3 次元脳血管網の構築によって、EVs の BBB 透過及び脳細胞輸送標的化の *ex vivo* 評価系の基盤が構築された。*Ex vivo* 評価系では、EVs の脳血管内皮細胞及び脳実質細胞の内在化評価の高感度化及びハイスループット化が不可欠であり、今後マイクロ流体デバイス内の流路系を改良することで、より精度の高い評価系構築を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tachikawa Masanori, Akaogi Ryo, Taii Ayaka, Akanuma Shin-ichi, Uchida Yasuo, Terasaki Tetsuya	4. 巻 109
2. 論文標題 Distinct Transport Properties of Human Pannexin 1 and Connexin 32 Hemichannels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1395 ~ 1402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2019.12.008	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 Tachikawa Masanori, Murakami Koji, Akaogi Ryo, Akanuma Shin-ichi, Terasaki Tetsuya, Hosoya Ken-ichi	4. 巻 132
2. 論文標題 Polarized hemichannel opening of pannexin 1/connexin 43 contributes to dysregulation of transport function in blood-brain barrier endothelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurochemistry International	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） 10.1016/j.neuint.2019.104600	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 Tachikawa Masanori, Kaneko Yosuke, Ohtsuki Sumio, Uchida Yasuo, Watanabe Michitoshi, Ohtsuka Hideo, Terasaki Tetsuya	4. 巻 109
2. 論文標題 Targeted Proteomics-Based Quantitative Protein Atlas of Pannexin and Connexin Subtypes in Mouse and Human Tissues and Cancer Cell Lines	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	6. 最初と最後の頁 1161 ~ 1168
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.xphs.2019.09.024	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14件（うち招待講演 4件／うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Sakamaki Y, Inagaki M, Sato M, Funamoto K, Tachikawa M
2. 発表標題 Reconstruction of perfusable human 3D microvasculature on a chip as an evaluation model of cancer cell extravasation and drug transport
3. 学会等名 Eighteenth International Conference on Flow Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato M, Inagaki M, Sakamaki Y, Funamoto K, Tachikawa M
2. 発表標題 Reconstruction of 3D human brain microvasculature on a chip using brain endothelial cells, astrocytes and pericytes
3. 学会等名 Eighteenth International Conference on Flow Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤桃子、稲垣舞、酒巻祐花、船本健一、立川正憲
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスを用いた三次元ヒト脳微小血管網の構築
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下暢、大野大樹、小迫英尊、稲垣舞、立川正憲
2. 発表標題 網羅的プロテオミクスを用いたヒト脳毛細血管内皮細胞への内在化活性を示す脳転移性メラノーマSK-Me1-28由来細胞外小胞の特性解析
3. 学会等名 日本薬剤学会第36年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 定量プロテオミクスが拓いた脳関門物流システム-Brain Barrier Logistics-解明研究
3. 学会等名 第14回日本薬物動態学会ショートコース
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 ヒト血液脳関門における細胞外小胞輸送システムの多様性と特異性
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 定量プロテオミクス解析から見てきた中枢-免疫インターフェースとしての血液脳関門の役割
3. 学会等名 第44回日本神経科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato M, Sakamaki Y, Inagaki M, Funamoto K, Tachikawa M
2. 発表標題 3D Human Blood-Brain Barrier Chip for Central Nervous System Drug Development
3. 学会等名 Seventeenth International Conference on Flow Dynamics (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 定量プロテオミクスで解き明かす血液脳関門・血液くも膜関門
3. 学会等名 第39回日本認知症学会学術集会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 稲垣舞, 佐野陽乃里, 中野瑛介, 登美育俊, 立川正憲
2. 発表標題 ヒト胎盤絨毛細胞株BeWo細胞由来エクソソームのヒト脳血管内皮細胞 (hCMEC/D3)への内在化
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tachikawa M, Kuroda H, Watanabe M, Uchida Y, Terasaki T
2. 発表標題 The human-specific virus receptor CD46 makes a major contribution to the internalization of brain-metastatic melanoma-derived exosomes by human blood-brain barrier endothelial cells.
3. 学会等名 13th International Conference of Cerebral Vascular Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tachikawa M, Terasaki T
2. 発表標題 Blood-brain barrier-permeable proteins and transport characteristics in brain endothelial cells
3. 学会等名 日本薬物動態学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 中枢関門科学: Connecting the human dots
3. 学会等名 第13回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立川正憲
2. 発表標題 定量プロテオミクスを基軸とする「脳関門中枢創薬科学」の新たな展開
3. 学会等名 第41回神経組織培養研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	船本 健一 (FUNAMOTO Kenichi) (70451630)	東北大学・流体科学研究所・准教授 (11301)	
研究分担者	福田 達也 (FUKUTA Tatsuya) (90805160)	和歌山県立医科大学・薬学部・講師 (24701)	

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
---------	---------