

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12651

研究課題名(和文)オルタナティブな核酸医薬、スフェロイドによる核酸医薬産生

研究課題名(英文)Alternative nucleic acid medicines

研究代表者

立花 亮(Tachibana, Akira)

大阪公立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80305614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソーム表面にナノボディ7D12を提示させ、EGFRを高発現細胞A431へのプラスミドをデリバリーした。効率が向上させるために、あるタンパク質をエクソソームに局在化させ、エクソソームへ特異的にプラスミドを封入できた。あるタンパク質によって、目的プラスミドだけを封入できた。プラスミドの共通配列に対するguide RNAであれば、複数のプラスミドを封入できた。

エクソソームの一般的な回収法である超遠心法は効率が10%程度と効率が悪いことが知られていた。新規沈殿法を開発した。ある物質を加え、通常の遠心(15000 xg)で、回収率は40-50%に達し、簡便な方法である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームにプラスミドを封入する試みはほとんどなされていない。プラスミドがデリバリーされ、標的細胞で働くなら、極めて優秀な核酸医薬となる。また、エクソソームを大量に回収する方法として、新規沈殿法を開発した。超遠心法が回収率10%程度であるのに新規沈殿法は40-50%と高効率に回収することができる。

今回の上記成果によって、プラスミドを封入したエクソソームを大量に生産することができる。このエクソソームは核酸医薬として利用できるばかりが、実験室レベルのトランスフェクション試薬としても利用可能である。さらに、核酸医薬を封入したエクソソームは将来的にはワクチンとしても利用可能であろう。

研究成果の概要(英文)：Nanobody 7D12 was presented on the exosome surface to deliver the plasmid to A431 cells that highly express EGFR. To increase efficiency, certain proteins were localised to the exosomes, allowing specific inclusion of the plasmid into the exosomes. Certain proteins allowed inclusion of only the target plasmid. Multiple plasmids could be encapsulated if the guide RNA was for a common sequence of plasmids.

The ultracentrifugation method, a common recovery method for exosomes, was known to be inefficient, with an efficiency of only 10%. A novel precipitation method was developed. It is a simple method with a recovery rate of 40-50% by conventional centrifugation (15000 xg) with the addition of certain substances.

研究分野：分子生物学

キーワード：エクソソーム 核酸医薬 プラスミド

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は化学合成されたオリゴヌクレオチドであると「広く」認識されている。DNA/RNAより結合力が優れているというメリットもあるが、分解されにくい非天然物であり、毒性があることは否めない。また、血流から標的細胞へ、そして、細胞質へ、場合によっては核内へとデリバリーされなければならない。翻って、我々の体はどうしているのだろうか。細胞はmiRNAやその阻害剤である”miRNA sponge”など核酸医薬を産生している。また、それらはエクソソームという細胞外に放出する直径100 nmほどの小胞に封入して、他の組織、臓器へとデリバリーしていることがよく知られるようになってきた。我々はこの天然のシステムを利用すればよいのではないか。

2. 研究の目的

核酸医薬を産生する細胞を作製する。生体内では細胞がmiRNAなどの核酸医薬をエクソソームに包含して、全身にデリバリーしている。それらmiRNAは他の細胞に取り込まれ、機能している。我々はこのシステムに準拠して、細胞に核酸医薬を産生させ、エクソソームに内包して、標的細胞にデリバリーするというを目的とする。また、核酸医薬そのものの開発も行う。

3. 研究の方法

(1)核酸医薬の設計／エクソソームへの内包

エクソソームに内包する核酸医薬として、当初環状RNAを予定していたが、実際に行ってみたところ、内包量が非常に低く、また、RNA結合タンパク質をエクソソームに局在化させても、環状RNAの内包量はほとんど変化しなかった。当初方針を変更し、核酸医薬をコードするプラスミドDNAを内包することとした。また、CD63などの従来から知られているエクソソームマーカーより局在量が多いタンパク質が報告された。膜貫通型タンパク質PTGFRNと膜に脂質によって結合しているタンパク質BASP1である。PTGFRNはエクソソーム表面に標的細胞へ結合できるための抗体（今回は発現効率を重視して、ナノボディを用いた）を提示するために利用する。また、標的プラスミドを内包できるか検討した。また、エクソソームを回収する方法として、一般的に超遠心法が用いられているが、回収率が10%程度と非常に効率が悪いことが知られている。我々は亜鉛イオンを添加することによって、エクソソームが沈澱することを見出した。この詳細を検討した。

(2)スフェロイドの作製およびエクソソームの効率的産生条件検討

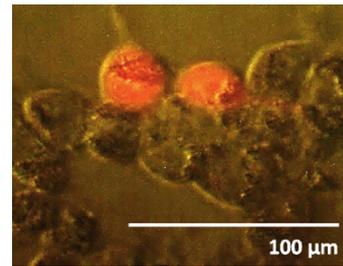
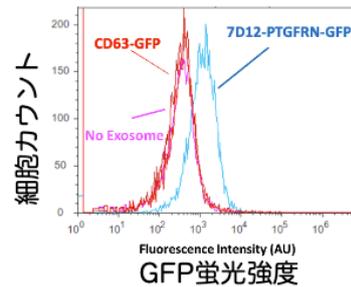
厚さ数100µmの細胞スフェロイド／細胞シートそのものは非常に扱いにくく、ゼラチンで保持してもその状況は変わらなかった。この扱いは名人芸的なテクニックを要求し、属人的要素が強いことがわかった。よって、高度なテクニックなしで、簡便にスフェロイドを作製できる方法を模索した。ゼラチンゲルの表面だけを架橋剤で処理し、内部に細胞を注入するという方法を開発した。これら細胞からのエクソソーム産生を検討した。エクソソーム産生を増強する低分子化合物が報告されているがそれらを数種類検討し

た。PTGFRN-GFP および BASP10-mCherry を発現させ、エクソソーム画分のそれぞれの蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

(1) エクソソーム表面にナノボディを提示する

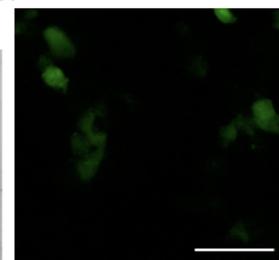
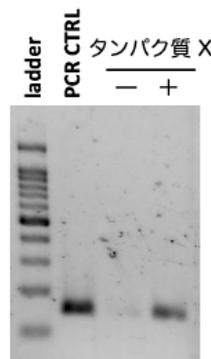
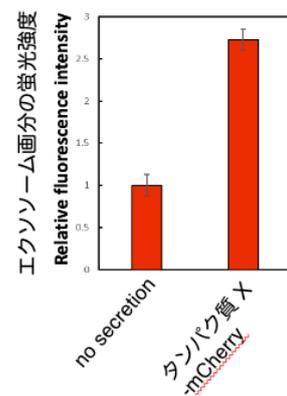
エクソソームを標的細胞へ送り込むために、その表面にナノボディを提示した。標的として、EGFR を選択した。EGFR に結合するナノボディ 7D12 を PTGFRN の N 末端に付加した (C 末端にマーカーとして GFP を付加した)。HEK293T 細胞でエクソソームを産生させたが、発現が思わしくなかった。HEK293T 細胞は EGFR を発現しているため、小胞体内などで 7D12 と結合しているためであると考え、shEGFR を同時に発現させることで、エクソソーム発現量を 2 倍以上にすることができた。このエクソソームを回収し、EGFR を高発現している A431 細胞に添加し、フローサイトメトリーで解析した (右図)。7D12 を提示したエクソソームは A431 細胞に結合していることがわかった。つまり、エクソソーム表面に十分量のナノボディを提示することができた。次に、この 7D12-PTGFRN-GFP の発現ベクターと同時に mCherry 発現ベクターをトランスフェクションし、mCherry 発現ベクターがエクソソームによって、デリバリーできるか検討した。その結果、右写真のように、mCherry 発現が確認された。しかしながら、その発現は限られた細胞にだけ観察された。mCherry 発現ベクターが効果的にエクソソームに封入されていないことが原因であると考えた。



(2) エクソソーム内部にプラスミドを保持させる

次に任意のプラスミドをエクソソームに内包させるために、あるタンパク質-mCherry 融合タンパク質を局在化させた。これを発現させたところ、右図のように、エクソソーム画分に含まれていることがわかった。

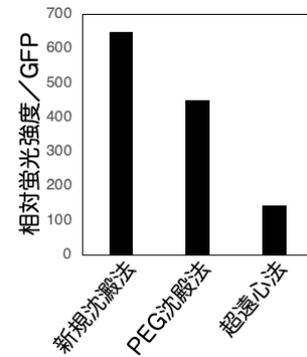
次に、GFP 発現ベクターをエクソソームに封入しようとした。エクソソーム画分を鋳型として PCR を行い、エクソソームに目的のプラスミドが封入されているか確認した (右電気泳動図)。タンパク質 x の有無によって、バンドが確認され、特異的に目的プラスミドが封入されていることがわかった。さらに、このプラスミドを HEK293T 細胞に添加したところ、右写真のように、緑色蛍光が観察され、アクセプター細胞で、デリバリーされた GFP が発現していることを確認した。



Scale Bar = 50 μm

(3) エクソソームの新規沈澱法

エクソソーム研究において、エクソソームの回収は非常に問題である。最も、スタンダードな方法は超遠心によって回収することであるが、超遠心機が必要であるばかりでなく、その回収率は低く、一般的に 10%程度であると言われている。ポリエチレングリコール(PEG)沈澱法においては、回収率はいいが、培地成分のタンパク質も沈澱させ、また、非常に時間がかかる方法である。我々は今回新たに新規沈澱法を考案した。培養上清にある物質を添加し、15000xg で遠心するという簡便な方法である。エクソソームが凝集し、沈澱するためと考えられる。PTGFRN-GFP を発現させ、エクソソームを新規沈澱法、PEG 沈澱法、超遠心法によって、回収し、その蛍光強度を比較した(右図)。新規沈澱法は超遠心法の4~5倍の回収率を示した。また、PEG 沈澱法より高い回収率を示した。様々な測定によって、新規沈澱法による培養上清からのエクソソーム回収率は40~50%であることがわかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yusaku Inubushi , Yoshiki Sakaguchi , Akira Tachibana	4. 巻 84
2. 論文標題 Uniform straw-like cell architecture for three-dimensional cell-cell communication assay	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biosci Biotechnol Biochem	6. 最初と最後の頁 1681-1684.
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 該当する

1. 著者名 Liu Xu , Kan-Ichiro Ihara , Saori Yoshimura , Daijiro Konno , Akira Tachibana , Takeshi Nakanishi, Taro Tachibana	4. 巻 39
2. 論文標題 Generation of the Rat Monoclonal Antibody Against the Extracellular Domain of Human CD63 by DNA Immunization	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Monoclon Antib Immunodiagn Immunother .	6. 最初と最後の頁 74-76.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mab.2020.0007	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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