

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21891

研究課題名（和文）siRNA搭載エキソソーム産生細胞を利用した組織 細胞二段階ターゲティング法開発

研究課題名（英文）Development of tissue-cell two-step targeting method using cells producing siRNA-loaded exosomes.

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）：本研究では組織 細胞レベルでの二段階ターゲティング法の開発を目的として、細胞動態制御とエキソソームへのsiRNA搭載法の開発について検討を行った。CCR2の細胞への導入による炎症部位集積性の向上について検討した結果、炎症誘導作用を有するマクロファージへの遊走性が向上した。次に、エキソソームへのRNA搭載効率の向上について検討した。エキソソーム移行性タンパク質とRNA結合タンパク質の融合タンパク質により搭載性は向上可能であった。一方で搭載されるRNAの複合体化は有効ではなかった。以上、エキソソームを利用した二段階ターゲティング法の開発に有用な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではsiRNA搭載エキソソーム産生細胞を利用した組織 細胞レベルでの二段階ターゲティング法の開発を目的として、細胞の動態の制御とエキソソームへのsiRNA搭載法の開発について検討を行った。siRNAの効率的なデリバリー法の開発は有用な治療法になると考えられるが、二段階ターゲティング法は効果的なsiRNAデリバリー法となりえる。本研究ではそのために必要となる細胞の動態制御法と、エキソソームへのsiRNA搭載法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：To develop a two-step targeting method at the tissue-cell level using siRNA-loaded exosome-producing cells, we investigated the regulation of cellular dynamics and the development of a method for siRNA loading onto exosomes. We investigated the improvement of inflammation site accumulation by introducing the chemokine receptor CCR2 into cells, and found that it enhanced migration to macrophages, which have inflammation-inducing effects. Next, we examined the improvement of RNA loading efficiency onto exosomes. The loading efficiency could be improved by the fusion protein of exosome migratory protein and RNA-binding protein. On the other hand, complexation of the loaded RNA was not effective. These findings are useful for the development of a two-step targeting method using exosomes.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：細胞外小胞 エキソソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉に基づき標的遺伝子の発現を抑制可能な siRNA は、医薬品としての利用が期待されるが、その実現には標的細胞への効率的な siRNA 送達法の開発が必要である。siRNA の投与経路としては、侵襲性低く広範な部位へと送達可能な全身投与が望ましい。全身投与後に標的となる細胞へと効率的に siRNA を送達するためには、その細胞が存在する標的組織への送達、さらには標的細胞への送達の二段階が必要である。これまでに開発されてきたデリバリー法の多くは、標的組織への送達は積極的には行わず、標的組織にのみ存在すると考えられる標的細胞へのリガンドを利用し、標的組織ならびに標的細胞へのデリバリーを試みるものであった。このアプローチは有用ではあるものの、標的指向性はリガンドの特異性に依存するため、標的組織以外に存在する細胞によるリガンド認識等の理由により、標的組織・細胞特異的な送達が困難な場合も存在する。一方で、標的組織、さらには標的細胞への指向化を二段階で達成することができれば、リガンドの特異性のみに依存したこれまでのアプローチとは異なる、革新的なデリバリー法となりえる。

細胞から産生される細胞外小胞であるエキソソームは内因性の核酸キャリアである。我々はこれまでにエキソソームを利用した核酸デリバリー法の開発を目的として、エキソソームへの核酸搭載法について検討を行うとともに (Biomaterials, 2016; Biol Pharm Bull, 2017)、エキソソームの体内動態を解析してきた (J Biotechnol, 2013; J Extracell Vesicles, 2015)。その過程において、エキソソームを全身投与後の動態制御、すなわち標的組織への送達は困難ではあるが、標的組織へ局所投与したエキソソームの動態制御、すなわち標的細胞への送達は十分に達成可能であることを見出していた (Biomaterials, 2019; Mol Pharm, 2017)。

2. 研究の目的

細胞由来の小胞であるエキソソームは内因性の RNA キャリアである。また、これを搭載するエキソソームの細胞指向性については制御可能である。従って、siRNA を搭載した標的細胞指向性エキソソームを産生する細胞を構築し、さらにこの産生細胞に標的組織移行性を賦与すれば従来は存在しなかった二段階ターゲティングが可能であると考えられた。そこで、エキソソームを産生する細胞を標的組織へと送達することができれば、標的細胞への指向性を有するエキソソームを持続的に供給可能ではないかと考えた。加えて、これまでに腫瘍組織に集積するマクロファージ (TAM) を対象とした研究を行った経験を有する (Mol Pharm, 2014) ことから、腫瘍組織への TAM の集積の原因である MCP1-CCR2 相互作用の利用、すなわちエキソソーム産生細胞への CCR2 の遺伝子導入によって、標的組織とした腫瘍組織への移行性の向上も可能であるとも考えた。そこで本研究では、siRNA 搭載エキソソーム産生細胞を利用した組織 細胞の二段階の標的指向性に基づく革新的な siRNA 送達法の開発を目指した。

申請者はこれまでにエキソソーム内部へのタンパク質の搭載を目的として、Gag タンパク質を利用したエキソソーム内部への目的タンパク質搭載法を開発したことから (Mol Pharm, 2018)、これに RNA 結合タンパク質を融合することで siRNA の搭載に利用可能ではないかと考えた。その一方で、エキソソーム一粒子当たりの Gag の搭載量は 10 分子程度であったことから、Gag 一分子当たり、多数の siRNA 前駆体を結合させることでより多数の siRNA の搭載が可能ではないかと考えられた。これまでに、核酸の二本鎖形成能を利用することで、核酸の集合化による核酸医薬の機能性の向上や、エキソソームの集合体の形成にも利用可能であることを報告してきたことから (ACS Nano, 2012; Biomaterials, 2017, 2019; J Control Release, 2018)、エキソソームへの RNA 搭載に際しては RNA の構造体化により搭載効率の向上が可能ではないかと考えた。

3. 研究の方法

本研究では、上述した目的の達成のために、
・効率的に siRNA を搭載したエキソソームの産生細胞の構築、
・エキソソームへの標的細胞指向性の賦与、
・エキソソーム産生細胞への標的組織指向性の賦与、
について開発した。以下に研究方法を詳述する。

・効率的に siRNA を搭載したエキソソームの産生細胞の構築

RNA 結合タンパク質とタンパク質結合 RNA モチーフの組み合わせによりエキソソームへ siRNA 前駆体を搭載する。RNA 結合タンパク質として、古細菌由来のタンパク質である L7Ae を選択し、これとエキソソーム内膜移行性タンパク質である Gag との融合タンパク質に FLAG タグを組み込んだタンパク質 Gag-L7Ae を設計しその発現プラスミド DNA を構築した。別途 L7Ae を導入した大腸菌を確立し、これより L7Ae の組み換えタンパク質を調製した。siRNA の前駆体として、ループ部分に L7Ae 結合 RNA 配列である C/D box 配列を挿入した short-hairpin RNA (shRNA) を設計し、その発現プラスミド DNA を構築した。また、C/D box モチーフ辺りの siRNA 前駆体量増大のために、核酸の相補鎖形成を利用してエキソソーム産生細胞内にて RNA ナノ構造体を形成

させることを目的として、両端が相補鎖となるような RNA 配列、RNA ナノ構造体を設計した。図 1 にイメージを示す。モデルエキソソーム産生細胞として、ヒト胎児腎線維芽細胞株 HEK293 細胞を用いた。各 RNA は、T7 RNA ポリメラーゼを利用した *in vitro* 転写反応を用いて調製した。エキソソームへの RNA 搭載効率は、リアルタイム RT-PCR 法を用いて測定した。各 siRNA 前駆体の RNA 干渉の誘導能の評価については、ホタルルシ

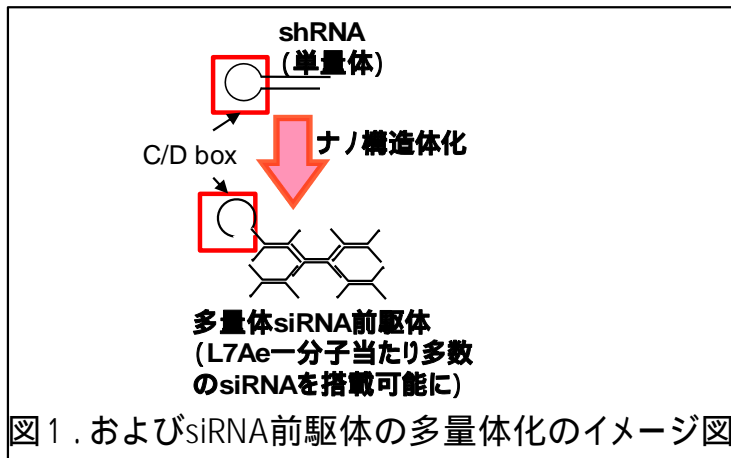


図 1. および siRNA 前駆体の多量体化のイメージ図

フェラーゼをモデルの標的遺伝子として、これを標的とする各 siRNA 前駆体を設計し、ホタルルシフェラーゼを導入した細胞に対して各 siRNA 前駆体を導入し、ルシフェラーゼ活性を測定することで RNA 干渉の誘導能を評価した。

・エキソソームへの標的細胞指向性の賦与法の確立

エキソソームへのリガンド搭載による標的細胞指向性の賦与法の確立を目的として、モデルの標的細胞として樹状細胞 (DC) を選択し、そのリガンドである CD40L のエキソソームへの搭載を行った。CD40L とエキソソーム外膜移行性タンパク質である Lactadherin (LA) の融合タンパク質 CD40L-LA を設計し、その発現プラスミド DNA を構築した。このプラスミド DNA を導入した細胞からエキソソームを回収し、CD40L 修飾エキソソームを調製した。これを PKH67 色素で蛍光標識し、蛍光標識した CD40L 修飾エキソソームを標的細胞である DC、あるいは非標的細胞である colon26 細胞に添加後のエキソソーム取込み量をフローサイトメトリー法により計測した。

・細胞への標的組織指向性の賦与

腫瘍組織から産生されるケモカイン MCP1 の受容体 CCR2 の発現プラスミド DNA を構築し、これを HEK293 細胞に遺伝子導入した。この細胞のケモカイン遊走能を Transwell を用いたケモタキシスアッセイにて評価した。別途、Transwell の上層に遺伝子導入した HEK293 細胞を、下層に未処置のマクロファージ細胞、あるいは炎症誘導性に分化させたマクロファージを播種し、遊走能を評価することで標的組織への遊走性を評価した。一方で、間葉系幹細胞は腫瘍組織や炎症部位への集積性を有していることが報告されている。そこでモデルの間葉系幹細胞としてマウス脂肪組織由来間葉系幹細胞である m17. ASC 細胞を選択し、そのケモタキシス能ならびに炎症部位遊走性について、HEK293 細胞と同様の検討を行い評価した。

4. 研究成果

・効率的に siRNA を搭載したエキソソームの産生細胞の構築

L7Ae と、C/D box を組み込んだ shRNA とが結合することをポリアクリルアミドゲル電気泳動にて確認した。次に、Gag-L7Ae を遺伝子導入した細胞から回収したエキソソームに Gag-L7Ae が搭載されていることを、FLAG タグを対象としたウェスタンブロッティング法にて確認した。C/D box を組み込んだ shRNA の RNA 干渉誘導能について、ホタルルシフェラーゼを標的とした細胞を用いて評価したところ、通常の shRNA と同様に C/D box を含んだ shRNA を導入した細胞においてもルシフェラーゼ活性の減少が認められたことから、RNA 干渉の誘導能を保持していることが確認できた。そこで、Gag-L7Ae と C/D box を組み込んだ shRNA とを同時に細胞へと遺伝子導入し、その細胞からエキソソームを回収した。回収したエキソソームに含有される shRNA の量を測定したところ、Gag-L7Ae を導入せず C/D box を組み込んだ shRNA だけを導入した細胞においては RNA が検出されなかったことは対照的に、同時導入した細胞においてはエキソソームへの shRNA 搭載が検出され、概算にてエキソソーム一粒子あたり 10 分子前後の shRNA が搭載されていた。

次に Gag-L7Ae あたりの RNA 搭載量の向上を目的として、ナノ構造体化した C/D box 含有 shRNA 前駆体について検討を行った。in vitro 調製した RNA を用いて、ナノ構造体化、すなわち多量体化についてポリアクリルアミドゲル電気泳動にて評価したところ、設計通りに多量体化していることを確認できた。そこで、この RNA ナノ構造体の RNA 干渉誘導能について、ホタルルシフェラーゼを標的として上記の検討と同様の方法にて検討を行った。その結果、ナノ構造体化した shRNA 前駆体は、単量体の shRNA がほぼ 10%程度にまで遺伝子発現を抑制したのとは対照的に、50%程度にまでしか遺伝子発現を抑制できなかった。これは多量体化している RNA は、RNA 処理酵素である Dicer にて認識されずらいために、siRNA が効率的に細胞内にて調製されなかったためではないかと考察している。次に、C/D box を含有する RNA ナノ構造体を Gag-L7Ae と同時に遺伝子導入した細胞からエキソソームを回収し、RNA 搭載量を評価した。その結果、RNA はほとんど搭載されていなかった。これは、多量体化した RNA に含まれる C/D box 配列が、Gag-L7Ae に認識されにくかったために、エキソソームへと搭載されなかったものと考察している。

・エキソソームへの標的細胞指向性の賦与法の確立

CD40L 修飾エキソソームを回収し、その細胞選択性について評価した。その結果、CD40L 修飾エキソソームは未修飾のエキソソームと比較して、標的細胞である DC に効率的に取り込まれた。また、非標的細胞に対する取込みは CD40L 修飾の影響を受けなかった。また、低温時には CD40L 修飾の有無によらずエキソソームの取込みは大幅に低下した。従って、リガンド修飾されたエキソソームの取込みは温度すなわちエネルギー依存的な経路であることを明らかとした。LA を利用したエキソソームへのリガンド修飾がエキソソームの標的細胞指向性の賦与に有用な手法となることを実証した。

・細胞への標的組織指向性の賦与

CCR2 を導入した HEK293 の遊走能について MCP-1 を利用したケモタキシスアッセイにて評価したところ、CCR2 の導入により遊走能が向上した。また、この細胞を未刺激のマクロファージあるいは炎症誘導性へと分化させたマクロファージと Transwell にて共培養し、炎症部位への遊走性を評価したところ、CCR2 の遺伝子導入により炎症性のマクロファージへの遊走性が向上した。CCR2 の導入による細胞への炎症部位集積性の賦与の可能性について証明した。別途、ASC についてその遊走性を評価したところ、CCR2 を導入した HEK293 細胞と同様に炎症部位集積性を示しうることを明らかとした。従って、ASC は炎症部位への送達細胞として利用可能であることを明らかとした。

以上本研究では、これまでに報告の無い、細胞そしてその産生エキソソームの動態の制御による二段階の標的指向性の賦与による革新的なデリバリー法の開発につながる基礎的な知見を得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋有己
2. 発表標題 エクソソームの体内動態の解析に基づく疾患治療法開発
3. 学会等名 第21回日本抗加齢医学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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