様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　５ 年　 ６ 月　 ７ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2021～2022
課題番号：２１Ｋ２０５０４

研究課題名（和文）マイクロ流体デバイスによるエクソソーム創薬基盤の創成

研究課題名（英文）On-chip hydration method for production of artificial exosomes

研究代表者
木村　笑（Kimura, Niko）

九州大学・工学研究院・助教

研究者番号：８０９１０９２６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、マイクロ流体デバイスを利用して、異なる物理的特性を持つ人工エクソソームを製造するオンチップ作製法を実証した。 人工エクソソームは、哺乳類細胞から分泌される細胞外小胞の脂質成分、内包分子、サイズ、剛性、流動性などの物理特性に基づいて設計した。
人工エクソソームを作製するため、すべての脂質分子と内容物を同時に自己集合させる従来のマイクロ流路法と、脂質分子や内包分子を化学的特性に基づいて順次的に自己組織化するためのマイクロ流路法の2つのオンチップ方法を実証した。
最後に、作製した複数の人工エクソソームの物理特性に基づいて、人工エクソソームの細胞内取り込みにおける嗜好性を見える化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
2018年以降、RNAなどの核酸を脂質ナノ粒子に搭載したナノ医薬品の臨床応用が急速に進んでいる。特に細胞外小胞のエクソソームに薬剤を搭載するエクソソーム創薬は、非侵襲なナノ医薬として注目されているが、高効率な薬剤導入は難しく、粒子物性は細胞からの抽出操作等で変化するため、ナノ粒子物性が生体内挙動に与える影響を統一的に評価できるエクソソーム創薬基盤の構築が求められている。
本研究で構築したマイクロ流体デバイスによる人工エクソソーム作製手法は、物理特性の視点でエクソソームの細胞内動態を理解をするための基盤技術となり得るのみならず、次世代の創薬の基盤となる統一的な評価系の構築へ貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, I demonstrated on-chip processes for producing artificial exosomes with different physical characteristics by utilizing microfluidic devices. Artificial exosomes were designed based on lipid components, contained biomolecules, and physical characteristics, such as size, stiffness, and fluidity, of extracellular vesicles secreted from mammalian cells.
In order to produce artificial exosoms containing biomolecules, I demonstrated two different on-chip methods. One was a conventional microfluidic method for simultaneous self-assembling of all lipid molecules and contents. The other was a microfludic method for sequential self-assembling of them based on their chemical characteristics.
Finally, based on the classified physical characteristics of the prepared artificial exosomes, I achieved to visualize cellular uptake preferences of nanoparticles based on natural lipids.

研究分野：ナノ材料工学

キーワード：マイクロ流体デバイス　脂質ナノ粒子　細胞外小胞

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

2018 年以降、RNA などの核酸を脂質ナノ粒子に搭載したナノ医薬品の臨床応用が急速に進んでいる。特に細胞外小胞のエクソソームに薬剤を搭載するエクソソーム創薬は、非侵襲なナノ医薬として注目されている（*1*）。しかし、高効率な薬剤導入は難しく、粒子物性は細胞からの抽出操作等で変化するため、ナノ粒子物性が生体内挙動に与える影響を統一的に評価できるエクソソーム創薬基盤の構築が求められている。そこでエクソソームの脂質組成を模倣した粒子の、人工エクソソームが注目されている。しかし従来の人工エクソソーム作製手法では、粒径を精密制御しながら薬剤を高効率で封入することは達成されていない（*2*）。

２．研究の目的

本研究では、①流路内の流体挙動操作によって物性が異なる人工エクソソームを作り分ける方法を確立し、②作製粒子の細胞内挙動を解析することを目的とした。また、確立した粒子作製手法を siRNA 以外の核酸や分析プローブの封入へ応用した。これにより、物性が異なるナノ粒子ライブラリーが形成でき、エクソソーム創薬の基盤となる統一的な評価系の構築へ貢献すると考えられる（図１）。

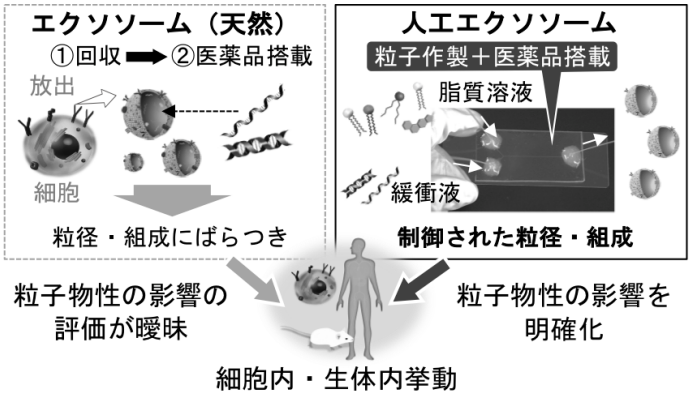

図 1. エクソソーム創薬

３．研究の方法

マイクロ流体デバイスによる人工エクソソーム作製方法を確立し、作製粒子の細胞内挙動を解析する。具体的には 2 つの課題の達成に取り組んだ。

（１）粒径・組成が異なる人工エクソソームの作製方法の開発

人工エクソソームは、脂質をエタノールへ溶解させた脂質溶液と、内包したい水溶性分子を分散させた緩衝液を原料溶液とし、マイクロ流体デバイス内部へシリンジポンプによって送液する手法（オンチップ水和法）で作製した（*3*）。脂質溶液の調製には、エクソソームの代表的な構成脂質である、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC), 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE), Sphingomyelin, Cholesterol, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine (DOPS)の 5 種類の脂質を用いた。内包分子には、核酸分子（dsDNA（700bp）、dsRNA（21 mer）、蛍光ナノダイヤモンド（アミノ基修飾、100 nm）を用い、クエン酸緩衝液、塩化カルシウムを含むトリス-塩酸緩衝液（*4*）に分散させた。作製粒子の粒径は、動的光散乱法（DLS）および Nanoparticle Tracking Analysis (NTA)によって評価し、分子の封入率は、従来の人工脂質分子を主成分とする脂質ナノ粒子への RNA 測定に用いられている Ribogreen assay （3）を基にプロトコ

ルを作成し、プレートリーダーを用いて蛍光強度を測定することで算出した。

（２）作製粒子の細胞内挙動解析

（１）と並行して作製粒子の細胞内挙動を解析した。粒子の細胞内挙動評価にはモデル細胞として主に HeLa 細胞を使用した。機能性の核酸分子である small interfering RNA (siRNA)を封入した人工エクソソームの活性は、ルシフェラーゼ発現 HeLa 細胞を用いてノックダウン活性を評価した。また、天然脂質を主成分としたナノ粒子の細胞内への取り込み挙動を詳細に可視化、評価するために、脂溶性プローブ（3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine, perchlorate (Neuro-DiO)、または 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)）で蛍光標識した人工エクソソームを調製し、HeLa 細胞へ暴露し、人工エクソソームのサイズ、粒子表面の流動性、内包分子の有無によるかたさ、の物理特性が取り込み量と取り込み課程に与える影響をフローサイトメーターおよび顕微鏡観察によって評価した。

４．研究成果

（１）異なる物理特性をもつ人工エクソソームの作り分け

従来のオンチップ水和法では、粒子を構成する脂質分子を全て同じ脂質溶液に分散させて用いる。本研究では、流路へ導入された溶液が形成する液-液界面に着目し、内包したい分子（DNA）と脂質分子の化学的特性に応じて段階的に脂質溶液を導入する方法も併用した。人工エクソソームの脂質組成は、粒子表面の流動性が大きく異なる RBL-2H3、PC-3、Jurkat 細胞から分泌されたエクソソームの脂質組成を基に決定した。原料溶液の流路への導入手法を使い分けることによって、従来法だけではサイズの作り分けが困難だった空粒子および DNA 搭載粒子をそれぞれ大小作り分けることに成功した（*5,6*）（図２）。

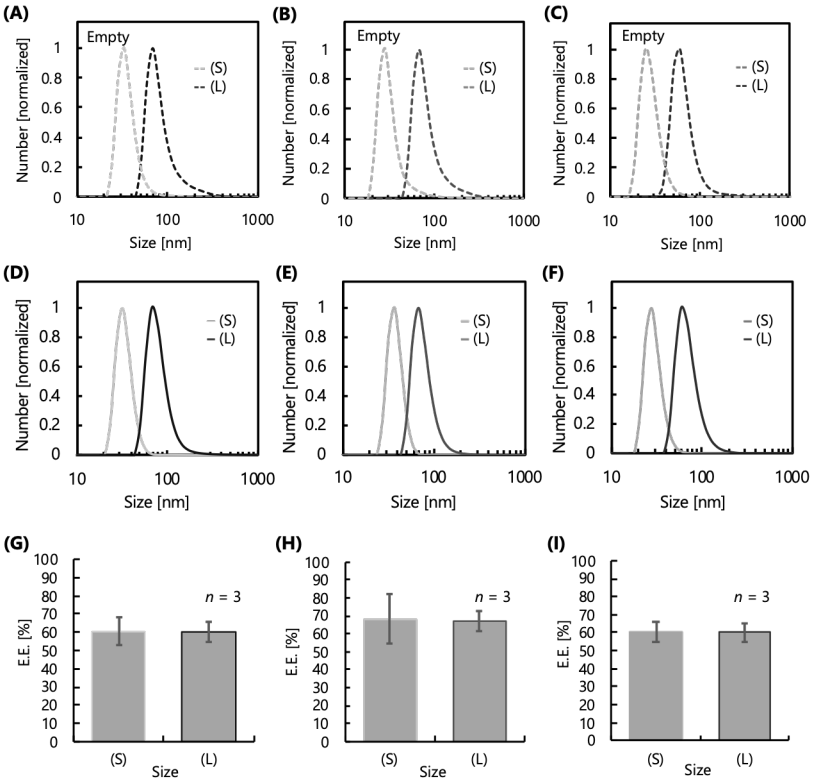

図２．作製した人工エクソソームの粒径分布と DNA 搭載効率

(A-C) 空の人工エクソソームの粒径分布。(D-F) DNA を搭載した人工エクソソームの粒径分布。(G-I) 人工エクソソームへの DNA 搭載率。

（2）人工エクソソームによる細胞の物理特性嗜好性の評価

作製した人工エクソソームのライブラリを用いて、ナノ粒子の物理特性（サイズ・表面流動性・かたさ）に対する細胞の取り込み嗜好性を評価した（図３）。HeLa 細胞は空粒子において粒子の物理特性に依存した取り込み挙動は確認できなかった（図３A-C)。一方で、DNA を搭載した粒子において、粒子表面の流動性が高い組成の人工エクソソームにおいてサイズに依存した粒子取り込みが見られた（図３D)。これは、DOPE の含有率が高く、実際のエクソソームと同様に内部に生体分子を含む比較的かたい脂質ナノ粒子において、サイズを制御して分子輸送ナノキャリアを設計・作製することが重要であること、生体内における多種多様なエクソソームを介した複雑細胞間情報伝達において、主要なマーカー分子だけでなく”粒子”としての特性が関与している可能性を示唆していると考えられる。

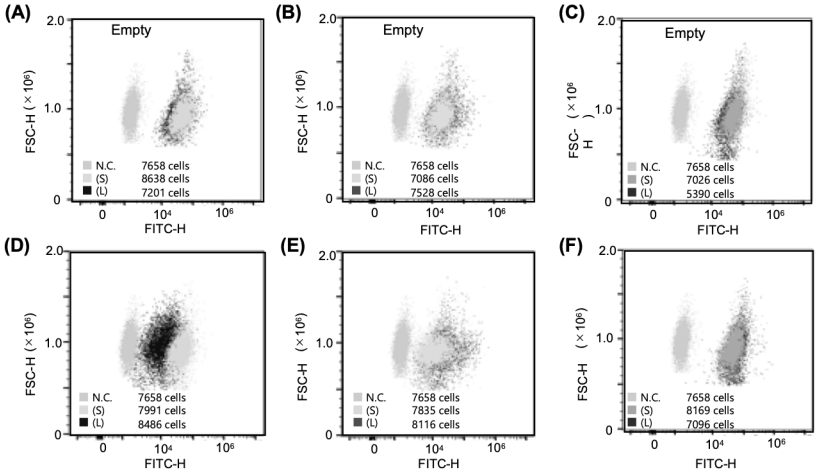

図３. HeLa 細胞の粒子取り込みにおける物理特性嗜好性

引用文献

(1) M. Zhang *et al*., *J. Mater. Chem. B*, **7**, 2421-2433 (2019).

(2) M. Lu *et al*., *Int. J. Pharm.*, **550**, 100-113 (2018).

(3) N. Kimura *et al*., *ACS Omega*, **3**, 5044-5051 (2018).

(4) N. Kimura *et al*., *ACS Appl. Bio Mater.*, **4**, 1783-1793 (2021).

(5) N. Kimura *et al*., *Proc. μTAS2021*, **1**, 355-356 (2021).

(6) 木村笑、佐久間臣耶、*Medical Science Digest*, **49**, 6, 47-49 (2023).

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計3件（うち査読付論文　2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 Niko Kimura, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma	４．巻 1
２．論文標題 AVATAR CELLS: LIVING-CELLS GIFTED NANOFUNCTIONERS	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Proc. MicroTAS2022	６．最初と最後の頁 p.174-175
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 －

１．著者名 Niko Kimura, Takuma Nomiyama, Toyohiro Naito, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, and Noritada Kaji	４．巻 1
２．論文標題 MICROFLUIDIC METHODOLOGIES FOR PRODUCTION OF SMALL-SIZED VARIOUS ARTIFICIAL EXOSOMES	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Proc.MicroTAS2021	６．最初と最後の頁 355-356
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 －

１．著者名 木村笑、佐久間臣耶	４．巻 49
２．論文標題 人工エクソソームの物性制御が拓く脂質ナノ医薬の理解と利活用　Artificial exosomes with designed physical characteristics lead to unexplored insights and applications of lipid-based nanomedicines	５．発行年 2023年
３．雑誌名 Medical Science Digest	６．最初と最後の頁 47-49
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 －

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　0件／うち国際学会　2件）

１．発表者名 Niko Kimura, Yoko Yamanishi, Shinya Sakuma
２．発表標題 AVATAR CELLS: LIVING-CELLS GIFTED NANOFUNCTIONERS
３．学会等名 26th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences（国際学会）
４．発表年 2022年

１．発表者名 Niko Kimura, Takuma Nomiyama, Toyohiro Naito, Masatoshi Maeki, Manabu Tokeshi, and Noritada Kaji
２．発表標題 MICROFLUIDIC METHODOLOGIES FOR PRODUCTION OF SMALL-SIZED VARIOUS ARTIFICIAL EXOSOMES
３．学会等名 MicroTAS2021（国際学会）
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