

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590993

研究課題名(和文) iPS細胞由来の人工型エクソソームによるmiRNAを用いたHCVの治療法の開発

研究課題名(英文) The study of clinical application for HCV with miRNA containing the modified exosomes derived from iPS cells

研究代表者

高梨 正勝 (Takanashi, Masakatsu)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80312007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：HCVを標的とするmiRNAを用いた治療法を行うにはドラッグデリバリーシステム(DDS)を開発する必要がある。本研究はDDSにエクソソームを応用し、miRNAによる治療法の開発を試みた。EGFRのリガンドの部分配列を持つGE11を発現させた細胞からエクソソームを精製しエクソソームを標的細胞へ特異性を持たせた。miRNAの内包はエクソソーム産生細胞に遺伝子導入し、精製したエクソソームに含まれることを確認した。このエクソソームを動物に投与すると移植したヒト腫瘍細胞特異的にデリバリーされることを確認した。このシステムにHCVを標的とするmiRNAを内包することでHCVの治療に応用する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：It is necessary to develop drug delivery system (DDS) to give a treatment using miRNA which targets HCV. In this study we examined to apply exosome to DDS for miRNA. We purified the exosomes from the cells which produced GE11 with the partial alignment of the ligand for EGFR and gave the target cell specificity. We produced the exosomes contain miRNA to gene transfer into the exosome-producing cells and confirmed that it was included in purified exosomes. We confirmed that the exosomes specifically performed delivery to the xenografted human cancer cells in mice. So we showed possibility to apply to treatment of the HCV by the exosomes containing miRNA which targets HCV in this system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：エクソソーム HCV 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

日本では150万から200万人がHCVに感染しており、国民100人中1から2人がウイルスキャリアーであると報告されている。HCV由来の癌は肝癌の8割を占める。HCVに対する治療法は肝機能を改善して肝臓の機能の悪化を防ぐ対症療法と、インターフェロン(IFN)を用いてHCVを体内から排除する方法がある。

しかし、日本人のHCVキャリアーの70%は1b型の遺伝子型であり、IFNに対する反応性は弱く、また、IFNによる副作用も起こることが報告されている。そのため、IFNに変わるHCVを標的とした治療法の開発が望まれる。近年、分子標的治療法への応用に20から25塩基の一本鎖RNAで遺伝子発現の調節を行う機能性RNA(miRNA)が注目されている。2009年にmiRNA-199aにはHCVのゲノムの複製を抑制する働きがあることを、本研究分担者である村上らによって報告をした。我々はこのmiRNAを用いてC型肝炎の発症原因となるHCVの複製を抑制する治療法の開発を目指す。miRNAの存在は、細胞のみならず、血液や尿、髄液、母乳などでも確認されている。また、癌患者の血清中にもmiRNAが存在すること(Tanaka; Plos One)や、肝癌でのmiRNAが癌の増殖に重要な役割をしていること(Shigoka; Patho. Int.)を我々は報告している。治療効果を高めるためにはHCVの感染した肝細胞に効率よくmiRNAを導入するため、miRNAの細胞内外の輸送を行っているエクソソームに肝細胞と親和性のあるHGFをエクソソームの膜上に発現させたものを用いる。エクソソームには主要組織適合遺伝子複合体(MHC)が発現して

いることから、治療に用いるエクソソームは患者由来のものが望まれる。そこで、患者由来の細胞をiPS細胞へ誘導し人工型エクソソームを作成する。

2. 研究の目的

HCVの多くの遺伝子型はIFNに対する反応性は弱く、IFNに変わるHCVを標的とした新規治療法の開発が望まれる。我々は世界で初めてHCVレプリコンを標的とするmiRNAの単離に成功し、このmiRNAを用いたHCVの治療応用を目指している。一方、核酸治療薬の効果は標的細胞に核酸薬が効率良く到達することが重要であると考えられておりmiRNAを感染細胞に効率良く作用させることが必要である。そこで我々は、iPS細胞を用いた細胞内小胞体膜表面にHGFを発現させた人工型エクソソームを合成し、その中にmiRNAを組み込んだ革新的なドラッグデリバリーシステムを開発する。このシステムを用いることはHCVを標的とする斬新的な治療方法の実現を可能とする。

3. 研究の方法

HCVの標的治療の開発のため、以下の研究計画を行った。

- (1)HGFを発現させたキメラ型エクソソーム及びmiRNAを含む人工型エクソソームの作成
- (2)*in vitro*でのHCV標的miRNAを含む人工型エクソソームによるHCVゲノムの抑制効果
- (3)マウスを用いた実験動物での人工型エクソソームによるHCVゲノムの増殖抑制効果
- (4)人工型エクソソームの異種抗原に対する実験動物での検討
ヒトiPS細胞由来の人工型エクソソームの作成と機能の解析

4. 研究成果

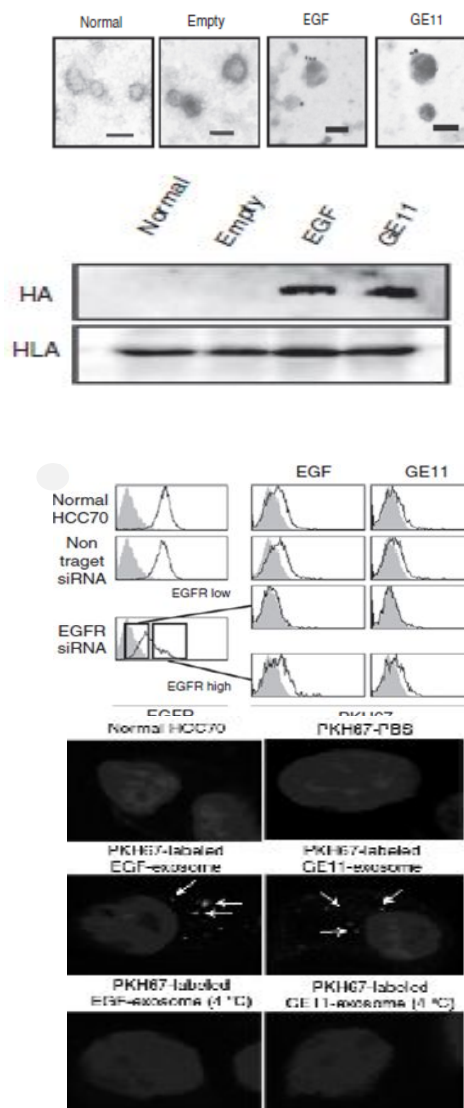
(1) エクソソーム産生細胞の確立とエクソソームの精製法

DDS に応用するエクソソームは、腫瘍細胞由来のエクソソームには取り込まれた細胞に影響を及ぼすことも考えられるため、内包される因子を考慮して正常に近い細胞株である HEK293 細胞を使用した。エクソソームの精製法については、培養上清を限外濾過法や超遠心法を試した結果、超遠心法で精製することで、均一な大きさのエクソソームを電顕写真から確認した。以上の結果から HEK293 細胞の培養上清を超遠心法にてエクソソームを精製することとした。

(2) 組織指向性を保持するエクソソームの作成

エクソソームを上皮細胞と親和性を持たせるため、EGFR 標的とした親和性分子を保持するエクソソームを作成することにした。EGFR は EGF の受容体であり、EGF の結合領域である GE11 にも親和性を示す。GE11 とキメラ分子を発現するベクターを構築し、HEK293 細胞に導入することで膜上に発現するか確認した。エクソソームの構成は細胞膜であるため、産生細胞膜に分子の発現を western blot 法と FACS で調べることで確認することが出来た。この細胞の培養上清からエクソソームを回収し、エクソソームでの分子の発現を調べたところ、western blot 法及び、免疫電顕にて確認が出来た。EGFR に対する親和性の確認を EGFR の発現量の違う細胞に蛍光標識したエクソソームを反応させ、共焦点レーザー顕微鏡で観察すると EGFR の発現量に依存する結果

を得た。以上の結果から EGFR 分子に対する指向性を持つエクソソームの作成に成功した。



(3) エクソソーム内への miRNA の内包

miRNA をエクソソームに内包について二つの方法を行った。一つは精製したエクソソームにエレクトロポレーション法を用いて miRNA オリゴを導入する。二つ目は、エクソソーム産生細胞自身に miRNA オリゴを遺伝子導入して培養上清中に産生されるエクソソームを回収する方法を行った。エクソソームに内包されたエクソソームの評価は PCR 法で確認をしたところ、二番目の方法でのみ miRNA の検出が確認された。

(4) 作成したエクソソームの機能解析

標的細胞に取り込まれた作成したエクソソームが細胞の標的分子の発現量に変化を誘導するか確認したところ、核酸を内包したエクソソームでは核酸を内包しないエクソソームと比較をして取り込まれた細胞の遺伝子の抑制効果が見られた。この結果からエクソソームに内包した核酸は標的細胞に取り込まれ、細胞内の遺伝子発現を抑制する機能を有することを示すことに成功した。

(5) マウスを用いた生体内での核酸デリバリーシステムの確認

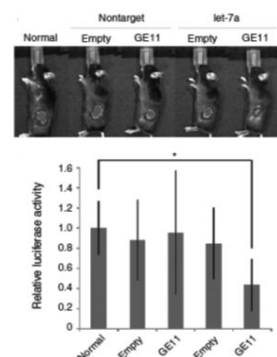
ヒト腫瘍細胞を Rag2^{-/-} マウスに移植・生着した個体に、蛍光標識したエクソソームを尾静脈から投与し、in vivo imaging analyzer (IVIS) で解析し、各臓器におけるエクソソーム分布を確認したところ、腫瘍組織に標識したエクソソームが到達していることを確認した。

(6) ヒト腫瘍組織を持つマウスでのエクソソーム

ヒト腫瘍細胞株を移植・生着させた Rag2^{-/-} に miRNA を内包したエクソソームを尾静脈より一週間ごとに 4 回投与し、その後の腫瘍の増殖について、In vivo imaging analyzer で解析したところ、核酸を内包したエクソソーム群ではエクソソーム単独群、対照核酸群と比較して優位な腫瘍の抑制効果を得た。

以上の結果から標的組織特異的な分子をエクソソームに発現させることにより、組織特異的に取り込まれ、さらに、このエクソソームに内包された miRNA が細胞内で機能することで腫瘍の増殖を抑制することに成功した。これらの結果は、miRNA の組織特異的なドラッグデリバリーシステム

にエクソソームが応用可能である可能性を示した。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Wu W., Takanashi M., Borjiigin N., Ohno S., Fujita K., Hoshino S., Osaka Y., Tsuchida A., Kuroda M. miRNA-18a modulates STAT3 activity through negative regulation of PIAS3 during gastric adenocarcinogenesis. *British J. Cancer*, 査読有 108(3), 2013, 653-661.

Yamaguchi G., Takanashi M., Fujita K., Ohira T., Kuroda M., Ikeda N. Isolation of mRNAs that target EGFR mRNA in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.*, 査読有 420(2), 2012, 411-416

Ohno S., Takanashi M., Sudo K., Ueda S., Ishida A., Matsuyama N., Fujita K., Mizitani T., Ohgi T., Ochiya T., et. al., Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol. Ther.*, 査読有 21(1) 2012 185-191

Borjiigin N., Ohno S., Wu W., Tanaka M., Suzuki R., Fujita K., Takanashi M., Oikawa K., et. al., TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid liposarcoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有 427(2) 2012 355-360.

Oikawa K., Tanaka S., Itoh S., Takanashi M., Ozaki T., Muragaki Y., Kuroda M., A novel oncogenic pathway by TLS-CHOP involving repression of MDA-7/ IL-24 expression. *British J. Canc.* 査読有 106(12) 2012 1976-1979

Xu M., Takanashi M., Oikawa K., Nishi H., Isaka K., Yoshimoto T., Ohyashiki J., Kuroda M., Identification of a novel role

of Septin 10 in paclitaxel-resistance in cancers through a functional genomics screen. *Cancer Sci.*, 査読有 103(4) 2012 821-827

Tsuchida A., Ohno S., Wu W., Borjigin N., Fujita K., Aoki T., Ueda S., Takanashi M., Kuroda M. miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.*, 査読有 102(12), 2011, 2264-2271

Suzuki R., Tanaka M., Takanashi M., Hussain A., Yuan B., Toyoda H., Kuroda M. Anthocyanidins-enriched bilberry extracts inhibit 3T3-L1 adipocyte differentiation via the insulin pathway. *Nutrition & metabolism*. 査読有 8, 2011, 14

〔学会発表〕(計 11 件)

高梨正勝 須藤カツ子 松永芳径 石川章夫 大木忠明 濱崎智洋 後藤浩 黒田雅彦 新規核酸を用いた血管新生網膜症に対する分子標的治療薬 第 103 回日本病理学会総会 2013 年 6 月 札幌

Ohno S, Takanashi M., Ohgi T, Mizutani T, Murakami T, Kuroda M., Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver anti-tumor microRNA to breast cancer cells. *Keystones Symposia Conference-Noncoding RNAs in Development and cancer*. 2013 年 1 月 Vancouver, CANADA

高梨正勝 須藤カツ子 松永芳径 石川章夫 大木忠明 濱崎智洋 後藤浩 黒田雅彦 新規核酸を用いた血管新生網膜症に対する分子標的治療法の開発 第 102 回 日本病理学会総会 2012 年 6 月 札幌

Oikawa K Takanashi M Niwa M Sun Y Gui T Shimokado A Itoh S Ozaki T Kuroda M Muragaki Y Wapl regulates HP1 expression and levels of various histone H3 tail modification. 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 福岡

高梨正勝 須藤カツ子 大野慎一郎 上田しのぶ 石川章夫 黒田雅彦 マウスに経口投与したエクソソームの生体内での安定性と分布 第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 2012 年

及川恒輔 高梨正勝 黒田雅彦 村垣泰光 粘膜型脂肪肉腫において TLS-CHOP は抗がん性サイトカイン MDA-7/IL-24 の発現を抑制する 第 71 回日本癌学会学術総会 札幌 2012 年 9 月

高梨正勝 須藤カツ子 松永芳径 大木忠明 濱崎智洋 谷口維紹 白井嘉彦 後藤浩 黒田雅彦 第 32 回日本眼薬理学会総会 滋賀 2012 年 9 月 那日蘇 大野慎一郎 田中正視 呉偉紅 田中理英子 藤田浩司 高梨正勝 黒田雅彦 TLS-CHOP 癌遺伝子が発現制御する miRNA の解析 第 101 回日本病理学会総会 東京 2012 年 4 月 倉田厚 呉偉紅 山田正俊 那日蘇 藤田浩司 大野慎一郎 高梨正勝 黒田雅彦 胃低分化癌における in situ hybridization 法を用いた miR-92a および miR-200c の発現低下の意義 第 101 回日本病理学会総会 東京 2012 年 4 月

高梨正勝 須藤カツ子 大野慎一郎 上田しのぶ 石川章夫 黒田雅彦 人工型 exosome の生体分布と安定性についての研究 第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 横浜

高梨正勝 須藤カツ子 大野慎一郎 上田しのぶ 石川章夫 黒田雅彦 CD63-GFP を発現したエクソソームのマウス生体内での安定性と分布について 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高梨 正勝 (TAKANASHI, Masakatsu)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：80312007

(2)研究分担者

村上 善基 (MURAKAMI, Yoshiki)
大阪市立大学・医学(系)研究科(研究
院)・准教授
研究者番号：00397556

(3)研究分担者

梅澤 明弘 (UMEZAWA, Akihiro)
独立行政法人国立成育医療研究セン
ター・部長
研究者番号：70213486

(4)連携研究者

須藤 カツ子 (SUDO, Katsuko)
東京医科大学・医学部・兼任講師
研究者番号：50126091