

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 14 日現在

機関番号：32645

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659166

研究課題名(和文) 癌患者自身の膜小胞体エキソソームを用いた新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new cancer therapy using the exosomes from patients.

研究代表者

仲矢 丈雄 (Nakaya, Takeo)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80512277

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

研究成果の概要(和文)：ヒト血液T細胞を効率的に培養し培養上清からT細胞が産生するエキソソームを効率的に回収する方法を検討した。T細胞産生エキソソームの表面分子への抗体を用いエキソソーム量を正確に定量する方法の開発を行った。エキソソームにがん細胞に結合する分子を発現させ、がん細胞を標的とするエキソソーム作製を検討し、ヒト肺癌細胞、肉腫細胞の移植マウスにmiRNA含有エキソソームを投与し腫瘍の増殖抑制を検証した。Luciferaseの全身発現マウスにLuciferaseを抑えるmiRNA含有エキソソームを投与し各臓器での発現抑制を検証した。また、HBV由来表面マーカーで肝細胞にエキソソームをとりこませる技術を検討した。

研究成果の概要(英文)：We developed the effective culture system of human CD8 T cells and effective collection methods of CD8 T cell generating exosomes. We also invented the accurate measurement system of T cell exosomes using the surface molecules of CD8 T cells. We also developed the cancer cell targeting exosomes. We investigated the tumor suppressive effects of cancer cell targeting exosomes in mice with human lung cancer cells or sarcoma cells. We observed how the miRNA including exosomes suppress the luciferase expression in luciferase expressing mice. We also investigated the methods that only hepatic cells can intake exosomes using HBV derived surface molecules.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：がん エキソソーム miRNA CD8 T細胞

1. 研究開始当初の背景

癌は日本人の死因の第一位を占めており、幸福に天寿を全うできる社会の実現のために、癌の克服は急務である。近年、癌の原因分子に直接的に作用する分子標的医薬、抗体医薬、酵素活性を阻害する低分子化合物が癌治療に用いられ大きな成果を上げている。一方、癌の増殖・浸潤・転移には、Ras など細胞内伝達物質や、c-Myc などの転写因子が極めて重要な役割を果たすが、これらの分子に対して、既存の抗体医薬、低分子化合物、siRNA では完全に作用を阻害できないため、新たな治療のイノベーションが必要である。

microRNA (miRNA) はタンパク質をコードしない 20 塩基長前後の non-coding RNA で、標的となる RNA の発現を抑制し、様々な生理活性を制御する。特に癌と関連が深い事が明らかになり、従来手法では標的にできない癌遺伝子を miRNA により抑制する癌治療法の開発が期待されている。

研究代表者らは、細胞自身が産生し分泌する膜粒子であるエクソソーム(exosome)に着目した。エクソソームに内包される miRNA 等の核酸はエクソソームの膜と蛋白の構造に守られ血中で RNase 抵抗性であることを研究代表者らのグループは明らかにした (*Pathol. Int.* 60:351, *Biomarkers.* 14:529, *PLoS One.* 4:e5532)。また、Kosaka らは細胞で作成した人工エクソソームは他細胞にも取り込まれ取り込んだ細胞の形質を変化させることを示した (*J Biol Chem.* 285:17442)。さらに、エクソソームによる癌細胞への核酸輸送系は、核酸が直接標的細胞の細胞質に取り込まれて機能し、核酸のゲノムへの組み込みによる発癌の危険がなく、エクソソームが腫瘍血管内皮の間隙を通り正常血管内皮の間隙を通らない大きさのため腫瘍組織に到達しやすく正常組織に漏れ出しにくいという利点がある (*Nat. biotechnol.* 29:325)。

2. 研究の目的

癌の免疫療法では、患者由来の CD8T 細胞が抗腫瘍免疫を活性化し、腫瘍細胞を攻撃する。研究代表者らは CD8T 細胞の培養上清中に患者細胞由来のエクソソームが大量に放出されることを見いだした。このエクソソームは単体で T 細胞と同じく抗腫瘍免疫を活性化する。さらにこのエクソソームは、microRNA を内包し、自己由来のため免疫の攻撃を受けないことから、癌治療の核酸輸送系として理想的条件を持つ。癌患者からエクソソームを回収し、癌細胞を特異的に抑制・死滅させる microRNA を導入し患者の体内に戻すことにより、癌細胞を選択的に抑制・死滅させることができ、副作用の少ない、効果的な新しい癌治療法になるものと期待される。このような癌患者自身のエクソソームを癌抑制 microRNA の輸送に用いた新しい癌治療法の開発を目指す。

エクソソームはエクソソーム産生細胞表面から microvesicle として、細胞外に放出される。従って、エクソソームを癌細胞特異的に取り込ませるため、エクソソーム産生細胞の表面に癌細胞上に高発現する分子の binding partner を発現させる必要がある。研究代表者らは Human Embryonic Kidney (HEK) 293 細胞株に、癌細胞表面に高発現する EGF 受容体の binding partner であつ EGF シグナルを活性化しない GE11 ペプチドを遺伝子導入し薬剤選択により発現細胞株を選別した。この細胞に腫瘍抑制性 microRNA(miRNA) let-7(Ras 等を抑制)を強制発現し、表面に GE11 を発現しかつ let-7 を内包するエクソソームを産生させてこれを精製した。ヒト乳癌細胞を移植した免疫不全マウスにこのエクソソームを投与することで、コントロールに比べ腫瘍が顕著に縮小し、本治療法の有効性を明らかにした(図: in

vivo imaging による評価；光が腫瘍）。

しかし、HEK293 のような患者自身の由来でない細胞株をエキソソーム産生に用いる方法では臨床応用を行う上で2つの大きな問題点が存在する。1つは、細胞株をエキソソームの産生源として用いた場合、免疫系の攻撃を回避するために患者のMHCなどを追加で発現させなければならない点、2つは癌細胞上に高発現する分子のbinding partnerを表面に発現しさらに貪食細胞など癌以外の細胞にできるだけ取り込まれないエキソソームを作成しないといけない点である。そこで本研究課題ではこれら2つの問題点を解決し、一気にエキソソームを用いた癌治療法を臨床応用に持っていかうと考えている。

第一の免疫系の問題点の解決には、癌免疫療法の際増殖させるCD8T細胞の培養上清中に大量にエキソソームが産生されているという独自の発見を活用する。このエキソソームは患者由来のものであるため、免疫系の攻撃を受けることは無い。癌の免疫療法において、患者から採血を行い、抗腫瘍免疫を担うCD8T細胞を、抗CD3抗体とIL-2で刺激を行いながら体外で培養し選択的に増殖させ、患者の体内に再び戻す。この培養方法は確立されており、エキソソームも超遠心法やカラム吸着法により培養上清から大量の抽出精製が可能である。しかも最初の採血以外の全ての操作を *Ex Vivo*で行うので、採血以外全く患者に侵襲や負担がない。また、CD8T細胞由来のエキソソームは、産生細胞が抗腫瘍免疫を担い、表面に抗腫瘍免疫を促進する分子を発現し、内部に抗腫瘍効果を促進するmicroRNAを含む。これらからCD8T細胞由来エキソソームは、単体でも抗腫瘍作用を促進し本治療法に用いる患者自己由来のエキソソームのリソースとして最適と考えられる。

第二の問題点に関しては、T細胞の産生するエキソソームの表面を加工することで解決する。

3. 研究の方法

(1) T細胞由来のエキソソームの内部に癌を抑制するmicroRNAをできるだけ多く効率よく導入する技術の開発。

(2) 標的癌細胞に効率よくエキソソームを取り込ませかつ貪食細胞など癌以外へのエキソソームの取り込みを少なくするために、エキソソームの表面に結合させる蛋白の開発。

(3) T細胞の培養上清から効率よく安価にエキソソームを回収する方法の検討。

(4) 簡便なエキソソームの定量法の開発。

4. 研究成果

ヒト血液T細胞を効率的に培養し培養上清からT細胞が産生するエキソソームを効率的に回収する方法を検討した。T細胞産生エキソソームの表面分子への抗体を用いエキソソーム量を正確に定量する方法の開発を行った。エキソソームにがん細胞に結合する分子を発現させ、がん細胞を標的とするエキソソーム作製を検討し、ヒト肺癌細胞、肉腫細胞の移植マウスにmiRNA含有エキソソームを投与し腫瘍の増殖抑制を検証した。Luciferaseの全身発現マウスにLuciferaseを抑えるmiRNA含有エキソソームを投与し各臓器での発現抑制を検証した。また、HBV由来表面マーカーで肝細胞にエキソソームをとりこませる技術を検討した。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 1件)

「次世代に向けた核酸医薬品の新技術」

()

仲矢丈雄・黒田雅彦・大木忠明

「化学」2012年9月号(化学同人)

研究者番号：

〔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

仲矢 丈雄 (NAKAYA, Takeo)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：80512277

(2) 研究分担者

黒田 雅彦 (KURODA, Masahiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251304

(3) 連携研究者