

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790542

研究課題名(和文)抗体エキソソーム・AbExを用いたDDSの創成と副作用のない癌治療への展開

研究課題名(英文)AbEx: a novel drug carrier based on human antibody-displaying exosome

研究代表者

白須 直人 (SHIRASU, Naoto)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70551422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、分泌膜小胞であるエキソソームに腫瘍関連抗原特異的なヒト抗体を提示させた抗体エキソソーム(AbEx)を薬剤送達に用いる癌治療法の開発を目的とする。癌胎児性抗原(CEA)に対する単鎖型抗体遺伝子をエキソソームタンパク質であるCD63と融合した遺伝子を作製し、実際にAbExの単離に成功した。このAbExは、CEA陽性癌細胞に結合し、細胞内へと取り込まれることが確認された。しかしながら、標的細胞への結合の親和性や特異性は十分とはいえなかった。そこで、AbExの分子デザインの大幅な見直しを行った。現在、安定的な収量と提示量の高いAbExが得られる系の構築を鋭意実施している。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop a novel DDS utilizing a human antibody-displaying exosome (AbEx) loaded with exogenous drugs. Because exosomes are able to be prepared from self-derived cells, if antibody to be displayed is produced with fully human V-genes, it is highly unlikely that the AbEx induces a host immune response. Moreover, tumor-specific and effective accumulation of the AbEx is expected to be accomplished by the antibody-directed tumor targeting and the enhanced permeation and retention effect. We successfully constructed a chimeric gene to produce AbEx which displays fusion proteins of a single-chain variable fragment of human anti-carcinoembryonic antigen (CEA) antibody and CD63 on the membrane. It was found that the AbEx actually binds to CEA-expressing cancer cells and is internalized into the cytosol. Unfortunately, the binding specificity was relatively low, we are optimizing the molecular design and expression system for obtaining more functional AbEx.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー エクソソーム 抗体

1. 研究開始当初の背景

薬剤の過剰投与や副作用を抑え、より安全かつ効果的に治療を行う手段として、必要最小限の薬剤を、必要な時に、必要な場所に集中して供給できるようなドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が盛んに行われている。今日まで、高分子ミセルやリポソーム、あるいは細胞膜透過性ペプチド等に薬効物質を担持させた DDS について数多くの報告がなされているが、用いる担体自体の免疫原性や、標的細胞への選択性が低いことによる非特異的な細胞毒性によって副作用が生じることが判明しており、臨床適用への大きな障壁となっている。また、癌細胞に対する RNA 干渉薬や自殺遺伝子の導入による遺伝子治療には、機能性ウイルスベクターが遺伝子デリバリーに使用されるが、同様の抗原性や標的的特異性の問題に加え、ホストゲノムの不適切な部位に外来遺伝子が挿入されることに起因する細胞がん化のリスクが懸念されている。したがって、これらの問題点を克服した高効率かつ高選択的な標的癌細胞への薬効物質デリバリーシステムの開発が切望されている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、腫瘍関連抗原 (tumor-associated antigen ; TAA) に対する完全ヒト型抗体分子を提示したエキソソーム (これを“抗体エキソソーム (AbEx)”と呼称する) を DDS の担体として利用することで、TAA を発現する標的癌細胞のみに抗腫瘍性の遺伝子や薬剤を送達し、他の正常組織には何ら障害を引き起こすことのない癌治療法の開発を目的とした。エキソソームは、生体内や培養細胞系において種々の細胞によって分泌されることが明らかとなっている直径 30~100 nm の膜小胞であり、その膜上や内包するタンパク質、さらには mRNA や miRNA などの核酸分子を他の細胞へと送

達することで、細胞間情報伝達を担う生体物質として近年注目されている。一方で、エキソソームの生体内における機能解析は未だ黎明期にあり、エキソソームを直接 DDS に応用した報告は、平成 26 年現在においても数報に留まっている。

3. 研究の方法

固形がん組織中の微小新生血管は、正常組織に比べて物質透過性が高く、リンパ管による分子回収機構も不完全であるため、エキソソームのような高分子物質が選択的に移行・集積するような現象が認められる。これは EPR 効果として知られるが、本研究ではこの効果に加えて、癌細胞特異的な抗体分子をエキソソーム表面に提示させることで、さらなる腫瘍への標的化および集積化を目指すものである。本研究で利用したのは、研究代表者がクローニングした癌胎児性抗原 (CEA) に対する完全ヒト型抗体の遺伝子である。抗 CEA-scFv とエキソソームのマーカータンパク質 CD63 の融合遺伝子を作製し、AbEx 発現用コンストラクトを作製した。これを HEK293FT 細胞等に遺伝子導入し、培養上清中に分泌される AbEx の単離を行った。エキソソームの分泌量およびエキソソーム膜上における抗体融合タンパク質の発現量を調べ、遺伝子導入や細胞培養の条件、コンストラクトデザインの最適化を検討した。AbEx の蛍光標識を行い、CEA 発現標的細胞株に対する AbEx の接着・集積、および標的的特異性について、蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーにて精査した。

4. 研究成果

腫瘍関連抗原である癌胎児性抗原 (CEA) に対するヒト単鎖型抗体遺伝子をエキソソームのマーカータンパク質である CD63 の細胞外ループに挿入したキメラ遺伝子のクローニングを行い、AbEx 発現用コンストラクト

を作製した。作製した AbEx 発現ベクターを HEK293FT 細胞に導入し、培養上清中から AbEx の単離を試みた結果、低収量ながらも抗体を提示したエキソソームが得られたことを確認した。単離した AbEx を蛍光色素 Dio によって染色し、これを CEA 陽性ヒト胃癌細胞株 MKN45 の培地中に添加して検鏡した結果、AbEx が細胞内に顆粒状に存在する像が観察され、その細胞内への取込みが確認された。AbEx の CEA 陽性細胞への結合はフローサイトメトリーによっても確認されたが、その結合量は十分とはいえず、CEA 陰性細胞への非特異的な結合も相当量認められた。これは、エキソソームあたりの抗体提示量が少ないこと、あるいは抗体融合タンパク質の抗原親和性が低いことが一因であると考えられた。AbEx の産生量自体も少ないことを鑑みて、抗体提示に用いる融合タンパク質のデザイン的大幅な見直しに着手した。腫瘍標的化に用いる分子種として完全長抗体を用いることとし、これをエキソソーム上に提示させるために、抗 CEA 抗体遺伝子を IgD 型へと改変させた発現コンストラクトを作製した。併せて、間接的な提示法の試みとして、単離エキソソームをアビジン修飾し、ビオチン化抗 CEA 抗体をこれに結合させた AbEx の調製も行った。しかしながら、安定的な収量と提示量の高い AbEx が得られる系の構築が難しく、今後さらなる検討を要する。

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 4 件)

1) Shirasu N, Num SO, Kuroki M. Tumor-targeted photodynamic therapy. *Anticancer Res.* 33(7), 2823-2831 (2013) 査読有り

2) Nam SO, Yotsumoto F, Miyata K,

Shirasu N, Miyamoto S, Kuroki Ma. Possible therapeutic targets among the molecules involved in the warburg effect in tumor cells. *Anticancer Res.* 33(7), 2855-2860 (2013) 査読有り

3) Shirasu N, Kuroki M. Functional design of chimeric T-cell antigen receptors for adoptive immunotherapy of cancer: architecture and outcomes. *Anticancer Res.* 32(6), 2377-2838 (2012) 査読有り

4) Kuroki Ma, Miyamoto S, Morisaki T, Yotsumoto F, Shirasu N, Taniguchi Y, Soma G. Biological response modifiers used in cancer biotherapy. *Anticancer Res.* 32(6), 2229-2233 (2012) 査読有り

[学会発表] (計 0 件)

[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

白須直人 (SHIRASU, Naoto)

福岡大学・医学部・講師

研究者番号：70551422

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：