

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750173

研究課題名(和文)エクストラセルラーベシクルの機能化とDDS応用

研究課題名(英文)Functionalization and DDS application of extracellular vesicles

研究代表者

澤田 晋一 (Sawada, Shin-ichi)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50444104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、近年、細胞間での情報伝達手段として注目され、薬物輸送担体への応用が期待されている細胞分泌小胞(エクストラセルラーベシクル、EVs)への機能化両親媒性高分子を用いた新規機能付与手法の開発を目的とした。EVsとの親和性を有する両親媒性高分子として疎水化多糖に着目し、EVsとの相互作用を検討したところ、その表面に疎水化多糖を物理的に吸着しえることが明らかとなった。また、カチオン性疎水化多糖を表面に複合させた機能化EVsは非特異的な細胞親和性が顕著に向上することが確認された。本研究の結果、機能化両親媒性分子によってEVsの表面を機能化しえることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Extracellular Vesicles (EVs) such as exosome are nanovesicles secreted by various types of cells. EVs are known to include proteins (cytosolic and membrane proteins) and RNAs. EVs are considered as proteins and RNAs (mRNA and miRNA) cargo for cell-cell communication, and there is an exponentially growing interest in medical application of exosomes. We propose new strategy for application of exosomes to DDS by modifying the surface of EVs with functional polymers. We developed the modification of EVs surfaces by amphiphilic polysaccharide nanogels and cationic nanogels. Moreover, interactions of EVs and cationic nanogels modified EVs to cells were investigated. The cell did not uptake well the exosomes alone. The cationic nanogels modified EVs, however, were significantly interacted with cells. Functionalization of EVs with nanogels is promising for wide application of exosomes.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：エクストラセルラーベシクル エクソソーム 両親媒性高分子 疎水化多糖 カチオン性分子

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する細胞は、隣接する細胞やその周辺の細胞と様々な手法により影響を及ぼし合っていることが知られている。それは、例えば細胞同士の接着を介してや細胞が分泌した特定の生理活性物質を介して行われる。現在、この細胞間コミュニケーションにおける新しい手段として、細胞が分泌するナノサイズの小胞(ベシクル)が注目を浴びている。

細胞が脂質二分子膜構造を持つ小胞(エクストラセルラーベシクル、EVs)を分泌することは以前から知られていたが、その役割についてはあまり良く分かっていなかった。近年、新たな細胞間の情報伝達物質として体液中に存在する RNA が注目を浴びている。最近になり、細胞から分泌される EVs 内にメッセンジャー RNA (mRNA) やマイクロ RNA (miRNA) が存在することが報告され、細胞間で RNA を輸送するキャリアとして EVs がその役割を担っていることが明らかとなりつつある。このような、生体物質輸送機能を持つ EVs は、生体が作り出した天然のドラッグデリバリーキャリアとも考えることができる。

これまでに高分子ミセルやリポソーム、ウイルスからなる様々なドラッグキャリアの研究・開発が行われているが、安全性、安定性、輸送効率など実用化には様々な課題がある。一方、生体内での細胞間情報伝達を可能とする EVs は血中などの生体内環境において安定に存在しうるということが明らかであり、ドラッグデリバリーキャリアとして必要な特性を有している。しかしながら、EVs をキャリアとして応用した例はまだ少なく、EVs 分泌細胞の選択と遺伝子工学的手法を組み合わせた報告のみである。例えば、脳細胞にターゲティングするために、遺伝子工学的手法を用いてニューロン特異的ペプチドを融合させた膜タンパク質を発現する樹状細胞を作製し、その細胞から回収した EVs に siRNA を含有させ、siRNA 含有 EVs をマウスの脳に送り込むことに成功している (Ervti LA. Nat Biotechnol, 2011)。このように、EVs の DDS キャリアへの応用はいくつかの報告があるものの、EVs の機能改変や機能付与については、EVs 分泌細胞の遺伝子改変による EVs の間接的な機能改変手法がほとんどである。

そこで、EVs への新しい機能付与技術として、ベシクル膜表面に機能化両親媒性高分子を物理的相互作用により修飾することで、本来持ち得ない機能を有した機能化 EVs を構築するという着想に至った。

2. 研究の目的

エクストラセルラーベシクル (EVs) への機能化両親媒性高分子を用いた新しい機能付与手法の開発を行い、バイオ、医療分野への応用に向けた機能化 EVs の構築を目的と

した(図1)。まず、EVs 親和性を有する機能化両親媒性高分子の設計と合成、溶液特性の検討を行う。細胞膜・脂質二分子膜との親和性を有する機能性分子を検討した後、機能化両親媒性高分子を合成する。得られた機能化両親媒性高分子と EVs 表面との相互作用を解析するとともに表面修飾に、より適した機能化両親媒性高分子の選択を行う。さらには機能化両親媒性高分子を表面修飾した機能化 EVs と細胞との相互作用について検討し、EVs への機能付与効果について評価する。

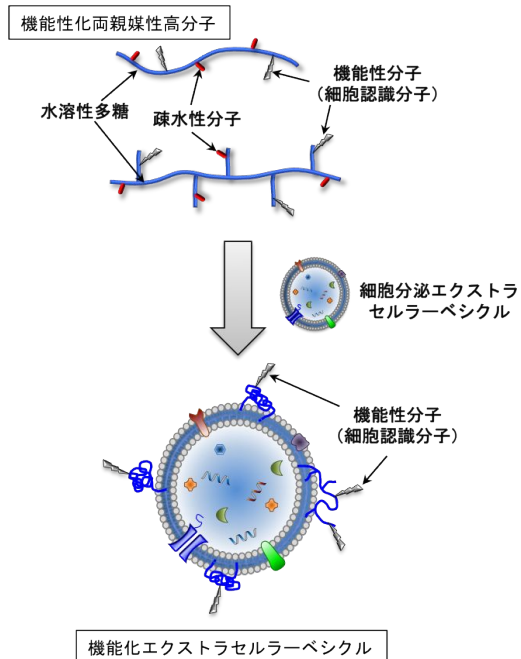


図1. 機能化両親媒性高分子によるエクストラセルラーベシクルの機能化

3. 研究の方法

(1) 機能化両親媒性高分子の設計と合成

まず、本研究に用いる水溶性高分子として我々がこれまでに研究、報告してきた疎水化多糖を用いることとした。具体的には、直鎖状水溶性多糖であるプルランに疎水性基としてコレステロール分子を導入したコレステロール置換プルラン (CHP) を基盤として機能性分子を導入することとした。CHP はリン脂質膜との相互作用能を有することが報告されており、同様にリン脂質を含む脂質二分子膜構造を持つ EVs と相互作用すると考えた。この CHP に EVs との相互作用を向上させるための分子としてカチオン性分子であるアミノ基を導入することとした。

(2) 培養細胞からのエクソソームの分離精製

本研究に用いる EVs として、培養細胞の分泌する EVs の一種であるエクソソームを用いることとし、エクソソーム由来細胞として、マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 およびヒト前骨髄性白血病細胞株 K562 を用いた。これらの細胞培養上清から超遠心分離機を用いた分画遠心法によりエクソソームを分離精製し、動的光散乱 (DLS) による粒径測

定およびウェスタンブロットングによるエクソソームマーカータンパク質の検出を行った。

(3)エクソソームと機能化両親媒性高分子との相互作用評価

エクソソームと(1)で得られた機能化両親媒性高分子をリン酸バッファー (pH 7.4) に溶解させた後、超音波処理を行い、機能化両親媒性高分子溶液を調製した。(2)で得られたエクソソーム懸濁液(と種々の濃度の機能化両親媒性高分子溶液を等量混合し相互作用の検討を行った。各条件サンプルは動的光散乱(DLS)による粒径測定、ゼータ電位測定および透過型電子顕微鏡(TEM)観察により複合体形成を評価した。

(4)機能化エクソソームと細胞との相互作用解析

細胞と機能化エクソソームとの相互作用解析のために、まず、膜透過蛍光色素(Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE))によりエクソソームを蛍光標識した後、その蛍光標識エクソソームと機能化両親媒性高分子を複合化させ、HeLa細胞と共培養し、細胞内への取り込み挙動を共焦点レーザー顕微鏡観察により検討した。また、ナノゲル複合化エクソソームの細胞内取り込みをフローサイトメーターにより定量評価した。次に、ナノゲル複合化エクソソームと細胞との共培養時の温度条件を変えることで細胞内取り込み経路の検討を行った。

4. 研究成果

(1)機能化両親媒性高分子の設計と合成

プルランにコレステロール分子を100単糖あたり1分子置換したコレステロール置換プルラン(CHP)に1,1'-カルボニルジイミダゾールを用いてエチレンジアミンを反応させた結果、CHPに100単糖あたりアミノ基を15分子置換したアミノ基修飾CHP(CHP-NH₂)を合成することに成功した。

(2)培養細胞からのエクソソームの分離精製

分画遠心法により得られたベシクルのサイズはDLS測定より150nm程度であった。また、ウェスタンブロットングによりエクソソームのマーカータンパク質であるHsc70とTransferrin Receptor (TfR)が検出された。さらには、TEM観察より100nm程度の二分子膜構造の粒子が観察されたことからエクソソームの分離精製を確認することができ、本研究に用いるエクソソームの供給体制を確立した。

(3)エクソソームと機能化両親媒性高分子との相互作用評価

得られたエクソソームとCHPおよびCHP-NH₂を種々の濃度条件で混合させたサン

プルで粒径が20-30nm程度増加した。TEM観察においても、エクソソーム表面に20-30nm程度の粒子が観察され、複合体を形成していることが示唆された。

(4)機能化エクソソームと細胞との相互作用解析

(3)で得られたCHP-NH₂複合化エクソソームの細胞内への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、エクソソームのみと比べ、CHP-NH₂複合化エクソソームの方がより顕著に細胞内に取り込まれていることが確認された。エクソソームの細胞内取り込みをフローサイトメーターにより評価した結果、CHP-NH₂を複合化することにより、細胞内に取り込まれたエクソソーム由来の蛍光強度が10倍程度増加することが明らかとなり、細胞親和性が顕著に向上することが明らかとなった。

細胞内へのCHP-NH₂複合化エクソソームの取り込みは低温培養条件下では著しく減少したことから、エンドサイトーシスにより取り込まれていると考えられる。

これらの結果より、機能化両親媒性高分子であるCHP-NH₂がエクソソーム表面と相互作用し機能化エクソソーム(機能化EVs)を構築し得るとともに、細胞親和性を付与し得ることが明らかとなった。また、CHP-NH₂と複合化させることで細胞内へのエクソソームの導入を促進することが明らかとなった。

CHP-NH₂のような機能化両親媒性高分子を用いた本研究成果は、エクソソームをはじめとするEVs表面への新しい機能付与技術であるだけでなく、EVsのバイオ、医療分野への応用において有用な技術となり得る。

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1件)

下田麻子、澤田晋一、秋吉一成、細胞外ベシクルの構造特性と機能制御、Drug Delivery System、29-2、2014、108-115、査読無

〔学会発表〕(計3件)

澤田晋一、秋山源、シクラ駿、佐々木善浩、秋吉一成、無細胞タンパク質発現システムを利用したプロテオリポソームの構築と機能解析、第63回高分子学会年次大会、2014年5月29日、名古屋国際会議場

佐藤祐子、梅崎香織、澤田晋一、向井貞篤、秋吉一成、リポソーム融合法を用いたハイブリッドエクソソームの構築、第52回日本生物物理学会年会、2014年9月26日、札幌コンベンションセンター

澤田晋一、池田心平、梅崎香織、下田麻子、佐藤祐子、秋吉一成、ハイブリッド exosomeの構築と機能、第63回高分子討論会、2014年9月26日、長崎大学文教キャンパス

〔図書〕(計1件)

秋吉一成、澤田晋一、下田麻子、ライフテ
クノロジーズジャパン株式会社、ライフテク
ノロジーズ情報誌 NEXT 6月号、2014、13

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

澤田 晋一 (SAWADA, Shin-ichi)
京都大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号： 50444104

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：