

平成 29 年 8 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06865

研究課題名(和文) 多彩なエクソソームの物性 動態相関解析による薬物送達カタログ作成と利用への展開

研究課題名(英文) Development of the catalog of various exosomes for efficient drug delivery by the analysis of their physicochemical property-pharmacokinetics relationship

研究代表者

藁科 翔太 (Warashina, Shota)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別研究員

研究者番号：30755393

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エクソソームの物性 - 動態相関解析に基づく薬物送達カタログの作成、及び、物性変化を極力伴わない薬物搭載手法の確立を通して、天然キャリアとしての性質を最大限活用したエクソソームDDS開発の有用性を示すことを目指した。では、エクソソームの物性や動態の評価系を確立し、エクソソームの違いによりがん細胞に対する親和性が異なることを見出した。また、エクソソームのPET試験に必要な標識技術の開発にも成功し、高精度の体内動態評価に基づく物性 - 動態相関解析が可能な環境を整えた。では、リポソームを用いた膜融合が、エクソソームへのsiRNA搭載と物性維持を両立する有用な戦略であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：The purposes of the research are (1) to show the usefulness of making exosome catalog by the analysis of exosome physicochemical property-pharmacokinetics relationship and (2) to establish drug incorporation method into exosomes without character changes for the development of exosome DDS. Through (1), we have established the evaluation method of exosome physicochemical property and pharmacokinetics (including cellular uptake). Especially, we succeeded in the potential of affinity difference against cancer cells between some types of exosomes. Moreover, we developed labeling method of positron emitter onto exosomes for pharmacokinetics analysis by PET imaging. In (2), we have developed the method of siRNA incorporation into exosomes by liposome-based membrane fusion without size changes. Using these techniques, we are going to evaluate the pharmacokinetics of the exosomes in mice, analyze the relationship and make a catalog for targeting cancer.

研究分野：ドラッグデリバリー

キーワード：エクソソーム DDS

### 1. 研究開始当初の背景

エクソソームは、生体内においてタンパク質や核酸等の生理活性物質を運搬している天然の「カプセル」である。そのため、エクソソームをドラッグデリバリーシステム (DDS) として活用する研究が注目されており、動態的な機能を付加した後に使用、送達する薬物を搭載後に使用等、様々な応用例が示され続けていた。一方で、エクソソームを DDS として活用する場合の最大の利点である、エクソソーム自身が特徴的な体内動態や組織標的性を保有することに焦点を当てエクソソーム DDS の開発を試みた例は皆無に等しかった。その背景として、エクソソームの性質 (由来細胞やそれに起因する物理化学的・生物学的物性の差) と動態の間にある相関性に対する理解は未だ断片的で、様々な細胞由来エクソソームの体系的な情報を収集し理解を深めることが必要であった。それに加えて、薬物をエクソソームへ効率的に搭載する手段として、エクソソームの物性変化を伴う方法が殆どであり、エクソソームの物性維持と薬物搭載を両立する新たな搭載手法の開発が必要不可欠であった。

### 2. 研究の目的

(1) 様々な由来細胞のエクソソームの物性及び動態を一律に評価が可能な系を選定・確立し、異なる細胞由来のエクソソーム間での物性・動態相関の比較を可能とする。そして、DDS として重要なエクソソームの種類や構成因子に対する理解を深めることでエクソソームの「カタログ」を作成し、天然の標的化カプセルとしての性質を最大限に活用したエクソソーム DDS の有用性を示す。

(2) リポソーム等への分子封入に用いられている様々な手法を比較・選定・改良することで、物性変化を極力伴わないエクソソームへの薬物搭載法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究では、「がん」への親和性・移行性が高いエクソソームを見出すことをモデル的な目標として設定し、がんに関係が深い細胞由来のエクソソームを実験に使用した。具体的には、マウス由来のがん細胞株 Colon26、線維芽細胞株 NIH3T3、血管内皮細胞株 UV 2、マクロファージ細胞株 RAW264 の培養上清から、超遠心分離によりエクソソームを単離・精製し、下述の評価を実施した。

物性評価：評価するエクソソームの物性として、動態への影響が大きいと予想される膜表面タンパク質、脂質の発現等の生物学的性質、及び、粒子径、多分散指数、ゼータ電位等の物理化学的性質に着目した。表面タンパク質はフローサイトメトリー (ビーズに結合させたエクソソームを間接的に検出)、脂質は LC-MS/MS により、粒子径等は動的光散乱法、光散乱電気泳動法、ナノ粒子トラッキング

法により評価した。

動態評価：in vitro 系におけるがん細胞株 Colon26 へのエクソソーム取り込み量を比較評価するため、蛍光分子 PKH67 をエクソソーム膜表面に標識し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。一方で、in vivo 系におけるエクソソームの体内動態評価の手法として、高い定量性及び時空間的分解能によりデータ取得が可能な Positron Emission Tomography (PET) に着目した。PET イメージングの実施には、エクソソームへポジトロン放出核種を標識する必要があるため、新たに標識法を設計した。具体的には、ポジトロン放出核種  $^{64}\text{Cu}$  を配位させたキレーターを、歪みアルキン解消型クリック反応を利用してエクソソーム表面へ結合させる戦略を採用し、各種反応条件等の最適化を試みた。

(2) エクソソームへ搭載するモデル薬物として、定量、機能評価ともに比較的容易である small interfering RNA (siRNA) を選択した。物性に大きな影響を与えずにエクソソームへ siRNA を搭載するための手法として、エレクトロポレーション法、膜透過性ペプチドを用いた導入法、siRNA 搭載リポソームとの膜融合法に着目し、siRNA 封入効率及び物理化学的性質の変化を比較した。また、その中で有力な搭載法であることが見出されたリポソームとの膜融合戦略については、さらなる siRNA 搭載効率の上昇を目的として、リポソームを構成する脂質の組成を最適化した。

### 4. 研究成果

(1) エクソソームが有する細胞親和性の差：Colon26、NIH3T3、UV 2、RAW264 由来エクソソームの Colon26 に対する細胞取り込みを評価した結果、エクソソームの種類により取り込み量が大きく異なることが明らかとなった (図 1)。これらのエクソソームの物理化学的性質には殆ど差が無かったことから、エクソソーム表面のタンパク質発現・脂質組成等の生物学的な性質が大きく影響を与えていると推察された。このことは、エクソソームの性質 (細胞種) の違いにより動態に差が存在するという当初の予想と一致し、エクソソームの薬物送達カタログを作成する意義が示された重要な結果と考えられる。

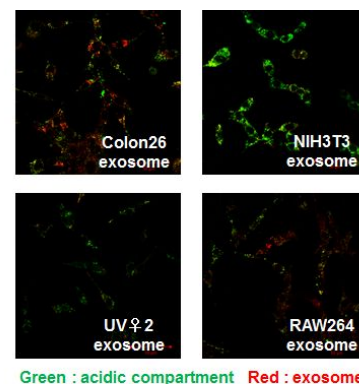


図1

(2) PET によるエクソソームの体内動態評価法の開発： $^{64}\text{Cu}$  を配位させるキレーターとして、生体内での標識安定性に優れた CB-TE1K1P を選択した。歪みアルキン解消クリック反応を利用してエクソソーム表面へ結合させるために、dibenzylcyclooctyne (DBCO) が結合した二官能キレーター DBCO-CB-TE1K1P を合成した。一方で、エクソソームを azide-NHS ester と反応させ、膜表面にアジド基を導入した。最後に、DBCO- $^{64}\text{Cu}$ -CB-TE1K1P をアジド修飾エクソソームと反応させ、 $^{64}\text{Cu}$  標識エクソソームを得た(図2)。標識前と比較して、生物学的・物理化学的性質ともに殆ど変化はなかった。

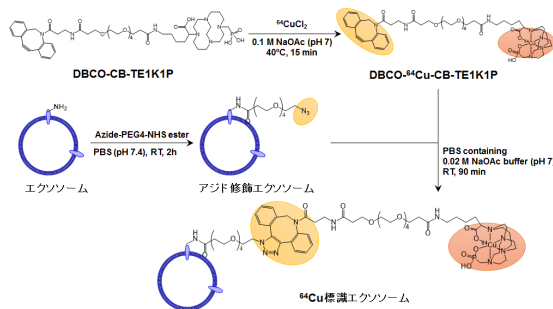


図2

調製した  $^{64}\text{Cu}$  標識エクソソームを GPC-HPLC により精製後、マウスへ静脈内投与し PET イメージングを実施した。その結果、投与後数分程度で肝臓及び脾臓に  $^{64}\text{Cu}$  標識エクソソームが集積する様子が認められた(図3)。また、PET イメージング終了後、解剖により各臓器・組織を回収し、カウンターで線量を測定したところ、同様に肝臓と脾臓から高い線量が検出された。他のイメージング法を用いて RAW264 由来エクソソームの体内動態を評価した過去の文献においても同様の傾向が報告されていたことから、本 PET イメージングはエクソソームの体内動態を反映していることが示唆された。本研究で開発したエクソソームへのポジトロン放出核種の標識法は、あらゆる種類のエクソソームへの応用が可能であり、現在、Co1on26、NIH3T3、UV 2 由来エクソソームに対して  $^{64}\text{Cu}$  標識を行い、PET イメージングによる体内動態の比較を実施する準備をしている段階である。

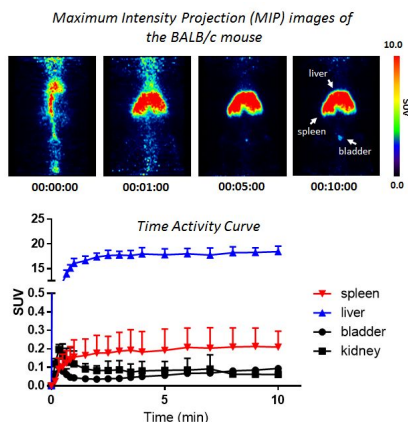


図3

(3) エクソソームへの薬物搭載法の検討：エレクトロポレーション法、膜透過性ペプチドを用いた導入法、リポソームとの膜融合法により、エクソソームへの siRNA の搭載を試みた。本実験では、siRNA に修飾された Dylight488 の蛍光強度を指標として搭載効率を算出した。エレクトロポレーション法及び膜透過性ペプチドの使用では、エクソソームへ殆ど搭載されなかった(0%)。一方で、リポソームとの膜融合法では、リポソームに封入された siRNA の多くがエクソソームに搭載されたことを示唆するデータが得られた(<50%)。この際に、粒子径、多分散指数、ゼータ電位の大きな変化は認められなかった。これらの結果から、リポソームとの膜融合戦略はエクソソームへの薬物搭載に有用であることが明らかとなった。次に、siRNA 封入効率のさらなる向上を目指し、高い膜融合能を示す最適ナリポソームの脂質組成を探索した。エクソソーム脂質膜を構成する主要な脂質(フォスファチジルコリン、フォスファチジルエタノールアミン、フォスファチジルセリン、コレステロール等)に着目し、それらの脂質の組み合わせにより構成した DiD 修飾リポソームを PKH67 修飾エクソソームと混合後、ショ糖密度勾配遠心分離による両者の移動を観察した。その結果、ショ糖中における蛍光分子の移動パターンが、リポソームの種類間で大きく異なっていることが明らかとなった。その中で、リポソームとエクソソームの密度の中間地点に新たに比較的均一な粒子群が形成された、フォスファチジルエタノールアミンとフォスファチジン酸で構成されたリポソームがエクソソームと高い膜融合能を有していることが示唆された。本検討で見出したリポソームが膜融合を介してエクソソームへ siRNA を搭載していることをより慎重に示すためには、FRET やナノトラッキング法等による粒子一単位での評価が必要不可欠と考えており、詳細な実験条件を検討している段階である。

### 総括

本研究では、エクソソームとしての性質を最大限活用したエクソソーム DDS を提案するために、エクソソームのカタログ作成に必要な物性・動態評価系の土台を形成した。実際に、薬物標的組織としてがんを想定した場合に、がん細胞に対する親和性がエクソソームの種類により異なることを確認し、PET を活用することで高精度な動態評価及び相関解析が可能段階にまで辿り着いた。また、物性変化を伴わないエクソソームへの分子封入法の開発においても、リポソームとの膜融合戦略を見出し、その効率の上昇が期待できる結果が得られた。今後、動態と物性の相関解析によりがんへ選択性を有するエクソソームを見出すことで、本研究目的であるカタログ作成の有用性を示し、がん以外のケースにおいても広く本戦略が利用される流れが生まれることを期待している。

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)

[学会発表](計1件)

藁科翔太 造田真希 仁欽 渡辺恭良  
向井英史、PET による体内動態解析を指向したエクソソーム表面への<sup>64</sup>Cu 標識、日本薬学会 第137年会、仙台国際センター(仙台市)、  
2017年3月27日(査読有)

6. 研究組織

(1)研究代表者

藁科 翔太 (Warashina, Shota)  
国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別研究員  
研究者番号：30755393