

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670266

研究課題名(和文) エキソソーム指向性 siRNA 誘導体の設計による生体内 RNA 干渉の効率的誘導

研究課題名(英文) Efficient induction of in vivo RNA interference by designing exosome-tropic siRNA derivatives

研究代表者

高橋 有己 (Takahashi, Yuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00547870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究ではエキソソームを利用した薬物送達システムの開発を念頭にエキソソームの体内分布の定量的評価法を開発するとともに、超遠心を利用した3種のエキソソーム回収方法を比較した。ビオチン結合タンパク質ストレプトアビジン(SAV)とエキソソーム移行性タンパク質lactadherin(LA)との融合タンパク質SAV-LAを設計し放射性ビオチン誘導体と組み合わせることでエキソソームの新規放射標識法を開発し、エキソソーム体内動態の定量的評価に成功した。3種の超遠心法について比較検討した結果、密度勾配を利用した超遠心法が、最も凝集体が少なく状態のよいエキソソームを回収するのに適していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the current study, for the goal of the development of drug delivery system by using exosomes, a method to quantitatively evaluate in vivo tissue distribution of exosomes was developed, and three ultracentrifugation-based exosome collection methods were compared to one another. We selected a biotin binding protein (streptavidin: SAV) and an exosome-tropic protein (lactadherin: LA) to obtain a fusion protein SAV-LA. Radio-labeled exosomes were prepared by using SAV-LA and radioactive biotin derivatives, and tissue distribution of the exosomes was quantitatively evaluated by using the labeled exosomes. By comparing the three ultracentrifugation-based exosome collection methods, we concluded that a density gradient ultracentrifugation method was the best method to collect exosomes with minimal aggregates and in a good quality.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：エキソソーム ラジオアイソトープ DDS

## 1. 研究開始当初の背景

種々の細胞が分泌するエキソソームは、粒子径 100nm 程度のタンパク質や核酸を内包する細胞外小胞であり、産生細胞以外の細胞に取り込まれることで内包物の細胞間物質輸送に関わる内因性輸送担体である。したがってエキソソームは、生体適合性および安全性が高く、効率的なドラッグデリバリーシステム (DDS) になりえると期待されている。エキソソームを用いた DDS の開発には、エキソソームの調製法や、エキソソームへの薬物搭載法、エキソソームの体内動態の制御法など、多岐にわたる技術の開発が必須であるが、その多くについては情報が不足しているのが現状である。中でも、エキソソームを利用した DDS の開発に際しては、その体内動態制御法の開発が必須である。そのため、これまで明らかでなかった、エキソソームの体内動態について、定量的な情報の収集が必要と考えられる。

そこで我々は、エキソソームを利用した DDS の開発を目的として、エキソソームの体内動態の解析を開始した。エキソソームの体内動態を定量的に評価可能な技術が存在しないことがエキソソームの体内動態情報が乏しい原因と考えられたことから、エキソソームの新規標識方法を開発することとした。エキソソームの標識法としては、脂溶性蛍光色素を用いた手法が安価かつ簡便であることから汎用されているが、定量性と感度が低いため、全身レベルでのエキソソームの追跡は不可能である。そこで我々は、エキソソームの体内動態を定量的に評価することを目的として、蛍光と比較して定量的解析に適した発光を利用することを考案し、発光レポータータンパク質である *Gussia luciferase* (gLuc) を利用したエキソソームの新規標識方法を開発した。エキソソームマーカータンパク質として知られる lactadherin (LA) をエキソソーム移行性タンパク質として選択し、これを gLuc と融合したタンパク質、gLuc-lactadherin (gLuc-LA) を設計し、これをコードしたプラスミド DNA を構築した。また、エキソソーム産生細胞には、エキソソーム産生量が多く、これまでにエキソソームの機能解明を目的とした研究で汎用されているマウス黒色細胞腫 B16-BL6 細胞を選択した。B16BL6 細胞に gLuc-LA 発現プラスミド DNA を遺伝子導入後に産生されるエキソソームを回収することで gLuc 標識エキソソームを得ることが可能であった。そこでこの gLuc 標識エキソソームをマウスの静脈内に投与したところ、エキソソーム由来の gLuc 活性は非常に速やかに血中から消失し、その血中消失半減期は約 2 分であることを見出した。また、in vivo イメージング法により、gLuc 標識エキソソームを投与したマウス体内の gLuc 活性を経時的に検出したところ、投与したエキソソーム由来の gLuc 活性は速やかに肝臓、脾臓、肺へと移行した。肝臓および脾

臓の gLuc 活性は、時間の経過とともに速やかに消失したことから、これらの臓器に移行したエキソソームは速やかに分解される可能性が示された。一方で、肺では gLuc 活性が比較的長時間残留したことから、肺でのエキソソームの取り込みは肝臓、脾臓とは異なる様式であることが推察された。

## 2. 研究の目的

これまでの検討において、gLuc-LA 標識エキソソームを用いることでエキソソームの全身レベルでの体内分布の可視化に成功した。しかしながら、レポータータンパク質である gLuc は、エキソソームが取り込まれた細胞内において分解されるために、gLuc 標識の利用による各臓器・組織へと移行したエキソソームの絶対量の定量は困難であった。各種臓器へ移行したエキソソームの定量的評価に際しては、細胞内へ取り込まれた後も活性を検出可能な放射性同位体の利用が有用であると考えられる。そこでアビジン-ビオチン結合を利用したエキソソームの放射標識法の開発に着手した。すなわち、ビオチン結合タンパク質として streptavidin (SAV) を選択し、これと LA との融合タンパク質 SAV-LA を設計し SAV-LA 発現プラスミド DNA を構築した。

エキソソームを用いた DDS の開発において、どのようにエキソソームを回収するかは重要な課題である。これまでに、超遠心を用いた方法に加えて、エキソソーム回収用試薬と混合して遠心する方法や、CD9、CD63 などのエキソソームマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫沈降法、サイズ排除クロマトグラフィーを利用する方法などが報告されている。これらの方法においては、回収の原理がそれぞれ異なることから、回収されるエキソソームの性質も異なると考えられる。エキソソームに含まれる mRNA やタンパク質の組成が、エキソソームの回収方法によって異なることは報告されているが、DDS としての利用に際して重要な粒子径などの物性に関する情報はほとんど報告されていない。DDS 製剤としての利用を考えた場合、免疫沈降法では抗体の混入が、サイズ排除クロマトグラフィー法ではエキソソームの希釈が懸念される。そこで我々は、超遠心を用いた 3 つの方法 (pelleting 法、cushion 法、gradient 法) と市販のエキソソーム回収用試薬を用いた回収方法を選択し、得られるエキソソームの物性をもとにこれらの方法を比較検討した。

## 3. 研究の方法

### SAV-LA 発現プラスミド DNA の構築

LA の分泌シグナルの C 末端に SAV を連結し、さらにその C 末端に LA の C1C2 領域を融合したタンパク質、SAV-LA をデザインし、これをコードする cDNA を pcDNA3.1 ベクターに組み込むことで pCMV-SAV-LA を構築した。

gLuc-LA 標識エクソソームおよび SAV-LA 修飾エクソソームの回収

マウスメラノーマ B16BL6 細胞をエクソソーム産生細胞として選択した。B16BL6 細胞に gLuc-LA をコードしたプラスミド DNA、pCMV-gLuc-LA をトランスフェクションし、24 時間後の培養上清を回収した。段階遠心法で、比較的大きな小胞を除去した後、0.2 μm のフィルターを通し、超遠心によりエクソソームをペレットとして回収した。SAV-LA 修飾エクソソームについては、pCMV-SAV-LA をトランスフェクションした後、上記の方法と同様の方法でエクソソームを回収することで調製した。

エクソソームの粒子径、粒子数および表面電荷の測定

エクソソームの粒子径および粒子数は qNano を用いて測定した。表面電荷はゼータサイザーを用いて測定した。

エクソソームの電子顕微鏡観察

回収した各エクソソームについて、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。別途、エクソソーム表面の SAV の検出を目的として、SAV-LA 修飾エクソソームをビオチン標識金ナノ粒子と混合した後、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

<sup>125</sup>I 標識エクソソームの調製と確認

SAV-LA 修飾エクソソームを (3-<sup>125</sup>I-iodobenzoyl) norbiotinamide (<sup>125</sup>I-IBB) と混合することで <sup>125</sup>I 標識エクソソームを調製した。エクソソームへの <sup>125</sup>I-IBB の結合はペーパークロマトグラフィー法により確認した。

<sup>125</sup>I 標識エクソソームを用いたエクソソーム組織分布の定量

マウス 1 匹あたりタンパク量として約 4 μg、放射活性として 37kBq のエクソソームを尾静脈より投与した。投与後、経時的に安楽死させたマウスから各臓器・組織を回収した。回収した各組織中の放射活性はカウンターを用いて計測した。

3 種の超遠心法および試薬を用いたエクソソームの回収

超遠心を用いた 3 つの方法 (pelleting 法、cushion 法、gradient 法) と市販のエクソソーム回収用試薬を用いた回収方法を選択した。Pelleting 法では、回収した培養上清を 100000g 1 時間の条件で超遠心し、エクソソームを沈殿させることで回収した。Cushion 法は、チューブの底に密度勾配用媒体 OptiPrep を加えその上に培養上清を置いて超遠心を行い界面を回収後、さらに超遠心により沈殿させて回収した。Gradient 法では、

OptiPrep による密度勾配を作成しその上に培養上清を重ねて 18 時間の超遠心の後にエクソソームが含まれるフラクションを回収した。エクソソーム回収用試薬として ExoQuick を選択し、試薬と混合してインキュベート後、低速での遠心によりエクソソームを沈殿させた (Precipitation 法)。

gLuc-LA 標識エクソソームの血中滞留性評価

各方法で回収した gLuc-LA 標識エクソソームを尾静脈内投与したマウスから経時的に採血し、ルミノメーターを用いて血清中 gLuc 活性を測定した。

gLuc-LA 標識エクソソームの濾過滅菌後の回収率の評価

各方法で回収した gLuc-LA 標識エクソソームを 0.2 μm のシリンジフィルターを用いて濾過滅菌した。濾過滅菌前後の gLuc 活性を測定することで、回収率を見積もった。

4 . 研究成果

SAV-LA 修飾の確認

pCMV-SVA-LA を遺伝子導入した B16BL6 細胞から産生されるエクソソームを回収した。回収したエクソソームについて、蛍光標識ビオチン誘導体を用いて SAV を定量したところ、1 粒子のエクソソームあたり約 50 分子程度の SAV が修飾されることを確認した。エクソソームの粒子径、表面電荷については、SAV-LA 修飾による影響をほとんど受けず、100nm 程度の粒子径を有し、その表面電荷は -40mV 前後であった。また、ビオチン修飾金ナノ粒子と混合した SAV-LA 修飾エクソソームを透過型電子顕微鏡で観察し、エクソソーム表面に biotin が結合可能であることを確認した (図 1)。

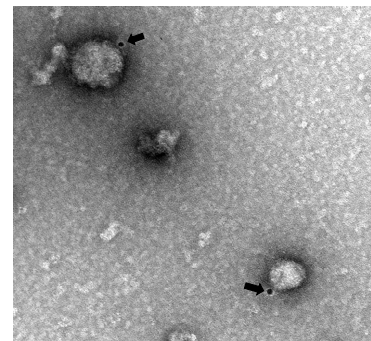


図 1 . ビオチン修飾金ナノ粒子と混合した SAV-LA 修飾エクソソームの電子顕微鏡観察写真 (矢印は金ナノ粒子の存在を示す)

<sup>125</sup>I によるエクソソーム標識

SAV-LA 修飾エクソソームを <sup>125</sup>I-IBB と混合することで <sup>125</sup>I 標識エクソソームを調製した。ペーパークロマトグラフィーにより、<sup>125</sup>I-IBB は SAV-LA 修飾エクソソームに結合していることを確認した。

<sup>125</sup>I 標識エクソソームを用いたエクソソーム組織分布の定量

<sup>125</sup>I 標識エクソソームをマウス尾静脈内に投与し、各組織・臓器中の放射活性を測定したところ、投与したエクソソームは速やかに血中から消失し、おもに肺・肝臓・脾臓へと移行した。投与4時間後においても、肺および脾臓、肝臓でそれぞれ投与量の約10、3、25%と高い放射活性が検出された(図2)。

この結果は SAV-LA を利用したエクソソームの放射標識法の有用性を示すものと考えられる。

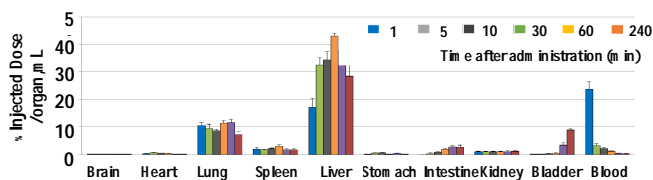


図2. 放射標識エクソソーム投与後の組織分布の定量結果

3種の超遠心法および試薬を用いた方法により回収されたエクソソームの回収量および物性評価

各方法で回収したエクソソームの形態を透過型電子顕微鏡で観察した結果、それぞれ100nm前後の小胞が観察された(図3)。一方、precipitation法で回収したサンプルには、数μmサイズの非常に大きな凝集体が多数観察されたことから以降の検討から除外した。各方法によるエクソソームの回収量について、ナノ粒子マルチアナライザー-qNanoにより粒子数を測定したところ、方法間での違いは認められなかった。粒子径分布を評価したところ、gradient法で回収したサンプル中には他と比較して100nm以上の粒子の割合が少なく、他の方法で回収したエクソソームと比較して凝集が少ないことが示唆された。

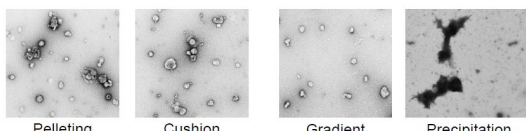


図3. 各方法で回収したエクソソームの電子顕微鏡観察写真

回収方法の違いがエクソソームの製剤特性に及ぼす影響の評価

各方法で回収した gLuc-LA 標識エクソソームを静脈内投与し、血中濃度を経時的に測定したところ、エクソソームの血中からの消失速度には大きな違いはなかった。次に0.2μmのフィルターを用いてろ過滅菌操作を行い、gLuc活性を指標に回収率を評価した。その結果、gradient法で回収したエクソソームの回収率は約80%と、50%以下だった他の2つと比較して有意に高かった(図4)。エクソソームがフィルターを通過する際には大きな粒子ほどつまりやすいと考えられることから、凝集体の数が少ない gradient法で回収したエクソソームで回収率が高くなったものと推察した。

以上、gradient法では回収に要する時間が他の方法と比べて長いものの、凝集体が少な

く、濾過滅菌にも適したエクソソームが得られることが示された。

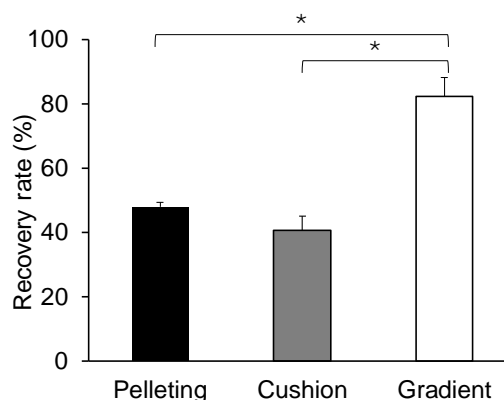


図4. 各方法で回収したエクソソームの濾過滅菌後の回収率

### 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3件)

Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Kato K, Yamashita T, Imai T, Saji H, Takakura Y. Quantitative Analysis of Tissue Distribution of the B16BL6-Derived Exosomes Using a Streptavidin-Lactadherin Fusion Protein and Iodine-<sup>125</sup>-Labeled Biotin Derivative After Intravenous Injection in Mice. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):705-713. doi: 10.1002/jps.24251.

Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Yamashita T, Matsumoto A, Charoenviriyakul C, Takakura Y. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:26238. doi: 10.3402/jev.v4.26238.

Yamashita T, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. Effect of exosome isolation methods on physicochemical properties of exosomes and clearance of exosomes from the blood circulation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2016, 98,1-8. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.10.017.

[学会発表](計9件)

Takahashi Y, Imai T, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Takakura Y. Quantitative evaluation of in vivo fate of mouse melanoma

B16-BL6-derived exosomes after intravenous injection into mice. 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress, 2014/4/13-18 (Melbourne, Australia),

Takahashi Y, Imai T, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Takakura Y. Quantitative analysis of the distribution and clearance of mouse melanoma B16-BL6-derived exosomes in mice. International Society for Extracellular Vesicles 2014/4/40-5/3, (Rotterdam).

山下拓真、今井貴文、高橋有己、森下将輝、西川元也、高倉喜信 静脈内投与された B16BL6 由来エキソソームのマウスにおける マクロファージ依存的消失挙動 日本薬剤学会第 29 年会、2014 年 5 月 20 日、大宮ソニックシティビル(埼玉県・さいたま市)

森下将輝、高橋有己、佐野紘平、西川元也、佐治英郎、高倉喜信 Streptavidin-biotin 結合に基づいた exosome 放射標識法による exosome 体内動態の定量的解析 日本 DDS 学会第 30 年会、2014 年 7 月 30 日、慶應義塾大学 (東京都・港区)

篠塚春香、高橋有己、加藤佳奈、西川元也、高倉喜信 SELEX 法を利用した exosome 移行性 RNA の探索 日本 DDS 学会第 30 年会、2014 年 7 月 30 日、慶應義塾大学 (東京都・港区)

Morishita M, Takahashi Y, Imai T, Nishikawa M, Takakura Y. Quantitative analysis of in vivo fate of mouse melanoma B16BL6-derived exosomes after intravenous injection into mice by development of labeling method for exosomes. Globalization of Pharmaceutics Education Network 2014, 2014/08/27-30 (Helsinki, Finland).

森下将輝、高橋有己、西川元也、高倉喜信 抗腫瘍免疫の増強を目的とした CpG DNA 修飾癌細胞由来 exosome の開発. 日本薬剤学会 第 30 年会、2015 年 5 月 21 日、長崎ブリックホール(長崎県 長崎市)

山下拓真、高橋有己、西川元也、高倉喜信 Exosome 回収方法が exosome の特性に及ぼす影響の評価. 日本薬剤学会 第 30 年会、2015 年 5 月 21 日、長崎ブリックホール(長崎県 長崎市)

高橋有己、西川元也、高倉喜信 核酸医薬の DDS への応用を目的とした体内動態制御型核酸搭載 exosome の開発. 第 31 回 日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 3 日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋有己 (TAKAHASHI, Yuki)  
京都大学・大学院薬学研究科・助教  
研究者番号：00547870

### (2) 研究分担者

高倉喜信 (TAKAKURA, Yoshinobu)  
京都大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：30171432

西川元也 (NISHIKAWA, Makiya)  
京都大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：40273437