

令和 3 年 10 月 13 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04402

研究課題名(和文) 口腔癌細胞に対するエクソソームを利用したsiRNA・ミサイル療法の開発

研究課題名(英文) Development of siRNA / missile therapy using exosomes for oral cancer cells

研究代表者

鵜澤 一弘 (Uzawa, Katsuhiko)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：30302558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、癌抑制性siRNAを搭載させた口腔癌標的型engineered exosomes (eExosomes)の開発を行った。eExosomesはEBI3をexosome表面に提示し、内部に口腔癌関連因子LCP1のsiRNAを搭載している。これらは口腔癌細胞に特異的に吸着し、口腔癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を強力に抑制させることが可能である。したがって、我々が開発したeExosomesは、口腔癌細胞へ効率的に到達し、腫瘍増殖抑制効果を示すことから、有望なドラッグデリバリーシステムを有した腫瘍増殖抑制デバイスとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

低分子干渉RNA (siRNA) を用いて、様々な疾患関連遺伝子の制御を行う遺伝子治療の可能性が期待されているが、体内の代謝や免疫機能によりsiRNAが標的である癌細胞に到達することなく分解・排除されてしまうため、臨床的に有用な治療法として実用化するには大きな障害がある。本研究では、口腔癌細胞表面発現タンパクをターゲットとする癌特異的吸着エクソソームを開発し、効率的に口腔扁平上皮癌にsiRNAを注入することで、その腫瘍増殖能を抑制させることができた。これらの結果は、今後の遺伝子治療の可能性を広げる成果であるといえる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we engineered the oral squamous cell carcinoma (OSCC) -targeting exosomes (eExosomes) which included OSCC suppressor siRNA. Briefly, the eExosomes had siRNA of the oral cancer-related factor (LCP1) and EBI3, a positive marker of OSCC, on the surface of exosomes. After treatment with the eExosomes, they specifically bound to OSCC cells and suppressed the cell proliferation, migration, and invasion activities. Therefore, it was suggested that our eExosomes system may be a promising drug delivery system device that efficiently bound to OSCC and suppressed the tumor growth.

研究分野：分子生物学

キーワード：口腔癌 エクソソーム drug delivery system siRNA ミサイル療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低分子干渉 RNA ( siRNA ) を用いて、様々な疾患関連遺伝子の制御を行う遺伝子治療の可能性が期待されている。siRNA は microRNA に比較して、標的遺伝子が単一であり、しかも、人工的に合成した siRNA は効率よく遺伝子発現を抑制することが可能である。このため、siRNA を用いて様々な疾患関連遺伝子の制御を行う遺伝子治療の可能性が期待されている。しかし、生体内では RNase による分解を受け、さらに、外来の siRNA に対しては RNA ウィルスに対するのと同様の免疫作用が惹起され、siRNA が標的である癌細胞に到達することなく分解・排除されてしまう。さらに、癌細胞に効率的に取り込まれることもない。この点が、臨床に有用な治療法として siRNA を実用化するための大きな障害となっている。他方、エクソソームはあらゆる細胞から分泌される脂質二重層に囲まれた細胞外小胞で、あらゆる細胞から分泌され、「自己」であるため免疫系からの攻撃を免れ、内容物も proteinase や RNase の影響を受けず、安定に血中を循環していることが広く知られている (PNAS 2008; 105(30): 10513-10518)。さらにエクソソームは、細胞間の輸送ツールとして機能し、がん細胞と免疫細胞との間で microRNA のやり取りがあることも示されている (Mol Cell. 2010 ;39(1):133-44)。これらのことから、癌細胞表面発現タンパクをターゲットとする癌特異的吸着エクソソームを開発し、効率的に口腔扁平上皮癌に siRNA 等を「注入」することが可能な「ミサイル療法」とも言うべき drug delivery system を開発することは新しい治療方法として大いに期待が持たれているところである。

### 2. 研究の目的

本研究では、エクソソームの生体内の安定性に着目し、siRNA が標的である癌細胞に到達する前の分解・排除を克服すること、さらに癌細胞表面発現タンパクをターゲットとする癌特異的吸着エクソソームを開発し、効率的に口腔扁平上皮癌に siRNA 等を「注入」することが可能な「ミサイル療法」とも言うべき drug delivery system を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 癌組織特異的ペプチドの検索

口腔領域の扁平上皮癌に対して、microarray 解析を行い、それぞれの癌の種類に応じた癌特異的発現遺伝子を検索・同定する。さらにエクソソームという性質から、細胞表面に存在・表出する遺伝子・タンパクに着目する。

#### (2) 同定した標的遺伝子の発現解析

同定した遺伝子の口腔癌細胞株での発現を定量的 RT-PCR ( qRT-PCR ) 法を行い確認する。

#### (3) ヒト胎児線維芽細胞へ標的遺伝子搭載

エレクトロポレーションを用いて標的遺伝子発現プラスミドベクターを導入し、ヒト胎児線維芽細胞に標的遺伝子を高発現させる。

#### (4) エクソソームへの標的遺伝子搭載

標的遺伝子を高発現させたヒト胎児線維芽細胞より抽出したエクソソームを電子顕微鏡で観察・同定し、さらに抽出した蛋白質より標的遺伝子が搭載されていることを確認する。

#### (5) エクソソーム吸着能評価試験

エクソソーム RNA を蛍光標識し口腔癌細胞 ( SAS ) へ作用させ、標的遺伝子搭載エクソソームがコントロールと比較して口腔癌細胞への取り込みを確認する。

#### (6) エクソソームへの siRNA 搭載

エレクトロポレーションを用いて、当講座で同定した癌関連遺伝子の siRNA をエクソソームに搭載する。

#### (7) siRNA 搭載エクソソームを用いた細胞増殖能・遊走能・浸潤能試験

当講座で同定した癌関連遺伝子 LCP1 の siRNA を搭載した標的遺伝子高発現エクソソームを口腔癌細胞 ( SAS 及び HSC3 ) に作用させ、コントロールと比較して有意に細胞増殖能・遊走能・浸潤能が低下していることを確認する。

#### (8) 担癌マウス ( SAS ) を使用した siRNA 搭載エクソソームによる機能解析

担癌マウス ( SAS ) に siRNA 搭載エクソソームを経静脈投与し、IVIS を用いたシグナル検出を経時的に測定し、コントロールと比較して有意に腫瘍増殖能が低下していることを確認する。さらに腫瘍において搭載した siRNA の標的遺伝子について RT-qPCR 法、WB 法、免疫組織化学染色法にて評価し、コントロールと比較して有意に発現が低下していることを確認する。

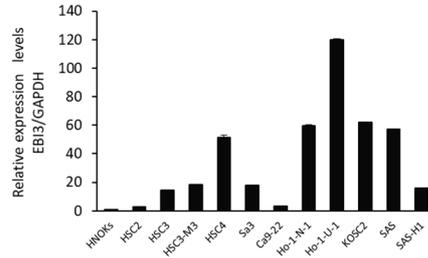
### 4. 研究成果

#### (1) 癌組織特異的ペプチドの検索

先の方法にて述べた通り、口腔領域の扁平上皮癌に対して、microarray 解析を行いヒト正常口腔粘膜上皮細胞と比較して、口腔癌細胞株において有意に発現が亢進し、かつ細胞表面に存在・表出する遺伝子 EBI3 を同定した。

#### (2) 同定した標的遺伝子の発現解析

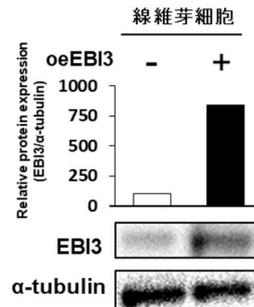
同定した遺伝子の口腔癌細胞株での発現を定量的 RT-PCR 法を行い確認した。(図1)



( 図 1 . EB13 の口腔癌細胞株での発現解析 )

( 3 ) ヒト胎児線維芽細胞へ標的遺伝子搭載

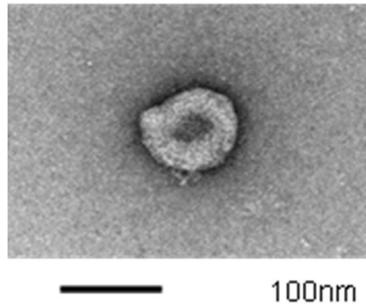
エレクトロポレーションを用いて標的遺伝子発現プラスミドベクターを導入し、ヒト胎児線維芽細胞に標的遺伝子を高発現させることに成功した。( 図 2 )



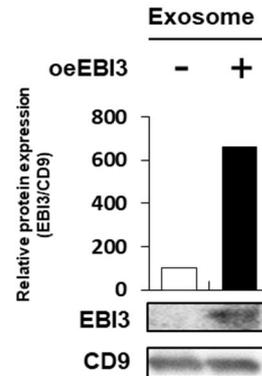
( 図 2 . 線維芽細胞における EB13 発現増強株の樹立 )

( 4 ) エクソソームへの標的遺伝子搭載

標的遺伝子を高発現させたヒト胎児線維芽細胞より抽出したエクソソームを電子顕微鏡で観察・同定し、抽出した蛋白質より標的遺伝子が搭載されていることを確認した。( 図 3 )( 図 4 )



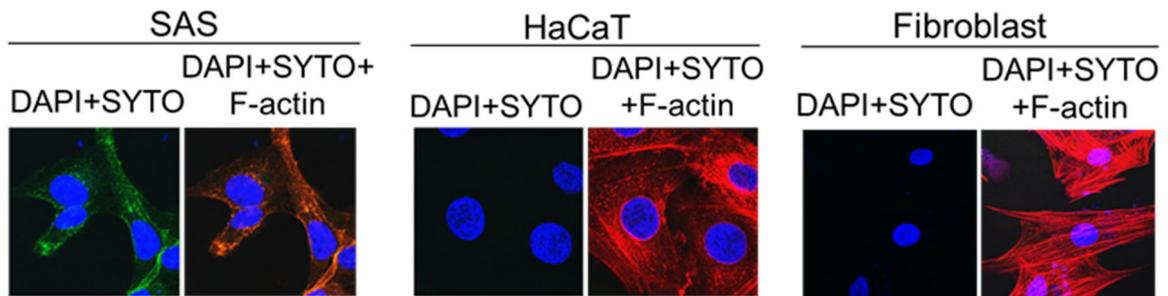
( 図 3 . 抽出エクソソームの電子顕微鏡像 )



( 図 4 . 抽出したエクソソームの EB13 発現 )

( 5 ) エクソソーム吸着能評価試験

エクソソーム RNA を蛍光標識し口腔癌細胞 ( SAS ) へ作用させ、標的遺伝子搭載エクソソームがコントロールと比較して高い効率で口腔癌細胞へ取り込まれることを確認した。( 図 5 )



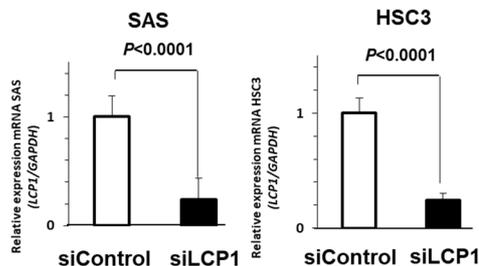
( 図 5 . エクソソームの細胞吸着能 )

ヒト胎児線維芽細胞由来のエクソソームの吸着能について、口腔癌細胞株 ( SAS )、ヒト表皮角化細胞株 ( HaCat )、ヒト胎児線維芽細胞株 ( Fibroblast ) を用いて蛍光免疫染色法にて確認し

た。DAPI は核、SYTO はエクソソームの吸着、F-actin は細胞骨格を示している。

**(6) エクソソームへの siRNA 搭載**

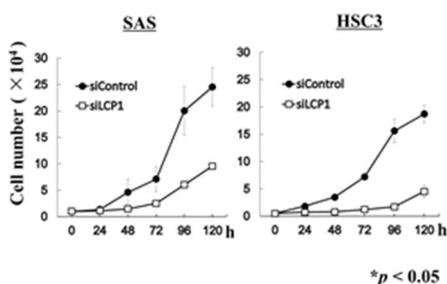
エレクトロポレーションを用いて、当講座で同定した癌関連遺伝子 LCP1 の siRNA をエクソソームに搭載した。そして SAS 細胞、HSC3 細胞へ導入し RT-qPCR にて LCP1 の発現解析を行った。(図6)



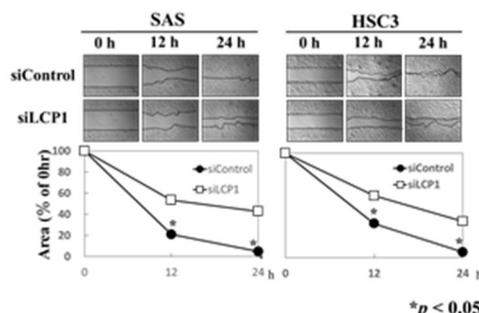
(図6. LCP1 の発現解析)

**(7) siRNA 搭載エクソソームを用いた細胞増殖能・遊走能・浸潤能試験**

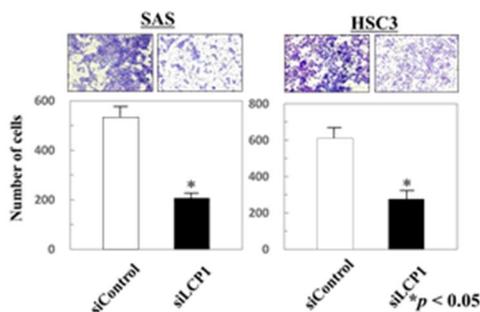
当講座で同定した癌関連遺伝子 LCP1 の siRNA を搭載した標的遺伝子高発現エクソソームを口腔癌細胞 (SAS 及び HSC3) に作用させ、コントロールと比較して有意に細胞増殖能・遊走能・浸潤能が低下していることを確認した。(図7)(図8)(図9)



(図7. 細胞増殖能試験)



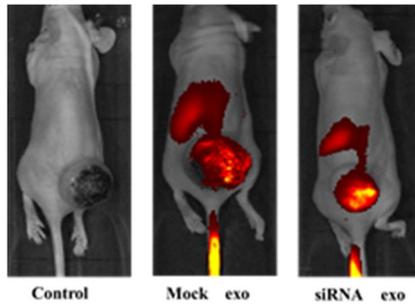
(図8. 細胞遊走能試験)



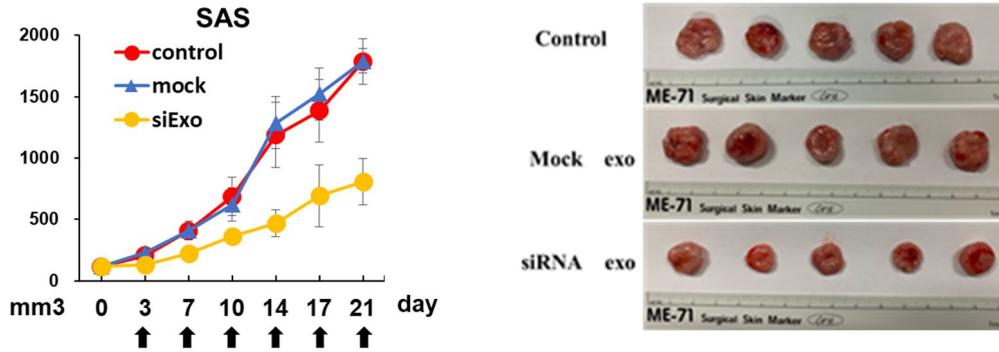
(図9. 細胞浸潤能試験)

**(8) 担癌マウス (SAS) を使用した siRNA を搭載した口腔癌吸着能を獲得したエクソソームによる機能解析**

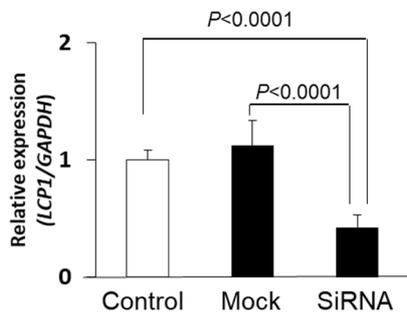
担癌マウス (SAS) に siRNA を搭載した口腔癌吸着能を獲得したエクソソームを Dir で染色のうえ 3 日おきに経静脈投与し、IVIS を用いたシグナル検出を経時的に測定し、コントロールと及び Mock 比較して有意に siRNA 投与群では腫瘍増殖能が有意に低下していることを確認した。(図10)(図11) さらに摘出した腫瘍において、搭載した siRNA の標的遺伝子を RT-qPCR 法、WB 法、免疫組織化学染色法にて評価し、コントロール及び Mock と比較して siRNA 投与群では有意に発現が低下していることを確認した。(図12. LCP1 の発現解析 RT-qPCR 法、WB 法、免疫組織化学染色法)



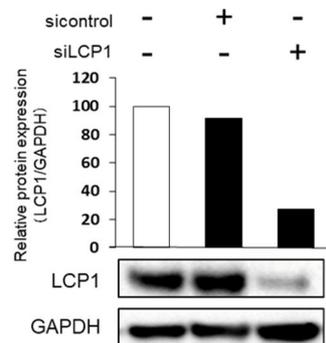
(図10. エクソソームの in vivo imaging)



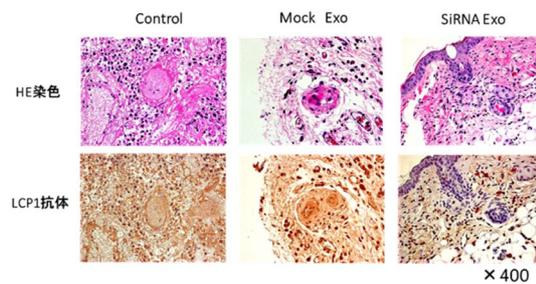
(図11. 腫瘍径の評価)



(図12. LCP1の発現解析 RT-qPCR)



(図12. LCP1の発現解析 WB法)



(図12. LCP1の発現解析 免疫組織化学染色)

摘出した腫瘍において、siRNA投与群ではその標的遺伝子についてRT-qPCR法、WB法、免疫組織化学染色法にて評価した結果、コントロール及びMockと比較して有意に発現が低下していることを確認した。

### (9) まとめ

今回我々は口腔癌をターゲットとした exosome を作製し、それに癌抑制性 siRNA を搭載させた癌標的型 engineered exosomes (eExosomes) の開発を目的とした。口腔癌の細胞膜で発現が上昇している遺伝子 EB13 をマイクロアレイにて抽出しターゲットペプチドとして選定した。EB13 導入線維芽細胞株由来の exosomes は癌細胞に対し特異的に吸着することを確認した。さらに口腔癌関連因子 LCP1 の siRNA を導入した eExosomes は、口腔癌細胞の増殖能・遊走能・浸潤能を強力に抑制させた。さらに In vivo においても siRNA を導入した eExosomes は、担癌マウスの腫瘍増殖能を有意に抑制した。従って本研究が開発した eExosomes は口腔癌細胞へ効率的に到達し、腫瘍増殖抑制効果をもたらす有望な DDS 装置である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yutaro Kase 1, Katsuhiko Uzawa 2 3, Sho Wagai 1, Shusaku Yoshimura 1 4, Jun-Ichiro Yamamoto 1 5, Yuriko Toeda 1, Megumi Okubo 1, Keitaro Eizuka 1 6, Toshiaki Ando 1, Takafumi Nobuchi 1, Kohei Kawasaki 1, Tomoaki Saito 7, Manabu Iyoda 7, Dai Nakashima 1, Atsushi Kasamatsu 7, Hideki Tanzawa 1 8	4. 巻 11
2. 論文標題 Engineered exosomes delivering specific tumor-suppressive RNAi attenuate oral cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-85242-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加瀬 裕太郎
2. 発表標題 癌抑制性siRNAを搭載した口腔癌標的型Engineered exosomesの開発
3. 学会等名 第65回 公益社団法人口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中嶋 大 (Nakashima Dai)  (50431747)	千葉大学・大学院医学研究院・助教  (12501)	
研究分担者	坂本 洋右 (Sakamoto Youshuke)  (50451745)	千葉大学・医学部附属病院・講師  (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	大和地 正信  (Yamatoji Masanobu)  (70451747)	千葉大学・医学部附属病院・助教     (12501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関