

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K15443

研究課題名（和文）エクソソームDDSの安全性の観点からの内容物除去・動態制御技術の開発

研究課題名（英文）Development of engineering method of exosomes for safety in clinical application

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・生命機能科学研究センター・研究員

研究者番号：30755393

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）：細胞から分泌される粒子であるエクソソームは、取り込んだ組織の機能を調節するはたらきをもち、大量生産も可能なことから、新たな薬としての研究が進められている。一方で、副作用が出るリスクを低減させるための研究は殆ど行われていない。本研究では、副作用の要因となり得るエクソソームの因子に着目し、より安全なエクソソームを構築する技術の開発を目指した。その中で、エクソソームの体内での挙動を正しく理解するための技術、副作用の原因となり得る分子が存在するエクソソーム粒子の内側（内水層）・外側（膜表面）を改造する技術について検討を行い、部分的ではあるが、研究成果の一部を論文や学会発表という形で世の中に発信した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副作用の低減を目指したエクソソーム改変の研究、特に、膜表面への機能性分子の修飾に関する検討は、エクソソームの安全性を追求しただけに留まらず、医薬品としてエクソソームを用いる利点（動態特性）を最大限活かすことも重要視したことで、今後、エクソソーム改変の研究を行う上で基盤となる技術・考え方になると考えている。また、研究の一環として開発した、PETイメージングを基としたエクソソームの動態評価法は、これまで詳細な解析がなされていなかったエクソソームの体内動態をより深く理解する上で有用であり、医薬品としてのエクソソームの研究開発の場において非臨床・臨床問わず貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Exosome, a particle secreted from a variety of cell types, is expected to be a new modality of drug such for Alzheimer's disease, cancer, and infection because exosome could be taken up by other tissues and regulate functions of the tissues in addition to ease of large-scale production. However, side effects of exosome-based drugs have not been well investigated. The aim of this research is to develop constructing method of 'safe exosome' whose risk of side effects is attenuated. To data, methods for detailed evaluation of exosome pharmacokinetics (real-time live imaging in body) and for exosome modification of outer and inner phases which might include risk factors of side effect (compatible with character preservation of original exosome such as size, surface charge, and protein affinity), has been investigated, and a part of the achievement was demonstrated as conference presentations and original paper (Shota Warashina et al., Int. J. Pharm., 624, 121968, 2022).

研究分野：Drug Delivery System、PETイメージング

キーワード：エクソソーム DDS PETイメージング

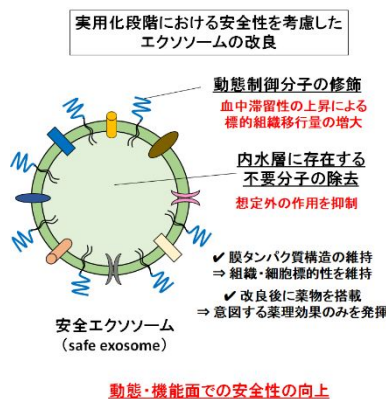
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞由来の成分を含有する細胞分泌粒子であり、その特徴的な構造や機能から、薬物や免疫賦活アジュバント等を標的部位へ送達する Drug Delivery System (DDS) キャリアとして活用する研究が行われている。Lipid Nanoparticle (LNP) が代表的存在である人工キャリアと比較して、エクソソームは細胞由来の天然ナノキャリアであるため、免疫原性の低さ、組織・細胞移行性等の点で有用であり、将来的な DDS の基盤技術のひとつとなることが期待されている。これまでの多くのエクソソーム DDS 研究は、エクソソームそのものや薬物・機能素子を搭載したエクソソームの薬理的有用性(薬物動態・治療効果等)を示すことに注力していた一方で、エクソソームの不均一性に起因する想定外の薬理作用が誘導される安全性の懸念、主要な投与経路である静脈内投与時における血中滞留性の低さに起因する標的組織への送達量の減少など、臨床応用の実現を志向する上で不可避な問題に対して言及・改善を試みた研究は筆者が知る限りほとんど報告されていなかった。

2. 研究の目的

エクソソーム製剤の実用化を志向して、本研究では、エクソソームを DDS キャリアとして用いる利点(特定の含有分子による薬理作用、標的組織への選択的な移行性など)の由来となる生物学的・物理化学的物性を維持しつつ、安全性の向上、及び、動態の改善を目的とした改変を可能とする方法を開発し、それらの技術の組み合わせにより安全なエクソソーム (safe exosome) を調製するための方法論を検討した。さらに、改変したエクソソームの体内動態を正確に把握するために、感度・時空間分解能共に高い positron emission tomography (PET) イメージングによる動態評価法についても検討した。



動態・機能面での安全性の向上

3. 研究の方法

本研究では、(1)安全性や血中滞留性の向上を目的としたエクソソームの改変方法の検討、(2)PET イメージングによる動態評価を目的としたポジトロン放出核種標識法の検討に大別して研究活動を実施した。Colon26 細胞の培養上清から単離し、超遠心分離を利用した一般的な方法により精製したエクソソームを以降のすべての実験に使用した。

(1) エクソソーム内水層分子の除去: 様々な濃度のエタノール、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ポリソルベート 20 / PBS 溶液にエクソソームを添加・混合し、室温で 30 分インキュベートした。その後、限外濾過フィルターを用いて精製し、最終的に PBS に懸濁した。透過処理前後のエクソソーム懸濁液、限外濾過液中のタンパク質及び RNA を定量することで、透過処理によりエクソソーム内水層外へ漏出した分子の量を 3 種の透過処理法の間で比較した。また、透過処理前後のエクソソームの粒子径、ゼータ電位をゼータサイザーで評価した。

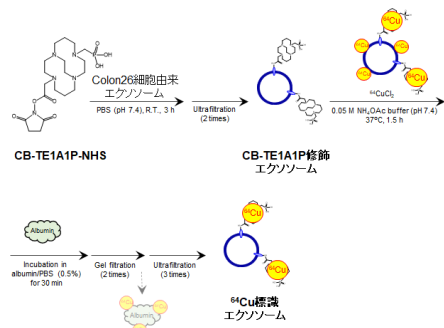
エクソソーム膜表面への Polyethylene glycol (PEG) 修飾: mPEG-N-hydroxysuccinimide (NHS) ester をエクソソーム懸濁液へ添加・混合し、室温で 3 時間インキュベートした。その後、限外濾過により精製し、PEG 修飾前後の粒子径、ゼータ電位を評価した。

内水層の除去・PEG 修飾の組み合わせ: 検討で見出した最適な条件下でエクソソームの内水層分子を除去後、さらに検討と同様に PEG 修飾を施した。一連の処理前後のエクソソームの粒子径・ゼータ電位をゼータサイザーにより、エクソソーム膜表面タンパク質の親和性をフローサイトメトリーにより評価した。

PEG 修飾を想定した膜表面脂質膜への挿入条件の検討: ポジトロン放出核種が配位するクロスブリッジ型キレーターと疎水性炭素鎖をコンジュゲートした新規分子を設計し、分散した状態、あるいはミセルを形成させた上で $^{64}\text{CuCl}_2$ を酢酸緩衝液へ添加・混合し、37 °C で 30 分インキュベートした。次に、それぞれエクソソーム懸濁液へ添加・混合し、37 °C で 1 時間インキュベートした後、限外濾過により精製した。それぞれの ^{64}Cu 標識エクソソームを Balb/c マウスへ静脈内投与、PET イメージングにより体内動態を評価することで、新規分子の挿入の有無を判断した。

(2) クロスブリッジ型キレーター修飾エクソソームの調製: 生体内標識安定性に優れたクロスブリッジ型キレーター CB-TE1A1P を NHS により活性化後、エクソソーム懸濁液に添加・混合し、室温で 3 時間インキュベートした。限外濾過により精製後、粒子径・ゼータ電位、及び、膜表面タンパク質の親和性を評価した。

^{64}Cu 標識エクソソームの調製: 検討で調製した CB-TE1A1P 修飾エクソソーム、 $^{64}\text{CuCl}_2$ を酢酸緩衝液へ添加・混合し、37 °C で 90 分インキュベートした。次に、アルブミンを添加・混合し、37 °C で 30 分インキュベ



ト後、ゲル濾過によりアルブミンを除去した。限外濾過により精製後、粒子径・ゼータ電位、及び、膜表面タンパク質の親和性を評価した。(研究施設の都合上、 $^{64}\text{CuCl}_2$ ではなく非放射性的の CuCl_2 を代替としてエクソソームに標識し親和性を評価した。)

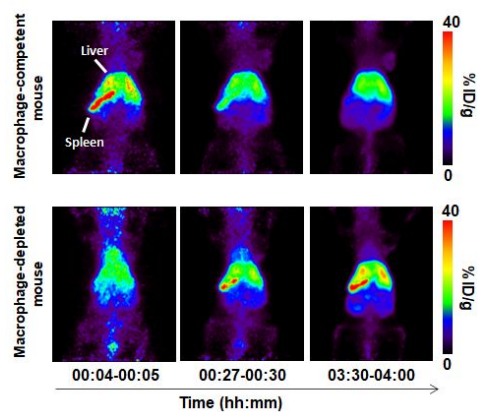
PET イメージングによるエクソソームの体内動態評価: Colon26 細胞を担がんした Balb/c マウス (未処理またはマクロファージ除去処理) に検討 で調製した ^{64}Cu 標識エクソソームを静脈内投与、同時に PET イメージングを開始し、体内動態を評価した。PET イメージング終了後マウスを安楽死させ、各臓器・組織を回収し、それぞれの線量を測定した。

4. 研究成果

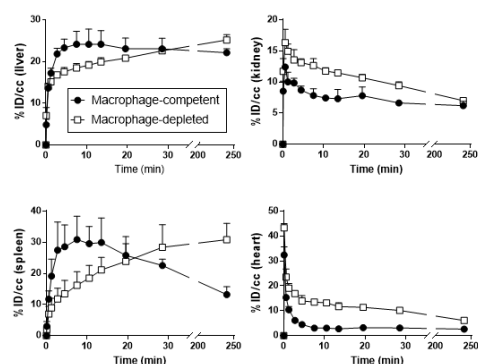
(1) 検討 において、エクソソーム内水層分子の漏出が比較的高く、粒子径・ゼータ電位といった物性にほぼ変化がなかった条件を見出した (DMSO 10%)。また、検討 において、PEG 修飾処理前と比較して修飾処理後のエクソソームの粒子径は同等であった一方でゼータ電位が 0 mV 付近に近づいたことから、エクソソーム膜表面へ PEG が修飾されたことが示唆された。次に、検討 、検討 で最適化した条件を組み合わせることで内水層分子の除去と PEG 修飾の両立が可能かどうか評価したところ (検討)、内水層除去後の PEG 修飾により両者が両立された一方で、エクソソーム膜表面のタンパク質 (CD63 など) の親和性が顕著に低下する問題が現れた。これは、内水層除去の際に行った DMSO による膜透過処理がエクソソーム脂質膜の流動性を上昇させたことで膜タンパク質の 3 次元構造、量が変化しやすい状態となり、それに加えて膜タンパク質と PEG が共有結合を形成したことで、膜タンパク質の親和性に与える影響が相加的に増加したと考えられた。

そこで、共有結合を介さずにエクソソームへ PEG を修飾する方法として、疎水性炭素鎖の脂質膜への挿入を介した修飾戦略について検討することとした (検討)。まず、市販の PEG 脂質 (mPEG-DSPE) をエクソソーム懸濁液へ添加・混合したところ、PEG 修飾時に特徴的なゼータ電位の変化 (0 mV 付近への変化) が確認されたことに加え、膜タンパク質の親和性の変化が共有結合を形成させる修飾方法の場合と比較してある程度軽減されることが明らかとなり、挿入戦略の有用性が示唆された。さらなる親和性変化の軽減を目的として、分子中の疎水性炭素鎖の数が DSPE と比較して少ない新規 PEG 脂質の合成を計画した。初めに、疎水性炭素鎖が戦略通りにエクソソーム脂質膜へ挿入されていることを確認するため、CB-TE1A1P を疎水性炭素鎖にコンジュゲートした分子 CB-TE1A1P-HBA を設計し、分散した状態、あるいはミセルを形成した状態でエクソソームと混合することで調製した ^{64}Cu 標識エクソソームを静脈内投与し、PET イメージングで体内動態を評価した。その結果、ミセル体 CB-TE1A1P-HBA を用いて標識した場合において、様々な種類のエクソソームに共通する動態傾向 (低い血中滞留性、肝臓・脾臓への高い集積) が PET イメージングで認められた一方で、分散状態の CB-TE1A1P-HBA を用いた場合はその傾向が認められなかったことから、疎水性炭素鎖のミセル体をエクソソームと混合する修飾方法が、エクソソームの動態特性を変化させずに目的分子をエクソソーム膜表面に挿入できる、PEG 修飾のための有力な候補であることが示唆された (検討途中)。

Maximum Intensity Projection images



Time-Activity Curves



(2) エクソソームの体内動態評価の手段として蛍光・発光を利用した方法の報告例がこれまでに多かったが、定量性や時空間的分解能、ヒトでの臨床試験を考慮に入れた場合、PET イメージングによる評価が最適と考え、細胞上清から単離したものの、血液・尿のような体液から単離したものの様な種類のエクソソームに適用できる後修飾的なポジトロン放出核種標識法の開発を試みた。具体的には、NHS で活性化した CB-TE1A1P を用いてエクソソーム膜表面タンパク質との間に共有結合を形成させることで ^{64}Cu を膜表面に固定化する方法である。CB-TE1A1P 修飾、及び、 ^{64}Cu 標識前後で物理化学的物性 (粒子径・ゼータ電位) と生物学的物性 (膜表面タンパク質の親和性) を比較したところ、これらの測定サンプル間での有意な差は認められなかったことから、本方法はエクソソームの物性、ひいてはエクソソーム本来の動態特性に影響を与えずにポジトロン放出核種を標識できる有用な標識法であることが示唆された (検討 、検討)。

上記の ^{64}Cu 標識エクソソームを担がんマウスへ静脈内投与し PET イメージングを実施したところ、通常マウスにおいては投与した内の大半の ^{64}Cu 標識エクソソームが投与 5 分以内に血中から消失し肝臓・脾臓に集積する様子がみられた一方で、マクロファージ除去マウスにおいては血中半減期が上昇し肝臓・脾臓への集積が減少したことから、投与したエ

エクソソームの多くは肝臓・脾臓に存在する細網内皮系マクロファージにより取り込まれることで血中からクリアランスされるという従来の知見と一致し、エクソソームの動態を PET で追跡できていることが示唆された（検討）。Safe exosome の proof of concept を取得するためには、臓器レベルでの定性的な動態傾向だけではなく組織レベルでの定量的な動態解析が必要と考えたため、PET データを活用した薬物動態学的解析の 1 つのモデルとして、肝臓・脾臓への ⁶⁴Cu 標識エクソソームの取り込みにおけるマクロファージの寄与の定量化を試み、総取り込みに対して肝臓では 67%、脾臓では 76%、マクロファージの寄与があることが明らかとなった。（Warashina et al., *Int. J. Pharm.*, 624, 121968, 2022）

本研究では、臨床での使用を想定した安全性の高いエクソソームを調製するための方法論の構築を目指し、想定外の薬理作用発揮を回避するための内水層分子除去技術の開発、エクソソーム製剤の有効性を向上させ炎症反応の惹起を抑制するための PEG 修飾戦略の検討、上記の技術を組み合わせた safe exosome の proof of concept 取得時に不可欠な定量性の高い体内動態評価技術の開発を行った。残念ながら最終的な目標である safe exosome の構築とその proof of concept の取得までに至らなかったが、上記の様々な検討の過程で safe exosome 構築のための基盤となる技術の開発や知見の集積に成功し、エクソソーム製剤の臨床応用に向けた研究開発に大いに貢献することが予想され、研究代表者自身の今後のエクソソーム研究の遂行にも役立たいと考えている。

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 0件）

1. 著者名 Warashina Shota, Zouda Maki, Mohri Kohta, Wada Yasuhiro, Maeda Kazuya, Watanabe Yasuyoshi, Mukai Hidefumi	4. 巻 624
2. 論文標題 64Cu-labeling of small extracellular vesicle surfaces via a cross-bridged macrocyclic chelator for pharmacokinetic study by positron emission tomography imaging	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 121968 ~ 121968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2022.121968	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藁科翔太、造田真希、和田康弘、渡辺恭良、向井英史
2. 発表標題 PETによるエクソソームの体内動態評価を指向した 膜表面キレーター化学修飾による64Cu標識
3. 学会等名 第60回日本核医学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藁科翔太 造田真希 和田康弘 渡辺恭良 向井英史
2. 発表標題 PETイメージングによる64Cu標識エクソソームの動態評価
3. 学会等名 第33回日本DDS学会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------