

令和元年6月20日現在

機関番号：34306

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16197

研究課題名(和文) エクソソーム膜脂質を利用した血液がん細胞へのsiRNA導入技術の開発

研究課題名(英文) Development of siRNA delivery for hematological malignancy using exosomal lipid

研究代表者

戸田 侑紀 (Toda, Yuki)

京都薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40779724

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)：狙った分子へ特異的に作用するsiRNA製剤は究極の分子標的治療であるが、生体内安定性が乏しいため標的部位へと送達する技術が別途必要である。中でも、血液がん細胞への導入は極めて困難であり、その技術開発が強く望まれている。本研究では、多発性骨髄腫や急性骨髄性白血病などの血液がん細胞株が分泌する細胞外分泌小胞(エクソソーム)にsiRNAを内包し、分泌元細胞内に送達させることに成功した。今後、siRNAの細胞内移行量を改善するためにエクソソームの細胞内移行量やsiRNA内包効率を高める工夫が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

狙った分子へ特異的に作用するsiRNA製剤は、現在使用されているがん治療薬よりも安全性が極めて高いと言われている。siRNAは細胞内に移行することで作用を発揮するが、血液がん細胞に対してsiRNAを細胞内導入する技術は未だ開発されていない。本研究では、血液がん細胞株が分泌する顆粒(エクソソーム)にsiRNAを包み込ませることにより、分泌元の血液がん細胞内に送達させることに成功した。本成果は、血液がんに対するsiRNA製剤の開発に繋がる重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Gene therapy using siRNA is one of the most promising strategy makes cancer therapy more effective and safer. However, development of delivery technology is essential for siRNA therapeutics which is easily degraded by nuclease in body. Notably, the incorporation of siRNA into blood cancer cells has not been achieved. In this study, we prompted to introduce siRNA into some types of blood cancer cells (multiple myeloma and acute myeloid leukemia) using their own extracellular vesicles (exosomes). Encapsulation of siRNA into exosomes promoted their internalization into cells, while it was not enough amount to induce RNA interference. Enhancement of the efficacy of exosome incorporation into cells and siRNA loading into exosomes could be required to solve this problem.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：エクソソーム siRNA 血液がん リポソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

siRNA は標的 mRNA の発現を特異的に抑制できるため、副作用の少ない新たながん治療薬として期待されているが、その生体内安定性の低さゆえ drug delivery system (DDS) が必須である。一般的に、血液がんなどの浮遊細胞に対して siRNA を効率的に導入することは困難とされており、有効な DDS は未だ開発されていない。

申請者らはこれまでに細胞間情報伝達を担うエクソソームの細胞指向性に注目し、DDS への応用を試みてきた。『生体内の運び屋』であるエクソソームは DDS として理想的であり、当開発領域で注目されている。またエクソソームが血球細胞に取り込まれる報告もあることから、エクソソーム自身やその性状を模倣した人工型 DDS による血液がん細胞への効率的な薬物送達が見込める。

以上の背景より、エクソソームの細胞指向性に基づく独自の DDS 研究戦略を血液がんに応用し、核酸医薬品開発による新規治療法の提案を目指した、本研究を立案した。

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究より、「エクソソームは分泌元の細胞へ効率的に取り込まれる」という知見を得ている。そこで、標的とする種々の血液がん細胞に対し、標的細胞から分泌されるエクソソームの細胞内移行性を各細胞種で評価する。また、複雑な生体成分で構成されるエクソソームを直接用いることは治療安全性確保の点から難しいと考え、固形がん細胞へ高い移行性を示すエクソソーム由来脂質リポソーム (Exolip-U251) の血液がん細胞への適用の可否も検討する。さらに、血液がん細胞への高い移行性がみられたものに関しては、構成成分の最適化をした後、siRNA などの薬物を内包し細胞レベルでの有効性を検証する。以上を通して、エクソソームの細胞指向性を基盤とした血液がんに対する有効な核酸医薬品開発のための科学的知見を提供する。

3. 研究の方法

(1) エクソソームの精製

細胞培養上清を超遠心した後、さらに 30% ショ糖に沈渣を重層した状態でさらに超遠心を行なった。最終的に 30% ショ糖底部の沈渣を回収し、エクソソームとしてその後の実験に用いた。

(2) 脂質抽出ならびにリポソームの作製

エクソソームの脂質成分は Bligh&Dyer 法により抽出した。また抽出脂質を押し出し法に供し、リポソームを得た。

(3) エクソソームならびにリポソームの細胞内移行性評価

エクソソームおよびリポソームをそれぞれ PKH67、NBD-PE により蛍光標識し、細胞に処置した。処置から 24 時間後における細胞内に導入されたエクソソームおよびリポソームの蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM) により検出した。

(4) エクソソームならびにリポソームに導入した薬物の細胞内動態および薬効の解析

エクソソームには蛍光標識 siRNA を市販キットや電気穿孔法により導入した。リポソームには、ドキシソルピシン (DOX) をリモートローディング法により内包させた。細胞内動態は薬物由来蛍光を LSM により解析した。siRNA の有効性については、標的 mRNA のノックダウン効率 (定量的 RT-PCR 法) から評価した。DOX の作用は、細胞生存率 (trypan blue 染色) にて評価した。

4. 研究成果

(1) Exolip-U251 の薬物送達能

固形がん細胞に対して高い移行性が確認されている (Exolip-U251) を血液がん細胞へ適用する前に、同リポソームの固形がん細胞における薬物送達能を評価した。蛍光標識 siRNA を市販キットによりコンジュゲートさせた Exolip-U251 を処置したところ、細胞内に siRNA 由来蛍光が検出された。このことから、siRNA は細胞内に導入されることが示唆された。続いて、細胞内に移行した siRNA の薬効作用を評価したところ、標的 mRNA 発現量はほとんど変化なかった。siRNA が細胞内で作用していないことが示唆されたため、siRNA の細胞内局在を解析したところ、siRNA 由来蛍光とリソソームマーカー (lysotracker) が共局在していることを明らかにした (図 1A)。本現象は RNA 干渉のポジティブコントロールとして用意したリポフェクタミン処置群においては見られなかった。これより、Exolip-U251 により導入された siRNA は RNA 干渉の場となる細胞質に遊離されることなく、リソソーム内に蓄積後分解された可能性が示唆された。

エクソソームが内包した miRNA を細胞内で作用していることを考慮すると、リポソーム膜内に siRNA を内包する必要があると考えた。しかし、電気穿孔法によるリポソーム膜内への内包化を種々の条件検討により行なったが、達成できなかった。そこで、リポソームへの内包化がすでに確立されている DOX をモデル薬物として用い、その作用発現を評価した。DOX 単独では作用発現しない濃度で処置した場合、有意な細胞生存率の低下がみられた (図 1B)。

以上より、薬物を担体内部に導入することが効率的な作用発現に重要であると示唆される。

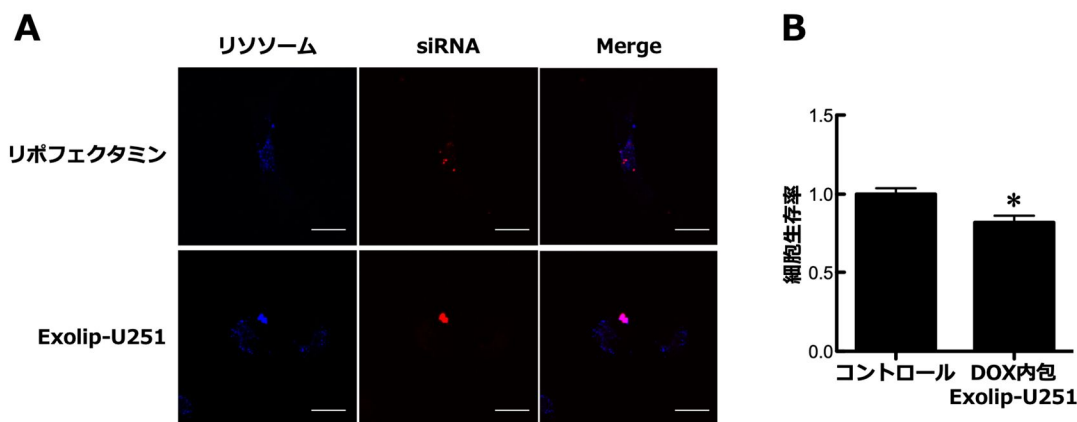


図 1 : Exolip-U251 の薬物送達能評価 (A) siRNA (赤) とリソソーム (lysotracker、青) の共染色画像 (スケールバー : 20 μm) (B) DOX 内包 Exolip-U251 の殺細胞効果の検証

(2) Exolip-U251 の血液がん細胞への移行性評価

固形がん細胞に対して高い移行性が確認されていたリポソームの血液がん細胞に対する移行性を評価した。標的細胞には多発性骨髄腫細胞 (OPM-2) を使用した。結果として、細胞内にリポソーム由来蛍光は検出されなかった。

(3) エクソソームの血液がん細胞への移行性評価

(2) の結果を受けて、エクソソームの血液がん細胞に対する移行性を評価した。評価対象は、(2) の実験で用いた OPM-2 および MLL 遺伝子再構成を含む白血病細胞 (MLL 白血病) の株 (THP-1) とした。各々の細胞株より分泌されるエクソソーム (Exo-OPM-2、Exo-THP-1) を精製し、蛍光標識後それぞれの細胞に処置した。結果として、両細胞株ともにエクソソーム由来蛍光が細胞内で見られた (図 2)。この結果は、申請者らの「エクソソームは分泌元の細胞へ効率的に取り込まれる」という理論に当てはまるものである。

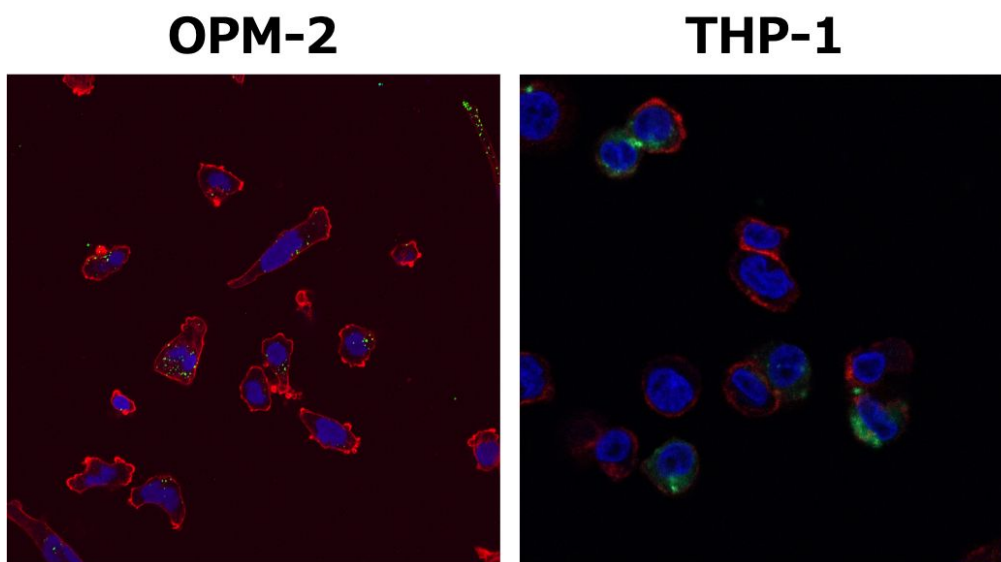


図 2 : エクソソームの血液がん細胞への移行性 各標的細胞分泌エクソソーム (PKH67、緑) 細胞骨格アクチン (Phalloidin-Rhodamine、赤) および核 (Hoechst33258、青) の共染色画像

(4) Exo-THP-1 に内包した siRNA の作用解析

MLL 白血病は有効な治療法が確立されていないため、本がん種を標的とした核酸医薬品開発に焦点を置いた。siRNA の標的配列として、MLL 再構成領域を選んだ。本領域は正常細胞には存在しないため、副作用を最小限に抑えられる。(1) の成果より、siRNA を細胞内で有効に作用させるためにはエクソソーム内に siRNA を内包化させる必要がある。そこで、電気穿孔法によりエクソソーム内に蛍光標識 siRNA を内包させ、細胞内移行性を評価した。その結果、細胞内に siRNA 由来蛍光が僅かに検出された (図 3)。続いて、細胞内に導入した siRNA が RNA

干渉を起こしているかについて、検討した。定量的 RT-PCR の結果、標的 mRNA の発現量に有意な変化はみられなかった。

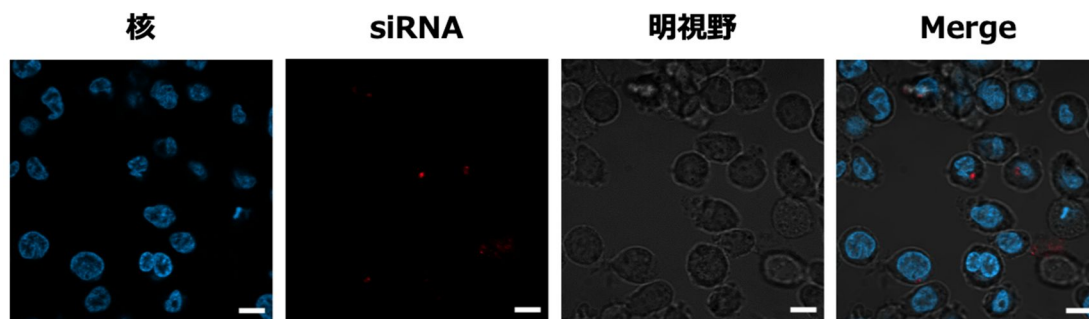


図 3 Exo-THP-1 の siRNA 送達能 スケールバー : 10 μ m

本研究において、OPM-2 や THP-1 などの各血液がん細胞は自身が分泌するエクソソームを取り込むことがわかった。また、エクソソームに内包した siRNA も細胞内への移行が観察された。しかし、その有効性を確認することはできなかった。原因として、siRNA のエクソソーム内包量が少なく、RNA 干渉を起こすに十分な量が細胞内に送達されなかったことが考えられる。これには、電気穿孔法の条件検討を行う必要がある。別の解決策として、エクソソームの取り込み経路を活性化する薬剤などを併用し、エクソソームの細胞内移行量を高める方法が考えられる。今後、siRNA の細胞内移行量をさらに高めるための工夫が必要であることが判明した。

5 . 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

Shohei Kawanishi, Kazuyuki Takata, Shouma Iteazono, Hiroko Nagayama, Sayaka Konoya, Yugo Chisaki, Yuki Toda, Susumu Nakata, Yoshitaka Yano, Yoshihisa Kitamura, and Eishi Ashihara: Bone-marrow-derived microglia-like cells ameliorate brain amyloid pathology and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 査読有, 64, 563-585 (2018).

doi: 10.3233/JAD-170994

Yoko Nakagawa, Eishi Ashihara, Hisayuki Yao, Asumi Yokota, Yuki Toda, Yasuo Miura, Susumu Nakata, Hideyo Hirai, and Taira Maekawa: Multiple myeloma cells adapted to long-exposure of hypoxia exhibit stem cell characters with TGF- β /Smad pathway activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 査読有, 496, 490-496 (2018).

doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.034.

Kazuyuki Takata, Takahide Amamiya, Hiroaki Mizoguchi, Shohei Kawanishi, Eriko Kuroda, Risa Kitamura, Aina Ito, Yuki Saito, Manami Tawa, Tomofumi Nagasawa, Haruka Okamoto, Yuko Sugino, Shigehiko Takegami, Tatsuya Kitade, Yuki Toda, William R. Kem, Yoshihisa Kitamura, Shun Shimohama, and Eishi Ashihara: Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor-specific agonist DMXBA (GTS-21) attenuates A β accumulation through suppression of neuronal γ -secretase activity and promotion of microglial amyloid- β phagocytosis and ameliorates cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging.*, 査読有, 62, 197-209 (2018).

doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.10.021.

Natsuki Imayoshi, Makoto Yoshioka, Jay Chauhan, Susumu Nakata, Yuki Toda, Steven Fletcher, Jeffrey W. Strovel, Kazuyuki Takata, and Eishi Ashihara: CG13250, a novel bromodomain inhibitor, suppresses proliferation of multiple myeloma cells in an orthotopic

mouse model. Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 484, 262-268 (2017).
doi: 10.1016/j.bbrc.2017.01.088.

〔学会発表〕(計 9 件)

戸田侑紀ら：DJ-1 は神経膠芽腫細胞の幹細胞性を制御する. 第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪国際会議場ほか, 大阪府, 大阪市), 2018.9.27-29.

戸田侑紀ら：DJ-1 は神経膠芽種幹細胞の維持に寄与する. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2018 (九州大学, 福岡県, 博多市), 2018.8.25.

戸田侑紀ら：神経膠芽種幹細胞における DJ-1 の機能. 生体機能と創薬シンポジウム 2018 (福岡大学, 福岡県, 福岡市), 2018.8.23-24.

戸田侑紀：生体内の情報伝達顆粒を利用した腫瘍標的化技術の開発. KYOTO BASIC SCIENCE FORUM (ハイアットリージェンシー京都, 京都府, 京都市), 2018.4.6.

Yuki Toda, et al: Cancer targeting using exosomal lipids toward detection enhancement of microlesion, AACR-SNMMI Joint Conference on STATE-OF-THE-ART Molecular Imaging IN CANCER BIOLOGY AND THERAPY, (San Diego, USA) 2018.2.14-18.

戸田侑紀ら：細胞指向性を制御するエクソソームの脂質と薬物送達への応用. 第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2017 (京都薬科大学, 京都府, 京都市), 2017.10.21-22.

辰巳宥衣、戸田侑紀ら：間葉系幹細胞由来エクソソームの造血制御に関する解析. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017 (京都薬科大学, 京都府, 京都市), 2017.8.26.

戸田侑紀、芦原英司：細胞外小胞の脂質組成から見出した新規がん標的型 DDS. 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (九州大学, 福岡県, 博多市), 2017.6.14-16.

鷓飼幸永佳、戸田侑紀ら：エクソソーム膜脂質より再構成したリポソームのがん細胞移行性評価. 日本薬学会第 137 年会 (仙台国際センター展示ホールホワイエほか, 宮城県, 仙台市), 2017.3.25-28.

〔その他〕

ホームページ等

<http://labo.kyoto-phu.ac.jp/seiri/seiri-j.html>

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：芦原 英司、森田 真也

ローマ字氏名：Ashihara, Eishi; Morita, Shin-ya