

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02562

研究課題名(和文) 免疫制御分子搭載エキソソームを利用したin vivo 遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of in vivo gene therapy using exosomes loading immunomodulatory molecules

研究代表者

高倉 喜信 (Takakura, Yoshinobu)

京都大学・薬学研究科・教授

研究者番号：30171432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では体内で産生される内因性エキソソームを利用したin vivo遺伝子免疫療法の開発を目的として、内因性エキソソームの挙動の解析とエキソソームへの免疫制御分子の搭載法の開発を行った。内因性エキソソームとして血液中のエキソソームに着目し、これを対象とした回収・標識法の確立に成功した。免疫制御分子として、NF- κ B抑制ペプチドであるNBDペプチドを選択し、エキソソーム内部への効率的なNBDペプチドの搭載法の開発に成功した。また、NBDペプチド搭載エキソソームは高い炎症抑制効果を示した。以上、内因性エキソソームを利用したin vivo遺伝子免疫療法につながる基盤の確立に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞から産生される粒子径100nm程度の膜小胞であるエキソソームは、細胞間で物質輸送を行う輸送担体であり、その生理機能の解明とそれを利用した治療法の開発が期待される。本研究では、体内におけるエキソソームの挙動の解明と治療用分子の搭載方法の確立に成功したが、これはエキソソームの生理機能の解明を目的とした研究並びに治療法の開発において重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analyzed the behavior of endogenous exosomes and developed a method to attach immunoregulatory molecules to exosomes in order to develop in vivo gene immunotherapy using endogenous exosomes produced in the body. We focused on blood exosomes as endogenous exosomes, and succeeded in establishing a method to collect and label them. We selected NBD peptide, an NF- κ B inhibitory peptide, as an immunoregulatory molecule, and succeeded in developing an efficient method for loading NBD peptide into exosomes. The NBD peptide-loaded exosomes showed a high anti-inflammatory effect. In conclusion, we have succeeded in establishing the basis for in vivo gene immunotherapy using endogenous exosomes.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：エキソソーム ルシフェラーゼ 免疫療法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクソソームは細胞から分泌される直径 100nm 前後の膜小胞である。2007 年にエクソソームに内包された RNA がエクソソームを取り込んだ細胞へと送達されその機能を発揮することが報告されて以降、エクソソームを介した細胞間物質輸送が注目を集めている。この現象ががんの増殖や転移、免疫応答、炎症、神経性疾患、感染症、等の種々の生体内イベントに関与することが報告されているが、なかでも免疫応答には注目が集まっている。

エクソソームの物質輸送能に着目して、種々の薬物デリバリーに応用する研究も活発に行われている。この場合には培養細胞の培養上清に放出されたエクソソームを回収、精製し、これに核酸医薬、脂溶性薬物等を搭載した後、外来的に投与する方法で機能、治療効果等が評価される。また、生体内で産生された内因性エクソソームが、免疫応答をはじめ生体内で起こる種々の生理的、生物学的反応の過程に関わっていることが証明されているが、内因性エクソソームあるいはその機能を遺伝子導入で改変したエクソソームを治療に応用した試みは非常に乏しい。免疫制御能を有する内因性のエクソソームを体内で持続的に産生させることができれば有用な免疫療法になると考えられる。

一方で、上述したような体内で産生されるエクソソームを利用した免疫療法の開発のためには、体内に存在するエクソソームの体内動態の解析、ならびに免疫制御分子を搭載したエクソソームの産生法の確立が必要となる。しかしながら、これらの情報については乏しい。

2. 研究の目的

以上のような背景より、本研究では体内に存在するエクソソームの体内動態の解析、ならびに免疫制御分子を搭載したエクソソームの産生法の確立について取り組むこととした。

体内に存在するエクソソームの体内動態の解析

本研究では解析対象とする体内に存在するエクソソームとして、血液中に存在するエクソソームに着目した。血液中にも大量のエクソソームが存在し、癌や免疫応答等の多様な生体内イベントへの関与が報告されている。エクソソームの生理機能の解明を目的とした研究では、培養細胞から回収したエクソソームを用いた研究が盛んに行われている。これまでに、培養細胞から回収したエクソソームを血液中に投与しても、マクロファージに取り込まれ血中より速やかに消失することが報告されている。この結果は血液中には内因性のエクソソームが大量に存在するという事実との整合性は低い。薬物速度論観点からは、血中においてエクソソームの産生と消失が平衡状態にあるために一定のエクソソーム濃度が維持されていると考えられる。しかしながら、内因性エクソソームの回収・標識方法が存在しないために血液中のエクソソームを対象とした解析は困難であり、産生・消失平衡については検討されてこなかった。そこで本研究では、将来的な内因性のエクソソームを対象とした遺伝子治療の実現を目的として、その前段階として内因性エクソソームの生体内挙動の解析方法と、薬物速度論に基づく産生と消失の平衡状態の解析方法とを開発し、血液中エクソソーム濃度の維持機構の解明を目指した。

免疫制御分子を搭載したエクソソームの産生法の確立

エクソソームへの免疫制御分子の搭載に際しては、エクソソームの外側あるいは内側への2種類の搭載方法が存在する。我々のこれまでの検討において、エクソソーム外側への効率的な搭載方法については既に確立済みであったことから、内側搭載についての検討を行うこととした。搭載する分子として、炎症促進性の転写因子となる NF- κ B の抑制ペプチドである NBD ペプチドを選択した。エクソソーム内側への搭載には、エクソソーム内膜指向性タンパク質である Gag ペプチドを NBD との融合タンパク質とした。その際は、Gag と NBD を 1 個、3 個あるいは 6 個融合した3種類の融合タンパク質をデザインした。Gag と NBD の融合タンパク質を遺伝子導入した細胞から回収した NBD 搭載エクソソームの炎症抑制効果を評価し、免疫制御分子の搭載による免疫療法の可能性について検証することとした。

3. 研究の方法

体内に存在するエクソソームの体内動態の解析

血液からのエクソソーム回収：血液からのエクソソーム回収はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を用いて行った。エクソソーム標識：リン脂質ホスファチジルセリン (PS) を認識するタンパク質 Lactadherin と発光性レポータータンパク質 Gaussia luciferase (gLuc) との融合タンパク質 gLuc-LA を利用してエクソソームを標識した。血中からのエクソソーム消失速度の計測：マウス尾静脈より、gLuc-LA で標識したエクソソームを投与し、経時的に血液を回収し、gLuc 活性を測定した。得られた血中濃度推移プロファイルについて、薬物速度論的解析を行い 2-コンパートメントモデルに基づき消失速度定数を算出した。エクソソームの産生速度の算出：血液中のエクソソーム濃度は産生と消失の平衡により決定されると仮定して、エクソソーム血中濃度ならびに消失速度から産生速度を算出した。エクソソームの in vivo イメージング：マウス尾静脈より、gLuc-LA で標識したエクソソームを投与後、セレンテラジン溶液を静脈内投与後、発光を検出することでエクソソームの体内分布を観察した。マクロファージ除去マウス：クロドロネート封入リポソームを静脈内投与することでマクロファージ除去マウスを準備した。

免疫制御分子を搭載したエクソソームの産生法の確立

NBD 搭載エクソソームの調製: Gag と NBD、さらに FLAG タグとの融合タンパク質を遺伝子導入した細胞の培養上清を回収し、段階遠心後超遠心にてエクソソームを沈降させエクソソームを回収した。**エクソソームへの NBD 搭載の評価:** 回収したエクソソームに含まれる NBD は FLAG タグを対象としたウェスタンブロッティングにより検出した。**NBD 搭載エクソソームの NF- κ B 抑制効果の評価:** NF- κ B 依存性プロモーターの下流にルシフェラーゼをコードしたプラスミドベクターをトランスフェクションした細胞をリポポリ多糖 (LPS) で刺激後、NBD 搭載エクソソームを添加した。この細胞のルシフェラーゼ活性を測定し、NF- κ B 転写活性を見積もることで、NBD 搭載エクソソームの NF- κ B 抑制効果を評価した。**NBD 搭載エクソソームの抗炎症効果の評価:** マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞を LPS で刺激することで炎症モデル細胞を調製した。この細胞に各種の NBD 搭載エクソソームを添加した。この細胞における炎症関連分子の mRNA 発現については RNA を抽出・逆転写後にリアルタイム PCR 法により測定した。別途培養上清を回収し、そこに含まれる炎症性サイトカイン量を ELISA 法により、一酸化窒素量をグリース法により測定した。

4. 研究成果

体内に存在するエクソソームの体内動態の解析

SEC によって血液中のエクソソームを効率的に回収可能であった。また、gLuc-LA を用いることで、血液中のエクソソームを特異的に標識可能であることを明らかとした。この標識エクソソームを用いて、血中での消失半減期を測定したところ、約 6 分程度であった。また、投与されたエクソソームは主に肝臓へと分布することも見出した (図 1)。

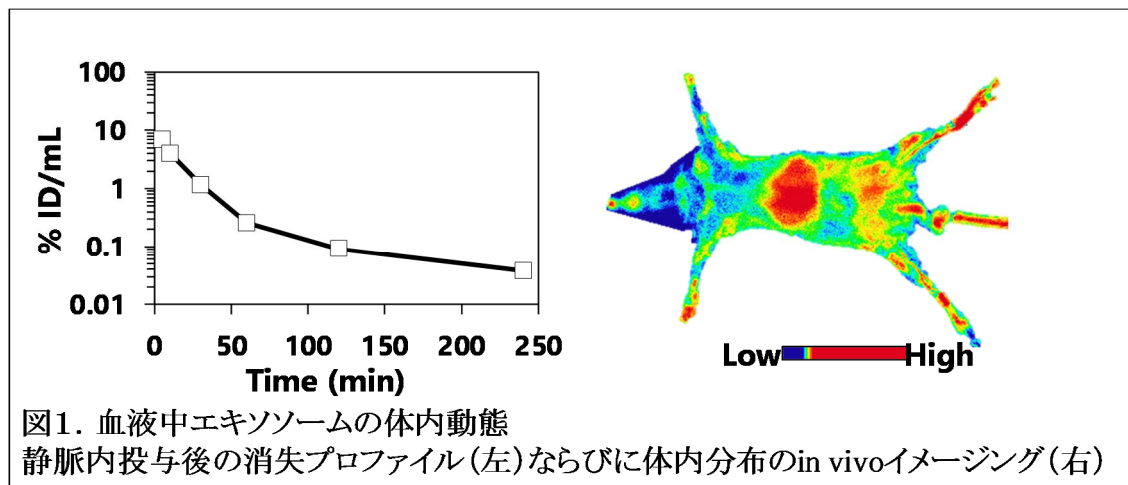


図1. 血液中エクソソームの体内動態
静脈内投与後の消失プロファイル(左)ならびに体内分布のin vivoイメージング(右)

定常状態での血液中エクソソーム濃度を測定し、消失速度と産生速度との平衡に基づく血中濃度の確定を想定することで産生速度を算出したところ、マウスにおいては毎分 18 μ g のエクソソームが血液中に産生されることが明らかとなった。構築したモデルの妥当性の検証を目的として、クロドロネート封入りポソーム投与により全身のマクロファージを除去することでエクソソームの消失速度定数を低下させたモデルマウスを作製し、同様にモデル解析を行った。その結果、消失速度定数を低下させたモデルマウスの消失速度定数を基として、産生速度は通常マウスと変わっていないと仮定して算出した血中エクソソーム濃度(約 450 μ g/mL)は、実測値(約 360 \pm 100 μ g/mL)の範囲内であったことから、構築したモデルの妥当性を証明できた。また、この結果は、血液エクソソーム濃度は産生と消失の平衡により決定されていることを示す結果である。

以上、血液からのエクソソームの回収並びに標識法を確立した。また、確立した方法を用いることで血液中エクソソームの体内動態の評価が可能となり、薬物速度論的解析方法を組み合わせることで、血液中エクソソームの産生速度の算出を可能とした。さらに、これらの方法を用いて、血液中エクソソームの濃度維持機構の解明に成功した。以上の成果はエクソソームの生理機能の解明を目的とした研究に有用な情報を供するものとなる。

免疫制御分子を搭載したエクソソームの産生法の確立

Gag と NBD、さらに FLAG タグとの融合タンパク質を遺伝子導入した細胞の培養上清から、NBD を搭載したエクソソームの回収が可能であることをウェスタンブロッティング法により確認した。その際には、Gag と NBD を 1 個、3 個あるいは 6 個融合した 3 種類の融合タンパク質をデザインしたが、いずれの場合にも NBD 搭載エクソソームの回収が可能であった。調製した NBD 搭載エクソソームの NF- κ B の抑制能について評価したところ、Gag と NBD を 6 個融合したタンパク質を搭載したエクソソーム (6NBD 搭載エクソソーム) が有意に抑制効果を示した一方で、Gag と NBD を 1 個あるいは 3 個融合したタンパク質を搭載したエクソソームの抑制効果は小さなものであった。これは、Gag 一個当たりの NBD 搭載量が多い方が、よりエクソソームに多数の NBD が搭

載されたために、より高い NF- κ B 抑制能を示した結果であると考えられる。そこで、LPS で刺激した RAW264.7 細胞を用いて、NBD を搭載したエキソソームの抗炎症能を評価したところ、6NBD 搭載エキソソームが他のエキソソームと比較して、炎症関連分子の mRNA 発現ならびにタンパク質発現を強力に抑制するとともに、炎症メディエーターである NO の産生も有意に抑制した。これは、6NBD 搭載エキソソームが他のエキソソームと比較して高い NF- κ B 抑制能を示した結果とも一致した結果である。

以上、免疫制御分子として選択した NBD のエキソソームへの効率的な搭載に成功した。また NBD 搭載エキソソームは NF- κ B 抑制効果を有しており、それに基づく炎症抑制能を有していることも明らかとした。以上、本研究で得られた成果はエキソソームへの免疫制御分子搭載についての有用な知見となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Matsumoto A, Takahashi Y, Chang HY, Wu YW, Yamamoto A, Ishihama Y, Takakura Y.	4. 巻 9
2. 論文標題 Blood concentrations of small extracellular vesicles are determined by a balance between abundant secretion and rapid clearance.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Extracell Vesicles	6. 最初と最後の頁 1696517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20013078.2019.1696517.	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 -
1. 著者名 Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y.	4. 巻 553
2. 論文標題 Preservation of exosomes at room temperature using lyophilization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Pharm.	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijpharm.2018.10.032.	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 -
1. 著者名 Liu W, Takahashi Y, Morishita M, Nishikawa M, Takakura Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Development of CD40L-modified tumor small extracellular vesicles for the effective induction of anti-tumor immune response.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomedicine (Lond)	6. 最初と最後の頁 1641-1652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2217/nnm-2020-0071.	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 -
1. 著者名 Matsumoto Akihiro, Asuka Maho, Takahashi Yuki, Takakura Yoshinobu	4. 巻 252
2. 論文標題 Antitumor immunity by small extracellular vesicles collected from activated dendritic cells through effective induction of cellular and humoral immune responses	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120112 ~ 120112
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biomaterials.2020.120112	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 -

1. 著者名 Takenaka M, Takahashi Y, Takakura Y.	4. 巻 328
2. 論文標題 Intracellular delivery of NF- B inhibitor peptide utilizing small extracellular vesicles for the application of anti-inflammatory therapy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Control Release.	6. 最初と最後の頁 435-443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.09.001	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 松本明宏、高橋有己、山本晶、高倉喜信
2. 発表標題 血液中の内因性エキソソームの挙動解析のための標識法開発と薬物速度論的解析に基づく内因性エキソソーム濃度維持機構の解明
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飛鳥真帆、松本明宏、高橋有己、高倉喜信
2. 発表標題 免疫活性化能を有する抗原搭載樹状細胞由来エキソソームを利用した効果的ながんワクチン療法の開発
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakagawa N, Takahashi Y, Takakura Y.
2. 発表標題 Development of Interferon -loaded tumor cell-derived extracellular vesicles applicable to cancer vaccine therapy.
3. 学会等名 International Society for Extracellular Vesicles 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsumoto A, Takahashi Y, Ariizumi R, Nishikawa M, Takakura Y.
2. 発表標題 Development of Exosome Assembly Formed by Utilization of DNA Hybridization and its Application for Cancer Vaccine.
3. 学会等名 Globalization of Pharmaceutics Education Network 2018 (GPEN2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高倉喜信
2. 発表標題 エクソソームの標識技術とドラッグデリバリー応用の最前線
3. 学会等名 第36回物性物理化学研究会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲川直輝, 高橋有己, 高倉喜信
2. 発表標題 がんワクチン療法への適用を目的としたInterferon- 搭載がん細胞由来exosome の開発
3. 学会等名 日本薬会第139年会
4. 発表年 2019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	高橋 有己 (Takahashi Yuki) (00547870)	京都大学・薬学研究科・准教授 (14301)	

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