

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19900

研究課題名(和文)RNA膜で構成される人工エクソソームの創製と高機能生理活性メディエーターへの展開

研究課題名(英文)Development of RNA-embedded membrane nanovesicles and their applications as highly functional bioactive mediators

研究代表者

宮田 完二郎(Miyata, Kanjiro)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：50436523

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、簡便な材料と調製法により「人工エクソソーム」を構築し、高機能生理活性メディエーターとして展開することを目的とした。具体的には、オリゴ核酸とポリペプチドの間で形成されるポリイオンコンプレックス(PIC)膜からなる中空ナノ粒子を構築し、中空ナノ粒子の物性および搭載分子に由来する生理活性機能を評価した。結果として、粒径約100 nmかつ安定な中空ナノ粒子を調製することができ、搭載分子単体と比べ、より優れた生理活性機能を得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬を用いて調製された人工エクソソーム「核酸ソーム」は、核酸医薬単体と比べて細胞内移行能に優れ、より高い生理活性(RNA干渉効果)を誘導できることが示された。また、人工エクソソームは内水相に生体高分子を内包し、細胞へと導入できることも示された。さらに、人工エクソソーム表層をアポトーシス誘導ペプチドで修飾することで、白血病細胞に細胞死を誘導できることも示唆された。以上より、簡便な材料と調製法を通じて優れた生理活性を有する人工エクソソームが調製できること、およびその生理活性は目的に応じて調節可能であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文):This study aimed to develop "artificial exosomes" by simple materials and methods and apply them as a multifunctional bioactivator. The artificial exosome was fabricated through the vesicular polyion complex (PIC) formation between oligonucleotides and PEGylated cationic polypeptides, followed by additional functionalizations, such as encapsulation of biomacromolecules and modification with apoptosis-inducing peptides and silica. The obtained vesicular PICs had a hydrodynamic diameter of ~100 nm and high stability in physiological milieu, and further exerted the enhanced bioactivity compared with naked oligonucleotides and peptides.

研究分野：薬物送達学

キーワード：人工エクソソーム オリゴ核酸 ポリペプチド ポリイオンコンプレックス膜

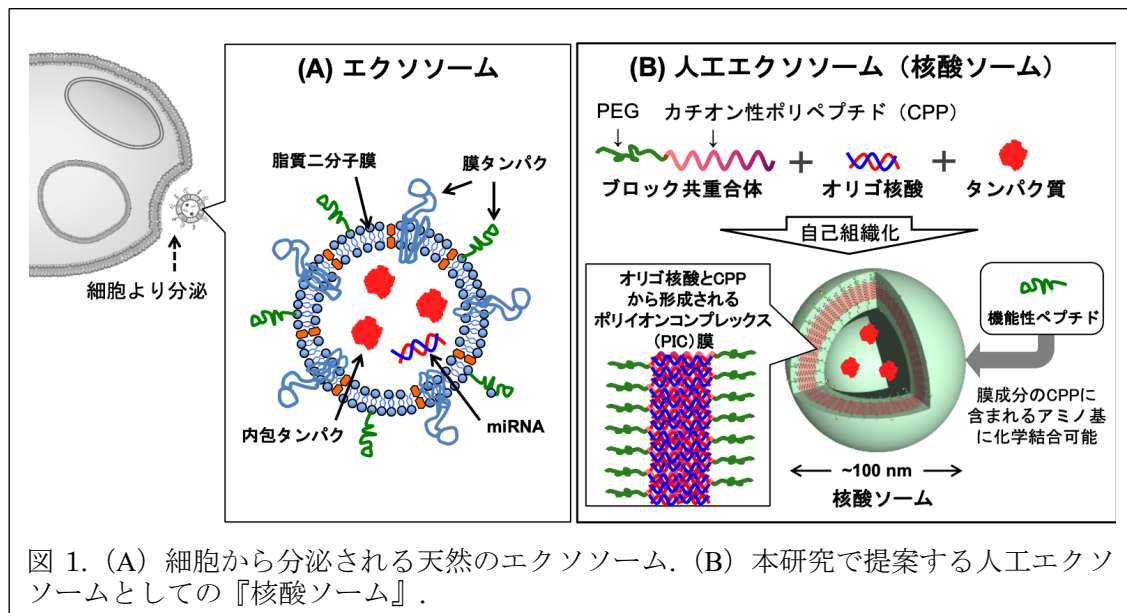
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、細胞間の情報伝達物質としてエクソソームが注目されている。エクソソームは、細胞が分泌する粒径約 100 nm の中空粒子であり、表面は細胞へのシグナル伝達を促す膜タンパクで覆われ、内部には細胞機能の調節因子であるマイクロ RNA (miRNA) などの核酸分子が内包されている (図 1A)。エクソソームは、これらの搭載分子を複合的に作用させることで、細胞移植に匹敵する強力な生理活性を生体内で誘導することができ、医療への応用展開が広く検討されている。一方、さらにその先の展開を見据えると、生体由来物質であるエクソソームには、予期せぬ副作用、大量生産や品質管理の難しさ、それに伴うコストパフォーマンスなどの課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究は、上述の課題を解決する方法論として、簡便な材料と調製法により形成される「人工エクソソーム」を構築することを目的とした。エクソソームの構造を忠実に模倣する場合、リン脂質二分子膜からなる中空粒子 (具体的にはリポソーム) を用いる方法論が考えられる。しかしながら、リポソームを用いる場合、調製に有機溶媒を用いることに加え、溶媒除去、超音波処理、濾過などの多段階のステップを必要とし、簡便な調製法とは言い難い。そこで、エクソソームの構造自体を模倣するのではなく、異なる構造材料を用いてエクソソームの機能を模倣し、新たな生理活性メディエーターとして活用できないかと考えた。エクソソームの機能発現の要は、miRNA などのオリゴ核酸であることから、オリゴ核酸自体を膜の構成成分とする中空粒子 (核酸ソーム) を簡便に調製できれば、人工エクソソームのプラットフォームとなる。さらに、核酸ソームの内水相にタンパク質を内包し、かつ表層を機能性ペプチドで修飾すれば、エクソソームの機能のコピーが可能であり、かつ天然にはない機能付与による高機能化も可能となる (図 1B)。



3. 研究の方法

本研究では、人工エクソソームの調製法として、ポリカチオンとポリアニオン間で静電相互作用を介して形成される複合体「ポリイオンコンプレックス (PIC)」に着目した。PIC 形成を利用することで、有機溶媒を用いることなく、水溶液の単純混合という簡便な方法で人工エクソソームを調製できるからである。また、中空粒子構造 (膜状) の PIC を調製するために、既報に基づいて poly(ethylene glycol) (PEG) とカチオン性ポリペプチド (CPP) のブロック共重合体 (PEG-CPP) を合成することにした^[1]。一方、ポリアニオンであるオリゴ核酸としては、塩基配列依存的に強力な遺伝子発現抑制 (RNAi) 効果を惹起する small interfering RNA (siRNA) を利用することにした。また、人工エクソソームに内包する物質としては、モデル生体高分子として蛍光標識デキストラン (DEX) を検討した。人工エクソソーム表層に搭載する機能性ペプチドとして、アポトーシスを誘導可能なペプチド配列である WEWT に着目した。さらに、人工エクソソームの安定性や物質保持能の向上に向けて、PIC 膜の直接的シリカハイブリッド化を行った。

4. 研究成果

(1) siRNA を搭載した人工エクソソーム『核酸ソーム』の調製と機能評価^[2]

siRNA を膜成分として含有する核酸ソームを調製するために、まず PEG-CPP の合成を行った。中空粒子型 PIC を調製するために、PEG 鎖の分子量は 2,000、CPP 鎖の重合度は 70 を狙った。また、CPP 鎖の化学構造として、既報を参考に poly[N-(5-aminopentyl)- α,β -aspartamide] (P(Asp-AP)) を採用した^[1]。合成された PEG-P(Asp-AP) に関しては、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) および核磁気共鳴分光法 (¹H NMR) により、狙い通りのブロック共重合体であることを確認した。

PEG-P(Asp-AP)と siRNA をそれぞれ緩衝液に溶解し、ボルテックスミキサーを用いて混合することで核酸ソームを調製した。得られたサンプルに対して動的光散乱測定、電気泳動光散乱測定、および透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行うことで、核酸ソームの粒子径、ゼータ電位、および形状に関する情報を得た。結果として、粒子径約 100 nm、ゼータ電位約 18 mV、中空状のナノ粒子が得られたことが確認された(図 2)。その一方で、150 mM NaCl を含む緩衝液中で核酸ソーム溶液は濁りを生じたことから、生理環境下では十分に安定ではないことが示唆された。そこで、核酸ソームを安定化するために、グルタルアルデヒドを用いて膜構造(具体的には P(Asp-AP)鎖の 1 級アミン)に架橋を施した。結果として、適度な混合比(P(Asp-AP)の 1 級アミンの 0.4 当量)で架橋を施した核酸ソームは、150 mM NaCl を含む緩衝液中でも粒子径変化を生じず、安定であることが確認された。

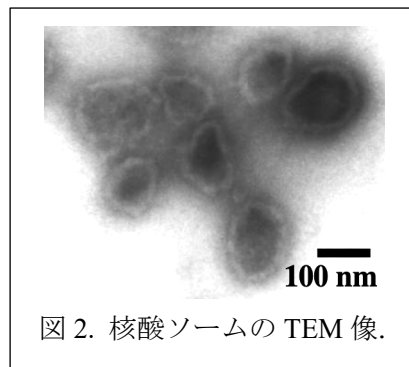


図 2. 核酸ソームの TEM 像.

次に、核酸ソームの生理活性メディエーターとしての機能を評価するために、培養がん細胞を用いた siRNA 導入実験を行った。蛍光標識 siRNA を用いて核酸ソームを調製して培養がん細胞に添加し、48 時間培養した後にフローサイトメーターを用いて細胞の蛍光強度を測定したところ、siRNA 単体を添加した細胞と比べ、80 倍近く大きい蛍光強度が得られた。この結果より、核酸ソームは搭載したオリゴ核酸を効率良く細胞に導入できることが示された。さらに、定量 PCR により細胞内での siRNA の生理活性(RNAi 効果)を測定したところ、有意な RNAi 効果を得ることに成功した(図 3)。詳細には、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する siRNA (siVEGF)と非標的配列の siRNA (siScr)を用いてそれぞれ核酸ソームを調製し、培養がん細胞に添加したところ、siVEGF を搭載した核酸ソームにおいてのみ、有意な RNAi 活性が認められた。これより、核酸ソームは生理活性メディエーターとして機能することが実証された。

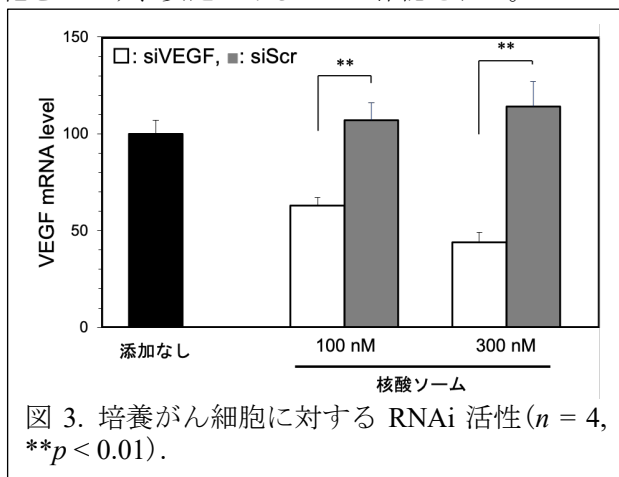


図 3. 培養がん細胞に対する RNAi 活性 ($n = 4$, $**p < 0.01$).

さらに、蛍光標識 DEX を用いて核酸ソームの生体分子内包機能を検証した。未架橋の核酸ソームと分子量 70,000 の蛍光標識 DEX をボルテックスミキサーで混合し、グルタルアルデヒド架橋を施した後に限外濾過を行い、蛍光相関分光法で解析した。その結果、蛍光標識 DEX の拡散係数が核酸ソームと同程度まで減少したことから、蛍光標識 DEX が核酸ソームに内包されたことが確認された。そこで、DEX 内包核酸ソームを培養細胞に添加し、共焦点レーザー走査顕微鏡により細胞内動態を観察したところ、DEX 由来の蛍光と siRNA 由来の蛍光が共局在している様子が確認された。これより、核酸ソームは内水相に内包した生体高分子を安定に細胞内へと導入できることが示された。

(2) 人工エクソソーム膜の機能性ペプチド修飾とシリカハイブリッド化

Fmoc 固相合成法により WEWT ペプチドを合成した。塩基性条件下での EDC カップリングにより、WEWT ペプチドを人工エクソソーム(PIC)膜へ導入した。得られたペプチド修飾人工エクソソームを限外ろ過により精製し、その後の実験に用いた。ヒト T 細胞性白血病細胞株である Jurkat 細胞を用いて細胞毒性評価を行ったところ、WEWT ペプチド単体およびペプチド未修飾人工エクソソームに比べて、WEWT ペプチド修飾人工エクソソームは高い殺細胞能を示した。その一方で、WEWT ペプチド修飾人工エクソソームの殺細胞能は、WEWT 修飾ポリカチオンよりも低かったことから、PIC 膜を形成することでポリカチオンに由来する非特異的な細胞毒性が抑制されることも明らかになった。また、WEWT ペプチド導入量と細胞死誘導能に相関があることも見出された。この結果は、PIC 膜内の残存アミノ基量が細胞吸着能に相関したためと考えられた。以上のことから、使用目的に応じて PIC 膜内の化学特性を最適化する必要があることが示唆された。ペプチド修飾と並行して、膜物性の制御を目指して PIC 膜内のシリカハイブリッド化を検討した。架橋度を制御した人工エクソソームにおいて、PIC 膜内の選択的シリカハイブリッド化が可能であり、また PIC 膜内の残存アミノ基の量がシリカ集積量に相関することが確認された。

以上の技術を用いることで、*in vivo* における人工エクソソームの生理活性、安定性、および物質透過性が制御され、天然にはない高次機能を集積した人工エクソソームの創出が可能になるものと期待される。

<引用文献>

1. Y. Anraku, A. Kishimura, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Living unimodal growth of polyion complex

- vesicles via two-dimensional supramolecular polymerization. *J. Am. Chem. Soc.* 135, 1423–1429 (2013).
2. B. S. Kim, S. Chuanoi, T. Suma, Y. Anraku, K. Hayashi, M. Naito, H. J. Kim, I. C. Kwon, K. Miyata, A. Kishimura, K. Kataoka, Self-assembly of siRNA/PEG-b-cationomer at integer molar ratio into 100 nm-sized vesicular polyion complexes (siRNAsomes) for RNAi and codelivery of cargo macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 141, 3699–3709 (2019).

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kim Beob Soo, Chuanoi Sayan, Suma Tomoya, Anraku Yasutaka, Hayashi Kotaro, Naito Mitsuru, Kim Hyun Jin, Kwon Ick Chan, Miyata Kanjiro, Kishimura Akihiro, Kataoka Kazunori	4. 巻 141
2. 論文標題 Self-Assembly of siRNA/PEG-b-Cationer at Integer Molar Ratio into 100 nm-Sized Vesicular Polyion Complexes (siRNAsomes) for RNAi and Codelivery of Cargo Macromolecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 3699 ~ 3709
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.8b13641	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 該当する

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件/うち国際学会 6件）

1. 発表者名 MengJu Chan, Kanjiro Miyata, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Akihiro Kishimura
2. 発表標題 Facile Fabrication of Silica-Hybrid Polyion Complex Nano-Vesicles and Its Function Enhancement
3. 学会等名 the 18th Asian Chemical Congres（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 B. S. Kim, A. Kishimura, K. Kataoka, K. Miyata
2. 発表標題 ASOsome: a Polyion complex vesicle possessing antisense oligonucleotides (ASO)-intercalated membrane
3. 学会等名 The 16th Pacific Polymer Conference（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 チャン メンル、宮田完二郎、森健、片山佳樹、岸村顕広
2. 発表標題 Development of amino-group-promoted silica hybrid based on polyion complex nano-vesicles for function enhancement
3. 学会等名 第29回日本MRS年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田完二郎
2. 発表標題 高分子材料の精密設計による核酸デリバリー
3. 学会等名 第14回ナノ・バイオメディカル学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fadlina Aulia, 松葉弘顕、中瀬生彦、森 健、岸村顕広、片山佳樹
2. 発表標題 Control of cellular uptake behavior based on tuning of structure and physical properties of PEGylated polyion complex and its application
3. 学会等名 Okinawa Colloids (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田完二郎
2. 発表標題 高分子材料を用いたドラッグデリバリーのこれまでとこれから
3. 学会等名 第34回高分子学会関東支部茨城地区 若手の会交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田完二郎, キムボブス, 内藤瑞, キムヒョンジン, 片岡一則, 岸村顕広
2. 発表標題 アンチセンス核酸を膜成分とするベシクル型ポリイオンコンプレックス(ASOsome)の構築とデリバリーへの展開
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 詹孟儒, 岸村顕広, 森健, 片山佳樹, 宮田完二郎
2. 発表標題 Development of silica hybrid polyion complex nanocarrier for functional enrichment
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮田完二郎, キムボブス, 内藤瑞, キムヒョンジン, 片岡一則, 岸村顕広
2. 発表標題 Fabrication of vesicular polyion complexes comprising oligonucleotide-intercalated membrane for enhanced oligonucleotide delivery
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Miyata, B. S. Kim, S. Chuanoi, M. Naito, H. J. Kim, A. Kishimura, K. Kataoka
2. 発表標題 Fabrication of vesicular polyion complexes comprising oligonucleotides as a membrane component
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Miyata, B. S. Kim, S. Chuanoi, Y. Anraku, M. Naito, H. J. Kim, A. Kishimura, K. Kataoka
2. 発表標題 siRNAsomes: a vesicular polyion complex comprising siRNA-intercalated membrane for high loading and efficient delivery of siRNA
3. 学会等名 19th Symposium for Gene and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 B. S. Kim, S. Chuanoi, Y. Anraku, K. Miyata, A. Kishimura, K. Kataoka
2. 発表標題 siRNAsome: A self-assembled vesicular architecture formed from siRNAs and PEGylated block cationers
3. 学会等名 6th International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 B. S. Kim, K. Miyata, A. Kishimura, K. Kataoka
2. 発表標題 Vesicular self-assemblies from siRNAs and PEGylated block cationers (siRNAsomes): Their structural, physicochemical, and biological characteristics
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮田完二郎, キム ボプス, チュアノイ サヤン, 須磨知也, 安楽泰孝, 内藤瑞, キム ヒョンジン, 岸村顕広, 片岡一則
2. 発表標題 siRNAを膜成分として含有するベシクル型ポリイオンコンプレックス(siRNAsome)の構築とsiRNAデリバリーへの展開
3. 学会等名 第40回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>宮田研ホームページ http://www.bmm.t.u-tokyo.ac.jp</p>

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	岸村 顕広 (Kishimura Akihiro) (70422326)	九州大学・工学研究院・准教授 (17102)	
連携 研究者	内田 智士 (Uchida Satoshi) (20710726)	東京大学・大学院工学系研究科・特任助教 (12601)	