

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04533

研究課題名(和文)天然ステルスエクソソームの解析とデリバリーキャリア開発への応用

研究課題名(英文) Analysis of naturally stealth exosome and its application as drug delivery carrier

研究代表者

高橋 有己 (Takahashi, Yuki)

京都大学・薬学研究科・准教授

研究者番号：00547870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは細胞から放出される粒子径100nm前後の膜小胞であり、その内包物を受け取り細胞に送達する細胞間の物質輸送担体である。エクソソームは一般にはマクロファージに取り込まれやすいが、中には取り込まれにくいエクソソームがいるのではないかと考え本研究を実施した。その結果、ホスファチジルセリンが少ないエクソソームが、マクロファージに取り込まれにくいことを見出した。このようなエクソソームは生体内で未知の作用を有する可能性が存在するとともに、このような特性を有するエクソソームは薬物のキャリアともなりえることから、有用である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームは生体内で様々な物質の細胞間輸送を媒介することで、種々の生理機能を発揮している。従って、マクロファージに取り込まれにくいという、一般のエクソソームとは異なる特性を有する本研究で見出したエクソソームは、従来のエクソソームとは異なる細胞を標的とする可能性が高いことから、未知の機能解明に資する重要な発見である。また、薬物のキャリアとしてエクソソームを利用するに際しても、有用な特性となりえることから、その重要性は高い。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are membrane vesicles of about 100 nm in diameter that are released from cells and are intercellular delivery carriers that deliver their contents to recipient cells. Exosomes are generally taken up by macrophages, but we hypothesized that some exosomes may not be easily taken up by macrophages. We found that exosomes low in phosphatidylserine contents are less likely to be taken up by macrophages. Such exosomes may have unknown effects in vivo and may be useful as carriers of drugs.

研究分野：生物薬剤学

キーワード：細胞外小胞 エクソソーム ホスファチジルセリン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エキソソーム(あるいはエクソソーム)は、ほぼすべての細胞から分泌される脂質二重膜により形成された細胞外小胞である。エキソソームは、核酸やタンパク質といった内包物質を取込み細胞へと送達する細胞間物質輸送担体であり、エキソソームを介した生命現象の解明を目的とした研究が盛んに行われている。また、天然の輸送担体であるエキソソームを利用したデリバリーキャリアの開発も期待される。

これまでに、エキソソームの機能解明あるいはこれを利用したデリバリーキャリアの開発を目的として、体外から体内へと投与されたエキソソームの体内動態が解析されてきた。その結果、静脈内に投与されたエキソソームは主にマクロファージに取り込まれ、速やかに消失することが、研究代表者らをはじめとした多数の研究グループから報告されている。エキソソームを介した生命現象については数多く報告されているが、エキソソームを取り込んだマクロファージに関する報告が多い。これは、これまでに種々の細胞から回収されてきたエキソソームのマクロファージに取り込まれやすいという性質を反映しての結果と考えられる。このような状況から、エキソソームを利用したデリバリーキャリアの開発においても、マクロファージあるいは類似の貪食細胞である樹状細胞を標的とした治療戦略やデリバリーキャリアの開発、すなわちワクチン療法や抗炎症療法の開発が先行している状況である。

これまでのエキソソーム研究において、エキソソームの特徴の一つとして、負の表面電荷を帯びていることが挙げられて来た。これは、エキソソーム表面にはホスファチジルセリン(PS)のような負電荷リン脂質をはじめとした負電荷の分子が存在するためである。この特性を利用して、PSを認識するタンパク質を利用した、高純度エキソソーム回収法が開発されるに至っている。また、研究代表者らをはじめとした研究グループにより、培養細胞から回収したエキソソーム表面の主にPSに由来した負電荷がマクロファージにより認識されるためにマクロファージに取り込まれやすいということが示されている。一方で、近年ではエキソソームと一言に言っても、実は多種多様なヘテロな粒子からなる集団であることが示されている。そこで、本研究では、エキソソームの中には、負電荷が少ない等の要因により、マクロファージには認識されにくいエキソソーム画分も存在しうると考えた。このようなエキソソーム画分を同定し、詳しく解析することができれば、エキソソームの生理機能の解明に重要な知見となりうる。加えて、同定した画分優れた動態特性を有することから、有用なデリバリーキャリアの開発にもつながるものと期待できる。

### 2. 研究の目的

以上のような背景より、マクロファージに認識されにくいエキソソームを探索・同定するとともに、そのようなエキソソームのどのような性質を明らかにすることを目指した。加えて、このようなエキソソームを利用したデリバリーキャリアの開発はを目指した。

### 3. 研究の方法

#### 培養細胞由来からのエキソソーム回収と解析

細胞の培養上清から超遠心法で総エキソソームを回収した。回収した総エキソソームのうち、負電荷が強いものほどマクロファージに認識されやすいと考えられた。エキソソーム移行性タンパク質 Lamp2c と発光性レポータータンパク質 Gaussia luciferase (gLuc) の融合タンパク質、gLuc-Lamp で標識した総エキソソームを、エキソソーム回収キットとして市販されている PS 結合タンパク質 Tim4 被覆磁気ビーズとインキュベートすることにより、PS を含有した PS (+) エキソソームを除去した PS 非含有 (-) エキソソームを回収した。別途、負電荷に応じたエキソソームの選別を目的として、陰イオン交換クロマトグラフィーによって、総エキソソームを分画した。

回収したエキソソームについて、粒子径・表面電荷等の粒子特性を動的光散乱法、qNano、電子顕微鏡等の方法により評価した。さらに、貪食細胞あるいは非貪食細胞による取込みを、蛍光標識したエキソソームを用いて顕微鏡観察および FACS 法により評価した。さらに、マーカータンパク質について、ウェスタンブロットティング法により評価した。gLuc 標識したエキソソームを用いて、マウスに投与後の体内動態特性についても検討した。

#### In vivo 個体レベルでの解析

肝臓への高効率遺伝子導入法であるハイドロダイナミクス法により Lamp2c-gLuc を遺伝子導入したマウスの血中からエキソソームを回収した。このエキソソームは、血中の総エキソソームを含むが、標識されているのは肝臓より放出されたエキソソームのみである。このようなエキソソームをマウスに投与後の血中滞留性を評価した。別途、クロドロネート封入リポソームを用いて全身のマクロファージを除去したマウスに対して、上記の方法により遺伝子導入することによって、肝臓由来エキソソームを特異的に標識したマウスにおいて、血中に存在する肝臓由来エキソソームを評価し、血中におけるエキソソームの存在状態に対してマクロファージの関与について評価した。その後、血中に存在するエキソソームを、gLuc-Lamp 遺伝子導入マウスから gLuc 抗体免疫沈降により回収し、と同様の検討を行いその特性を解明する。

別途、培養細胞での検討と In vivo 個体実験での検討との相関性、変化について詳細に明らか

とすることを目的として、Lamp2c-gLuc 安定発現がん細胞を構築し、これを移植したマウスの血中から gLuc を目印として回収したエキソソームと培養がん細胞から回収したエキソソームとを比較し、In vivo におけるエキソソームの選別過程を評価した。この検討を通じて、培養細胞から回収したサンプルを用いた実験単独では困難な、血中におけるエキソソームのダイナミックな挙動を解析した。

#### デリバリーキャリアの開発

上記の解析で見出したエキソソームについて、そのデリバリーキャリアとしての応用の可能性を明らかとするために、回収した血中滞留性の高いエキソソームへの薬物搭載の可能性について検証した。モデル薬物として、抗がん剤であるドキソルビシンならびにクルクミンを選択し、その搭載効率を評価した。

## 4. 研究成果

### 培養細胞からの PS(-)エキソソームの回収

モデル細胞として選択したマウスメラノーマ細胞 B16BL6 細胞から回収した総エキソソームについて、Tim4 被覆ビーズを用いて PS の露出の有無に応じてエキソソームを選別したところ、総エキソソーム中の 5%前後が、PS を露出していない PS(-)エキソソームであった。このエキソソームの物性を評価したところ、粒子径は総エキソソームと同程度の 100nm であった。一方で、負電荷リン脂質である PS の露出が無いことを反映してか、PS(-)エキソソームの表面電荷は、総エキソソームと比較してより中性に近い弱い負電荷を有していた。一方で、そのエキソソームの構成タンパク質についてプロテオミクス解析により評価したところ、エキソソームのマーカータンパク質として知られる CD63 や Lamp2、HSP70 といったタンパク質の発現レベルについては、元の総エキソソームと比較するとほとんど変化していなかった。一方で、生体内において PS 結合タンパク質として知られている、Annexin や Lactadherin といったタンパク質の発現レベルは、PS(-)エキソソームにおいて総エキソソームと比較して大幅に低下していたが、これは PS を露出していないという特性に由来したものと考えられた。さらに、この PS(-)エキソソームをマウス静脈内投与後の血中滞留性について評価したところ、PS(-)エキソソームは総エキソソームと比較して 10 倍以上高い血中滞留性を示すことが明らかとなった。

続いて、PS(-)エキソソームの存在の一般性について検証することを目的として、B16BL6 細胞に加えて、マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 細胞、マウス繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞、マウス結腸がん細胞株 colon26 細胞、マウス樹状細胞株 DC2.4 細胞、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 細胞から総エキソソームを回収後、Tim4 被覆ビーズにて選別を行ったところ、いずれの細胞から回収した総エキソソームからも、PS(-)エキソソームの回収が可能であった。続けて、他の方法による PS(-)エキソソームの回収の可能性について検証するために、B16BL6 細胞から回収した、総エキソソームを陰イオン交換クロマトグラフィーにより選別した。その結果、負電荷が弱い画分が溶出される直溶出画分として、添加した総エキソソームの薬 5%前後のエキソソームが溶出された。続けて、このエキソソームの物性を評価したところ、粒子径についてはもとと変化していない一方で、弱い負電荷を有していた。またこの画分のエキソソームはほとんど PS を露出していなかった。さらに陰イオン交換クロマトグラフィーにより回収した、PS を露出していないエキソソームは、Tim4 で回収したエキソソームと同様に高い血中滞留性を示した。

### In vivo における PS(-)エキソソームの評価

肝臓への高効率遺伝子導入法であるハイドロダイナミクス法により Lamp2c-gLuc を遺伝子導入したマウスの血中から総エキソソームを回収した。この総エキソソームから、肝細胞由来エキソソームを抗 gLuc 抗体を用いた免疫沈降により回収したところ、PS をほとんど露出していなかった、同様の遺伝子導入を行ったマウスから回収した初代培養肝細胞から回収したエキソソームは PS を豊富に含有していたことから考えると、In vivo の環境においては、PS を持たないエキソソームが少量と PS を持つエキソソームが多量に放出されるが、マクロファージによって PS を持つエキソソームが優先的に処理されるために、血中に残存するエキソソームとしては、PS を持たないエキソソームがメジャーなエキソソームとなるのではないかと考えられた。そこで、遺伝子導入を行ったマウスの血中から回収した肝細胞由来エキソソームを別のマウスに投与後の血中滞留性を評価したところ、非常に高い血中滞留性を示したことからこの仮説は指示された。そこで、マクロファージによる選別によって、血中においては肝細胞由来エキソソームとしては、PS を持たないエキソソームがメジャーなポピュレーションとなるという仮説を検証するために、上記の遺伝子導入を行ったマウスに対してマクロファージ除去剤であるクロドロネート封入リポソームを投与し、そのマウスの血中から肝細胞由来エキソソームを回収し解析を行った。その結果、マクロファージを除去したマウスの血中においては、肝細胞由来エキソソームとしても、PS を有するエキソソームがメジャーなエキソソームとなっていた。この結果は、In vivo においては、マクロファージによる選別によって、存在するエキソソームのフェノタイプが変化することを示す結果と考えられた。

そこで、さらに汎用性ととも培養細胞での検討と In vivo 個体実験での検討との相関性、変化について詳細に明らかとすることを目的として、Lamp2c-gLuc 安定発現がん細胞を構築し、これを移植したマウスの血中から gLuc を目印として回収したエキソソームと培養がん細胞から回収したエキソソームとを比較した。その結果、培養細胞から回収した総エキソソームは、PS を

有するエクソソームが総エクソソームの中の 9 割前後を占めることが明らかとなった一方で、このがん細胞を移植した担がんマウスの血中に存在するがん細胞由来エクソソームは、その 9 割以上が PS を持たないエクソソームであることが明らかとなった。この結果からも、In vivo においては、マクロファージをはじめとした他の細胞による影響によってエクソソームの存在比率などが変化することが明らかとなった。

#### デリバリーキャリアの開発

上記の解析で見出した PS を持たないエクソソームのデリバリーキャリアとしての応用の可能性を明らかとするために、回収した血中滞留性の高いエクソソームへの薬物搭載の可能性について検証した。モデル薬物として、抗がん剤であるドキソルビシンならびにクルクミンを選択し、その搭載効率を評価した。その結果、搭載効率は高くないものの、ドキソルビシンならびにクルクミンを搭載可能であった。一方で、治療効果が期待できる量の上記薬物を搭載した PS(-)エクソソームを得るのは、困難であることが明らかとなった。この結果からは、PS(-)エクソソームを用いたデリバリーキャリアの開発のためには生産性の改善が必須であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kobayashi Y, Kitamura S, Takahashi Y, Takakura Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of enzymatic depletion methods for preparation of small extracellular vesicles with long blood-circulation half-life.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharm Res	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11095-022-03405-9	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, Takahashi Yuki, Ogata Kosuke, Kitamura Shimpei, Nakagawa Naoki, Yamamoto Aki, Ishihama Yasushi, Takakura Yoshinobu	4. 巻 24
2. 論文標題 Phosphatidylserine-deficient small extracellular vesicle is a major somatic cell-derived sEV subpopulation in blood	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102839 ~ 102839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2021.102839	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuki Kobayashi, Momoko Naiki, Ayane Yabuta Yuki Takahashi, Yoshinobu Takakura.
2. 発表標題 Investigation of in vivo behavior of extracellular vesicles with different sizes after intraduodenal administration
3. 学会等名 Globalization of Pharmaceutics Education Network 2022 (GPEN2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋有己
2. 発表標題 体内動態情報を基盤とした細胞外小胞の多様性の解析と治療応用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長期血中滞留性を示す細胞外小胞のマウス血漿からの分画とその体内動態解析
2. 発表標題 北村慎平、松本明宏、高橋有己、高倉喜信
3. 学会等名 日本薬学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋有己
2. 発表標題 エクソソームを利用した免疫療法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋有己、松本明宏、北村慎平、高倉喜信
2. 発表標題 マウス血漿中において長期血中滞留性を示す細胞外小胞の発見とその体内動態解析
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021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	高倉 喜信  (Takakura Yoshinobu)  (30171432)	京都大学・薬学研究科・教授    (14301)	

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	小形 公亮  (Ogata Kosuke)  (80866781)	京都大学・薬学研究科・助教     (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