#### 研究成果報告書 科学研究費助成事業

E

今和 6 年 5 月 7 日現在 機関番号: 12605 研究種目: 若手研究 研究期間: 2022~2023 課題番号: 22K14568 研究課題名(和文)マイクロデバイスを用いた生体内微粒子ミメティクスの物性制御とナノ医薬設計への展開 研究課題名(英文)Microfluidic devices for production of extracellular vesicles inspired nanoparticles 研究代表者 木村 笑(Kimura, Niko) 東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・講師 研究者番号:80910926

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3.600.000円

研究成果の概要(和文):細胞が分泌する脂質を主成分とするナノ粒子のエクソソームを模倣したナノ粒子は、 生体内の微粒子の体内動態解明や創薬研究へ応用できる。また、ナノ粒子の粒径・粒子内外の搭載分子・粒子の 力学特性を自在にカスタマイズして設計する手法を確立することで、ナノ粒子を介した分子送達過程を制御する ことができると考えられる。本研究では、マイクロ流路内部で、脂質ナノ粒子を粒径制御して作製する手法をも とに、粒径・粒子内部および表面への分子搭載を自在にカスタマイズして人工エクソソームを作製できるマイク ロ流体デバイスを利用した人工エクソソーム作製手法の創成に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義 本研究成果により、所望の物理特性をもつ多種多様のエクソソーム模倣粒子の調製が可能になる。これにより、 従来の人工合成脂質を主成分とする脂質ナノ粒子よりも実際のエクソソームに近い条件で、粒子としての特性 (粒子物性)が体内動態へ与える影響を粒子物性を基軸に評価することができるようになる。本研究成果による 人工エクソソームの作製手法および、作製粒子によって得られた基礎的知見は、エクソソームが持つ高い生体適 合性や選択的蓄積特性をもつような新規ナノ医薬品の設計・作製に貢献し得ると考える。

研究成果の概要(英文): Exosomes are nano-meter sized extracellular vesicles mainly composed of natural lipids and they mediate complicated intercellular communication in our bodies. They are expected to provide fundamental biological insights and designs of novel nanomedicines. On exosomes surface, there are various biological molecules such as proteins, and inside exosome, there are also biological molecules such as nucleic acids. Referring to recent research relating exsomes, not only biological molecules such as integrins but also their physical characteristics such as size and stiffness are considered as key factors in their unique behaviors in our bodies. In terms of designing of effective nanocarriers, physical characteristics of nanoparticles such as size and stiffness are also important design parameters to achieve desired drug delivery. In this study, microfluidic methods are demonstrated to produce exosome inspired nanoparticles based on natural lipids with desired size and stiffness.

研究分野:ナノバイオサイエンス

キーワード: 脂質ナノ粒子 マイクロ流体デバイス エクソソーム 物理特性

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

昨今の RNA ワクチンを代表に、薬剤を内包した脂質ナノ粒子は世界中で臨床応用が進んでいる ナノ医薬品である。また、内因性脂質ナノ粒子のエクソソームへ薬剤導入した製剤も次世代のナ ノ医薬として注目されている(1)。エクソソームは細胞間の情報伝達や癌転移など幅広い生命現 象に関与し、その挙動を利用した高度な細胞標的型の製剤開発が期待できる。一方で、生体中の エクソソームの粒径・搭載物・力学特性等の粒子特性は多様性に富み、抽出方法による物性変化 も生じる(2)。ナノ粒子の粒子特性は体内動態へ影響を与えるため(3)、エクソソーム製剤にお いても粒子特性に基づく詳細な解析・設計が望まれる。しかし、生体由来の微粒子に対して粒子 特性に基づく挙動解析と製剤設計を行うことは困難である。解決策の一つとしてエクソソーム 模倣粒子(人工エクソソーム)の利用が注目されているが、粒子特性を制御できる人工エクソソ ームの作製方法は未だ確立されていない。

申請者はこれまでに、エタノールに脂質を溶解させた脂質溶液と緩衝液を導入するだけで脂 質ナノ粒子の粒径・組成・分子搭載を自在に制御できるマイクロ流体デバイスを開発してきた (4)。さらに、開発デバイスの精密な流体挙動制御によって、3種類の天然のエクソソームの脂 質組成と同様の脂質組成を持つ RNA 搭載粒子を 40–200 nm で粒径制御して作製することに成功 し、作製粒子の粒径と組成の違いが、細胞内挙動へ影響を与えることを報告した(5,6)。最近に なり、申請者は同一の粒径と組成を持つ模倣粒子間に、内包物の有無による細胞内挙動の違いを 見出した(7)。本結果は、エクソソームの力学特性の違いが体内動態に関与している可能性を示 唆している。

脂質ナノ粒子による分子送達の制御には、①粒子表面への分子搭載と②力学特性(硬さ)を 制御する必要がある。天然のエクソソームの粒子表面には無数のタンパク質や糖鎖などが露出 しており、どの分子が薬剤キャリアとして機能する上でどのくらい重要であるのか?、を明らか にすることは非常に難しい。そこで、粒径、粒子内部および表面への分子搭載を自在にカスタマ イズして人工エクソソームを作製できるマイクロ流体デバイスの開発に取り組む。本研究によ って、粒子表面の機能と力学特性の両方を制御可能なナノ医薬品設計のプラットホームの構築 が期待される。

# 2. 研究の目的

本研究は、粒径、粒子内部および表面への分子搭載を自在にカスタマイズして人工エクソソーム を作製できるマイクロ流体デバイスの開発を目的とする。

#### 研究の方法

#### (1)人工エクソソームの作製

人工エクソソームの作製には、これまでに創成したマイクロ流体デバイスを利用した脂質ナノ 粒子作製方法(マイクロ流路法)を利用した(4-7)。本手法では、マイクロ流路内部へ脂質を溶 解させたエタノール溶液(脂質溶液)と搭載分子を含む緩衝液を別の流入口から導入し、出口か ら粒子の状態で回収する。流路内部へ導入された脂質分子は、緩衝液の導入により水和が進むこ とで分子同士が集合して最終的に粒子を形成する、自己組織化を利用している。本研究では、エ クソソームと同様の物理特性を有する模倣粒子作製のため、粒径は主に流量条件によって、かた さは核酸分子の内包によって制御した。モデルエクソソームには、Jurkat 細胞由来のエクソソー ム(7)を用い、脂質には主に 2,3-Dioleoyl-glycero-1-phosphocholine (DOPC)、1,2-Dioleoyl-snglycero-3-phosphoethanolamine (DOPE)、コレステロール、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'rac-glycerol) (DOPG)、スフィンゴミエリン、の5種類を用いた。また、実際のエクソソーム のように粒子表面に生体分子を修飾するために、モデル生体分子としてエクソソームの主要検 出マーカーである CD63 を用い、(i)粒子生成後の CD63 修飾、および(ii)粒子生成時の CD63 修飾 の大きく2種類のプロセスを検討した。

## (2)作製粒子の評価

作製後の粒子の粒径は、動的光散乱法によって測定した。また、粒子濃度は、ナノ粒子トラッキング解析法によって測定した。粒子内部への核酸分子の搭載率の測定には、Ribogreen assay (4) を基に、microRNAの検出には RiboGreen<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific)を、dsDNAの検出には Picogreen<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific)を適用した。粒子へ搭載された CD63 量は、微量分光光度計を用いて測定した。

③細胞毒性評価

作製した粒子の細胞毒性評価には MTT アッセイを用いた。細胞は、Jurkat 細胞を用いた。

#### 4. 研究成果

(i) 脂質ナノ粒子作製後の CD63 の粒子への修飾検討

まず、事前にマイクロ流路法(5-7)によって平均粒径が~50 nm、~100 nm となるように制御・作 製した microRNA 内包脂質ナノ粒子を準備した。10 mM 脂質溶液と、10.6 μM microRNA および 13 mM 塩化カルシウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH8.0)をマイクロ流体デバイスへ導 入した。導入時の流量条件は、~100 nm の粒子作製時には、流入口を2 つ有するマイクロ流体 チップを使用し、脂質溶液と緩衝液の流量和(総流量)が 500 μL/min、脂質溶液の流量に対する 緩衝液の流量の比(流量比)が2 となる条件で導入した。一方で、~50 nm の粒子作製時は、3 つの流入口を有するマイクロ流体チップを用い、中心の流入口から 10 mM 脂質溶液を、両側の 流入口から 5.3 μM microRNA および 6.5 mM 塩化カルシウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)を、総流量が 500 μL/min、流量比が4 となるように導入した。マイクロ流体デバイス の流出口から回収した粒子懸濁液は、残留エタノールおよび余剰塩化カルシウムの除去のため に一晩 PBS を外液に透析した。作製した粒子の microRNA 搭載率はいずれのサイズの粒子にお いても 30-40%となった。

次に、粒子表面へ CD63 を搭載するために、透析後の粒子と 45 µg/µL CD63 を含む 10 mM HEPES (pH7.0) を体積比 1:4 となるように、バッチ (マイクロチューブ内でピペッティング) および流路内で混合した。流路内の混合には、粒子作製時に用いた 2 つの流入口を有するマイク ロ流体チップを用い、総流量 500 µL/min で導入して混合した。回収した混合液は、(a)すぐに非 搭載の CD63 を除去するために PBS を外液に一晩透析操作するプロセスと、(b)回収後に 24 時間 インキュベート (4℃) した後、非搭載の CD63 を除去するために PBS を外液に一晩透析するプロセスを実施した。(a)において、バッチおよび、マイクロ流路内混合のいずれのプロセスにおい ても粒径は事前に調製した粒子の平均粒径が概ね維持されていたが、CD63 の粒子への搭載率は、0.001%未満となった。(b)においては、バッチおよび、マイクロ流路内混合のいずれのプロセス においても事前調製時に~100 nm の平均粒径であった粒子は概ね粒径を維持できていたが、~50 nm の粒子は、CD63 との混合後にいずれのプロセスにおいても 0.006%程度となった。

本結果から、事前に調製した脂質ナノ粒子に対して CD63 を後処理プロセスで搭載する際に は、検討した混合条件においてオフデバイスおよびオンデバイスの溶液混合の均一性の違いに よる搭載効率への影響は小さく、長時間のインキュベーション操作は、搭載率を向上させるが、 100 nm 以下の小さな脂質ナノ粒子の場合は粒子同士の凝集も誘発してしまい、粒径を維持する ことが困難であることがわかった。

(ii) 脂質ナノ粒子生成時の CD63 の粒子への修飾検討

(i)で述べたように、100 nm 以下の小さな脂質ナノ粒子の粒径を維持したまま後処理操作によっ てCD63 を搭載することが困難であった。そこで、粒子生成と同時に CD63 を搭載する手法を検 討した。3 つの流入口を有するマイクロ流体チップ(8)を用いて、緩衝液に 20 µM microRNA およ び 26 mM 塩化カルシウムを含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0) と、90 µg/µL CD63 を含む 10 mM HEPES (pH7.0) の2種類の緩衝液を用いて粒子を作製し(図 1)、一晩の透析後に粒径お よび搭載率を測定した。作製粒子の平均粒径は、56±1.7 nm であり(図 2)、CD63 の搭載率は 0.2 ±0.001% (54±3.1 CD63 ng/1.2×10<sup>11</sup> particles) であった(図 3)。(i)で検討した手法と比較すると、 粒子生成時に同時に搭載を行う本手法であれば、CD63 非搭載粒子の際に検討した粒径を維持し たまま搭載できることがわかった。これは、粒子膜が不安定な状態で分子搭載を行い、しかしな がら、本手法による CD63 搭載人工エクソソームの作製時の CD63 搭載率および回収率は低く、 また、実際のエクソソームでは、多くの場合本研究で達成した搭載量よりも多くのタンパク質を 含む傾向にある。そのため、本研究で構築した粒子作製手法を基に、脂質-タンパク質濃度比の 検討、粒子作製用流路の表面修飾による非特異吸着の軽減等の工夫を施すことで、より汎用性の 高い人工エクソソーム作製方法を創成できると考える。

<引用文献>

- 1. T. Skotland et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2020
- 2. S. Sharma et al., Sci. Rep., 2020
- 3. H. Cabral et al., Nat. Nanotechnol., 2011
- 4. N. Kimura et al., ACS Omega, 2018
- 5. N. Kimura et al., ACS Applied Bio Materials, 2021
- 6. N. Kimura et al., Proc. MicroTAS 2021, 2021
- 7. N. Kimura *et al.*, *ACS Nano*, 2024
- 8. N. Kimura and S. Sakuma, Proc MEMS 2024, 2024





図1. (ii)の粒子作製プロセスで用いたマイクロ流体:







図3.作製した人工エクソソームに搭載されたCD63濃度

## 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	4.巻
Niko Kimura, Shinya Sakuma	-
2.論文標題	5 . 発行年
CYTOTRANSDUCERS VISUALIZE FUNCTIONS OF LIVING CELLS	2023年
3.雑誌名	6.最初と最後の頁
Proc. Transducers2023	-
掲載論文のD01(デジタルオブジェクト識別子)	査読の有無
	有
オープンアクセス	国際共著
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	-
	•

# 〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件) 1 . 発表者名

Niko Kimura, Shinya Sakuma

2.発表標題

CYTOTRANSDUCERS VISUALIZE FUNCTIONS OF LIVING CELLS

# 3 . 学会等名

THE 22ND INTERMATIOMAL CONFERENCE ON SOLID-STATE SENSORS. ACTUATORS AND MICROSYSTEMS (国際学会)

# 4 . 発表年

2023年

# 〔図書〕 計1件

1.著者名	4 . 発行年
木村笑、佐久間臣耶	2023年
2.出版社	5 . 総ページ数
ニュー・サイエンス社	3
3.書名 Medical Science Digest, - 最先端医療の今 - 人工エクソソームの物性制御が拓く脂質ナノ医薬の理解 と利活用	

#### 〔産業財産権〕

〔その他〕

\_

6.研究組織

氏名 所属研究機関・部局・職   (ローマ字氏名) (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