

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19384

研究課題名（和文）持続的な培地回収システムを用いた高機能エクソソームの探索と薬物送達への応用

研究課題名（英文）Exploration of highly functional exosomes using a continuous media recovery system and its application to drug delivery

研究代表者

小出 裕之（Koide, Hiroyuki）

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：60729177

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、細胞培養中に培地を持続的に送液、回収する装置を開発し、細胞から産生される細胞に取り込まれやすいエクソソームを回収し、その機能の解明を試みた。その結果、従来の方法である48時間の静置培養と比較して、培地を持続回収することで回収されるエクソソーム数が顕著に増加していた。さらに、そのエクソソームを細胞に添加し、細胞への取り込み量を比較したところ、従来の静置培養により回収したエクソソームと比較して、細胞への取り込み量が顕著に向上していた。以上より、培地を持続回収することで、これまでとは異なるエクソソームの回収が可能となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エクソソームが細胞間のコミュニケーションツールとして考えられていこう、今日までエクソソーム研究が盛んに行われてきた。しかし、これまでエクソソームは数日間の静置培養液をEV回収源としてきた。そのため、高い細胞取り込み能を示す機能的エクソソームを回収することは困難であり、これまでは主に細胞への取り込み能の低い非機能的エクソソームを回収し、解析してきた可能性が高い。そのため、本研究により回収した高機能のエクソソームの生物学的機能解析や膜タンパク質、核酸などの内封物質を解析することで、難治性疾患のメカニズムの解明を通じた新薬開発やバイオマーカー開発につながることから、学術的、社会的意義は高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a device that continuously pumps and collects medium during cell culture, and attempted to collect highly functional exosomes produced by cells because some exosomes are taken up by the cells after production, immediately. As a result, the number of exosomes was significantly increased by continuous collection of medium compared to the conventional method. Furthermore, when the exosomes were added to cells and the amount of cellular uptake was measured, the amount of cellular uptake of exosomes was markedly increased compared to the conventional exosomes. These results indicate that exosomes collected by the developed device contain highly functional exosomes. From these results, continuous recovery of the culture medium is one of the method for the collection of highly functional exosomes.

研究分野：薬物送達

キーワード：エクソソーム 薬物送達 がん

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 100 nm 前後の脂質二重膜小胞であり、核酸 (mRNA、miRNA) やタンパク質などが内包されている。エクソソームが近隣だけでなく遠隔の細胞に取り込まれることで内封物質を介して様々な情報伝達が行われている (Valadi H., et al., Nat Cell Biol., 9, 654., 2007)。近年、エクソソームとがん細胞の生存、悪性化、転移、アルツハイマー病、糖尿病など様々な疾患との関与が報告されており、miRNA を主とする内封物質や膜タンパク質の解析は、疾患の病因解明や治療薬開発に有益な情報を与える。さらに、エクソソームは生体由来で安全性の高い薬物送達キャリアとして期待されている。しかし、エクソソームの細胞への取り込み量とエンドーム脱出量は非常に少ない。そのため、エクソソームを用いた薬物送達の大きな課題となっている。インビトロでエクソソームを回収する方法としては、細胞を 48 時間“連続”培養し、その培地をカラムや超遠心法により精製する手法が主流である (図 1)。しかし申請者は、エクソソームが細胞間の情報伝達を担っていることから、細胞培養中に産生されたエクソソームの一部は培地中に長時間浮遊することなく、速やかに細胞に取り込まれることで細胞増殖速度や形態などを制御していると考察した。つまり、48 時間の“連続”培養後に得られたエクソソームは、ドナー細胞に不必要、取り込まれにくい、もしくは遠隔細胞にのみ取り込まれる性質であると考えられる。そのため、産生されたエクソソームが再び細胞に取り込まれる前に回収することができれば、細胞に取り込まれやすく、これまでとは機能だけでなく、核酸などの内封物質の種類や量 (比率) が異なるエクソソームが得られる可能性が高い。

2. 研究の目的

独自開発したシステムを用いてエクソソームを回収し、その機能を解析し、本システムにより回収したエクソソームの有用性を証明する。

3. 研究の方法

【エクソソームの回収】

細胞はヒト前立腺がん細胞である PC-3 に標識のために Nano-luciferase (N-luc) が遺伝子導入されたもの (PC-3 (N-luc)) を用いた。PC-3 (N-luc) 細胞を 150 mm ディッシュに 3.0×10^6 cells/dish なるように播種し、37°C、5% CO₂条件下で 24 時間培養した。その後 15 ml の PBS で 2 回洗浄し、1% exosome-depleted FBS (EDF) 含有培地を加え、37°C、5% CO₂ 条件下で 48 時間培養後の培養上清を回収した。装置回収は同様に 13 ml の 1% exosome-depleted FBS (EDF) 含有培地を加えた後に、培地交換システム (高砂工業株式会社) を設置し、流速 100 μ l/min となるように 1% EDF 含有培地を送液した。さらに、培養上清をフラスコにて 37°C、5%CO₂ 条件下で 24 時間回収した (Day1)。その後、フラスコを新しいものに交換し、24~48 時間回収した (Day2)。

回収した培養上清を 4°C、2,000 x g で 10 分間遠心した後、1 M トレハロースを最終濃度 25 mM となるように加えて、0.22 μ m フィルターで濾過滅菌した。その後、超遠心機 (GS120GXL、(株) 日立製作所) を用いて 4°C、100,000 x g で 70 分間超遠心分離を行い、上清を除去し、25 mM トレハロース含有 20 mM HEPES buffer を加えてボルテックスミキサーで 5 分間攪拌させた。再度 4°C、100,000 x g で 70 分間超遠心分離を行い、上清を除去したのちに 20 mM HEPES buffer を加えた。

【エクソソームの同定】

精製後のエクソソーム懸濁液を 4°C、100,000 x g で 70 分間超遠心分離を行い、上清を除去したのちに 1xSDS sample buffer を 50 μ l 加え、5 分間ボルテックスし、ブロックインキュベーターにて 96°C で 2 分間加熱処理したものを泳動サンプルとした。ゲルに泳動サンプル 30 μ l をアプライし、電気泳動を行った (泳動装置: NC-1070 型電源装置、日本エイドー(株))。転写後 PVDF 膜は、1% BSA in TTBS に浸して 37°C で 1 時間振盪させることでブロッキング処理を行った。溶液除去後、1% BSA in TTBS で希釈した一次抗体 (Anti-CD63 mouse monoclonal antibody) を添加し、4°C で一晩振盪させた。PVDF 膜を TTBS で 5 分間ずつ 2 回洗浄した後、1% BSA in TTBS で希釈した二次抗体 (HRP-linked sheep anti mouse IgG antibody) を添加し、室温で 1 時間反応させた。PBST で 5 分間ずつ 2 回洗浄した PVDF 膜に ImmunoStar® Zata (Solution A: Solution B=1: 1) を滴下し、5 分間遮光静置した後、LAS3000 mini (FUJIFILM) を用いて発光を観察した。

【エクソソームの細胞内取込み効率の検討】

PC-3 細胞を 24-well plate に 6.0×10^4 cells/well なるように播種し (n=3)、37°C、5%CO₂条件下で 24 時間培養した。その後 300 μ l の PBS で洗浄し、300 μ l の 1% EDF 含有培地を加え、粒子数が、 1.0×10^9 particles/well となるように各エクソソーム懸濁液を 50 μ l 添加した。その後、37°C、5%CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培地循環による影響のみをコントロールと比較するために Day1 と Day2 を混ぜて精製した Mix 群も用意した。

エクソソームを添加して培養した後、PBS で 2 回洗浄後、1% OG-Lysis buffer を 200 μ l 加えることで細胞を可溶化した。細胞溶解液を遠心 (5,000 x g, 10min, 4°C) した後、発光強度を測定した。

4. 研究成果

【エクソソームの同定】

ナノサイトで粒子径測定を行い、ウェスタンブロットによりエクソソームマーカータンパク質である CD63 (30~60 kDa) の検出を試みた。結果、回収した粒子の粒子径は 121.9±0.6 nm (Control)、121.3±0.4 nm (Day1)、124.9±1.2 nm (Day2)、121.6±0.8 nm (Mix)、であり、一般的なエクソソームの粒子径 (約 120 nm) と同じであった。

また、ウェスタンブロットでは連続培養だけでなく、培地循環装置により回収した粒子においても CD63 タンパク質の発現が確認された。CD63 は糖修飾タンパク質であるためブロードしたバンドとなる。粒子径とマーカータンパク質の結果より、培地循環装置により回収した粒子はエクソソームであることが示された。

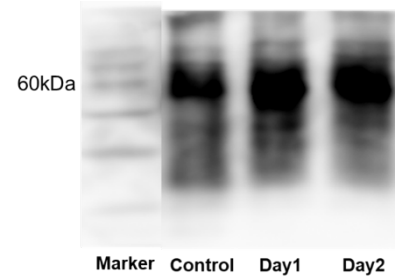


図 1. CD63 の発現量

【循環装置を用いることによる細胞への影響】

循環装置と連続培養それぞれで回収したエクソソームについて N-luc の発光値を測定することでエクソソームの産生量を比較した。結果、循環装置を用いることでエクソソーム産生量が約 1.8 倍になった(図 2A)。また、エクソソーム回収後の細胞数は装置回収により 20% 減少していた(図 2B)。エクソソームは細胞間で情報伝達し、増殖を制御しているため、培地循環によりシグナル伝達を担うエクソソームが回収され、増殖が阻害された結果であると考察している。

【細胞内取込み効率の評価】

回収したエクソソームの受容細胞への影響を評価するために、細胞にエクソソームを添加し、増殖度を評価したところ、装置回収エクソソーム添加群では連続培養回収エクソソームと比較し、増殖度が高くなった(図 2C)。最後に、回収した両エクソソームの性質の違いを明らかにするために、各エクソソームを PC-3 細胞に添加してから 24 時間後に細胞を溶解し、N-luc 由来の発光強度を測定することで細胞への取り込み率を算出した。その結果、連続培養により回収したエクソソームと比較し、装置回収したエクソソームは細胞内への取り込み量が顕著に増加した(図 2D)。

以上より、細胞培養中にエクソソームを持続的に回収することで、従来とは異なる性質のエクソソームが回収可能であることが示唆された。

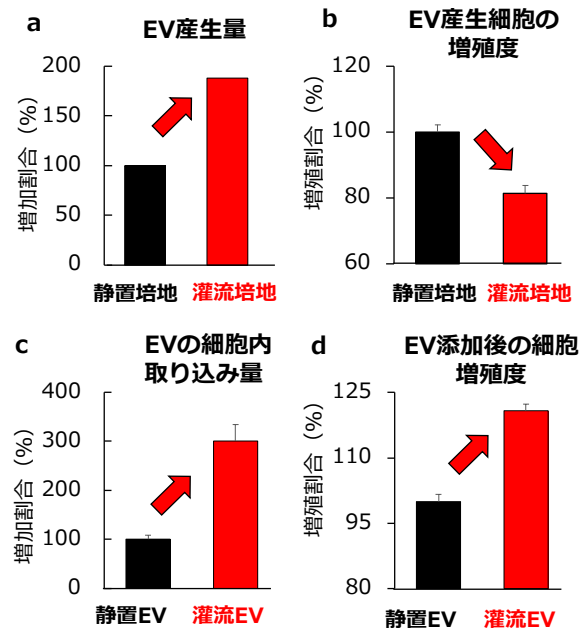


図 2. 循環装置を用いてエクソソームを回収することの利点

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Hashimoto Masahiro, Yonezawa Sei, Furan Song, Nitta Chiori, Maeda Noriyuki, Tomita Koji, Yokouchi Ayano, Koide Hiroyuki, Asai Tomohiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Increasing the siRNA knockdown efficiency of lipid nanoparticles by morphological transformation with the use of dihydrosphingomyelin as a helper lipid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	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） 10.1039/d3bm00068k	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 Asai Tomohiro, Yokota Masafumi, Isomura Hideki, Koide Hiroyuki, Sakurai Naoyuki, Okamoto Ayaka, Ando Hidenori, Dewa Takehisa, Oku Naoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Treatment of PTEN-Null Breast Cancer by a Synthetic Lethal Approach Involving PARP1 Gene Silencing	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmaceutical Sciences	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） 10.1016/j.xphs.2023.02.017	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 Koide Hiroyuki, Saito Kazuhiro, Yoshimatsu Keiichi, Chou Beverly, Hoshino Yu, Yonezawa Sei, Oku Naoto, Asai Tomohiro, Shea Kenneth J.	4. 巻 355
2. 論文標題 Cooling-induced, localized release of cytotoxic peptides from engineered polymer nanoparticles in living mice for cancer therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 745 ~ 759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jconrel.2023.02.020	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9件（うち招待講演 6件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小出 裕之	
2. 発表標題 消化管で標的分子を吸着するナノ掃除機の開発	
3. 学会等名 第2回BVAバイオインターフェース（招待講演）	
4. 発表年 2022年	

1. 発表者名 小出 裕之
2. 発表標題 生体内で標的分子を吸着する多官能性ナノ粒子製剤の開発と疾患治療への応用
3. 学会等名 日本薬学会第37年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小出 裕之、米澤 正、出羽 毅久、奥 直人、浅井 知浩
2. 発表標題 脂凍結融解技術を駆使した核酸・タンパク質送達方法の開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小出裕之、星野 友、奥 直人、浅井知浩
2. 発表標題 血液中で標的分子を中和するポリマーリガンド修飾リポソームの開発
3. 学会等名 第71回高分子討論会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小出 裕之
2. 発表標題 消化管で標的分子を吸着する機能性ナノ粒子開発
3. 学会等名 第27回創剤フォーラム若手研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小出 裕之
2. 発表標題 敗血症治療を可能とする合成高分子ナノ粒子開発
3. 学会等名 第17回ナノ・バイオメディカル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平田真也、小出裕之、落合広樹、鈴木ひかる、出羽毅久、奥 直人、浅井知浩
2. 発表標題 凍結融解による簡便なタンパク質内封リポソームの調製とタンパク質の細胞内送達への応用
3. 学会等名 日本薬剤学会第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口和馬、小出裕之、齊藤和弘、星野 友、奥 直人、浅井知浩
2. 発表標題 温度に応答して標的分子を吸着・放出する多官能性ナノ粒子の開発とがん治療への応用
3. 学会等名 遺伝子・デリバリー研究会第20回夏期セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安野 豪、小出裕之、米澤 正、浅井知浩
2. 発表標題 経口投与されたポリマーナノ粒子の体内動態に影響を与える因子の模索
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022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	奥 直人 (Oku Naoto) (10167322)	帝京大学・薬学部・教授 (32643)	
研究 分担者	疋田 智也 (Hikita Tomoya) (20600935)	愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍制御学分野・主任研究員 (83901)	

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