

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650626

研究課題名（和文） ヒト培養細胞分泌のエクソソームによるマイクロRNA 核酸医薬デリバリー法の開発

研究課題名（英文） Development of novel drug delivery system for microRNA nucleic biomedicine using exosome from human cultured cells

研究代表者

田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00271065

研究成果の概要（和文）：

エクソソームを可視化するための Cd44-GFP を発現した正常細胞、癌細胞株の樹立に成功し、それらから産生される GFP 可視化エクソソームの精製に成功した。それらを用いて、microRNA を他の細胞にデリバリーできることを確認した。これらのツールは、エクソソームを用いた DDS の基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have developed Cd44-GFP expressing cells including normal and cancer cell lines to visualized exosomes. We also purified CD44-GFP labeled exosomes form those cells. We confirmed that CD44-GFP labeled exosomes cargo microRNA by adding these exosomes to the other cells. These tools should be useful for exosome derived DDS technology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：エクソソーム、マイクロ RNA、ドラッグデリバリーシステム、がん

## 1. 研究開始当初の背景

miRNA は、ゲノムから転写される 20-25 塩基の非常に短い non-coding RNA の一つであり、動植物に広く存在し、細胞の発生、分化、増殖などの様々な生物現象に重要な役割を果たしている。転写後は、一部ギャップを持つ二本鎖 RNA で存在するが、成熟した miRNA は一本鎖で RISC と呼ばれる複合体と結合して、mRNA の翻訳や転写を阻害する。miRNA は、siRNA と異なり一つの miRNA で約 100 以上もの遺伝子の翻訳調節（翻訳阻害）や転写抑制を行うことができ、細胞内の遺伝子調節の新機構として近年世界中で注目されている(Nature 455, 64-67, 2008)。miRNA は、種々の疾患発症などに寄与しており、miRNA を利用した診断や治療が世界中の製薬会社、Alnylam 社を中心としたベンチャーで進んでいる。武田などの製薬会社が

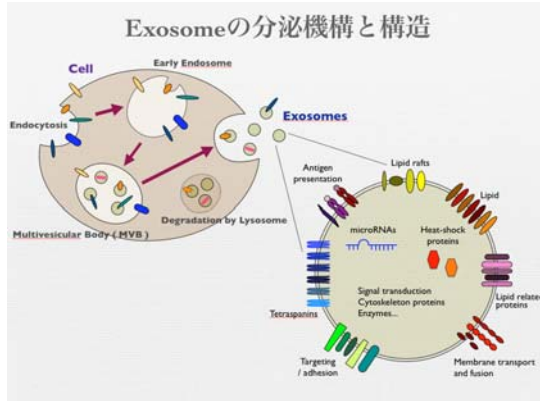
ライセンス契約を結んだことでもニュースになった。しかし、miRNA を臨床上用いる為には、miRNA デリバリーシステムの問題は全く解決されておらず、これらを打破するブレイクスルーが期待されている。

## 2. 研究の目的

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) は、次世代の天然型核酸医薬品として注目されている。しかし、siRNA の核酸医薬化でも問題となっているドラッグデリバリーシステム (DDS) の問題をクリアできないと十分な効果を示さないことが懸念されている。近年、マイクロ RNA は、脂質二重膜構造したエクソソーム(exosome)に包まれて、血清、母乳、唾液などの体液に分泌されていることが明らかになった。分泌された miRNA は、他の組織の細胞に取り込まれることからエ

エクソソーム構造が DDS のキーとなることが考えられる。

そこで、本研究では、細胞が作り出すエクソソームを利用した DDS システムを作ることで、次世代核酸医薬の DDS 問題を克服できる技術革新を目的として行う。



### 3. 研究の方法

エクソソーム研究において、エクソソームの精製方法は確立されておらず、エクソソーム学会などでも大きな議論となっている。そこで、本研究では、エクソソームの粒子径、エクソソームの分泌量、エクソソームのマーカの発現量などを検討し、エクソソーム研究に至適な精製方法を確立する。

また、miRNA の DDS の効率化を行うためには、まずエクソソームによる DDS の取り込み効率を評価できる評価系の構築が重要である。

そこで、分泌されるエクソソームを可視化する系の構築を目指す。具体的には、脂質特異的に結合する試薬 (PKH67 など) をエクソソーム精製後に添加して、エクソソームの脂質を可視化する。

さらに、エクソソームマーカの一つである CD67 の GFP 融合タンパク質を用いて、正常細胞やがん細胞に恒常的に発現させて、エクソソーム膜タンパク質の可視化を行う。そこからエクソソームを精製すれば、CD67-GFP を含むエクソソームを得ることができるため、エクソソームの動態を可視化することができる。つぎに、DDS の評価に用いる特異的な miRNA を細胞に導入して、それらが細胞外に蛍光で可視化されたエクソソームで分泌される系を構築する。

可視化したエクソソームを用いて、細胞選択性、臓器特異性が見いだせるかどうかを評価する。

最後に、臓器の特異性が見いだされたものは、マウスなどの動物を用いて in vivo で評価し、in vivo での有用性を実証する。

### 4. 研究成果

細胞が分泌するエクソソームを miRNA の DDS

として利用できる基盤を形成するために、

(1) 細胞が分泌するエクソソームを可視化できるシステムを構築する。

(2) 分泌エクソソームの細胞の取り込み選択性の有無を検証する。

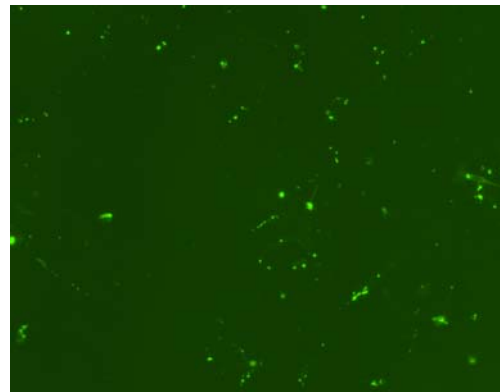
(3) 組織特異的 DDS を培養細胞、動物を用いて検証する (エクソソームの細胞の取り込み特異性が見いだされた場合)。

(4) miRNA が取り込まれているエクソソームの脂質構成を明らかにする。

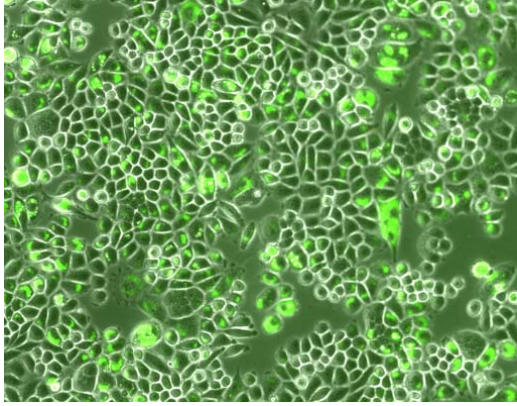
(5) 大量培養 DDS システム構築のための基盤形成を目標に研究を実施した。

(1) エクソソーム精製のための調整法の確立を行った。エクソソームは 50nm ほどの小粒子であることから、細胞のデブリ除去後に超遠心にて行う方法が主流で行われている。そこで、エクソソームマーカーを指標にウエスタン解析で、エクソソーム生成量を定量して、至適な条件を確立した。

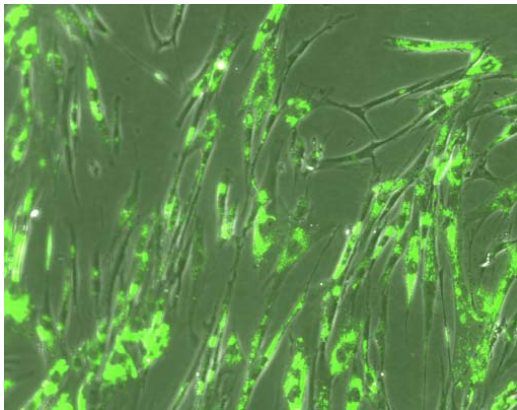
(2) 細胞が分泌するエクソソームを可視化に関しては、超遠心にて調整したエクソソームに PKH67 の脂質に親和性のある試薬を加えた場合に緑色の蛍光が見られることをもちいて、エクソソームのラベルをおこなった。未標識を超遠心で除去した後に、細胞に添加したところ高効率に細胞に取り込まれることが明らかになった (図 1)。



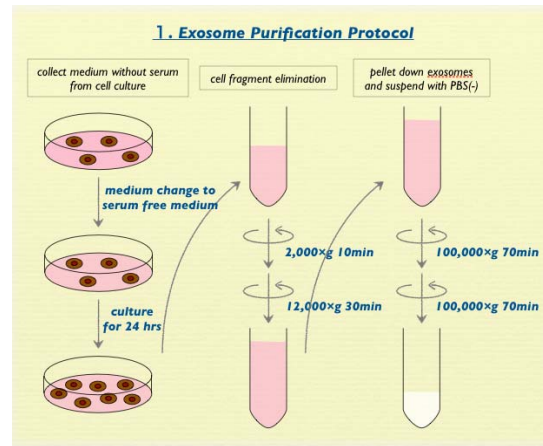
(3) CD63-GFP を恒常的に発現できる細胞を 6 種作成し成功し、それらの細胞から蛍光ラベルされたエクソソームが分泌されていることを確認した。がん細胞の HeLa 細胞では、非常に強い GFP を発現する細胞の樹立に成功した。また、この細胞から分泌するエクソソームを精製したところ、GFP を発現するエクソソームが精製できた。



- (4) 分泌エクソソームの細胞の取り込み選択制の有無の検証を実施したが、使用した正常細胞、癌細胞では効率に違いはあるものの選択性は見いだせなかったが、エクソソームにより miRNA が、他の細胞にデリバリーできることは明らかにできた。
- (5) miRNA が取り込まれているエクソソームの脂質構成に関しては、質量分析装置を用いた解析により細胞膜と同様の脂質構成であることがわかった。
- (6) 大量培養 DDS システム構築のための基盤形成に関しては、エクソソームの分泌が高い細胞を同定でき、これらを用いて恒常的に特定の miRNA を発現する細胞を構築し、高濃度のエクソソームを分泌できる細胞系を構築することができた。



さらに、エクソソームを超遠心機により高濃度に濃縮する系の確立ができた。これらの細胞系とエクソソーム濃縮系を用いて、大量培養装置の開発が行える大量培養 DDS の基盤形成を構築することができた。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① D. Xu, F. Takeshita, Y. Hino, S. Fukunaga, Y. Kudo, A. Tamaki, J. Matsunaga, R. Takahashi, T. Takata, A. Shimamoto, T. Ochiya, H. Tahara, miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence, *J. Cell Biology*, 査読有、193、2011、409-442
- ② Y. Matsumoto, T. Miyamoto, H. Sakamoto, H. Izumi, Y. Nakazawa, T. Ogi, H. Tahara, S. Oku, A. Hiramoto, T. Shiiki, Y. Fujisawa, H. Ohashi, Y. Sakemi, S. Matsuura, Two unrelated patients with MRE11A mutations and Nijmegen breakage syndrome-like severe microcephaly, *DNA Repair (Amst)*, 査読有、10、2011、314-321

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① Ayumi Nakamura, Nobuyoshi Kosaka, Aya Tamaki, Megumi Okada, Takahiro Ochiya, Hidetoshi Tahara, Senescent associated microRNAs analysis in exosomes, Exosome and Microvesicle, 2011.10.16, Orland, USA
- ② 中村亜由美、岡田恵、小坂展慶、落谷孝広、田原栄俊、MicroRNA profiling in senescent associated exosome, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011.12.14、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ③ 岡田恵、中村亜由美、小坂展慶、落谷孝広、田原栄俊、Visualization of senescence secreted exosome, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011.12.15、パシフィコ横浜(神奈川県)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 栄俊 (TAHARA HIDETOSHI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00271065

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

落谷 孝広 (Takahiro Ochiya)

独立行政法人国立がん研究センター・がん  
転移研究室・室長

研究者番号：60192530

黒田 雅彦 (Masahiko Kuroda)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251304