

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659157

研究課題名(和文)分泌膜小胞を用いたRNA医療の試行

研究課題名(英文)Trial of RNA medicine using secretory membrane vesicles

研究代表者

赤尾 幸博(Akao, Yukihiro)

岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・教授

研究者番号：00222505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNA干渉を利用したRNA医療を実現させるにはヌクレアーゼによる不活化から回避できる合併症のない薬物搬送システム(DDS)の確立が必須であり、近年リポソームやナノ分子ポリマーにRNAを包埋して試行されている。分泌膜小胞特異的に発現するマーカーCD81との抗原抗体反応により膜小胞単離システムの構築を確立し、またその過程においてトランスフェクション試薬の最適化に成功した。さらに担癌マウスでの全身投与における評価ができた。

研究成果の概要(英文)：Microvesicles (MVs) are possible vehicles for navigating RNA molecules to body tissues. Previously, we found that macrophages take up liposome-entrapped RNA molecules, some of which remain undegraded in the cells. Here, we demonstrate that transfected RNA molecules in human monocytic leukemia THP-1 cells were shed from THP-1 macrophages as contents in MVs during incubation in serum-free medium, which shedding was shown by biochemical analyses such as quantitative (q)RT-PCR, expression of CD63 and CD81 (a membrane-associated MV protein), and immuno-electron microscopic study. The MV/miR-143 was transferred into the cells and exhibited growth inhibition in human bladder cancer T-24 cells. We also estimated the efficiencies of transfection into the cells and release via MVs by use of transfection reagents. Furthermore, we devised the isolation method of MVs using magnet beads. Thus, we can establish the RNA molecule delivery system by the use of MVs in vitro.

研究分野： RNA創薬、 薬剤搬送システム、 核酸治療

キーワード： RNA創薬 薬剤搬送システム 分泌膜小胞 核酸治療

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬、とりわけ RNA 医薬の実現にはドッキングデリバリーシステム(DDS)の確立が必須である。この研究では患者の細胞を用いて細胞が分泌する膜小胞に目的の RNA 分子を包埋させ、より生理的で新規な RNA 医薬キャリアーを用いた治療法を試行する。

2. 研究の目的

研究目的は下記の事象を研究期間に明らかにすることである。

ex vivo において RNA 分子の細胞導入および膜小胞の分泌を促進させる方法の最適化と導入された RNA 分子の膜小胞分泌までの機序の解明

膜小胞包埋 RNA 分子の機能を in vivo において検証

膜小胞包埋 RNA 分子の分布臓器の選択性とその機序の解明

がん細胞が分泌する膜小胞のがん特異的表面抗原の同定

3. 研究の方法

[1] 細胞の培養

ヒト単核球白血病細胞 THP-1、ヒト膀胱癌細胞 T-24 は当研究室で培養したものを使用した。10%FBS を含む RPMI-1640 培地中、37 °C、5%CO₂ の条件下で培養し、維持した。

[2] トランスフェクション

前日に $1-2 \times 10^5$ /ml に調整した THP-1、5ml に対し、100 μ l の OPTI-MEM と 5'末端に蛍光色素である cy5.5、3'末端に benzene-pyridine を化学修飾した RNA 分子(miR-143BPs)、そして非修飾の miRNA を Control としそれぞれ 25 μ l をトランスフェクションした。この際、7.5 μ l の Lipofectamine RNAiMAX Reagent、25 μ l の G1(飽和型)、U2-G1(不飽和型)を試薬として用い、同時に 1 μ l の 160 μ M TPA を加えることで分化誘導を引き起こした。

[3] 超遠心による分泌膜小胞の収集

トランスフェクション後 24 時間培養し、培養液を無血清培地に変えて 20 時間培養し、分泌膜小胞を含む上清を、100,000rpm、4 °C、3h の超遠心により回収した。

[4] ExoMir (RNA 抽出)

20 時間後の無血清培地を 1500rpm、3min 遠心、上清を 0.45 μ m filter に通した後、さらに 0.22 μ m(top)、0.02 μ m(bottom) filter を通した。それぞれの filter に 1ml の BiooPure-MP を加え、タンパク除去した後、Chloroform 200 μ l を加え 12,000rpm、15min 遠心分離後、上清を回収した。3 μ l の共沈剤を加え攪拌し 5 分静置した後 600 μ l の Isopropanol を加え -20 °C 下で一晩放置した。12,000rpm、15min 遠心後、上清を除去し 900 μ l 75% ethanol を加え再び 12,000rpm、15min 遠心、上清を除去した後に濃度調整を行った。

[5] ビーズと抗体の固相化、分泌膜小胞の単離

500 μ l の NaOH と当量の磁性ビーズ

(CWM22-04-WS, CWM22-05-WS)を 10min 攪拌し invitrogen bead separations 単離(以下単離と略)した後、再び 500 μ l の NaOH を加え攪拌、単離した。そして 500 μ l の冷イオン交換水を加え 5min 攪拌、単離を 3 回繰り返す、その後 100 μ l の carbodiimide methyl-p-toluensulfonate(CMC)を加え室温にて 30min 持続的に攪拌した。そして単離し 500 μ l の冷イオン交換水を加え攪拌、単離した後 500 μ l の 100mM MES pH5 を加え攪拌、単離した。そこに 90 μ l の 50mM MES に 10 μ l の抗 CD81 抗体を加えたものを加えた。室温にて 30min 持続的に攪拌した後、PBS にて洗浄し 100 μ l を分泌膜小胞に加え 60min 持続的に攪拌、単離し PBS にて 3 回洗浄した。

[6] Western blot

10 \times blotting buffer を 10 倍希釈し泳動槽に流し込んだ後、gel をセットし 6 μ g ずつ各 well に流し込んだ後電気泳動を開始した。この間、Membrane をカットし MeOH で 3min 振とうし miliQ でさらに 5min 振とうした。Thick blot paper もカットし 1 \times blotting buffer で振とうした。泳動後、gel をカットし blotting buffer で 5min 振とうし、Thick blot paper, membrane, gel, Thick blot paper の順にセットし Blotting を行った。

4. 研究成果

[1] miRNA の化学修飾によるトランスフェクション効率

miRNA の化学修飾した際のトランスフェクション効率を評価するため、miR-143 の 3'末端に benzene-pyridine を化学修飾した RNA 分子(miR-143BPs)と非修飾の miR-143、そしてコントロールを THP-1 にトランスフェクションし、細胞内と分泌膜小胞内の miR-143BPs 量を測定した。細胞内、分泌膜小胞内共に化学修飾 miR-143BPs の方がより高い濃度で miR-143BPs が検出された。このことから化学修飾(BPs)を施したほうが細胞への、トランスフェクション効率、及び分泌膜小胞への移行の効率が高いことが分かった。

[2] 分化誘導によるトランスフェクション効率及び分泌膜小胞への移行

分化誘導剤 TPA を加え、分化誘導させたマクロファージ/THP-1 と単球/THP-1 との比較実験を行った。その結果、マクロファージの方が単球に比べて、トランスフェクション効率や分泌膜小胞への分泌効率が向上していることが分かった。

[3] 分泌膜小胞単離プロセスの構築

[3-1] 分泌膜小胞特異的な膜表面マーカーの選定

分泌膜小胞のみを単離する方法として、膜表面に特異的に発現するタンパクを利用した抗原抗体反応による単離法を試みた。その為、理想的な膜表面マーカーを選定するため、分泌膜小胞に存在するいくつかのタンパクを Western blot により検出した。その結果、CD81

が最も THP-1 細胞分泌膜小胞特異的に発現していることが分かった。このことから、単離の際に CD81 を用いて行なうこととした。

[3-2] 膜小胞単離の確認

直接磁性ビーズに抗 CD81 抗体を固相化し、分泌膜小胞膜表面マーカー CD81 との抗原抗体により単離を行った。その後、分泌膜小胞が磁性ビーズに結合しているかを確認するため、膜小胞と CD81 固相化磁性ビーズをインキュベートした後、膜小胞を溶出し抗 CD81 抗体を用いて Western blot を行った。その結果、CD81 のバンドが検出されたことから磁性ビーズに対し抗 CD81 抗体は固相化され、抗原抗体反応が進行し、膜小胞が CD81 を介して磁性物質に結合したことが示された。

[3-3] トランスフェクション及び膜小胞への分泌効率の最適化

膜小胞単離システムの構築において、導入された RNA 分子の効率的な膜小胞への分泌を可能にするため、以下の試薬の最適化を行った。

[3-4] トランスフェクション試薬

現在共同研究する片山化学工業株式会社のトランスフェクション試薬である G1(飽和型)、U2-G1(不飽和型)と従来から使用している Invitrogen 社の Lipofectamine の分泌膜小胞の分泌効率、他細胞への伝播率をそれぞれ比較した。

[3-5] Lipofectamine と U2-G1(不飽和型)の比較実験

従来の Lipofectamine と U2-G1 を当量用いて、miR-143BPs を処理し、その後トランスフェクションした。ExoMir により top, bottom に分け分泌膜小胞の RNA 抽出を行い、miR-143 を、TaqMan primer を用いて Real-time PCR 法により評価した。その結果、Lipofectamine の方が 1.7 倍分泌効率の良いことが分かった。次に THP-1 から回収した分泌膜小胞を T-24 細胞に伝播させた際の伝播率を調べた。その結果、U2-G1 の方が 7 倍以上も T-24 への伝播率が高い結果となった。このことから、RNA 医療としての実用においては腫瘍部位での膜小胞の伝播率が重要であるため、この比較実験における評価では、U2-G1 を今後の比較実験に用いることとした。

[3-6] U2-G1(不飽和型)と G1(飽和型)の比較実験

前回と同様、U2-G1 と G1 をそれぞれ当量トランスフェクションに用いた。ExoMir により分泌膜小胞の RNA 抽出を行った。同様の方法で評価した結果、G1 の方が 13 倍、分泌効率が良いことが分かった。次に THP-1 細胞から回収した分泌膜小胞を T-24 細胞に伝播させた際の伝播率を確認した。その結果、G1 の方が 3 倍 T-24 への伝播率が高いことが分かった。また、G1 の T-24 に対する細胞増殖抑制効果が観察された。以上のことから G1 はトランスフェクションにおける最適試薬と考えられ、今後の DDS に効果が期待できる

評価となった。

[3-7] 磁性ビーズ

Invitrogen 社の Dynabeads、日立マクセル株式会社 の 04-WS、05-WS を用いた抗 CD81 抗体/磁性ビーズによる分泌膜小胞の収集システムについて検討した。

Protocol に従いそれぞれの抗 CD81 抗体/磁性ビーズに同量のサンプルを加え単離された膜小胞から RNA を抽出した。その結果、05-WS の方が若干ではあるが RNA 濃度が高いことがわかった。このことは、多くの膜小胞が 05-WS に結合していることを示唆している。以上、この比較実験における評価では、05-WS が分泌膜小胞単離に適していることがわかった。

[3-8] 細胞への伝播

miR-143BPs を蛍光物質 cy5.5 で標識した。miR-143BP/cy5.5 を導入した THP-1 細胞から分泌された miR-143BP/cy5.5 包埋膜小胞を T-24 細胞の培養液中加入してインキュベートすると、T-24 細胞内に miR-143BPs の cy5.5 シグナル(緑色)が認められた。さらに 24 時間培養の結果、細胞増殖を抑制していることも分かった。

総括

この研究により、分泌膜小胞を介して RNA 分子を運搬することが可能であることが判明した。分泌膜小胞を用い、siRNA、miRNA を ex vivo で細胞導入し、細胞治療、遺伝子治療として癌などの治療に応用することで、今後画期的な DDS として期待できる。当研究では、目的の RNA 分子を含む分泌膜小胞をキャリアーとする RNA 分子搬送システムの構築を確立し、その過程で用いられるトランスフェクション試薬、イムノ磁性ビーズの最適化を行った。分泌膜小胞に特異的に発現する膜表面マーカーとして CD81 タンパクを同定し、それに対する抗体を磁性ビーズに固相化して膜小胞の単離を行ったが、単離量が少なかったため、今後より効率的に大量の膜小胞を回収出来るシステムを検討する必要がある。また抗原抗体反応による単離では実用化の際、抗体の不活化による問題点がある。そのため今後、抗体に変わる新たな化合物の選定を行い、実用化に向けたさらなる研究が望まれる。

トランスフェクションの際、膜小胞への分泌率の評価では G1(飽和型)が最も優れている結果となったが、G1(飽和型)の特徴から考えるに、直径 130nm と一般的なリポソームよりも小さいこと、そして膜構造の脂質アルキル鎖が飽和型であることが、エンドサイトーシスを促進しているのではないかと考えられる。またトランスフェクション試薬によって分泌膜小胞を介した miRNA の他細胞への伝播率に差が出てくるということは、試薬の構造によって細胞の特定のシグナル伝達により膜小胞中への移行が促進される可能性が考えられる。

当研究では、in vitro で膜小胞/miR-143 を T-24

に導入することで増殖抑制が見られた。このことから、今後は in vivo においても同様に見られるかさらなる研究が望まれる。

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 1 件)

Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells. Yamada N, Tsujimura N, Kumazaki M, Shinohara H, Taniguchi K, Nakagawa Y, Naoe T, Akao Y. Biochim Biophys Acta. 2014 Nov;1839(11):1256-72. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

Yukihiro Akao, Chemically-modified synthetic microRNA-205 inhibits the growth of melanoma cells and a clinical trials in canine melanomas, American Association Cancer Research in Shanghai, 2014.10.8-12, 上海・中国

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

赤尾 幸博 (Akao, Yukihiro)

岐阜大学・連合創薬医療情報研究科・
教授

研究者番号：00222505

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：