

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659260

研究課題名(和文)RNA医薬を搭載した標的指向型多機能性エクソソームの開発

研究課題名(英文)Development of target-specific multifunctional exosomes loaded with RNA drugs

研究代表者

高橋 有己(Takahashi, Yuki)

京都大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00547870

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞から分泌される小胞であるエクソソームの体内動態制御法の開発を目的として、エクソソームの体内動態を解析した。マウスメラノーマ細胞株、B16BL6細胞をモデルのエクソソーム細胞として検討を行ったところ、静脈内に投与されたエクソソームは半減期2分という非常に短い時間で血中から速やかに消失することを見出した。主に肝臓・肺・脾臓に分布することも見出した。また、血中からのエクソソームの速やかな消失は、肝臓・脾臓に存在するマクロファージにより取り込まれるためであることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, in vivo fate of exosomes was analyzed for the goal of the development of exosome-based drug delivery system. B16BL6 murine melanoma cells were selected as model exosome-producing cells. It was found that intravenously administered exosomes quickly disappeared from blood circulation with short half-life of approximately 2 minutes. Exosomes distributed mainly to the liver, lung and spleen. In addition, it was demonstrated that quick clearance of exosomes from blood circulation was caused by the uptake of exosomes by macrophages in the liver and spleen.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー エクソソーム ルシフェラーゼ イメージング DDS

1. 研究開始当初の背景

標的 RNA を配列特異的に分解する短い 2 本鎖 RNA (siRNA) や、遺伝子発現調節により種々の生体内イベントを制御するマイクロ RNA (miRNA) に代表される機能性 RNA は、特異性かつ安全性の高い疾患治療を実現可能な次世代治療薬としての開発が期待されている。しかしながら、培養細胞に対しては多くの効率的な機能性 RNA デリバリー技術が開発されているものの、個体レベルで十分な量の RNA を標的細胞にデリバリー可能なシステムは存在しなかった。癌細胞や樹状細胞での検討から、細胞内の RNA やタンパク質が直径 100nm 前後のエキソソームと名付けられた小胞に内包される形で細胞外に放出され、別の細胞に移行後、内包物を細胞内に送達する現象が見出された。この発見以降、エキソソームを機能性 RNA のキャリアへの利用が試みられていた。先行する研究において、エキソソームは siRNA のデリバリーキャリアとして利用可能であることは報告されていたものの、その体内動態上については不明な点も多く、体内動態制御についても十分に行われているとは言い難いものであり、より厳密にエキソソームの体内動態を制御可能な方法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

エキソソームを用いた機能性 RNA キャリアの開発にはエキソソームの体内動態の制御が必須であり、そのためにはエキソソームの体内動態情報が必要となる。しかしながら、エキソソームの体内動態の追跡方法が存在しなかったことから、エキソソームの体内動態に関する情報はほとんど存在しなかった。そこで本研究では、エキソソームの体内動態制御に基づく機能性 RNA キャリアの開発を目的として、エキソソームの体内動態追跡方法を開発し、開発された手法を用いてエキソソームの体内動態について解析した。エキソソームの体内動態の追跡には、レポータータンパク質とエキソソーム移行性タンパク質との融合タンパク質でエキソソームを標識する方法が利用可能ではないかと考えた。レポータータンパク質として、基質と反応することで発光する *Gussia luciferase* (gLuc) を、エキソソーム移行性タンパク質として lactadherin (LA) を選択し、gLuc と LA の融合タンパク質、gLuc-LA をデザインし、これを発現するプラスミド DNA を構築した。構築した gLuc-LA 発現プラスミド DNA をエキソソーム産生細胞に遺伝子導入することで産生されるエキソソームを gLuc-LA で標識することを試みた。また、研究を遂行する過程において、肝臓・脾臓に存在するマクロファージがエキソソームの体内動態に大きな影響を及ぼす可能性が示されたことから、エキソソームの体内動態にマクロファージが及ぼす影響についても検討した。

3. 研究の方法

gLuc-LA 発現プラスミド DNA の構築

LA の分泌シグナルの C 末端に gLuc を連結し、さらにその C 末端に LA の C1C2 領域を融合したタンパク質、gLuc-LA をデザインしこれをコードする cDNA を pcDNA3.1 ベクターに組み込み、pCMV-gLuc-LA を構築した。

gLuc-LA 標識エキソソームの回収

マウスメラノーマ細胞 B16BL6 細胞をモデルのエキソソーム産生細胞として選択した。B16BL6 細胞に pCMV-gLuc-LA をトランスフェクションし、24 時間後の培養上清を回収した。段階遠心法で、比較的大きな小胞を除去した後、0.2 μm のフィルターを通した。このサンプルについて、超遠心法でエキソソームをペレットとして沈澱させ、エキソソームを回収した。エキソソームの回収過程で各サンプルを回収し、ルミノメーターを用いて gLuc 活性を計測した。

免疫電子顕微鏡観察

回収した gLuc-LA 標識エキソソームを抗 gLuc 抗体とインキュベートした後、Protein A 標識金ナノ粒子と反応させ、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。

粒子径・表面電荷の計測

ゼータサイザーを用いて各エキソソームの粒子径・表面電荷を計測した。

蛍光標識エキソソームの調製

脂溶性赤色蛍光色素である PKH26 red fluorescent cell linker kit を用いてエキソソームを標識後、超遠心法を用いて余分の PKH26 色素を除去し、PKH26 標識エキソソームを調製した。

gLuc-LA 標識の血清中での安定性評価

gLuc-LA 標識エキソソームを 20% 牛血清含有リン酸緩衝液中で 37 $^{\circ}\text{C}$ でインキュベートし、経時的に gLuc 活性を測定した。別途、経時的に回収したサンプルについて超遠心を行い、上清中の gLuc 活性を測定することでエキソソームからの gLuc-LA の遊離を評価した。

マクロファージの除去

マクロファージの除去を目的に、クロドロネートを含むリポソームを薄膜水合法により調製した。得られたクロドロネートリポソームをマウスに尾静脈内投与し、投与 24 時間後のマウスをマクロファージ除去マウスとして実験に用いた。

エキソソーム取り込み細胞種の評価

PKH26 標識エキソソームをマウスに尾静脈内投与し、投与 10 分後に肝臓および脾臓、肺を回収した。回収臓器の凍結切片を作製し、マクロファージ特異的抗体である Alexa

Fluor488 標識 anti-mouse F4/80 抗体を用いて免疫染色を行った。別途、PKH26 標識エクソソームを投与したマウスに対して、FITC 標識トマトレクチンを右心室から灌流することで血管内皮細胞を染色し、回収した肺の凍結切片を作製した。

In vivo イメージング

gLuc-LA 標識エクソソームを尾静脈内投与したマウスにセレンテラジンを尾静脈内投与し、gLuc による化学発光を in vivo イメージング装置を用いて検出した。

エクソソームの血中滞留性評価

gLuc-LA 標識エクソソームを尾静脈内投与したマウスから経時的に採血し、血清中 gLuc 活性をルミノメーターを用いて測定した。

4. 研究成果

gLuc-LA による標識の確認

pCMV-gLuc-LA を遺伝子導入された B16BL6 細胞から産生されるエクソソームを回収したところ、エクソソーム画分に強い gLuc 活性の濃縮が観察されたことから、gLuc-LA によるエクソソーム標識の可能性が示された(図1)。

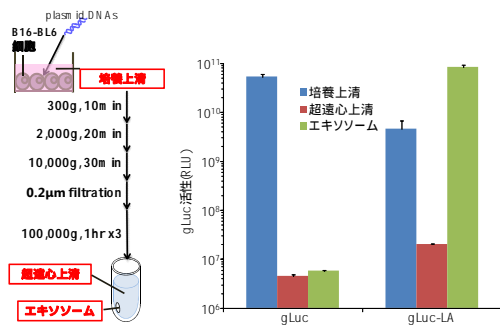
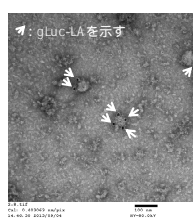


図1. gLucあるいはgLuc-LA発現プラスミドDNAを遺伝子導入された細胞の培養上清からのエクソソームの回収時の各画分におけるgLuc活性

次に、抗 gLuc 抗体を用いた免疫電子顕微鏡観察により、エクソソーム表面における gLuc-LA の存在を検出した。その結果、エクソソーム表面に gLuc-LA が存在することを確認した(図2左)。以上の結果から、本方法により gLuc-LA 標識エクソソームが調製可能であることが明らかとなった。また、粒子径・表面電荷について、すでに報告した??非標識エクソソームと gLuc-LA とで比較を行ったところ、有意な違いは存在しなかったことから、gLuc-LA はエクソソームの物性にほぼ影響を与えない標識方法であることを確認した(図2右)。



粒子径	表面電荷
66 ± 11 nm	-45 ± 2 mV

図2. 免疫電子顕微鏡観察によるgLuc-LA 標識エクソソーム表面のgLuc-LAの検出(左) gLuc-LA 標識エクソソームの粒子径と表面電荷(右)

gLuc-LA 標識の安定性

gLuc-LA 標識エクソソームの gLuc 活性は、20%血清含有緩衝液中で4時間インキュベートした後も減少しなかった。また、超遠心後の上清中にはgLuc-LA 活性はほぼ検出されなかった。従って、エクソソームの gLuc-LA 標識は、血中では安定であることが示唆された。

全身投与された gLuc-LA 標識エクソソームの体内動態の解析

gLuc-LA 標識エクソソームを尾静脈よりマウスに投与し、経時的に採血を行い血清中 gLuc 活性を測定した。その結果、静脈内に投与されたエクソソームの血中からの消失半減期は約2分と非常に短いことが明らかとなった(図3)。

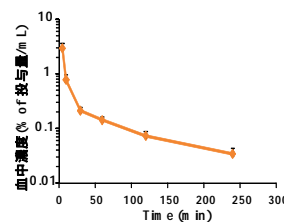


図3. gLuc-LA 標識エクソソームを静脈内投与されたマウスにおけるエクソソームの血中濃度推移

次に、in vivo イメージングにより、投与されたエクソソームの全身での分布について観察を行ったところ、投与後早期に肺・肝臓・脾臓といった臓器へのエクソソームの集積が観察された。また、時間経過に伴い、各臓器におけるエクソソームからのシグナルの減弱が観察され、投与後4時間後には肺においてのみ発光シグナルが検出された(図4)。

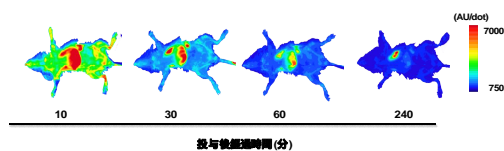


図4. In vivo imaging法によるgLuc-LA 標識エクソソームを静脈内投与されたマウスにおけるエクソソームの体内分布の経時変化の観察

全身投与したエクソソームの取り込み細胞の同定

PKH26 標識エクソソームをマウスに投与し、マクロファージ特異抗体を用いて免疫染色を行った結果、肝臓と脾臓において、エクソソームとマクロファージとの共局在が観察されたが、肺においてはそのような現象は観察されなかった。一方で、蛍光標識レクチンを用いて血管内皮細胞を染色したところ、PKH26 標識エクソソームと肺の血管内皮細胞との共局在が観察された。以上の結果から、血中に投与されたエクソソームは肝臓・脾臓中マクロファージと、肺の血管内皮細胞に取り込まれることが示唆された。

エクソソームの消失に及ぼすマクロファージの影響

血中に存在するエクソソームの消失に及

ばすマクロファージの影響を明らかにするために、クロドロネートリポソームを投与したマウスをマクロファージ除去マウスとして用いた。gLuc-LA 標識エキソソームを静脈内投与したところ、未処理マウスと比較して、マクロファージ除去マウスでは血中からのエキソソームの消失クリアランスが10分の1以下に低下した。また、in vivo イメージングによりエキソソームの体内分布を評価したところ、未処理マウスでは投与後初期にエキソソームの肝臓および脾臓への集積が観察されたが、マクロファージ除去マウスではこれら臓器への集積が低下する様子が観察された。また、マクロファージ除去マウスでは、体内からの gLuc 活性の消失が著しく遅延した。

以上、本研究では gLuc-LA を用いたエキソソームの標識方法を開発し、全身投与されたマウスメラノーマ B16-BL6 細胞由来エキソソームの体内動態の定量的な解析と、体内分布の可視化に成功した。また、静脈内に投与された B16BL6 細胞由来のエキソソームの血中からの消失に、肝臓と脾臓のマクロファージが大きく寄与することを明らかにした。本研究で得られた成果は、エキソソームを基盤とした DDS 開発に有用な知見を提供するものとする。

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)

Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, Takakura Y. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. Journal of Biotechnology 2013 ;165:77-84.

〔学会発表〕(計 6 件)

森下 将輝、高橋 有己、佐野 紘平、西川 元也、佐治 英郎、高倉 喜信 . Streptavidin-biotin 結合を利用した exosome の放射標識による exosome 体内動態定量的解析法の開発 日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月

高橋有己、西川元也、高倉喜信 . exosome を基盤とする DDS 開発を指向した体内動態評価システムの開発 .第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2013 年 7 月

今井貴文、高橋有己、西川元也、高倉喜信 .Gaussia Luciferase-Lactadherin 融合タンパク質を利用した exosome の体内動態評価法の開発 . 第 29 回日本 DDS 学

会学術集会、京都、2013 年 7 月

加藤佳奈、大原早織、高橋有己、西川元也、高倉喜信 . 蛍光標識 exosome を利用した細胞と exosome との相互作用解析 . 第 29 回日本 DDS 学会学術集会、京都、2013 年 7 月

今井貴文、高橋有己、西川元也、高倉喜信 . Gaussia Luciferase を利用したエキソソーム標識法の開発によるエキソソーム体内動態解析 日本薬剤学会第 28 年会、愛知、2013 年 5 月

Saori Ohara, Yuki Takahashi, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura. Cellular Uptake Mechanism of Fluorescently Labeled Exosomes. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、京都、2012 年 11 月

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 有己 (TAKAHASHI, YUKI)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：00547870

(2)研究分担者

高倉 喜信 (TAKAKURA, YOSHINOBU)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：30171432

西川 元也 (NISHIKAWA, MAKIYA)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：40273437