

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560240

研究課題名(和文) ナノ複合体で疾患エクソソーム内を制す「生体内ナノサージェリ - 技術」の挑戦的開発

研究課題名(英文) Challenging development of "in vivo nano-surgery technology" to control the internal biological molecules of disease-derived exosome by nanocomplexes

研究代表者

城 潤一郎 (Jo, Jun-ichiro)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：60511243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは、細胞から分泌される小胞である。最近、疾患由来細胞のエクソソーム(疾患エクソソーム)がさまざまな疾患の発生や悪性化に関与することが明らかになってきた。疾患エクソソームの動態と機能を人為的に制御できれば、疾患の発生や悪性化を抑制できるはずである。本研究の目的は、ナノテクノロジーを駆使して疾患エクソソームの内部情報を生体内で制御する技術(エクソソームの生体内ナノサージェリー技術)を開発することである。この技術を実現するため、本研究では、エクソソームの表面に対する抗体を修飾し、膜破壊ペプチドと制御因子を内包した生分解性ナノ複合体の作製を試みた。

研究成果の概要(英文)：Exosome is one of vesicles secreted from cells. Recently, it has been revealed that disease-derived exosomes are involved in the onset and malignant alteration of various diseases. It is no doubt that the technology-based artificial control of dynamics and biological function in disease-derived exosomes enables to suppress the onset and malignant alteration of diseases. The objective of this study was to develop a technology called "in vivo nano-surgery technology", which can regulate the internal biological information of disease-derived exosome by making use of nanotechnology. To achieve the technology, in this study, a biodegradable nanocomplex was attempted to prepare by the modification of antibody with an affinity for the exosome and the encapsulation of a membrane-disrupting peptide and regulation factor.

研究分野：生体材料

キーワード：エクソソーム ナノ粒子

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脂質二重膜で形成される小胞であり、生命現象を伝搬する内部情報(タンパク質、メッセンジャーRNA、ならびにマイクロRNAなど)を内包して相手の細胞内へ運搬する細胞間コミュニケーション担体としての役割を担う。

最近になって、エクソソームがさまざまな疾患の発生や悪性化に関与することが明らかになってきた。そこで、もしこの疾患エクソソームの動態と機能を人為的に制御できれば、疾患の発生や悪性化の抑制が期待できる。これまでに、疾患エクソソームの動態と機能を人為的に制御する方法として、疾患細胞からのエクソソーム分泌を阻害する方法、分泌後循環するエクソソームを捕捉する方法、および相手細胞へのエクソソームの取り込みを阻害する方法が提案されている。これらの方法は、エクソソームの動態を制御するものであり、制御後の内部情報が保持されたエクソソームの運命は不明である。この場合、動態制御されたエクソソームは、内部情報を保持しており、疾患の再発の危険性がある。疾患エクソソームの内部情報が相手細胞へ伝搬することが疾患進行の原因になっていることは、多くの研究結果(Al-Nedawi K.ら Nat. Cell Biol., 2008 など)から予想できる。そこで、疾患を根本的に治療するためには、疾患エクソソームの内部情報を生体内で制御する必要があると考えた。

2. 研究の目的

上記の研究開発当初の背景に基づき、本研究では、生体内に存在するエクソソームの内部情報を制御する技術を開発することを目的とした。具体的には、エクソソーム関連生物学、薬剤送達技術、およびナノテクノロジーを融合し、生体内でエクソソームを捕捉し、そこでエクソソーム膜に穴を開け、内部へ制御因子を送り込むことが可能なナノ複合体を創製する。このナノ複合体を用いて疾患エクソソームの内部情報を生体内で制御し、疾患を治療する「エクソソームの生体内ナノサージェリー技術」の創製にチャレンジする。

エクソソームの生体内ナノサージェリー

を行うためには、2つの過程を必要とする。

(1) 標的とするエクソソームの能動的な捕捉、(2) 頑丈な構造をもつエクソソームへの制御因子の導入である。エクソソームの能動的な捕捉には、エクソソーム特異的な抗体を用い、エクソソームへの制御因子導入には、膜破壊ペプチドを用いる。この2つの過程を同時に行う必要があり、それらに加えて制御因子が、様々な分解酵素が存在する生体内で安定であるとは限らない。一方、生分解性ナノ粒子は全身投与、複数の分子の修飾、内包分子の保護、およびナノスケールでの放出が可能である。そこで、分解性ナノ粒子へ抗体を修飾、膜破壊ペプチドおよび制御因子を内包した生分解性ナノ複合体を作製する。

研究期間内に、このナノ複合体における対象エクソソームの捕捉率、膜破壊ペプチドによりエクソソームへ導入可能な物質の分子量、およびエクソソームへの効率的な制御因子導入に必要な徐放化担体からの放出速度について明らかにする。最終的に、悪性度の高いメラノーマ細胞の皮下移植および転移モデルマウスを用いて、エクソソームの生体内ナノサージェリー技術の効果を明らかにする。

エクソソームの生体内ナノサージェリー技術の開発が成功すれば、疾患をエクソソームの機能制御で治すというエクソソーム治療工学のための汎用的な基盤技術を提供することになる。すなわち、対象とするエクソソームおよび制御因子を変えることによって、他の疾患治療や再生治療にも適用できる。また、制御因子ではなく、イメージングプローブをエクソソーム内部に導入することも可能となり、イメージング技術を介したエクソソームの細胞間コミュニケーションの解明につながる。このように、本研究成果の学術的、社会的な影響はきわめて大きい。

3. 研究の方法

本研究の目的である「抗体を修飾、膜破壊ペプチドおよび制御因子を内包した生分解性ナノ複合体の作製とエクソソームの生体内ナノサージェリーによる悪性度の高いがんへの応用」を達成するため、以下のように

研究を計画した。

(1) 単独因子がエクソソームに与える影響の評価

(2) 生分解性ナノ複合体の作製

(3) エクソソームの生体内ナノサージェリーによるがん治療効果の評価

平成 26 年度では、エクソソームの生体内ナノサージェリーを達成するための生分解性ナノ複合体の基礎検討((1)(2))を行う。平成 27 年度は、ナノ複合体の最適化と、最適化ナノ複合体を用いたエクソソームの生体内ナノサージェリーによるがん治療効果とメカニズムを検証する((2)(3))。

平成 26 年度

(1) 単独因子がエクソソームに与える影響の評価

エクソソームの抽出

悪性度の高いメラノーマ細胞株 (B16F10) および正常メラニン細胞株 (HEMa-LP) から、エクソソームを抽出する。エクソソームのサイズを動的光散乱 (DLS) で測定する。それぞれのエクソソームの表面抗原 (CD63、CD9、CD81、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) クラス 1、Met72 等を予定) をフローサイトメータで評価する。HEMa-LP と比較して B16F10 で高発現している抗原に対する抗体を、以後のナノ粒子への修飾に用いる。

エクソソーム内への物質導入に与える膜破壊ペプチドの影響の検証

エクソソームへ、膜破壊ペプチド (GALA) と蛍光物質を添加する。エクソソームを分離後、その蛍光強度を測定し、蛍光物質の導入量を評価する。蛍光物質の分子量とペプチドの添加量を変化させ、膜破壊ペプチドがエクソソーム内への物質導入に与える影響を評価する。

制御因子がエクソソーム内部情報に与える影響の評価

エクソソームから内部情報 (タンパク質と RNA) を抽出する。この抽出液へ制御因子 (タンパク質分解酵素、RNA 分解酵素等を予定) を添加する。添加後の内部情報の分解を電気泳動にて評価する。内部情報の分解挙動に与える制御因子の添加量の影響を調べる。最適な制御因子を以後のナノ粒子への内包に用

いる。

(2) 生分解性ナノ複合体の作製

生分解性ナノ粒子の作製

ゼラチンあるいは乳酸 - グリコール酸共重合体 (PLGA) からなり、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾された、サイズが 100 nm 程度の生分解性ナノ粒子を作製する。ゼラチンナノ粒子はコアセルベーション法、PLGA ナノ粒子は水中油中水型エマルション形成法を用いる。

抗体修飾生分解性ナノ粒子の作製と評価
ナノ粒子表面に修飾された PEG の末端へ抗体を反応させ、抗体修飾生分解性ナノ粒子を作製する。抗体修飾生分解性ナノ粒子とエクソソームを混合、経時的にそのサイズを DLS で評価し、抗体修飾生分解性ナノ粒子によるエクソソーム捕捉とその安定性を評価する。

膜破壊ペプチドおよび制御因子を内包した生分解性ナノ複合体の作製と評価

ゼラチンナノ粒子は含浸法、PLGA ナノ粒子は内水相を用い、膜破壊ペプチドおよび制御因子を内包する。上記の結果に基づき、膜破壊ペプチドおよび制御因子の内包量を選定する。放射性同位元素を用いて、膜破壊ペプチドおよび制御因子の徐放性を評価する。

平成 27 年度

(2) 生分解性ナノ複合体の作製

前年度の研究成果に基づき、抗体を修飾、膜破壊ペプチドおよび制御因子を内包した生分解性ナノ複合体を作製する。作製したナノ複合体をエクソソームへ添加し、内部情報の分解程度を評価する。この結果から、生分解性ナノ複合体を最適化し、以後の動物実験に用いる。

(3) エクソソームの生体内ナノサージェリーによるがん治療効果の評価

B16F10 細胞をマウス大腿部皮下に移植、担がんマウスを作製する。最適化された生分解性ナノ複合体をがん組織へ局所あるいは静脈内投与し、がん体積の変化により治療効果を評価する。B16F10 細胞をマウスへ静脈移植し、がんの肺転移モデルを作製する。B16F10 細胞の移植後、生分解性ナノ粒子を投与する。一定時間後、肺中の結節を計数し、転移がんに対する治療効果を評価する。

GFP 恒常発現 B16F10 細胞と蛍光標識生分解性ナノ複合体を用いて、生体内ナノサージェリーによるがん治療効果のメカニズムを検証する。

4. 研究成果

(1) 単独因子がエクソソームに与える影響の評価

疾患エクソソームの抽出

悪性度の高いメラノーマ細胞株 (B16F10 細胞) を、エクソソームを除いた細胞培養液中で 72 時間培養した。得られた培養上清から、超遠心法にて疾患エクソソームを抽出した。エクソソームのサイズを、ゼータサイザーを用いて測定したところ、約 150 nm であった。ピシンコニン酸 (BCA) を用いて、得られたエクソソームのタンパク質濃度を測定した。

エクソソームをアルデヒド基が修飾されたポリスチレンビーズと混合し、エクソソームが固定化されたポリスチレンビーズを得た。このエクソソーム固定化ポリスチレンビーズを、フローサイトメトリーを用いて解析した。その結果、抽出したエクソソームの表面に CD9 が発現していることを確認した。

エクソソームの内部情報を調べるため、エクソソームから RNA を抽出し、パイオアナライザーで解析し、RNA の存在を確認した。

エクソソーム内への物質導入に与える膜破壊ペプチドの影響の検証および制御因子がエクソソーム内部情報に与える影響の評価

エクソソームへ膜破壊ペプチド (GALA) を添加した。エクソソームを分離後、そのサイズ等を測定した。GALA 添加によるエクソソームの物性変化等を評価しようとしたが、評価系に問題があり実施できなかった。今後は、ペプチドの添加量を変化させることによって、膜破壊ペプチドがエクソソーム内への物質導入に与える影響、さらに制御因子がエクソソーム内部情報に与える影響を評価する必要がある。

(2) 生分解性ナノ複合体の作製

ゼラチンナノ粒子の作製

生分解性ナノ粒子の出発材料として、ゼラチンを選択した。種々の濃度のゼラチン (等電点 5.0, 重量平均分子量 100,000) 水溶液へアセトンを追加することによって、ナノサイズのコアセルベーションを形成させた。このコアセルベーションへグルタルアルデヒドを加えゼラチンを化学架橋した。その後、アセトンを蒸発させることによって、ゼラチンナノ粒子を得た。ゼラチンナノ粒子のサイズは、コアセルベーション形成時のゼラチン濃度によって変化することがわかった。

抗体修飾ゼラチンナノ粒子の作製

このゼラチンナノ粒子に対して種々の方法で、抗体修飾を行った。1 つ目は、ゼラチンナノ粒子へ混合するのみで、抗体をゼラチンナノ粒子へ物理吸着させる方法 (物理吸着法) である。2 つ目は、2 官能性化学架橋剤を用い、ゼラチンおよび抗体のアミノ基を架橋する方法 (化学修飾法) である。3 つ目は、抗体の Fc 部位にある糖鎖を還元し、ゼラチンのアミノ基とシッフ塩基を形成させることによって修飾する方法 (還元的アミノ化法) である。放射性同位元素にて標識した抗体を用いて、これらの 3 つの方法の単位重量ナノ粒子あたりの抗体修飾量を測定した。その結果、化学修飾法が最も高い抗体修飾量を示した。これは、抗体を化学修飾で着実に固定化したこと、また、修飾反応に用いたアミノ基の数が、糖鎖の還元による末端アルデヒド基の数よりも十分大きかったためと考えられる。

放射性同位元素あるいは培養細胞を用いて、修飾したゼラチンナノ粒子の抗原認識能を評価した。その結果、還元的アミノ化法が有意に高い抗原認識能を示すことがわかった。これは、修飾に抗体の Fc 部分の糖鎖を用いたことで、化学修飾による抗原認識部位のマスキングが阻害され、抗体の抗原認識能が維持されたためと考えられる。

この抗体修飾ゼラチンナノ粒子へ膜破壊ペプチドを内包させる予定であったが、エクソソーム内への物質導入に与える膜破壊ペプチドの影響の検証が進行していないため、エクソソームの生体内ナノサージェリー

によるがん治療効果の評価も含めて、今後行う予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

吉本雄、城潤一郎、田畑泰彦：抗体固定化ゼラチンナノ粒子の作製とその抗原認識能評価、第64回高分子学会年次大会(2015年5月27~29、札幌)

吉本雄、城潤一郎、田畑泰彦：抗原認識能に与えるゼラチンナノ粒子への抗体固定化の影響、第31回日本DDS学会学術大会(2015年7月2~3、東京)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

城 潤一郎 (Jo, Jun-ichiro)

京都大学・再生医科学研究所・助教

研究者番号：60511243

(2)研究分担者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号：50211371

(3)連携研究者

該当なし。