

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 人工エクソソームを用いた革新的免疫制御法の開発
(英語) Development of novel immuno-regulatory methods using engineered exosomes

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 華山力成
(英語) Rikinari Hanayama

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人 金沢大学・ナノ生命科学研究所・教授
(英語) Professor, WPI Nano Life Science Institute, Kanazawa University

II 研究開発の概要

課題概要

エクソソームはほとんどの細胞が分泌する直径 30–150nm 前後の細胞外小胞で、分泌細胞由来のタンパク質や脂質・RNAなどを運ぶことで、様々な機能を制御する新たな細胞間情報伝達媒体として注目されている（図1）。特に樹状細胞などの免疫細胞が分泌するエクソソーム上には、免疫系を活性化する分子（抗原-MHC 複合体など）が、逆にがん細胞が分泌するエクソソーム上には、免疫系を抑制する分子（Fas-L や PD-L1 など）が発現している。更に内側には mRNA や microRNA が含まれており、これらの免疫制御分子を介して免疫応答やがん進展の制御など種々の生命現象に関与することが明らかとなっている。このことから現在、エクソソームを標的にした、もしくはエクソソームそのものを用いた創薬が期待されている。近年、エクソソーム上に発現しているマーカー分子であるテトラスパニン（CD9、CD63、CD81 など）とのキメラ分子を作製することで、目的のタンパク質を自在にエクソソーム上に発現させることが可能となっている。そこで私たちは、この技術を応用してエクソソーム上に「複数の免疫制御分子を同時に発現」させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現することのできない「革新的な免疫制御法の実現」を目指している。すなわち、免疫細胞の効率的な活性化には、複数の免疫制御分子によるシグナルが同時に入る必要があるが、従来の免疫制御法では、これらが生体内で分散してしまう（図2左）。その結果、目的の免疫細胞を効率的に活性化できないばかりか、目的外の免疫細胞をも“非特異的”に活性化してしまい、様々な副作用が引き起こされてしまう。一方、私たちの技術では、エクソソームを介して生体内で複数の免疫制御分子を同時に運び同じ場で使うことで、個々の免疫制御分子の単純な併用では見られない相乗効果により、目的の免疫細胞のみを“特異的”に活性化させることが可能となる（図2右）。私たちは、このように免疫制御機能を高めた改変エクソソームの開発を進めることで、これまでの技術では不可能であった「がん細胞のみを特異的に攻撃する免疫細胞」や「自己免疫疾患・アレルギーのみを特異的に抑制する免疫細胞」などを、改変エクソソームを用いて患者の体内に効率的に作り出す新規免疫制御法の開発を行っている。高機能・高品質なエクソソーム製剤の製造を実現化することで、がん・感染症・自己免疫・アレルギーなど様々な疾患に対する効果的かつ副作用のない創薬開発を推進してゆく。



図1. 免疫系エクソソームの構成分子

エクソソームには様々な分子が載っているが、中でもテトラスパニンはエクソソームの表面マーカーとして知られている。テトラスパニンとのキメラ分子を作製することで、目的のタンパク質をエクソソーム上に自在に発現されることが可能となっている。

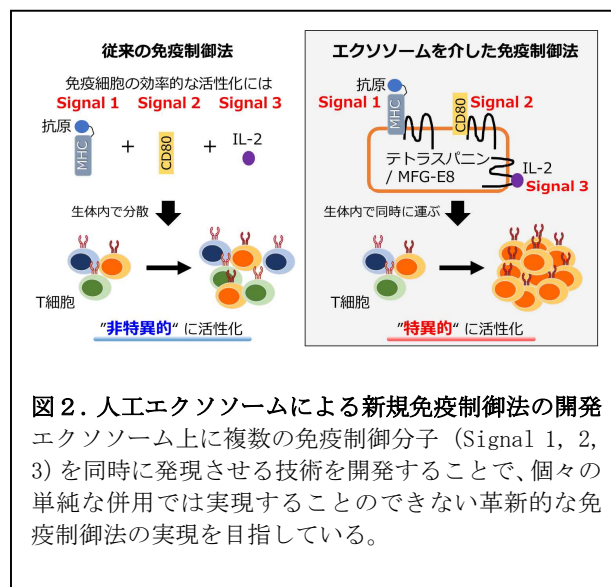


図2. 人工エクソソームによる新規免疫制御法の開発
エクソソーム上に複数の免疫制御分子（Signal 1, 2, 3）を同時に発現させる技術を開発することで、個々の単純な併用では実現することのできない革新的な免疫制御法の実現を目指している。

成果概要

【1. 抗原特異的抗腫瘍免疫増強法の開発】

抗原ペプチド-MHC I 複合体・CD80 補助シグナル・IL-2 を同時発現するエクソソーム APExo(CTL) を作製し、抗原特異的に CD8⁺ T 細胞を活性化させることに成功した。モデル抗原ペプチド (OVA) を用いた効果検討にて、OVA を発現する癌細胞の担癌マウスにおいて、APExo(CTL) の投与で癌の増殖を顕著に抑制することに成功した (図 3)。

【2. 抗原特異的自己免疫抑制法の開発】

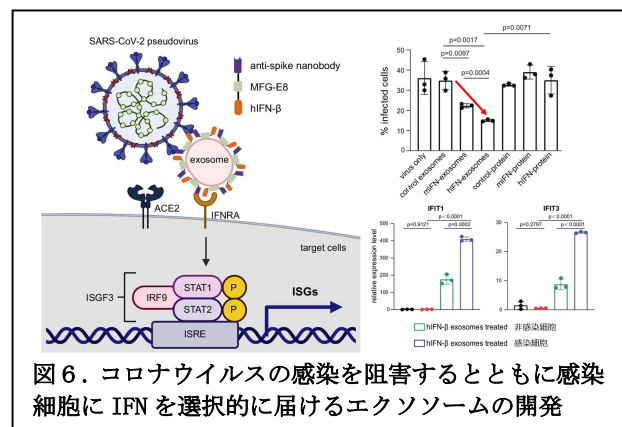
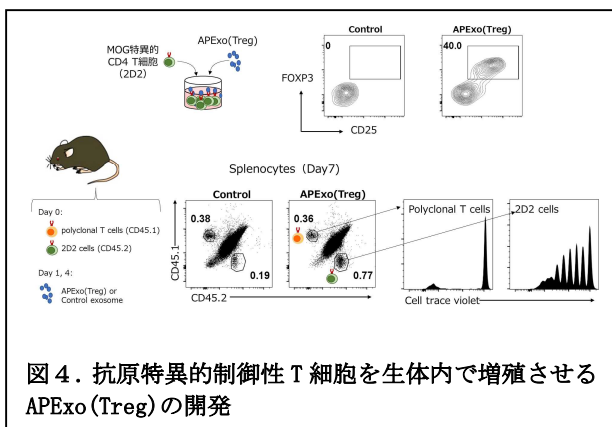
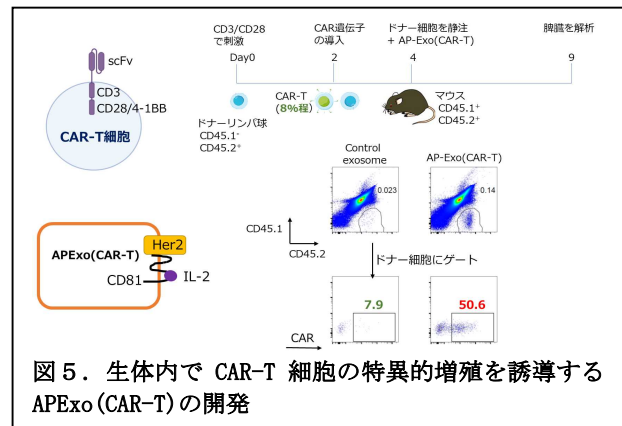
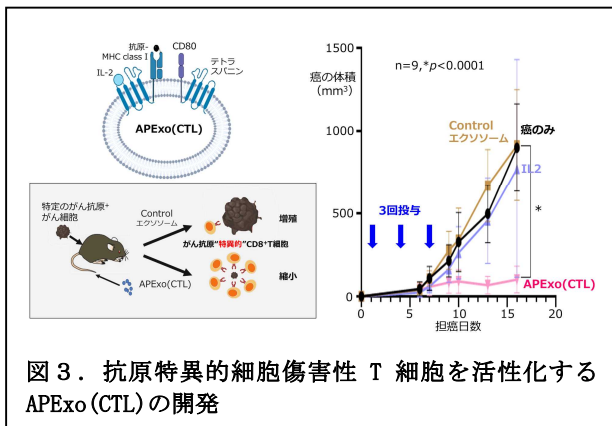
抗原ペプチド-MHC II 複合体・CD80・IL-2・TGF- β を同時発現するエクソソーム APExo(Treg) を作製し、抗原特異的に制御性 T 細胞を分化誘導することに成功した。実験的自己免疫性脳脊髄炎を誘発する MOG ペプチドを用い、培養細胞系とマウス生体内において、MOG 特異的制御性 T 細胞を増殖させることに成功した (図 4)。

【3. 生体内 CAR-T 細胞増殖法の開発】

生体内で CAR-T 細胞を増殖・活性化させる為、CAR の抗体部位が認識する抗原 (Her2) と IL-2 を同時に発現するエクソソーム APExo(CAR-T) を作製した。マウス生体内への投与で CAR-T 細胞を特異的に増殖させることに成功した (図 5)。

【4. 高選択性ドラッグデリバリー法の開発】

SARS-CoV-2 シュードウイルスを用いた感染実験系をモデルとし、MFG-E8 とのキメラ分子作製により抗 spike 抗体と interferon(IFN)- β を同時に発現するエクソソームを作製した。このエクソソームが、ウイルスの感染を効率良く阻害するとともに、感染細胞に IFN- β を選択的に送達することで特異的に IFN 誘導遺伝子の発現を誘導し、抗ウイルス状態を惹起することに成功した (図 6)。



Exosomes, small vesicles secreted by cells, are garnering attention for their role in intercellular communication. They carry various molecules like proteins, lipids, and RNA, influencing diverse functions. Exosomes from immune cells express molecules like antigen-MHC complexes, while those from cancer cells express immunosuppressive molecules. There's growing interest in targeting or utilizing exosomes for drug discovery. Recently, it has become possible to freely express target proteins on exosomes by creating chimeric molecules with tetraspanins (CD9, CD63, CD81, etc.), which are marker molecules expressed on exosomes.

Taking advantage of this technology, we propose a methodology to enhance immunomodulation by simultaneously expressing multiple immunomodulatory molecules on exosomes. Traditional methods disperse these signals, leading to inefficient immune cell activation and nonspecific side effects. On the other hand, our new method targets specific immune cells, enhancing activation synergistically by delivering multiple agents within exosomes to the same location in vivo. This approach seeks to precisely activate immune cells targeting cancer cells or suppressing autoimmune disorders and allergies, surpassing conventional methods.

In this research project, we have developed four novel methods that highlight the potential of this approach:

- 1. Antigen-Specific Anti-Tumor Immunopotential:** APExo(CTL) formulation presents antigen peptides, co-stimulatory signals, and IL-2 on exosomes, activating CD8⁺ T cells specifically. It shows promise in inhibiting cancer proliferation in mice expressing specific antigen.
- 2. Antigen-Specific Autoimmune Suppression:** APExo(Treg) induces antigen-specific regulatory T cell differentiation by presenting antigen peptides, co-stimulatory signals, IL-2, and TGF- β on exosomes. It expands regulatory T cell populations, potentially mitigating autoimmune diseases like experimental autoimmune encephalomyelitis.
- 3. In Vivo CAR-T Cell Proliferation:** APExo(CAR-T) facilitates CAR-T cell proliferation and activation in vivo by presenting specific antigen and IL-2 on exosomes. This approach successfully expands CAR-T cell populations in murine models.
- 4. Highly Selective Drug Delivery:** Exosomes engineered to present anti-spike antibodies and IFN- β by creating a chimeric molecule with MFG-E8, shows efficacy against SARS-CoV-2 pseudovirus infection. In addition, they selectively convey IFN- β to infected cells, inducing targeted antiviral responses.

These developments showcase the potential of engineered exosomes in immunomodulation and targeted therapy, offering avenues for combating cancer, infectious diseases, autoimmune disorders, and allergies with reduced side effects.