

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：エクソソームをハイジャックする革新的核酸医薬品の開発と肺癌治療への展開

Development of Novel Exosome-Hijacking Nucleic Acid Drugs for Treatment of Lung Cancers

研究開発実施期間：令和6年5月1日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：山吉 麻子

Asako Yamayoshi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京科学大学 生命理工学院 教授

Department of Life Science and Technology, Institute of Science Tokyo, Professor

II 研究開発の概要

これまでに我々は、生体制御系に大きな役割を果たしている細胞外小胞の一種であるエクソソームを利用した『エクソソーム随伴型核酸医薬』を独自に開発してきた（特許第7193083号）。この手法は、「エクソソームに結合しハイジャックする抗体（ExAb）」に「核酸医薬」が搭載された「抗体結合型核酸医薬（ExHijack-Oligo）」を用いるものである。ExHijack-Oligoは、がん細胞から分泌された内在性エクソソームの表面に結合した後、エクソソームに随伴して受容細胞に核酸医薬が導入され、標的遺伝子の機能を制御する。本法は、細胞内に含まれる内在性遺伝子だけでなく、エクソソームに含まれるmicroRNA（エクソソーム由来miRNA）の機能制御も可能であることを既に見出しており、これまでに肺癌細胞、口腔上皮がん細胞の増殖抑制に成功している（Pharmaceutics, 2020; Chem. Pharm. Bull., 2023; 続報作成中）。本法は、抗体結合型核酸医薬（ExHijack-Oligo）を投与するだけで体液中のエクソソームに随伴して核酸医薬の細胞内送達を可能とするため、エクソソームを単離・精製してさらに薬物を封入するという複雑かつ難解なプロセスを必要とせず、これまで抗体薬物複合体（ADC）技術で確立されたプロセスをある程度転用することが可能であり、エクソソームをデリバリー担体として直接活用する場合よりも産業応用へのハードルは低い。また、我々は近年、このExHijack-Oligoが原発性腫瘍だけでなく転移性腫瘍にも集積する性質を見出した。そこで本研究では、ExHijack-Oligoのがん細胞への集積メカニズムを明確化すると共に、遺伝子抑制効果及び抗腫瘍効果を指標に肺癌治療への展開を目指した。さらに、DDS評価研究者との密な連携のもと、さらなるExHijack-Oligo分子設計の最適化、高機能化について検証した。

1. 腫瘍組織内を効率的に浸透するExAbならびにExHijack-Oligoの分子形状の決定

1-1) ヒト化ExAb、低分子化ExAbの作製

本法の臨床外挿性を高めるため、ExAb抗体のヒト化を行った。複数のクローンを検討した結果、従来型ExAb（ラット由来抗CD63抗体）よりも高いヒト化ExAbを獲得することに成功した。また、細胞内導入効率の向上や腫瘍組織内の浸透性改善のため、ヒト化ExAbを低分子化した断片化抗体を作製した。

1-2) 肺がん細胞由来エクソソーム特異的抗体の作製

肺がん細胞由来エクソソームで免疫する独自手法により、肺がんエクソソームを認識する抗体を複数クローン作製した。作製したクローンのうち2つのクローンで、肺がん細胞（HARA-B細胞）に選択的に細胞内取込能を示すクローンを得ることに成功した。現在、東京科学大学にて肺がん細胞（A549細胞・HARA-B細胞）への導入効率評価および担がんマウスへ投与時の腫瘍集積能について評価中である。また、プロテオミクス解析により得られた肺がん細胞エクソソーム抗体の抗原の同定を行っているところである。

1-3) ヒト化 ExAb および低分子化 ExAb の腫瘍組織内浸透性の評価

項目 1-1 で作製されたヒト化 ExAb あるいは低分子化 ExAb に蛍光標識を施し、細胞内取込効率・腫瘍組織浸透性を評価した。完全長ヒト化抗体については、プロジェクト開始時より従来型 ExAb（ラット由来抗 CD63 抗体）よりも高いヒト化 ExAb を獲得することに成功していたが、より高い細胞内取込を示すヒト化 ExAb を獲得することに成功した。得られたクローンに蛍光標識を施し、担がんマウスにおける臓器分布を評価した。実験に使用する担がんマウスについて、DDS 評価研究者の安永教授と相談しながら種々検討し、まずは皮下腫瘍モデル（肺がん）でなく腹膜播種モデル（胃がん）で評価を行った。その結果、新たに作製したヒト化 ExAb（抗 CD63 抗体）は高い腫瘍集積性を示すことが確認された。また、上述したヒト化 ExAb を低分子化した断片化 ExAb の作製を行った。得られた断片化 ExAb を蛍光標識し、細胞内導入効率を評価したところ、高い細胞内取込を示すクローンを得ることに成功した。

1-4) ExHijack-Oligo の腫瘍組織内浸透性の評価

項目 1-3 で最適化された ExAb を ExHijack-Oligo に搭載し、蛍光標識を施した後、上述と同様に担がんマウスにおける腫瘍組織浸透性を評価した。その結果、新たに作製したヒト化 ExAb 搭載型 ExHijack-Oligo についても高い腫瘍集積性を示すことが確認された。また、項目 1-3 で最適化された ExAb を低分子化した断片化 ExHijack-Oligo を作製し、これに蛍光標識を施した後、細胞内導入効率を評価した。その結果、断片化 ExAb のうち Variant1 を搭載した ExHijack-Oligo を用いた場合に高い細胞内取込が認められた。

2. ExAb ならびに ExHijack-Oligo の動態解析と分子形状の最適化

2-1) 放射性核種/長波長蛍光分子搭載 ExAb の動態解析

PET 解析は、同一個体における時空間分解能の高い動態データを取得可能であり、大きな固形腫瘍だけでなく、小さな転移巣などへの分布も正確に評価することが可能である。先述したように、ExHijack-Oligo の腫瘍集積メカニズムが明らかとなっていないため、これを解明するために放射性核種を搭載した ExAb を作製し、担がんマウス投与後における経時的、3次元変動を捉える時空間分析評価を行うことを目指した。本実験項目は向井准教授（長崎大学）との連携により遂行した。

放射性核種としては Cu-64 を採用し、ExAb にキレーターを介して搭載した。CD63 を高発現する PC3 細胞（ヒト前立腺がん）由来エクソソームと Cu-64 標識 ExAb をマウスに共投与し、全身の PET 解析を行った結果、エクソソームの動態に類似したプロファイルを示すことが見出された。

またさらに詳細な in vivo PK/PD 解析ならびに腫瘍内での局在解析のため、高感度長波長蛍光分子を標識した ExAb を作製し、細胞内取込ならびに臓器分布の評価を目指した。DDS 評価研究者である安永教授（国立がん研究センター）・花岡教授（慶應義塾大学）が開発された長波長蛍光分子（SiR680）を選択し、これを ExAb に標識した。SiR680 標識 ExAb の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、細胞内に有意に取り込まれ、細胞質中に局在することが認められた。

3. DDS 評価研究課題との連携

3-1) ExAb ならびに ExHijack-Oligo の組織浸潤性向上のためのイオン液体の選定

現行の ExHijack-Oligo（非共有結合型リンカー）の場合、D-オリゴアルギニンをリンカーとして採用導入し、静電的作用によって核酸を抗体に搭載しているが、石田教授（徳島大学）の開発されたイオン液体を用いることで、アルギニン化抗体と核酸医薬との静電的相互作用が向上される結果を得た。そこでこれを A540 細胞に添加し、細胞内局在を観察したところ、核酸の細胞内送達効率自体は向上したが、その効果はエクソソーム非依存的であることが見出された。他のイオン液体についても検討したが、同様の結果が得られたため、2024 年度で一旦、本項目の実施を中止することとなった。

3-2) 放射 ExAb ならびに ExHijack-Oligo の動態解析ならびに改善のための放射性核種/長波長蛍光分子の選定と解析放射核種

項目 2-1 で述べたように、PET 解析のため、放射性核種（Cu-64）を標識した ExAb ならびに ExHijack-Oligo を調整した。先述のように、CD63 を高発現する PC3 細胞（ヒト前立腺がん）由来エクソソームと Cu-64 標識 ExAb をマウスに共投与し、全身の PET 解析を行った結果、エクソソームの動態に酷似したプロファイルを示すことが見出された。

また、長波長蛍光剤（SiR680）標識 ExAb ならびに ExHijack-Oligo についても、項目 2-1 に記載したように合成を進めた。その際、抗体の SH 基に SiR680 を導入するため、マレイミド基を持つ化合物を新たに合成し、現在、in vivo 評価を進めている。

3-3) がんモデルマウスの選定と ExHijack-Oligo の動態評価

本実験系では、ヒト CD63 陽性エクソソームに ExHijack-Oligo が結合し、体液中を循環して腫瘍へ送達されるシステムを基盤としている。先述したように、本研究で用いている ExAb（抗ヒト CD63 抗体）はマウス CD63 には交差生を持たないため、マウス体液中に存在するマウス CD63 陽性エクソソームには結合せず、移植したヒトがん細胞から放出されるヒト CD63 陽性エクソソームにのみ結合することとなり、皮下移植されたヒトがん細胞からマウス血中に放出されるエクソソーム量が限定されているという課題が見出された。このため、胃がん腹膜播種を新たに採用して検証した。さらに、皮下移植モデルについては移植する細胞株の再検討を行うことで、腫瘍内での血管新生更新が認められ、ExAb の腫瘍集積効果も顕著に増大することが見出された。

3-3) 高分解能 X 線計測ならびに高感度蛍光計測による ExHijack-Oligo の動態解析

ExHijack-Oligo の腫瘍集積機構の解明、ならびに、がん組織内の薬物動態解析のため、金ナノ粒子標識を施した ExHijack-Oligo を合成し、マイクロ X 線 CT イメージングを行った。本研究項目は権田教授（東北大学）との連携により遂行した。合成した金ナノ粒子標識抗体の細胞内局在を観察したところ、15nm の金ナノ粒子標識抗体を用いた場合に有意な細胞内取込は認められ、金ナノ粒子標識によって ExAb の細胞内取込能が損なわれていないことが確認された。そこで金ナノ粒子標識抗体（15nm）を担がんマウス（腹膜播種モデル）に腹腔投与し、臓器分布を確認したところ、腫瘍選択的な集積が認められた。摘出した腫瘍を高輝度放射光施設 NanoTerasu において解析したところ、金ナノ粒子標識 ExAb が腫瘍深部にまで浸透していることが明らかとなった。

We have previously developed a unique “Exosome-Hijacking DDS” platform utilizing exosomes, a type of extracellular vesicle that plays a major role in biological regulatory systems (Figure 1). This approach employs an “antibody-oligonucleotide conjugate therapeutic (ExHijack-Oligo),” in which a “nucleic acid therapeutic” is linked to an “exosome-binding and hijacking antibody (ExAb).” After ExHijack-Oligo binds to the surface of endogenous exosomes secreted from cancer cells, the nucleic acid therapeutic is delivered into recipient cells in association with the exosomes, thereby regulating the function of target genes. We have already demonstrated that this method can regulate not only endogenous intracellular genes but also the function of microRNAs contained within exosomes (exosome-derived miRNAs). Using this strategy, we have successfully suppressed the proliferation of lung cancer cells and oral epithelial cancer cells (Pharmaceutics, 2020; Chem. Pharm. Bull., 2023; follow-up study in preparation).

Because this method enables intracellular delivery of nucleic acid therapeutics simply by administering ExHijack-Oligo, which then associates with circulating exosomes in body fluids, it does not require the complicated and technically demanding processes of exosome isolation, purification, and drug loading. Moreover, the platform can partially leverage manufacturing processes already established for antibody–drug conjugate (ADC) technologies, thereby presenting a lower barrier to industrial application compared with approaches that directly utilize exosomes as delivery carriers.

In recent years, we have further discovered that ExHijack-Oligo accumulates not only in primary tumors but also in metastatic tumors. Therefore, in this study, we aimed to clarify the mechanism underlying the accumulation of ExHijack-Oligo in cancer cells and to explore its application for lung cancer therapy by evaluating gene-silencing activity and antitumor efficacy. In addition, through close collaboration with researchers specializing in DDS researchers, we investigated further optimization and functional enhancement of the molecular design of ExHijack-Oligo.

1. Optimization of ExAb and ExHijack-Oligo for tumor penetration

To improve the clinical applicability of ExHijack-Oligo, we generated humanized ExAb antibodies and fragmented ExAb variants. Several humanized ExAb clones exhibited higher intracellular uptake than the conventional rat-derived anti-CD63 antibody. Fluorescent imaging studies in tumor-bearing mice demonstrated high tumor accumulation of the newly developed humanized ExAb.

In parallel, we established multiple antibodies recognizing lung cancer cell-derived exosomes using our original immunization method. Among them, two clones selectively showed intracellular uptake into lung cancer cells (HARA-B cells). Their tumor-targeting ability in vitro and in vivo is currently under evaluation, and antigen identification is ongoing through proteomic analysis.

Furthermore, optimized humanized ExAb ExAb were incorporated into ExHijack-Oligo. The humanized ExAb-conjugated ExHijack-Oligo showed efficient tumor accumulation and intracellular delivery.

2. Pharmacokinetic analysis and structural optimization of ExAb and ExHijack-Oligo

To clarify the tumor accumulation mechanism of ExHijack-Oligo, we performed in vivo pharmacokinetic analyses using radiolabeled and long-wavelength fluorescently labeled ExAb. PET imaging with Cu-64-labeled ExAb revealed a biodistribution profile similar to that of exosomes following co-administration with exosomes derived from CD63-high PC3 prostate cancer cells, suggesting that ExAb associates with exosome dynamics in vivo.

In addition, to enable more detailed PK/PD and intratumoral localization analyses, ExAb was labeled with the long-wavelength fluorescent probe SiR680, developed by Professors Yasunaga and Hanaoka. Confocal laser microscopy demonstrated efficient intracellular uptake of SiR680-labeled ExAb and its localization within the cytoplasm.

3. Collaboration with DDS evaluation researchers

To further optimize ExHijack-Oligo, we collaborated closely with DDS researchers to improve tissue penetration, analyze in vivo dynamics, and establish appropriate tumor models.

First, ionic liquids developed by Professor Ishida were evaluated to enhance electrostatic interactions between arginine-modified antibodies and nucleic acids in the non-covalent ExHijack-Oligo system. Although several ionic liquids improved intracellular delivery efficiency in A549 cells, the effect was found to be exosome-independent, and this approach was therefore discontinued in 2024.

Next, PET imaging and fluorescence-based analyses were conducted using Cu-64- and SiR680-labeled ExAb/ExHijack-Oligo. Cu-64-labeled ExAb exhibited biodistribution profiles closely resembling those of exosomes in vivo. In parallel, SiR680-labeled probes were synthesized using newly designed maleimide compounds for SH-specific antibody labeling, and in vivo evaluation is currently ongoing.

To optimize tumor models for ExHijack-Oligo evaluation, we investigated the limitations of the current system, in which the anti-human CD63 ExAb selectively binds only human cancer cell-derived exosomes but not mouse CD63-positive exosomes. Because subcutaneous xenograft models produced limited levels of circulating human exosomes, a gastric cancer peritoneal dissemination model was introduced. In addition, optimization of implanted cell lines in subcutaneous models enhanced tumor angiogenesis and significantly improved tumor accumulation of ExAb.

Finally, to investigate intratumoral distribution mechanisms, gold nanoparticle-labeled ExAb was synthesized and analyzed using micro-X-ray CT imaging and synchrotron-based imaging at NanoTerasu. The 15 nm gold nanoparticle-labeled ExAb showed efficient intracellular uptake and selective tumor accumulation in tumor-bearing mice. High-resolution imaging further demonstrated deep penetration of ExAb into tumor tissues.