

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名： エクソソーム改変技術を用いた新規ドラッグデリバリーシステムの開発
3. 研究開発代表者： 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 分子細胞治療研究分野 研究員 吉岡祐亮
4. 研究開発の成果

研究背景と概要

現在、がん治療において、核酸医薬品や抗体医薬品などの分子標的医薬品の開発が盛んに行われており、その治療効果が期待されている。実際、マウスを用いた治療効果の測定では一定の評価が得られている。しかし、それら評価は腫瘍局所に投与したりして評価している場合もあり、局所投与に限定されるのが現状である。しかし、ヒトの治療を想定した場合、局所投与可能な場合はほとんどなく、開発した医薬品を患部局所に効率的に送達するデリバリーシステムの開発が必要である。本研究は、現在急成長を遂げているバイオ医薬品を安全かつ特定の組織・細胞に高効率で届けるために、エクソソームという脂質二重膜を有する細胞由来の小胞顆粒に着目したデリバリー技術の開発を目的とする。すなわち、細胞から分泌されるエクソソームをキャリアーとし、特定のタンパク質やmicroRNA (miRNA) もしくは合成核酸を内包させ、治療を行う新規医薬品の創出である。そのためには特定の組織・細胞へ送達するために必要な分子群および治療標的分子を内包させたエクソソームを作製する技術の開発が必要である。また、生体由来エクソソームを医薬品として用いるための品質規格や安全面の評価を行う必要もある。27年度はエクソソームを利用した医薬品開発の実現性を高めるため、エクソソームの内包物、特にmiRNAとタンパク質について解析を行い、継代数による品質の変化を確認した。また、エクソソーム指向性決定因子を明らかにするため、エクソソームタンパク質の網羅的解析を行い、いくつか候補タンパク質を挙げたのち、それらタンパク質の発現抑制株の作製および、それら細胞株由来エクソソームの体内動態を解析した。その他、磁気ビーズと抗体を用いたエクソソーム回収法の開発や糖鎖修飾によるマウス体内の安定性および動態解析を行った。

研究成果

1. エクソソーム指向性決定因子の同定

脳に集積しやすいエクソソームのタンパク質について網羅的に解析を行った。それらタンパク質群から候補を挙げ、候補タンパク質について機能解析を行った。これらタンパク質を利用した改変エクソソームの作製の準備として、細胞内で標的分子の発現を抑制した細胞株を作製した。発現を抑制した細胞から回収したエクソソームにおける標的タンパク質量の減少を確認後、マウスに投与すると、エクソソームの体内動態が変化する可能性を示唆するデータが得られた。特に肺への取り込みが減少するデータが得られた。肺への取り込みが減少した分のエクソソームが、どの臓器へ取り込まれたかは不明であり、今後検討する必要がある。また、腫瘍への取り込みについても検討する。

2. エクソソームの品質管理

4つの異なる患者由来の間葉系幹細胞の継代数が異なる2つの時期の細胞由来のエクソソーム(計8種類)をmiRNAのマイクロアレイとLC-MS/MSを用いて網羅的にmiRNAとタンパク質

を解析した。予備検討として、エクソソームの回収量を比較したが、同一細胞株では、継代数によるエクソソーム分泌量の変化は平均値から±15%程度と少ないが、細胞株間では、分泌量の差が1.5倍以上あった。網羅的解析の結果、脂肪由来間養系幹細胞のエクソソームの内包物は、少ない継代数では、変化が少ないことが明らかとなった。ただし、全く同じ内包物を示すとは限らないことも明らかとなった。

3. エクソソーム回収法の検討および開発

磁気ビーズと抗体を利用して、がん細胞特異的なエクソソームに存在する CD147 選択的なエクソソームの解析を行った。ビーズとエクソソームの結合を外す方法として、酸による溶出と、加熱による溶出を検討したが、酸による溶出では、エクソソームマーカーである CD9 が検出されず、加熱処理のみ検出可能であった。しかし、この溶出方法では、エクソソームが壊れている可能性が高く、今後はインタクトな状態でエクソソームを回収する方法の検討も必要である。また、エクソソーム回収法を改良して、回収効率を上げているが、劇的な回収効率の向上は得られなかった。

4. 糖鎖修飾によるエクソソームの取り込み率の検討

前年度の結果から、N型糖鎖修飾やシアル酸が細胞への取り込み効率に関与していることが明らかになっており、銀染色の結果から、糖鎖修飾を受けているエクソソームタンパク質は主に120kDaと80kDaのタンパク質であることが明らかになっている。27年度は、これら120kDaと80kDaの糖鎖修飾が多く施されているタンパク質をプロテオーム解析から2種類同定し、糖鎖の有無を確認した。同定した糖鎖タンパク質の発現を抑制した細胞から回収したエクソソームをマウスに投与すると、エクソソームの体内動態が変化する可能性を示唆するデータが得られた。