

98. 炎症性疾患治療に資する機能性エクソソーム製剤の開発

高橋 有己

京都大学 大学院薬学研究科 病態情報薬学分野

Key words : マクロファージ, 間葉系幹細胞, アジュバント

緒言

炎症は免疫関連細胞を始めとする多数の細胞が関係した生体応答であり、細胞間での情報伝達が重要である。マクロファージは、炎症において重要な役割を果たす細胞であり、抗炎症治療法の開発における主要な標的細胞である。マクロファージは刺激の種類に応じて、炎症を促進する M1 マクロファージか、抗炎症作用を有する M2 マクロファージに分化する。従って、マクロファージを標的とする抗炎症治療法を開発する場合、M1 マクロファージの機能を抑制することが重要である。

エクソソームは種々の細胞から分泌されるタンパク質や核酸を内包する膜小胞であり、エクソソームを取り込んだ細胞にその内容物を送達する細胞間物質輸送機構の一つである。近年、エクソソームの機能解明を目的とした研究が盛んに行われており、炎症に関しては間葉系幹細胞由来エクソソームによる抗炎症作用が報告されており、エクソソームに内包される microRNA やタンパク質がその抗炎症作用の活性本体であることが報告されている。また、エクソソームの性質は産生する細胞に由来することが知られていることから、抗炎症能を示す細胞である M2 マクロファージが産生するエクソソームは抗炎症能を有しうることが期待できる。従って、このような性質を有するエクソソームを抗炎症物質のキャリアとすることで、相加効果を発揮するのではないかと期待できる。私はこれまでに、エクソソームを利用したドラッグデリバリーシステムの開発にはエクソソームの体内動態制御法の確立が必須と考え、これを実現するための第一段階としてエクソソーム体内動態の定量的解析に取り組んできた。これまでに、エクソソーム移行性タンパク質 lactadherin (LA) とレポータータンパク質との融合タンパク質を利用したエクソソーム標識法を新たに開発し、これを利用したエクソソーム体内動態の定量的解析法の開発に成功した¹⁾。その結果、静脈内投与されたエクソソームは、その産生細胞の由来を問わずマクロファージに取り込まれることを見出した²⁾。マクロファージは炎症治療における主たる標的細胞の一つであることから、この結果はエクソソームを利用したマクロファージへの抗炎症物質の薬物送達キャリアの開発の可能性を示すものであると考えられた。以上の背景から、抗炎症作用が期待できる M2 マクロファージあるいは間葉系幹細胞由来エクソソームを用いた抗炎症治療法の開発の可能性について検討を行った。

方法、結果および考察

1. 間葉系幹細胞からのエクソソーム回収

雄性の ICR マウス (7 週齢) より精巢上体脂肪組織を回収し、コラゲナーゼ処理を行った後、接着細胞を回収することで脂肪由来幹細胞 (ASC) を回収し、間葉系幹細胞として用いることとした。回収した ASC を脂肪細胞分化誘導培地あるいは骨細胞分化誘導培地で培養したところ、それぞれ脂肪細胞および骨細胞へと分化することを確認できたことから、回収した ASC は分化能を有する間葉系幹細胞であることを確認した。別途、幹細胞表面抗原特異的抗体を用いて免疫染色を施したのち、フローサイトメトリーにより幹細胞特異的表面抗原を有していることも確認した。そこで、回収した ASC を 1.2×10^6 cells/dish の細胞数で 5 枚の 15 cm dish に播種し、エクソソーム回収用培地を加えて 24 時間培養後の培養上清より、超遠心沈降法にてエクソソームの回収を試みた。回収したエクソソームの総量はブラッドフォード法でタンパク質量を定量することで見積もった。その結果、回収できるエクソソーム量は非常に少なく、回収回ごとに回収量のばらつきも大きく、時には $1.5 \mu\text{g}$ 以下のエクソソームしか回収できないこともあった。以上のような

結果より ASC より回収されるエクソソームを用いた検討の実施は困難であると考え、間葉系幹細胞由来のエクソソームを用いた検討は行わないこととした。

2. M1 および M2 に分化したマクロファージからのエクソソーム回収

マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 (RAW) 細胞をモデルのマクロファージとして選択し検討に用いた。RAW 細胞をリポ多糖 (LPS) およびインターフェロン- γ (IFN γ) 存在下で培養することで M1 に、インターロイキン 4 (IL-4) 存在下で培養することで M2 へと分化させた。それぞれ M1 および M2 へと分化していることをマーカー遺伝子の mRNA 発現レベルを測定することで確認した (図 1)。

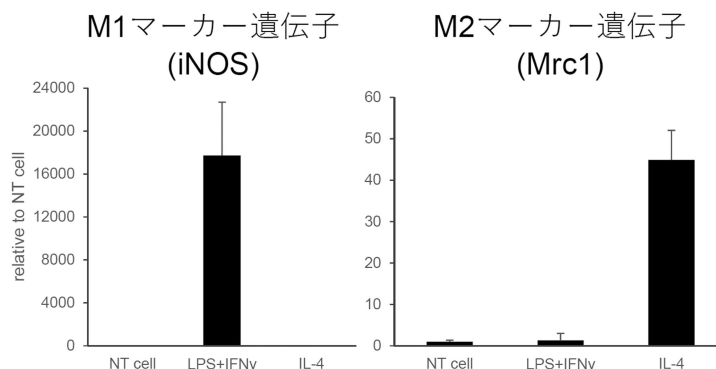


図 1. RAW 細胞の M1 および M2 への分化の確認

通常状態の RAW 細胞、M2 へと分化させた RAW 細胞、および M1 へと分化させた RAW 細胞よりエクソソームを回収した。それぞれ、Normal exo、M2 exo、M1 exo と表記することとする。

回収したエクソソームを RAW 細胞に添加し、その分化状態に与える影響の評価を目的として、M1 および M2 のマーカー遺伝子の mRNA 発現レベルを定量した。その結果、いずれのエクソソームも RAW 細胞をどちらかという M1 へと傾けることが明らかとなった (図 2)。

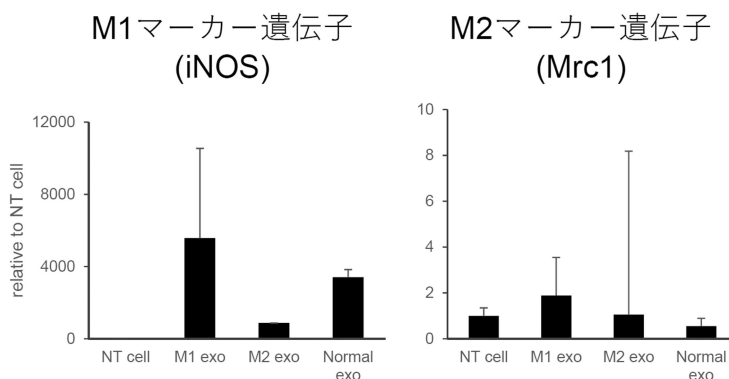


図 2. RAW 細胞へのエクソソーム添加による影響

続けて、RAW 細胞にエクソソームを添加した後、LPS で刺激後の腫瘍壊死因子 (TNF) - α 産生量を指標にその抗炎症能を評価したところ、種類を問わずエクソソームの添加による TNF- α 産生の抑制効果は確認されなかった。一方で、M1 exo は免疫活性化能を示しうる可能性が示唆されたことから、免疫賦活化剤としての利用の可能性について検証を行うこととした。

モデルの抗原提示細胞としてマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞を選択し、これに Normal exo あるいは M1 exo を添加後の炎症性サイトカインであるインターロイキン (IL) -6 産生量を指標にその免疫賦活化能を評価した。その結果、Normal exo の添加ではほとんど IL-6 は産生されなかった一方で、M1 exo を添加することで有意な IL-6 産生が認められた (図 3)。

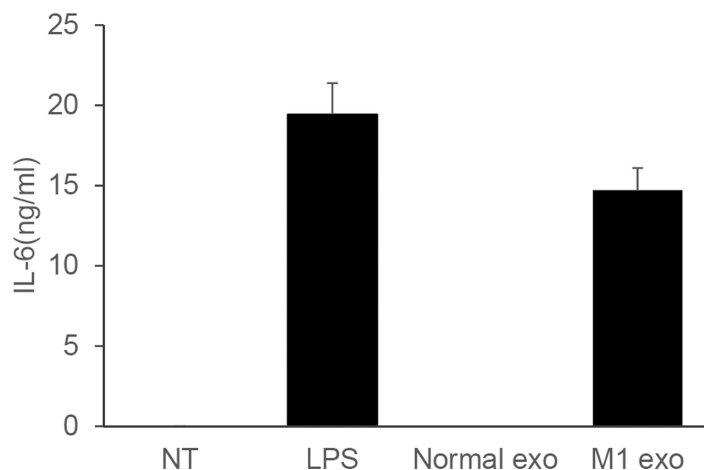


図 3. エキソソームを添加後の DC2.4 細胞からの IL-6 産生

そこで、モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) を選択し、DC2.4 細胞による OVA の抗原提示能について OVA クラス I 抗原反応性 T 細胞ハイブリドーマ、CD8 OVA1.3 細胞からの IL-2 産生を指標に DC2.4 細胞による抗原提示能について評価を行った。その結果、M1 exo を OVA とともに DC2.4 細胞に添加することで、CD8 OVA1.3 細胞からの IL-2 産生が大幅に増加した (図 4)。

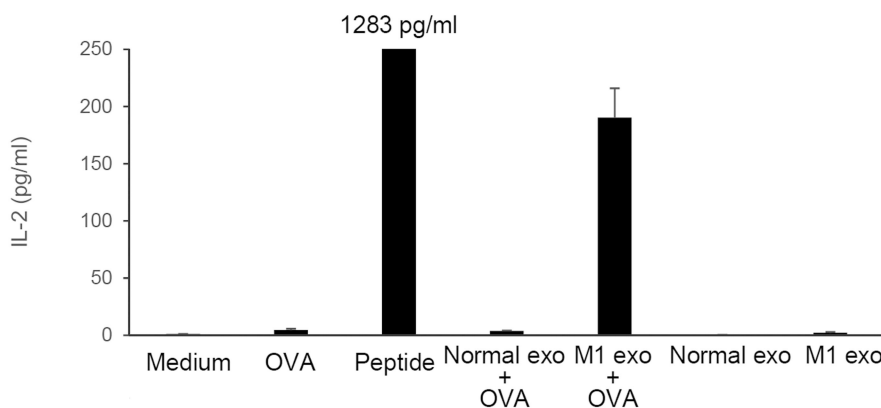


図 4. エキソソームを添加した DC2.4 細胞と CD8 OVA1.3 細胞との共培養後の上清中 IL-2 濃度

これは、M1 exo が免疫賦活化剤として機能したために、DC2.4 細胞による OVA の抗原提示能が増強された結果を示すものと考えられる。

以上、本研究では、M1 へと分化したマクロファージから産生されるエキソソームが免疫賦活化作用を有しており、抗原提示細胞による抗原提示能を増強可能であることを明らかとした。本研究で得られた知見はエキソソームを利用した免疫療法の開発に有用な知見をもたらすものと期待する。

共同研究者

本研究の共同研究者は京都大学大学院薬学研究科の高倉喜信、西川元也、Charoenviriyakul Chonlada、有泉侖一である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) 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. *J Biotechnol.* 2013;165:77-84. doi: 10.1016/j.jbiotec.2013.03.013. PubMed PMID: 23562828
- 2) Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Yamashita T, Matsumoto A, Charoenviriyakul C, Takakura Y. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:26238. doi: 10.3402/jev.v4.26238. PubMed PMID: 25669322