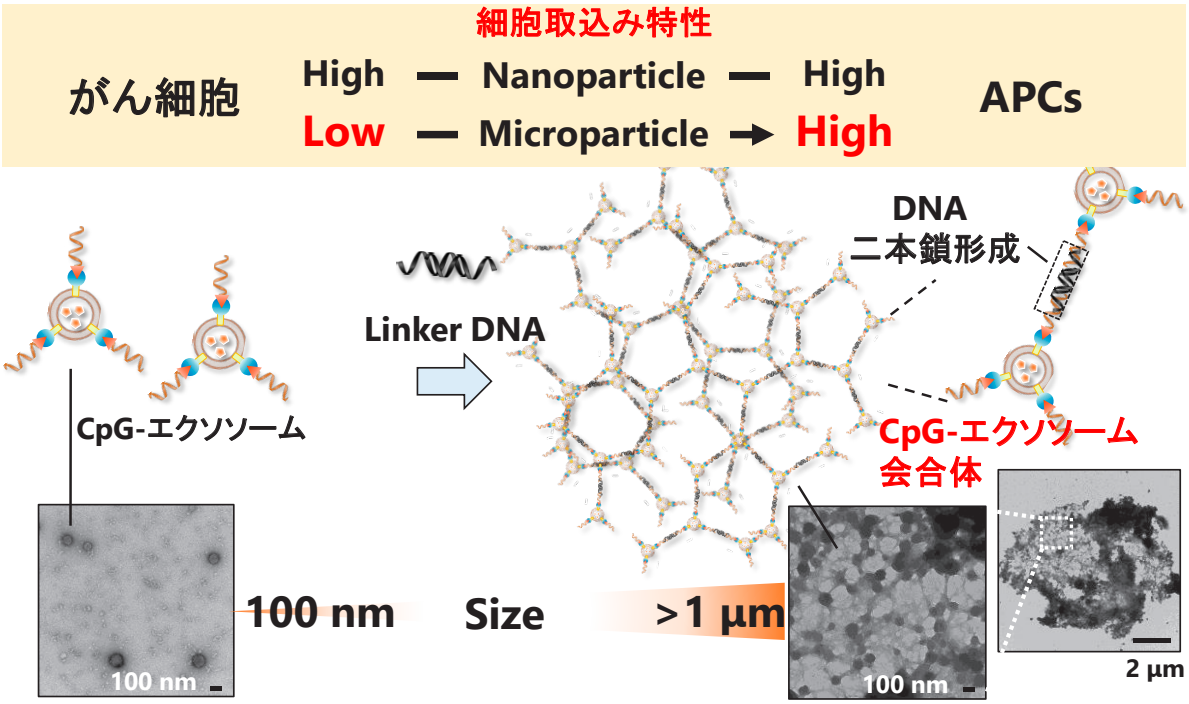
84　エクソソーム動態解析に基づくデリバリーシステム開発	髙倉　喜信

【目的】エクソソームは核酸やタンパク質を内包する粒子径 100 nm 程度の脂質膜小胞であり、内包物を遠隔の細胞に送達する内因性輸送担体であることから、近年エクソソームを利用した治療薬、あるいはドラッグキャリアとしての利用が期待されている。その実現に向けて解決すべき重要な課題の一つとしてエクソソームの体内動態特性の把握とその制御に基づく疾患治療法の開発が挙げられる。研究代表者はこれまでにエクソソームがマクロファージをはじめとした抗原提示細胞（APC）に取り込まれやすいという性質に着目し、癌抗原を内包する癌細胞由来エクソソームを利用した癌ワクチン療法の開発に取り組み、エクソソームに免疫賦活剤である CpG DNA を搭載した CpG エクソソームが抗腫瘍免疫誘導に有用であることを見出した。一方でその過程において、腫瘍組織に局所投与後のエクソソームの動態を解析したところ、標的である APC 以外への取込みが明らかとなった。抗原特異的免疫反応を誘導するためには、APC への送達が重要である。ナノ粒子はサイズ増大に伴い、APC に取り込まれやすくなる一方で、他細胞には取り込まれにくくなる。そこで、エクソソームが APC へと細胞選択的に送達されるよう、サイズ増大を目的として CpG エクソソームを DNA の相補鎖形成能で連結した CpG エクソソーム会合体を調製し、会合体化による抗腫瘍免疫誘導の増強について評価した。

【方法】エクソソーム会合体の形成は透過型電子顕微鏡観察により確認した。培養細胞系にて、APC ならびに非 APC による取込みを、FACS 法により確認した。担癌モデルマウスを用いて、エクソソームならびにエクソソーム会合体投与後の抗腫瘍免疫誘導ならびに抗腫瘍効果を評価した。

【結果】平均粒子径 1〜10 μm 程度のエクソソーム会合体の形成を確認した。エクソソーム会合体はエクソソームと比べて APC への取り込みが 2 倍程度増大した一方で、癌細胞への取り込みは半分程度に減少した。担癌モデルマウスを用いた治療実験では、エクソソーム会合体はエクソソームに比較して有意に腫瘍の成長を遅延させた。

DNA 会合体形成による細胞取り込み特性の制御のイメージ図



84. エクソソーム動態解析に基づくデリバリーシステム開発

髙倉　喜信

京都大学 大学院薬学研究科 病態情報薬学

Key words：エクソソーム，CpG DNA，APC，免疫誘導

緒　言

エクソソームは核酸やタンパク質を内包する粒子径 100 nm 程度の脂質膜小胞であり、内包物を遠隔の細胞に送達する内因性輸送担体であることから、近年エクソソームを利用した治療薬、あるいはドラッグキャリアとしての利用が期待されている。その実現に向けて解決すべき重要な課題の一つとしてエクソソームの体内動態特性の把握とその制御に基づく疾患治療法の開発が挙げられる。研究代表者はこれまでにエクソソームがマクロファージをはじめとした抗原提示細胞（APC）に取り込まれやすいという性質に着目し、癌抗原を内包する癌細胞由来エクソソームを利用した癌ワクチン療法の開発に取り組み、エクソソームに免疫賦活剤である CpG DNA を搭載した CpG エクソソームが抗腫瘍免疫誘導に有用であることを見出した。一方でその過程において、腫瘍組織に局所投与後のエクソソームの動態を解析したところ、標的である APC 以外への取込みが明らかとなった。抗原特異的免疫反応を誘導するためには、主たる抗原提示細胞である APC への効率的な送達が重要である。ナノ粒子はサイズ増大に伴い、樹状細胞により取り込まれやすくなる一方で、他細胞には取り込まれにくくなる。そこで、エクソソームが APC へと細胞選択的に送達されるよう、サイズ増大を目的として CpG エクソソームを DNA の二本鎖形成により連結した CpG エクソソーム会合体を調製し、会合体化による抗腫瘍免疫誘導の増強について評価した。その結果、DNA の二本鎖形成能を利用することで、CpG エクソソーム会合体の調製が可能であり、CpG エクソソームを会合体化することで、非 AP　C 細胞によるエクソソーム取込みの低減と、APC によるエクソソーム取込みの増加、さらにはその免疫活性化能を増強可能であることを培養細胞系にて確認した。さらに、担癌マウスを用いた *in vivo* 実験系にて、CpG エクソソームの会合体化により、投与部位での滞留性の向上とエクソソーム投与による抗腫瘍免疫誘導の増強、さらにそれによる抗腫瘍効果の増強が可能であることを明らかとした［1］。

方　法

モデルの癌細胞としてマウスメラノーマ細胞 B16BL6 細胞（B16 細胞）を用いた。ストレプトアビジン（SAV）とエクソソーム指向性タンパク質 Lactadherin の融合タンパク質 SAV-LA を遺伝子導入した B16 細胞より、超遠心法にて SAV 修飾エクソソームを回収したのち、ビオチン修飾 CpG DNA と混合し、CpG DNA 搭載エクソソーム（CpG エクソソーム）を調製した。さらに、CpG エクソソームの CpG DNA 部分に存在する末端部分と相補的な配列を有するリンカーDNA を CpG エクソソームと混合することで、CpG エクソソーム会合体を調製した。会合体の形成は、透過型電子顕微鏡観察により確認した。APC として樹状細胞、非 APC 細胞として B16 細胞を選択し、これに PKH67 色素にて蛍光染色した。CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を添加後の細胞取込みを FACS 法により評価した。CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を樹状細胞に添加後の培養上清中の TNF-α量を ELISA 法により測定することで免疫活性化能を評価した。発光性レポータータンパク質 Gaussia Luciferase（gLuc）と LA との融合タンパク質、gLuc-LA を用いて gLuc 標識した CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を皮内に投与後、経時的に回収した皮膚組織中の gLuc 活性を測定することで、投与部位滞留性を評価した。CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を皮内に投与後、血清を回収し抗 B16 細胞特異的な抗体量を ELISA 法にて測定するとともに、脾臓細胞を回収し B16 細胞で刺激後の IFN-γ産生を ELISA 法にて測定すること

で、B16 細胞特異的な液性免疫ならびに細胞性免疫の誘導を評価した。マウスに B16 細胞を皮内移植することで担癌モデルマウスを作製し、このマウスの腫瘍組織内へ CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を投与後、経時的に腫瘍体積を測定することで抗腫瘍効果を評価した。

結果および考察

1. CpG エクソソーム会合体の調製とその *in vitro* 評価

CpG エクソソームを、リンカーDNA と混合することで、会合体を形成可能であった（図 1）。調製した会合体は、約 1 μm 程度のサイズを有していた。

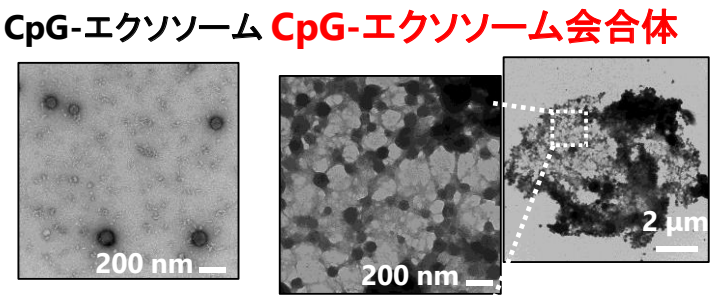


図 1. 透過型電子顕微鏡観察
CpG エクソソーム（左）ならびに CpG エクソソーム会合体（右）の透過型電子顕微鏡観察像。

CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を添加後の細胞取込みを FACS 法により評価したところ、会合体の形成によって APC による取込みは約 2 倍上昇した一方で、非 APC である B16 細胞による取込みは半分程度にまで減少した（図 2）。従って、エクソソームを会合体とすることで、非 APC による取込みを抑制するとともに APC による取り込みを増強可能であることが明らかとなった。

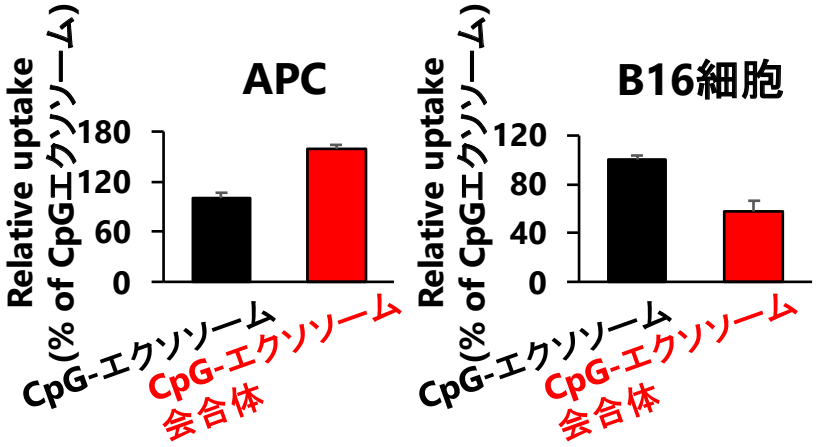


図 2. APC ならびに非 APC（B16 細胞）による取込み評価
FACS 法による APC ならびに非 APC（B16 細胞）による CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体の取込み評価。

さらに、樹状細胞に CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を添加後の TNF-α産生を指標に免疫活性化能を評価したところ、会合体化により免疫活性化能を増強可能であった。これは、取込みの増大を反映した結果であると考えられる。

2. CpG エクソソーム会合体の *in vivo* 評価

gLuc で標識した CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を皮内に投与し、投与部位の滞留性を評価したところ、会合体化により滞留性は有意に向上した。また、CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を皮内に投与後の抗原特異的免疫誘導能を評価したところ、会合体化することで、腫瘍抗原特異的な液性並びに細胞性免疫の誘導を有意に増強可能であった。これは、投与部位の滞留性の向上ならびに APC への送達効率の向上によるものであると考えられる。さらに、マウスに B16 細胞を皮内移植することで作製した担癌モデルマウスの腫瘍組織内へ CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を投与したところ、会合体化により CpG エクソソーム投与に比較して有意に腫瘍増殖が抑制された（図 3）。この結果は、抗腫瘍免疫誘導能の増強を反映したものと考えられる。

以上、本研究では、エクソソームを会合体化することで APC 選択的な送達効率の向上ならびに投与部位滞留性の向上といった、体内動態の制御が可能となることを明らにとした。また、体内動態の制御は、癌細胞特異的な免疫誘導能の増強にも有用であった。本研究の成果はエクソソームの動態制御法の開発、ならびにエクソソームを利用した免疫制御法の開発において有用な知見を供するものである。

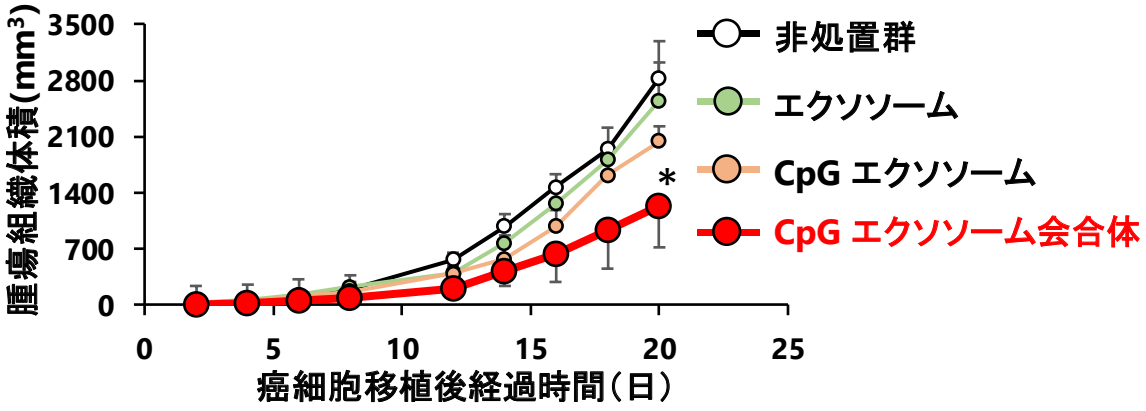


図 3. 抗腫瘍効果の評価

担癌モデルマウスの腫瘍組織内にエクソソーム、CpG エクソソームあるいは CpG エクソソーム会合体を投与後の腫瘍組織体積の経時変化。* $p < 0.05$ vs 他全群（Tukey-Kramer 法により検定）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野の西川元也、高橋有己、松本明宏、有泉伶一である。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） Matsumoto A, Takahashi Y, Ariizumi R, Nishikawa M, Takakura Y. Development of DNA-anchored assembly of small extracellular vesicle for efficient antigen delivery to antigen presenting cells. Biomaterials. 2019 Dec;225:119518. Epub 2019 Sep 25.PMID:31586864 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119518.