

京都大学教育研究振興財団助成事業
成果報告書

平成30年 4月23日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 辻 井 昭 雄 様

所属部局 薬学研究科

職 名 准教授

氏 名 高橋有己

助成の種類	平成29年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究課題名	癌ワクチン療法への応用に向けた多機能性エクソソームデリバリーシステムの開発			
上記以外で助成金を 充当した 研究内容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 日本DDS学会 第11回次世代をになう若手医療薬科学シンポジウム			
成果の概要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会計報告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額 (円)	
		研究消耗品費	700,480	
		RI実験施設使用料	263,520	
TEM走査型電子顕微鏡使用料		36,000		
当財団の助成に ついて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) 助成いただきありがとうございました。			

成果の概要／高橋有己

細胞から分泌されるエクソソーム(Exosome)はタンパク質や核酸等を内包する 100nm 程度の細胞外小胞である。癌細胞由来エクソソームは癌抗原を内包することから、近年癌細胞由来エクソソームを利用した癌ワクチン療法が盛んに研究されている。すなわち、癌細胞由来エクソソームと免疫賦活剤を抗原提示細胞に送達することで誘導される抗腫瘍免疫反応は新たな癌治療法に成り得ると注目されている。効果的な抗腫瘍免疫反応の誘導には投与部位からのコントロールリリース、そしてそれに続く抗原提示細胞への癌細胞由来エクソソームと免疫賦活剤の送達が挙げられる。我々は以前癌細胞由来エクソソームに免疫賦活剤である CpG DNA を標識可能であること、また DNA の相補的相互作用を利用して金ナノ粒子を会合化して効果的に抗原提示細胞を活性化することに成功している。そこで本研究では効果的な抗腫瘍免疫反応を誘導することを目的に、リンカーDNA を介して形成される CpG DNA 修飾癌細胞由来エクソソーム会合体(以下 CpG-Exo 会合体)を調製・評価した。併せて、エクソソームを利用した治療に際しては重要となりうるエクソソームの生産性の向上を目的として、エクソソームの回収に影響を及ぼす要因についても検討した。以下に概略を示す。

1. 癌細胞由来エクソソーム会合体の開発

エクソソーム集合体の調製条件について最適化を行った。最適化したエクソソーム会合体について、培養細胞系を用いて会合体化による影響を評価した後、マウスを用いた *in vivo* 実験系において、会合体化による免疫細胞指向性と投与部位滞留性、免疫活性化能の変化を評価した。

①CpG-Exo 会合体の調製条件の最適化:モデルエクソソーム産生癌細胞であるマウスメラノーマ B16BL6 細胞からエクソソームを回収し、既報の方法に従って CpG DNA 搭載エクソソーム(CpG-Exo)を調製した。CpG-Exo とリンカーDNA を混合して電子顕微鏡で観察すると数 μm 程度の会合体が観察された。そこでリンカーDNA のリンカー長、リンカーDNA と CpG-Exo の混合比を変更した際の CpG-Exo 会合体を電子顕微鏡で観察し、CpG-Exo 会合体の形成効率が高い条件を決定した。

②培養細胞系での評価:蛍光標識 CpG-Exo と CpG-Exo 会合体を抗原提示細胞であるマウス樹状細胞 DC2.4 細胞に添加し、その細胞内取り込みを評価したところ、会合化することで CpG-Exo の DC2.4 細胞への取り込み量が増大した。取り込み阻害剤を用いて取り込み機構を解析した結果、CpG-Exo 会合体はエンドサイトーシスを介して DC2.4 細胞に取り込まれていると示唆された。一方、非抗原提示細胞(マウス線維芽細胞、B16BL6 細胞)で同様の取り込み実験を行うと、CpG-Exo 会合体の非抗原提示細胞への取り込みが CpG-Exo よりも低下した。次に CpG-Exo 会合体の活性化能を評価することを目的に CpG-Exo 会合体を DC2.4 細胞に添加して一定時間後の培養上清中の炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6)量を指標に免疫活性化能を評価した。その結果、CpG-Exo を会合体化することで炎症性サイトカイン量産生が増大した。

③In vivo 評価:蛍光標識した CpG-Exo と CpG-Exo 会合体をマウス皮内投与後、経時的に投与部位の蛍光強度を評価した。その結果、会合体化により CpG-Exo の投与部位滞留性が増大することを明らかにした。さらに投与皮膚組織部位を回収し、種々のサイトカイン(IL-6, IL12-p40)、ケモカイン(CXCL5, CXCL10)の mRNA 量を指標に免疫活性度を評価したところ、CpG-Exo 会合体投与マウスではこれら mRNA 量が有意に増大したことから、その免疫活性化能を増大可能であることを見出した。

以上、エクソソームへの投与部位滞留性の付加および抗原提示細胞指向性を付加した、癌細胞由来 CpG DNA 修飾エクソソーム会合体の開発に成功した。

2. エキソソーム生産性に影響を及ぼす要因の評価

効率的なエキソソームの生産性の改善を目的として、培地体積がエキソソームの回収効率に及ぼす影響について検討した。モデルエキソソーム産生細胞としてマウスメラノーマ B16BL6 細胞を選択し、超遠心法により培地中のエキソソームを回収した。エキソソーム回収量はブラッドフォード法による総タンパク質定量法によって評価した。経時的にエキソソームを回収したところ、回収量は培養後 18 時間で頭打ちとなり、この時間までにエキソソームの細胞からの放出と細胞取り込みが平衡に達したと推察した。次に、回収用培地体積を 20mL、40mL、80mL としたときの 24 時間培養後のエキソソーム回収量を評価した。その結果、エキソソームの総回収量は培地体積に依存して増加した。以上、培地体積を最適化することでエキソソームの生産性を向上可能であることを明らかとした。