消化器がんに対するエクソソームを用いた DDS の開発

京都大学大学院 薬学研究科 病態情報薬学分野*

高橋有己*・高倉喜信*

Development of exosome-based DDS targeting gastrointestinal cancer

Exosomes are membrane vesicles composed of lipid bilayer with diameter of approximately 100 nm and are released from various types of cells. Exosomes work as endogenous intercellular delivery vehicles. Intercellular delivery by exosomes has been demonstrated to be related to the development, progression and metastasis of gastrointestinal cancer. On the other hand, exosomes, endogenous delivery carriers, can be effective DDS targeting gastrointestinal cancer. Here, we describe problems in the development of exosome-based DDS and solutions for the problems and introduce reported examples of exosome-based DDS targeting gastrointestinal cancer.

エクソソームは種々の細胞から放出される、脂質二重膜からなる粒子径100 nm前後の膜小胞であり、内因性の細胞間物質輸送機構として機能している。エクソソームによる物質輸送は消化器がんの発生や増悪、転移にも関与する可能性が示されている一方で、内因性の輸送機構であるエクソソームは消化器がんを標的とした優れた DDS となりえると期待できる。本稿では、エクソソームを利用した DDS についての課題とその解決法について紹介するとともに、これまでに報告されている消化器がんに対するエクソソームを利用した DDS の実例について紹介する。

Yuki Takahashi*, Yoshinobu Takakura*

Keywords: exosome, extracellular vesicles, pharmacokinetics, vaccine

1. はじめに

エクソソームは種々の細胞から放出される、脂質二重膜からなる粒子径100 nm前後の膜小胞であり、産生細胞に由来した核酸やタンパク質を内包する。エクソソームを取り込んだ細胞にはエクソソームの内包物が送達されることから、エクソソームは内因性の細胞間物質輸送機構として機能している。エクソソームによる物質輸送は、がん、神経変性疾患、免疫原性疾患、糖尿病等の代謝性疾患、感染症など、多岐にわたる疾患において重要な役割を果たしていることが明らかとなりつつあり¹⁻⁶⁾、その機能解明を目的とした研究が盛んに行われている。また、産生細胞に由来した物質を内包するエクソソームは、疾患時において病因細胞に由来した物質を内

包しうることから、エクソソームを指標としたバイオマーカーの探索も行われている⁷⁾。加えて、内因性の細胞間物質輸送機構であるエクソソームは天然のデリバリーシステムであることから、優れたドラッグデリバリーシステム(DDS)になりえると期待され、DDS応用を目的とした研究も盛んに行われている。

がんは、日本人の死因の第1位であり、なかでも近年は食生活の欧米化により大腸がん等の消化器がんが増加していることから、治療・診断法の開発が望まれる。がんの発生と転移・増悪においてもエクソソームが関与している可能性が示されており、がん細胞から産生されるエクソソームによるがん細胞自身の増殖・生存の増強や、がん細胞由来エクソソームが血管内皮細胞等に取り込まれることで転移を促進する可能性が報告されている⁸⁾。消化器がんにおいてもエクソソームによるがんの増悪も報告されて

* Department of Biopharmaceutics and Drug Metabolism, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

おり、例えば胃がんにおいてエクソソームが肝転移に関与することが報告されている⁹⁾。がん細胞自身の増殖や転移といった現象に加えて、免疫系へのエクソソームの作用も明らかとなりつつあり、がん細胞から産生されるエクソソームがT細胞、樹状細胞、マクロファージといった種々の免疫細胞に作用することで免疫抑制に関与していることも報告されている¹⁰⁾。一方で、エクソソームを利用したがん治療も期待されており、なかでも DDS 応用が特に期待される。エクソソームを利用した DDS についてはその研究の歴史がまだ浅いことから解決すべき課題は多く存在するが、その有用性を示す報告もなされつつあり、消化器がんを標的とした DDS の今後の開発にも大いに期待できる。そこで本稿では、エクソソームを利用した DDS についての課題とその解決法について筆者らの検討結果を中心に紹介した後、これまでに報告されている消化器がんに対するエクソソームを利用した DDS の事例について紹介したい。

2. エクソソームを利用した DDS の課題と現状

エクソソームを利用した DDS の開発に際しては、エクソソームの産生細胞の選択、調製方法の選択、薬物の搭載法、体内動態の解析と制御等、解決すべき課題が多く存在する(図1)。本項では、エクソソ

ームを利用した DDS の開発に向けたこれら課題についての現状について紹介する。

エクソソームを利用した DDS の開発に際して、体内動態の制御は最重要課題の1つであるが、その実現のために必須となるエクソソームについての体内動態情報は乏しかった。筆者らはエクソソームの体内動態を簡便かつ定量的に評価可能な方法の開発を目的として、エクソソームの標識法の開発に取り組んだ。そこで、発光性レポータータンパク質 Gaussia luciferase (gLuc) とエクソソーム移行性タンパク質 lactadherin (LA) との融合タンパク質 gLuc-LA を設計し、定量性・感度に優れ、*in vivo* イメージングによる体内分布の可視化も可能となる発光を利用したエクソソームの標識法を開発した¹¹⁾。モデルエクソソーム産生細胞としてマウスメラノーマ B16 BL6 細胞を用いて検討を行った結果、マウスの静脈内に投与後、gLuc-LA 標識エクソソームは消失半減期が約2分程度と非常に速やかに血中から消失し、肝臓、脾臓、肺へと移行することを見出した。さらに、検討を進め、肝臓・脾臓に移行したエクソソームはマクロファージに、肺へ移行したエクソソームは血管内皮細胞に取り込まれることを見出した¹²⁾。また、全身のマクロファージをクロロネート封入リポソームにより除去したマウスでは、エクソソームの消失半減期が大幅に延長することも見出し、マクロファージがエクソソームの体内

図1 エクソソームを利用した DDS とその課題のイメージ図

動態に大きな影響を与えていることを実証した。また、マクロファージによる認識に際してはエクソソーム膜に含まれる負電荷リン脂質ホスファチジルセリンに起因した負電荷が、肺血管内皮細胞による認識にはエクソソーム表面タンパク質が関与することも明らかとしている^{13,14)}。gLucの代わりにビオチン結合タンパク質ストレプトアビジン(SAV)をLAと融合したSAV-LAを設計し、これを利用したエクソソームの放射標識法の開発にも成功している¹⁵⁾。他の細胞から産生されるエクソソームの体内動態を評価した検討においても、エクソソームが主に肝臓・脾臓に移行すること、そして血中から比較的速やかに消失することが筆者らを含めた複数の研究グループから報告されており、このような体内動態挙動はエクソソームに共通した性質である可能性が示唆される^{16~18)}。一方で、エクソソーム表面に存在する4回膜貫通タンパク質あるいはインテグリンの種類により臓器指向性が異なるという報告がなされており、産生細胞種によりエクソソームの臓器指向性が異なる可能性も示されている^{19,20)}。今後より詳細な情報が明らかとなることが期待される。

以上のような体内動態情報を基に体内動態の制御について試みた検討も存在し、エクソソーム膜表面タンパク質と動態制御能を有するタンパク質あるいはペプチドとの融合タンパク質の利用が多く報告されている。これまでにこの手法により動態を制御したエクソソームによって脳・腫瘍組織などへのデリバリーが可能であることが報告されている^{21,22)}。また、マクロファージによるエクソソーム認識が負電荷に基づくことから、負電荷高分子を大量投与することでマクロファージによるエクソソーム取り込みを阻害し、エクソソームの腫瘍集積性を向上させた報告も存在する²³⁾。今後はエクソソームの体内動態情報についての検討が進むことで、より優れたエクソソームの体内動態制御法が開発されるものと期待する。

エクソソームの産生細胞はエクソソームの性質に影響を及ぼすために、その選択はDDSとしての利用に際して重要な要因となっている。産生細胞の種類により、エクソソームの物性・表面分子とそれらにより決定される体内動態、内包する核酸・タンパ

ク質・脂質とそれによる生物学的作用等が影響を受けると考えられる。細胞種による体内動態の違いについては前述したが、生物学的作用としては、例えば樹状細胞(DC)由来のエクソソームはmajor histocompatibility complex(MHC)分子を有しDCの抗原提示能を改善すること、間葉系幹細胞(MSC)由来エクソソームは抗炎症作用を有することなどが報告されており^{24,25)}、このような特性が目的とするDDSに及ぼす影響を慎重に検討する必要がある。また、エクソソームの性質のみならず産生量も細胞種により異なることが報告されている。筆者らも5種類の細胞株を用いて検討を行ったところ、細胞種によりエクソソームの産生量が異なることを確認していることから¹⁸⁾、細胞種の選択は生産性の観点からも重要な要因である。

産生細胞に加えてエクソソームの回収方法もその性質に影響を及ぼす。エクソソームの回収方法としては、超遠心法、免疫沈降法、高分子を利用したエクソソーム回収用試薬による沈降、サイズ排除クロマトグラフィー法などさまざまな方法が存在するが、DDS応用を念頭に回収方法の影響について調べた研究は乏しかった。筆者らは、DDS応用を念頭にエクソソームの希釈や抗体の混入が起こらない、超遠心を利用した3種の方法(pelleting法、cushion法、gradient法)と市販のエクソソーム回収用試薬(Exoquick-TC)を用いた方法(precipitation法)を選択し、回収方法の違いがDDS製剤としてのエクソソームに及ぼす影響を評価した²⁶⁾。各方法で回収したエクソソームを透過型電子顕微鏡で観察したところ、超遠心により回収したエクソソームでは100 nm前後の小胞が多数存在したが、エクソソーム回収用試薬を用いて回収したサンプルにおいては、数 μm の大きな凝集体が観察された。超遠心による3つの方法間で回収量の大きな差は認められなかった一方、粒子径分布についてはgradient法において軽度の凝集を示す100 nm以上での分布が他の2つと比較して少なかった。体内動態については方法間で大きな違いは認められなかった。DDS製剤としての利用を念頭に、各エクソソームを孔径200 nmのフィルターで濾過滅菌したところ、gradient法で回収したエクソソームの濾過滅菌後の

回収率は約80%と、50%以下であった他の2つと比較して有意に高かったことから、凝集体が少ないgradient法で回収されたエクソソームは詰まりにくかったものと推察された。一方、gradient法は他の方法と比較して手間と時間を要する方法であることから、今後はより簡便に状態のいいエクソソームを回収可能な方法の開発が望まれる。

3. エクソソームを利用した 消化器がんに対する DDS

エクソソームを利用した DDS はさまざまな疾患に対する適用が期待されるが、なかでもがんはその適用が盛んに研究されている対象疾患であり、消化器がんを対象としたエクソソームを利用した DDS もいくつか報告されている。本項ではこれまでに報告されているエクソソームあるいはそれに類する生体由来小胞を利用した消化器がんを標的とする DDS の事例について紹介する。

内因性の物質輸送機構であるエクソソームは種々の治療用分子の優れた DDS になりえると期待されるが、その利用が最も進展している適用先としてエクソソームを抗原デリバリーに利用するがんワクチン療法があげられる。がん抗原を内包しているがん細胞由来エクソソームは、がん抗原特異的免疫応答の誘導が可能であることから、がんワクチン療法への適用についての研究が昔から行われてきた²⁷⁾。一方で、がん細胞由来エクソソームを利用した免疫療法の実現には、抗原提示細胞である樹状細胞へのエ

クソソーム送達と樹状細胞の活性化と抗原提示が必要となる。これまでのがん細胞由来エクソソームを利用したがん免疫療法の開発を目的とした検討においては、がん細胞由来エクソソームと免疫賦活剤(アジュバント)の同時投与が行われてきたが、同時投与では両者の生体内における別々の挙動や、樹状細胞のアジュバントの取り込み効率の低さから、免疫応答が不十分であった。筆者らは、アジュバントをがん細胞由来エクソソームに搭載することで、がん抗原とアジュバントの樹状細胞への同時送達による抗腫瘍免疫の効率的誘導が可能ではないかと考えた(図2)。免疫刺激性核酸 CpG DNA をアジュバントとして選択し、B16 BL6細胞から回収したエクソソームに CpG DNA を搭載したエクソソームを調製した。エクソソームに CpG DNA を搭載することで、マウス樹状細胞株 DC2.4細胞への CpG DNA とエクソソームとの同時送達が可能であり、腫瘍特異的抗原の提示効率を増強可能であった。また、マウスを用いた *in vivo* 実験系において、CpG DNA 搭載エクソソームは腫瘍抗原特異的細胞・液性免疫を効率的に誘導可能であり、さらに担がんモデルマウスにおいて、強力な腫瘍増殖・転移の抑制効果を示した²⁸⁾。以上の結果はエクソソームにアジュバントを搭載することで、抗腫瘍免疫を効率的に誘導可能であることを示すものである。がん細胞由来エクソソームによるがん免疫療法は、腫瘍抗原の同定と精製を必要としないため、さまざまながん種に対する有効な治療法となる可能性を有する。これまでに消化器がんを対象としたがん細胞由来エクソソームを

図2 CpG DNA 搭載エクソソームによる抗腫瘍免疫誘導の模式図

用いたがん免疫療法の臨床試験も行われており、安全性と抗腫瘍免疫誘導の可能性については実証されたものの効果には改善の必要があることが報告されている²⁹⁾。今回、筆者らが開発したがん細胞由来エクソソームへのアジュバント搭載法が、消化器がんをはじめとした各種のがんに適用可能ながん免疫療法に発展することを期待したい。

エクソソームは内因性に miRNA や mRNA といった核酸の輸送機構として機能していることから、エクソソームを用いた DDS の適用が最も期待される分子として、siRNA や miRNA といった核酸があげられる。肝がんにおいては、miR-122 の発現低下ががんの増悪に関係していることから、脂肪由来幹細胞由来エクソソームを利用した miR-122 の肝がん細胞へのデリバリーが報告されている³⁰⁾。その報告においては、miR-122 を脂肪由来幹細胞由来エクソソームを利用して肝がん細胞に送達することによって、肝がん細胞の抗がん剤感受性を改善可能であることが示されている。また、線維芽細胞より回収したエクソソームを利用した KRAS に対する siRNA の睥がんへの送達も報告されている³¹⁾。エクソソームを利用した核酸 DDS は現在盛んに研究が行われていることから、今後の発展が大いに期待される。

前述した分子に加えて、低分子のデリバリーについても報告されている。エクソソームを利用した DDS を適用された低分子薬物として、抗炎症性薬物である脂溶性分子、クルクミンがあげられる。クルクミン搭載エクソソームをリポ多糖誘発性脳炎モデルマウスに対し経鼻投与することで、エクソソームを介したクルクミンの脳へのデリバリーが可能であり、抗炎症作用が得られることが報告されている³²⁾。植物からもエクソソームに類似したナノ粒子を回収可能であるが、この粒子にクルクミンを搭載し、大腸がん患者へと投与する臨床試験が現在進行中である³³⁾。対象は消化器がんではなく乳がんや肺がんではあるが、パクリタキセルやドキシソルビシンといった抗がん剤の DDS に応用した例も報告されている^{21,34)}。

4. おわりに

エクソソームを利用した DDS についてはすでにごんを対象としたその有用性が実証されつつあり、消化器がんに対しても有用な DDS となりえるものと期待される。今後、革新的なエクソソームを利用した消化器がんへの DDS が開発されることを祈念したい。

文献

- 1) Wu K., et al., *Biochim. Biophys. Acta.*, **1868**, 538-563 (2017)
- 2) Howitt J., et al., *J. Biol. Chem.*, **291**, 26589-26597 (2016)
- 3) Withrow J., et al., *Arthritis Res. Ther.*, **18**, 286 (2016)
- 4) Garcia-Contreras M., et al., *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **21**, 2940-2956 (2017)
- 5) Liberman M., et al., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **998**, 151-160 (2017)
- 6) Fuhrmann G., et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **118**, 56-61 (2017)
- 7) Pant S., et al., *Biochem. Pharmacol.*, **83**, 1484-1494 (2012)
- 8) Azmi A. S., et al., *Cancer Metastasis Rev.*, **32**, 623-642 (2013)
- 9) Zhang H., et al., *Nat. Commun.*, **8**, 15016 (2017)
- 10) Whiteside T. L. J., *Clin. Invest.*, **126**, 1216-1223 (2016)
- 11) Takahashi Y., et al., *J. Biotechnol.*, **165**, 77-84 (2013)
- 12) Imai T., et al., *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 26238 (2015)
- 13) Matsumoto A., et al., *J. Pharm. Sci.*, **106**, 168-175 (2017)
- 14) Charoenviriyakul C., et al., *Mol. Pharm.*, **15**, 1073-1080 (2018)
- 15) Morishita M., *J. Pharm. Sci.*, **104**, 705-713 (2015)
- 16) Smyth T., et al., *J. Control. Release*, **199**, 145-155 (2015)
- 17) Wiklander O.P., *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 26316 (2015)
- 18) Charoenviriyakul C., et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, **96**, 316-322 (2017)
- 19) Rana S., et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **44**, 1574-1584 (2012)
- 20) Hoshino A., et al., *Nature*, **527**, 329-335 (2015)
- 21) Tian Y., et al., *Biomaterials*, **35**, 2383-2390 (2014)
- 22) Liu Y., et al., *Sci. Rep.*, **5**, 17543 (2015)
- 23) Watson D.C., et al., *Biomaterials*, **105**, 195-205 (2016)
- 24) Utsugi-Kobukai S., et al., *Immunol. Lett.*, **89**, 125-131 (2003)
- 25) Zhu Y. G., et al., *Stem Cells*, **32**, 116-125 (2014)
- 26) Yamashita T., et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **98**, 1-8 (2016)
- 27) Tan A., et al., *Int. J. Nanomedicine*, **5**, 889-900 (2010)
- 28) Morishita M., et al., *Biomaterials*, **111**, 55-65 (2016)
- 29) Dai S., et al., *Mol. Ther.*, **16**, 782-790 (2008)
- 30) Lou G., *J. Hematol. Oncol.*, **8**, 122 (2015)
- 31) Kamerkar S., et al., *Nature*, **546**, 498-503 (2017)
- 32) Sun D., et al., *Mol. Ther.*, **18**, 1606-1614 (2010)
- 33) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01294072>(最終閲覧日：2018年9月1日)
- 34) Kim M. S., et al., *Nanomedicine*, **12**, 655-664 (2016)