エクソソーム随伴導入型薬物送達システムの開発

山吉麻子^{a,b}

Development of Novel Drug Delivery System Targeting Exosomal microRNA

Asako Yamayoshi^{a,b}

^aDepartment of Chemistry of Biofunctional Molecules, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University; 1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan; and ^bPREST, Japan Science and Technology Agency (JST); 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan.

(Received August 27, 2019)

Recently, mRNAs and microRNAs (miRNAs) have been identified in exosomes, which can be taken up by neighboring or distant cells. These exosomal-miRNAs may regulate gene expression in recipient cells. miRNAs are a type of non-coding RNA that induce post-transcriptional gene silencing of their target genes and regulate a wide range of biological processes, including apoptosis, differentiation, metabolism, and cell proliferation. According to recent reports, aberrant expression of miRNAs is associated with most pathological disease processes, including carcinogenesis. Therefore circulating onco-miRs are considered as significant therapeutic targets for cancer therapy. However, there is no report to regulate the function of miRNAs in exosomes. In this study, we developed novel drug delivery system using anti-exosome antibody-oligonucleotide conjugates (ExomiR-Tracker) for functional inhibition of circulating miRNAs. The “ExomiR-Tracker” is the world’s first innovative molecule that has targeting property for exosome-recipient cells and specifically delivers nucleic acid medicines to the target cells. We found that ExomiR-Tracker can bind to the surface of exosomes and that the complexes are introduced into exosome-recipient cells then inhibit the activity of miRNA. We showed that ExomiR-Tracker can accumulate in cancerous tumors after intravenous administration. Existing technologies have difficulties for introducing anti-miR into exosomes and extremely low possibility to deliver anti-miR to exosome-recipient cells after intravenous administration. However, we successfully developed useful inhibition technology against exosomal-miRNA.

Key words—exosome; nucleic acid drug; microRNA (miRNA); drug delivery system (DDS)

1. はじめに

がん細胞が分泌する『エクソソーム』と呼ばれる小胞が、がんの転移において重要な役割を果たすことが明らかとなった [Fig. 1 (b)].^{1,2)} エクソソームはがん細胞を含むすべての細胞から分泌される直径 100 nm 程度の小胞であり、発見当初は細胞の不要物的な存在としか認知されておらず、その機能や存在意義などは不明であった。しかし、2007 年に mRNA や microRNA (miRNA) などの遺伝子が内包されて他の細胞へと受け渡されている可能性が示唆され、急激に注目を浴びることとなった。³⁾ とり

わけエクソソームに含まれる miRNA (exosomal-miRNA) は、がんの転移にも深く関与しており、新たな治療標的として注目されている。⁴⁻⁷⁾

miRNA の一般的な機能阻害法として、miRNA に相補的な配列を有する核酸 (anti-miR 核酸) を用いた手法が挙げられる。⁸⁾ しかしながら exosomal-miRNA はエクソソームに内包されているため、ヒト体内に投与された anti-miR 核酸をエクソソーム内に送達するのは困難である。また近年、エクソソームはすべての細胞や臓器に取り込まれるのではなく、その効率に指向性があることが見いだされた。例えば、U251 細胞から採取したエクソソームは、親細胞である U251 細胞へは取り込まれるが、アストロサイトには取り込まれ難く、さらにはこの逆も然りで、アストロサイトから採取したエクソソームは親細胞であるアストロサイトへは取り込まれるが U251 細胞には取り込まれ難いという現象

^a長崎大学大学院医歯薬学総合研究科機能性分子化学分野 (〒852-8521 長崎市文教町 1-14), ^bJST さきがけ (〒332-0012 埼玉県川口市本町 4-1-8)

e-mail: asakoy@nagasaki-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 139 年会シンポジウム S45 で発表した内容を中心に記述したものである。

Fig. 1. (a) Mechanism of miRNA-mediated Translational Repression, and (b) Schematic Representations of the Gene Regulatory Mechanism of Exosomal miRNA in the Recipient Cells

が見い出されている。⁹⁾ また、エクソソーム表面に存在するインテグリンのクラスターが郵便番号のように機能し、臓器選択的に送達された後、エクソソームが送達される臓器選択的にがん細胞が転移する現象、すなわちがん細胞から放出されるエクソソームが転移先臓器に選択的に取り込まれ、前転移ニッチ形成に寄与していることも報告されている。¹⁰⁾ このため、がんを根治するためには、がん細胞由来エクソソームが取り込まれる細胞選択的に薬剤を送達する技術が求められるが、エクソソーム受容細胞選択的な drug delivery system (DDS) 技術は存在しない。本誌上シンポジウムでは、exo-

somal-miRNA を標的とした機能性分子の開発例について紹介する。

2. anti-miR 核酸の設計指針

miRNA は、細胞の分化、増殖、代謝、アポトーシスなど、極めて重要な生命活動を制御する non-coding RNA である。^{11,12)} ほ乳類遺伝子の約 60% 以上が miRNA による発現抑制を受けていると考えられており、miRNA の発現異常ががんを始めとした様々な疾患の原因の 1 つであることが知られている。^{13,14)} miRNA はそれ単独で機能せず、RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるリボヌクレオプロテインを形成して初めてその機能を獲得

Fig. 3. Releasing Rates of miRNA from RISC by Using RINDA-conjugated Oligonucleotides

anti-miR 核酸が RISC 中の miRNA に結合した後の運命に関しては、様々な議論がなされながらも明解な解答がない状態だった。われわれは anti-miR 核酸によって miRNA が RISC から解離する現象を見出した。この知見から、これまでとは異なった作用機序に立脚した miRNA 阻害剤の開発も期待される。

3. exosomal-miRNA を標的とした抗体結合型 anti-miR 核酸の開発

上記項目で anti-miR 核酸の分子構造の最適化を行った後、exosomal-miRNA の機能阻害を目指した anti-miR 核酸の DDS 戦略開発に着手した。先述したように、exosomal-miRNA は体内を巡り、受容細胞内で機能するため、exosomal-miRNA を標的とした創薬を考える場合、薬剤をエクソソーム受容細胞に送達する技術が求められる。そこで筆者は、エクソソーム表面抗原を認識する抗体 (anti-Exo 抗体) を薬物輸送担体として利用することで、anti-miR 核酸のエクソソーム受容細胞への送達と、exosomal-miRNA の機能阻害を実現するエクソソーム随伴導入型核酸医薬 (ExomiR-Tracker) の開発を行った。ExomiR-Tracker は「anti-Exo 抗体」

に「anti-miR 核酸」が導入された「抗体結合型核酸」である。戦略としては、体液中で ExomiR-Tracker の anti-Exo 抗体部分がエクソソーム表面に結合した後、エクソソーム受容細胞内に導入される際に、ExomiR-Tracker の anti-miR 核酸も細胞内部に導入されるのではないかとするものである。

当初、このコンセプトが実現可能かどうかについて十分な知見がなかったため、まず、anti-Exo 抗体に蛍光標識を施し、Cal27 細胞 (口腔上皮がん細胞) の培養細胞上清に添加して、細胞内に導入されるかどうかを評価した。anti-Exo 抗体として、anti-CD9 抗体、anti-CD63 抗体、anti-CD81 抗体を使用した。またコントロールとして、エクソソーム内部に存在する TSG101 タンパク質を抗原とする anti-TSG101 抗体を用いた。共焦点レーザー顕微鏡による観察の結果、anti-TSG101 抗体の場合には蛍光が全く観察されなかったが、anti-Exo 抗体の場合には、程度の差はあるものの、いずれの場合にも蛍光が細胞質中に認められた。とりわけ、anti-CD63 抗体を用いた場合に細胞質にその蛍光が顕著に観察されたため、anti-CD63 抗体を ExomiR-Tracker として採用することとした。

Fig. 4. Confocal Microscopic Images ($\times 100$) of Cells Treated with anti-Exo mAb + RNA (Cy5) or anti-Exo mAb-9r + RNA (Cy5). Blue: Hoechst 33342 (nuclei); Green: Acti-stain 488; Red: RNA (Cy5); [mAb] = 200 nM, Scale Bars: 30 μm . (Color figure can be accessed in the online version.)

次に、anti-CD63 抗体を用い、ExomiR-Tracker の合成を行った。本研究では、anti-Exo 抗体と anti-miR 核酸を結合させるリンカーとしてアルギニンリッチなオリゴペプチドを採用した。まず、Traut's Reagent (Thermo Scientific) を用い、抗体 (IgG) のアミノ基を介してチオール基を導入した。チオール基の導入量は Ellman's Reagent (Thermo Scientific) により行った。そして、チオール基が修飾された IgG に対して Cys (Npys) - (D-Arg), (AnaSpec) を加え、ジスルフィド結合形成反応によるオリゴアルギニンペプチドの導入を行った。IgG に対するアルギニンの導入の有無は、anti-miR 核酸とのゲルシフトアッセイにより確認した。最後にアルギニンが導入された IgG と anti-miR 核酸とを phosphate buffered saline (PBS) 中で混合し、両者の複合体 (ExomiR-Tracker) を得た。また、コントロール分子として anti-TSG101 抗体を用い、上記と同様にアルギニンを導入し、anti-miR 核酸との複合体を作製した (Ctrl IgG-antimiR complex)。

蛍光標識した ExomiR-Tracker を培養細胞上清に添加し共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、細胞質に局在することが確認された。一方、anti-Exo 抗体並びに anti-miR 核酸を単独投与した系、Ctrl IgG-antimiR complex 添加系においては、細胞内に蛍光シグナルが認められなかった (Fig. 4)。この結果より、ExomiR-Tracker はエクソソー

ムを介して細胞内に導入されることが示唆された。

ExomiR-Tracker に搭載された anti-miR 核酸が細胞内に導入されることが確認されたため、細胞内に導入された anti-miR 核酸が遺伝子発現抑制効果を発揮するかどうかについて評価することとした。本研究では exosomal miR-21 を anti-miR 核酸の標的として選定した。低酸素条件下で培養した口腔上皮がん細胞では、エクソソームに含まれる miRNA のうち miR-21 の量が増大し、エクソソーム受容細胞の増殖能、転移能などを促進させることが知られている。¹⁹⁾ 筆者らも口腔上皮がん細胞 (Cal-27) を通常酸素条件下 (20% O_2) 及び低酸素条件下 (0.1% O_2) でそれぞれ培養後、超遠心法を用いてエクソソームを培養上清から回収し、qRT-PCR により解析した結果、低酸素条件下で培養した細胞由来の exosomal miR-21 の量は、通常酸素条件下で培養したものより約 3.5 倍増大していることが確認され、エクソソーム受容細胞の増殖を亢進することを確認している。miR-21 を標的とした anti-miR 核酸を搭載した ExomiR-Tracker を合成し、exosomal-miR21 に対する機能阻害能をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。その結果、ExomiR-Tracker は標的 miRNA の機能を配列特異的に阻害することが可能であることが示された。さらに、Scratch Assay により細胞増殖抑制効果を評価した結果、Hypoxia エクソソーム添加系において促進された細胞増殖に対し、ExomiR-Tracker は顕著な抑

制効果を示すことが明らかとなった。

最後に、ヌードマウスを用いて担がんマウスを作製し臓器分布について評価したところ、ExomiR-Trackerは腫瘍へ選択的に集積することが明らかとなった。さらに、顕著な抗腫瘍効果も確認された。今後、ExomiR-Trackerの細胞内導入機構や作用機序について、さらに詳細に解析していく予定である。

4. まとめ

筆者は、極微量で高度な機能を発揮し、生体制御系に大きな役割を果たしている exosomal-miRNA を標的とした機能性分子の開発に成功した。近年、エクソソームを回収した後、様々な分子を内包させることで DDS として利用する研究が盛んに行われているが、^{20,21)} 筆者らの開発した手法はエクソソームを単離・精製する必要がなく、体内に直接投与できるという点において一線を画すものである。エクソソームには miRNA 以外の non-coding RNA や、mRNA、MMP などのタンパク質が含まれており、がん化に寄与するものが次々と報告されている。筆者らの開発した ExomiR-Tracker は、anti-miR 核酸でなく、mRNA を標的としたアンチセンス核酸、siRNA、アプタマー、さらには核酸だけでなく低分子化合物を導入することも可能である。今後、exosomal-miRNA だけでなく、エクソソームに内包される様々な分子を標的とした新規分子標的医薬の創製へと発展させていきたい。

謝辞 本研究にご協力頂いた京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科の村上 章教授並びに有吉純平博士、岸本祐典修士、小西 諒修士を始めとする生体高分子情報研究室の学生の皆様、京都大学大学院理学研究科の杉山 弘教授、長崎大学大学院医歯薬学総合研究科の山本剛史准教授及び機能性分子化学研究室の大山将大学士、大日本住友製薬株式会社の関係者各位に深く感謝致します。

利益相反 大日本住友製薬(株)から共同研究費を受領。

REFERENCES

1) Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O., *Nat. Cell Biol.*, **6**, 654–659 (2007).

2) Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T., *J. Biol. Chem.*, **285**, 17442–17452 (2010).

3) Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J. J., Lötvall J. O., *Nat. Cell Biol.*, **9**, 654–659 (2007).

4) Pegtel D. M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D. A., van Eijndhoven M. A., Hopmans E. S., Lindenberg J. L., de Gruijl T. D., Würdinger T., Middeldorp J. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 6328–6333 (2010).

5) Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y., *Mol. Cell*, **39**, 133–144 (2010).

6) Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T., *J. Biol. Chem.*, **285**, 17442–17452 (2010).

7) Peinado H., Alečković M., Lavotshkin S., Matei I., Costa-Silva B., Moreno-Bueno G., Hergueta-Redondo M., Williams C., Garcia-Santos G., Ghajar C., Nitadori-Hoshino A., Hoffman C., Badal K., Garcia B. A., Callahan M. K., Yuan J., Martins V. R., Skog J., Kaplan R. N., Brady M. S., Wolchok J. D., Chapman P. B., Kang Y., Bromberg J., Lyden D., *Nat. Med.*, **18**, 883–891 (2012).

8) Horwich M. D., Zamore P. D., *Nat. Protoc.*, **3**, 1537–1549 (2008).

9) Toda Y., Takata K., Nakagawa Y., Kawakami H., Fujioka S., Kobayashi K., Hattori Y., Kitamura Y., Akaji K., Ashihara E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **456**, 768–773 (2015).

10) Hoshino A., Costa-Silva B., Shen T. L., Rodrigues G., Hashimoto A., Tesic Mark M., Molina H., Kohsaka S., Di Giannatale A., Ceder S., Singh S., Williams C., Soplop N., Uryu K., Pharmed L., King T., Bojmar L., Davies A. E., Ararso Y., Zhang T., Zhang H., Hernandez J., Weiss J. M., Dumont-Cole V. D., Kramer K., Wexler L. H., Narendran A., Schwartz G. K., Healey J. H., Sandstrom P., Labori K. J., Kure E. H., Grandgenett P. M., Hollingsworth M. A., de Sousa M., Kaur S., Jain M., Mallya K., Batra S. K., Jarnagin W. R., Brady M. S., Fodstad O., Muller V., Pantel K., Minn A. J., Bissell M. J., Garcia B. A.,

- Kang Y., Rajasekhar V. K., Ghajar C. M., Matei I., Peinado H., Bromberg J., Lyden D., *Nature*, **527**, 329–335 (2015).
- 11) Ambros V., *Nature*, **431**, 350–355 (2004).
- 12) Kloosterman W. P., Plasterk R. H., *Cell*, **11**, 441–450 (2006).
- 13) Krol J., Leodige I., Filipowicz W., *Nat. Rev. Genet.*, **11**, 597–610 (2010).
- 14) Ma L., *Breast Cancer Res.*, **12**, 210 (2010).
- 15) Ma J. B., Yuan Y. R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D. J., *Nature*, **434**, 666–670 (2005).
- 16) Ariyoshi J., Momokawa D., Eimori N., Kobori A., Murakami A., Yamayoshi A., *Bioconjug. Chem.*, **26**, 2454–2460 (2015).
- 17) Ariyoshi J., Eimori N., Kobori A., Murakami A., Sugiyama H., Yamayoshi A., *Chem. Lett.*, **46**, 143–145 (2017).
- 18) Ariyoshi J., Matsuyama Y., Kobori A., Murakami A., Yamayoshi A., *Nucleic Acids Ther.*, **27**, 303–308 (2017).
- 19) Li L., Chao L., Wang S., Wang Z., Jiang J., Wang W., Li X., Chen J., Liu K., Li C., Zhu G., *Cancer Res.*, **76**, 1770–1780 (2016).
- 20) Lai C. P., Mardini O., Ericsson M., Prabhakar S., Maguire C., Chen J. W., Tannous B. A., Breakefield X. O., *ACS Nano*, **8**, 483–494 (2014).
- 21) Smyth T., Petrova K., Payton N. M., Persaud I., Redzic J. S., Graner M. W., Smith-Jones P., Anchordoquy T. J., *Bioconjug. Chem.*, **25**, 1777–1784 (2014).