

■ はじめに

エクソソームとは、細胞から放出される小胞であり、約100 nmのサイズを持つ。エクソソームはその内部にRNAなどの核酸、タンパク質、脂質などを含んでおり、これらの物質を細胞間でやり取りするためのコミュニケーションツールとしての役割を担っていると考えられている。また間葉系幹細胞由来のエクソソームは様々な疾患に対し治療効果があるとの報告や、エクソソームに薬剤や核酸等を人工的に封入することも可能であることから、エクソソームを目的とする組織へ特異的かつ高効率で送達する技術は、新しいdrug delivery system (DDS)として有望視されている。そこで我々はこの新規DDSを開発するため、エクソソーム表面の改質を考案した。本研究では、特異的糖鎖認識活性を有するタンパク質“レクチン”をエクソソーム表面に複合化する手法として2種類の方法を検討した。

■ 活動内容

1. エクソソームのビオチン化によるレクチンの提示

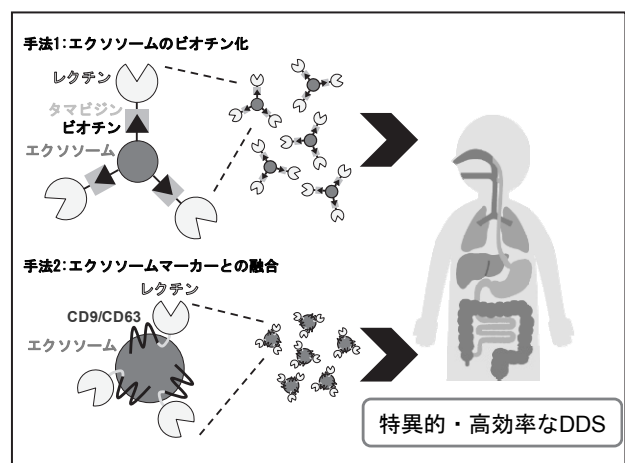
本実験では、ヒト胎児腎由来HEK293T細胞に産生させ精製したエクソソームを用いた。精製したエクソソームをビオチン標識化し、western blot (W.B.)でビオチン化を確認した。次に、ビオチンと高いアフィニティーを持つタマビジンをBC2LCNレクチンに融合したタンパク質を調製し、ビオチン化エクソソームと反応させることで、エクソソーム表面にビオチン-タマビジンの結合を介してBC2LCNレクチンを提示することに成功した。作製したBC2LCN複合化エクソソームが特異的糖鎖認識活性を有しているか否かを糖鎖アレイで解析したところ、BC2LCN由来の糖鎖認識活性を保持していた。BC2LCNは、iPS細胞やがん細胞株の細胞表面にある特定の糖鎖を認識することが分かっている。そこでエクソソームを蛍光標識化しiPS細胞及びがん細胞株へ添加したところ、BC2LCNを複合化していないエクソソームと比較し、BC2LCN複合化エクソソームでは、エクソソーム由来の強い蛍光が確認された。以上の結果から、BC2LCNのエクソソームへの複合化により、BC2LCNの特異的糖鎖認識活性に応じてエクソソームを高効率で送達することに成功した。現在、作製したエクソソームにモデル薬剤を封入することで、開発したレクチン複合化エクソソームが目的とする細胞に薬剤を送達できるか否かについて検討を行っている。

2. エクソソームマーカータンパク質との融合によるレクチンの提示

CD9やCD63タンパク質はエクソソームマーカーとして知られる。そこで遺伝子工学の手法を用いてCD9/CD63遺伝子とレクチン遺伝子を融合し、HEK293T細胞へ遺伝子導入したところ、CD9/CD63とレクチンの融合タンパク質の発現がW.B.で確認出来た。また細胞膜上におけるレクチン-CD9/CD63融合タンパク質の発現をフローサイトメトリー(FCM)で確認した。次に、遺伝子導入した細胞からエクソソームを精製し、エクソソーム膜上におけるレクチン-CD9/CD63融合タンパク質の発現を確認したところ、W.B.及びFCMの両方で発現が確認出来た。以上の結果から、エクソソームマーカータンパク質との融合により、エクソソーム表面にレクチンを複合化する新たな手法の開発に成功した。現在、作製したエクソソームが、複合化したレクチンの糖鎖認識活性に応じた結合活性を有しているか否かについて検討を行っている。

3. 結論

本研究では、2種類の方法でエクソソーム表面にレクチンを複合化する新たな手法の開発に成功した。つまり、用いるレクチンの種類に応じてこれら方法を使い分けることが可能であり、広く応用できる可能性を秘めている。本研究の成果は新規DDSの開発の礎となることが期待される。



代表発表者 丹羽 祐貴(にわ ゆうき)
所 属 産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門
細胞グライコーム標的技術グループ
問合せ先 〒305-8568 つくば市梅園 1-1-1 中央第 2
TEL: 029-861-3125 FAX: 029-861-3125
niwa-y@aist.go.jp

■キーワード: (1)エクソソーム
(2)レクチン
(3)ドラッグデリバリーシステム
■共同研究者: 館野 浩章(産業技術総合研究所)