

癌細胞由来エクソソームを利用した癌抗原
デリバリーシステムに基づく
癌免疫療法の開発に関する研究

2016

森 下 将 輝

目次

総論の部	1
緒言	1
第1章 癌細胞由来エクソソームの定量的体内動態解析を目的とした放射標識法の開発	2
1.1 SAV-LA 修飾エクソソームの調製	3
1.2 SAV-LA 修飾エクソソームの物理化学的性質	4
1.3 SAV-LA 修飾エクソソームへの ^{125}I -IBB 結合	5
1.4 血清中でのエクソソームへの放射標識の安定性	5
1.5 エクソソームの血中濃度推移	6
1.6 エクソソームの組織分布	7
1.7 考察	9
第2章 遺伝子改変癌細胞由来エクソソームを基盤とする癌抗原-アジュバント同時デリバリーシステムの開発	11
2.1 CpG DNA 修飾癌細胞由来エクソソームの調製	12
2.2 DC2.4 細胞による細胞取り込み	14
2.3 サイトカイン産生能および抗原提示能	15
2.4 B16BL6 細胞特異的免疫の誘導	16
2.5 CpG DNA 修飾エクソソームの抗腫瘍効果	18
2.6 CpG DNA 修飾エクソソーム投与が癌微小環境形成および転移に与える影響	21
2.7 考察	23
第3章 細胞内動態制御型癌細胞由来エクソソームの開発による癌抗原提示能の増強	26
3.1 GALA 修飾癌細胞由来エクソソームの調製	27
3.2 GALA 修飾癌細胞由来エクソソームの膜溶解活性	28
3.3 DC2.4 細胞に取り込まれたエクソソーム内包物の局在	29

3.4 DC2.4 細胞による癌抗原の MHC クラス I 提示能	31
3.5 考察	31
結論	33
謝辞	35
実験の部	
第 1 章	36
第 2 章	39
第 3 章	44
引用文献	47

総論の部

緒言

ヒトの体を構成する細胞の数は約 37 兆個とも言われ、その種類は多岐に渡る。それぞれの細胞は単独で機能するのみならず、細胞間の物質輸送に基づく情報伝達を行うことで生体の機能が維持されている。従来、細胞間の情報伝達はギャップ結合に代表される細胞間の直接的な相互作用や、ホルモンやサイトカインなどの細胞外に分泌される可溶性分子を介して行われていると考えられていた。しかしながら、これらの機構に加えて、細胞外小胞と呼ばれる細胞から分泌される脂質二重膜により形成される小胞が細胞間の情報伝達に関与することが明らかとされ注目を集めている。細胞外小胞は、その産生経路によってアポトーシス小体、マイクロベシクル、エクソソームに分類される¹⁾。これらの細胞外小胞の中でも、近年その役割が注目されるとともに、新たな疾患診断法・治療法への利用が期待されているのがエクソソームである。

エクソソームは多小胞体の開口分泌（エクソサイトーシス）により分泌される直径約 100 nm の脂質二重膜で形成される小胞であり、産生細胞に由来するタンパク質や核酸を含有している²⁾。癌細胞由来エクソソームは癌抗原を内包しており、抗腫瘍免疫反応を誘導可能であることから、癌抗原の同定を必要としない新規癌ワクチン製剤としての利用が期待されている³⁾。癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の実現には、抗原提示細胞である樹状細胞（DC）への効率的なエクソソームのデリバリーに加えて、その後の DC の活性化と DC 上の MHC クラス I 分子による癌抗原の提示が必要である。しかしながら、DC へのデリバリー方法の開発に際して重要となる、体外から投与された癌細胞由来エクソソームの体内動態に関する情報は乏しく、また癌細胞由来エクソソームを取り込んだ DC の活性化および癌抗原の提示に関する検討も不十分であった。

そこで本研究では、癌細胞由来エクソソームを基盤とした癌免疫療法の開発を目的に、まず、遺伝子改変技術を応用したエクソソームの放射標識法を開発し、癌細胞由来エクソソームの体内動態定量的解析を試みた。次いで、エクソソームを取り込んだ DC の効率的活性化を目的として、癌細胞由来エクソソームを免疫賦活剤（アジュバント）で修飾し、DC の活性化能および抗腫瘍免疫誘導能を評価した。さらに、DC の癌抗原提示能の増大を目的に、細胞内動態制御型癌細胞由来エクソソームを開発し、エクソソームの内包物の細胞質へのデリバリー効率の改善による、癌抗原提示能の増強を試みた。本研究で得られた結果を以下 3 章にわたり論述する。

第1章 癌細胞由来エクソソームの定量的体内動態解析を目的とした放射標識法の開発

エクソソームは様々な細胞から分泌される膜小胞であり、タンパク質や核酸を内包している⁴⁾。近年の研究から、こうした生理活性分子がエクソソームを介して標的細胞へ取り込まれることで、癌の転移や免疫反応などの生体反応を引き起こしていることが明らかとなった⁵⁻⁸⁾。

癌細胞由来エクソソームは癌抗原を内包しており、抗腫瘍免疫反応を誘導可能であることから、癌抗原の同定を必要としない新規癌ワクチン製剤としての利用が期待されている⁹⁻¹⁰⁾。しかしながらその実現には、抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) への送達、DC の活性化、DC 上の抗原提示分子への癌抗原の提示等を可能とする癌細胞由来エクソソームの開発が必要である。DC へのエクソソームの送達の実現のためには、体外から投与された癌細胞由来エクソソームの体内動態情報が必要となる。しかしながら、エクソソーム体内動態の解析手法が存在しないためにその情報は非常に乏しかった。

従来、エクソソームの体内動態を解析するには脂溶性の蛍光色素が広く用いられてきた¹¹⁻¹⁴⁾。蛍光色素による標識は比較的安価で簡便な方法であり、組織へ移行したエクソソームの検出には有用であるが、感度および定量性に乏しく、全身レベルでの体内動態の定量的解析には適さない。また、化学発光を利用したエクソソームの体内動態特性解析も報告されている。Takahashi らは、レポータータンパク質である *Gussia luciferase* (gLuc) とエクソソーム移行性タンパク質である *lactadherin* (LA) との融合タンパク質 (gLuc-LA) をエクソソームへ標識することで、体外から投与されたエクソソームの体内動態の可視化に成功し、マウス黒色細胞種 B16BL6 細胞由来エクソソームは主に肝臓、脾臓、肺に分布することを明らかとしている¹⁵⁾。しかしながら、レポータータンパク質は細胞へ取り込まれた後に失活・分解するため、臓器に移行したエクソソームの絶対量の測定は不可能である。これに対し、高感度で安定性に優れる放射性同位体を用いた標識は定量的な体内動態解析のための有用な手段であるが、エクソソームへの標識に応用した報告例は存在しなかった。

そこで本章では、遺伝子改変技術を応用したエクソソームへの新規放射標識法の開発とそれを利用した定量的な癌細胞由来エクソソームの体内動態解析を試みた。エクソソームの放射標識には、ストレプトアビジン (SAV) とビオチン (biotin) 間の結合を利用した¹⁶⁾。すなわち、SAV と LA との融合タンパク質 (SAV-LA) を設計し、これを発現するプラスミド DNA (pDNA) を構築した。B16BL6 細胞に対し SAV-LA 発現 pDNA を導入し、培養上清中に分泌された SAV-LA 修飾エクソソーム (SAV-exo) を回収した。次に、SAV-exo をヨウ素 125 標識 biotin 誘導体の (3-¹²⁵I-iodobenzoyl) norbiotinamide (¹²⁵I-IBB) と反応させることでエクソソームを放射標識した。調製した放射標識エクソソームをマウス尾静脈より投与し、血液および各主要臓器中の放射活性を経時的に測定することで、体内動態の定量的解析を行った。

1.1 SAV-LA 修飾エクソソームの調製

SAV-LA の模式図を Fig. 1A に示した。SAV-LA を発現する pDNA を B16BL6 細胞へ導入した後、エクソソーム回収過程の各画分における SAV 濃度を測定した。その結果、細胞画分およびエクソソーム画分における SAV 濃度はそれぞれ約 118 nM、約 42 nM であった (Fig. 1B)。また、精製前の培養上清および超遠心後の上清中の SAV 濃度は検出限界 (2nM) 以下であった。続いて、回収したエクソソームと biotin 標識金コロイドを混合後、透過型電子顕微鏡 (TEM) によりエクソソーム粒子を観察した (Fig. 1C)。その結果、SAV-LA 発現 pDNA を導入した細胞から回収したエクソソームの表面における biotin 標識金コロイドの存在が確認された。一方、pDNA を導入しない細胞から回収したエクソソームでは、biotin 標識金コロイドは検出されなかった。エクソソーム画分における SAV 濃度およびエクソソームの粒子数から SAV の修飾率を算出したところ、エクソソーム 1 粒子あたりおよそ 43 分子の SAV が修飾されていることを確認した。これらの結果より、SAV-LA 修飾エクソソームは biotin に対する結合能を有することが示された。

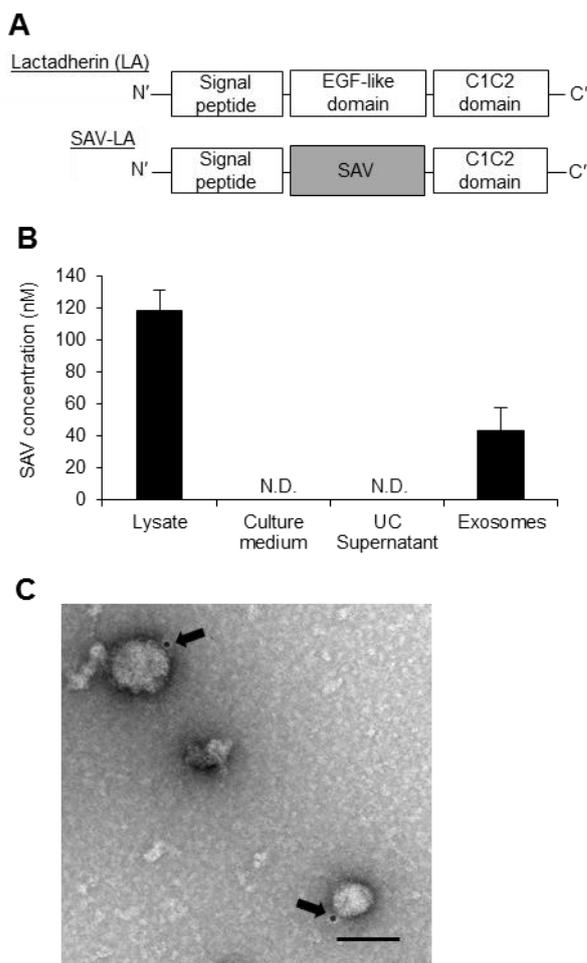


Figure 1. Modification of exosomes with SAV-LA

(A) Schematic representation of lactadherin (LA) (upper image) and streptavidin (SAV)-LA (lower image). (B) Twenty-four hours after transfection of SAV-LA-expressing pDNA, cell lysate and culture medium were collected. Ultracentrifuge (UC) supernatant and exosomes were collected from the culture medium. The results are expressed as means \pm standard deviations (SDs) of 3 samples. (C) Transmission electron microscope (TEM) image of SAV-exo incubated with 10-nm biotin-coated gold nanoparticles. Arrows indicate the 10-nm gold particles. Scale bar = 100 nm.

1.2 SAV-LA 修飾エクソソームの物理化学的性質

続いて、ナノ粒子マルチアナライザー-qNano を用いて SAV-exo の粒度分布を測定した (Fig. 2A)。その結果、得られた粒度分布は未修飾エクソソーム (Exo) を測定した場合の粒度分布とはほぼ同一であった。SAV-exo の平均粒子径および表面電荷はそれぞれ 70 ± 3 nm、 -41 ± 6 mV であり、Exo の測定値はそれぞれ 68 ± 3 nm、 -43 ± 3 mV であったことから、平均粒子径および表面電荷においても大きな違いはなかった (Fig. 2B and C)。さらに、TEM による粒子形状の観察画像においても、SAV-LA 修飾の有無による粒子形状の顕著な相違は認められなかった (Fig. 2D and E)。

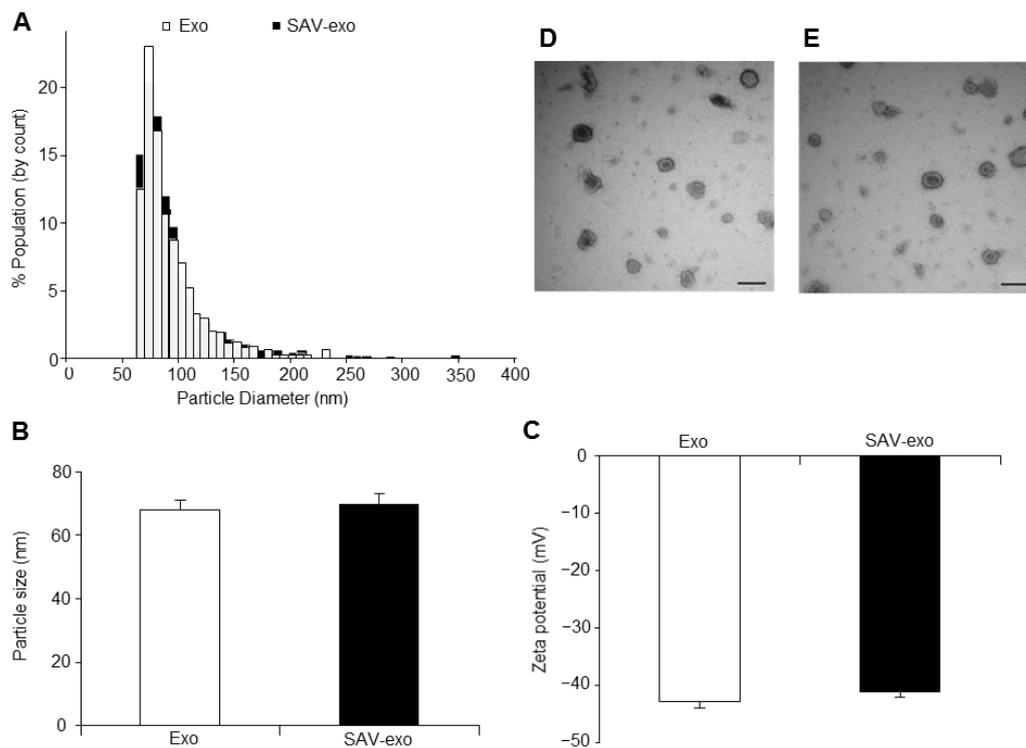


Figure 2. Physicochemical properties of exosomes collected from B16BL6 cells

(A) Histogram of the particle size distribution of the exosomes determined by using a qNano. (B) The particle size and (C) zeta potential of the exosomes before and after the transfection of streptavidin–lactadherin (SAV-LA)-expressing pDNA determined using a Zetasizer Nano ZS. These results are expressed as means \pm standard deviation (SDs) ($n = 3$). Transmission electron micrographs of the exosomes collected from (D) untransfected or (E) transfected B16BL6 cells. Scale bar = 100 nm.

1.3 SAV-LA 修飾エクソソームへの ^{125}I -IBB 結合

エクソソームへの ^{125}I -IBB の結合を確認するため、SAV-exo と ^{125}I -IBB を混合後、ペーパークロマトグラフィーを行い放射活性の分布を評価した (Fig. 3A)。その結果、 ^{125}I -IBB を単独で展開した場合には、放射活性は fraction No.6 を中心に分布した。一方、 ^{125}I -SAV、 ^{125}I -SAV-LA、SAV-exo と ^{125}I -IBB との混合物 (^{125}I -labeled B16BL6 exosomes) を展開した場合には、放射活性はスポットした fraction No.1 から移動しなかった。よって、SAV-biotin 間の結合に基づきエクソソームが放射標識可能であることが示された。

1.4 血清中でのエクソソームへの放射標識の安定性

続いて、20%FBS 含有 PBS 条件下で放射標識エクソソームをインキュベートし、300 kDa のフィルターを用いて限外濾過後、残存する放射活性を測定することで血清存在下におけるエクソソームの放射標識の安定性を評価した (Fig. 3B)。その結果、95%以上の放射活性が限外濾過後もフィルター上に存続したことから、エクソソームへの放射標識は血清中でも解離することなく、安定に維持されることが示された。

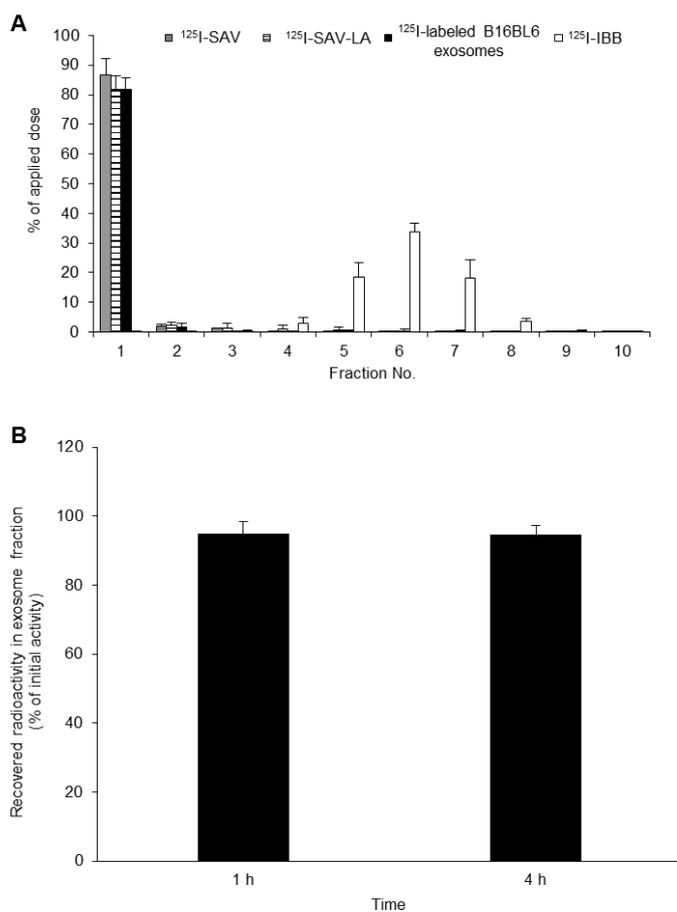


Figure 3. Binding of ^{125}I -IBB to SAV-exo and labeling stability in serum

(A) Paper chromatography of ^{125}I -IBB alone (white column), ^{125}I -IBB incubated with SAV (gray column), SAV-LA (horizontal lined column), and SAV-exo (closed column). (B) Labeling stability of exosome labeled with ^{125}I -IBB in PBS containing 20% FBS. The results are expressed as means \pm standard deviation (SDs) (n = 3)

1.5 エキソソームの血中濃度推移

放射標識した B16BL6 細胞由来エキソソーム、SAV、SAV-LA 融合タンパク質をマウス尾静脈内へ投与後、血液中の放射活性を経時的に測定することでエキソソームの血中濃度推移を評価した (Fig. 4)。その結果、静脈内投与されたエキソソームは SAV あるいは SAV-LA 融合タンパク質と比較して速やかに血中から消失した。エキソソームの血中からの消失挙動は 2 相性を示したため、続いて 2 コンパートメントモデルに基づいて、エキソソームの薬物動態学的パラメータを算出した (Table 1)。その結果、分布相および消失相の半減期はそれぞれ約 1.5 分、346 分であった。また、エキソソームの血中濃度-時間曲線下面積 (AUC) が 3.2% ID·h/ml であったのに対し、SAV および SAV-LA 融合タンパク質はそれぞれ 48.3% ID·h/ml および 29.0% ID·h/ml であった。なお、 ^{125}I -IBB をマウス尾静脈内へ投与した場合も血中から速やかに消失し、AUC は 3.1% ID·h/ml であった。

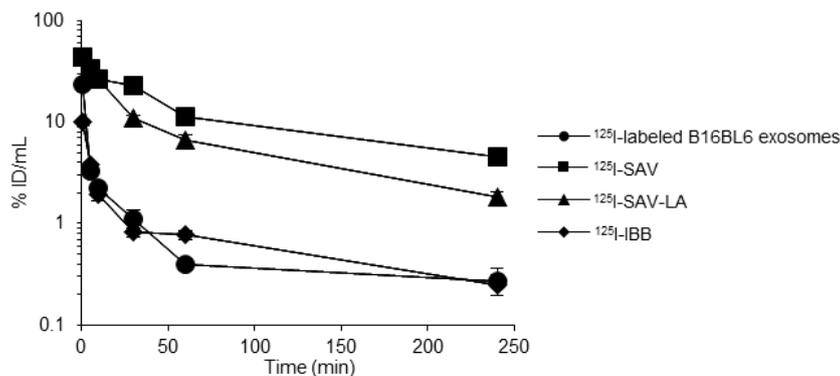


Figure 4. Pharmacokinetics of ^{125}I -labeled B16BL6 exosomes derived from B16BL6 cells after intravenous injection into mice

Time course of blood concentrations in each sample in mice after intravenous injection of ^{125}I -labeled B16BL6 exosomes (circle symbols), ^{125}I -streptavidin (SAV) (square symbols), and ^{125}I -SAV-lactadherin (LA) (triangle symbols), ^{125}I -IBB (rhombus symbols). The results are expressed as means \pm standard deviations (SDs) (n = 4).

Table 1. Pharmacokinetic parameters of ¹²⁵I-labeled B16BL6 exosomes, ¹²⁵I-streptavidin (SAV), and ¹²⁵I-SAV-lactadherin (LA), ¹²⁵I-IBB after intravenous injection into mice

Dose	AUC (% ID·h/mL)	MRT (h)	t _{1/2} (min)	
			t _{1/2α}	t _{1/2β}
¹²⁵ I-labeled B16BL6 exosomes	3.2	0.78	1.5	346
¹²⁵ I-SAV	48.3	1.23	11.7	173
¹²⁵ I-SAV-LA	29.0	0.90	7.5	99
¹²⁵ I-IBB	3.1	0.99	2.7	116

1.6 エキソソームの組織分布

続いて、エキソソームを静脈内投与後、各臓器をサンプリングし、放射活性を測定することでエキソソーム体内動態を定量的に評価した (Fig. 5A)。その結果、投与されたエキソソームは主に肝臓、脾臓、肺に集積した。肝臓において、静脈内投与後1分の時点で17% IDの放射活性が検出され、30分でピークを迎えた (39% ID)。その後、4時間の時点で28% IDまで減少した。脾臓において、1.8% IDの放射活性が投与1分後に検出された。その後、投与30分後にピークに達し (2.4% ID)、4時間では1.6% IDが検出された。加えて、肺へのエキソソームの集積も確認された。投与1時間後に12% ID、4時間後では7% IDの放射活性が検出された。膀胱に蓄積した尿中の放射活性は時間と共に増大し、投与1時間後では3.4% ID、4時間後では8.8% IDの放射活性が検出された。

これに対し、SAV タンパク質を静脈内投与した場合には主に腎臓及び膀胱で放射活性が検出された (Fig. 5B)。投与1分後に腎臓で2.7% IDが検出され、4時間後には7.0% IDまで増大した。膀胱においても放射活性は時間と共に増大し、1時間後で12% ID、4時間後で23% IDの放射活性がそれぞれ確認された。一方、肝臓、肺で検出された放射活性はエキソソームと比較して非常に低く、投与4時間の時点で肝臓では1.9% ID、肺では0.24% IDであった。なお、脾臓に関しては検出不可能なレベルであった。

SAV-LA 融合タンパク質については、投与1分後に肺で1.4% IDが検出され、4時間後では0.16% IDにまで減少した (Fig. 5C)。投与4時間後での肺で検出された放射活性は、エキソソームと比較しておよそ1/35と低い値となった。脾臓においては、0.81% IDが投与1分後に検出され、1時間後にピーク達した (2.2% ID)。その後放射活性は減衰していき、投与4時間後では0.94% IDとなった。肝臓では投与1分後に13% IDが検出され30分後には32% IDまで増大した。その後、4時間の時点で13% IDまで減少した。腎臓および膀胱への移行パターンはSAVを投与した場合と類似しており、腎臓では4.4% ID、膀胱では15% IDが投

与4時間後の時点でそれぞれ検出された。

^{125}I -IBB を尾静脈内投与した場合には肝臓、腎臓、小腸、膀胱で放射活性が検出された (Fig. 5D)。肝臓においては投与5分後に28% ID が検出され、4時間後には2% ID まで減衰した。腎臓では12% ID の放射活性が投与1分後に検出され、4時間後には0.43% ID となった。小腸および膀胱においては、30% ID および28% ID の放射活性が投与4時間後にそれぞれ検出された。

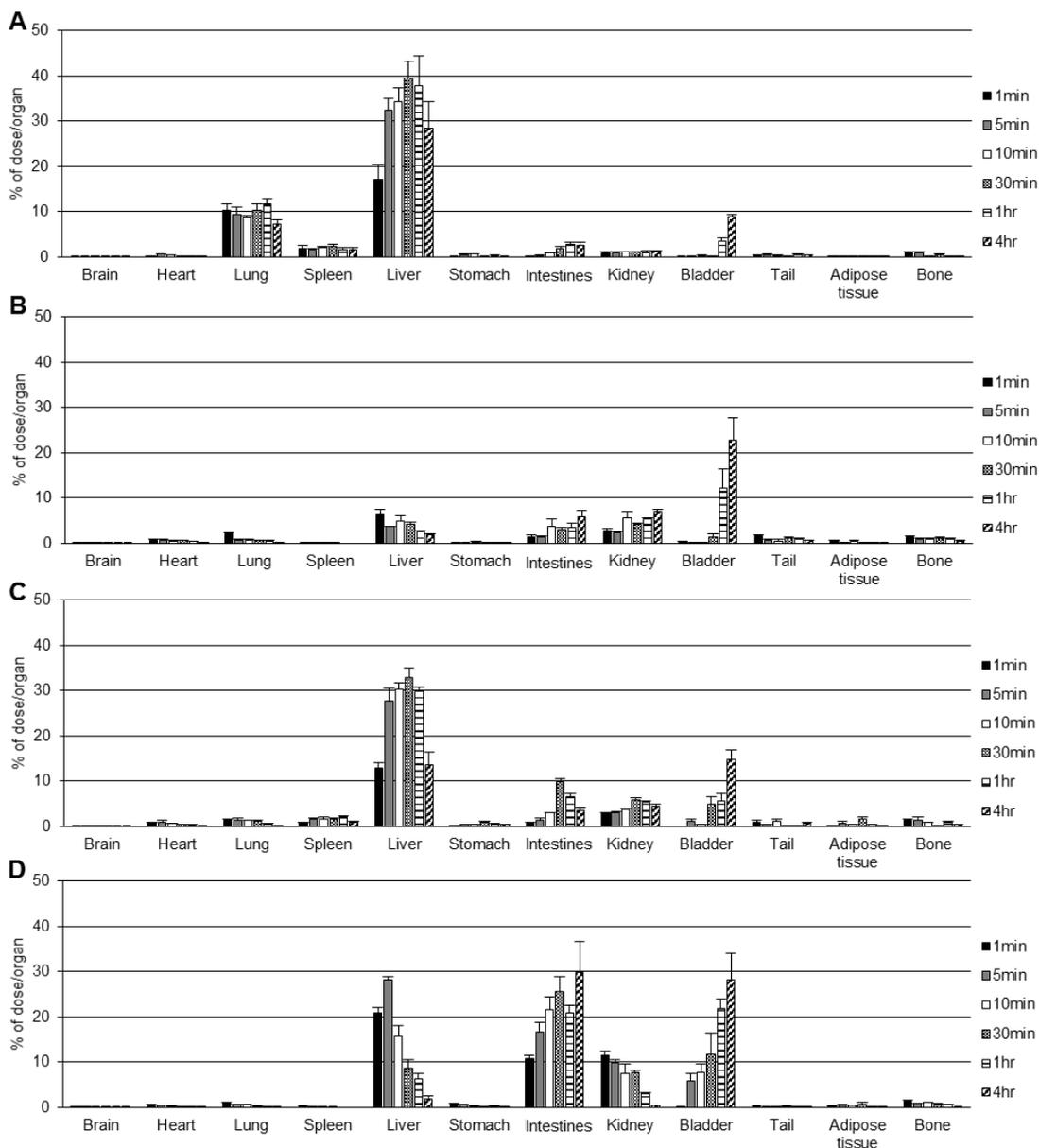


Figure 5. In vivo distribution of ^{125}I -labeled B16BL6 exosomes derived from B16BL6 cells after intravenous injection into mice

Time course of radioactivity in each organ after intravenous injection of (A) ^{125}I -labeled B16BL6 exosomes, (B) ^{125}I -SAV, and (C) ^{125}I -SAV-LA, (D) ^{125}I -IBB. These results are expressed as means \pm standard error of means (SEMs) (n = 4).

1.7 考察

エクソソームと biotin 標識試薬との結合実験から、SAV-LA 発現 pDNA を導入した B16BL6 細胞から回収したエクソソームは biotin との結合親和性を有していることが証明された (Fig. 1 and 3)。一方、エクソソーム表面に提示された分子は血液成分と接触しやすい環境にあることから、標識体の分解や解離により体内動態解析結果の信頼性が損なわれる可能性がある。しかしながら、エクソソームの放射標識は血清中でも安定であり、さらには放射標識エクソソームの体内動態は ^{125}I -IBB のそれと全く異なる挙動を示したことから、今回開発した方法により、エクソソームの体内動態が定量的に解析可能であることが実証された (Fig. 3-5)。

SAV を修飾した粒子への搭載を目的に、これまでに各種抗癌剤や抗体の biotin 誘導体が開発されている¹⁷⁻¹⁸⁾。従って、SAV-LA 融合タンパク質を利用すれば、こうした機能分子を biotin 誘導体としてエクソソーム表面に修飾可能となることから、エクソソームを基盤としたデリバリーシステムの開発にも本方法は有用であると考えられる。また体内動態の解析を目的としたエクソソームの標識法の開発に際しては、エクソソームの物理化学的性質に与える影響が少ない方法が望ましい。SAV は生理的条件下で 4 量体を形成することから、SAV-LA 修飾によってエクソソームが凝集体を形成する可能性が懸念された¹⁹⁾。しかしながら、エクソソームの粒子径測定や粒子形状の観察からは、SAV-LA 修飾による大きな変化は認められなかった (Fig. 2)。したがって、今回開発したエクソソーム放射標識法は、エクソソームが本来有する物理化学的性質を損なうことなく体内動態を評価可能な有用な方法であることが示された。

放射標識エクソソームの体内動態解析結果から、マウス尾静脈内に投与された B16BL6 細胞由来エクソソームは血中から速やかに消失し、その後肝臓、脾臓、肺へ集積した (Fig. 4-5 and Table 1)。この B16BL6 細胞由来エクソソームの肺への集積は、以前に我々が行った gLuc 標識エクソソームの体内動態解析の結果と一致している¹⁵⁾。一方で、ヒト胎児腎臓 293 細胞由来エクソソームや間葉系幹細胞由来エクソソームをマウス尾静脈内に投与した場合には、肝臓や脾臓に優先的に移行するという報告もある²⁰⁻²¹⁾。これらのエクソソームの粒子径は今回我々が評価した B16BL6 細胞由来エクソソームの値とほぼ同一であったことから、エクソソームの体内動態の規定因子としては粒子径や表面電荷のような物理化学的性質に加えて、エクソソーム表面に発現するタンパク質などの生物学的性質が大きく関与している可能性も考えられる。また、静脈内投与されたエクソソームは、産生細胞の種類に依らず血中から速やかに消失することが報告されている²²⁾。従って、今回検討に用いた B16BL6 細胞由来エクソソームを含め、標的細胞へと選択的にエクソソームを送達するためにはその体内動態を制御する方法の開発が必要となる。

B16BL6 細胞由来エクソソームの体内動態の定量的解析から、肝臓および脾臓にエクソソームが移行することを見出したが、これらの臓器はマクロファージなどの単核食細胞系 (mononuclear phagocyte system; MPS) を豊富に含んでいることが知られている。また、負

電荷を帯びたリポソームは静脈内投与された後 **MPS** に補足されることが報告されており、**MPS** が認識する様式に関しては血清タンパク質を介した機構と介さない機構の両方が存在する²³⁻²⁵。エクソソームも同様に負電荷を帯びていることから、静脈内投与後された **B16BL6** 細胞由来エクソソームについても負電荷リポソームと同様の機構でマクロファージに取り込まれた可能性が考えられる。加えて、エクソソーム表面に豊富に存在する負電荷リン脂質の一種であるホスファチジルセリン (**PS**) はマクロファージに認識されることから²⁶⁻²⁷、体内動態の規定因子としてはエクソソームの脂質組成も重要であると思われる。

肝臓や脾臓に加えて、**B16BL6** 細胞由来エクソソームの肺への集積も確認された。エクソソームと同じく負電荷を帯びるマイクロベシクルが静脈内投与された場合、膜表面の **PS** が肺の血管内皮細胞に認識されることが報告されている²⁸。従って、**B16BL6** 細胞由来エクソソームの肝臓や脾臓への集積と同様、肺への集積に関してもエクソソームの脂質膜を構成する **PS** が体内動態特性に大きく関与している可能性がある。

直径が 50-100 nm の粒子は静脈内投与後腎臓のメサングウム細胞に取り込まれることが報告されているが²⁹、**B16BL6** 細胞由来エクソソームに関しては腎臓への蓄積は確認されなかった。また、上述した臓器へ **B16BL6** 細胞由来エクソソームが移行した後、膀胱でも放射活性が検出され、時間と共にその活性は増大した。腎臓の糸球体基底膜にはサイズおよび電荷依存的な濾過機能が存在し、アルブミンなどの高分子量タンパク質の尿中排泄を制限している³⁰。直径がおよそ 100 nm であるエクソソームが糸球体基底膜を通過することは考えにくいことから、**B16BL6** 細胞由来エクソソーム投与後に膀胱で検出された放射活性は、エクソソームが細胞に取り込まれ、分解後に遊離した放射性同位体に起因する放射活性を測定しているものと考えられる。

以上、第 1 章ではエクソソームへの新規放射標識法を開発し、癌細胞由来エクソソームの定量的な体内動態解析に成功した。そして、静脈内に投与された **B16BL6** 細胞由来エクソソームは速やかに血中から消失し、主に肝臓に取り込まれることを見出した。癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の実現には、エクソソームの体内動態特性を解明し、**DC** への効率的なデリバリー法を開発する必要があるため、本検討で得られた知見は癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の開発に対して有用な情報を提供するものと考えられる。

第 2 章 遺伝子改変癌細胞由来エクソソームを基盤とする癌抗原－アジュバント同時デリバリーシステムの開発

癌抗原を利用した癌免疫療法は、癌抗原特異的な細胞傷害性 T 細胞の誘導により腫瘍を退縮可能であるが、その実現には癌抗原の同定と精製が課題である³¹⁻³³。加えて、強力な抗腫瘍免疫の獲得には抗原提示細胞である樹状細胞 (DC) の活性化が必要であることから、アジュバントの DC への効率的な送達も重要となる³⁴⁻³⁷。従って、癌免疫療法の発展には、癌抗原の同定・精製が不要で、なおかつアジュバントのデリバリーキャリアとしても利用可能な新規素材の利用が求められる。

癌細胞由来エクソソームは癌抗原を内包しており、DC への癌抗原の送達を介した抗腫瘍免疫の誘導が期待できる。従って、癌細胞由来エクソソームを利用することで、癌抗原の同定や精製を必要としない新規癌ワクチン製剤の開発が可能と考えられている³⁸⁻⁴¹。加えて近年では、癌細胞由来エクソソームを利用した癌ワクチンに関する臨床研究も行われ始めている⁴²⁻⁴³。さらに、これまでの先行研究から、small interfering RNA (siRNA) や抗炎症性の低分子治療薬などをエクソソームに搭載することで、標的細胞へ効率的にデリバリーできることが実証されていることから、アジュバントのデリバリーキャリアとしての利用も期待できる⁴⁴⁻⁴⁵。

一方、癌抗原特異的な免疫反応の誘導には、癌抗原を取り込んだ DC の活性化が重要であることから、癌細胞由来エクソソームとアジュバントを同一の DC へ送達する方法の開発が望まれる⁴⁶⁻⁴⁸。以上の知見に基づき、著者は癌細胞由来エクソソームをアジュバントで修飾することで、癌抗原とアジュバントとの DC への同時デリバリーが可能となり、強力な抗腫瘍免疫の誘導が可能ではないかと考えるに至った。

そこで第 2 章では、遺伝子改変癌細胞由来エクソソームをアジュバントで修飾することで、癌細胞由来エクソソームを利用した癌抗原とアジュバントの同時デリバリーシステムの開発を試みた。第 1 章と同様の方法で、癌細胞である B16BL6 細胞由来エクソソームを SAV-LA 融合タンパク質で修飾し⁴⁹、これに免疫刺激性核酸である CpG DNA の biotin 誘導体を反応させ、CpG DNA 修飾エクソソーム (CpG-SAV-exo) を調製した (Fig. 6)。そして、培養細胞を用いて CpG-SAV-exo の DC へのデリバリー能および活性化能を評価するとともに、担癌モデルマウスを用いた抗腫瘍免疫の誘導能についても評価した。

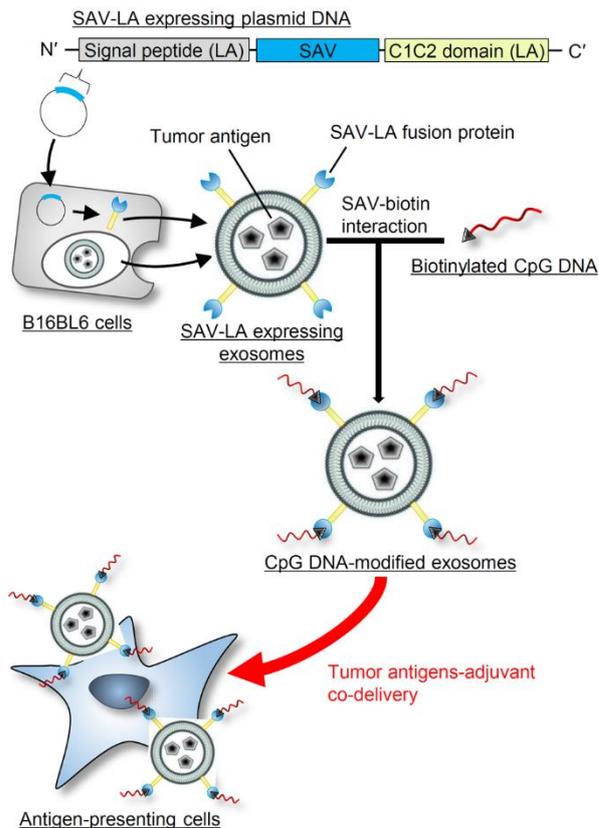


Figure 6. Schematic representation of the preparation of CpG DNA-modified exosomes.

A plasmid DNA encoding a fusion protein of streptavidin (SAV), N-terminal secretion signal of lactadherin (LA) and C1C2 domain of LA (SAV-LA) was constructed. SAV-LA expressing exosomes (SAV-exo) were collected from the culture supernatants of B16BL6 cells transfected with the plasmid DNA. CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo) were prepared by mixing SAV-exo and biotinylated CpG DNA.

2.1 CpG DNA 修飾癌細胞由来エクソソームの調製

SAV-LA 発現 pDNA を B16BL6 細胞に導入し、培養上清中に含まれるエクソソームを超速心操作により回収した。細胞およびエクソソームに含まれる各種タンパク質の存在を western blotting 法により検出した (Fig. 7A)。その結果、回収したエクソソームについてエクソソームのマーカータンパク質である Alix、HSP70、CD81 の存在を確認できた。さらに、エクソソーム画分において小胞体に局在するカルネキシンに由来するバンドは検出されなかったことから、回収したエクソソームには細胞断片が混入していないことが示された。SAV-LA 発現プラスミドを導入した細胞から回収したエクソソームでは、SAV も検出された。さらに、B16BL6 細胞から分泌されるエクソソームは、メラノーマ抗原である gp100 や TRP2 を含有していることも確認した。続いて、エクソソームの CpG DNA による修飾を確認するため、赤色蛍光色素 PKH26 で標識した SAV-LA 修飾エクソソームとフルオレセイン標識した biotin 化 CpG DNA を混合後、蛍光顕微鏡にてエクソソーム粒子を観察した (Fig. 7B)。SAV-LA 修飾エクソソーム (SAV-exo) と biotin 化 CpG DNA を混合した場合には、両者の共局在が観察されたのに対し、未修飾のエクソソーム (Exo) あるいは gLuc-LA 標識エクソソーム (gLuc-exo) と biotin 化 CpG DNA を混合した場合には両者の共局在は認められなかった。従って、SAV-biotin 結合に基づきエクソソームを CpG DNA で修飾可能であることが示され

た。回収したエクソソームのタンパク量、粒子数および CpG DNA の蛍光強度を測定したところ、エクソソーム 1 μg におよそ 1 pmol の CpG DNA すなわちエクソソーム 1 粒子におよそ 287 分子の CpG DNA が修飾されていることが分かった。続いて、回収した CpG-SAV-exo の粒子形状および物性を Exo あるいは SAV-exo と比較した (Fig. 7C and Table 2)。その結果、Exo、SAV-exo、CpG-SAV-exo の粒子径はそれぞれおよそ 114、119、109 nm であった。また、表面電荷はいずれも -33 mV 程度であり、粒子形状の大きな変化も認められなかった。

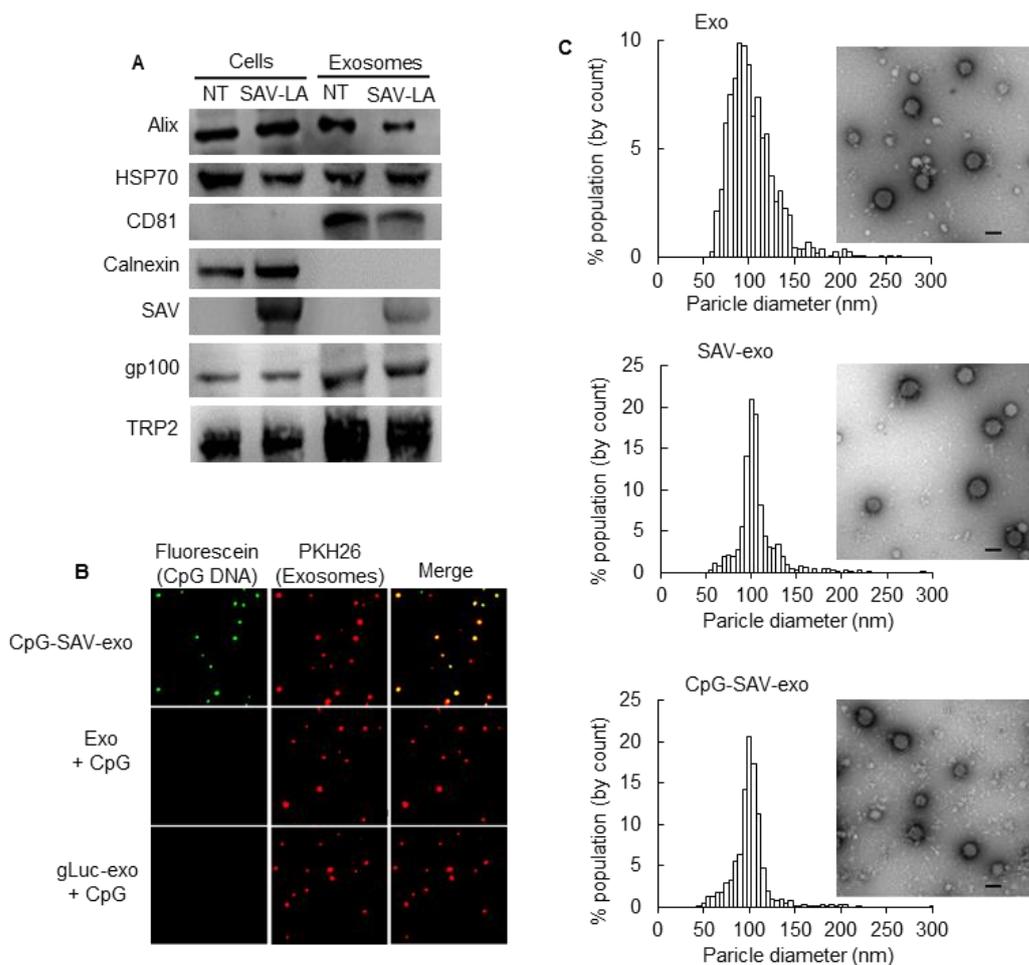


Figure 7. Development of CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo).

(A) Western blotting analysis of Alix, HSP70, CD81, Calnexin, streptavidin (SAV), gp100, and TRP2 in cell lysates and exosomes from non-treated (NT) or SAV-lactadherin (SAV-LA) transduced B16BL6 cells. (B) Fluorescent microscopic observation of CpG-SAV-exo, exosomes mixed with biotinylated CpG DNA (Exo + CpG), and gLuc-LA expressing exosomes mixed with biotinylated CpG DNA (gLuc-exo + CpG) (green = fluorescein-labeled biotinylated CpG DNA, red = PKH26-labeled exosomes). (C) Histograms of particle size distribution and transmission electron microscopy (TEM) images of Exo, SAV-exo, and CpG-SAV-exo. Scale bar = 100 nm.

Table 2. Particle size and zeta potential of Exosomes (Exo), streptavidin (SAV)-exosomes (SAV-exo) and CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo). Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 3).

	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
Exo	112 \pm 12	-33 \pm 0.2
SAV-exo	119 \pm 9	-32 \pm 0.5
CpG-SAV-exo	109 \pm 10	-32 \pm 1.6

2.2 DC2.4 細胞による取り込み

フローサイトメトリー法により、フルオレセイン標識 CpG DNA (F-CpG)、エキソソームと F-CpG との混合物 (Exo + F-CpG)、gLuc-LA 標識エキソソームと F-CpG との混合物 (gLuc-exo + F-CpG) および F-CpG DNA 修飾エキソソーム (F-CpG-SAV-exo) を DC2.4 細胞へ添加後の取り込みを評価した (Fig. 8A and B)。平均蛍光強度 (MFI) を算出したところ、F-CpG-SAV-exo を添加した場合に、F-CpG 単独を添加した時と比較して MFI の増大が確認されたことから、CpG DNA の取り込みはエキソソームへの修飾で向上することが示された。これに対し、PKH67 標識したエキソソームの取り込みは、CpG DNA 修飾の有無に関わらず同程度であった (Fig. 8C and D)。さらに、蛍光顕微鏡を用いてエキソソームの取り込みを観察したところ、F-CpG-SAV-exo を添加した場合に CpG とエキソソームが同一細胞に取り込まれる様子が観察された (Fig. 7E)。

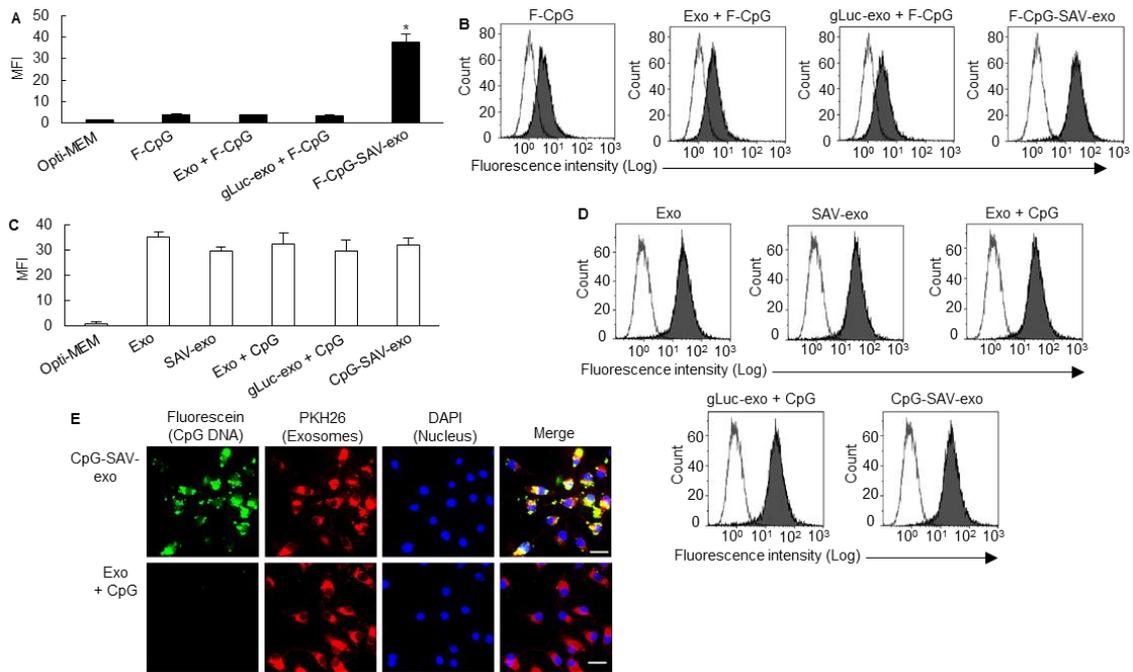


Figure 8. Efficient and simultaneous delivery of tumor antigens and adjuvant by CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo).

(A-D) Flow cytometric analysis of DC2.4 cells after the addition of fluorescein-labeled biotinylated CpG-SAV-exo (A, B) and PKH67-labeled CpG-SAV-exo (C, D). The mean fluorescence intensity (MFI) was calculated as an index of cellular uptake. (E) Fluorescent microscopic image of DC2.4 cells incubated with CpG-SAV-exo (green = fluorescein-labeled biotinylated CpG DNA, red = PKH26-labeled exosomes, blue = DAPI). Scale bar = 20 μ m.

2.3 サイトカイン産生能および抗原提示能

続いて、各種エクソソームを DC2.4 細胞へ添加後の TNF- α 、IL-6、IL-12p40 産生量を評価した (Fig. 9A-C)。エクソソームと CpG DNA の混合物 (Exo + CpG) あるいは gLuc-LA 標識エクソソームと CpG DNA の混合物 (gLuc-exo + CpG) を添加した場合と比較して、CpG-SAV-exo を添加した場合にこれらのサイトカイン産生の大幅な増大が観察された。さらに、エクソソームを取り込んだ DC2.4 細胞と gp100 に反応性を示す BUSA14 細胞を共培養後、BUSA14 細胞から産生される IL-2 を測定することで抗原提示能を評価した (Fig. 9D)。その結果、CpG-SAV-exo を DC2.4 細胞へ添加することで、BUSA14 細胞からの IL-2 産生の増大が認められた。しかしながら、Exo + CpG あるいは gLuc-exo + CpG を添加した場合には、IL-2 産生の増大は認められなかった。

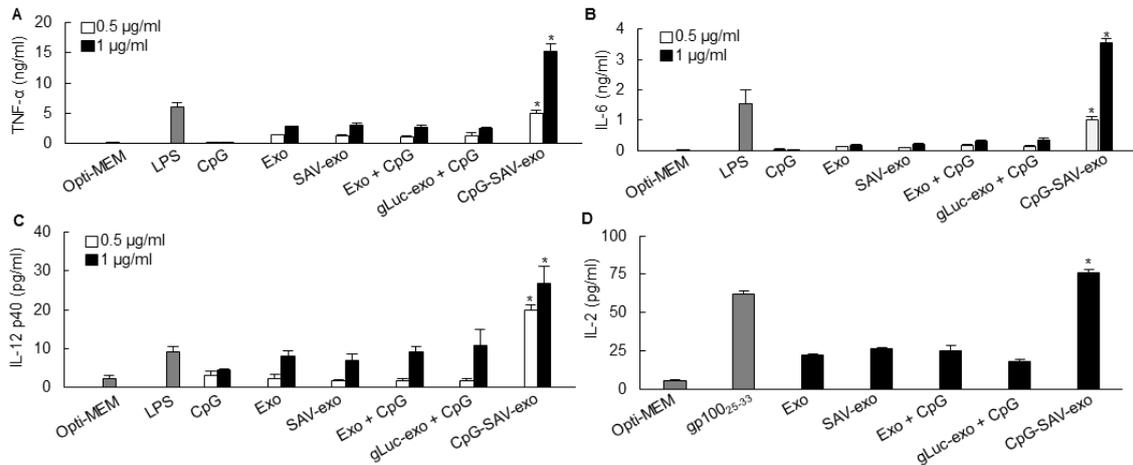


Figure 9. Stimulation with CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo) enhanced antigen presentation capacity of dendritic cells.

(A) Tumor necrosis factor- α (TNF- α), (B) interleukin-6 (IL-6) and (C) IL-12 p40 secretion from DC2.4 cells at 8h after the treatment with CpG-SAV-exo. (D) IL-2 secretion from BUSA14 cells induced by a gp100-specific response. DC2.4 cells were treated with Exo, SAV-exo, Exo + CpG, gLuc-exo + CpG, or CpG-SAV-exo at a final concentration of 1 μ g/ml of exosomes. Next, BUSA14 were added, and the cultures were incubated for 24 h. IL-2 concentrations in culture media were measured. Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 4). Data shown are representative of three independent experiments. *P < 0.05 compared with the Exo + CpG group.

2.4 B16BL6 細胞特異的免疫の誘導

B16BL6 細胞特異的な免疫応答を評価するため、CpG-SAV-exo をマウスへ皮内投与した。その後、脾細胞を回収しマイトマイシン C 処理した B16BL6 細胞あるいは EG7 細胞と共培養し、産生される IFN- γ 量を測定した (Fig. 10A)。Exo、SAV-exo、および Exo + CpG を免疫した場合の脾細胞が産生する IFN- γ は同程度であったのに対し、CpG-SAV-exo を免疫した場合には IFN- γ 産生量の大幅な増大が認められた。一方、EG7 細胞と共培養後の脾細胞からは、有意な IFN- γ 産生は確認されなかった。さらに、血清中の B16BL6 特異的抗体価についても評価を行った (Fig. 10B-G)。その結果、CpG-SAV-exo 投与群における B16BL6 特異的な総 IgG 抗体価は、Exo + CpG 投与群よりも有意に高かった。さらに、Th-1 応答性に関連する IgG2a 抗体価についても、CpG-SAV-exo 投与による上昇が確認された。一方で、Th-2 応答性の IgG1 抗体価については、CpG-SAV-exo を投与しても上昇は認められず、Exo + CpG 投与群と同程度であった。また、IgG2a/IgG1 比についても CpG-SAV-exo の投与により増大したことから、B16BL6 特異的な Th-1 応答性の体液性免疫を効果的に誘導可能であることが示された (Fig. 10H)。

続いて、B16BL6 特異的な cytotoxic T-lymphocyte (CTL) 活性を評価した (Fig. 11A and B)。CpG-SAV-exo を免疫後の脾細胞では、Exo、SAV-exo、Exo + CpG を免疫した場合と比較し

て、B16BL6 に対する高い CTL 活性を示した。一方で、EG7 細胞に対する有意な CTL 活性は認められなかった。

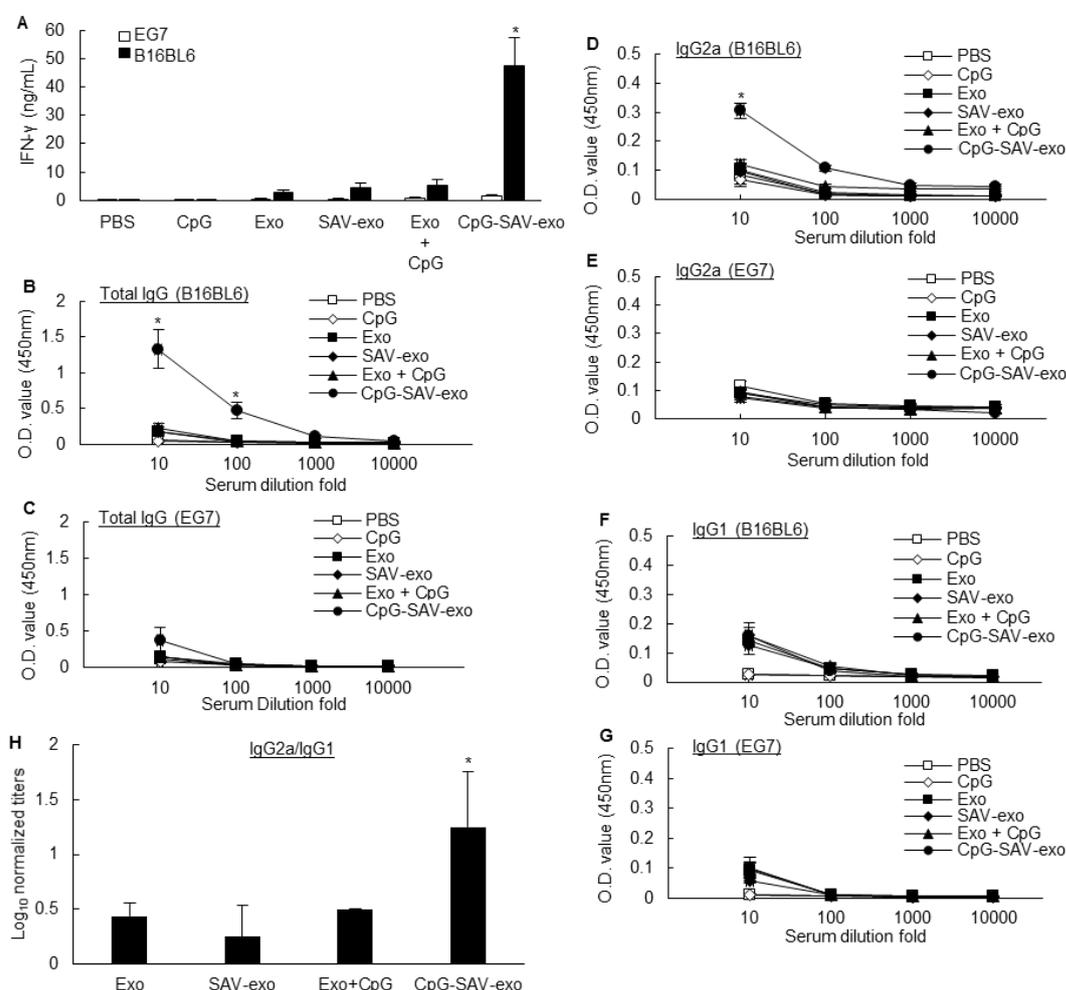


Figure 10. Induction of potent B16BL6-specific cellular and humoral immunity by CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo).

Mice were intradermally immunized three times with PBS, CpG-SAV-exo, SAV-exo, Exo + CpG, or CpG-SAV-exo (1-pmol DNA and 1- μ g exosomes/50 μ L-PBS/mouse) at 3-day intervals. (A) Cellular immune response induced by CpG-SAV-exo. Splenocytes were collected 7 days after the last immunization and stimulated with mitomycin C-treated B16BL6 or EG7 cells for 3 days. Levels of interferon- γ (IFN- γ) in the culture media were measured. (B-H) Humoral immune responses after immunization with CpG-SAV-exo. Plates were coated with B16BL6 or EG7 lysates and incubated with serum from immunized mice. Total mouse immunoglobulin G (IgG) (B, C), mouse IgG2a (D, E), and mouse IgG1 (F, G) were detected. (H) Ratio of IgG2a/IgG1 antibodies titers against B16BL6. Results are expressed as the means \pm standard deviations of data from five mice. Data shown are representative of two independent experiments. *P < 0.05 compared with the Exo + CpG group.

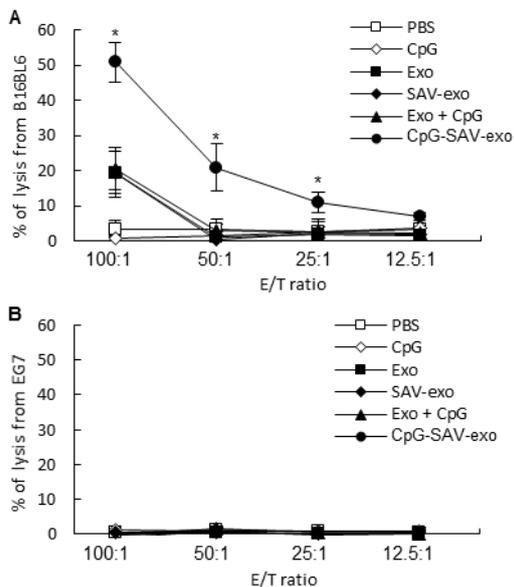


Figure 11. Induction of potent B16BL6-specific cytotoxic T lymphocytes by CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo).

Splenocytes isolated from immunized mice were co-cultured with mitomycin C-treated B16BL6 cells for 4 days. A ^{51}Cr release assay was subsequently performed. B16BL6 (A) and EG7 (B) cells were used as target cells. Results are expressed as the means \pm standard deviations of data from five mice. Data shown are representative of two independent experiments. * $P < 0.05$ compared with the Exo + CpG group.

2.5 CpG DNA 修飾エキソソームの抗腫瘍効果

各種エキソソームを3日間隔で計3回皮下投与したマウスに、最終免疫から7日後にB16BL6細胞を皮下に移植し、腫瘍径およびマウス生存率を経日的に測定した。その結果、CpG-SAV-exoの投与により、他の投与群と比較して癌の増殖が有意に抑制された(Fig. 12A)。一方、Exo + CpGを投与した場合の癌増殖抑制効果はExoあるいはSAV-exoの投与群と同程度であった。加えて、マウス生存率もCpG-SAV-exoを投与することで有意に上昇した(Fig. 12B)。

続いて、B16BL6担癌モデルマウスに対し、各種エキソソームを3日間隔で計3回腫瘍内投与し、マウスの腫瘍径および生存率を経日的に測定した(Fig. 12C)。その結果Exo、SAV-exo、Exo + CpGを投与しても腫瘍増殖抑制効果は殆ど認められなかった。しかしながら、CpG-SAV-exoを投与することで有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、CpG-SAV-exoの投与によるマウス生存率も有意に上昇した(Fig. 12D)。また、CpG DNA 修飾エキソソームの腫瘍内投与は、皮下投与と比較してより強力に腫瘍増殖を抑制することを確認した(Fig. 13)。続いて、抗腫瘍免疫活性におけるT細胞の関与を確認するため、胸腺欠損マウスにB16BL6細胞を移植し、CpG-SAV-exoを腫瘍内投与した場合の腫瘍増殖を評価した(Fig. 14)。その結果、野生型の担癌マウスではCpG-SAV-exo投与による抗腫瘍免疫活性が確認されたのに対し、胸腺欠損マウスではほとんど認められなかったことから、CpG-SAV-exoによる抗腫瘍免疫はT細胞が大きく関与していることが示唆された。

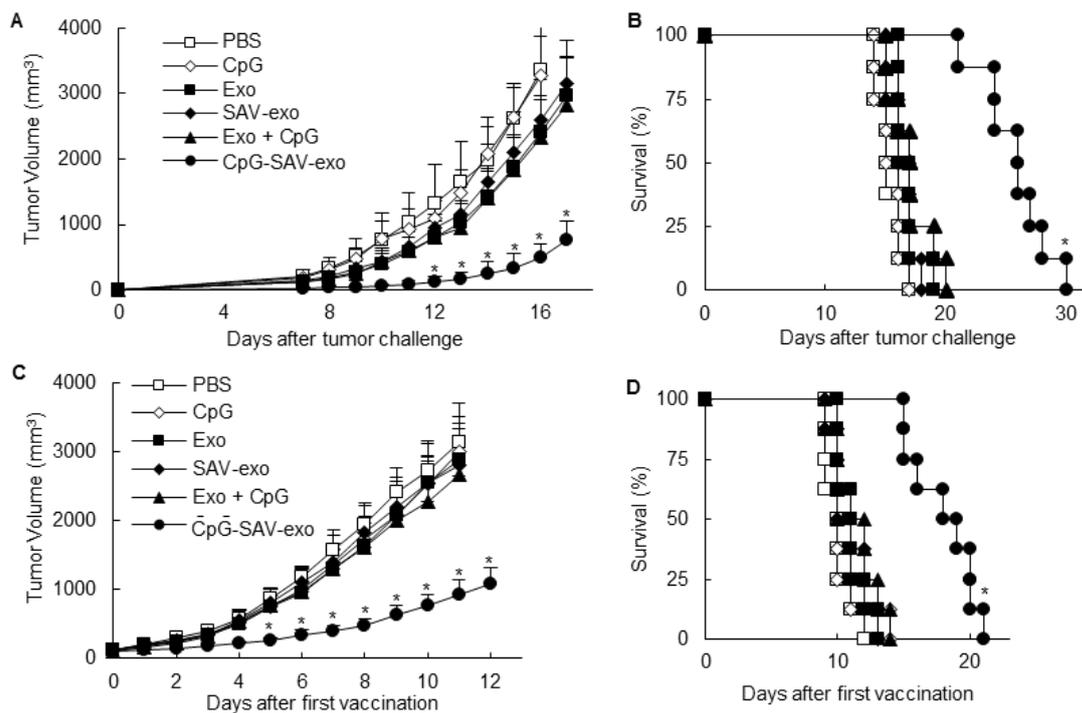


Figure 12. Antitumor immunity induced by CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo).

(A, B) Mice were intradermally immunized three times with PBS, CpG-SAV-exo, SAV-exo, Exo + CpG, or CpG-SAV-exo (1-pmol DNA and 1- μ g exosomes/50- μ L PBS/mouse) at 3-day intervals. Seven days after the last immunization, mice were subcutaneously inoculated with B16BL6 cells (5×10^5 cells/mouse). Tumor volume (A) and survival (B) were measured daily. (C, D) Mice were subcutaneously inoculated with B16BL6 cells. When the tumor volume in these mice exceeded 100 mm³, the indicated test components were directly injected into tumor tissues at 3-day intervals. Tumor volume (C) and survival (D) were measured daily. Results are expressed as the means \pm standard deviations of data from eight mice. Data shown are representative of two independent experiments. *P < 0.05 compared with the Exo + CpG group.

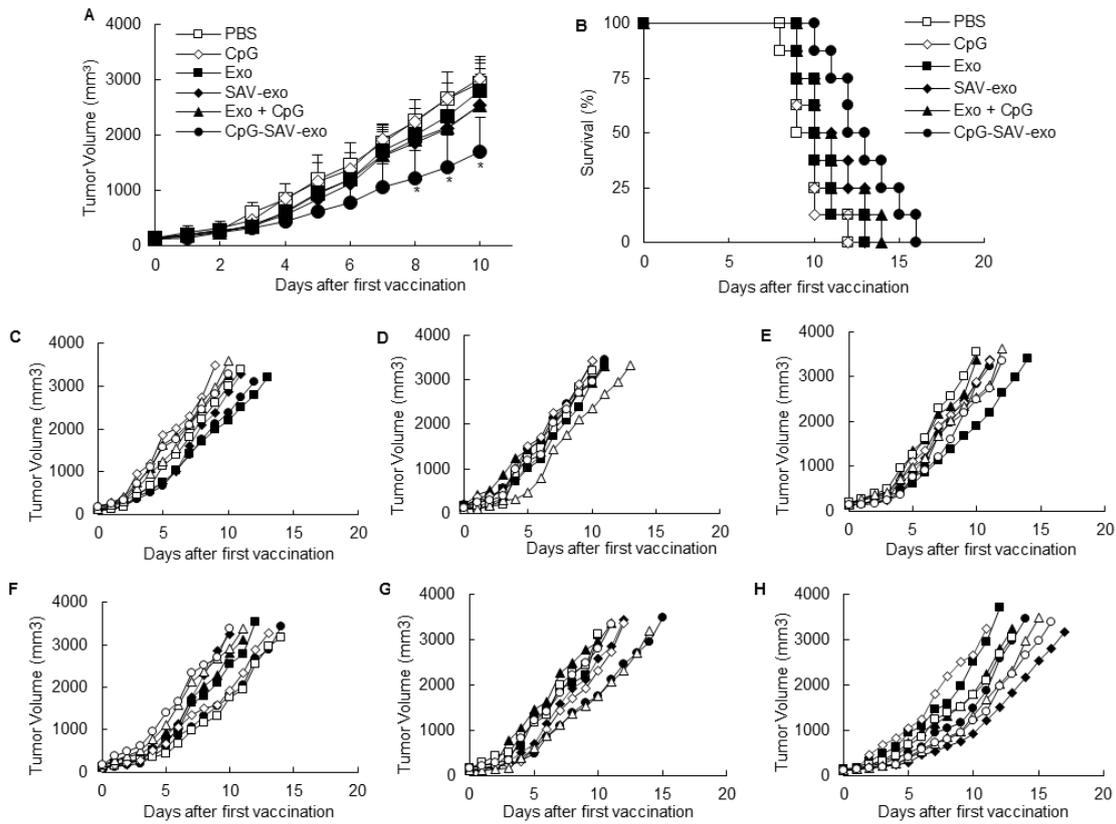


Figure 13. Therapeutic antitumor immunity induced by intradermal administration of CpG DNA-modified exosomes (CpG-SAV-exo).

When the tumor volume in the mice exceeded 100 mm³, PBS, CpG, Exo, SAV-exo, Exo + CpG, or CpG-SAV-exo were intradermally injected three times at 3-days intervals. Tumor volume (A) and survival (B) were measured daily. Results are expressed as the means \pm standard deviations of data from eight mice. *P < 0.05 compared with the Exo + CpG group. (C-H) Tumor volume of individual mice after the first vaccination. (C) Phosphate-buffered saline (PBS), (D) CpG, (E) exosome (Exo), (F) streptavidin-expressing exo (SAV-exo), (G) Exo + CpG, and (H) CpG DNA-modified exo (CpG-SAV-exo).

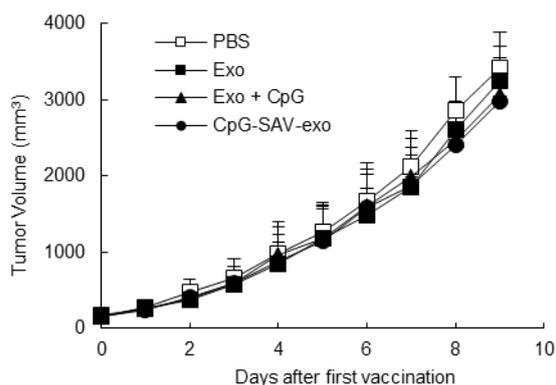


Figure 14. Tumor volume in athymic nude mice (BALB/c nu/nu) after vaccination with PBS, Exo, Exo + CpG or CpG-SAV-exo.

When the tumor volume in the athymic BALB/c nu/nu mice exceeded 100 mm³, the mice received intratumoral injection of PBS, Exo, Exo + CpG, or CpG-SAV-exo. Immunization were repeated three times at 3-day intervals. Tumor volume was measured daily. Results are expressed as the means \pm standard deviations of data from four mice.

2.6 CpG DNA 修飾エクソソーム投与が癌微小環境形成および転移に与える影響

CpG DNA 修飾エクソソームによる強力な抗腫瘍免疫が確認されたが、一方で癌細胞由来エクソソームは血管新生や免疫抑制作用を介した癌微小環境形成、あるいは癌転移の促進に関わっているといった報告も存在する。そこで、CpG DNA 修飾エクソソームの投与がこれらの現象に与える影響を評価した。まず、担癌モデルマウスに CpG-SAV-exo を腫瘍内投与後、腫瘍組織における VEGF および TGF- β 1 の mRNA を測定することで、CpG-SAV-exo が癌微小環境に与える影響を評価した (Fig. 15A and B)。その結果、CpG-SAV-exo を投与しても、両 mRNA の発現増大は認められなかった。また、共焦点蛍光顕微鏡による観察からも腫瘍組織における血管新生の増大は認められなかった (Fig. 15C)。

癌転移に与える影響を評価するため、CpG-SAV-exo 投与後の担癌マウスから肺を摘出し、肺結節数を測定した (Fig. 16)。その結果、Exo あるいは Exo + CpG を投与した場合には、PBS 群と同程度の結節数が確認されたのに対し、CpG-SAV-exo の投与ではむしろ減少した。これらの結果より、CpG-SAV-exo は癌微小環境にほとんど影響は与えず、むしろ癌転移を抑制することが示された。

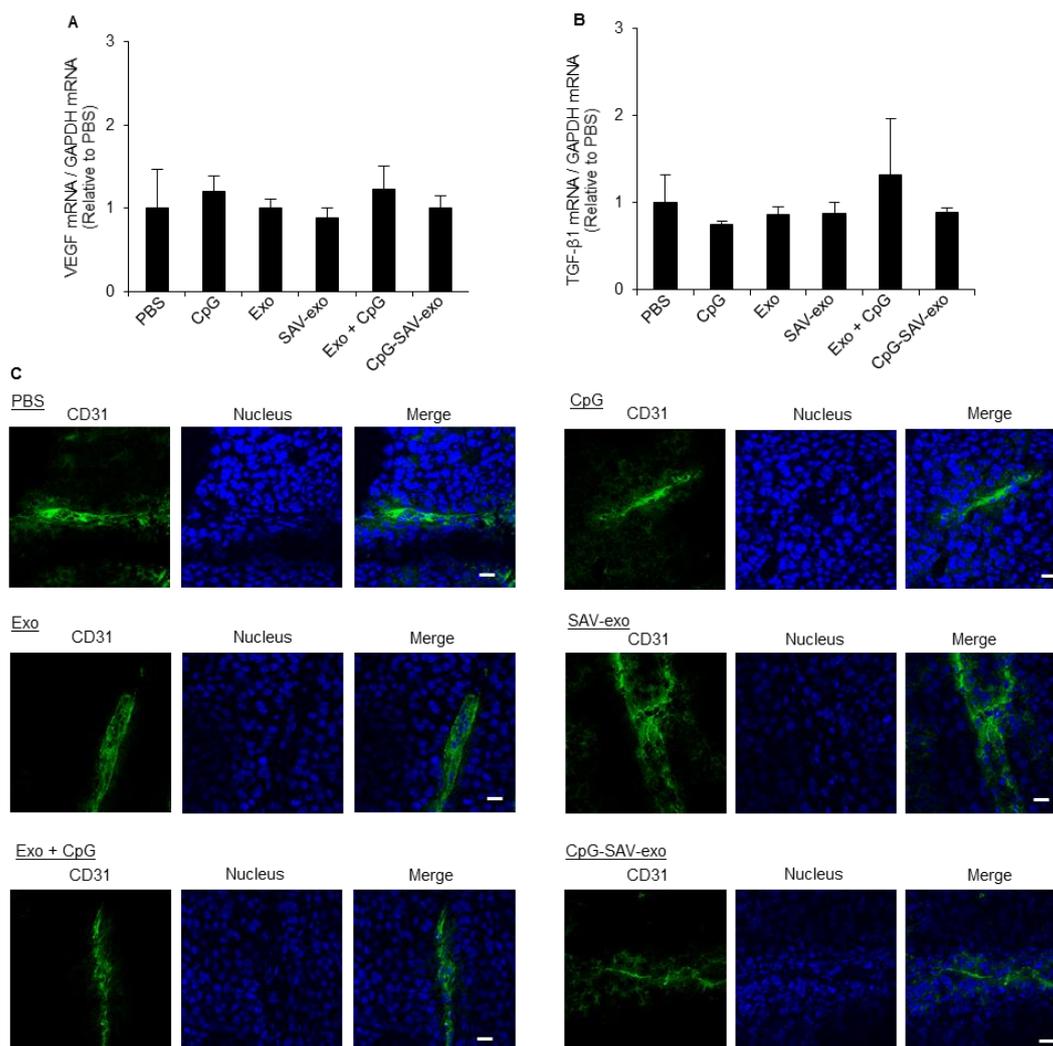


Figure 15. Evaluation of VEGF and TGF-β1 mRNA level and microvessel formation in tumor tissue after the treatment with CpG-SAV-exo.

Total RNA was extracted from tumor tissue at 1 day after the last immunization and the mRNA level of VEGF (A) and TGF-β1 (B) were measured. Results are expressed as the means ± standard deviations of data from four mice. (C) Typical images of tumor tissue stained with anti-CD31 antibody (microvessel; green) and DAPI (nucleus; blue). Scale bar = 20μm.

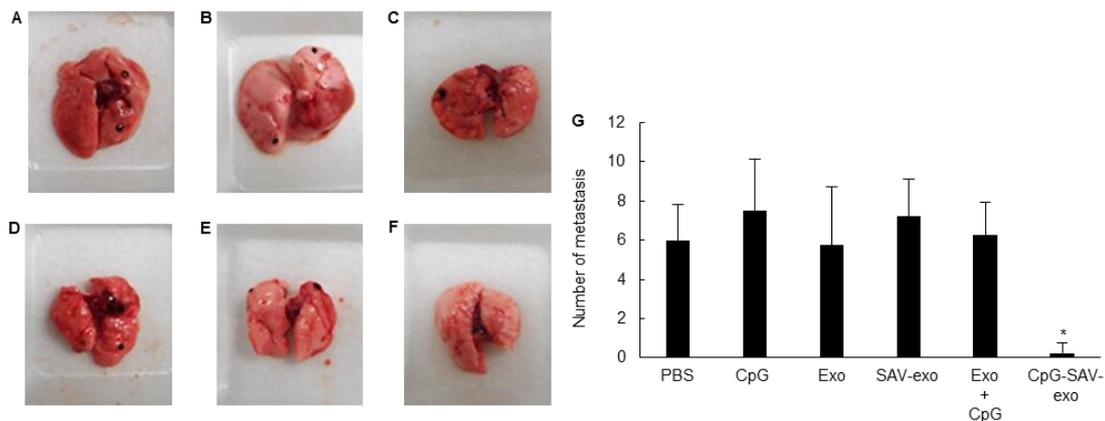


Figure 16. Pulmonary metastasis of B16BL6 cells in tumor-bearing mice after the treatment with CpG-SAV-exo.

At 1 day after the last immunization, lung of tumor-bearing mice was isolated and the number of pulmonary tumor nodules were counted. Photographs of lungs after the treatment with (A) Phosphate-buffered saline (PBS), (B) CpG, (C) exosome (Exo), (D) SAV-LA-expressing exo (SAV-exo), (E) Exo + CpG, and (F) CpG DNA-modified exo (CpG-SAV-exo). (G) Number of pulmonary tumor nodules. Results are expressed as the means \pm standard deviations of data from four mice. * $P < 0.05$ compared with the Exo + CpG group.

2.7 考察

癌抗原を利用した癌免疫療法においては、限られた種類の癌抗原しか同定・精製されていないのが現状である。従って、こうしたプロセスを必要としない癌細胞由来エキソソームを利用した癌免疫療法は、様々な癌に対して癌抗原特異的 CTL を誘導するのに有効と言える⁵⁰。癌細胞由来エキソソームとアジュバントを利用した癌免疫療法は臨床試験で既に行われているものの、両剤の単純混合物を投与していることから、抗原提示細胞である DC への癌抗原とアジュバントの同時デリバリーはほとんど期待できない。本研究では、癌細胞由来エキソソームを CpG DNA で修飾することで、癌細胞由来エキソソームを基盤とした癌抗原とアジュバントの同時デリバリーシステムを開発し、優れた抗腫瘍免疫を誘導可能であることを示した (Fig. 8 and 12)。この方法を利用することでエキソソームによる癌免疫療法の更なる発展が期待できるものと考えられる。

本研究ではエキソソームを CpG DNA で修飾するために、解離定数が 10^{-15} M と非常に強力な SAV と biotin 間の相互作用を利用した⁵¹⁻⁵³。また、SAV は LA との融合タンパク質とすることでエキソソームへ修飾しているが、第 1 章の検討より LA を介してエキソソーム表面へ提示される分子は血清存在下のような生物学的環境においても安定であることが示されている^{49,54}。このような結合安定性の高い方法を用いてエキソソームを CpG DNA 修飾したため、両剤を DC へ同時デリバリーできたとも考えられる。

エキソソームの物理化学的性質に関して、負電荷を帯びた CpG DNA の存在によりエキソ

ソームの表面電荷が変化し、DC へのエクソソームのデリバリー能に影響を及ぼしかねない。しかしながら、エクソソーム 1 μg あたりに存在する CpG DNA はおよそ 1 pmol であり、これはエクソソームに負電荷を与えている主要な分子の一つである PS がエクソソーム 1 μg あたり 100 pmol 含まれるのと比較すると非常に少ないことから、エクソソームの物性に与える影響は少ないものと考えられる⁵⁵⁾。実際に物性測定や細胞取り込み実験からもその可能性は否定された。

抗腫瘍免疫の評価に関して、エクソソームを CpG DNA で修飾することで、1 回あたり 1 μg の投与量で強力な Th-1 型の免疫応答および抗腫瘍免疫活性が誘導できた (Fig.12)。エクソソームを利用したワクチン開発の先行研究の多くが 1 回あたり 10-200 μg を投与しており、本検討で用いた CpG-SAV-exo は非常に少量であるにも関わらず効果的な免疫応答を引き起こした⁵⁶⁻⁵⁸⁾。エクソソーム回収量の増大は癌免疫療法において重要な課題とされていることから、アジュバント修飾によるエクソソーム投与量の削減は、癌細胞由来エクソソームを基盤とした癌免疫療法の更なる発展に繋がると期待できる⁵⁹⁻⁶⁰⁾。

CpG DNA 修飾エクソソームの腫瘍内投与は、皮内投与よりも優れた抗腫瘍免疫活性を示した (Fig. 12 and 13)。これまでに、CpG DNA の腫瘍内投与により癌細胞のネクローシスを惹起可能な TNF- α の産生が増大することが報告されている⁶¹⁾。加えて、CpG DNA の腫瘍内投与は CD4 陽性および CD8 陽性 T 細胞を効果的に誘導し、さらには骨髄由来免疫抑制細胞の活性を減弱することも報告されている⁶²⁻⁶³⁾。CpG DNA 修飾エクソソームを用いることで CpG DNA のデリバリー能の向上が認められたことから、CpG DNA 修飾エクソソームの腫瘍内投与により上述した CpG DNA の活性が増大している可能性がある。

癌細胞由来エクソソームを利用した癌ワクチンの臨床研究が進む一方で、癌細胞由来エクソソームによる血管新生や免疫抑制作用、あるいは癌転移の促進といった相反する作用も報告されている^{8, 64-67)}。しかしながら、本研究においては CpG DNA 修飾エクソソームを投与後の腫瘍組織におけるこれらの現象に関与すると考えられるサイトカインの mRNA 発現量に変化は無く、肺転移に関してもむしろ減少した (Fig. 15 and 16)。従って、CpG DNA 修飾エクソソームを利用した癌抗原-アジュバントの同時送達システムは癌抗原特異的な抗腫瘍免疫を優先的に誘導可能と考えられる。また、CpG DNA 修飾エクソソーム投与後の免疫応答に関して、EG7 細胞に対する有意なサイトカイン産生および CTL 活性は確認されなかった (Fig. 10 and 11)。癌細胞由来エクソソームは癌抗原のみならず自己抗原も含んでいることから、これらが DC への取り込みを介して提示されると自己免疫反応を誘導する恐れがある。現在のところエクソソームを利用した癌ワクチンに関する臨床研究ではそのような報告は存在しないが、今後はこうした自己免疫応答にも注意すべきと思われる。

DC へのエクソソームおよび CpG DNA のデリバリー能に関して、CpG DNA 修飾エクソソームを用いた場合に CpG DNA のデリバリー効率に顕著に上昇したのに対し、エクソソームのデリバリー能に変化は無かった (Fig. 8)。体外から投与された癌細胞由来エクソソームは DC に取り込まれるものの、そのデリバリー効率は高くないことが報告されている⁶⁸⁾。

これに対し、DC を標的とした抗原デリバリーシステムの開発において、CD40 や glycosphingolipid Gb3 といったリガンドの使用により DC への抗原のデリバリー効率が上昇することが報告されている⁶⁹⁻⁷¹⁾。従って、これらのリガンドを LA との融合タンパク質としてエクソソームへ修飾することで、DC へのデリバリー能の更なる向上が期待できるものと考ええる。

以上、第 2 章では遺伝子改変技術を利用して癌細胞由来エクソソームを CpG DNA で修飾することにより、DC への癌抗原-アジュバント同時デリバリーに成功した。さらに、担癌モデルマウスを用いた検討から、エクソソームと CpG DNA の単純混合物を投与した場合と比較して、CpG DNA 修飾エクソソームを投与することで優れた抗腫瘍免疫が得られることを明らかとした。これらの結果は、癌細胞由来エクソソームを利用した癌抗原-アジュバント同時デリバリーシステムの開発するうえで重要な情報を提供するものと考ええる。

第3章 細胞内動態制御型癌細胞由来エキソソームの開発による癌抗原提示能の増強

癌細胞由来エキソソームを用いた癌免疫療法では、癌抗原の DC への取り込みと、それに引き続く効率的な癌抗原の提示が必要である。抗原特異的な免疫反応の誘導には、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞および CD4 陽性ヘルパー T 細胞への抗原提示が重要であり、これらの T 細胞は DC 上の MHC クラス I およびクラス II 分子を介して提示された抗原ペプチドをそれぞれ認識する⁷²⁾。一般に、DC に取り込まれた癌抗原はエンドソーム/リソソーム画分でプロセッシングを受け、MHC クラス II 分子に結合し細胞表面へ移送された後、CD4 陽性ヘルパー T 細胞へ提示される⁷³⁾。しかし、一部の癌抗原は細胞質に局在するプロテアソームと呼ばれるタンパク質分解酵素複合体により分解され、生じた抗原ペプチドは小胞体上の TAP (transporter associated with antigen presentation) を通過し、MHC クラス I 分子に結合する。その後、MHC クラス I-抗原ペプチド複合体は細胞表面へと輸送され CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞に対し提示されることが知られており、この一連の経路はクロスプレゼンテーションと呼ばれる⁷⁴⁻⁷⁵⁾。効果的な抗腫瘍免疫の獲得には CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が必要であるため、癌抗原を細胞質へと積極的にデリバリーし、DC 上の MHC クラス I 分子を介した癌抗原の提示を増強することが望ましい⁷⁶⁾。

これまでの先行研究から、エキソソームは主にエンドサイトーシスを介して DC に取り込まれることが報告されている⁷⁷⁾。従って、癌細胞由来エキソソームを利用した癌免疫療法においても、エンドソームからの効率的な脱出を図り、細胞質へ癌抗原をデリバリーすることで癌抗原の MHC クラス I 提示能を増強させる必要がある。

そこで第3章では、DC に取り込まれた癌細胞由来エキソソームの細胞内動態を制御することで、癌抗原の MHC クラス I 提示能の増強を試みた。エンドソームから細胞質への移行を促進する機能分子として、pH 応答性膜融合ペプチドである GALA を選択した⁷⁸⁻⁷⁹⁾。GALA は酸性条件で両親媒性の α -ヘリックス構造を形成し、脂質膜へ貫入することで膜溶解作用を示す。エキソソームへの GALA 修飾は、第2章と同様に SAV-biotin 間の結合を利用することとした。すなわち、B16BL6 細胞由来エキソソームを SAV-LA 融合タンパク質で修飾し、これに GALA の biotin 誘導体を反応させることで GALA 修飾癌細胞由来エキソソーム (GALA-exo) を調製した。酸性条件における GALA-exo の膜溶解活性を評価するとともに、マウス樹状細胞 DC2.4 細胞を用いて、GALA-exo のエンドソーム脱出能および癌抗原の MHC クラス I 提示能についても評価した。

3.1 GALA 修飾癌細胞由来エクソソームの調製

SAV-LA 発現プラスミドを導入した B16BL6 細胞からエクソソームを回収し、各種タンパク質の存在を western blotting 法により検出した (Fig. 17A)。その結果、第 2 章と同様にエクソソームのマーカータンパク質である Alix、HSP70、CD81 の存在を確認した。さらに、メラノーマ抗原の 1 種である gp100 を発現していることも確認した。続いて、エクソソームの GALA による修飾を確認するため、赤色蛍光色素 PKH26 で標識した SAV-LA 修飾エクソソームとフルオレセイン標識した biotin 化 GALA を混合し、蛍光顕微鏡にてエクソソーム粒子を観察した (Fig. 17B)。SAV-LA 修飾エクソソーム (SAV-exo) と biotin 化 GALA を混合した場合には、両者の共局在が観察されたのに対し、未修飾のエクソソーム (Exo) と biotin 化 GALA を混合した場合には両者の共局在は認められなかった。従って、SAV-biotin 結合に基づきエクソソームを GALA で修飾可能であることが示された。また、GALA の修飾効率についても確認したところ、エクソソーム 1 μg におよそ 1.98 pmol の GALA すなわちエクソソーム 1 粒子におよそ 571 分子の GALA が修飾されていることが示された。続いて、回収した GALA-exo の物性を Exo あるいは SAV-exo と比較した (Fig. 17C and Table 3)。その結果、Exo、SAV-exo、CpG-SAV-exo の粒子径はそれぞれおよそ 107、107、106 nm であり、粒度分布についても類似したパターンを示した。また、表面電荷はそれぞれいずれも -32 mV 程度であり、GALA 修飾後もエクソソームの物性は大きく変化しないことが示された。

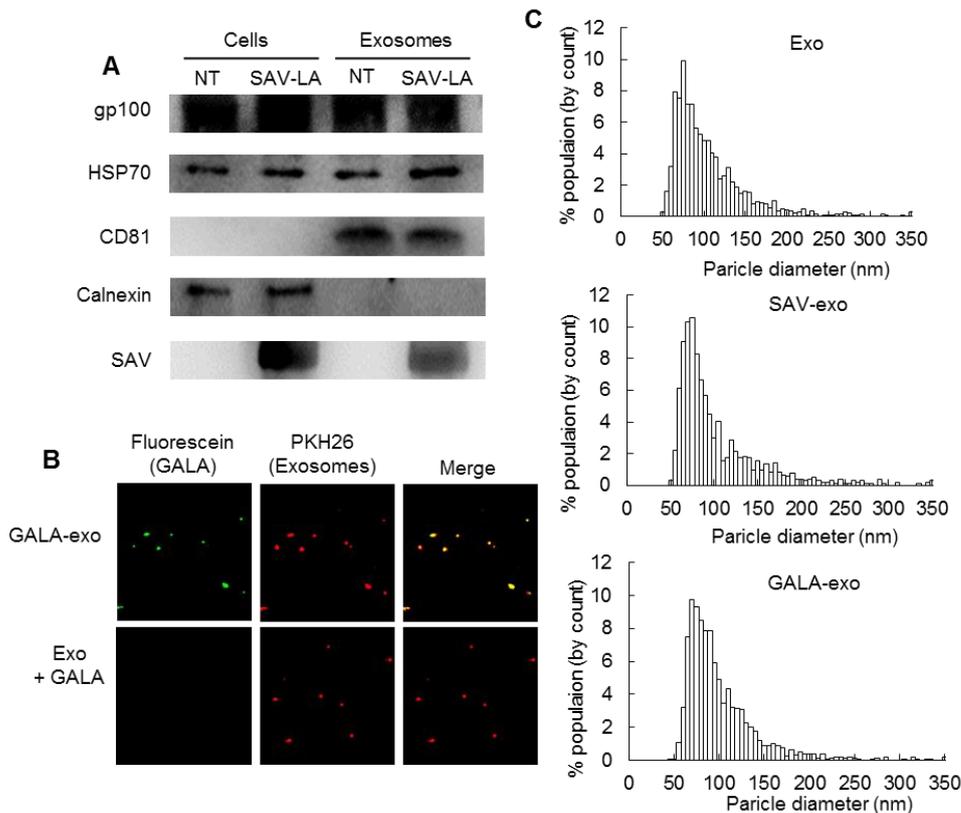


Figure 17. Development of GALA-modified exosomes (GALA-exo).

(A) Western blotting analysis of gp100, HSP70, CD81, Calnexin, SAV in cell lysates and exosomes from non-treated (NT) or SAV-LA transduced B16BL6 cells. (B) Fluorescent microscopic observation of GALA-exo, exosomes mixed with biotinylated GALA (Exo + GALA) (green = fluorescein-labeled biotinylated GALA, red = PKH26-labeled exosomes). (C) Histograms of particle size distribution images of Exo, SAV-exo, and

Table 3. Particle size and zeta potential of Exosomes (Exo), streptavidin (SAV)-exosomes (SAV-exo) and GALA-modified exosomes (GALA-exo). Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 3).

	Particle size (nm)	Zeta potential (mV)
Exo	107 \pm 10	-32 \pm 0.6
SAV-exo	107 \pm 5	-32 \pm 0.4
GALA-exo	106 \pm 4	-33 \pm 1.9

3.2 GALA 修飾癌細胞由来エキソソームの膜溶解活性

GALA は酸性条件下で膜溶解活性を示すことから、続いてカルセインを封入したリポソームを GALA-exo と混合後、リポソームの膜溶解に伴い漏出するカルセイン量を測定した (Fig. 18)。その結果、pH5 の条件でカルセイン封入リポソームと GALA-exo を混合することで、カルセインの漏出が確認された。また、この時のカルセインのリポソームからの漏出は GALA-exo の添加量依存的に増大した。一方、pH5 においてカルセイン封入リポソームを Exo と混合してもカルセインの漏出は確認されなかった。さらに、pH7.4 においては、GALA-exo あるいは Exo と混合してもリポソームからのカルセインの漏出は確認されなかったことから、GALA-exo が酸性条件において膜溶解活性を発揮することが示された。

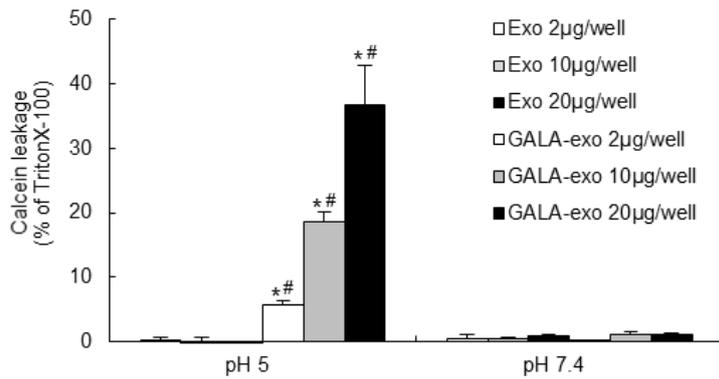


Figure 18. Membrane-lytic activity of GALA-exo.

Calcein-encapsulating liposomes added to 96-well plates were incubated with the indicated concentration of unmodified exosomes (Exo) or GALA-exo for 1 h at 37°C. The fluorescence intensity of samples were measured with excitation at 490 nm and emission at 520 nm. Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 4). *P < 0.05 compared with the Exo in pH 5 at same concentration. #P < 0.05 compared with the GALA-exo in pH7.4 at same concentration.

3.3 DC2.4 細胞に取り込まれたエキソソーム内包物の局在

細胞に取り込まれたエキソソームの細胞内動態を評価するため、エキソソーム内包物を Exo-Green を用いて緑色に蛍光染色した後 DC2.4 細胞へ添加し、その様子を共焦点蛍光顕微鏡で観察した (Fig. 19A)。その結果、Exo あるいは SAV-exo を DC2.4 細胞へ添加した場合には、エキソソーム内包物を示す緑色の蛍光はエンドソームを示す赤色の蛍光と共局在していた。これに対し、GALA-exo を添加した際にはエキソソーム内包物を示す緑色の蛍光が細胞質全体へ拡散する様子が観察された。また、GALA 修飾エキソソームの内包物の細胞質移行は、エンドソームの酸性化阻害剤であるクロロキンの処理により消失した。また、Exo、SAV-exo、GALA-exo を DC2.4 細胞へ添加した際の取り込み量について比較したところ、いずれのエキソソームでも同程度細胞に取り込まれることが確認された (Fig. 19B)。従って、SAV や GALA の修飾はエキソソームの DC2.4 細胞への取り込みに大きな影響は与えないことが示された。

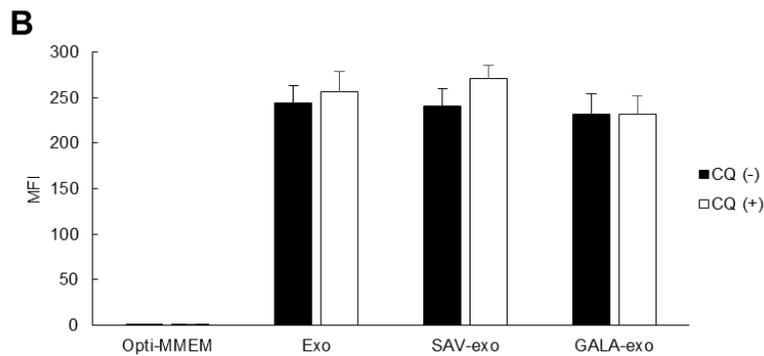
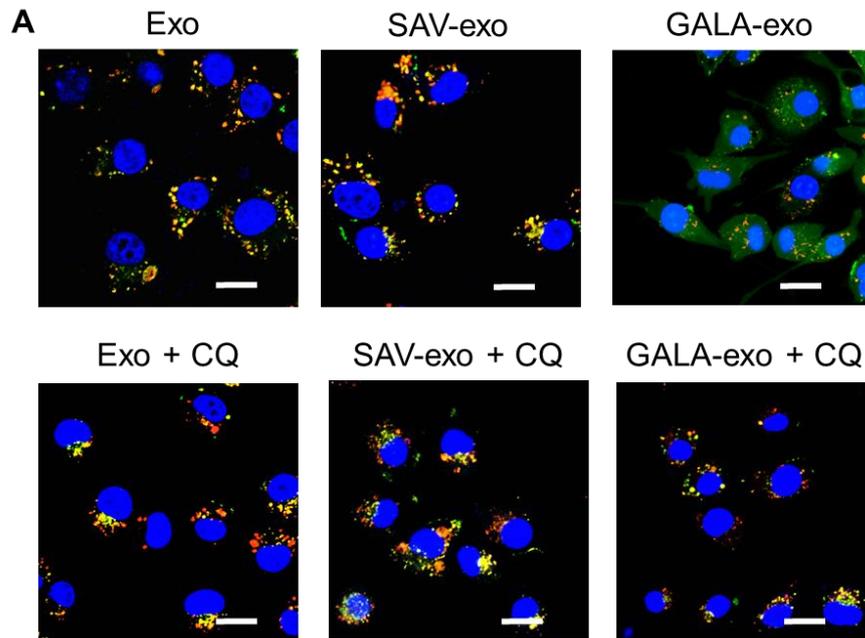


Figure 19. Cellular uptake of GALA-exo by DC2.4 cells.

(A) Upper; Confocal fluorescent microscopic image of DC2.4 cells 12 h after incubation with Exo, SAV-exo or GALA-exo. Bottom; DC2.4 cells were incubated with 10 μ M chloroquine for 60 min to inhibit endosomal acidification. Then, the cells were incubated with Exo, SAV-exo or GALA-exo for 12 h and observed under confocal fluorescent microscopy. (green = cargos of exosomes, red = endosome, blue = DAPI). Scale bar = 20 μ m. (B) Flow cytometric analysis of DC2.4 cells after the addition of Exo, SAV-exo or GALA-exo in the absence (■) or presence (□) of chloroquine (CQ). Results are expressed as means \pm standard deviations (n =

3.4 DC2.4 細胞による癌抗原の MHC クラス I 提示能

続いて、Exo、SAV-exo、GALA-exo を添加した DC2.4 細胞と BUSA14 細胞を共培養し、BUSA14 細胞が分泌する IL-2 を測定することで DC2.4 細胞の癌抗原の MHC クラス I 提示能を評価した (Fig. 20)。その結果、Exo あるいは SAV-exo を DC2.4 細胞へ添加した場合に比べ、GALA-exo を添加することで BUSA14 細胞が分泌する IL-2 が有意に増大した。従って、エクソソームを GALA で修飾することで DC2.4 細胞による癌抗原の MHC クラス I 提示能が増強されることが示された。

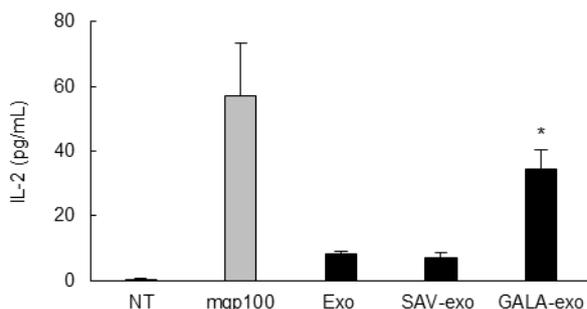


Figure 20. Tumor antigen presentation capacity by MHC class I molecules on DC2.4 cells.

DC2.4 cells treated with Exo, SAV-exo or GALA-exo were co-cultured with BUSA14 cells and incubated for 24 h. IL-2 secretion from BUSA14 cells induced by a gp100-specific response were measured. Results are expressed as means \pm standard deviations (n = 4). *P < 0.05 compared with the Exo group.

3.5 考察

従来の癌抗原タンパク質あるいはペプチドを用いた癌ワクチンと同様に、癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法においても、効果的な抗腫瘍免疫の獲得には DC による癌抗原提示能の増大に基づく CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞の誘導が重要であることが実証されている⁸⁰⁾。これまでに、癌細胞由来エクソソームによる抗腫瘍免疫の増強にはアジュバントが広く用いられてきた⁸¹⁻⁸⁴⁾。臨床試験においても、癌細胞由来エクソソームとアジュバントの併用により DC を活性化することで癌抗原提示能が増強され、CD8 陽性細胞傷害性 T 細胞を効率的に誘導可能であることが報告されている⁴²⁻⁴³⁾。しかしながら、癌細胞由来エクソソームの細胞内動態制御により DC の癌抗原提示能の増強を達成した報告は存在しなかった。今回、癌細胞エクソソームを pH 応答性の膜融合ペプチドである GALA で修飾することで、エクソソーム内包物の細胞質への移行が促進され、DC による癌抗原の MHC クラス I 提示能の増強に成功した。

細胞に取り込まれたエクソソームの細胞内動態の制御は、エクソソームを利用した癌免疫療法のみならず、エクソソームを基盤としたドラッグデリバリーシステム (DDS) 開発にも有用と考えられる⁸⁵⁻⁸⁷⁾。エクソソームは内因性の核酸の輸送担体としても機能することから、small interfering RNA (siRNA) や micro RNA といった核酸医薬品のデリバリーシステムとしての利用も期待されている^{44-45, 88-90)}。こうした核酸医薬品の主たる作用部位は細胞

質であるが、エキソソームのエンドソームからの脱出が不十分なため作用が最大限発揮されないといった問題が指摘されている⁹¹⁾。SAV-biotin 結合を利用したエキソソームへの GALA 修飾は、癌細胞のみならず他の細胞が分泌するエキソソームにも適用可能であるため、エキソソームを基盤とした DDS 開発に有用な知見を提供するものと考えられる。

GALA は酸性条件において両親媒性の α -ヘリックス構造を形成し、脂質膜への貫入を引き起こすことで膜溶解作用を示す⁷⁸⁾。さらに、GALA は濃度依存的に膜溶解活性を発揮することも報告されており⁹²⁾、これらの知見は今回のカルセイン封入リポソームに対する GALA-exo の膜溶解活性でも確認された (Fig. 18)。さらに、DC2.4 細胞を用いた細胞取り込みの観察から、GALA 修飾によりエキソソーム内包物が細胞質へと効率的に移行する様子が確認されたが、この効果はエンドソームの酸性化阻害剤であるクロロキンの処理により消失した。よって、GALA-exo がエンドソーム内の酸性条件において膜溶解活性を発揮したものと推察される (Fig. 19A)。また、フローサイトメトリー法による検討から、DC2.4 細胞によるエキソソームの取り込み量は GALA の修飾に影響されないことを確認した (Fig. 19B)。従って、GALA 修飾による癌抗原の MHC クラス I 提示能の増強は、エキソソーム取り込み量の増大によるものではなく、細胞内挙動の変化に起因するものと考えられる。

BUSA14 細胞を利用した抗原プレゼンテーションアッセイより、DC2.4 細胞による gp100 の MHC クラス I 提示能は GALA-exo の処理により増大することが示された (Fig. 20)。しかしながら、癌細胞由来エキソソームは癌抗原のみならず内因性の自己抗原も内包している。従って、こうした自己抗原の細胞質への移行も GALA 修飾により増大していることが予想され、これにより自己反応性の CD8 陽性 T 細胞が誘導されている可能性がある⁹³⁾。よって、癌細胞由来エキソソームを基盤とした癌免疫療法の実用化に向けては、GALA-exo を免疫後の自己免疫反応の惹起にも注意を払う必要がある。

以上、第 3 章では SAV-biotin 結合を利用することで、癌細胞由来エキソソームを pH 応答性の膜融合ペプチド GALA で修飾することに成功した。そして、GALA 修飾癌細胞由来エキソソームは DC に取り込まれた後エキソソーム内包物を細胞質へ積極的に送達することを見出すとともに、DC による癌抗原の MHC クラス I 提示能を増強できることを明らかにした。これらの知見は癌細胞由来エキソソームの細胞内動態制御に基づく癌免疫療法の開発に有益な情報を提供するものと考えられる。

結論

著者は 3 章にわたり、癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の開発を目的に、エクソソームの体内動態定量的解析法を開発するとともに、癌細胞由来エクソソームを取り込んだ DC の活性化能および癌抗原提示能についての検討を行い、以下の結論を得た。

第 1 章 癌細胞由来エクソソームの定量的体内動態解析を目的とした放射標識法の開発

癌細胞である B16BL6 細胞に SAV-LA 発現プラスミドを導入することで、SAV-LA 修飾エクソソームを調製した。さらに、このエクソソームに ^{125}I -IBB を反応させることで SAV-biotin 結合に基づくエクソソームの放射標識に成功した。そして、エクソソーム放射標識法の開発により、各組織へ移行した癌細胞由来エクソソームの絶対量を定量的に解析することを可能とした。これらの検討から、癌細胞由来エクソソームの DC への効率的なデリバリー法の開発に基づく癌免疫療法の構築に向けて、エクソソーム放射標識法の開発に基づく体内動態定量的解析が有用であることが示された。

第 2 章 遺伝子改変癌細胞由来エクソソームを基盤とする癌抗原-アジュバント同時デリバリーシステムの開発

SAV-LA 修飾エクソソームに対し、免疫刺激性核酸である CpG DNA の biotin 誘導体を反応させることで CpG DNA 修飾癌細胞由来エクソソームの開発に成功した。癌細胞由来エクソソームへ CpG DNA を修飾することでマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞への CpG DNA のデリバリー効率は大幅に上昇し、さらにエクソソームと CpG DNA の同一細胞への同時デリバリーも可能とした。CpG DNA 修飾癌細胞由来エクソソームは DC2.4 細胞を効率的に活性化し、癌抗原提示能も増大した。さらに、CpG DNA 修飾癌細胞由来エクソソームを投与することで、エクソソームと CpG DNA の混合物を投与した場合よりも効率的に癌抗原特異的免疫反応が誘導され、優れた抗腫瘍効果が得られた。これらの検討から、癌細胞由来エクソソームを利用した癌抗原-アジュバント同時デリバリーは DC の活性化および癌抗原提示能の増大が可能であり、抗腫瘍免疫を強力に誘導できることが示された。

第 3 章 細胞内動態制御型癌細胞由来エクソソームの開発による癌抗原提示能の増強

SAV-LA 修飾エクソソームと pH 応答性膜融合ペプチド GALA の biotin 誘導体を混合することで、SAV-biotin 結合に基づく GALA 修飾癌細胞由来エクソソームの調製に成功した。調製した GALA 修飾癌細胞由来エクソソームは酸性条件において膜溶解活性を発揮することが示された。GALA 修飾癌細胞由来エクソソームは DC2.4 細胞に取り込まれた後、その内包物が細胞質へ積極的に移行することを見出すとともに、その内包物質の細胞質以降にはエンドソームの酸性を必要とすることを明らかとした。さらに、癌細胞由来エクソソーム

を GALA で修飾することで、DC2.4 細胞による癌抗原の MHC クラス I 提示能が増強されることが示された。これらの検討から、癌細胞由来エクソソームの細胞内動態を制御することで、樹状細胞による癌抗原の MHC クラス I 提示能を増強可能なことが明らかとなった。

以上、著者は、エクソソームの放射標識法を開発し、癌細胞由来エクソソームの定量的体内動態解析に成功した。また、優れた抗腫瘍免疫の獲得には遺伝子改変癌細胞由来エクソソームを用いた癌抗原-アジュバントの同時デリバリーが有効であることを見出すとともに、エンドソーム脱出能を有する癌細胞由来エクソソームを開発することで効率的な癌抗原の提示を可能とした。本研究で得られた知見は、癌細胞由来エクソソームを利用した癌免疫療法の開発に対して有用な基礎的情報を提供するものと考えられる。

謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 高倉喜信教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御懇篤なる御助言と御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科 西川元也准教授、高橋有己助教に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、実験の一部に御協力、御助言、御指導を賜りました京都大学大学院薬学研究科病態機能分析学分野 佐治英郎教授、神戸薬科大学薬品物理化学研究室 佐野紘平講師に心からの感謝の意を表します。

また、種々の貴重な御助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科病態情報薬学分野教室一同、特に実験の一部に御協力戴いた松本明宏氏に深謝します。

最後に、研究に専念できる環境を与えて下さった父 一義、母 砂稚子に深く感謝致します。

実験の部

第1章 実験の部

【1】 試薬

DMEM 培地は日水製薬株式会社より購入した。ウシ胎仔血清 (FBS) は MP Biomedicals 社より購入した。ポリエチレンイミン (PEI) Max は Polyscience 社より購入した。Opti-modified Eagle's medium (Opti-MEM) は Life Technologies より購入した。その他の試薬は、市販の特級品を用いた。

【2】 細胞株

マウスメラノーマ細胞株 B16BL6 は、理研バイオリソースセンター社から購入した。細胞は、10 % FBS、0.15 % 炭酸水素ナトリウム、100 units/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地で、37 °C、5 % CO₂、加湿条件下で培養した。

【3】 実験動物

5 週齢、雄性、BALB/c マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。

【4】 SAV-LA 発現プラスミド DNA の作成

SAV、LA の cDNA の作成方法については以前に報告している^{15,94}。SAV-LA の cDNA は、以下のプライマーを用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した。SAV (forward) 5'-GGATAGATCTCAGCATGCAGGTCTCCCCTGTGCTGGCCGCGCTGTGCGGCATGCTACTCTGCGCCTCTGGCCTCTTCGCCGGTGACCCCTCCAAGGACTC-3', (reverse) 5'-TCCATGCCAGCTGTGTAGAACACCCTGCTGAACGGCGTCGAGCG-3'; LA (forward) 5'-TGTTCTACACAGCTGGGCATGGA-3', (reverse) 5'-CTACGCTAGCCTGAGCATTAAACAGCCCAGCAGCTC-3'。増幅した SAV-LA 部分を pcDNA3.1 ベクターへ挿入することで、SAV-LA 発現プラスミド DNA を作成した。

【5】 エキソソーム回収用培地の作成

10 % FBS 含有 DMEM 培地を 100,000 × g で 2 時間超遠心操作を行うことで、FBS 由来のエキソソームを除去した。その後、孔径 0.45 μm のメンブランフィルター (日本ミリポア社) で滅菌濾過操作を行った。

【5】 B16BL6 細胞への遺伝子導入

SAV-LA 発現プラスミド DNA 40 μg を 0.323 g/L に調製した PEI Max (Polysciences 社) 320 μl と混合し、30 分間静置することにより複合体を形成させた。その後、80 % コンフルエン

ト状態となった B16BL6 細胞へ複合体溶液を添加し、1 時間後にエクソソーム回収用培地に交換後さらに 24 時間培養を行った。

【6】 SAV-LA 修飾エクソソームの回収

プラスミド導入後の細胞培地に対して、 $300 \times g$ 10 分、 $2,000 \times g$ 20 分、 $10,000 \times g$ 30 分の順で遠心分離を行って細胞断片を除去し、その後孔径 $0.2 \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを用いて濾過操作を行うことで前処理培地を調製した。前処理培地に対して $100,000 \times g$ 1 時間の超遠心操作を行うことで SAV-LA 修飾エクソソームを沈殿させた。培養上清を除去し PBS に置換し再度超遠心操作を 2 回行うことで培地由来のタンパク質を洗浄除去した。その後、ブラッドフォード法によるタンパク質定量を行うことでエクソソームの回収量を算出した。

【7】 エクソソームの物理化学的性質の評価

エクソソームの粒度分布および平均粒子径はナノ粒子マルチアナライザー qNano (Izon 社) を用いて測定した。エクソソームの表面電荷については、Zetasizer Nano ZS (Malvern) を用いて測定した。

【8】 透過型電子顕微鏡によるエクソソーム粒子の観察

エクソソームに 2 % パラホルムアルデヒドを添加し室温で 30 分固定した後、走査型電子顕微鏡 (TEM) 観察用グリッド (応研商事社) に添加した。PBS で洗浄後、1 % グルタルアルデヒドで再度固定し、1 % 酢酸ウランを添加することで透過処理を行った。その後、エクソソーム粒子を TEM により観察した。

【9】 放射標識エクソソームの調製

SAV-LA 修飾エクソソーム $10 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ を ^{125}I -IBB $92.5 \text{ kBq}/30 \mu\text{l}$ と室温で 10 分インキュベートすることによりエクソソームの放射標識を行った。調製したエクソソームの放射化学的純度は、ペーパークロマトグラフィーを用いて評価した。

【10】 放射標識の安定性評価

放射標識エクソソームを 20 % FBS 含有 PBS 中でインキュベーションした。1 時間後および 4 時間後に Nanosep 300 K Omega (Pall Corporation) でサンプルを限外濾過し、濾過されずに残存したサンプル中の放射活性を γ シンチレーションカウンター (PerkinElmer 社) で測定した。

【11】 エクソソーム体内動態の評価

マウスへ放射標識エクソソームを 1 匹当たり $4 \mu\text{g}/37 \text{ kBq}$ で静脈内投与した。経時的に大静脈採血することで屠殺し、血液中あるいは各組織中の放射活性を γ シンチレーションカウ

ンターで測定した。エキソソームの速度論的解析は、非線形最小二乗法プログラム MULTI を用いて算出した⁹⁵⁾。

第2章 実験の部

【1】試薬

RPMI1640 培地は日水製薬株式会社より購入した。非必須アミノ酸溶液はナカライテスク株式会社より購入した。モノチオグリセロールおよびマイトマイシン C は和光純薬工業株式会社より購入した。蛍光色素 PKH26 および PKH67 は Sigma-Aldrich 社より購入した。他の試薬は第1章と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】細胞株

B16BL6 細胞は第1章と同様の方法で実験に用いた。マウス胸腺腫細胞株 EG7 細胞は American Type Culture Collection より購入した。マウス樹状細胞株 DC2.4 はマサチューセッツ医科大学病理学部の Kenneth Rock 博士より供与して頂いた。BUSA14 細胞 (gp100 反応性のマウス T 細胞ハイブリドーマ) はワイツマン科学研究所の Lea Eisenbach 教授より供与して頂いた⁹⁶⁾。

【3】実験動物

5 週齢、雄性、BALB/c マウスおよび胸腺欠損 BALB/c Slc-nu/nu マウスは、日本エスエルシー株式会社より購入した。

【4】オリゴヌクレオチド (ODN)

3'末端を biotin-triethylene glycol (TEG) 修飾したホスホロチオエート型 ODN 1668 (5'-TCCATGACGTTTCCTGATGCT-3')は Integrated DNA Technologies 社より購入した。別途、3'末端を biotin-TEG 修飾、5'末端を Fluorescein isothiocyanate (FITC) で蛍光標識した ODN も Integrated DNA Technologies 社より購入した。CpG モチーフに該当する配列は下線で記した。

【5】SAV-LA 修飾エキソソームの回収

第1章と同様の方法で SAV-LA 修飾エキソソームを回収した。

【6】CpG DNA 修飾エキソソームの調製

SAV-LA 修飾エキソソーム 1 µg を biotin 化 CpG DNA 100 pmol と混合し、室温にて 10 分インキュベートした。その後、超遠心操作により未反応の biotin 化 CpG DNA を除くことで CpG DNA 修飾エキソソームを精製した。別途、FITC 標識した biotin 化 CpG DNA を SAV-LA 修飾エキソソームと混合し、さらに PKH26 を添加することでエキソソームの脂質膜を蛍光染色した。その後、超遠心操作により CpG DNA 修飾エキソソームの蛍光標識体を精製した。

【7】 エキソソームの物理化学的性質の評価

第 1 章と同様の方法でエキソソームの粒度分布、平均粒子径ならびに表面電荷を測定した。

【8】 透過型電子顕微鏡によるエキソソーム粒子の観察

第 1 章と同様の方法でエキソソーム粒子を TEM により観察した。

【8】 Western blotting

エキソソームおよび凍結融解により調製した細胞溶解液 5 μ g を 0.1 M の dithiothreitol で処理後、95°C で 3 分間加熱した。その後、10 % ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により 100 V で 2 時間電気泳動を行った。さらに、ゲルを回収し電気泳動により PVDF 膜へタンパク質を転写した。得られた PVDF 膜は Blocking One 溶液で 30 分間振盪した後、各種一次抗体と室温で 1 時間処理した。その後 0.1 % tween 20 含有 TBS (250 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl) で洗浄し、peroxidase 標識 2 次抗体と室温にて 1 時間反応させた。洗浄後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore 社) で処理し、LAS-3000 imaging system (FUJIFILM 社) によりバンドを検出した。各抗体は下記に記した。

The primary and secondary antibodies used for western blotting

Primary antibodies
rabbit anti-streptavidin antibody (1:100; Sigma-Aldrich)
mouse anti-Alix antibody (1:20,000; BD Biosciences)
rabbit anti-HSP70 antibody (1:1,000; Cell Signaling Technology)
rabbit anti-CD81 antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology)
rabbit anti-Pmel17 antibody (1:200; Santa Cruz Biotechnology)
goat anti-TRP2 antibody (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology)
rabbit anti-Calnexin antibody (1:1,000; Santa Cruz Biotechnology)
Secondary antibodies
rabbit anti-mouse IgG-HRP (1:2,000; Thermo Fisher Scientific)
goat anti-rabbit IgG-HRP (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology)
donkey anti-goat IgG-HRP (1:5,000; Santa Cruz Biotechnology)

【9】 DC2.4 細胞によるエキソソームの取り込み

DC2.4 細胞 5×10^4 個を 96 ウェルプレートに播き、24 時間培養した。PBS で細胞を二回洗浄した後、蛍光標識したエキソソームを細胞に添加し、37 °C で 8 時間インキュベートした。PBS で細胞を二回洗浄した後、200 μ l の PBS で細胞を回収し、フローサイトメトリー (Gallios Flow Cytometer) で細胞の蛍光強度を測定し、Kaluza software (version 1.0) で算

出した。

【10】 蛍光顕微鏡観察

DC2.4 細胞を 13 mm のカバーガラス上に播いた。4 時間培養した後、蛍光標識したエクソソームを添加し、37 °C で 24 時間インキュベートした。PBS で細胞を 2 回洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。PBS で細胞を 2 回洗浄した後、細胞核を染色するために 60 nM の 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI) を添加し、10 分間インキュベートした。細胞が接着したカバーガラスを、マウント剤 (SlowFade Gold) を添加したスライドガラス上へ置き、蛍光顕微鏡 (Biozero BZ-X710) を用いて観察した。

【11】 DC2.4 細胞からのサイトカイン産生量評価

5.0×10^4 個の DC2.4 細胞を 96 ウェルプレートに播いた。24 時間培養後、Opti-MEM で希釈したエクソソームを細胞に添加した。8 時間インキュベート後、上清を回収し、-80 °C で保存した。上清中の TNF- α 濃度は ELISA 法 (OptEIA set) を用いて測定した。

【12】 DC2.4 細胞の抗原提示能評価

DC2.4 細胞 5×10^4 個を 96 ウェルプレートに播き、24 時間培養した。その後 Opti-MEM で希釈したエクソソームおよび 5.0×10^4 個の BUSA14 細胞を添加し共培養した。24 時間インキュベート後、上清を回収し、-80 °C で保存した。上清中の IL-2 濃度は ELISA 法を用いて測定した。

【13】 脾臓細胞からのサイトカイン産生および

エクソソームをマウス側腹部に 3 日間隔で計 3 回皮内投与した。最終免疫から 7 日後のマウスより脾臓を採取し、脾臓細胞の懸濁液を調製した。別途、B16BL6 細胞および EG7 細胞をマイトマイシン C 処理することで増殖を停止させ、これらを標的細胞とした。 5×10^5 個の脾臓細胞と 5×10^4 個の標的細胞を 48 ウェルプレート内で 3 日間共培養し、上清中の IFN- γ 濃度を ELISA 法により測定した。

【14】 CTL の活性測定

エクソソームを免疫後のマウス脾細胞をマイトマイシン C 処理した B16BL6 細胞で 3 日間再刺激した後、脾臓細胞を 2×10^7 cells/mL に調製した。次に、 ^{51}Cr 標識を施した 2×10^4 個の標的細胞と段階希釈した脾臓細胞を 100 μL ずつ混合し、4 時間培養した。この際、最大遊離として、脾臓細胞の代わりに 1% Triton-X100 溶液を、自然遊離として、培養液 100 μL を加えた。培養終了後、培養上清を 100 μL ずつ回収しその中に含まれる放射活性を測定した。以下の式により B16BL6 および EG7 における % of specific lysis を算出し、CTL 活性を測定した。

$$\% \text{ of specific lysis} = \frac{(\text{observed release} - \text{spontaneous release})}{(\text{maximal release} - \text{spontaneous release})}$$

【15】 B16BL6 特異的 IgG 産生の評価

エキソソームをマウス側腹部に 3 日間隔で計 3 回皮内投与した。最終免疫から 7 日後にマウス下大静脈より採血を行い、遠心分離することにより血清を回収した。別途、B16BL6 および EG7 を炭酸緩衝液 (pH 9.5) に懸濁後、凍結融解を繰り返すことで細胞溶解液を調製し、これを 96 ウェルプレートに吸着させた。このプレートを 0.05 % Tween20 含有 PBS (T-PBS) で 3 回洗浄し、0.1 % BSA 含有 T-PBS を加え一時間放置し、ブロッキングを行った。T-PBS により洗浄した後、希釈した血清サンプルをアプライし、室温にて 2 時間放置した。洗浄後、HRP 標識マウス IgG 抗体、IgG1 抗体および IgG2 抗体 (Bethyl Laboratories 社) を加えて 1 時間インキュベートし、T-PBS 溶液にて洗浄した後、基質溶液 (OPD 20 mg、H₂O₂ 20 μL/リン酸-クエン酸緩衝液 50 mL) により室温にて発色させた。30 分後、10 % H₂SO₄ によって反応を停止させ、490 nm の吸光度を測定した。

【16】 エキソソームによる抗腫瘍効果の評価

癌予防効果を検討するため、エキソソームをマウス側腹部に 3 日間隔で計 3 回皮内投与し、最終免疫から 7 日後に 5×10^5 個の B16BL6 細胞を背部皮下に移植した。別途、癌治療効果を検討するために、マウス背部皮下に 5×10^5 個の B16BL6 細胞を移植した。腫瘍体積が 100 mm³ を超えた時、エキソソームを腫瘍内に直接投与あるいは側腹部に皮内投与した。エキソソームは 3 日間隔で計 3 回投与した。抗腫瘍効果は、マウスの腫瘍体積および生存日数を指標に評価した。腫瘍体積は以下の式を用いて算出した。

$$\text{Tumor volume (mm}^3\text{)} = (\text{longer length} \times \text{shorter length}^2) \times 0.5$$

なお、腫瘍体積が 3000 mm³ を超えたマウスは安楽死させた。

【17】 腫瘍組織中 mRNA の測定

担癌マウスにエキソソームを腫瘍内投与後、腫瘍組織から全 RNA を抽出し、ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO 社)を用いて逆転写反応を行った。腫瘍組織中に含まれる VEGF と TGF-β1 の mRNA の発現レベルは、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems 社)を用いた定量的 PCR により測定した。尚、定量的 PCR には以下のプライマーを用いた。

GAPDH forward, 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'; reverse, 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'; VEGF forward, 5'-CATCTTCAAGCCGTCCTGTGT-3'; reverse, 5'-CAGGGCTTCATCGTTACAGCA-3'; TGF-β1 forward, 5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3'; reverse, 5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'.

【18】腫瘍組織における新生血管の観察

担癌マウスに対しエクソソームを腫瘍内投与後、クリオスタットにより腫瘍組織を切片厚 10 μm で切り出し、4 %パラホルムアルデヒドで固定した。PBS で洗浄後、20 % FBS 含有 PBS 中で 1 時間処理した。さらに、切片をウサギ抗マウス CD31 抗体 (Biolegend 社) と 1 時間反応させ、洗浄後、Alexa Fluor 488 標識した抗ウサギ IgG (Molecular probes) で 1 時間処理した。細胞核を染色するために 60 nM の DAPI を添加し、10 分間インキュベートした。その後マウント剤 (SlowFade Gold) を添加し、共焦点蛍光顕微鏡 (A1R MP) を用いて切片を観察した。

【19】肺転移の評価

担癌マウスにエクソソームを 3 日間隔で計 3 回腫瘍内投与した。最終投与の翌日に肺を摘出し、肺に転移した癌の小結節数を測定した。

【20】統計学的解析

Analysis of variance (ANNOVA) を行い、Tukey-Kramer 法により有意差検定を行った。 $p < 0.05$ を統計学的に有意であるとした。

第3章 実験の部

【1】 試薬

1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) および Bis [N,N-bis (carboxymethyl) aminomethyl] fluorescein (カルセイン) は東京化成工業より購入した。コレステロールはナカライテスク株式会社より購入した。Exo-Green は System Biosciences 社より購入した。他の試薬は第2章と同様のもの、もしくは市販の特級品を用いた。

【2】 細胞株

B16BL6 細胞、DC2.4 細胞および BUSA14 細胞第2章実験の部【2】と同様の方法で実験に用いた。

【3】 ペプチド

N 末端を biotin-aminohexanoic acid (Ahx) で修飾した GALA (WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA) は Genscript 社より購入した。別途、N 末端を biotin-Ahx、C 末端を FITC で標識した GALA も Genscript 社より購入した。

【4】 SAV-LA 修飾エキソソームの回収

第1章実験の部【6】と同様の方法で SAV-LA 修飾エキソソームを回収した。

【6】 GALA 修飾エキソソームの調製

SAV-LA 修飾エキソソーム 1 μg を biotin 化 GALA 10 pmol と混合し、室温にて 10 分インキュベートした。その後、超遠心操作により未反応の biotin 化 GALA を除くことで GALA 修飾エキソソームを精製した。別途、FITC 標識した biotin 化 GALA を SAV-LA 修飾エキソソームと混合し、さらに PKH26 を添加することでエキソソームの脂質膜を蛍光染色した。その後、超遠心操作により GALA 修飾エキソソームの蛍光標識体を精製した。

【7】 エキソソームの物理化学的性質の評価

第1章実験の部【7】と同様の方法でエキソソームの粒度分布、平均粒子径ならびに表面電荷を測定した。

【8】 透過型電子顕微鏡によるエキソソーム粒子の観察

第1章実験の部【8】と同様の方法でエキソソーム粒子を観察した。

【9】 ウェスタンブロッティング

第2章実験の部【8】と同様の方法でウェスタンブロッティングを行った。

【10】 リポソームの調製

DSPC41 mg とコレステロール 10 mg をクロロホルムに溶解し、ナス型フラスコに分取した。ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を減圧留去して脂質薄膜とした。この薄膜に 60 mM カルセイン含有 Tris 緩衝液を加え懸濁し、70 °C で 30 分間振盪し、孔径 100 nm のポリカーボネート膜を用いた濾過操作により粒子径を均一にした。その後、Sephadex G50 Fine (GE Healthcare 社) によるゲル濾過を行い、リポソームに封入されていないカルセインを分離した。この時のバッファーは pH 5 のクエン酸緩衝液または pH 7.4 の PBS を使用した。

【11】 膜溶解活性

総脂質濃度 10 µg のカルセイン封入りポソームを添加した 96 ウェルプレートにエキソソームを添加後、37 °C で 1 時間インキュベートした。リポソームに封入したカルセインの漏出挙動を蛍光測定することで、エキソソームの膜溶解活性を評価した。膜溶解活性は 1 % (v/v) Triton X-100 を添加した際の最大蛍光強度に対する蛍光強度の百分率として以下の式を用いて算出した。

$$\% \text{ Calcein leakage} = \frac{FI_{\text{sample}} - FI_{\text{buffer}}}{FI_{\text{triton}} - FI_{\text{buffer}}} \times 100$$

【12】 DC2.4 細胞によるエキソソームの取り込み

DC2.4 細胞 5×10^4 個を 96 ウェルプレートに播き、24 時間培養した。Exo-Green を用いてエキソソーム内包物を蛍光標識した後、細胞へ添加し 37 °C で 12 時間インキュベートした。PBS で細胞を二回洗浄した後、200 ml の PBS で細胞を回収し、フローサイトメトリー (Gallios Flow Cytometer) で細胞の蛍光強度を測定し、Kaluza software (version 1.0) で算出した。

【13】 共焦点蛍光顕微鏡での観察

DC2.4 細胞を 13 mm のカバーガラス上に播き、4 時間培養した。Exo-Green を用いてエキソソーム内包物を蛍光標識した後、細胞へ添加し 37 °C で 12 時間インキュベートした。PBS で細胞を 2 回洗浄した後、1 µM の LysoTracker Red DND-99 (Life Technologies 社) で 2 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、さらに 4% パラホルムアルデヒドで 10 分間固定した。洗浄後、60 nM の DAPI を添加し、10 分間インキュベートした。その後マウント剤 (SlowFade Gold) を添加し共焦点蛍光顕微鏡 (A1R MP) を用いて細胞を観察した。

【14】 DC2.4 細胞の抗原提示能評価

第 2 章実験の部【12】と同様の方法で抗原提示能を評価した。

【15】 統計学的解析

第2章実験の部【20】と同様の方法で統計学的解析を行った。

引用文献

1. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol* 2013 200 373-383.
2. Vader P, Breakefield XO, Wood MJ. Extracellular vesicles: emerging targets for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2014 20 385-393.
3. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Lim SK. Immunotherapeutic potential of extracellular vesicles. *Front Immunol* 2014 5 518.
4. Orr L, Adam M, Johnstone R. Externalization of membrane-bound activities during sheep reticulocyte maturation is temperature and ATP dependent. *Biochem Cell Biol* 1987 65 1080-1090.
5. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009 9 581-593.
6. Johnstone R. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins. *Biochem Cell Biol* 1992 70 179-190.
7. Subra C, Grand D, Laulagnier K, Stella A, Lambeau G, Paillasse M, et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. *J Lipid Res* 2010 51 2105-2120.
8. Peinado H, Alečković M, Lavotshkin S, Matei I, Costa-Silva B, Moreno-Bueno G, et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat Med* 2012 18 883-891.
9. Cho JA, Yeo DJ, Son HY, Kim HW, Jung DS, Ko JK, et al. Exosomes: a new delivery system for tumor antigens in cancer immunotherapy. *Int J Cancer* 2005 114 613-622.
10. Zhuang X, Xiang X, Grizzle W, Sun D, Zhang S, Axtell RC, et al. Treatment of brain inflammatory diseases by delivering exosome encapsulated anti-inflammatory drugs from the nasal region to the brain. *Mol Ther* 2011 19 1769-1779.
11. Hong BS, Cho JH, Kim H, Choi EJ, Rho S, Kim J, et al. Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics* 2009 10 556-2164-10-556.
12. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011 71 3792-3801.
13. Wiklander OP, Nordin JZ, O'Loughlin A, Gustafsson Y, Corso G, Mäger I, et al. Extracellular vesicle in vivo biodistribution is determined by cell source, route of administration and targeting. *J Extracell Vesicles*. Journal of extracellular vesicles

2015 4. 26316

14. Smyth T, Kullberg M, Malik N, Smith-Jones P, Graner MW, Anchordoquy TJ. Biodistribution and delivery efficiency of unmodified tumor-derived exosomes. *J Controlled Release* 2015 199 145-155.
15. Takahashi Y, Nishikawa M, Shinotsuka H, Matsui Y, Ohara S, Imai T, et al. Visualization and in vivo tracking of the exosomes of murine melanoma B16-BL6 cells in mice after intravenous injection. *J Biotechnol* 2013 165 77-84.
16. Sano K, Temma T, Kuge Y, Kudo T, Kamihashi J, Zhao S, et al. Radioimmunodetection of membrane type-1 matrix metalloproteinase relevant to tumor malignancy with a pre-targeting method. *Biol Pharm Bull* 2010 33 1589-1595.
17. Soininen SK, Lehtolainen-Dalkilic P, Karppinen T, Puustinen T, Dragneva G, Kaikkonen MU, et al. Targeted delivery via avidin fusion protein: Intracellular fate of biotinylated doxorubicin derivative and cellular uptake kinetics and biodistribution of biotinylated liposomes. *European J Pharm Sci J Pharm Sci* 2012 47 848-856.
18. Balthasar S, Michaelis K, Dinauer N, von Briesen H, Kreuter J, Langer K. Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 2005 26 2723-2732.
19. Hsu C, Park S. Computational and mutagenesis studies of the streptavidin native dimer interface. *J Mol Graph Model* 2010 29 295-308.
20. Lai CP, Mardini O, Ericsson M, Prabhakar S, Maguire CA, Chen JW, et al. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *Acs Nano* 2014 8 483-494.
21. Grange C, Tapparo M, Bruno S, Chatterjee D, Quesenberry PJ, Tetta C, et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med* 2014 33 1055-1063.
22. Charoenviriyakul C, Takahashi Y, Morishita M, Matsumoto A, Nishikawa M, Takakura Y. Cell type-specific and common characteristics of exosomes derived from mouse cell lines: Yield, physicochemical properties, and pharmacokinetics. *Eur J Pharm Sci* 2017 96 316-322.
23. Moghimi SM, Patel H. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system—the concept of tissue specificity. *Adv Drug Deliv Rev* 1998 32 45-60.
24. Chonn A, Cullis PR, Devine DV. The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol* 1991 146 4234-4241.
25. Rothkopf C, Fahr A, Fricker G, Scherphof G, Kamps J. Uptake of phosphatidylserine-containing liposomes by liver sinusoidal endothelial cells in the serum-free perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 2005 1668 10-16.

26. Feng D, Zhao W, Ye Y, Bai X, Liu R, Chang L, et al. Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic* 2010 11 675-687.
27. Fomina AF, Deerinck TJ, Ellisman MH, Cahalan MD. Regulation of membrane trafficking and subcellular organization of endocytic compartments revealed with FM1-43 in resting and activated human T cells. *Exp Cell Res* 2003 291 150-166.
28. Rautou PE, Mackman N. Deletion of microvesicles from the circulation *Circulation* 2012 125 1601-1604.
29. Choi CH, Zuckerman JE, Webster P, Davis ME. Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 108 6656-6661.
30. Bennett CM, Glasscock RJ, Chang RL, Deen WM, Robertson CR, Brenner BM, et al. Permeability of the glomerular capillary wall. Studies of experimental glomerulonephritis in the rat using dextran sulfate. *J Clin Invest* 1976 57 1287-1294.
31. Romero P, Cerottini J, Speiser DE. Monitoring tumor antigen specific T-cell responses in cancer patients and phase I clinical trials of peptide-based vaccination. *Cancer Immunol Immunother* 2004 53 249-255.
32. Stevanovic S. Identification of tumour-associated T-cell epitopes for vaccine development. *Nat Rev Cancerr* 2002 2 514-514.
33. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature* 2011 474 609-615.
34. Batista-Duharte A, Lindblad EB, Oviedo-Orta E. Progress in understanding adjuvant immunotoxicity mechanisms. *Toxicol Lett* 2011 203 97-105.
35. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 2009 27 3331-3334.
36. Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z, et al. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8 T cell-mediated anti-tumor immunity. *Vaccine* 2008 26 5046-5057.
37. Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA. Materials engineering for immunomodulation. *Nature* 2009 462 449-460.
38. Sun Y, Liu J. Potential of Cancer Cell-Derived Exosomes in Clinical Application: A Review of Recent Research Advances. *Clin Ther* 2014 36 863-872.
39. Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001 7 297-303.
40. Andre F, Scharz N, Chaput N, Flament C, Raposo G, Amigorena S, et al. Tumor-derived exosomes: a new source of tumor rejection antigens. *Vaccine* 2002 20 A28-A31.

41. Rao Q, Zuo B, Lu Z, Gao X, You A, Wu C, et al. Tumor-derived exosomes elicit tumor suppression in murine hepatocellular carcinoma models and humans in vitro. *Hepatology* 2016 64 456-72
42. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* 2008 16 782-790.
43. Lener T, Gimona M, Aigner L, Borger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles* 2015 4 30087.
44. Cooper JM, Wiklander P, Nordin JZ, Al-Shawi R, Wood MJ, Vithlani M, et al. Systemic exosomal siRNA delivery reduced alpha-synuclein aggregates in brains of transgenic mice. *Mov Disord* 2014 29 1476-1485.
45. Liu Y, Li D, Liu Z, Zhou Y, Chu D, Li X, et al. Targeted exosome-mediated delivery of opioid receptor Mu siRNA for the treatment of morphine relapse. *Sci Rep* 2015 5 17543.
46. Wilson KD, de Jong SD, Tam YK. Lipid-based delivery of CpG oligonucleotides enhances immunotherapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009 61 233-242.
47. Diwan M, Tafaghodi M, Samuel J. Enhancement of immune responses by co-delivery of a CpG oligodeoxynucleotide and tetanus toxoid in biodegradable nanospheres. *J Controlled Release* 2002 85 247-262.
48. San Román B, Irache JM, Gómez S, Tsapis N, Gamazo C, Espuelas MS. Co-encapsulation of an antigen and CpG oligonucleotides into PLGA microparticles by TROMS technology. *Eur J Pharm Biopharm* 2008 70 98-108.
49. Morishita M, Takahashi Y, Nishikawa M, Sano K, Kato K, Yamashita T, et al. Quantitative Analysis of Tissue Distribution of the B16BL6-Derived Exosomes Using a Streptavidin–Lactadherin Fusion Protein and Iodine-125-Labeled Biotin Derivative After Intravenous Injection in Mice. *J Pharm Sci* 2015 104 705-713.
50. Jäger E, Jäger D, Knuth A. Antigen-specific immunotherapy and cancer vaccines. *Int J Cancer* 2003 106 817-820.
51. Chaiet L, Wolf FJ. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces. *Arch Biochem Biophys* 1964 106 1-5.
52. Le Trong I, Wang Z, Hyre DE, Lybrand TP, Stayton PS, Stenkamp RE. Streptavidin and its biotin complex at atomic resolution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2011 67 813-821.
53. Deng L, Broom A, Kitova EN, Richards MR, Zheng RB, Shoemaker GK, et al. Kinetic stability of the streptavidin–biotin interaction enhanced in the gas phase. *J Am Chem Soc* 2012 134 16586-16596.

54. Imai T, Takahashi Y, Nishikawa M, Kato K, Morishita M, Yamashita T, et al. Macrophage-dependent clearance of systemically administered B16BL6-derived exosomes from the blood circulation in mice. *J Extracell Vesicles* 2015 4 26238.
55. Llorente A, Skotland T, Sylvänne T, Kauhanen D, Róg T, Orłowski A, et al. Molecular lipidomics of exosomes released by PC-3 prostate cancer cells. *Biochim Biophys Acta* 2013 1831 1302-1309.
56. Yang Y, Xiu F, Cai Z, Wang J, Wang Q, Fu Y, et al. Increased induction of antitumor response by exosomes derived from interleukin-2 gene-modified tumor cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2007 133 389-399.
57. Chen W, Wang J, Shao C, Liu S, Yu Y, Wang Q, et al. Efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes derived from heat-shocked lymphoma cells. *Eur J Immunol* 2006 36 1598-1607.
58. Gu X, Erb U, Büchler MW, Zöller M. Improved vaccine efficacy of tumor exosome compared to tumor lysate loaded dendritic cells in mice. *Int J Cancer* 2015 136 74-84.
59. Xie Y, Bai O, Zhang H, Yuan J, Zong S, Chibbar R, et al. Membrane-bound HSP70-engineered myeloma cell-derived exosomes stimulate more efficient CD8 CTL-and NK-mediated antitumour immunity than exosomes released from heat-shocked tumour cells expressing cytoplasmic HSP70. *J Cell Mol Med* 2010 14 2655-2666.
60. Andre F, Scharz NE, Movassagh M, Flament C, Pautier P, Morice P, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *The Lancet* 2002 360 295-305.
61. Calzascia T, Pellegrini M, Hall H, Sabbagh L, Ono N, Elford AR, et al. TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J Clin Invest* 2007 117 3833-3845.
62. Lonsdorf AS, Kuekrek H, Stern BV, Boehm BO, Lehmann PV, Tary-Lehmann M. Intratumor CpG-oligodeoxynucleotide injection induces protective antitumor T cell immunity. *J Immunol* 2003 171 3941-3946.
63. Zoglmeier C, Bauer H, Norenberg D, Wedekind G, Bittner P, Sandholzer N, et al. CpG blocks immunosuppression by myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *Clin Cancer Res* 2011 17 1765-1775.
64. Hood JL, San RS, Wickline SA. Exosomes released by melanoma cells prepare sentinel lymph nodes for tumor metastasis. *Cancer Res* 2011 71 3792-3801.
65. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen T, Rodrigues G, Hashimoto A, Mark MT, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015 527 329-335.
66. Bai J, Xie X, Lei Y, An G, He L, Chen R. Consideration of dual characters of exosomes in the tumour immune response. *Cell Biol Int* 2014 38 538-545.
67. Kunigelis KE, Graner MW. The Dichotomy of Tumor Exosomes (TEX) in Cancer Immunity: Is It All in the ConTEXT? *Vaccines* 2015 3 1019-1051.

68. Hao S, Moyana T, Xiang J. Review: cancer immunotherapy by exosome-based vaccines. *Cancer Biother Radiopharm* 2007 22 692-703.
69. Tacken PJ, Torensma R, Figdor CG. Targeting antigens to dendritic cells in vivo. *Immunobiology* 2006 211 599-608.
70. Haicheur N, Bismuth E, Bosset S, Adotevi O, Warnier G, Lacabanne V, et al. The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *J Immunol* 2000 165 3301-3308.
71. Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S, Soares H, et al. In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 2004 199 815-824.
72. Germain RN. T-cell development and the CD4–CD8 lineage decision. *Nat Rev Immunol* 2002 2 309-322.
73. Liu Z, Roche PA. Macropinocytosis in phagocytes: regulation of MHC class-II-restricted antigen presentation in dendritic cells. *Frontiers in physiology* 2015 6 1.
74. Heath WR, Belz GT, Behrens G, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, et al. Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 2004 199 9-26.
75. Fehres CM, Unger WW, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. Understanding the biology of antigen cross-presentation for the design of vaccines against cancer. *Frontiers in immunology* 2014 5 149.
76. Radford KJ, Tullett KM, Lahoud MH. Dendritic cells and cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2014 27 26-32.
77. Escrevente C, Keller S, Altevogt P, Costa J. Interaction and uptake of exosomes by ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2011 11 108.
78. Li W, Nicol F, Szoka FC. GALA: a designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2004 56 967-985.
79. Lin BF, Missirlis D, Krogstad DV, Tirrell M. Structural effects and lipid membrane interactions of the pH-responsive GALA peptide with fatty acid acylation. *Biochemistry (N Y)* 2012 51 4658-4668.
80. Mignot G, Roux S, They C, Ségura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med* 2006 10 376-388.
81. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005 65 5238-5247.

82. Morishita M, Takahashi Y, Matsumoto A, Nishikawa M, Takakura Y. Exosome-based tumor antigens–adjuvant co-delivery utilizing genetically engineered tumor cell-derived exosomes with immunostimulatory CpG DNA. *Biomaterials* 2016 111 55-65.
83. Wang J, Wang L, Lin Z, Tao L, Chen M. More efficient induction of antitumor T cell immunity by exosomes from CD40L gene-modified lung tumor cells. *Mol Med Rep* 2014 9 125-131.
84. Zhang J, Zhang Y, Luo C, Xia Y, Chen H, Wu X. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored interleukin-2 expressed on tumor-derived exosomes induces antitumor immune response in vitro. *Tumori* 2010 96 452-459.
85. Shahabipour F, Barati N, Johnston TP, Derosa G, Maffioli P, Sahebkar A. Exosomes: Nanoparticulate Tools for RNA Interference and Drug Delivery. *J Cell Physiol* 2017.
86. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2016 106 148-156.
87. Batrakova EV, Kim MS. Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Controlled Release* 2015 219 396-405.
88. van der Meel R, Fens MH, Vader P, van Solinge WW, Eniola-Adefeso O, Schiffelers RM. Extracellular vesicles as drug delivery systems: lessons from the liposome field. *J Controlled Release* 2014 195 72-85.
89. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, et al. Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells. *Mol Ther* 2013 21 185-191.
90. Katakowski M, Buller B, Zheng X, Lu Y, Rogers T, Osobamiro O, et al. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett* 2013 335 201-204.
91. Hung ME, Leonard JN. A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery. *J Extracell Vesicles* 2016 5 31027.
92. Parente RA, Nir S, Szoka Jr FC. Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA. *Biochemistry (N Y)* 1990 29 8720-8728.
93. Liblau RS, Wong FS, Mars LT, Santamaria P. Autoreactive CD8 T cells in organ-specific autoimmunity: emerging targets for therapeutic intervention. *Immunity* 2002 17 1-6.
94. Kudo T, Ueda M, Kuge Y, Mukai T, Tanaka S, Masutani M, et al. Imaging of HIF-1-active tumor hypoxia using a protein effectively delivered to and specifically stabilized in HIF-1-active tumor cells. *J Nucl Med* 2009 50 942-949.
95. Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobio-dyn* 1981 4 879-885.
96. Cafri G, Sharbi-Yunger A, Tzehoval E, Eisenbach L. Production of LacZ Inducible T Cell Hybridoma Specific for Human and Mouse gp100 25–33 Peptides. *PloS one* 2013 8 e55583.