

京都大学	博士 (医学)	氏名	田村 亮
論文題目	Augmented liver targeting of exosomes by surface modification with cationized pullulan (カチオン化プルランを用いたエクソソームの表面修飾はエクソソームの肝指向性を増強する)		
(論文内容の要旨) エクソソームは、様々なタンパク質やRNA、脂質などを含有し細胞より分泌されるナノサイズの膜小胞であり、炎症性疾患をはじめとする動物モデルにおける治療効果が示されている。エクソソーム表面の修飾により臓器指向性および治療効果の増強を図る試みは、主にエクソソームを分泌する細胞への遺伝子導入により実施され、生体材料を用いた報告はほとんどない。本研究では、生体材料によるエクソソームの表面修飾を目的として、多糖類であるプルランの使用を試みた。本研究にはマウス骨髄由来組織幹細胞より超遠心法により採取したエクソソームおよびポリアミンである spermine の化学修飾により作製したプルラン (カチオン化プルラン) を使用した。 プルランによるエクソソームの表面修飾は、エクソソーム表面の負電荷とカチオン化プルランの正電荷間の静電相互作用を利用した。修飾前後でのエクソソームのサイズ変化、電子顕微鏡所見、表面電位、およびプルランを凝集させる効果を持つ RCA120 を用いた実験より、エクソソーム表面にカチオン化プルランが存在することが示唆された。また、カチオン化プルランの修飾後においてもエクソソームの代表的な表面マーカーがエクソソーム表面に確認された。 カチオン化プルラン修飾がエクソソームの細胞内取り込みに与える影響は HepG2 細胞を用いて確認した。修飾前後のエクソソームを PKH26 にて標識し、HepG2 細胞への取り込みを調べた。修飾エクソソームは、修飾していないものと比較して細胞内集積が有意に上昇した。その集積はアシアロ糖タンパク受容体阻害剤による HepG2 細胞の前処置により抑制された。この結果は、修飾エクソソームの取り込みに肝細胞および HepG2 細胞表面に存在する受容体の関与を示唆している。 修飾エクソソームの治療効果については、concanavalin Aを用いて作製した肝障害マウスを使用して調べた。PKH26 標識を行ったエクソソームを用いて、静脈内投与後の各組織内の PKH26 の集積を評価した。修飾することによりエクソソームの肝組織集積の有意な増加が認められた。また、修飾エクソソームは、修飾前エクソソームと比べて有意な抗炎症効果を示した。近赤外線吸収色素による標識および in vivo imaging system を用いたエクソソームの biodistribution を評価したところ、修飾エクソソームは主に肺、脾、および肝に集積していた。また、修飾エクソソームを投与したマウスでは肝内での制御性T細胞の増加が認められ、肝障害の抑制に関与していることが示唆された。 本研究では、肝への指向性および肝障害に対するエクソソームの治療効果の増強を目的として、生体材料であるプルランを表面修飾に用いた。エクソソームの表面修飾および機能の増強を目的としてプルランを用いた報告は、本研究が世界初である。プルランはすでにアシアロ糖タンパク質受容体を介した肝への指向性が報告されており、薬剤添加物として使用されている材料である。また、エクソソームの表面修飾の試みには分泌細胞への遺伝子の導入法が報告されているが、生体材料を用いた報告はほとんどない。本研究の結果より、プルランを用いた修飾によりエクソソームの肝組織への臓器指向性および障害肝での治療効果の増強が示されたとともに、エクソソームの修飾材料としての既知の生体材料の有用性もあわせて実証された。			

(論文審査の結果の要旨)

エクソソームは細胞から分泌されるナノ小胞であり、間葉系幹細胞から分泌されるエクソソームは様々な治療実験に用いられている。エクソソームの臓器特異的な送達には分泌細胞への遺伝子導入が報告されているが、もう一つの方法として生体材料によるエクソソーム表面の修飾があげられる。本学位申請者は肝指向性の付与を目的に、肝細胞上のアシアロ糖蛋白受容体にて取り込まれるプルランを使用し修飾を試みた。

修飾エクソソームは HepG2 細胞における *in vitro* 実験において有意に集積の増加を認め、この増加はアシアロ糖蛋白受容体の阻害剤により抑制された。

マウスを使用した *in vivo* 実験においては、修飾エクソソームの集積は肝において有意に増加した。また、concanavalin A を用いた肝障害モデルでは未修飾のエクソソームを投与した群と比し有意に炎症を抑制した。また、同群において肝組織中の制御性 T 細胞は有意に増加しており、炎症の抑制に寄与していることが示唆された。

以上の研究は、肝指向性を目的としたエクソソーム表面の修飾におけるプルランの有用性を示し、エクソソームの表面修飾における既知の生体材料の有用性の実証に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 8 月 18 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降