

京都大学	博士（薬学）	氏名	山下 拓真
論文題目	RNAデリバリーを目的としたエクソソームの調製法に関する研究		
<p>エクソソームは細胞が分泌する直径 100 nm 程度の小胞である。エクソソームに搭載された miRNA をはじめとする核酸を介した細胞間の情報伝達が果たす重要な役割が報告されたことから、RNA 医薬のキャリアへのエクソソームの応用が期待されている。その実現には、回収法、RNA の搭載法などの開発と最適化が必要であると考えられるが、これらの方法についての情報は乏しい。そこで申請者は、RNA デリバリーを目的としたエクソソームの調製法の最適化を目的に、以下の検討を試みた。</p> <p><u>第 1 章 エクソソーム回収法がエクソソームの特性に及ぼす影響の検討</u></p> <p>エクソソームの回収法としては様々な方法が報告されているが、デリバリーキャリアとしての利用を念頭にこれらの方法により回収されたエクソソームを比較した情報は乏しい。そこで、回収法によるエクソソームの性質の違いを検討した。モデルの産生細胞としてマウスメラノーマ細胞株 B16BL6 を選択し、比較する回収法としては、超遠心によりエクソソームを沈殿させる方法(Pelleting 法)、超遠心により Iodixanol 溶液上にエクソソームを集める方法(Cushion 法)、Iodixanol 密度勾配遠心法(Gradient 法)の 3 つを選択した。これらの方法間でエクソソーム回収量には大きな違いは見られなかったが、回収したエクソソーム間で凝集の程度が異なり、Gradient 法により最も凝集の少ないエクソソームを回収可能であることが示された。続いて回収法間での凝集の程度の違いによる影響を評価した。その結果、各方法で見られた凝集の程度の違いはマウス静脈内投与後の血中濃度プロファイルに大きな影響を与えない一方で、ろ過滅菌後の回収率が凝集により低下することが示された。以上、回収法がエクソソームの凝集の程度に影響し、これが製剤的な特性にも影響しうることを示した。</p> <p><u>第 2 章 効率的なエクソソーム回収のための培地体積の最適化</u></p> <p>エクソソームの利用を考えるうえで、エクソソームの回収量の低さは大きな問題の一つである。第一章において各回収法によるエクソソーム回収量が大きく変わらなかったことを考えると、回収量を増やすためには培養上清中に含まれるエクソソーム量を増大させることが必要と考えられる。そこで、培養上清中のエクソソーム量に影響を与える因子としてエクソソーム回収時の培地体積に着目し、その最適化を試みた。まず B16BL6 細胞の培養上清中エクソソーム量を経時的に測定したところ、およそ 12 時間でプラトーに達した。この原因としては、自己のエクソソームがエクソソーム分泌を負に制御している可能性も考えられた。しかしながら、あらかじめエクソソームを加えた状態で培養しても新規に分泌されるエクソソーム量が変化しないこと、エクソソームが濃度依存的に細胞へと取り込まれることが確認されたことから、プラトーに達する原因はエクソソームの分泌と取り込みが平衡に達するためであると示唆された。この結果をもとに、エクソソーム回収時の培地量を変化させたところ、培地量が多いほど細胞当たりのエクソソーム回収量が増加することが示された。以上、効率的なエクソソーム回収には培地体積の増大が有効であることを示した。</p> <p><u>第 3 章 RNA 搭載法の開発を目的としたエクソソーム移行性 RNA 配列の探索</u></p>			

RNA 医薬のキャリアとしての可能性が期待される一方で、エクソソームへの高効率な RNA 搭載法は確立されていない。前章までに述べたように、エクソソームの回収量はそれほど多くないことから、高効率な搭載法の開発が望ましい。そこで、内因性のエクソソームへの RNA 搭載機構を利用した効率的なエクソソームへの RNA 搭載方法の開発を目的として、Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) 法によるエクソソーム移行性配列の探索を試みた。初期配列としては、プライマー結合配列に挟まれた 40 塩基のランダム配列をもつ RNA プールを用意した。RNA プールを B16BL6 細胞へと導入した後、回収したエクソソーム中 RNA から再び RNA プールを作製するサイクルを繰り返してエクソソーム移行性配列の濃縮を行った結果、プール中に多数存在する配列(RNA-A)を見出した。そこで確認のため、RNA-A のエクソソーム移行性を評価した結果、プール中に見つかったほかの配列および RNA-A のスクランブル配列と比較して、エクソソームへの移行量が数倍程度増大していることが示された。以上、新規エクソソーム移行性配列を見出すとともに、SELEX 法によりエクソソーム移行性配列の探索が可能であることを示した。

以上、申請者は、RNA デリバリーキャリアとしてのエクソソームの調製法の最適化を目的として、エクソソーム回収法の比較、回収時培地体積に関する検討を行うとともに、新規エクソソーム移行性 RNA 配列を見出した。本研究で得られた知見は、エクソソームを基盤とした RNA のデリバリーキャリアの開発に有用な情報を提供するものとする。

(論文審査の結果の要旨)

エクソソームは細胞が分泌する直径 100 nm 程度の小胞である。エクソソームに搭載された miRNA をはじめとする核酸を介した細胞間の情報伝達が果たす重要な役割が報告されたことから、RNA 医薬のキャリアへのエクソソームの応用が期待されている。申請者は、RNA デリバリーを目的としたエクソソームの調製法の最適化を目的に、以下の検討を試みた。

まず回収法によるエクソソームの性質の違いを検討した。モデルの産生細胞としてマウスメラノーマ細胞株 B16BL6 を選択し、比較する回収法としては、超遠心によりエクソソームを沈殿させる方法(Pelleting 法)、超遠心により Iodixanol 溶液上にエクソソームを集める方法(Cushion 法)、Iodixanol 密度勾配遠心法(Gradient 法)の 3 つを選択した。検討の結果、回収したエクソソーム間で凝集の程度が異なり、Gradient 法により最も凝集の少ないエクソソームを回収可能であること、ろ過滅菌後の回収率が凝集により低下することが示された。以上、回収法がエクソソームの凝集の程度に影響し、これが製剤的な特性にも影響しうることを示した。

次に、培養上清中のエクソソーム量に影響を与える因子としてエクソソーム回収時の培地体積に着目し、その最適化を試みた。培養上清中エクソソーム量を経時的に測定したところ、およそ12時間でプラトーに達した。この原因はエクソソームの分泌と取り込みが平衡に達するためであると示唆された。この結果をもとに、エクソソーム回収時の培地量を変化させたところ、培地量が多いほど細胞当たりのエクソソーム回収量が増加することが示された。以上、効率的なエクソソーム回収には培地体積の増大が有効であることを示した。

次に内因性のエクソソームへの RNA 搭載機構を利用した効率的なエクソソームへの RNA 搭載方法の開発を目的として、Systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) 法によるエクソソーム移行性配列の探索を試みた。初期配列としてプライマー結合配列に挟まれた 40 塩基のランダム配列をもつ RNA プールを用意し、これを B16BL6 細胞へと導入した後、回収したエクソソーム中 RNA から再び RNA プールを作製するサイクルを繰り返してエクソソーム移行性配列の濃縮を行った結果、プール中に多数存在する配列(RNA-A)を見出した。RNA-A のエクソソーム移行性を評価した結果、プール中に見つかったほかの配列および RNA-A のスクランブル配列と比較して、エクソソームへの移行量が数倍程度増大していることが示された。以上、新規エクソソーム移行性配列を見出すとともに、SELEX 法によりエクソソーム移行性配列の探索が可能であることを示した。

以上、申請者は、RNA デリバリーキャリアとしてのエクソソームの調製法の最適化を目的として、エクソソーム回収法の比較、回収時培地体積に関する検討を行うとともに、新規エクソソーム移行性 RNA 配列を見出した。本研究で得られた知見は、エクソソームを基盤とした RNA のデリバリーキャリアの開発に有用な情報を提供するものと考えられる。

よって、本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 31 年 2 月 15 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、2020 年 12 月 1 日までの間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。