

京都大学	博士（薬科学）	氏名	松本 明宏
論文題目	Development of small extracellular vesicle-based therapeutics based on the elucidation and regulation of pharmacokinetic properties （細胞外小胞の体内動態特性の解明とその制御に基づく疾患治療法の開発に関する研究）		
<p>細胞外小胞(Small extracellular vesicle, sEV)は核酸やタンパク質を内包する粒子径100nm程度の脂質膜小胞であり、内包物を遠隔の細胞に送達する内因性輸送担体であることから、近年sEVを利用した治療薬、あるいは薬物輸送担体としての利用が期待されている。その実現に向けて解決すべき重要な課題の一つとしてsEVの体内動態特性の把握とその制御に基づく疾患治療法の開発が挙げられる。申請者が所属する研究室では、これまでにsEVがマクロファージをはじめとした抗原提示細胞に取り込まれやすいという性質に着目し、癌抗原を内包する癌細胞由来sEVを利用した癌ワクチン療法の開発に取り組んできた。そこで申請者はまず、腫瘍組織内に局所投与後のsEVの動態を解析した。その結果、標的である抗原提示細胞以外への取り込みが明らかとなったことから、抗原提示細胞への細胞選択的なsEV送達法の開発に取り組んだ。次いで、申請者は樹状細胞から産生されるsEVが免疫活性化能に優れることに着目して、癌ワクチン療法への適用の可能性を検証した。また、動態制御によるsEVの治療薬あるいは薬物輸送担体としての汎用性を高めることを目的にsEVの全身レベルでの体内動態特性とその機構を解明し、新規血中滞留型sEVの同定と解析についても試みた。</p> <p>第一章：癌細胞由来細胞外小胞の抗原提示細胞への選択的送達による抗腫瘍免疫応答の増強</p> <p>癌抗原特異的免疫反応を誘導するためには、主たる抗原提示細胞である樹状細胞へ癌抗原と免疫賦活剤を送達することが重要である。しかしながら、局所投与後の体内動態を解析したところ、sEVは癌細胞等の樹状細胞以外の細胞にも送達されるため樹状細胞への送達効率が低いことが判明した。ナノ粒子はサイズ増大に伴い、樹状細胞に取り込まれやすくなる一方で、他細胞には取り込まれにくくなる。そこで、sEVが樹状細胞へと選択的に送達されるよう、サイズ増大を目的にsEVをDNAの相補鎖形成能で連結したsEV会合体を調製し、会合体化による抗腫瘍免疫誘導の増強について評価した。その結果、平均粒子径1-10μm程度のsEV会合体の形成を確認した。sEV会合体はsEVと比べて樹状細胞への取り込みが2倍程度増大した一方で、癌細胞への取り込みは半分程度に減少した。マウス固形癌モデルを用いた治療実験では、sEV会合体はsEVよりも顕著に腫瘍の成長を遅延させた。</p> <p>第二章：免疫活性化能を有する樹状細胞由来細胞外小胞を利用した癌ワクチン療法の開発</p> <p>癌抗原特異的な抗腫瘍免疫応答の増強には、腫瘍微小環境に存在する免疫抑制型マクロファージを強力に活性化して免疫刺激型に変化させることが重要である。申請者は<i>in vitro</i>実験系にて、免疫賦活剤で予め刺激した樹状細胞から産生されるsEVはToll like receptor 4依存的にマクロファージを活性化することを見出した。そこで<i>in vivo</i>での抗腫瘍免疫応答の誘導を評価するためにこのsEVをマウス固形癌モデルに腫瘍内投与した。その結果、腫瘍微小環境下の免疫抑制型マクロファージの免疫刺激型への変化、ならびに腫瘍増殖の有意な抑制に成功し、一部マウスでは癌の完全退縮を認めた。</p>			

第三章：静脈内投与後の細胞外小胞の体内動態解析

培養細胞由来のsEVはマウスに静脈内投与するとマクロファージ依存的に消失半減期5分程度で血中から非常に速やかに消失した。そこでまずマクロファージがsEVを認識し、取り込む機構解明を試みたところ、マクロファージはsEV表面上のホスファチジルセリン(PS)等に由来する強い負電荷を認識することを見出した。次にこれまで全く明らかとなっていない内因性のsEVの体内動態の解明を目的に、これまで技術的課題であった内因性sEVの分離精製法、並びに標識法を新たに開発し、マウス血液由来の内因性sEVの標識体の調製が可能となった。その結果、静脈内投与後の内因性sEVの体内動態解析に初めて成功し、内因性sEVの体内動態特性が培養細胞由来のsEVと酷似することを見出すと共に内因性sEVの産生速度を見積もることに成功した。

第四章：マクロファージによる取り込み回避に基づく新規血中滞留型細胞外小胞の同定

sEVは物理化学的特性等において非常にヘテロな小胞の集団であることが明らかとなっており、近年sEVをさらに細かく分画した画分では体内動態特性が異なる可能性が報告されている。そこで第三章の結果を基に、sEV中にはPS露出量が少ない未知のsEV(PS⁻-sEV)画分が存在すること、またそのPS⁻-sEV画分はマクロファージへの取り込みが回避されることで体内動態特性が異なるのではないかと仮説を立てその検証を試みた。そこでまず、培養細胞由来sEVについて検討した結果、PS⁻-sEV画分がsEV全画分に対する微量画分として存在しており、マクロファージに取り込まれにくいこと、並びに血中滞留性に優れることを明らかにした。さらにマウスにおいて検討したところ、マクロファージによる取り込みから回避されることで消失半減期が9時間程度である非常に血中滞留性の高いPS⁻-sEV画分が血中にも存在することを発見した。

以上、申請者は見かけのサイズを増大させたsEV会合体を開発することで樹状細胞への送達効率の上昇による抗腫瘍免疫応答の増強を可能とした。また活性化した樹状細胞のsEVは腫瘍微小環境を免疫抑制型から免疫活性型に改変させることで抗腫瘍免疫応答を一層増強させた。最後に、マクロファージによるsEVの取り込み機構にPSが関与することを新たに明らかにするとともに、マクロファージへの取り込み回避可能な新規血中滞留型PS⁻-sEVの同定に成功した。本研究で得られた知見は、sEVの体内動態特性とその制御に基づくsEVを利用した治療薬あるいは薬物輸送担体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。

(論文審査の結果の要旨)

細胞外小胞(Small extracellular vesicle, sEV)は核酸やタンパク質を内包する粒子径100nm程度の脂質膜小胞であり、内包物を遠隔の細胞に送達する内因性輸送担体であることから、近年sEVを利用した治療薬、あるいは薬物輸送担体としての利用が期待されている。申請者は、以下四章にわたり、sEV体内動態特性の解明とその制御に基づく疾患治療法の開発に関する研究を行った。

第一章：癌細胞由来細胞外小胞の抗原提示細胞への選択的送達による抗腫瘍免疫応答の増強

sEVが樹状細胞へと選択的に送達されるよう、サイズ増大を目的にsEVをDNAの相補鎖形成能で連結したsEV会合体を調製し、会合体化による抗腫瘍免疫誘導の増強について評価した。その結果、平均粒子径1-10 μ m程度のsEV会合体の形成を確認した。sEV会合体はsEVと比べて樹状細胞への取り込みが2倍程度増大した一方で、癌細胞への取り込みは半分程度に減少した。マウス固形癌モデルを用いた治療実験では、sEV会合体はsEVよりも顕著に腫瘍の成長を遅延させた。

第二章：免疫活性化能を有する樹状細胞由来細胞外小胞を利用した癌ワクチン療法の開発

申請者は*in vitro*実験系にて、免疫賦活剤で予め刺激した樹状細胞から産生されるsEVはToll like receptor 4依存的にマクロファージを活性化することを見出した。そこで*in vivo*での抗腫瘍免疫応答の誘導を評価するためにこのsEVをマウス固形癌モデルに腫瘍内投与した。その結果、腫瘍微小環境下の免疫抑制型マクロファージの免疫刺激型への変化、ならびに腫瘍増殖の有意な抑制に成功し、一部マウスでは癌の完全退縮を認めた。

第三章：静脈内投与後の細胞外小胞の体内動態解析

マクロファージがsEVを認識し、取り込む機構解明を試みたところ、マクロファージはsEV表面上のホスファチジルセリン(PS)等に由来する強い負電荷を認識することを見出した。次にこれまで全く明らかとなっていない内因性のsEVの体内動態の解明を目的に、これまで技術的課題であった内因性sEVの分離精製法、並びに標識法を新たに開発し、マウス血液由来の内因性sEVの標識体の調製が可能となった。その結果、静脈内投与後の内因性sEVの体内動態解析に初めて成功し、内因性sEVの体内動態特性が培養細胞由来のsEVと酷似することを見出すと共に内因性sEVの産生速度を見積もることに成功した。

第四章：マクロファージによる取り込み回避に基づく新規血中滞留型細胞外小胞の同定

第三章の結果を基に、sEV中にはPS露出量が少ない未知のsEV(PS⁻-sEV)画分が存在すること、またそのPS⁻-sEV画分はマクロファージへの取り込みが回避されることで体内動態特性が異なるのではないかと仮説を立てその検証を試みた。そこでまず、培養細胞由来sEVについて検討した結果、PS⁻-sEV画分がsEV全画分に対する微量画分として存在しており、マクロファージに取り込まれにくいこと、並びに血中滞留性に優れることを明らかにした。さらにマウスにおいて検討したところ、マクロファージによる取り込みから回避されることで消失半減期が9時間程度である非常に血中滞留性の高いPS⁻-sEV画分が血中にも存在することを発

見した。

以上、本研究で得られた知見は、sEVの体内動態特性とその制御に基づくsEVを利用した治療薬あるいは薬物輸送担体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。よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年2月14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。