

# 研究終了報告書

## 「In vivo における多対多のアッセイを基盤としたエクソソームターゲティングシステムの効率的探索」

研究期間：2017年10月～2021年3月

研究者：小嶋 良輔

### 1. 研究のねらい

エクソソームは、種々の細胞から放出される直径 50-150 nm 程度の膜小胞であり、その中に内包されるタンパク質、mRNA、miRNA や、膜上に提示されているタンパク質を通じて細胞間のコミュニケーションを介在する重要な役割を担っていると考えられている。また、このような基礎生物学的な興味と同時に、生体適合性が高く血液脳関門を透過可能であるといった優れた特性からドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアとしても注目を集めている。このため、その動態の自在制御が可能となれば、次世代医療に大きなインパクトを与える事ができると予想される。

一方、がん細胞から放出されるエクソソームが、前転移ニッチの形成などを通じてがん細胞の悪性化に寄与しているといった報告もあることから、がん細胞からのエクソソーム放出を抑えることで、新しいがんの治療法を創出できるといった概念も提唱されており、エクソソームを対象とした基礎研究、応用研究を推進するにはエクソソームの放出機構を詳細に解明し、制御可能とすることも極めて重要であると考えられる。

しかしながら、エクソソームの体内動態や放出過程を制御する要因は極めて複雑であるため、個々のタンパク質がエクソソームの動態や放出に与える影響を一つずつ解析するような従来の研究手法だけでは、これらの過程を制御する要因の全貌理解がなかなか進まないのが現状であった。

このような現状を打破すべく、本研究では、独自に開発してきた合成生物学的なエクソソーム改変技術を応用することで、エクソソーム産生細胞内で様々な遺伝子発現に摂動をかけ、そこから放出されるエクソソームが、それぞれどの細胞から放出されたのかをタグづける「エクソソームバーコード化システム」を新たに開発し、これによって創製した「バーコード化エクソソーム」を用いて、エクソソームの体内動態や放出過程を制御する因子の網羅的解析を可能とすることを目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

独自に開発してきた、任意の RNA をエクソソーム内に封入する合成生物学的手法と、任意の遺伝子発現に摂動を与える CRISPR/Cas9 システムを組み合わせることで、エクソソーム産生細胞群において、様々な遺伝子の発現に摂動をかけ、それと同時に、それぞれのエクソソームがどのような遺伝子の発現に摂動がかかった細胞から放出されたのかをタグづける、「バーコード化エクソソーム」の創製法を確立した。

続いて、様々な遺伝子の発現に摂動がかけられた細胞群から放出されるエクソソーム内の

バーコードの構成比を詳細に解析することで、どのような遺伝子にコードされるタンパク質が、エクソソームの放出に影響を与えているのかを網羅的に解析する新手法を開発した。さらに、阻害剤などを用いたアッセイにより、本スクリーニングによって得られたヒット内に、真のヒットが含まれることが確認され、本スクリーニング系の有効性が確かめられた。

また、バーコード化エクソソームを動物個体内に注入し、このバーコードの動態を網羅解析することで、エクソソームの動態に影響を与える因子の網羅的解析手法の開発も試みた。バーコード化エクソソームを打ち込んだ動物個体からバーコードを回収し、読み出すことに成功したが、真のヒット因子を見つけるには、さらに系を改良していく必要があることが明らかとなった。引き続き研究を継続中である。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A: 基盤技術:「高品質なバーコード化エクソソーム調製法」の確立

我々はこれまでに、エクソソーム産生細胞に、エクソソームマーカである CD63 と、C/Dbox と呼ばれる RNA モチーフに結合する L7Ae の融合タンパク質(CD63-L7Ae)を発現し、別途細胞内に発現する mRNA に C/Dbox モチーフを導入しておくことで、L7Ae と C/Dbox の相互作用を利用し、任意の mRNA をエクソソーム内に積極的に封入できることを見出してきた (Kojima et al, *Nat Commun.* 2018, 9, 1305). 本研究では、このシステムを最適化しつつ、任意の遺伝子の発現をコントロールすることを可能とする CRISPR/Cas9 システムと組み合わせることで、エクソソーム産生細胞群において、様々な遺伝子の発現に摂動をかけ、それと同時に、これに用いた gRNA をエクソソーム内にバーコードとして封入することを目指した。結果、① RNA-binding protein と種類と、それに結合する guide RNA (gRNA)の配列の最適化 ②エクソソーム内からの gRNA 読み出し法の最適化 を行うことで、極めて高効率なエクソソームバーコード化・およびその読み出しを行うことが可能となった。具体的には、10000 種類以上の gRNA ライブラリーを 1 gRNA/cell となるようにエクソソーム産生細胞内に導入し、ここから放出されたエクソソームの中から、99% 以上の gRNA を効率的に読み出すことが可能となった。

### 研究テーマ B 「バーコード化エクソソームを用いたエクソソーム放出制御因子の網羅的探索」

上記のバーコード化エクソソームを用いて、エクソソームの放出を制御する因子の網羅的探索を試みた。具体的には、gRNA をエクソソーム内に封入する上記システムを発現する細胞に関して、Cas9 を発現する細胞、もしくは発現しない細胞を用意し、ここに様々な gRNA ライブラリーを導入した。この細胞群から放出されたエクソソーム内のバーコードを Cas9<sup>+/+</sup>-群間で比較することで、エクソソームの放出に影響を与える因子の網羅的解析が可能になると考えた。東京大学大学院薬学系研究科の水野らと共同研究を推進し、細胞の増殖に影響を与える因子の影響を排除するようなスクリーニング解析アルゴリズムを開発し、これを適用することで、エクソソームの放出に真に影響を与えていると考えられる因子を抽出した。得られたヒット因子に関して、実際に阻害剤等を細胞に適用し、放出されるエクソソームの量を確かめたところ、スクリーニング結果を反映する結果が得られたことから、真のヒットを釣ってくることができ

ていることが確かめられた。またヒット因子をもとにパスウェイ解析をおこなったところ、これまでエクソソームとの関連が注目されてこなかった遺伝子群も多数見つかり、さらに RNA 結合タンパク質に融合するエクソソームマーカーを変更することで、特定のエクソソームの sub-population に焦点を当てた放出制御因子の探索が可能であることも示唆された。以上の結果から、エクソソームの放出に影響を与える因子の網羅的解析が可能であることが示された。本アッセイ系は、全遺伝子がエクソソームの放出に与える影響を、一人の実験者が数か月以内にアッセイできることを可能にする強力な手法であり、エクソソームの基礎的なバイオロジー研究を飛躍的に前進させうるものであると期待される。(現在論文投稿準備中)

#### 研究テーマ C 「In vivo においてエクソソームの動態を制御する因子の網羅的探索」

上記のバーコード化エクソソーム創製プロセスにおいては、エクソソーム産生細胞の形質によって、このエクソソームの膜上のタンパク質の発現や脂質の状態も変化すると考えられる。この多様な形質を持ったバーコード化エクソソームライブラリーを生きた動物個体に投与し、一定時間後、ターゲット/非ターゲットの組織/細胞内で、どのようなバーコードが多く含まれているかを解析することで、どのような形質を持つエクソソームがどの組織/細胞に集積するのかを網羅的に解析することができると考えた。

実際に、作製したバーコード化エクソソームを動物個体内に打ち込み、一定時間後に血清や臓器を抽出してバーコードの読み出しを行ったところ、個々の gRNA レベルでは、特定の臓器で濃縮されている gRNA が存在した。しかしながら、個体内に打ち込み拡散したバーコードを再現性よく増幅することの技術的なハードルの高さから、複数の gRNA の効果を統合して遺伝子レベルでのヒットを探索すると、エクソソームの動態に有意に変化させていると考えられる因子を抽出するのは困難であった。今後、システムのさらなる最適化を行い、in vivo においてエクソソームの動態を制御する因子の網羅的解析を可能とすることを目指し、引き続き研究を進めていく。

### 3. 今後の展開

エクソソームの放出制御因子の探索に関しては、実際に釣れてきたヒット因子に関してより理解を深め、これまでに関係が知られていなかった因子がエクソソームの放出にかわり、それが生物学的に重要な役割を果たしていることを示したい。また、今後様々な細胞種でスクリーニングを行い、細胞種特異的にエクソソーム放出を制御する因子の発見などを試みたいと考えている。このような因子が発見できれば、エクソソームが病態の進展に関わる疾患をターゲットとした創薬研究にもつながり得る。

エクソソームの動態を制御する因子の探索に関しては、バーコードの抽出法の改善や、バーコードの安定性を向上させるような仕組みを新たに導入することで、動物個体内から安定してバーコードを読み出す手法を確立し、動態に影響を与える因子を網羅的に同定する新規スクリーニング法の開発を目指す。

#### 4. 自己評価

研究開始当初の最も大きな目標は、バーコード化エクソソームの創出、およびバーコードの読み出し法を確立(テーマ A)したのち、これを用いてエクソソームの体内動態を制御する要因を網羅的に解析すること、さらには、これによって得られた知見を、エクソソームの動態の自在制御へと応用することであった(テーマ C)。本研究において、実際に高効率なバーコード化エクソソーム産生法、およびそのバーコードの読み出し法を実際に確立することができ、プラットフォームの創出(テーマ A)に関しては十分目標を達成したと考えている。ただ、これを用いてエクソソームの動態を制御する因子を一斉解析するには、まだ超えなければならない技術的ハードルがあることもわかってきた(テーマ C)。さきがけ研究期間内に、この点を完全に解決できなかったことは残念であるが、今後このさきがけ研究で得た知見をうまく活用しながら、将来的に大きな花を開かせたいと考えている。

一方、本微粒子さきがけに参加し、領域内の研究者とも交流を進めるにつれ、エクソソームの放出を制御する因子に関して、驚くほどわからないことが多いことを知ると共に、これを解明することの大きな意義を認識するに至った。ここで、私が開発してきたバーコード化エクソソームは、この放出制御因子の網羅的解析を可能とする極めて強力な研究ツールになり得ることに思い至り、実際に、開発したバーコード化エクソソームを用いて、エクソソーム放出制御因子の網羅的解析を可能とする新手法を確立することに成功した(テーマ B)。本結果は、エクソソームをはじめとする細胞外微粒子のバイオロジーの理解を飛躍的に進展させ得る重要な成果であると考えている。また、将来的に、本手法を用いて、例えばがん細胞選択的にエクソソームの放出を制御可能な因子を発見できれば、創薬研究にもつながると考えており、社会的にも大きなインパクトを与えることができると期待している。本研究は、さきがけ研究の開始と同時に1から開始したため、これらの主要な成果を査読済み論文として発表できる段階にはまだ至っていないが、鋭意論文投稿を準備中であり、世界的にも大きなインパクトを与えることができるものと期待している。

本研究の遂行に当たっては、適切な研究実施体制および研究費の執行ができたと考えている。特に、本研究を遂行するには、費用のかかる次世代シーケンシングを日常的に遂行することが必須であったため、若手研究者が獲得できる外部資金源としてもっとも大きなものの一つである「さきがけ」の支援がなければ、研究を遂行することは不可能であった。本研究で開発してきたシステムは、エクソソームの動態や放出制御因子の網羅的解析を目指したものであったが、これによって得られた成果は、細胞外微粒子に関する基礎バイオロジーの更なる深化と、その知見を利用した創薬をはじめとする応用利用という両方の側面において、極めて多方向に展開できると期待され、今後 10 年以上のスパンを見据えた、将来的な科学イノベーションの礎を築くことができたと考えている。本さきがけ領域で得られたネットワークを生かして、共同研究も多数展開することができており、「科学技術イノベーションの源泉となる、新たな科学知識に基づく創造的な革新的技術のシーズ(新技術シーズ)を世界に先駆けて創出することを目的とするネットワーク型研究」というさきがけ研究の趣旨にかなった研究を十分に遂行することができたと考えている。

#### 5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表





研究期間累積件数:15件

1. **Ryosuke Kojima**<sup>\*</sup>, Daniel Bojar<sup>\*</sup>, Giorgio Rizzi, Ghislaine Charpin-El Hamri, Marie Daoud El-Baba, Pratik Saxena, Simon Ausländer, Kelly R Tan, Martin Fussenegger Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment. (\*co-first author) *Nat. Commun.* 2018, 9, 1305.

本さがけ研究の基盤技術となる、任意のRNAを、エクソソームマーカースに結合したRNA結合タンパク質との相互作用によって、エクソソーム内に積極的に封入する技術(EXOTic device)について報告した。本技術をもとにして、さがけ領域内での共同研究も遂行している。

2. Yuichiro Koide<sup>\*</sup>, **Ryosuke Kojima**<sup>\*</sup>, Kenjiro Hanaoka, Koji Numasawa, Toru Komatsu, Tetsuo Nagano, Hisataka Kobayashi, Yasuteru Urano (\*co-first author) Design strategy for germanium-rhodamine based pH-activatable near-infrared fluorescence probes suitable for biological applications. *Commun Chem.* 2019, 2, 94.

細胞内の酸性環境を近赤外波長領域で可視化する蛍光プローブを開発した。細胞外微粒子を含む、様々な物質のエンドサイトーシス、エキソサイトーシスに伴う細胞内小器官のpH変化の可視化などに利用できる可能性がある。

## (2)特許出願

研究期間累積件数:1件(特許公開前のもも含む)

## (3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

受賞:

1. Human Frontier Science Program (HFSP), Career Development Award (CDA) 受賞。2019年3月。
2. 第12回バイオ関連化学シンポジウム 部会講演賞 2018年9月
3. 第13回日本ケミカルバイオロジー学会 Royal Society of Chemistry, Poster Award 2018年6月
4. 第13回日本分子イメージング学会 優秀発表賞 2018年6月

著作物:

1. Methods in Molecular Biology, "Mammalian Cell Engineering" Editor として編纂, in press.
2. Ryosuke Kojima<sup>\*</sup>, Dominique Aubel, Martin Fussenegger<sup>\*</sup> (\*Co-corresponding author) "Building sophisticated sensors of extracellular cues that enable mammalian cells to work as "doctors" in the body" *Cell Mol. Life Sci.* 2020, 77, 3567-3581.
3. 小嶋良輔 「遺伝子工学的アプローチを利用した エクソソームのエンジニアリングとその応用」 *膜*, 2020, 45, 62-67.
4. Ryosuke Kojima<sup>\*</sup>, Martin Fussenegger<sup>\*</sup> (\*Co-corresponding author) "Synthetic Biology: Engineering Mammalian Cells To Control Cell-to-Cell Communication at Will" *Chembiochem* 2019, 20, 994-1002.

等。

主要な学会発表:

1. Ryosuke Kojima, Martin Fussenegger. New class of drug delivery platforms based on synthetic-biology-inspired designer mammalian cells. 12<sup>th</sup> International Symposium on Nanobiotechnology, Nanyang Technological University, Singapore, Mar 2019.

2. Ryosuke Kojima, Daniel Bojar, Martin Fussenegger, Engineering designer exosomes produced efficiently by mammalian cells in situ and their application for the therapy of Parkinson's disease. ISEV2019, Miyakomesse, Kyoto, Japan, Apr 2019.

3. 小嶋良輔、國武厚貴、浦野泰照 「核酸バーコードを用いたエクソソーム放出制御因子の網羅的解析」 第42回日本分子生物学会年会、福岡、2019年12月

4. 小嶋良輔 「Designer Cellを用いた新たな疾患治療システムとその設計原理」 第93回日本生化学会大会、オンライン、2020年9月

等。