

奨励金No.1543

リソソーム集積型抗体を利用した選択的エクソソーム除去技術の開発

岩崎 崇

鳥取大学 農学部 准教授

Selective exosome-removal method using lysosome-accumulating antibody

Takashi Iwasaki,

Faculty of Agriculture, Tottori University, Associate Professor



乳がん細胞から分泌される HER2 陽性エクソソームは、浸潤・転移を促進し、抗体医薬ハーセプチンの効果を低減させる。本研究では、H16 ペプチドを修飾したリソソーム集積型の抗 HER2 抗体を作成した。この抗体を利用して、HER2 陽性エクソソームのリソソーム輸送と分解を誘導し、抗体医薬ハーセプチンの薬効改善を実証した。これにより、HER2 陽性エクソソームの選択的除去技術の開発に成功した。

Exosomes are associated with various diseases, and HER2-positive exosomes from breast cancer cells are particularly problematic. These exosomes inhibit the effectiveness of antibody drugs and promote cancer cell metastasis. Therefore, selective removal of HER2-positive exosomes from the bloodstream is crucial. The polyhistidine peptide (H16 peptide), a cell-penetrating peptide from our previous study, has shown effectiveness in transporting molecules to lysosomes. We developed an exosome-removal method using H16 peptide-modified antibodies. The H16-fused anti-HER2 nanobody selectively binds to and transports HER2-positive exosomes to lysosomes for degradation. This method restores the efficacy of antibody drugs, thereby successfully establishing an exosome-removal method using the H16 peptide.

1. 研究内容

1. 緒言

1.1. エクソソームと乳がん

エクソソーム（細胞から分泌される粒径約 50～100 nm の膜小胞）は、疾患と密接に関係していることが明らかになっている。特に、エクソソームが関与する疾患として乳がんが挙げられる。HER2 陽性乳がんは、侵襲性が高いことが知られており、治療薬として抗 HER2 抗体（ハーセプチン）が使用されている。しかし、乳がん細胞から分泌される HER2 陽性エクソソームが抗体医薬と結合し、薬効を弱め、周囲の乳がん細胞の浸潤・転移を活性化することが報告されている^[1,2]。HER2 陽性エ

クソソームは、乳がんの難治性・悪化に関与している重要な原因物質である。本研究では、HER2 陽性エクソソームを標的とした選択的除去技術の開発を目指した。

1.2. エクソソームの選択的除去技術の戦略

本研究では、独自に開発した細胞膜透過ペプチド「ポリヒスチジン（H16 ペプチド）」を利用した。H16 ペプチドは高い細胞膜透過性と血中安定性を示し、高分子リポソーム（粒径約 100 nm の膜小胞）をリソソームに輸送する能力を有している^[3-5]。そこで、HER2 陽性エクソソームをリソソームで選択的に分解する手法を考案し、実証を試みた。

2. 方法

2.1. H16 ペプチド修飾抗 HER2 抗体の作製

抗 HER2 抗体由来の単鎖低分子抗体 Nanobody (Nb) を使用し、Nb の C 末端に H16 ペプチドと非膜透過性の FLAG ペプチドを融合した Nb-H16 および Nb-FLAG を設計し、発現プラスミドを構築した。発現には大腸菌 SHuffle[®] T7 Express lysY Competent *E. coli* をホストとして使用し、アフィニティー精製により Nb-H16 および Nb-FLAG を精製した。

2.2. 供試細胞

HER2 陰性ヒト乳がん細胞 MCF-7 および HER2 陽性ヒト乳がん細胞 SKBR3 を供試細胞として使用した。各培地は、FBS、Penicillin、Streptomycin、Amphotericin B、ピルビン酸ナトリウム、非必須アミノ酸を含有し、37°C、5.0% CO₂ 条件下で培養した。

2.3. mCherry 修飾 HER2 陰性／陽性エクソソームの調製と定量

エクソソーム膜表面に存在する CD9 に赤色蛍光タンパク質 mCherry を融合した CD9-mCherry 発現プラスミド (Addgene #55013) を使用し、MCF-7 細胞および SKBR3 細胞にトランスフェクションし、48 時間後の培養上清から mCherry 修飾 HER2 陰性／陽性エクソソームを得た。エクソソーム量は蛍光プレートリーダーにて定量した。

2.4. エクソソームの細胞内輸送の評価

HER2 陽性ヒト乳がん細胞 SKBR3 を播種し、Nb-H16 または Nb-FLAG と mCherry 修飾 HER2 陰性／陽性エクソソームの混合液を添加し、24 時間インキュベーション後、フローサイトメーターで蛍光量を測定し、蛍光顕微鏡で観察した。

2.5. 細胞増殖率の測定

SKBR3 を播種し、Nb-H16 または Nb-FLAG を添

加後、抗体医薬ハーセプチンを添加し、24 時間インキュベーションした後に、Cell Counting Kit-8 を用いて細胞増殖率を評価した。

3. 結果

3.1. Nb-H16 および Nb-FLAG の調製と機能評価

大腸菌 SHuffle[®] T7 Express lysY Competent *E. coli* を用いた発現系と、アフィニティー精製により、Nb-H16 および Nb-FLAG を高純度で精製した (図 1A、B、C)。さらに、アフィニティー精製ビーズを用いた評価系 (図 1D) により、HER2 陽性エクソソームと選択的に結合することを確認した (図 1E)。

3.2. Nb-H16 による HER2 陽性エクソソームの細胞内輸送

Nb-H16 は HER2 陽性エクソソームを選択的に細胞内へ輸送し、培養上清中の HER2 陽性エクソソームを選択的に除去することが確認された (図 2A)。さらに、Nb-H16 によって細胞内輸送された HER2 陽性エクソソームは、細胞内のリソソームに集積することが確認された (図 2B)。

3.3. Nb-H16 による HER2 陽性エクソソームのリソソーム分解誘導

Nb-H16 によって細胞内輸送された HER2 陽性エクソソーム量は、経時的に減少することが確認された (図 3A)。蛍光顕微鏡観察からも、Nb-H16 によってリソソームに輸送された HER2 陽性エクソソーム量が経時的に分解されていることが確認された (図 3B)。

3.4. Nb-H16 による抗体医薬の薬効改善

HER2 陽性乳がん細胞に Nb-H16 を前処理することで、HER2 陽性エクソソームを選択的に除去し、その後で抗体医薬ハーセプチンの薬効改善を評価した (図 4A)。その結果、10~100 μg/mL の Nb-H16 で前処理を行った場合、抗体医薬ハーセプチンの薬効改善が確認された (図 4B)。

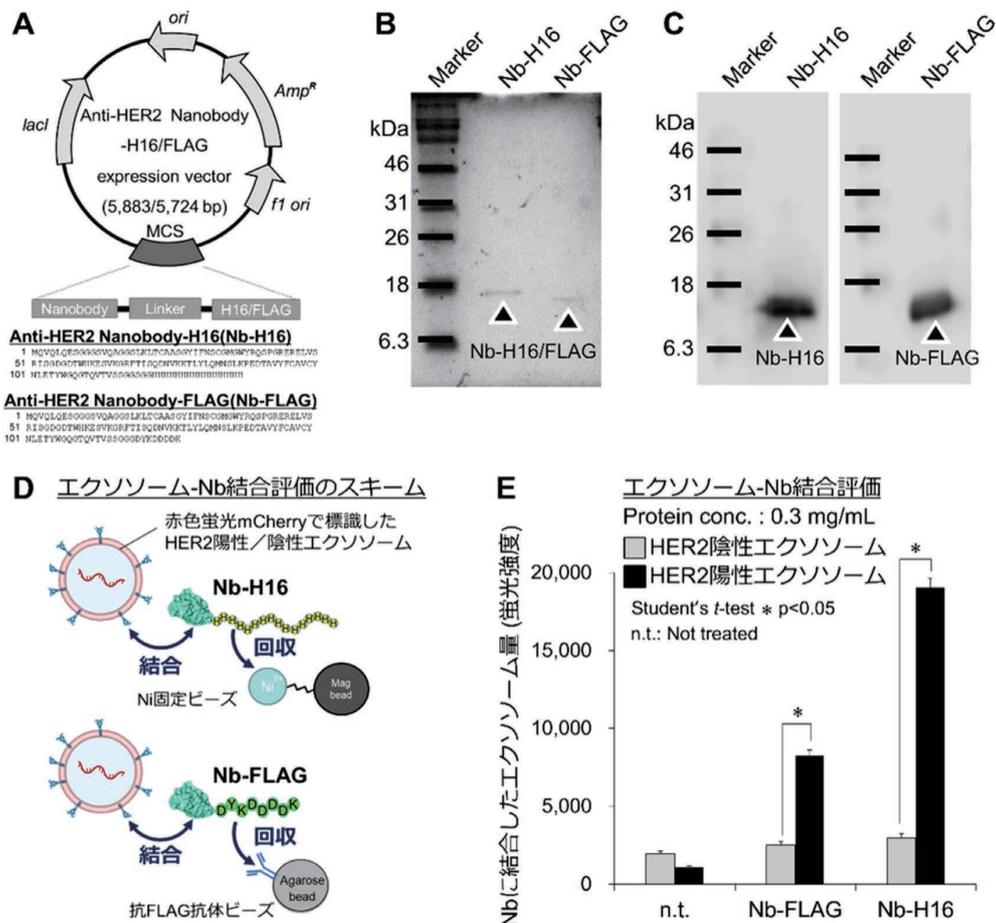


図1. Nb-H16/Nb-FLAGの調製とHER2陽性エクソソームとの選択的結合の評価

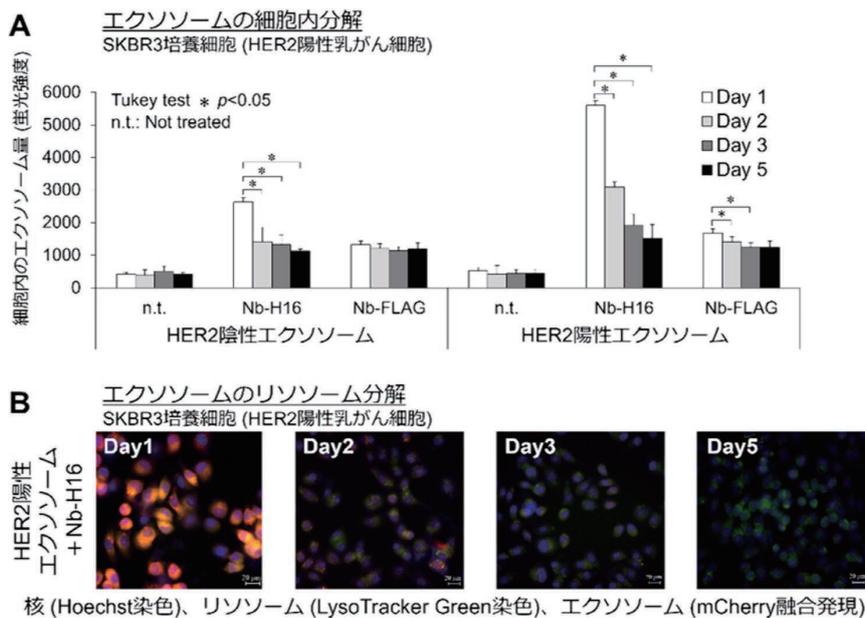


図2. Nb-H16によるHER2陽性エクソソームの細胞内輸送

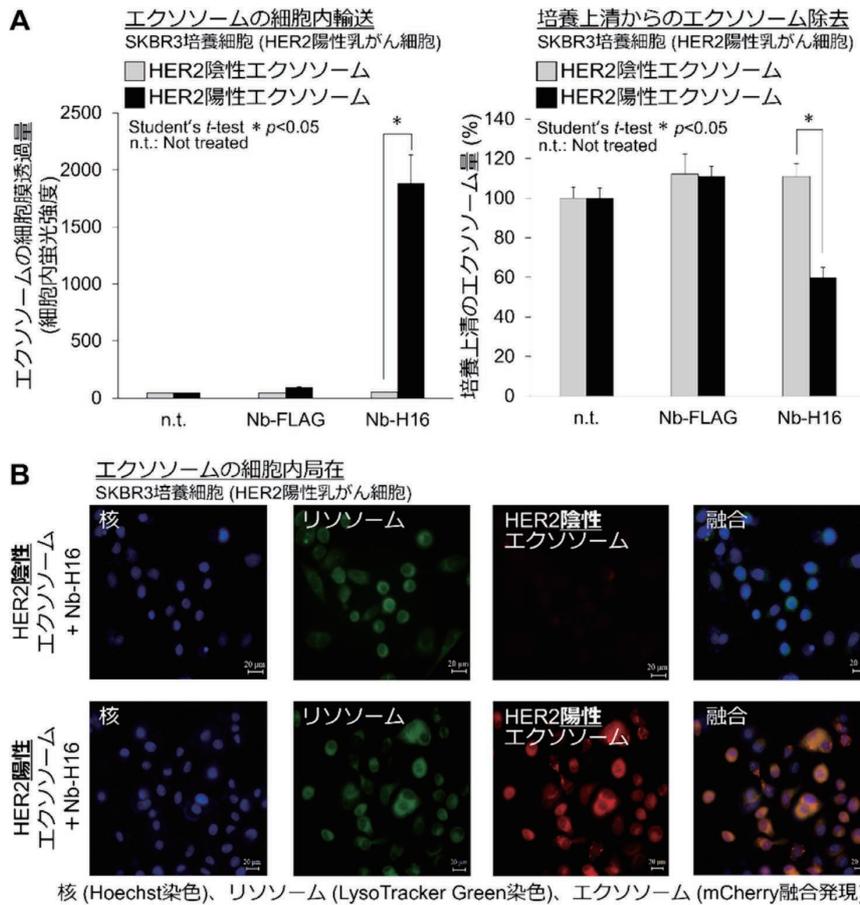


図3. Nb-H16によるHER2陽性エクソソームのリソソーム分解誘導

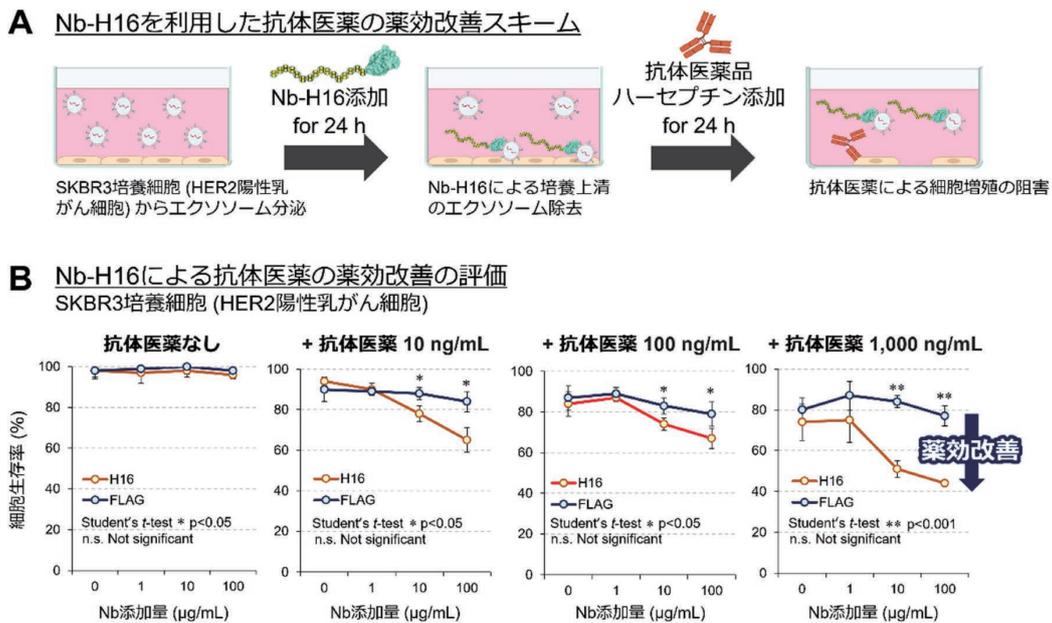


図4. Nb-H16による抗体医薬の薬効改善

4. 考察

本研究では、Nb-H16を利用したエクソソーム除去技術を開発し、*in vitro*試験系においてHER2陽性エクソソームの選択的除去に成功した。今後は*in vivo*においても同様の実証が求められるが、HER2陽性乳がんに対する抗体医薬の薬効改善や乳がんの悪化阻止への応用が期待される。また、Nb-H16を利用したエクソソームの選択的除去技術により、Nb部分を変更することで任意のエクソソームの分解誘導が可能になる。今後は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの広範な疾患に対する新たな治療戦略が期待される。

5. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多大なるご支援を賜りました日立財団に厚く御礼を申し上げます。

6. 引用文献

1. Ciravolo, V., Huber, V., Ghedini, G.C., et al. Potential role of HER2-overexpressing exosomes in countering trastuzumab-based therapy. *J. Cell. Physiol.* 2012, **227**, 658-667.
2. Wang, T., Gilkes, D.M., Takano, N., et al. Hypoxia-inducible factors and RAB22A mediate formation of microvesicles that stimulate breast cancer invasion and metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014, **111**, E3234-E3242.
3. 特許第6202707号：新規細胞膜透過ペプチド
4. Iwasaki, T., Tokuda, Y., Kotake, A., et al. Cellular uptake and *in vivo* distribution of polyhistidine peptides. *J. Control. Release* 2015, **210**, 115-124.
5. Hayashi, T., Shinagawa, M., Kawano, T., Iwasaki, T. Drug delivery using polyhistidine peptide-modified liposomes that target endogenous lysosome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018, **501**, 648-653.

2. 発表（研究成果の発表）

Yamada, S., Kawano, T., Iwasaki, T. Development of an exosome-knockdown method using polyhistidine peptide. 第60回ペプチド討論会（滋賀、2023年）