

| | |
|--------------|---|
| Title | 様々な食物由来エクソソームによるDDSキャリアとしての応用性検証研究 |
| Author(s) | |
| Citation | 令和3（2021）年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書．2022 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/85622 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| 令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」 研究成果報告書 | | | | | |
|---|--|----------|-----------|----|----|
| ふりがな 氏名 | きのおか じゅん 紀ノ岡 潤 | 学部 学科 | 薬学部薬学科 | 学年 | 1年 |
| ふりがな 共同 研究者氏名 | うしろ あい 後 愛唯 | 学部 学科 | 薬学部薬学科 | 学年 | 1年 |
| | えぎわ あおい 江澤 葵 | | 薬学部薬学科 | | 1年 |
| | おおや ももこ 大矢 桃子 | | 薬学部薬学科 | | 1年 |
| | おくむら ふうか 奥村 風香 | | 薬学部薬学科 | | 1年 |
| アドバイザー教員 氏名 | つじかわ かずたけ 辻川 和丈 | 所属 | 大阪大学薬学研究科 | | |
| 研究課題名 | 様々な食物由来エクソソームによる DDS キャリアとしての応用性検証研究 | | | | |
| 研究成果の概要 | 研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。) | | | | |

1) 背景

エクソソームは細胞から放出される天然の小胞であり、細胞間のコミュニケーションに利用されている。エクソソームは野菜や果物果汁にも豊富に含まれることが明らかになっており、これまでに牛乳やグレープフルーツ由来のエクソソームを利用した drug delivery system (DDS)開発が進んでいる(1)。食物由来エクソソームは、これまでのリポソームや高分子ミセルなどの合成脂質と比較し、毒性が低く、安価に大量に回収できることから DDS キャリアとして注目されている(2)。いくつかの食物由来エクソソーム(レモン、ブロッコリーなど)は、それ自体による抗腫瘍作用も報告されている(3)。

SDGs の 1 つに 2030 年までに世界全体一人当たりの食料廃棄を半減させるという目標が掲げられている。先進国において果実や野菜類は農業生産過程でのロスが多く、魚介類は小売業者や消費者の段階での廃棄率が高いことが報告されている(4)。

そこで、食料廃棄量が多い食材よりエクソソームを回収し、DDS キャリアとしての応用性を検証した。

2) 目的

食料廃棄量が多い食材からエクソソームを回収し、DDS キャリアとしての応用性を明らかにすること。

3) 方法

食物エクソソームの回収

食物エクソソームの回収には、レモン、キウイ、トマト、牛乳、鶏肉、サバ身、サバ眼球を用いた。トマト、キウイ、レモンは、搾り汁を用いた。鶏肉、サバ身、サバ眼球に関しては、 -30°C で冷凍した後、 37°C のウォーターバスで解凍することで得られたドリップを用いた。サンプルから大きな粒子と細胞片を取り除くために全サンプルに対して 4°C 、 $2,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行った。それら上清を 4°C 、 $10,000 \times g$ で 30 分間遠心分離を行った。遠心分離後の上清を牛乳は $0.45 \mu\text{m}$ 、その他のサンプルは $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターを通し、 -80°C で保存した。 37°C のウォーターバスで解凍した後、 4°C 、 $100,000 \times g$ で 90 分間超遠心分離を行った。続いて上清を取り除き 4°C 、 $100,000 \times g$ で 90 分間超遠心分離を再度行い、得られたペレットを食物エクソソームとし、低吸着チューブにて -80°C で保存した。

食物エクソソームの性状解析

粒度分布・粒径測定 ナノ粒子マルチアナライザー qNano を用いて、性状解析(粒子数、粒子径)を行った。また、レモン、トマト、サバ身、サバ眼球に関しては、透過型電子顕微鏡(transmission electron microscopy: TEM)による観察を行った。

食物エクソソームの蛍光標識

チューブに入った各食物エクソソームサンプルに、 $25 \mu\text{L}$ の phosphate-buffered saline (PBS) を加え、これに $4 \mu\text{mol/L}$ の脂質親和性蛍光色素 PKH26 (ナカライテスク) を $25 \mu\text{L}$ 加え、5 分間反応させた後に 5% bovine serum albumin (BSA)/PBS を 1 mL 加えて反応を止め、この一連の作業によってエクソソームを標識した。続いて超遠心チューブに上記の全溶液を移し、これに 5% BSA/PBS を 3 mL 加え、 4°C 、 $100,000 \times g$ で 90 分間超遠心分離を行った。得られたペレットを蛍光標識食物エクソソームとした。

膀胱癌細胞株を用いた食物エクソソームの取り込み評価

食物エクソソームの取り込み評価には膀胱癌細胞株 KLM-1 細胞を用いた。KLM-1 細胞を 5.0×10^4 細胞 / well で播種すると同時に蛍光標識した食物エクソソーム(終濃度: 3.0×10^8 粒子 / mL)を加えた。24 時間経過後に蛍光顕微鏡とフローサイトメーターによって、癌細胞株による食物エクソソームの取り込み割合を評価した。

食物エクソソームによる膀胱癌細胞株増殖抑制作用の評価

KLM-1 細胞を 0.5×10^3 細胞 / well で播種すると同時に蛍光標識した食物エクソソーム(終濃度: 3.0×10^8 個 / mL)を加えた。細胞播種から 24 時間後、96 時間後に WST8 試薬 (同仁堂) を添加し、 450 nm (生細胞)と 630 nm (バックグラウンド)の波長を計測した。 $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターを通した PBS を添加した群をコントロールとした。

統計解析

グラフの作成ならびに統計解析は GraphPad PRISM (Ver. 6)を用いた。2 群間の比較は unpaired t-test、3 群間以上の比較は One-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test)を用いた。

4) 研究結果

食物エクソソームの性状解析

TEM (図 1)ならびに qNano (図 2)によって、各食物サンプルからエクソソームが回収出来ていることが確認できた。キウイ及び鶏肉より回収したエクソソームの TEM 解析は、時間の都合上解析を行うことが出来なかった。粒子解析の結果、食物エクソソーム間で平均粒子径に顕著な違いがあることが明らかになった(図 2)。また、食物サンプルあたりのエクソソーム回収量は他の食物サンプルと比較し、レモンが著しく多かった(図 3)。牛乳の超遠心産物は、夾雑物が多かったため粒子解析を行えず、以降の解析から除外した。

膀胱癌細胞への食物エクソソームの取り込み評価

次に癌細胞に対する食物エクソソームの取り込みを評価するため、患者 5 年生存率ならびに治療満足度の低い膵癌の細胞株を用いた。いずれの食物エクソソームも、24 時間の暴露により、約 5-7 割の膵癌細胞株に取り込まれた。食物エクソソームサンプル間における取り込み細胞の割合に有意な差はみられなかった(図 4)。

食物エクソソームによる膵癌細胞株の増殖抑制作用評価

DDS キャリアとしての検討を行うにあたり、まずは食物エクソソーム自体の膵癌細胞に対する作用を検証した。キウイ及び鶏肉より回収したエクソソームを添加した群は、コンタミネーションが起こったため解析から除外した。PBS コントロールと比較しトマト及びサバの身由来のエクソソームは、顕著に膵癌細胞株の増殖を抑制した($p < 0.05$ 、図 5)。また、レモンとサバの眼球由来のエクソソームは、膵癌細胞株に対して増殖抑制作用の傾向を示した($p = 0.05$ 、図 5)。

5) 考察

全ての食物サンプルから、直径 70~100 nm 程度の粒子が採取できたことが確認された。その形状とサイズから、エクソソーム状粒子の収集が確認できた。また、各食物エクソソームの粒子径中央値、粒度分布の様子が似ていたことから、食物エクソソーム間での性状に大きな違いは存在しないことが示唆された。

ヒト由来ではないエクソソームでも膵癌細胞株に取り込まれることが分かったため、食物エクソソームに抗癌剤を内包することが出来れば、実際にどの程度薬剤を搭載可能であるのかを検討する必要があるが、DDS キャリアとしての実用性があるのではないかと考えられる。

DDS キャリアへの応用の際し、均一なエクソソーム集団であることが品質管理の面において重要であることが想定される。トマト由来エクソソームはその他の食物エクソソームと比較し粒子径が均一な集団であり、膵癌細胞に対して顕著な細胞増殖抑制作用も有する。トマト由来エクソソームが正常細胞に対して悪影響を及ぼさないことを示すことができれば、DDS キャリアとして有用であると考えられる。

ヒト由来エクソソームと比較して、食物の方が安価に大量のエクソソームを回収することが可能であるので、廃棄食物からエクソソームを回収し、DDS キャリアとして応用することができれば、SDGs の目標の一つである「つくる責任・つかう責任」に含まれる、「2030 年までに小売・消費レベルにおける世界全体の一人当たりの食料の廃棄を半減させ、収穫後損失などの生産・サプライチェーンにおける食品ロスを減少させる。」「2030 年までに、廃棄物の発生防止、削減、再生利用及び再利用により、廃棄物の発生を大幅に削減する。」への貢献に繋がるのではないかと期待される。

6) 今後の展望

本検討では、DDS キャリアとしての有用性を検証するにあたり、食物エクソソーム自体が有する癌細胞の増殖抑制作用を明らかにすることが出来た。今後、食物エクソソーム自体が有する癌細胞増殖抑制作用が何に起因するのかを明らかにしたい。また、その体内動態解析は勿論のこと、実際に食物エクソソームに抗癌剤を封入し、食物エクソソーム単体に比べてより強力な癌抑制作用が得られるのか否かを検証したいと考えている。

7) 引用文献

1. 吉岡祐亮, 落谷孝広, エクソソームによる新規 DDS キャリアの開発, *Drug Delivery System*, 35-1 (2020)
2. Zhuang X., et al. Grapefruit-derived nanovectors delivering therapeutic miR17 through an intranasal route inhibit brain tumor progression. *Molecular Therapy*, 24, 96-105 (2016)
3. Gioia S., et al. Biological properties and therapeutic effects of plant-derived nanovesicles. *Open Med (Wars)*, 1: 1096-1122, (2020)
4. 世界の食料ロスと食料廃棄, 国際農林業協働協会 (2011)

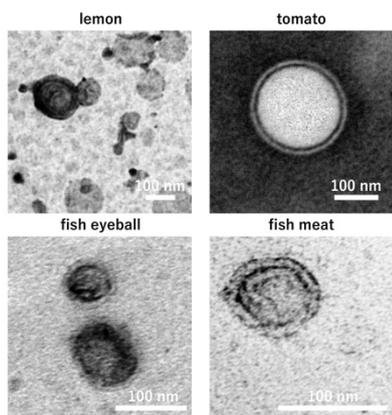


図 1 TEM による食物エクソソーム観察像
白色バー: 100 nm

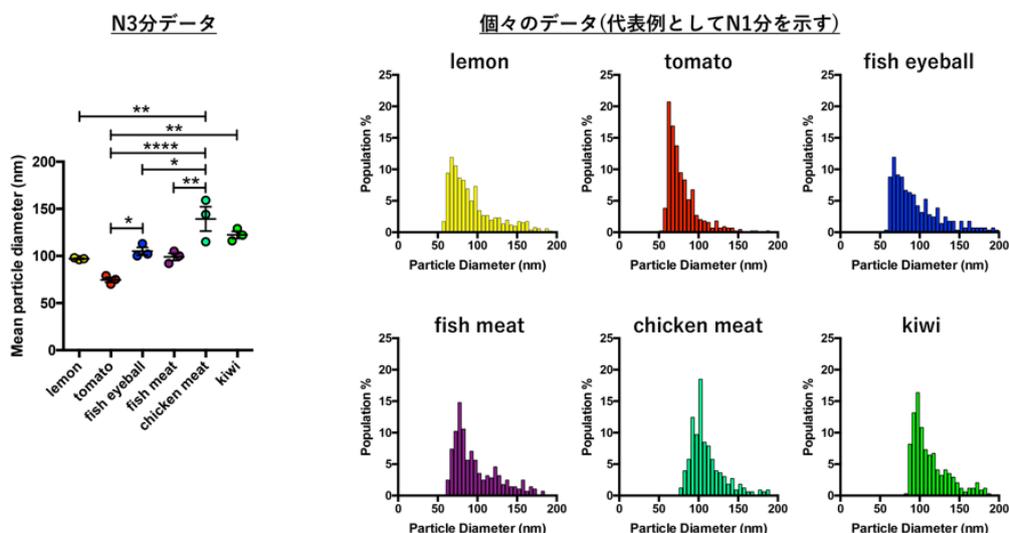


図 2 回収した食物エクソソームの粒子径解析

(左図) N3 分の平均粒子径解析データ (右図) 各食物エクソソームの粒子径解析代表例データ。One-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$

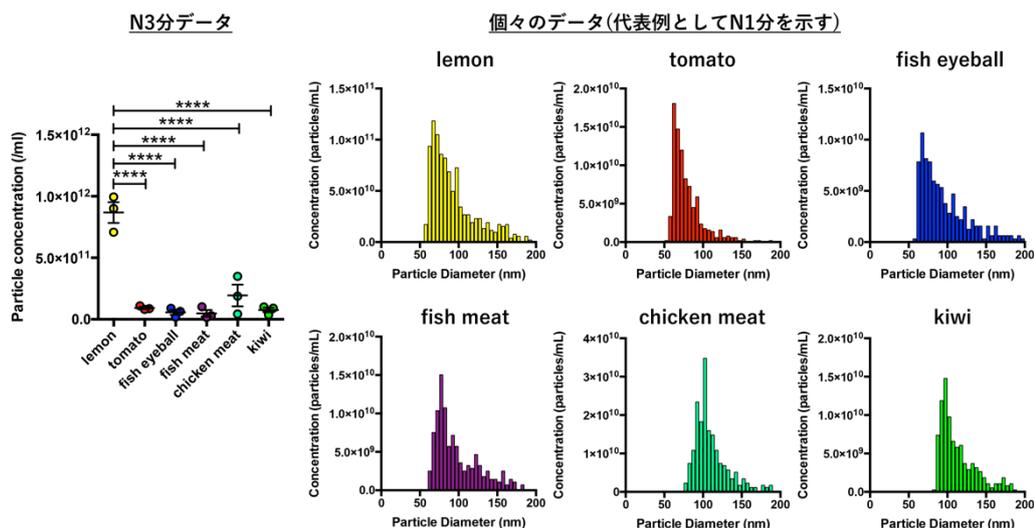


図 3 回収した食物エクソソームの粒子濃度解析

(左図) N3 分の解析データ (右図) 各食物エクソソームの粒子濃度解析代表例データ。One-way ANOVA (Tukey's multiple comparisons test), **** $p < 0.0001$

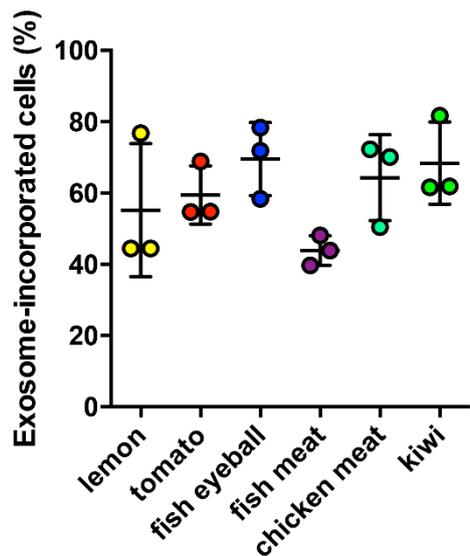


図 4 膵癌細胞への食物エクソソームの取り込み評価

蛍光ラベル化した食物エクソソームを膵癌細胞株 KLM 細胞に添加し、24 時間後にフローサイトメトリーによって食物エクソソームを取り込んだ細胞の割合を測定した。

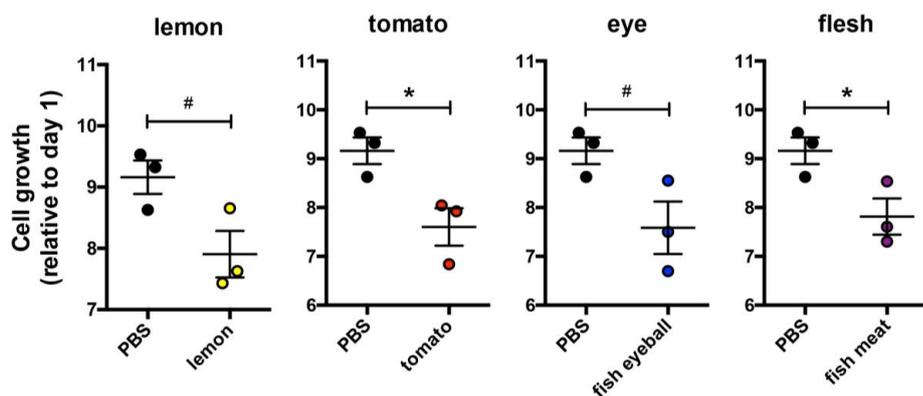


図 5 膵癌細胞の増殖能に対する食物エクソソームの作用評価

膵癌細胞株 KLM 細胞に食物エクソソームを添加後、1 日目、4 日目に WST-8 試薬による細胞増殖アッセイを行った。4 日目の測定値を 1 日目で割った値を縦軸とした。Unpaired t-test, * $p < 0.05$; # $p = 0.05$