

## マイクロ流体デバイスを用いた デザイナーエクソソーム製造への取り組み

北海道大学大学院工学研究院 真栄城 正寿

### 1. はじめに

近年、エクソソームは、医薬、再生医療、診断のみならず、化粧品科学の分野においても大きな注目を集めている。エクソソームは細胞から分泌される細胞外小胞であり、生体から分泌される内因性の脂質ナノ粒子である。そのため、分泌細胞由来の脂質膜の内部に、miRNA、mRNA、タンパク質など、様々な生体分子を内包している<sup>1)</sup>。これまでに、エクソソームが生体内において細胞間コミュニケーションの役割を担っていることが報告されており、がんの転移や悪性化などにも関与している<sup>2)3)</sup>。一方で、間葉系幹細胞由来のエクソソームは、抗炎症作用や組織修復などの機能を有しており、再生医療分野において実用化が期待されている。このようなエクソソームの性質は、疾患治療を目的とした薬物送達システム (Drug Delivery System : DDS) だけでなく、エイジングケア、バリア機能、毛髪・頭皮科学など、化粧品研究・実用化においても興味深い対象となっている。

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックによって、核酸医薬の実用化が加速し、mRNA ワクチンの実用化に至った<sup>4)5)</sup>。COVID-19 に対する mRNA ワクチンは、不安定な mRNA を保護し、細胞に効率よく送達するために脂質ナノ粒子がキャリア粒子として用いられている。化粧

品分野においても同様に、近年では単に有用成分を配合するだけでなく、有効成分をどのように届けるか、すなわち送達技術の重要性が高まっている。角層をはじめとする皮膚バリアの存在下で、表皮や真皮近傍まで浸透し有用成分を届けることのできる機能性化粧品の設計は、今後の化粧品開発において重要な課題である。そのため、近年では有用成分を脂質のナノカプセルであるリポソームに封入した化粧品が開発・販売されている。

その中で、エクソソームは生体由来の脂質ナノ粒子として、ナノDDS医薬品への応用のみならず、細胞親和性や低刺激性、抗老化への期待から、新たな化粧品素材・キャリアとして注目されている。一方で、天然エクソソームは分泌細胞や調製条件によって性質が大きく異なり、粒径、脂質組成、内包分子、表面タンパク質などが不均一である。この不均一性は、高機能化や品質管理、実用化において大きな課題となる。さらに、不均一性の課題だけではなく、細胞由来の不純物の混入の懸念、不純物を除去するための複数回の精製過程が必要となり、製造コスト面においても改善する余地がある。したがって、エクソソームの機能を理解し、その機能や特性を模倣した粒子を工学的に再現 (デザイナーエクソソーム)・製造する技術が求められる。

本論文では、著者らが開発したマイクロ流体デ

デバイスを用いて、エクソソームの表面に提示されているテトラスパニンやインテグリンを提示したエクソソーム様脂質ナノ粒子を製造する方法を紹介する<sup>6)</sup>。エクソソーム様脂質ナノ粒子は、表面にエクソソームのマーカータンパク質を提示しているだけでなく、内部にはsiRNAやmRNAなどの核酸も搭載できることを明らかにした。本方法は、細胞を一切使用することなく、簡便かつ迅速にデザイナーエクソソームを製造することができ、化粧品分野においても基礎研究のみではなく、実用化に向けても有用な製造になると考えられる。

## 2. 研究の目的、実験方法

本研究の目的は、著者らの独自のマイクロ流体デバイスであるiLiNP<sup>®</sup>デバイスを用いて、表面にエクソソームタンパク質を提示し、内部に医薬品を搭載したエクソソーム様脂質ナノ粒子を簡便に製造する方法の確立である(図1)。また、エクソソーム様脂質ナノ粒子の機能を解明するために、表面に提示させたエクソソームタンパク質が、RNA送達に与える影響の解明に取り組んだ。特に、エクソソームの表面タンパク質として代表的なテトラスパニン(CD9、CD63、CD81)及び

インテグリン(ITG $\alpha$ V $\beta$ 5、ITG $\alpha$ 6 $\beta$ 4)に着目し、それぞれを提示しつつ、内部にsiRNAまたはmRNAを搭載した粒子を調製し、細胞及びマウスを用いて、粒子の機能評価を行った。

まず、天然エクソソームの特性を模倣するために、細胞を構成する脂質成分であるDOPC、スフィンゴミエリン、DOPE、コレステロール、DOPSを用いた(脂質モル比:28/17.5/17.5/30/7 mol%)。また、内部に核酸を搭載したエクソソーム様脂質ナノ粒子を作製する場合は、上記の脂質組成にイオン化脂質であるSM-102を20 mol%添加した[M-102/DSPC/sphingomyelin/DOPE/cholesterol/DOPS/DMG-PEG 2k (20/11/20/5/30/7/1.5)]。脂質を溶解させた脂質/エタノール溶液を、マイクロ流体デバイス内でエクソソームタンパク質を含む水系の緩衝液で希釈することで粒子を作製した。送液量は、脂質溶液及び緩衝液の合計で500  $\mu$ L/minに設定し、緩衝液/脂質溶液の流量比を2に設定した。作製した粒子は、PBS緩衝液を用いて一晩透析し、エタノールの除去及び緩衝液を置換した。透析後のサンプルは、サイズ除去クロマトグラフィーによって粒子に提示されていない不要なタンパク質を除去した。精

これ以降の閲覧を希望の場合は、本誌をご購読ください。