

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2014-185090

(P2014-185090A)

(43) 公開日 平成26年10月2日(2014.10.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 47/42 (2006.01)	A 6 1 K 47/42	4 C 0 7 6
A 6 1 K 9/127 (2006.01)	A 6 1 K 9/127	4 C 0 8 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 C 0 8 6
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 18 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-60148 (P2013-60148)
 (22) 出願日 平成25年3月22日 (2013. 3. 22)

(出願人による申告) 「国等の委託研究の成果に係る特許出願 (平成24年度「JST-Erato秋吉バイオナノトランスポータープロジェクト」委託研究、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願)」

(71) 出願人 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 110000796
 特許業務法人三枝国際特許事務所
 (72) 発明者 秋吉 一成
 京都府京都市西京区京都大学桂 国立大学
 法人京都大学大学院工学研究科内
 (72) 発明者 佐藤 祐子
 京都府京都市西京区京都大学桂 国立大学
 法人京都大学大学院工学研究科内
 (72) 発明者 澤田 晋一
 京都府京都市西京区京都大学桂 国立大学
 法人京都大学大学院工学研究科内

最終頁に続く

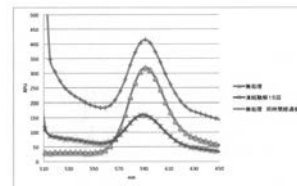
(54) 【発明の名称】 リポソーム-エキソソームハイブリッドベシクル及びその調製法

(57) 【要約】

【課題】エキソソームへの生理活性物質の導入の手法を提供する。

【解決手段】生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを複合化してなる、リポソーム-エキソソームハイブリッドベシクル。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを複合化してなる、リポソーム - エキソソームハイブリッドベシクル。

【請求項 2】

生理活性物質がタンパク質、核酸または薬物である請求項 1 に記載のベシクル。

【請求項 3】

前記リポソームがカチオン性リポソームである、請求項 1 又は 2 に記載のベシクル。

【請求項 4】

前記ベシクルが siRNA を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のベシクル。

10

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のベシクルからなる物質導入用担体。

【請求項 6】

請求項 5 に記載のベシクルからなる生理活性物質の導入剤。

【請求項 7】

生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを混合し、凍結・融解工程に供することを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルの調製法。

【請求項 8】

生理活性物質を内包するカチオン性リポソームとエキソソームを混合し、複合化させることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルの調製法。

20

【請求項 9】

生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを混合し、ポリエチレングリコール (PEG) 及び / 又は PEG-脂質により複合化させることを特徴とする、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルの調製法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、リポソーム - エキソソームハイブリッドベシクル及びその調製法、物質導入用担体、導入剤に関する。

30

【背景技術】

【0002】

細胞は、生体膜構造を有する様々なベシクル (extracellular vesicle) を放出している。その中で、エキソソームは、細胞が分泌するエンドソーム由来の 50-100nm のサイズを有するベシクルであり、近年、エキソソーム中にメッセンジャー RNA (mRNA) やマイクロ RNA (miRNA) が含まれており、他の細胞に RNA を運ぶシャトルとして機能することが見いだされた。生物における細胞間コミュニケーション手段として、これまでは細胞間の直接の接着や増殖因子、サイトカインなどの生理活性タンパク質、ペプチド、ホルモンを用いる経路が知られていたが、特定の細胞由来の細胞膜タンパク質や核酸を含むエキソソームが、長距離の細胞間コミュニケーション経路として、種々の生命現象に重要に関わっていることが明らかにされつつあり、医療やバイオへの応用研究が進められている。

40

【0003】

エキソソームをドラッグデリバリーキャリアとして応用した例はまだそれほど多くはないが、エキソソームを分泌する側の細胞を適切に選択することにより、また、疾病特異的に発現している膜タンパク質等のリガンドをエンドソームや細胞膜に過剰発現させてエキソソームに移行させるにより、標的指向性を上昇させ、ドラッグキャリアとして利用することが試みられている。例えば、Zhang らは、マウスリンパ腫 EL-4 由来のエキソソームにがん細胞の増殖を抑制するクルクミンを含有させ、マウスの骨髄細胞に到達させることに成功している (非特許文献 1)。また、Erviti らは、siRNA を搭載したエキソソームを

50

マウスの脳に送り込むことに成功している(非特許文献2)。Ervitiらは、脳にターゲティングするために、遺伝子工学的手法を用いてニューロン特異的ペプチド(RVGペプチド)を融合させたエキソソーム膜タンパク質(Lamp2b)を発現する樹状細胞を作製した。その細胞から回収したエキソソームに電気穿孔法を用いてsiRNAを内包させ、マウスに投与したところ、脳のニューロンやミクログリアなどにsiRNAが送達され、標的遺伝子がノックダウンされることを報告している。また、Ervitiらは、アルツハイマー病治療の標的遺伝子であるBACE1のノックダウンにも成功している。また、東京医科大学の大野らのグループでは、上皮成長因子受容体[EGFR]に高い親和性を持つ人工ペプチド[GE11]を発現する遺伝子と腫瘍抑制性マイクロRNAを導入した細胞から抽出精製したエキソソームに、GE11が膜表面に発現しており、目的のマイクロRNAが内包されていることを示した。さらにそこで得られたエキソソームをマウスに導入したところ、GE11提示型エキソソームが乳がんモデルマウスで腫瘍の発達を効率よく抑制することを報告した。細胞種によりエキソソームはレセプター/リガンド相互作用、マクロピノサイトーシス等の様々なエンドサイトーシスやファゴサイトーシスによって受け手側の細胞に取り込まれると報告されている(非特許文献3)。このような背景から、エキソソームを用いたドラッグデリバリーは、新しい治療法として期待されている。

10

【0004】

一方、生体構成成分であるリン脂質から成るリポソームを用いたドラッグデリバリーは、近年盛んに研究されている。リポソームをドラッグキャリアとして用いる利点として、内包物質の制御のしやすさが挙げられる。リポソームを利用したドラッグキャリアは、PEGを修飾すること等により、血中滞留性の向上や補体等による捕捉から回避可能になり、また、標的細胞志向型の抗体等を表面に修飾することにより、標的特異性が飛躍的に向上している。近年本発明者らは、無細胞タンパク質合成系にリポソームを共存させることで、膜タンパク質の遺伝子発現に伴うリポソームへの直接構成、さらに、膜タンパク質を発現したリポソームだけを精製するシステムの構築に成功している(非特許文献4)。

20

【0005】

特許文献1は、組換え体センダイウイルスを利用した膜融合性リポソームを開示しているが、エキソソームについての記載はない。特許文献2は、B型肝炎ウイルスタンパク質中空バイオナノ粒子とリポソームを用いたsiRNAの内包と細胞選択的なsiRNAの導入方法を開示しているが、エキソソームについての記載はない。

30

【0006】

特許文献3は、外因性遺伝物質を取り込ませたエキソソームを含む組成物を開示し、エキソソームに遺伝物質を取り込ませる具体的方法としてエレクトロポレーションが開示されている。特許文献3の明細書には、トランスフェクション剤を使用できること、トランスフェクション剤としてカチオン性リポソームが例示されているが、カチオン性リポソームを使用した実施例の記載はない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】再表97/016171

【特許文献2】特開2010-077091

【特許文献3】特表2012-524052

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Sun D et al. Mol Ther 2010, 18:1606-1614

【非特許文献2】Alvarez-Erviti L et al., Nat Biotechnol. 2011 Apr;29(4):341-5. Epub 2011 Mar 20.

【非特許文献3】Escrevent C et al. BMC cancer 2011 11:108-118

【非特許文献4】Nomura S. M et al J. Biotec. 2008 133: 190-195

【発明の概要】

40

50

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、エキソソームへの生理活性物質の導入の手法を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明は、以下のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクル及びその調製法、物質導入用担体、導入剤に関する。

項1． 生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを複合化してなる、リポソーム - エキソソームハイブリッドベシクル。

項2． 生理活性物質がタンパク質、核酸または薬物である項1に記載のベシクル。

項3． 前記リポソームがカチオン性リポソームである、項1又は2に記載のベシクル。

項4． 前記ベシクルが siRNA を含む、項1～3のいずれかに記載のベシクル。

項5． 項1～4のいずれかに記載のベシクルからなる物質導入用担体。

項6． 項5に記載のベシクルからなる生理活性物質の導入剤。

項7． 生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを混合し、凍結・融解工程に供することを特徴とする、項1～4のいずれかに記載のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルの調製法。

項8． 生理活性物質を内包するカチオン性リポソームとエキソソームを混合し、複合化させることを特徴とする、項1～4のいずれかに記載のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルの調製法。

項9． 生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを混合し、ポリエチレングリコール (PEG) 及び / 又は PEG-脂質により複合化させることを特徴とする、項1～4のいずれかに記載のリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルの調製法。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、エキソソームに任意の生理活性物質を導入することができる。

【0012】

リポソームとエキソソームを複合化することにより、リポソームに内包した物質をエキソソームにも内包できる。リポソームは容易に膜組成を変えることができるため、本来エキソソームには内包不可能な分子の内包が可能になる。リポソームは、薬剤の電荷によって膜成分を選択することにより、高い封入効率で薬剤を封入可能である。また、リポソームのサイズをコントロールすることで、エキソソーム-リポソーム複合化物の最終的な大きさを制御することも可能である。エキソソームの構成成分を提示したカプセルの中に、プラスミドDNA を内封することも可能である。PEGで修飾されたリン脂質やコレステロール類は、脂質部分がエキソソームと相互作用し、PEG鎖がエキソソーム表面を覆うことで免疫系により攻撃されなくなり長期血中滞留性となる、いわゆるステルス-エキソソームを構築することができる。さらに、我々が開発したリポソームへの膜タンパク質直接構成法を用いて作成した、膜タンパク質発現リポソームと複合化させることにより、細胞のトランスフェクションを介することなくエキソソームの膜の改変や修飾を行うことが可能である。化学修飾リポソームも加味すると、バリエーションは無限大であり、内包物と外膜をより生体適合性を高め、テイラーメイド医療に応用可能なレベルへと改変することが可能である。また、大きなサイズの一枚膜リポソーム (以下、一枚膜リポソームを「SUV」ということもある。) と複合化させることにより、簡単に基板上にエキソソーム上のタンパク質のマッピングが可能になる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】凍結融解による無標識エキソソームとRhodamine-NBD標識SUVの相互作用

【図2】凍結融解したものとしめないものサイズ分布の比較

【図3】凍結融解超音波処理回数と蛍光強度

【図4】TRITON添加サンプルを基準にしたgreen蛍光強度回復

10

20

30

40

50

【図5】凍結融解処理ごとの複合体のサイズ変化

【図6】GelStar(登録商標)封入SUVの蛍光強度変化

【図7】カチオン性脂質(a. 10%, b. 30%)含有リポソームにエキソソームを添加した場合のLSM画像

【図8】カチオン性脂質(70%)含有リポソームにエキソソームを添加した場合のLSM画像

【図9】PEG濃度と蛍光強度変化(エキソソーム-リポソーム)

【図10】green/red比をもとにしたFRET解消効率(右)エキソソーム

【図11】PEG濃度によるエキソソーム-リポソーム複合体のサイズ変化

【発明を実施するための形態】

【0014】

1つの実施形態において、本発明は、リポソームとエキソソームが複合化したリポソーム-エキソソームハイブリッドベシクルを提供するものである。

【0015】

本発明におけるエキソソームとは、細胞から放出される小胞を広く含む。エキソソームの直径は30~200nm程度、好ましくは30~100nm程度であり、リン脂質、コレステロールなどの脂質、タンパク質等を含む。エキソソームはそれを産生する限り、いかなる動物種または植物種由来のものであってもよい。動物種は、例えば、脊椎動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヤギ、ニワトリ、サケ、マグロ等)が挙げられるが、好ましくは、薬物、核酸などの生理活性物質を導入する標的細胞と同種の動物由来であり、標的細胞が生体内の細胞である場合には、標的細胞と同じ動物に由来する小胞が好ましい。また、エキソソームが由来する細胞種は特に限定されないが、例えば、腫瘍細胞、樹状細胞、マクロファージ、T細胞、B細胞、血小板、網状赤血球、上皮細胞、線維芽細胞、幹細胞、iPS細胞等の様々な種類の細胞を挙げることができる。また、エキソソームは種々の体液、例えば、血液、尿、腹水などから調製することもできる。

【0016】

リポソームは、多重層リポソーム、一枚膜リポソームのいずれであってもよい。リポソームの大きさは40nm~100μm程度、好ましくは50nm~50μm程度、特に60nm~10μm程度である。リポソームは、通常の数メートルサイズのリポソームとジャイアントリポソームのいずれを使用してもよい。ジャイアントリポソームのサイズは通常1~100マイクロメートル程度である。通常の数メートルサイズのリポソームの大きさは、40nm~300nm程度、好ましくは50nm~200nm程度、特に60nm~150nm程度である。リポソームのサイズ(粒子径)は、エクストルーダーを用いて、孔径の小さいフィルターを通過させることによって調節可能である。

【0017】

本明細書において、リポソームとエキソソームの「複合化」は、リポソームとエキソソームが融合する場合、リポソームとエキソソームが会合する場合の両方を含む。

【0018】

本明細書において、物質を「内包」とするとは、リポソーム、エキソソームなどの各粒子の内部に物質が存在する場合と、リポソームとエキソソームが会合して1つの複合体を形成した場合にも、物質は、リポソーム、エキソソーム又はこれらの複合体に「内包」されている。

【0019】

本発明のハイブリッドベシクルは、リポソームとエキソソームが1:1で複合化(融合又は会合)したハイブリッドベシクルでもよく、1個のリポソームと複数のエキソソームが複合化(融合又は会合)したベシクルでもよく、複数のリポソームと1個のエキソソームが複合化(融合又は会合)したベシクルでもよく、複数のリポソームと複数のエキソソームが複合化(融合又は会合)したベシクルでもよい。

【0020】

エキソソーム1個あたりに複合化するリポソームは、0.2~5個程度、好ましくは0

10

20

30

40

50

． 3 ～ 3 個程度、より好ましくは 0 . 5 ～ 2 個程度である。

【 0 0 2 1 】

リポソームは超音波処理法、逆相蒸発法、凍結融解法、脂質溶解法、噴霧乾燥法などの従来公知の任意の方法により製造することができる。

リポソームの構成成分としては、リン脂質、コレステロール類、PEGで修飾されたリン脂質、PEGで修飾されたコレステロール類などが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

リン脂質としては、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (D P P E) 、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (D S P E) などのホスファチジルエタノールアミン類；ジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C) 、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C) などのホスファチジルコリン類；ジパルミトイルホスファチジルセリン (D P P S) 、ジステアロイルホスファチジルセリン (D S P S) などのホスファチジルセリン類；ジパルミトイルホスファチジン酸 (D P P A) 、ジステアロイルホスファチジン酸 (D S P A) などのホスファチジン酸類、ジパルミトイルホスファチジルイノシトール (D P P I) 、ジステアロイルホスファチジルイノシトール (D S P I) などのホスファチジルイノシトール類などが挙げられ、卵黄レシチン、大豆レシチン、リゾレシチン等の天然リン脂質、あるいはこれらを常法によって水素添加したものを使用することができる。

10

【 0 0 2 3 】

また、ポリエチレングリコール (P E G) で修飾された (P E G 鎖を有する) リン脂質として、DSPE-PEG, mPEG (メトキシPEG) -DSPE (PEGの分子量、750, 1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000) を使用することができる。

20

【 0 0 2 4 】

コレステロール類としては、コレステロール (C h o l) 、 3 - [N - (ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール (D C - C h o l) 、 N - (トリメチルアンモニオエチル)カルバモイルコレステロール (T C - C h o l) などが挙げられる。

また、ポリエチレングリコール (P E G) で修飾された (P E G 鎖を有する) コレステロール類として、Cholesterol-PEG, mPEG (メトキシPEG) - Cholesterol (PEGの分子量、1000, 2000, 5000, 10000, 20000, 30000, 40000) を使用することができる。

30

【 0 0 2 5 】

リポソームの構成成分は、これらの脂質を単独であるいは組み合わせて使用することができる。

【 0 0 2 6 】

リポソームには、少なくとも 1 種のカチオン性脂質を包含させることができる。

【 0 0 2 7 】

カチオン性脂質としては、DC-6-14 (0,0' -ditetradecanoyl-N-(-trimethylammonioacetyl)diethanolamine chloride) 、DODAC (dioctadecyldimethylammonium chloride) 、DOTMA (N-(2,3-dioleoyloxy)propyl-N,N,N-trimethylammonium) 、DDAB (didodecylammonium bromide) 、D O T A P (1,2-dioleoyloxy-3-trimethylammonio propane) 、DC-Chol (3 -N-(N',N',-dimethyl-aminoethane)-carbamol cholesterol) 、DMRIE (1,2-dimyristyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethyl ammonium) 、DOSPA (2,3-dioleoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propanaminum trifluoroacetate) 等が挙げられる。

40

【 0 0 2 8 】

好ましい 1 つの実施形態において、本発明のリポソームは、カチオン性脂質、リン脂質、コレステロール類を含む。これらの比率としては、リポソーム全体を 100 重量部としてリン脂質：10～100 重量部、好ましくは 30～100 重量部、より好ましくは 70～100 重量部、コレステロール類：0～50 重量部、好ましくは 0～30 重量部、より好ましくは 10～20 重量部。

カチオン性脂質：0～80 重量部、好ましくは 10～70 重量部、より好ましくは 30～70 重量部

50

である。

【0029】

上記の比率において、リン脂質、コレステロール類の一部または全部がPEGで修飾されていてもよい。

【0030】

リン脂質としては、DSPE-PG10G、DSPE-PEG350やPEG-コレステロールのようにPEGなどで修飾されたリン脂質やコレステロール類を使用することもできる。PEGで修飾されたリン脂質やコレステロール類は、脂質部分がエキソソームと相互作用し、PEG鎖がエキソソーム表面を覆うことで免疫系により攻撃されなくなり長期血中滞留性となる、いわゆるステルス-エキソソームを構築することができる。

10

【0031】

リポソームには、核酸、タンパク質、薬物などの生理活性物質を封入することで、エキソソームとの複合化時にこれらの生理活性物質をハイブリッドベシクルに導入することができる。

【0032】

薬物は任意の薬物が使用され特に限定されないが、例えば、抗腫瘍剤、抗高血圧剤、抗低血圧剤、抗精神病剤、鎮痛剤、抗鬱剤、抗躁剤、抗不安剤、鎮静剤、催眠剤、抗癲癇剤、オピオイドアゴニスト、喘息治療剤、麻酔剤、抗不整脈剤、関節炎治療剤、鎮痙剤、ACEインヒビター、鬱血除去剤、抗生物質、抗狭心症剤、利尿剤、抗パーキンソン病剤、気管支拡張剤、抗利尿剤、利尿剤、抗高脂血症剤、免疫抑制剤、免疫調節剤、制吐剤、抗感染症剤、抗新生物剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、抗糖尿病剤、抗アレルギー剤、解熱剤、抗痛風剤、抗ヒスタミン剤、止痒剤、骨調節剤、心血管剤、コレステロール低下剤、抗マラリア剤、鎮咳剤、去痰剤、粘液溶解剤、鼻詰り用薬剤、ドパミン作動剤、消化管薬剤、筋弛緩剤、神経筋遮断剤、副交感神経作動剤、プロスタグランジン、興奮薬、食欲抑制剤、甲状腺剤又は抗甲状腺剤、ホルモン、抗偏頭痛剤、抗肥満剤、抗炎症剤などとして作用し得るものが挙げられる。好ましい薬物は抗腫瘍剤である。抗腫瘍剤としては、ホルモン療法剤（例えば、ホスフェストロール、ジエチルスチルベストロール、クロロトリアニセリン、酢酸メドロキシプロゲステロン、酢酸メゲストロール、酢酸クロルマジノン、酢酸シプロテロン、ダナゾール、アリルエストレノール、ゲストリノン、メバルトリシン、ラロキシフェン、オルメロキシフェン、レボルメロキシフェン、抗エストロゲン（例、クエン酸タモキシフェン、クエン酸トレミフェンなど）、ピル製剤、メピチオスタン、テストロラクトン、アミノグルテチイミド、LH-RHアゴニスト（例、酢酸ゴセレリン、ブセレリン、リュープロレリンなど）、ドロキシフェン、エピチオスタノール、スルホン酸エチニルエストラジオール、アロマターゼ阻害薬（例、塩酸ファドロゾール、アナストロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、ポロゾール、フォルメスタンなど）、抗アンドロゲン（例、フルタミド、ピカルタミド、ニルタミドなど）、5 α -レダクターゼ阻害薬（例、フィナステリド、エプリステリドなど）、副腎皮質ホルモン系薬剤（例、デキサメタゾン、プレドニゾン、ベタメタゾン、トリアムシノロンなど）、アンドロゲン合成阻害薬（例、アピラテロンなど）、レチノイドおよびレチノイドの代謝を遅らせる薬剤（例、リアロゾールなど）などが挙げられ、なかでもLH-RHアゴニスト（例、酢酸ゴセレリン、ブセレリン、リュープロレリンなど）、アルキル化剤（例えば、ナイトロジェンマスタード、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、クロラムブチル、シクロフォスファミド、イホスファミド、チオテパ、カルボコン、トシル酸インプロスルファン、ブスルファン、塩酸ニムスチン、ミトブロニトール、メルファラン、ダカルバジン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウム、トリエチレンメラミン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ピボプロマン、エトグルシド、カルボプラチン、シスプラチン、ミボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン、アルトレタミン、アンバムスチン、塩酸ジブロスピジウム、フォテムスチン、プレドニムスチン、プミテパ、リボムスチン、テモゾロミド、トレオスルファン、トロフォスファミド、ジノスタチンスチマラー、カルボコン、アドゼレシン、システムスチン、ピゼレシン）、代謝拮抗剤（例えば

20

30

40

50

、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、チオイノシン、メトトレキサート、エノシタピン、シタラピン、シタラピンオクフォスファート、塩酸アンシタピン、5-FU系薬剤（例、フルオロウラシル、テガフル、UFT、ドキシフルリジン、カルモフル、ガロシタピン、エミテフルなど）、アミノプテリン、ロイコボリンカルシウム、タブロイド、プトシン、フォリネイトカルシウム、レボフォリネイトカルシウム、クラドリピン、エミテフル、フルダラピン、ゲムシタピン、ヒドロキシカルバミド、ペントスタチン、ピリトレキシム、イドキシウリジン、ミトグアゾン、チアゾフリン、アンバムスチン）、抗癌性抗生物質（例えば、アクチノマイシンD、アクチノマイシンC、マイトマイシンC、クロモマイシンA3、塩酸プレオマイシン、硫酸プレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、塩酸ダウノルピシン、塩酸ドキシソルピシン、塩酸アクラルピシン、塩酸ピラルピシン、塩酸エピルピシン、ネオカルチノスタチン、ミスラマイシン、ザルコマイシン、カルチノフィリン、ミトタン、塩酸ゾルピシン、塩酸ミトキサントロン、塩酸イダルピシン）、植物由来抗癌剤（例えば、エトポシド、リン酸エトポシド、硫酸ビンブラスチン、硫酸ピンクリスチン、硫酸ビンデシン、テニポシド、バクリタキセル、ドセタクセル、ビノレルピン、カンプトテシン、塩酸イリノテカン）、免疫療法剤（BRM）（例えば、ピシパニール、クレスチン、シゾフィラン、レンチナン、ウベニメクス、インターフェロン、インターロイキン、マクロファージコロニー刺激因子、顆粒球コロニー刺激因子、エリスロポイエチン、リンホトキシン、BCGワクチン、コリネバクテリウムパルブム、レバミゾール、ポリサッカライドK、プロコダゾール）、細胞増殖因子ならびにその受容体の作用を阻害する薬剤（例えば、トラスツズマブ（ハーセプチン（商標）；抗HER2抗体）、ZD1839（イレッサ）、グリーベック（GLEEVEC）などの抗体医薬）が挙げられる。抗腫瘍剤の対象となる癌の種類としては、結腸・直腸癌、肝臓癌、腎臓癌、頭頸部癌、食道癌、胃癌、胆道癌、胆のう・胆管癌、膵臓癌、肺癌、乳癌、卵巣癌、子宮頸癌、子宮体癌、膀胱癌、前立腺癌、精巣腫瘍、骨・軟部肉腫、白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、皮膚癌、脳腫瘍等が挙げられ、好ましくは結腸・直腸癌、胃癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌、膵臓癌、胆道癌、肝臓癌が挙げられる。

【0033】

これらの薬剤、核酸、タンパク質などの生理活性物質は、1種単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

【0034】

核酸としては、特に制限はなく、DNA、RNA、DNAとRNAのキメラ核酸、DNA/RNAのハイブリッド等いかなるものであってもよい。また、核酸は1~3本鎖のいずれも用いることができるが、好ましくは1本鎖又は2本鎖である。核酸は、プリンまたはピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のオリゴマー（例えば、市販のペプチド核酸（PNA）等）または特殊な結合を含有するその他のオリゴマー（但し、該オリゴマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などであってもよい。さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然のヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合または硫黄含有結合（例えば、ホスホチオエート、ホスホジチオエートなど）を持つもの、例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチドなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレート化合物（例えば、アクリジン、プソラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射活性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、アノマー型の核酸など）であってもよい。好ましい核酸としては、siRNAなどのRNAが挙げられる。

【0035】

10

20

30

40

50

s i R N Aとは、標的遺伝子のm R N Aもしくは初期転写産物のヌクレオチド配列又はその部分配列（好ましくはコード領域内）（初期転写産物の場合はイントロン部分を含む）に相同なヌクレオチド配列とその相補鎖からなる二本鎖オリゴR N Aである。s i R N Aに含まれる、標的ヌクレオチド配列と相同な部分の長さは、通常、約18塩基以上、例えば約20塩基前後（代表的には約21～23塩基長）の長さであるが、R N A干渉を引き起こすことが出来る限り、特に限定されない。また、s i R N Aの全長も、通常、約18塩基以上、例えば約20塩基前後（代表的には約21～23塩基長）の長さであるが、R N A干渉を引き起こすことが出来る限り、特に限定されない。

【0036】

標的ヌクレオチド配列と、s i R N Aに含まれるそれに相同な配列との関係については、100%一致していてもよいし、塩基の変異があってもよい（少なくとも70%、好ましくは80%、より好ましくは90%、最も好ましくは95%以上の同一性の範囲内であり得る）。

10

【0037】

s i R N Aは、5'又は3'末端に5塩基以下、好ましくは2塩基からなる、塩基対を形成しない、付加的な塩基を有していてもよい。該付加的塩基は、D N AでもR N Aでもよいが、D N Aを用いるとs i R N Aの安定性を向上させることができる。このような付加的塩基の配列としては、例えばug-3'、uu-3'、tg-3'、tt-3'、ggg-3'、guuu-3'、gttt-3'、ttttt-3'、uuuuu-3'等の配列が挙げられるが、これに限定されるものではない。

20

【0038】

s i R N Aは任意の標的遺伝子に対するものであってよいが、本発明の核酸導入剤を疾患の予防・治療剤として用いる場合には、エキソソーム中に封入されるs i R N Aは、その発現亢進が対象疾患の発症および/または増悪に関与する遺伝子を標的とするものが好ましく、より具体的には、その遺伝子に対するアンチセンス核酸が、臨床もしくは前臨床段階に進んでいる遺伝子や新たに知られた遺伝子を標的とするもの等が挙げられる。

【0039】

s i R N Aは、1種のみで使用してもよく、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【0040】

タンパク質としては、酵素、受容体、抗体、抗原、インターフェロン、インターロイキンなどのサイトカインなどが挙げられる。

30

【0041】

本発明のハイブリッドベシクルの大きさは、100ナノメートル～20マイクロメートル程度、好ましくは100～200ナノメートル程度である。

【0042】

リポソームとエキソソームのハイブリッドベシクルの製造法の例を具体的に説明すると、該リポソームとエキソソームを水などの適当な溶媒中で混合し、凍結・融解を繰り返すことにより、リポソームとエキソソームを複合化させることができる。凍結融解は、1～30回程度、好ましくは10～30回程度、より好ましくは20～30回程度が挙げられる。

40

【0043】

リポソームとしてカチオン性リポソームを使用した場合、カチオン性リポソームとエキソソームを混合することにより複合化することができる。複合化は、反応温度4～50程度、反応時間1～24時間程度で実施することができる。

【0044】

複合化反応は、エキソソーム100重量部に対し、リポソームを20～1000重量部程度、好ましくは100～1000重量部程度使用する。

【0045】

複合化にP E Gを使用する場合、生理活性物質を内包するリポソームとエキソソームを

50

ポリエチレングリコール (P E G) の存在下に混合し、複合化させてリポソーム - エキソソームハイブリッドベシクルを調製することができる。 P E G は、0 ~ 40 重量 % 程度の濃度でリポソームとエキソソームを含む混合液中に加えることができる。

【 0 0 4 6 】

使用される P E G としては、 P E G 5 0 0 ~ P E G 1 0 0 0 0 、好ましくは P E G 1 0 0 0 ~ P E G 8 0 0 0 が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

また、DSPE-PG10G、DSPE-PEG350のようにPEGなどで修飾されたリン脂質、 P E G で修飾されたコレステロール類などのPEG-脂質をエキソソームと複合化する場合には、PEG-脂質とエキソソーム中の脂質のモル比が0 ~ 30モル % 程度になるように加える。

10

【実施例】

【 0 0 4 8 】

以下、本発明を実施例を用いてより詳細に説明するが、本発明が実施例に限定されないことはいうまでもない。

【 0 0 4 9 】

実施例 1

< 実験方法 >

1. 凍結融解法による膜融合

1.1 実験手法

1.1.1. 試薬

DOPS [1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine]

Rhodamine-DHPE [Lissamine rhodamine B 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt]

NBD-DHPE [N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt]

GelStar(登録商標)

【 0 0 5 0 】

1.1.2. SUV作製

クロロホルム : メタノール = 2 : 1 溶液に溶解したDOPSに、NBD-DHPEとRhodamine-DHPEが1% になるように添加し、アルゴンガス環流下で溶媒を蒸発させて脂質フィルムを作成した。作成した脂質フィルムにPBSバッファを150 μ L加えて37 $^{\circ}$ Cで5分静置し、ボルテックスミキサーで攪拌した後エクストリューダーで100 nmのフィルターにかけてSUVを作成した。この時のDOPSの最終濃度が50 mMになるようにした。無色素のSUVも同様に作成し、コントロール実験に供した。

30

【 0 0 5 1 】

1.1.3. 細胞培養上清からのエキソソーム精製

K562細胞 (ヒト白血病細胞株) 、 $1.0 \sim 2.0 \times 10^6$ 個/mLの濃度でエキソソーム不含有培地 (FBS由来のエキソソームを取り除いた培地) に懸濁し、15時間培養した後、細胞懸濁液を回収し、1000 rpmで10分遠心後、上清を回収しさらに12000g、4 $^{\circ}$ Cで30分間遠心した。この上清を回収し100000g、4 $^{\circ}$ Cで2時間遠心した。上清を捨て、5 mLのPBSを入れ、100000 g、4 $^{\circ}$ Cで2時間遠心した。遠心後、上清を捨てPBSで沈殿を再懸濁しK562由来エキソソーム懸濁液を得た。

40

【 0 0 5 2 】

RAW264.7細胞 (マウスマクロファージ細胞株) を 1×10^6 個/mlの濃度でエキソソーム不含有培地2 Lに懸濁し、18 ~ 24時間培養した後、細胞懸濁液を回収し、400 g、4 $^{\circ}$ Cで10分遠心後、上清を回収しさらに10000 g、4 $^{\circ}$ Cで15分間遠心した。この上清を孔径0.45 μ m及び孔径0.22 μ mのフィルターで濾過後、限外濾過膜を用いて180 mlまで濃縮した。この濃縮上清を孔径0.8 μ mのフィルターに通した後、100000 g、4 $^{\circ}$ Cで2時間遠心した。上清をアスピレーターで吸引除去後、エキソソームを含む沈査をPBSで洗浄し、100000 g、4 $^{\circ}$ Cで2時間遠心した。遠心後、上清をアスピレーターで吸引除去後、沈査を200 μ lのPBSに再

50

懸濁しRAW264.7由来エキソソーム懸濁液を得た。

【0053】

1.1.4. 核酸染色剤を用いた複合化モニター実験

膜を透過しない核酸染色剤を封入したSUVをエキソソームに複合化させることで、内部溶液混合によるRNA検出を行った。150 μ Lで30 mM DOPSになる脂質フィルムに、37 に暖めておいたGelStar(登録商標)10 μ LとPBS140 μ Lを加え、5分程度37 で膨潤させ、ボルテックスミキサーで攪拌した後、エクストリューダーで100 nmフィルターに通してSUVを作成した。その後、SUVを精製し、余剰色素を除去した。K562 エキソソーム(Lot32) 1.3 μ gと、最終濃度が42.3 μ MのDOPSSuv (including 9000x GelStar(登録商標))を混合し、蛍光強度を測定した。混合後に液体窒素で完全に固化した後室温にて20分以上静置した凍結融解法で処理したものの蛍光強度も測定した。また、コントロールとして、GelStar(登録商標)10 μ LとPBS140 μ Lをゲル濾過したものを同じ要領用いたもので同様の実験を行なった。

10

【0054】

1.2. 結果と考察

最終濃度4 μ MのDOPSSuv (1% NBD-PE, Rhodamine-PE) と50 μ L中でタンパク質量5.3 μ gになるようにK562エキソソームを混合し、液体窒素で完全に固化と室温で完全に融解させることを15回繰り返して蛍光強度を測定した。

【0055】

図1の緑色のラインが、エキソソームと混合直後のSUVの蛍光強度であり、薄紫色が、氷上で凍結融解にかかった時間と同等の時間を経過したサンプルの蛍光強度である。青色のラインが、凍結融解したものである。氷上静置したサンプルは、短波長側の蛍光強度が増加したが、長波長側の蛍光強度は下がらなかった。一方で、凍結融解したサンプルでは、長波長側の蛍光強度の減少がみられた。この結果をさらに詳しく知る為に、ナノサイトで凍結融解したものとしめないもののサイズを測定した。

20

【0056】

その結果、凍結融解したもの(凍結融解15回)ではサイズ分布が全体的に大きくなっており、FRET解消法と併せてエキソソームとリポソームが複合化していることが示唆された。

【0057】

Raw エキソソームの場合

DIOとR18で共染色したエキソソーム(150 μ g/mL)10 μ Lに、100 μ Mのリポソーム溶液を90 μ L加え、液体窒素中で完全に固化し、37 のヒートブロックにて溶解を5回繰り返す毎にサンプルの蛍光強度と粒子径の測定を行なった。また、同様にして作成したサンプルにTRITONX-100を1%添加し、完全に脂質混合が起こった条件での緑色の蛍光強度を100%とした時の各回数での蛍光強度を%としてFRET解消効率2(図4)を求めた。蛍光強度の変化で見る限り、Raw-エキソソームとリポソームは、凍結融解を30回繰り返すことにより60%程度脂質混合し、複合化が起こっていることが示唆された。

30

【0058】

また、エキソソームとリポソームを混合して凍結融解を30回繰り返した場合のみ、赤色の蛍光が増大した。R18は自己消光性の色素であり、その蛍光強度が増大したということはエキソソーム上のR18分子間距離が顕著に広がったことを示しており、このことから複合化が起こっていることが示された。

40

【0059】

これまでの実験においては、脂質膜成分が混合することによりリポソームとエキソソームの複合化をモニターしていたが、エキソソームとリポソームの内容物の混合が測定できないかどうかをリポソームにRNA検出試薬であるGelStar(登録商標)を封入し、エキソソームと混合して凍結融解を行なって調べた。

【0060】

その結果、混合しただけの系と比較して、凍結融解によって1.5倍蛍光強度が高くなった。このことより、凍結融解によって外部の脂質の交換だけでなく、内容物の移行混合も

50

おこっていることが示された。

【 0 0 6 1 】

2. カチオン性リポソーム混合法

2.1 実験手法

2.1.1. 試薬

DOPC [1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine],

EPC [1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine]

DIO[3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate],

R18 [Octadecyl Rhodamine B Chloride],

【 0 0 6 2 】

2.1.2. GL作製

クロロホルム：メタノール=2:1溶液に溶解したDOPCとEPCを目的比で混合し、DIOが1%になるように添加し、アルゴンガス環流下で溶媒を蒸発させて脂質フィルムを作成した。作成した脂質フィルムに100 μ Lの294 mMグルコース及び10 mM KCl溶液を加え室温で一晩静置し、GLを作成した。この時のDOPCとEPCの最終濃度が1 mMになるようにした。

【 0 0 6 3 】

2.1.3. 細胞培養上清からのエキソソーム精製とエキソソームの染色

1.1.3. と同様に抽出したK562エキソソームを使用した。R18をDMSOに溶解し、最終濃度がエキソソームのリン脂質濃度の1%程度になるように加えた。そのとき、系に加わるDMSOの量は5%以下になるようにした。色素とエキソソームを混合した後、氷上で1時間静置し、カラムを用いて余剰色素を除去した。

【 0 0 6 4 】

2.2. 結果と考察

プレパラート上で緑色の蛍光色素であるDIOで染色したGL100 μ M(lipid)溶液と赤色の色素であるR18で染色したエキソソーム溶液0.1 μ g/ μ L(protein)を等量混合してレーザー共焦点顕微鏡[LSM]観察を行なった。その結果、時間とともに、リポソーム表面が厚くなることがわかり、カチオン性脂質であるEPC含有量が低い場合には、厚くなった部分が緑色で観察された(図7)。リポソームの表面にエキソソームが吸着したハイブリット体が得られた。

【 0 0 6 5 】

カチオン性脂質の含有量を70%まで増加した場合には、GLの表面が緑色の励起波長で赤色の蛍光が観察され、FRETが起こっていることがわかった。これは、GLとエキソソームの膜の複合化を示唆している。

【 0 0 6 6 】

3. PEGによるリポソームの複合化とリポソームとエキソソームの相互作用

細胞やリポソームの複合化誘起剤として古典的に用いられているポリエチレングリコールを用いたリポソームとエキソソームの複合化を試みた。今回はPEG6000を用いて実験を行なった。

【 0 0 6 7 】

3.1 実験手法

3.1.1. 試薬

DOPC [1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine],

DOPS [1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-L-serine]

DIO[3,3'-dioctadecyloxacarbocyanine perchlorate],

R18 [Octadecyl Rhodamine B Chloride],

【 0 0 6 8 】

3.1.2. SUV作製

クロロホルム：メタノール=2:1溶液に溶解したDOPSに、NBD-PEとRhodamine-PEが1%になるように添加し、アルゴンガス環流下で溶媒を蒸発させて脂質フィルムを作成した。作成した脂質フィルムにPBSバッファを150 μ L加えて37 $^{\circ}$ Cで5分静置し、ボルテックスミキ

10

20

30

40

50

サーで攪拌した後エクストリューダーで100 nmのフィルターにかけてSUVを作成した。この時のDOPSの最終濃度が50 mMになるようにした。無色素のSUVも同様に作成し、コントロール実験に供した。

【0069】

3.1.3. 細胞培養上清からのエキソソーム精製

1.1.3. と同様に抽出したRawエキソソームを使用した。

【0070】

3.1.4. エキソソームの染色と蛍光強度測定とナノサイト測定

2.1.3. と同様にD10とR18で共染色したエキソソーム(150 $\mu\text{g/mL}$)10 μL に、PEGと脂質濃度にして90 μM 分のDOPCsuvあるいはDOPSSuv溶液を加え、蛍光強度と粒子径の測定を行った。

10

【0071】

3.2. 結果と考察

蛍光強度測定の結果、PEGの濃度が高くなるにしたがって緑色の蛍光強度が増加し、脂質成分の混合が起こっていることが分かった(図9, 10)。

【0072】

また、ナノサイトによるサイズ測定の結果では、DOPCsuvよりも、DOPSSuvで、PEG濃度が40%で顕著にサイズが大きくなり、複合化が生じていることが示唆された(図11)

。

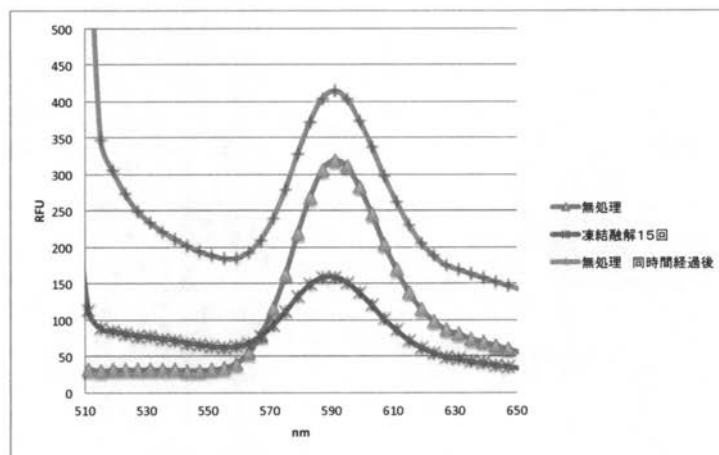
【産業上の利用可能性】

20

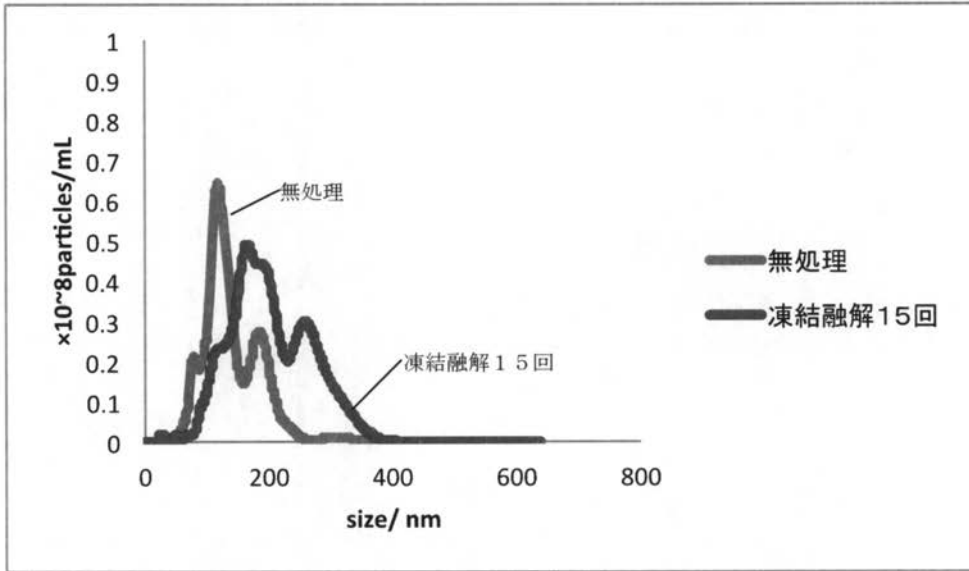
【0073】

本発明のベシクルは、薬物、核酸などの生理活性物質を細胞内に導入することができるので、ドラッグデリバリー・システム(DDS)として利用可能である。また、標識物質をベシクルに導入することで、バイオイメージングに応用することができる。さらに、抗原をベシクルに導入することで、ワクチンとして利用することもできる。

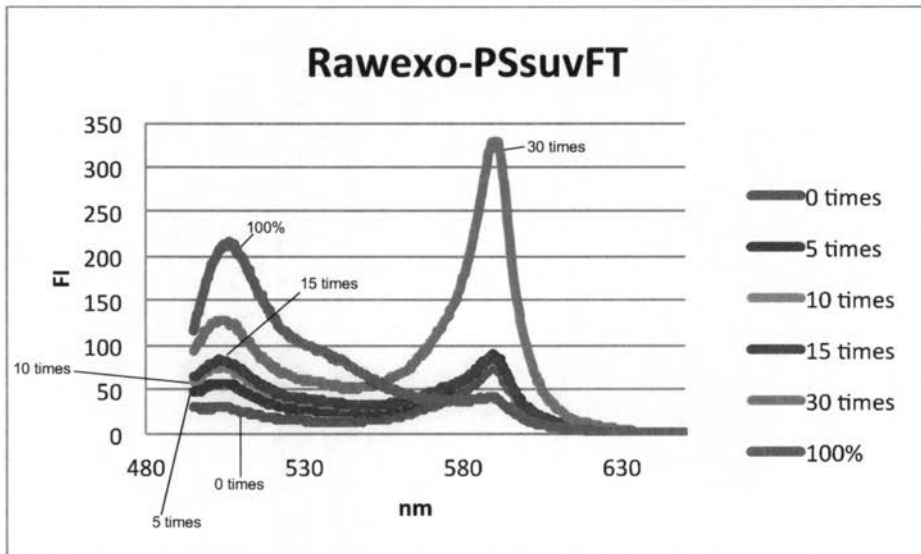
【図1】



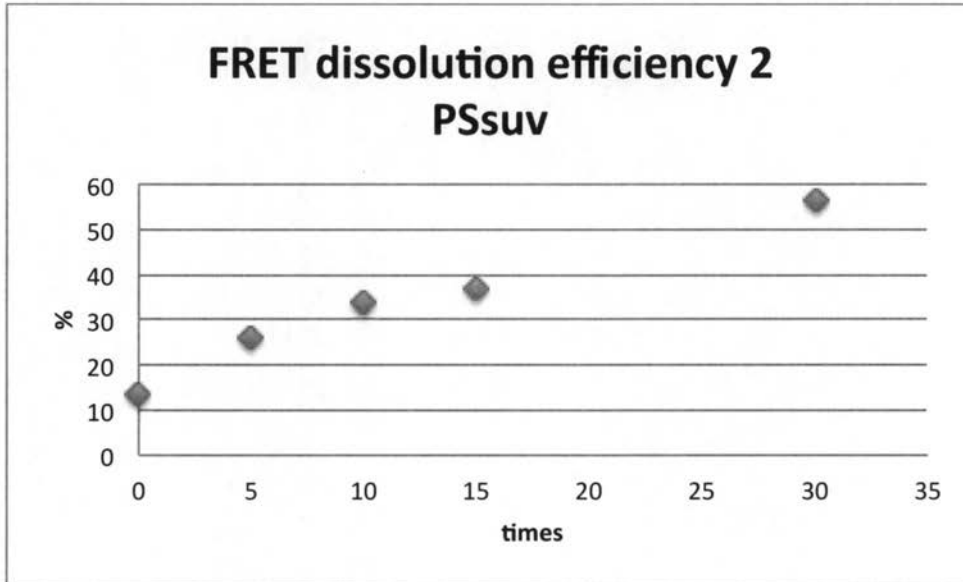
【 図 2 】



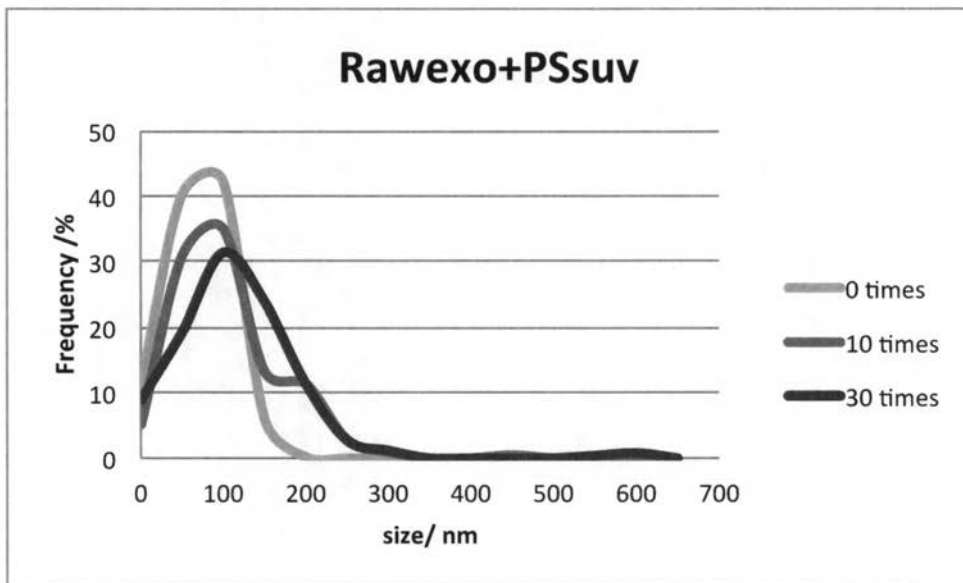
【 図 3 】



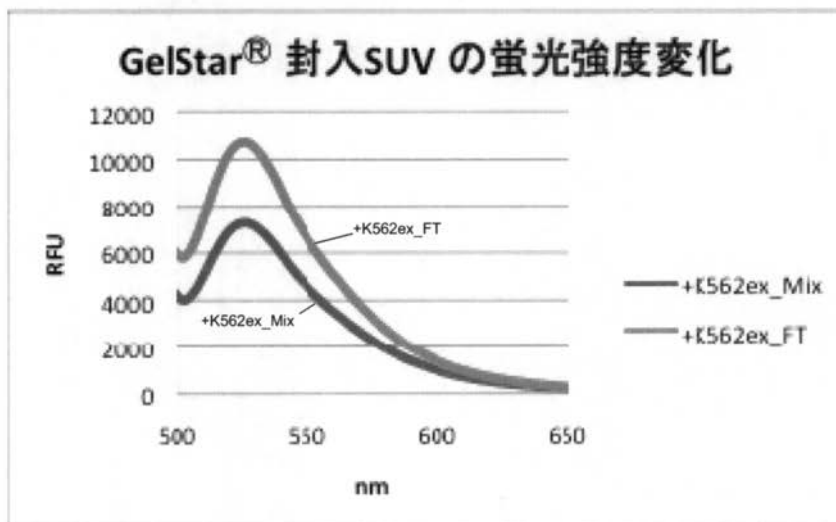
【 図 4 】



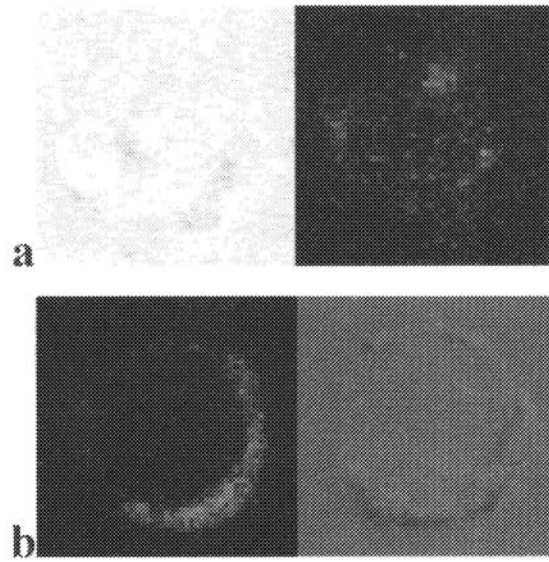
【 図 5 】



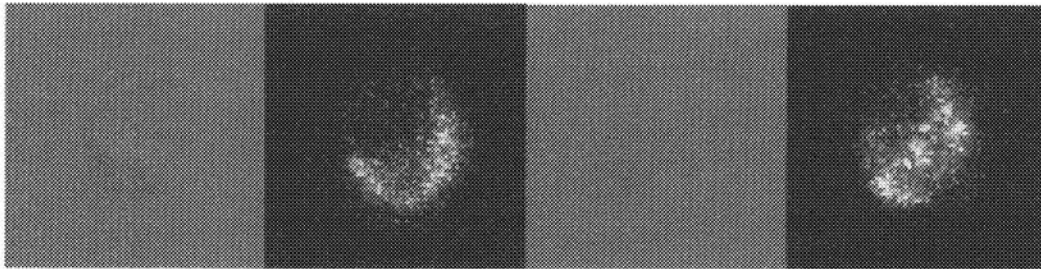
【 図 6 】



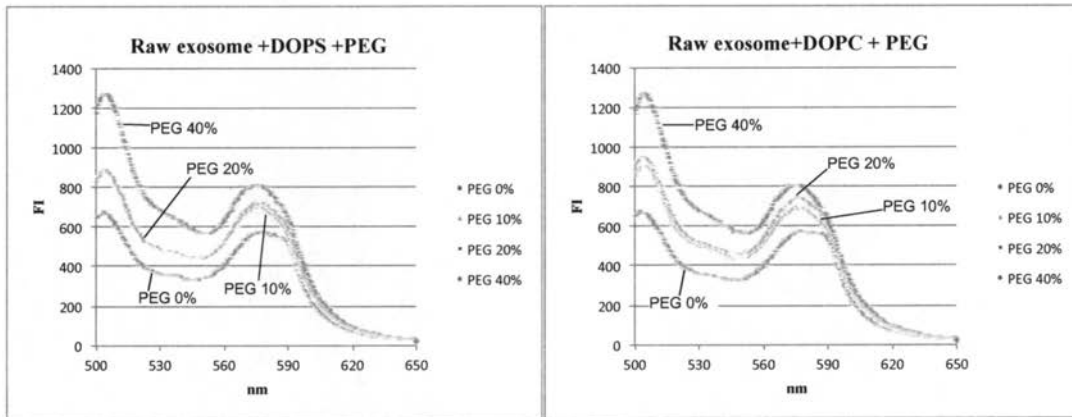
【 図 7 】



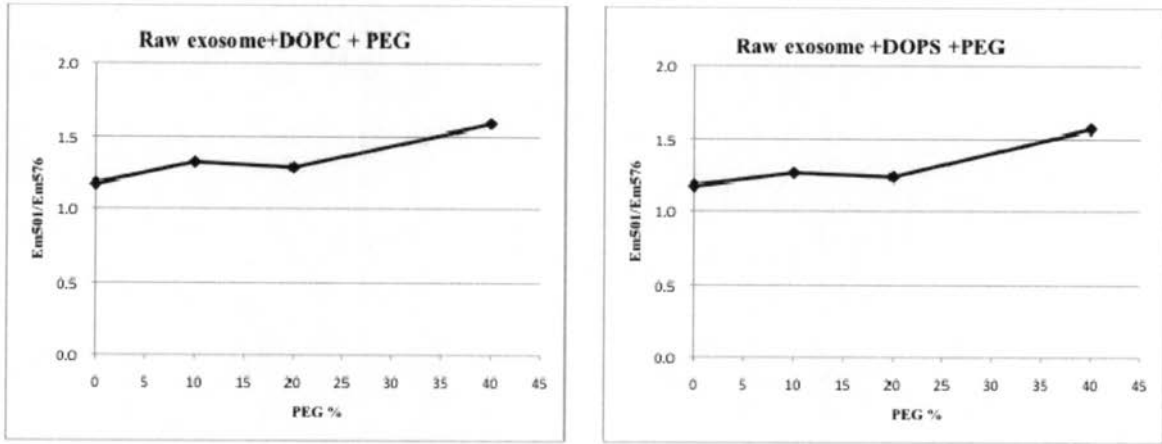
【 図 8 】



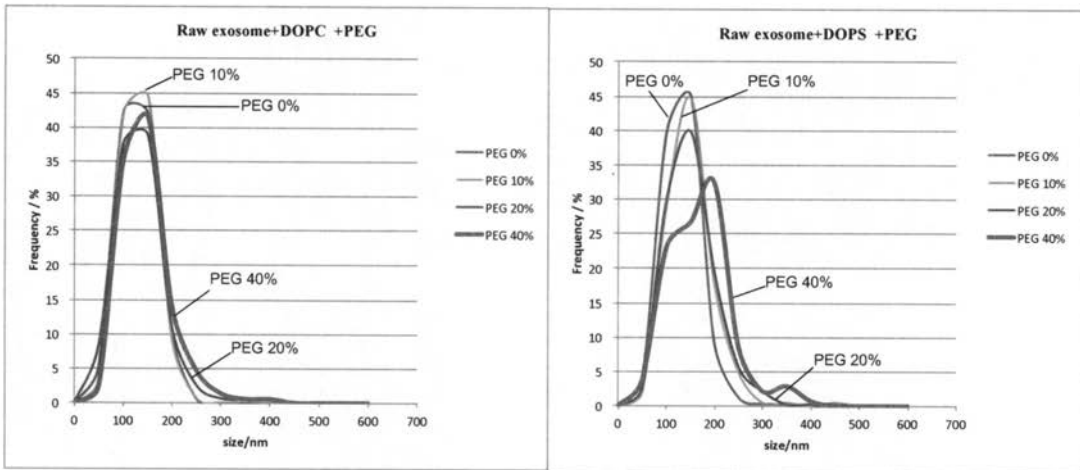
【 図 9 】



【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 47/34 (2006.01)	A 6 1 K 47/34	
A 6 1 K 47/44 (2006.01)	A 6 1 K 47/44	
Fターム(参考)	4C076 AA19 CC50 DD09 DD63A EE23A EE41 GG01	
	4C084 AA03 AA13 BA03 CA62 MA24 NA20	
	4C086 AA10 EA16 MA03 MA05 MA24 NA20	