機能性ペプチド修飾型エクソソームを用いた 細胞内への薬物導入技術

大阪府立大学 大学院理学系研究科*

中瀬生彦*

Intracellular delivery system based on biofunctional peptide-modified exosomes

Extracellular vesicles (exosomes, EVs) (30-200 nm) that encapsulate biofunctional molecules (e.g., microRNAs and enzymes) are highly expected to be useful as next-generation therapeutic carriers because of their pharmaceutical advantages such as controlled immunogenicity, effective usage of cell-to-cell communication routes, absence of cytotoxicity, constitutive secretion, encapsulation of additional biofunctional molecules, and expression of functional proteins in membranes. However, methods for increasing the cellular uptake efficacy of EVs must be developed to achieve effective intracellular delivery of EV contents. In this review, I introduce and discuss novel techniques to enhance cellular EV uptake by modification of arginine-rich peptides on EV membranes for macropinocytosis induction and effective cellular uptake. Our research group previously found that macropinocytosis (accompanied by actin reorganization, ruffling of the plasma membrane, and engulfment of large volumes of extracellular fluid) is very important route for the cellular uptake of EVs. Therefore, we developed macropinocytosis induction techniques by modification of biofunctional peptides on EV membranes to enhance their cellular uptake. Arginine-rich cell-penetrating peptides have been shown to induce macropinocytosis via proteoglycans on plasma membranes, and we developed arginine-rich cell-penetrating peptide-modified EVs that can actively induce macropinocytotic uptake by cells. In addition, I discuss effects of lyophilization of arginine-rich cell-penetrating peptide-modified EVs on their biological activity. Our findings may contribute to the development of EV-based intracellular delivery systems via macropinocytosis.

細胞分泌小胞を介した細胞間コミュニケーション、および、小胞を用いた薬物送達が大きく注目されている。細胞分泌小胞は、形成時にサイトソルに存在する機能性分子、例えば microRNA 等の遺伝子や酵素を内包する。分泌された小胞は、分泌細胞から離れた場所に存在する細胞に運ばれ、細胞内へ移行する。その結果、分泌小胞内の“メッセージ”が離れた細胞に伝わり、結果として分泌小胞を介して細胞間情報伝達が行われる。一方で、エクソソームをはじめとした細胞分泌小胞は、薬学的な観点から、免疫制御が可能、遺伝子工学で膜タンパク質発現が可能、細胞間コミュニケーション経路が利用可能、低い細胞毒性、無限分泌等の高い優位性を有し、次世代の薬物運搬体としても大きく期待されている。筆者らの研究チームは、エクソソームの細胞内移行に「マクロピノサイトーシス」経路が重要であること、そしてペプチド化学を用いることで、エクソソームの膜表面にマクロピノサイトーシスを誘導するための機能性ペプチドを修飾することで、エクソソームの細胞内送達の効率性を、大幅に上昇させることに成功している。本総説では、エクソソームを中心とした細胞分泌小胞の概要やマクロピノサイトーシスの重要性、機能性ペプチド修飾型エクソソームを基盤とした薬物送達技術等について紹介する。

Ikuhiko Nakase*

Keywords: Extracellular vesicles, exosomes, macropinocytosis, arginine-rich cell-penetrating peptides

* Graduate School of Science, Osaka Prefecture University

1. はじめに

近年、細胞分泌小胞(extracellular vesicle)を介した細胞間コミュニケーション、および、小胞を用いた薬物送達が大きく注目されている。細胞分泌小胞は、マイクロベシクル(microvesicle)、エクソソーム(exosome)、そしてアポトーシス小体(apoptotic body)に大きく分けることができ、それぞれの小胞は分泌経路が異なる¹⁻⁴⁾。マイクロベシクルは細胞形質膜からの出芽で生じる小胞で、直径約100 nmから1 μm の大きさをもつ。一方で、エクソソームは詳細を後述するが、細胞内のマルチベシクラーエンドソーム(multivesicular endosome、MVE)内に形成され、直径が約30 nmから200 nmの大きさを有する。MVE内部に形成蓄積されたエクソソームは、MVE膜と形質膜が融合することで開口し細胞外へ放出される。マイクロベシクルとエクソソームは、細胞膜で囲まれた小胞であるが、このように形成機序に大きな違いがある。アポトーシス小体は、その名前のとおりアポトーシス誘導時に形質膜から形成

される巨大な小胞で、直径約1 μm から5 μm の大きさをもつ。細胞分泌小胞は、形成時にサイトゾルに存在する機能性分子、例えば microRNA 等の遺伝子や酵素を内包する。分泌された小胞は、分泌細胞から離れた場所に存在する細胞に血液等の体液にのって運ばれ、細胞内へ移行する。その結果、分泌小胞内の“メッセージ”が離れた細胞に伝わり、結果として分泌小胞を介して細胞間情報伝達が行われる(図1)¹⁻⁴⁾。

この細胞分泌小胞を介した細胞間情報伝達は、細胞のホメオスタシスの維持のみならず、疾患進展にも寄与することが明らかとなっており、例えば、miR-181c を内包する乳がん細胞が分泌するエクソソームは、血液脳関門を破壊することで脳へのがん転移が促進されることが示され、miR-181c が標的とする PDPK1 遺伝子が破壊されることでアクチン制御が破綻することが機序として解明されている⁵⁾。また MMP1 mRNA 遺伝子を内包する卵巣がんが分泌するエクソソームは、がんの腹膜播種性転移を促進するために腹膜の中皮細胞をアポトーシス

図1 エクソソームを介した細胞間コミュニケーション

細胞死へ誘導することも明らかとなっている⁶⁾。さらに近年では、血液等の体液から単離したエクソソームの内包分子である microRNA や酵素等を調べることで、疾患を見つける技術開発も盛んに進められている^{7,8)}。

一方で、エクソソームをはじめとした細胞分泌小胞は、薬学的な観点から、(1)免疫制御が可能、(2)遺伝子工学で膜タンパク質発現が可能、(3)細胞間コミュニケーション経路が利用可能、(4)低い細胞毒性、(5)無限分泌等の高い優位性を有し、次世代の薬物運搬体としても大きく期待されている。例えば、アルツハイマー疾患を改善するためのエクソソームを用いた siRNA デリバリーの例(BACE 標的)も示されている⁹⁾。さらに細胞増殖抑制や細胞遊走促進等のそれぞれの機能を有する、人工系で作製が難しい microRNA や膜タンパク質発現、酵素内包のカクテルを有するエクソソームが天然の細胞から分泌されてくることから、それらの天然エクソソームを利用することで、疾患治療用の薬剤として活用できることが大きく期待できる。加えて、筆者らの研究チームは、エクソソームの細胞内移行に「マクロピノサイトーシス」経路が重要であること、そしてペプチド化学を用いることで、エクソソームの膜表面にマクロピノサイトーシスを誘導するための機能性ペプチドを修飾することで、エクソソームの細胞内送達の効率性を、大幅に上昇させることに成功している¹⁰⁻¹³⁾。

2. マクロピノサイトーシス経路の重要性

細胞が細胞外のタンパク質等の分子を取り込む際に、エンドサイトーシスの経路を用いる。例えば、形質膜受容体に存在する受容体に対して、リガンド分子が結合することで、サイトゾルにおいて AP2 アダプタータンパク質を用いたクラスリン分子の結合、および、形質膜のボール状の構造体を形成し、最終的にダイナミンで形質膜からのエンドソームの切り離しを行う。これらはクラスリン依存的なエンドサイトーシスと呼ばれているが、クラスリンがエンドソームの大きさを制限するため、通常約 120 nm 程度までの直径であることが報告さ

れている¹⁴⁾。エクソソームを含め、細胞分泌小胞は 120 nm の大きさを超えるものが存在し、通常のクラスリン依存的なエンドサイトーシスの場合、分泌小胞の細胞内移行性は効率性が低いと考えられる。一方で、クラスリン非依存的で、アクチン重合の再構成で形質膜ラフリング(ラメリポディア)を伴うマクロピノサイトーシス経路が知られている^{15,16)}。例えば、がんを高発現な上皮成長因子受容体(epidermal growth factor receptor, EGFR)やケモカイン受容体の CXCR4 等の受容体活性化によってシグナルが誘導され、マクロピノサイトーシスが誘導されることが示されている¹⁷⁻²⁰⁾。マクロピノサイトーシスは、栄養物も含めた細胞外分子を直径が 1 μm を超えて細胞内へ取り込むことができる¹⁴⁾。例えば、膵臓がんに関して、2013年に Commissoらが、がんの悪性化に関わる K-Ras の変異体が発現した膵臓がん、マクロピノサイトーシス経路による細胞内取り込みが発達し、本経路での細胞外栄養分の取り込み増強ががんの悪性化につながっていることを報告し、さらに、マクロピノサイトーシス阻害剤を用いることで、動物実験においても膵臓がんの増殖が有意に抑えられた結果が報告されている²¹⁾。抗がん剤ではなく、マクロピノサイトーシス経路阻害剤を用いることで、新しい反応点での膵臓がんを進展抑制する知見は、高いインパクトを与えるとともに、発達した細胞内取り込み経路を標的とするといった新しい観点からの薬剤応用は、各がん細胞への適用性が高いものと考えられる。

エクソソームに限ると、これまでの細胞内移行メカニズムは、エクソソーム膜のテトラスパニン膜タンパク質等がリガンドになっている可能性や、Glypican-1 等のグリコサミノグリカンががん由来のエクソソームに高発現しており、それがリガンドになっているといった説が考えられていた²²⁻²⁶⁾。しかしながら、受容体へリガンドが結合して細胞内へ取り込まれる場合は、上述のようにクラスリン依存的な細胞内移行がほとんどで、120 nm 程度を超える大きなサイズの分泌小胞は細胞内移行性が低いと考えられる。一方で筆者らは、先の K-Ras 変異体を発現した膵臓がんでの知見を考慮し、エクソソームの細胞内移行におけるマクロピノサイトーシスの重要

性について詳細に検討した。まず、EGFRのリガンドであるEGFで受容体を活性化することでマクロピノサイトーシスを誘導し、エクソソームの細胞内移行への影響を調べた。EGFRを高発現するヒト類表皮がんA431細胞において検討した結果、驚くべきことにマクロピノサイトーシス誘導によって顕著なエクソソームの細胞内移行上昇が確認された¹⁰⁾。さらに、Commissoらの実験系と同様にマクロピノサイトーシスを高く誘導する膵臓がん由来MIA-PaCa細胞を用いた場合、エクソソームの移行効率が高いことを*in vitro*の実験で明らかとした¹⁰⁾。通常エクソソーム膜は負に帯電しており、ゼータポテンシャルも約 -10 mV であり、同じく負電荷を帯びている形質膜と反発することで、形質膜との相互作用は低いと考える¹⁰⁾。一方で、マクロピノサイトーシス経路の場合は、上述のラッフリングを用いて形質膜と相互作用しにくいエクソソームを効果的に包んで細胞内へ取り込ませることができる¹⁰⁾。つまり、細胞側の視点からみると、エクソソームを受容体で引き寄せるのではなくて、自体の膜を効果的に利用して囲い込むといった新しい観点からの機序を有することになる。エクソソームを介した細胞間コミュニケーションについて、マクロピノサイトーシスが大きく寄与する可能性が、これらの知見から大いに予測できる。さらに2017年には、Kamerkarらの研究グループが、膵臓がんでのK-Ras変異体発現によるマクロピノサイトーシス誘導の発達とエクソソームの高いがん細胞内への移行性を利用して、エクソソームを利用したsiRNAを膵臓がんへ効果的に送達し、*in vivo*のモデル動物実験において本手法で著しく膵臓がん抑制効果を発揮できたことを報告している²⁷⁾。

3. 抗がん剤投与におけるエクソソームを介した細胞間コミュニケーションへの影響と薬物送達への応用

ただし、エクソソームの細胞内移行にマクロピノサイトーシスが重要であることは明確になっているが、最近、筆者らの研究チームはマクロピノサイトーシス以外での重要な細胞内移行経路の存在

の可能性を示唆する知見が得られている²⁸⁾。筆者らは、上皮成長因子受容体EGFRの阻害剤である抗がん剤gefitinib(商品名：イレッサ)での肺がん治療における、エクソソームの細胞間コミュニケーションに関する検討を行った。Gefitinibは、非小細胞肺がんの臨床治療で用いられているが、副作用や薬剤耐性等の注意が必要であり、またそれらの詳細な機序解明が喫緊の課題となっている。最近、筆者らは、gefitinib処理によって薬剤感受性のある非小細胞肺がんのミトコンドリア活性(還元酵素活性やミトコンドリア膜電位等)に影響を与えることを示し、基礎研究ではあるが、薬剤のEGFR阻害のみならず、他の細胞内オルガネラへも影響することで、薬剤処理における副作用誘起の原因解明につながる知見を報告した²⁹⁾。Gefitinib処理によって、ミトコンドリア活性が上昇し、例えば多剤投与による抗がん剤処理において、ミトコンドリアで働く薬剤活性に大きく影響を与えることを示した²⁹⁾。さらに筆者らの研究チームは、細胞へのgefitinib処理によってエクソソームによる細胞間コミュニケーションへの影響について詳細に調べた結果、細胞の増殖能に影響を与えない低濃度でのgefitinib処理によって、エクソソームの細胞内移行量が顕著に上昇すること、一方で、リポソームの細胞内移行量が大きく低下することを確認した²⁸⁾。GefitinibはEGFR阻害剤であり、上述のとおり、マクロピノサイトーシス経路も阻害する²⁸⁾。エクソソームの細胞内移行にはマクロピノサイトーシス経路が重要であることが明らかになっているものの、gefitinib処理によってエクソソームの移行量上昇が認められたことから、マクロピノサイトーシス経路を超える移行促進可能な機序が存在することが示されたことになる。抗がん剤ドキソルビシンをエクソソームに内包させた場合、リポソームでの同様な場合と比べて、エクソソームの場合の方がgefitinibと同時に投与を行った場合に、内包ドキソルビシンの非小細胞肺がんに対する抗がん活性が有意に高くなることを初めて確認した²⁸⁾。本結果においてエクソソームの膜タンパク質の影響を調べるために、トリプシンでタンパク質を分解・除去したエクソソームで再度検討を行った。その結果、エクソソームの膜タンパク質を分解することで、

gefitinib処理による細胞内移行性がさらに上昇することが確認された²⁸⁾。よって、エクソソーム膜脂質が gefitinib 処理時における細胞内移行促進に寄与している可能性が考えられるが、今後、さらなる詳細な機序解明が必要となっている。一方で、薬物送達の観点から、多剤での抗がん活性を狙う際に、送達に用いる材料の細胞内移行性が併用薬剤によって影響を及ぼすことが本研究からも示唆され、エクソソームを用いた薬剤送達において新たな有用点として、今後、本知見が重要な基礎的知見となり得ると考える。

4. エクソソーム膜上への機能性ペプチド修飾技術

現在、筆者らの研究チームは機能性ペプチドを用いたエクソソームの細胞内導入技術の構築研究を進めており、各技術の詳細を後述するが、ここではペプチド修飾法について簡単に述べたい。筆者らは、エクソソームの膜成分をいじくらずにペプチドを結

合させる簡便な技術として、(1)ペプチドにステアシル基等のアシル化を施す方法と、(2)スクシンイミド基を有するリンカーをもったペプチドを用いる場合の2つの技術構築を行った(図2)。

(1)ペプチドにステアシル基等のアシル化を施す方法においては、Fmoc固相法でビーズ上でのペプチド合成の際に、N末端にステアリン酸等での脱水縮合を行い、その後、脱保護・精製でアシル化された目的ペプチドを得る。例えばステアシル基を有するペプチドは、エクソソームと溶液中で混合するだけで、アシル化した疎水性部位がエクソソーム膜に容易に挿入されることで、ペプチドをエクソソーム膜上に提示させることができる^{11,13)}。エクソソーム膜へ提示されていないペプチドは、限外濾過法等で除去することが可能である。本手法は、基本的にペプチドの配列の考慮は必要ないが、疎水性の高いペプチドの場合、ペプチドへの疎水性基の付与によって溶解性が悪くなる場合がある。その場合は、アシル化する疎水性基の疎水度の制御と、エクソソーム

図2 エクソソーム膜へのアルギニンペプチド修飾と細胞へのマクロピノサイトーシス誘導

膜への挿入の度合いのバランスを考慮して、調製が必要となる。

(2) スクシンイミド基を有するリンカーをもったペプチドを用いる方法は、例えば sulfo-EMCS 等の二価性リンカーを用いて目的ペプチドとエクソソーム膜タンパク質を共有結合で結合させる。ペプチド合成の際にシステイン残基をペプチド配列中に導入し、N末端を、無水酢酸を用いたアセチル化キャップを行う。精製した目的ペプチドのシステイン残基側鎖と、EMCS のマレイミド基とをマイケル付加で結合させて再度精製する。次に、精製後のペプチドとエクソソームを混合させることで、ペプチドのリンカーが有するスクシンイミド基と、エクソソームの膜タンパク質アミノ基と反応し、目的ペプチドとエクソソームが共有結合でくっつく¹²⁾。本手法では、もともとの結合させたいペプチド配列中にリジン等のアミノ基やシステイン残基が存在しない場合に用いることができる。アミノ酸配列を鑑み、場合によっては非天然のアミノ酸を配列中に導入し、クリックケミストリーを用いたリンカー結合を用いる必要も生じる。

(1) の手法を用いた場合は、エクソソームの膜タンパク質に影響がほとんどなく、ペプチドを修飾させることができ、一方で、(2) の手法の場合は膜タンパク質の構成アミノ酸側鎖に共有結合を行うので、膜タンパク質の本来の機能に影響を生じる可能性がある。しかし、(2) の手法は共有結合でのペプチド修飾なので、(1) の場合での膜へ挿入するアンカー型と比較してエクソソーム膜上でのペプチド保持力が高いことが考えられる。研究の目的に応じて手法の選択と最適化が必要である。

5. アルギニンペプチド修飾型エクソソームの マクロピノサイトーシス誘導と 効率的な細胞内移行

上述のとおり、エクソソームの細胞内移行にマクロピノサイトーシス経路が重要であることが明らかとなったため¹⁰⁾、エクソソーム自体でマクロピノサイトーシスが誘導できる技術を構築することで、細胞内移行性を増強できると考えた。そこで筆者らは、

マクロピノサイトーシスを誘導する膜透過性アルギニンペプチド修飾型エクソソームの技術開発を行った。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)-1の感染で発現する転写因子 Tat タンパク質由来ペプチド(HIV-1 Tat(48-60))やオリゴアルギニン(R_n : $n=8\sim 16$)等は、細胞内へ高効率に移行する機能を有し、膜透過性ペプチド(cell-penetrating peptides, CPPs)と呼ばれている³⁰⁾。配列中にアルギニン残基を多く有する CPPs の細胞内移行機序として、形質膜のプロテオグリカンの糖鎖のヘパラン硫酸やコンドロイチン硫酸等を介して形質膜に集積する。その結果、プロテオグリカン(syndecan-4)のクラスター化が形成され、細胞内での PKC α のプロテオグリカンへの結合が生じ、シグナル伝達が生じる。最終的に、低分子量 G タンパク質の Rac 1 が活性化されることで、アクチン骨格の再構築による葉状仮足(ラメリポディア)、および、形質膜の波打ち構造形成によってマクロピノサイトーシスが生じ、細胞外分子を効率的に細胞内へ取り込むことができる³⁰⁾。筆者らの研究チームは、本膜透過性アルギニンペプチドをエクソソーム膜に結合させることで、エクソソームが標的の細胞にマクロピノサイトーシスを誘導させ、細胞内移行を促進させることが可能か検討を行った(図2)^{11,12)}。

まず、上述のステアシル基を N 末端に有する代表的な膜透過性アルギニンペプチドの1つであるオクタアルギニン(stearyl-R8)を合成し検討を行った。細胞内移行評価を行うために、エクソソームのマーカー膜タンパク質の CD63 テトラスパニンに緑色蛍光タンパク質が配列融合したタンパク質(CD63-GFP)を、エクソソームを分泌する母細胞に遺伝子工学で発現させることで、CD63-GFP 発現エクソソーム(CD63-GFP-Exo)を分泌させ、超遠心法で単離した。その単離 CD63-GFP-Exo に stearyl-R8 を混合することでエクソソーム膜上にペプチドを修飾させ、そのエクソソームの細胞内移行について詳細を検討した。結果として、stearyl-R8 を修飾することでエクソソームがスキャホールドとして、標的細胞の形質膜上で syndecan-4 のクラスター化を促進し、葉状仮足を伴うマクロピノサイトーシスを誘導させることでエクソソームの細胞内移行効率を顕

図3 アルギニンペプチド(R8)修飾エクソソームのHeLa細胞内移行観察 (共焦点レーザー顕微鏡、24 hr、10 μ g/mL)

著に上昇させることに成功した(図3)¹¹⁾。ペプチドのエクソソーム膜上に結合した量に応じて移行性が上昇し、本手法において細胞毒性はほとんど生じないことも確認した¹¹⁾。

次に本手法における、オリゴアルギニン配列のアルギニン残基数の違いによる、エクソソームの細胞内移行性への影響に関して検討した¹²⁾。膜透過性アルギニンペプチドにおいて、ペプチドによるプロテオグリカンのクラスター化、および、マクロピノサイトーシス誘導は、配列中のアルギニン残基数が影響を及ぼすことが示されている^{30,31)}。そこで、アルギニン残基数の異なるオリゴアルギニンを合成し、CD63-GFP-Exoの膜表面へ各ペプチドを結合させ、エクソソームの細胞内移行効率を検討した。本実験においては、上述の「(2) スクシンイミド基を有するリンカーをもったペプチドを用いる方法」にてエクソソーム膜にペプチドを結合させる手法を用いた。結果として、オリゴアルギニンを結合してもエクソソーム形態にほとんど影響を与えないこと、そして、R8、および、R12ペプチドを結合させたエクソソームが、他のペプチドと比較して細胞内移行効率が最も促進し、マクロピノサイトーシス阻害剤で顕著に移行量が低下するといった結果が得られた¹²⁾。本手法においても、各オリゴアルギニンを修飾したエクソソーム処理による細胞毒性はほとんど生じなかった。加えて、上述のとおりエクソソーム膜は負に帯電していることから、オリゴアルギニンを二価性リンカーでエクソソーム膜に共有結合させなくても静

電相互作用でオリゴアルギニンペプチドをくっつけて、マクロピノサイトーシス誘導で細胞内移行性が上昇するか検討した。結果として、二価性リンカーを用いずにオリゴアルギニンとエクソソームを単に混合させた場合においては、どのオリゴアルギニンをを用いてもエクソソームの細胞内移行効率が上昇することは認められなかった¹²⁾。よってエクソソーム膜上に、上述の手法を用いて機能性ペプチドを強く結合させることが、ペプチドの機能性を十分に発揮するために重要であることが示唆された。

次に、エクソソームを用いたサポリタンパク質の細胞内送達、および、生理活性について検討を行った。分子量が約3万のサポリンはリボソーム不活化タンパク質で、抗がん活性を有する³²⁾。その抗がん活性を誘導するためにはサポリンが細胞膜を通過し、サイトゾルへ移行する必要がある。そこで、エレクトロポレーションを用いてエクソソームにサポリンを内包し、細胞内に移行後にサポリンの抗がん活性を調べることで、エクソソーム、および、エンドソームからサイトゾルへの脱出効率について検討した。結果として、細胞内移行性が比較的低いR16ペプチドを結合したエクソソームの方が、移行性の高いR8、および、R12ペプチドを結合させた場合と比較して、サポリン内包エクソソームの抗がん活性が著しく高いことが明らかとなった¹²⁾。この結果は、R16ペプチドを結合させたエクソソームの方が、R8、および、R12ペプチドの場合と比較して細胞内移行性が低いものの、細胞内移行後のエクソソーム、および、エンドソームからの内包物サイトゾル放出効率が高いことを示唆し、機能性ペプチドを選択する場合において、細胞内移行効率のみならず、細胞内移行後の内包物放出効率も考慮したバランスのよいペプチドを選択しないといけないことを表している。本結果は、エクソソームに関わらず、あらゆる薬物送達におけるキャリアー選択において重要なポイントであり、評価方法も含めて最適化のための方法論を各場合において確立しなければならないと強く考える。

6. pH感受性膜融合ペプチドを用いた エクソソーム内包物放出促進技術

エンドサイトーシスの成熟によって、プロトンポンプによるエンドソーム内のpH低下がみられ、この細胞生理的機序を利用したエンドソームからのサイトゾル脱出技術の開発が進められている。通常、エンドサイトーシスで細胞内に薬物送達を行った場合、エンドソームが初期エンドソームから後期エンドソームへと成熟後にリソソームが融合することで、エンドソームの中身が各種酵素で分解されてしまう。したがって、リソソームで薬物が分解される前にサイトゾルへ脱出させなければいけない。筆者らはこれまで、pH感受性膜融合ペプチドである GALA ペプチドを用いたタンパク質の効率的なサイトゾル送達技術の開発を行ってきた^{33,34)}。GALA ペプチド(アミノ酸配列: WEAAALAEALAEALAEHLAEALAEALAEALAA)は、30残基のアミノ酸で構成されたウイルスの膜融合タンパク質を模倣した人工ペプチドで、pHが中性の場合は二次構造をほとんどとらないが、pHが低下することでヘリックス含有量が上昇し、膜に挿入されやすくなることで膜の不安定化、および、融合を促進することが知られている³³⁻³⁵⁾。この GALA ペプチドは、アミノ酸配列をみてわかるとおりグルタミン酸残基に富み、負に帯電している。一方で、上述のように細胞形質膜も負に帯電しているので、GALA ペプチド単独での細胞内移行性は著しく低い^{33,34,36)}。そこで、カチオン性脂質を“糊”として利用することで、脂質と GALA と複合体を形成させ、GALA ペプチドの細胞内移行性が有意に上昇することを筆者らは見出している^{33,34)}。さらに、GALA ペプチドにサイトゾルに運びたいタンパク質や量子ドット等の分子を結合させ、カチオン性脂質と複合体を形成させることで、エンドサイトーシスで細胞内へ取り込ませる。その結果、エンドソーム内pH低下による GALA ペプチドを介した膜融合促進によって、GALA ペプチドに結合させた目的分子が、効果的にサイトゾルへ放出されることを確認している^{33,34)}。

筆者らは、この GALA ペプチドを用いたサイト

ゾル送達技術をエクソソームへ応用した(図4)。上述のとおり、エクソソーム膜は負に帯電しているので、GALA ペプチドとカチオン性脂質の混合液に、さらにエクソソームを加えることで、複合体が形成することを確認した³⁶⁾。本複合体を細胞に処理した結果、エクソソームと共に GALA ペプチドが細胞内へ移行することを、蛍光を用いた可視化実験で確認した³⁶⁾。本技術で注意しないといけないことは、カチオン性脂質は量を多く使用すると細胞毒性が生じることが知られており、本実験では細胞毒性が出ない脂質濃度である2%(v/v)での条件で検討を行っている。カチオン性脂質がない場合は、エクソソームが細胞内に取り込まれても、GALA はほとんど取り込まれないため、脂質を用いた複合体形成が重要である。70 kDa の蛍光標識デキストランをエクソソームにエレクトロポレーションを用いて内包させた後、GALA ペプチドとカチオン性脂質で複合体を形成させて細胞に取り込ませた結果、デキストランのサイトゾル脱出を確認できた³⁶⁾。塩化アンモニウムを用いてエンドソーム内のpH低下を抑制すると、GALA ペプチドのサイトゾル脱出効果が著しく低下することから、エンドソームの成熟がペプチド機能の発揮に大切であることを示し、また、GALA ペプチドの濃度の違いによって、複合体形成に影響を及ぼし、サイトゾル脱出効率に変化することから、複合体形成における濃度調整の最適

図4 GALA ペプチドを用いたエクソソーム内包物の高効率なサイトゾル放出

化を行うことが重要である。さらに、上述同様にサポリタンパク質を内包したエクソソームを用いて抗がん活性に関する検討を行った。エレクトロポレーションを用いてエクソソームにサポリンを内包し、GALA とカチオン性脂質で複合体を形成させ細胞内に移行させる。移行後にサポリンの抗がん活性を調べることで、エクソソーム、および、エンドソームからサイトゾルへの脱出効率について検討した結果、GALA ペプチドとの複合体を形成させることで、サポリン内包エクソソームの抗がん活性が顕著に上昇することが確認された³⁶⁾。本手法は、エクソソームと混合するだけで簡便にエクソソームの内包分子のサイトゾル放出を促進させることができる画期的な手法であり、今後、microRNA を含めたさまざまな薬物内包エクソソームに応用可能であることが大きく期待できる。

7. エクソソームの凍結乾燥

エクソソームを薬剤として用いる場合、その保存法を確立することは大切である。一般的にエクソソームを冷蔵で保存した場合は長くても1~2週間程度、冷凍の場合は数カ月間保存できることが知られている。しかし、凍結融解を繰り返すことでエクソソーム形態に大きく影響を与えることも知られている。現在、エクソソームに凍結乾燥を施すことで、長期的な保存が可能か調べる研究が進められている³⁷⁻³⁹⁾。筆者らも上述の膜透過性アルギニンペプチド修飾型エクソソームの凍結乾燥について検討した結果を最近報告した⁴⁰⁾。実験としては、R16ペプチドを結合したエクソソームについて凍結乾燥した後、水を加えて元に戻すといった手法を用いた。電子顕微鏡でのエクソソーム形態の確認や、細胞内移行性の評価を行った結果、R16ペプチド修飾型エクソソームは、凍結乾燥によってほとんど影響を受けないといった知見が得られた⁴⁰⁾。一方で、上述と同様にサポリンを内包したエクソソームに関してR16ペプチドを結合させたエクソソームを用いて検討を行った結果、凍結乾燥によって抗がん活性が顕著に低下することが確認された⁴⁰⁾。エクソソームに内包していないサポリン単体をそのまま凍結乾燥

した場合は、凍結乾燥後においてもサポリンの抗がん活性はほとんど影響を受けない⁴⁰⁾。したがって、凍結乾燥後のエクソソームに関して、細胞内移行後の内包サポリンのサイトゾル放出効率が何らかの理由で低下している可能性が示唆される⁴⁰⁾。詳細な機序は未だに不明であり、サポリン以外の生理活性分子にもあてはまるか今後さらなる検討が必要であるが、凍結乾燥によるエクソソーム内包物の放出効率を維持できる最適な保存方法のさらなる構築も含めて、研究を進展させたいと考える。

8. おわりに

本総説において、エクソソームの基礎から細胞内移行におけるマクロピノサイトシスの重要性和、機能性ペプチドを用いた本経路の促進誘導技術、pH感受性膜融合ペプチドを用いたエクソソーム内包物のサイトゾル放出増強技術、および、ペプチド修飾型エクソソームの凍結乾燥の影響についてまとめさせていただいた。エクソソームは分泌する細胞種や培養環境、単離方法等によってタンパク質発現量や形態、細胞内移行性等のエクソソームの性質に影響を与えることが知られており、それぞれの研究目的や実験条件において手法の最適化を行わなければならないといった実験的に難しい点が存在する。しかし、人工的に創製できない機能性エクソソームを将来薬剤として活用することは大きく期待されており、機能性ペプチドを用いた本技術・知見が基盤技術として薬物送達研究を含めて貢献できることを願う。また今後の研究展開においても、多岐化が進むエクソソーム研究をサポートできる技術を一層構築したいと強く考える。本総説が細胞分泌小胞の基礎、および、これらを基盤とした薬物送達技術の開発研究の理解に少しでも役立つことを願ってやまない。

文献

- 1) Raposo G., *et al.*, *J. Cell Biol.*, **200**, 373-383 (2013)
- 2) Tan A., *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **65**, 357-367 (2013)
- 3) Yáñez-Mó M., *et al.*, *J. Extracell. Vesicles*, **4**, 27066 (2015)
- 4) Yamamoto T., *et al.*, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **20**, 746-757 (2019)
- 5) Tominaga N., *et al.*, *Nat. Commun.*, **6**, 6716 (2015)
- 6) Yokoi A., *et al.*, *Nat. Commun.*, **8**, 14470 (2017)
- 7) Properzi F., *et al.*, *Biomark. Med.*, **7**, 769-778 (2013)
- 8) Jiang L., *et al.*, *Mol. Pharm.*, **16**, 3333-3349 (2019)
- 9) Alvarez-Erviti L., *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 341-345 (2011)
- 10) Nakase I., *et al.*, *Sci. Rep.*, **5**, 10300 (2015)
- 11) Nakase I., *et al.*, *Sci. Rep.*, **6**, 34937 (2016)
- 12) Nakase I., *et al.*, *Sci. Rep.*, **7**, 1991 (2017)
- 13) Nakase I., *et al.*, *Chem. Commun.*, **53**, 317-320 (2017)
- 14) Conner S.D., Schmid S.L., *Nature*, **422**, 37-44 (2003)
- 15) Swanson J.A., Watts C., *Trends Cell Biol.*, **5**, 424-428 (1995)
- 16) Swanson J.A., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 639-649 (2008)
- 17) Araki N., *et al.*, *Cell Struct. Funct.*, **31**, 145-157 (2006)
- 18) Dise R.S., *et al.*, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **294**, G276-285 (2008)
- 19) Nakase I., *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **51**, 7464-7467 (2012)
- 20) Tanaka G., *et al.*, *Chem. Biol.*, **19**, 1437-1446 (2012)
- 21) Comisso C., *et al.*, *Nature*, **497**, 633-637 (2013)
- 22) Morelli A.E., *et al.*, *Blood*, **104**, 3257-3266 (2004)
- 23) Théry C., *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 581-593 (2009)
- 24) Tian T., *et al.*, *J. Cell Biochem.*, **111**, 488-496 (2010)
- 25) Svensson K.J., *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **288**, 17713-17724 (2013)
- 26) Melo S.A., *et al.*, *Nature*, **523**, 177-182 (2015)
- 27) Kamberkar S., *et al.*, *Nature*, **546**, 498-503 (2017)
- 28) Takenaka T., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **572**, 118762 (2019)
- 29) Takenaka T., *et al.*, *Anticancer Res.*, **37**, 4779-4788 (2017)
- 30) Futaki S., Nakase I., *Acc. Chem. Res.*, **50**, 2449-2456 (2017)
- 31) Nakase I., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **446**, 857-862 (2014)
- 32) Fabbri M.S., *et al.*, *Toxins*, **9** (2017)
- 33) Kobayashi S., *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **20**, 953-959 (2009)
- 34) Nakase I., *et al.*, *Methods Mol. Biol.*, **683**, 525-533 (2011)
- 35) Subbarao N.K., *et al.*, *Biochemistry*, **26**, 2964-2972 (1987)
- 36) Nakase I., Futaki S., *Sci. Rep.*, **5**, 10112 (2015)
- 37) Akers J.C., *et al.*, *Cancer Biomark.*, **17**, 125-132 (2016)
- 38) Charoenviriyakul C., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, **553**, 1-7 (2018)
- 39) Frank J., *et al.*, *Sci. Rep.*, **8**, 12377 (2018)
- 40) Noguchi K., *et al.*, *Anticancer Res.*, in press