

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「細胞外微粒子に起因する生命現象の解
明とその制御に向けた基盤技術の創出」
研究課題「細胞外微粒子の細胞内運命の解析と制
御」

研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者: 二木 史朗
(京都大学 化学研究所 教授)

§1 研究実施の概要

(1)実施概要

マクロピノサイトーシスは細胞外微粒子の細胞内取込の中心的経路の一つである。本研究では、新しい細胞環境検出系を用いて種々の細胞外微粒子の細胞への移行様式を明らかにしつつ、効果的な細胞内送達系を樹立することを目指し、検討を進めた。具体的には

- ・細胞外微粒子の細胞内移行ゲートとしてのマクロピノサイトーシスの理解の深化
- ・内因性微粒子を介した細胞間情報伝搬経路としてのマクロピノサイトーシスの理解
- ・微粒子の細胞内(サイトゾル)への送達設計指針の樹立
- ・マクロピノソーム内やサイトゾル内の環境変化を計測する多元同時センサー系の樹立
- ・マクロファージにおける微粒子の取込機構解析と選択的送達系開発

の5項目に関して、特に細胞内送達の解析と制御を中心に据える形で研究を進めた。

主たる成果として、研究代表者二木は、マクロピノサイトーシスによる細胞内微粒子送達ペプチドの高活性化を図り、細胞内送達ペプチド HAad あるいは SN21-LK15 関連ペプチドの開発により、研究開始時の 1/10~1/20 のペプチド/抗体濃度で同等の送達能を達成した(HAad: 日米特許取得)。さらに送達ペプチドの多量体と抗体により形成される液滴・コアセルベートを介して抗体を細胞内に高速注入する画期的な送達概念を見出した (*Angew. Chem. Int. Ed.*誌 Top5% の評価・表紙に採用)。抗体(IgG)を含む液滴を形成後、脂質ナノ粒子(LNP)形成を行う事で、細胞内に抗体を効果的に送達可能な LNP が形成できることも見出した。研究分担者中瀬と協働し、インクジェットシステムを用いることで、L17E 存在下に抗体を短時間で HeLa 細胞内に導入が可能であることを示した(プレスリリース)。研究分担者森井と協働し、マクロピノソーム内やサイトゾル内の環境変化を計測する pH センサー-endoscope ならびに pH/カテプシン活性の多元同時センサー-macropinoscope を開発した。内因性微粒子(エクソソーム、マイクロベシクル)のエンドサイトーシスによる細胞内への取り込みと内包物放出の定量評価系を樹立し、送達におけるマイクロベシクルの優位性を提起するとともに、マクロピノサイトーシスの活性化による取込促進系を開発(中瀬とも協働)した。研究分担者江口は肝細胞由来微粒子が遠隔臓器に伝播され障害を誘発することを明らかにするとともに、微粒子の細胞への取り込みにマクロピノサイトーシスも関与することを示した。研究分担者新留は微粒子の細胞内取込にマクロピノサイトーシスを含む種々の様式が関与することを示すとともに、PLGA ナノ粒子による肝マクロファージへの選択的送達系を開発した。細胞外微粒子の細胞内移行ゲートの理解の過程で、研究代表者二木は生理的なマクロピノサイトーシス制御における Ca^{2+} の重要性を示す一方、機械受容チャネル Piezo1 アゴニスト Yoda1 が EGF 刺激によって誘導されるアクチン重合とマクロピノサイトーシス誘導を阻害するとともに、がん細胞の増殖阻害活性を有することも見出した。さらに、直径 3 μm のポリスチレンビーズが非貪食系の HeLa 細胞に細胞膜突起に絡みとられつつ細胞内に取り込まれる新規様式を見出した。

以上により、当初挙げた研究項目「微粒子の細胞内(サイトゾル)への送達設計指針の樹立」に関しては格段の成果が見られ、またその他の項目においても当初目標のほとんどを達成した。また、本報告書提出時点で総論文数 115 報、申請特許 15 件、招待講演 97 件など多くの成果を挙げることが出来た。また 18 件の報道・プレスリリースにて研究成果の一般市民への発信を行った。

CREST「細胞外微粒子」では領域目標として(1)細胞外微粒子の検出・分離・解析技術の高度化; (2)細胞外微粒子を介した生体応答機序の解明; (3)細胞外微粒子の体内動態制御に向けた展開を挙げている。上記の研究成果は、細胞外微粒子の細胞内移行の解析と制御という観点から、これらの目標の全てに貢献するものであるが、特に微粒子細胞内送達法の開発に関連する領域研究目標(3)の達成において、世界第一線の成果を挙げることが出来たのではないかと考えている。また、研究遂行において、領域内外の多くの研究者との新たな連携が生まれたことや若手育成にも貢献できたことも付記したい。

(2)顕著な成果

＜優れた基礎研究としての成果＞

1. 細胞外微粒子の細胞内移行様式の検証

EGF 誘導型マクロピノサイトーシスにおけるカルシウムイオンの重要性を指摘した。一方では直径 3 μm のポリスチレンビーズが非食食系の HeLa 細胞に細胞膜突起に絡みとられつつ細胞内に取り込まれるファゴサイトーシス・マクロピノサイトーシスとはことなる新規様式を見出した。また、細胞外小胞の細胞内取込と標的細胞への融合の定量系を開発し、エクソソームに較べてマイクロベシクルの送達能が高い可能性を提唱した。細胞外小胞取り込みへのマクロピノサイトーシスの関与を確認した。

2. 新規マクロピノソーム内 pH/カテプシン活性センサー“Macropinoscope”の開発

マクロピノソーム特異的マーカー 70 kDa デキストランへのフルオレセイン／オレゴングリーン／ローダミン配備による広範な pH レシオ感知、蛍光団 sulfo-Cy5 と消光団 BHQ-3 配備による OFF→ON 型カテプシン B 活性の感知を同時に行える新規センサー Macropinoscope を開発し、単一マクロピノソーム内の pH 低下とカテプシン B 活性の上昇を細胞内での局在と関連付けて検出した。

3. マクロピノサイトーシス誘導ペプチド SN21 と短鎖高活性類縁体 oxP4A の創出

マクロピノサイトーシスを強力に誘導するペプチド SN21 やその短鎖高活性類縁体 oxP4A を開発し、タンパク質・抗体や細胞外小胞などの機能性分子・微粒子の細胞内送達と細胞活性調節への有用性を示した。さらに、SN21 類縁体のマクロピノサイトーシス誘起にはペプチド、培地中のシステイン、細胞表面のチオール間の S-S 交換が重要であることを示した。SN21-LK15 はコスモバイオ(株)から細胞導入用試薬として市販化された。

＜科学技術イノベーションに大きく寄与する成果＞

1. 液滴を介した抗体の細胞内への高速流入

細胞内抗体送達ペプチド L17E の 3 量体と負電荷を付与した抗体との混合により液滴(コアセルベート)が生じ、これが細胞膜と接触して取り込まれながら、液滴の崩壊による抗体の細胞内への流入と細胞全体への分布(1 分程度で完了)が起こることを発見した。さらに、高分子多糖プルランと L17E とのコンジュゲートによっても効果的な抗体の細胞内送達が可能であり、液滴(コアセルベート)を用いた細胞内送達概念の一般性や拡張性を示した。

2. 細胞への抗体導入のための新規アプローチの開発

in vivo 適用を考える際、脂質ナノ粒子(LNP)も抗体(IgG)の細胞内導入に大きな可能性を有する送達手段である。IgG を含む液滴を形成後に LNP 化することで、細胞内に抗体を効果的に送達可能な IgG 含有 LNP が形成できることを見出した。また、インクジェットシステムと膜透過性ペプチドの組み合わせで、細胞膜に穴を開けることなく狙った細胞へ超微量の抗体導入が可能であることを確認した。

3. 細胞内送達ペプチド HAad およびその誘導体の開発

マクロピノサイトーシスにより細胞内移行を促進する微粒子送達ペプチド HAad を開発するとともに高活性化を図り、研究開始時の 1/10～1/20 の送達ペプチド・抗体濃度で同等の送達活性を達成可能とした。さらに、HAad にピレンブチル酸などの疎水性基を導入することにより有意に送達効率が向上することを確認した。

＜代表的な論文＞

1. 液滴を介した抗体の細胞内への高速注入

Iwata, T., Hirose, H., Sakamoto, K., Hirai, Y., Arafles, J.V.V., Akishiba, M., Imanishi, M., Futaki, S. Liquid droplet formation and facile cytosolic translocation of IgG in the presence of attenuated cationic amphiphilic lytic peptides. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 19804-19812.

2. 高活性マクロピノサイトーシス誘導ペプチド oxP4A

Arafiles, J.V.V., Hirose, H., Hirai, Y., Kuriyama, M., Sakyamah, M.M., Nomura, W., Sonomura, K., Imanishi, M., Otaka, A., Tamamura, H., Futaki, S. Discovery of a macropinocytosis-inducing peptide potentiated by medium-mediated intramolecular disulfide formation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, 60, 11928-11936.

3. マクロピノサイトーシス内環境(pH/カテプシン B 活性)時空間センサー “Macropinoscope”

Hirose, H., Nakata, E., Zhang, Z., Shibano, Y., Maekawa, M., Morii, T., Futaki S. Macropinoscope: Real-time simultaneous tracking of pH and cathepsin B activity in individual macropinosomes. *Anal. Chem.* **2023**, 95, 11410-11419.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

グループ名	研究代表者または 主たる共同研究者氏名	所属機関・部署・役職名	研究題目
二木グループ	二木 史朗	京都大学・化学研究所・教授	マクロピノサイトーシスの理解と活用
森井グループ	森井 孝	京都大学・エネルギー理工学研究所・教授	細胞内環境測定多元同時センサーの開発
新留グループ	新留 琢郎	熊本大学・大学院先端科学研究部・教授	マクロファージ選択的微粒子送達系開発
*中瀬グループ(2022 年度から参画)	中瀬 生彦	大阪公立大学・大学院理学研究科・教授	微粒子の細胞内(サイトゾル)への送達設計指針の樹立
*江口グループ(2022 年度から参画)	江口 暁子	三重大学・大学院医学系研究科・特任准教授 (2023 年 4 月より三重大学付属病院准教授)	内因性微粒子を介した細胞間情報伝搬経路としてのマクロピノサイトーシスの理解

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・[微粒子]さきがけ井田大貴研究者(名古屋大学工学研究科講師)・名古屋大学工学研究科高橋康史教授: 走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)を用いたマクロピノサイトーシス時の細胞膜形態変化のリアルタイム観察(*Anal. Chem.* **2021**, 93, 5383); 走査型イオン伝導顕微鏡(SICM)を用いた 3 μm ポリスチレンビーズの細胞内移行観察(*Biomater. Sci.* **2022**, 10, 7093)
- ・静岡県立大学薬学部 浅井知浩教授: 脂質ナノ粒子を用いたタンパク質の細胞内送達(*Sci. Rep.* **2021**, 11, 19896)
- ・静岡県立大学薬学部 原雄二教授: Piezo1 からのカルシウムイオン流入によるマクロピノサイトーシス制御 (*Sci. Rep.* **2022**, 12, 6322)
- ・筑波大学生命科学動物資源センター 杉山文博教授: HAad を用いたタンパク質の in vivo 送達評価 (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, 59, 19990; *Bioorg. Med. Chem.* **2022**, 61, 116728)
- ・鳥取大学工学研究科 松浦和則教授: HAad 修飾人工ウイルスカプシドを用いたナノボディの細胞内送達(*Bioconjug. Chem.* **2022**, 33, 311)
- ・北海道大学 人獣共通感染症リサーチセンター 澤洋文教授: 細胞外小胞の移行および融合率の定量実験系の構築(*Bioconjug. Chem.* **2022**, 33, 1852)
- ・エトヴェシュ・ローランド大学(ハンガリー) Zoltan Bánóczy 博士/ソルボンヌ大学-CNRS(フランス) Sandrine Sagan 博士: アルギニンペプチドの修飾による細胞内取込促進 (*Amino Acids*, **2021**, 53, 1033)
- ・ミラノ大学(イタリア) Francesca Granucci 教授: 細胞内イノシトール四リン酸センサー動態のリアルタイムセンシング(*Sci. Signal.* **2021**, 14, eaaz2120)

- ・京都大学大学院工学研究科 森泰生教授: 蛍光 NO センサーの開発(*Bioorg. Med. Chem.* **2020**, 28, 115430)
- ・慶應義塾大学 寺川光洋教授: 金・銀ナノ粒子を使ったセンシング技術(*Optics Express* **2019**, 27, 14657; *Plasmonics* **2023**, 18, 751)
- ・全南大学校 (韓国) Gibok Lee 博士: ナノ粒子を使った診断と治療に関する研究 (*Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, 8, 133; *J. Controlled Release* **2021**, 330, 1)
- ・千葉大学 八尋錦之介教授: 細菌毒素を使った薬物送達システム (*Chem. Pharm. Bull.* **2020**, 68, 363; *Nanomaterials*, **2022**, 12, 2161; *ACS Appl. Bio Mater.* **2023**, 6, 3387)
- ・北九州市立大学 櫻井和朗教授: ナノ粒子を使った薬物送達システム (*Biomaterials* **2021**, 269, 120631)
- ・大阪公立大学理学研究科 飯田琢也教授: 光濃縮技術を用いた機能性ペプチドの標的細胞へのサイトゾル導入技術・細胞外小胞の検出系構築 (*Nano Lett.* **2022**, 22, 9805; *Nanoscale Horiz.* **2023**, 8, 1034)
- ・大阪公立大学獣医学研究科 西田英高准教授: ハイドロゲルを用いた間葉系幹細胞由来細胞外小胞の人工的放出制御 (*Regen. Ther.* **2022**, 22, 1)
- ・大阪大学微生物病研究所 吉岡靖雄教授: 樹状細胞標的ペプチドの開発と新しいワクチン技術への展開 (*iScience* **2022**, 25, 105324)