

称号及び氏名 博士(理学) 野口 公輔

学位授与の日付 令和2年3月31日

論文名 膜透過性ペプチド修飾によるエクソソームの細胞内移行促進技術  
の開発

論文審査委員 主査 中瀬 生彦  
副査 藤井 郁雄  
副査 佐藤 孝哉  
副査 木下 誉富

## 学位論文要旨

「膜透過性ペプチド修飾によるエクソソームの細胞内移行促進技術の開発」

理学系研究科 生物科学専攻 細胞機能制御化学研究室

博士後期課程 3年 野口 公輔

### 1. 序論

エクソソーム (exosomes, extracellular vesicles, EVs) は直径約 30-200 nm の脂質二重膜で構成された小胞で、microRNA や酵素などの様々な機能性分子を内包し、生体を構成する殆ど全ての細胞から分泌される。そして、その内包した分子を細胞間で送達することで、情報伝達、及び、細胞機能制御に関与していることが知られている。近年、エクソソームと病態との関連性やエクソソーム由来の疾患マーカーの探索等、疾患進展解明や診断技術開発のための研究が精力的に行われている。一方で、エクソソームは、細胞毒性が無く、機能性分子の人工的な内包や修飾が可能、下記の免疫制御が可能等、薬学的な観点からの高い優位性を有することから、次世代の薬物送達ツールとして大きく期待されている。さらにエクソソームは、私たちの体液（血液や尿、唾液等）に大量に含まれていることから、免疫原性の課題を克服するために患者自身の体液から単離したエクソソームに患者が必要とする薬物や機能性分子を内包、或いは、修飾した後、患者に戻す「テーラーメイド治療」を将来的に実現できる可能性も有する (図 1)。しかし、エクソソームを薬物送達ツールとして利用する上で、薬物送達の観点からの細胞内への移行性が低いことが大きな問題となっている。一方で、著者の所属研究室の先行研究において、上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化や Ras 変異体の発現によってマクロピノサイトーシスが誘導されるシグナルが生じ、マクロピノサイトーシスの特徴であるアクチン依存的な葉状仮足 (ラメリポディア) が形成されることによって、直径が約 30-200 nm のエクソソームが効率的に細胞内に移行することを発見した[1]。

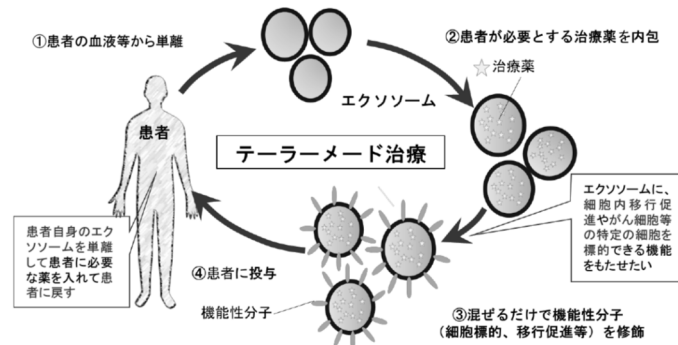


図1. エクソソームを基盤としたテーラーメイド治療

から、次世代の薬物送達ツールとして大きく期待されている。さらにエクソソームは、私たちの体液（血液や尿、唾液等）に大量に含まれていることから、免疫原性の課題を克服するために患者自身の体液から単離したエクソソームに患者が必要とする薬物や機能性分子を内包、或いは、修飾した後、患者に戻す「テーラーメイド治療」を将来的に実現できる可能性も有する (図 1)。しかし、エクソソームを薬物送達ツールとして利用する上で、薬物送達の観点からの細胞内への移行性が低いことが大きな問題となっている。一方で、著者の所属研究室の先行研究において、上皮成長因子受容体 (EGFR) の活性化や Ras 変異体の発現によってマクロピノサイトーシスが誘導されるシグナルが生じ、マクロピノサイトーシスの特徴であるアクチン依存的な葉状仮足 (ラメリポディア) が形成されることによって、直径が約 30-200 nm のエクソソームが効率的に細胞内に移行することを発見した[1]。

本研究では、プロテオグリカンのクラスター化を介してマクロピノサイトーシスを誘導する機能性ペプチドをエクソソーム膜に化学的に修飾する方法の開発、及び、そのペプチド修飾によってエクソソーム自体に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を促進させる技術開発研究を展開（第1章、第3章）した。さらに、修飾するペプチド配列におけるアルギニン残基数や二量体化がエクソソームの細胞内移行性やマクロピノサイトーシスの誘導効率に与える影響について明らかとし（第1章、第3章）、加えて、製剤化の観点から医薬品の保存性向上に用いられる凍結乾燥が、アルギニンペプチド修飾型エクソソームの機能に与える影響についても検討（第2章）を行った。

## 2. 実験方法と結果、及び、考察

### 2.1. 第1章：アルギニンペプチド修飾型エクソソームを基盤にした薬物送達技術の開発

ヒト免疫不全ウイルス HIV-1 Tat タンパク質由来の Tat (48-60) やオリゴアルギニン(Rn) に代表されるアルギニンペプチドは、形質膜上のシンデカン-4等のプロテオグリカンのクラスター化を生じ、PKC $\alpha$  のリン酸化シグナルを介したマクロピノサイトーシスを誘導することが知られている[2]。そこで、Rn (n = 4, 8, 12, 16) を二価性リンカーである *N*- $\epsilon$ -maleimidocaproyl-oxysulfosuccinimide ester (sulfo-EMCS) を介してエクソソーム膜に簡便に化学修飾し、その細胞内移行効率について、フローサイトメトリー (FACS) や共焦点レーザー顕微鏡を用いて

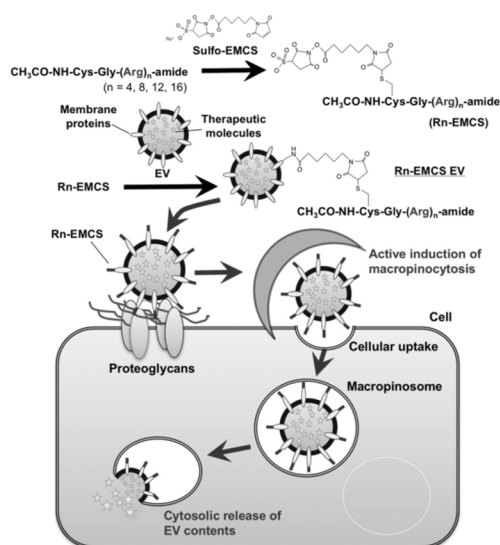


図2. オリゴアルギニンを修飾したエクソソームのマクロピノサイトーシス誘導と効率的な細胞内取り込み

検討を行った（図2）。その結果、チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO-K1) 細胞に対して、EMCS-R8 (20  $\mu$ M) を修飾した場合に約 29 倍、EMCS-R16 (10  $\mu$ M) を修飾した場合に約 18 倍、エクソソームの細胞内移行効率を上昇させることに成功したことに加え、修飾するペプチド配列中のアルギニン残基数の違いがエクソソームの細胞内移行効率に影響を与えることを明らかにした。そして、マクロピノサイトーシス阻害剤である 5-(*N*-Ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA) 存在下に

における、ペプチドを修飾したエクソソームの細胞内移行性の低下や、ローダミンファロイジンにより染色されたアクチン重合体を、共焦点レーザー顕微鏡観察を行った結果、ペプチド修飾型エクソソームで処理した細胞においてラメリポディアの形成誘導が確認されたことから、そのエクソソームの細胞内移行促進

において、マクロピノサイトーシスが寄与していることを明らかとした。さらに、分子量約 30,000 のリボソーム不活化タンパク質として知られるサポリンをエレクトロポレーションにより内包したエクソソームを作製し、ペプチド修飾した時のサポリン内包エクソソームの生理活性を WST-1 assay により検討した結果、EMCS-R16 (10  $\mu$ M) を修飾した際に、サポリンが効果的にサイトゾルへと送達され、最も顕著に細胞死（細胞生存率：約 20%）を誘導することを明らかとした [3]。

## 2.2. 第 2 章：凍結乾燥がアルギニンペプチド修飾型エクソソームの機能に与える影響評価

第一章において、膜透過性アルギニンペプチド修飾型エクソソームの開発に成功したが、エクソソームの保存性の向上が、エクソソームの製剤化において重要な課題となっている。さらに、エクソソームの性質は細胞の状態や細胞の周辺環境、患者の体液由来のエクソソームにおいては患者の健康状態によって変化することが考えられるため、同じ時期に単離したエクソソームを治療に用いることが望ましいと考えられる。そこで、医薬品の保存性向上のために多く用いられている凍結乾燥技術が、アルギニンペプチド修飾型エクソソームの細胞内移行や内包薬物のサイトゾル送達能に与える影響について検討を行った。その結果、R16 修飾型エクソソームの細胞内移行については、凍結乾燥の影響はほとんど認められず、凍結乾燥前と同様にその細胞内移行において糖鎖が寄与していることも確認された。しかし、凍結乾燥を行った EMCS-R16 を修飾したサポリン内包エクソソームの生理活性を検討した結果、上記、凍結乾燥をしていない場合[3]と異なり、顕著な細胞死を誘導することはない、凍結乾燥が EMCS-R16 修飾型エクソソームの内包薬物の活性に影響を与えることを示唆する結果が得られた。一方で、エクソソームに内包していない場合、サポリンの凍結乾燥による生理活性への影響は認められなかった（図 3）。エクソソームに内包されたサポリンの細胞死誘導活性の低下の原因として、サポリンのサイトゾル送達効率の低下、水和時におけるエクソソーム内包分子によるサポリンのリフォールディング阻害、エクソソーム内でのサポリンの凝集など

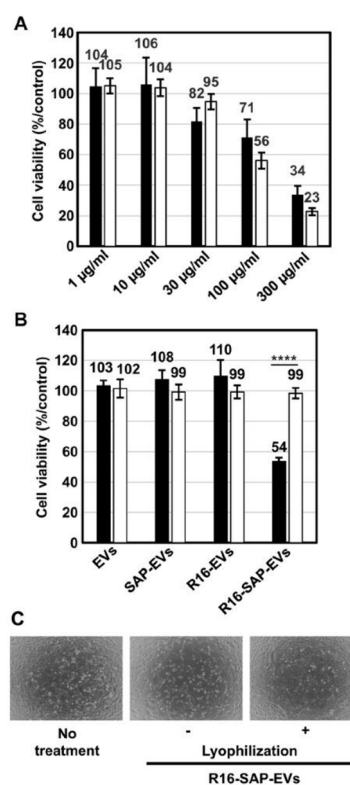


図3. 凍結乾燥による活性影響. (A) サポリンの細胞毒性（凍結乾燥前：黒、凍結乾燥後：白）. (B) エクソソーム内包サポリンの細胞毒性（凍結乾燥前：黒、凍結乾燥後：白）（CHO-K1細胞、48時間）. (C) 顕微鏡観察.

が理由として推測される。凍結乾燥によるエクソソーム内包薬物活性低下機序については不明な点が残るが、本研究成果は、R16 修飾型エクソソームを用いた細胞内薬物送達における重要な薬剤学的知見であると考えられる[4]。

### 2.3. 第 3 章：細胞膜透過性ペプチド sC18 の細胞内移行機序の解明とエクソソームを基盤とした薬物送達技術への応用

sC18 ペプチドは抗菌タンパク質 CAP18 の C 末端に由来する塩基性を豊富に含む配列を持ち、細胞膜透過性を示すことが知られている。さらに sC18 を二量体型にした(sC18)<sub>2</sub> は、特に乳がん細胞に対して高い細胞内移行性を示すことが明らかとされている[5]。しかし、その詳細な細胞内移行機序に関しては不明であった。そこで本研究では、sC18 と同様に塩基性アミノ酸に富む細胞膜透過性ペプチドによって誘導されるマクロピノサイトーシス[2]に焦点を当て、sC18、及び、(sC18)<sub>2</sub> の細胞内移行におけるマクロピノサイトーシスの寄与について検討を行った。ヒト乳がん細胞 (MCF-7) に対して、sC18、及び、(sC18)<sub>2</sub> を用いた刺激時のマクロピノサイトーシスマーカー (FITC-Dextran (分子量: 70,000)) の取込みを FACS で解析した結果、(sC18)<sub>2</sub> (5 μM) での細胞刺激が、sC18 (50 μM) で刺激した場合と比較して、マクロピノサイトーシスマーカーが優位に細胞内へ移行することを明らかとした。また、EIPA 存在下において、(sC18)<sub>2</sub> の細胞内移行が顕著に阻害されることも示された。さらに、CHO-K1 細胞 (野生株) と CHO-A745 (糖鎖欠失株) に対する EIPA 存在下での sC18、及び、(sC18)<sub>2</sub> の細胞内移行を検討した結果、(sC18)<sub>2</sub> の細胞内移行、及び、マクロピノサイトーシス誘導に形質膜上の糖鎖が重要な役割を果たすことが明らかとなった。

マクロピノサイトーシスの誘導は第 1 章で述べたように、エクソソームの細胞内移行において重要である[1]。第 1 章にて、エクソソームの細胞内移行性を改善する技術開発に成功したが、より低濃度のペプチド修飾で効率的に細胞内移行を促進させる技術や、分子標的技術について、更なる改善が必要であると考える。そこで、著者の所属研究室で開発されてステアシル基を介してエクソソーム膜にペプチドを修飾する方法[6]を用いて、合成した N 末端をステアシル化した stearyl-sC18、及び、stearyl-(sC18)<sub>2</sub> とエクソソームを混合することで簡便に、sC18、或いは、(sC18)<sub>2</sub> 修飾型エクソソームを作製した。そして、その細胞内移行を FACS と共焦点レーザー顕微鏡にて検討した結果、ペプチドを修飾することで、MCF-7 細胞に対するエクソソームの細胞内移行は促進され、特に stearyl-(sC18)<sub>2</sub> を修飾した場合に、顕著に高い細胞内移行性を示すことが明らかとなった。さらにマクロピノサイトーシス阻害剤 (EIPA) によって、それらペプチド修飾型エクソソームの細胞内移行が阻害されたことから、細胞内移行の促進においてマクロピノサイトーシスが顕著に寄与していることが示された。最後にサ

ポリリン内包エクソソームを用いて、それらのペプチド修飾がサポリンのサイトゾル送達に与える影響についても検討を行った。その結果、stearyl-(sC18)<sub>2</sub> を修飾することで、効率的にサポリンがサイトゾルへ送達され、サポリンの細胞死誘導活性が発揮されることが示された。

### 3. 結論

本研究によって、マクロピノサイトーシスを誘導する機能性ペプチドをエクソソーム膜に簡便に化学修飾することで、エクソソームがスキャフォールドとなってペプチドの膜タンパク質標的（例えばオリゴアルギニンの場合は syndecan-4 等）とクラスター化を生じ、結果として効率的なマクロピノサイトーシス誘導による高効率なエクソソームの細胞内移行を達成するに至った。がん細胞には、マクロピノサイトーシスを誘導する高発現受容体として、例えば上記の EGFR やケモカイン受容体である CXCR4 等が知られており、本技術を基盤とした効果的なエクソソーム内包薬剤のがん細胞への送達技術構築へ応用できることが考えられる。一方で、凍結乾燥によるエクソソーム内包薬剤の活性低下も本研究によって明らかとなり、今後、エクソソーム製剤の保存技術のさらなる開発が必要不可欠である。

### 参考文献

[1] Nakase, I., *et al. Scientific Reports* **5**, 10300 (2015), [2] Futaki, S., and Nakase, I., *Accounts of Chemical Research* **50**, 2449-2456 (2017), [3] Nakase, I., **Noguchi, K.**, *et al. Scientific Reports* **7**, 1991 (2017), [4] **Noguchi, K.**, *et al. Anticancer Research* **39**, 6701-6709 (2019), [5] Gronewold, A., *et al. ChemMedChem* **12**, 712 (2017), [6] Nakase, I., **Noguchi, K.**, *et al., Scientific Reports* **6**, 34937 (2016)

### 4. 論文目録

本学位論文内容は、下記の発表論文による。

1. Nakase, I.\*, **Noguchi, K.**, Fujii, I., and Futaki, S. Vectorization of biomacromolecules into cells using extracellular vesicles with enhanced internalization induced by macropinocytosis. *Scientific Reports* **6**, 34937 (2016) (原著論文)
2. Nakase, I.\*, **Noguchi, K.**, Aoki, A., Takatani-Nakase, T., Fujii, I., and Futaki, S. Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery. *Scientific Reports* **7**, 1991 (2017) (原著論文)

3. **Noguchi, K.**, Hirano, M., Hashimoto, T., Eiji Yuba, Takatani-Nakase, T., and Nakase, I.\* Effects of lyophilization of Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles on intracellular delivery. *Anticancer Research* **39**, 6701-6709 (2019) (原著論文)

(参考)

1. 中瀬生彦、**野口公輔**、吉田徹彦、ペイリー小林菜穂子、腫瘍細胞の CD47 発現を抑制するための薬剤組成物及びその利用 (特許願 2017-013140) (2017 年 1 月 27 日特許出願)
2. Nakase, I.\*, Ueno, N., Katayama, M., **Noguchi, K.**, Takatani-Nakase, T., Kobayashi, N.B., Yoshida, T., Fujii, I., Futaki, S. Receptor clustering and activation by multivalent interaction through recognition peptides presented on exosomes. *Chemical Communications* **53**, 317-320 (2017) (原著論文)
3. **野口公輔**、中瀬生彦\*、機能性ペプチド修飾型エクソソームを用いた細胞内薬物導入技術、「ペプチド創薬の最前線/The Frontier of Peptide Drug Discovery」監修：木曾良明 (第 16 章 分担 p. 144-153) シーエムシー出版 (2019) (和文総説)
4. Takenaka, T., Nakai, S., Katayama, M., Hirano, M., Ueno, N., **Noguchi, K.**, Takatani-Nakase, T., Fujii, I., Kobayashi, S.S.\*, Nakase, I.\* Effects of gefitinib treatment on cellular uptake of extracellular vesicles in EGFR-mutant non-small cell lung cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics* **572**, 118762 (2019) (原著論文)

学位論文提出者 氏名 野口 公輔

## 学位論文題目

膜透過性ペプチド修飾によるエクソソームの細胞内移行促進技術の開発

## 学位論文審査結果の要旨

細胞分泌小胞“エクソソーム”は、分泌時に microRNA や酵素等の生理活性分子を内包し、正常細胞・疾患関連の細胞間における情報伝達体として寄与している。また、薬学的な観点からの高い優位性から、疾病治療に必要な薬物をエクソソームに内包させ、薬物送達キャリアーとして用いる治療技術が臨床研究でも進められている。しかし、現行におけるエクソソームを用いた薬物送達において、細胞内移行性が乏しく、また標的とする疾患関連細胞への効果的な送達を達成する為には一層改善が必要である。

本学位論文提出者の野口公輔氏は、本研究において、がん細胞において高い発現が認められる syndecan-4 を含む糖タンパク質に標的性を有する膜透過性アルギニンペプチドをエクソソーム膜に簡便に結合させる技術（共有結合型と膜挿入型）を開発し、標的細胞への効果的なマクロピノサイトーシス誘導と、顕著な細胞内取り込み促進を達成した。また、抗がん活性を有するサポリンをエクソソームに内包させることで、本技術によってがん細胞死活性の誘導に成功した。エクソソームの細胞内導入に重要なマクロピノサイトーシスを人工的に誘導できる画期的な手法として注目に値する。さらに乳腺がんにも効率的に取り込まれる CAPI8 由来 sC18 ペプチドに関しても、エクソソーム膜に結合させる技術構築を本研究で達成し、標的乳腺がん細胞にマクロピノサイトーシスの誘導、及び、効果的なエクソソームの細胞内導入・薬剤送達が可能になった。一方で、医療応用におけるエクソソーム薬剤として保存技術の構築は重要な課題である。凍結乾燥技術は薬剤保存方法として幅広く用いられており、本研究においてペプチド修飾型エクソソームについて凍結乾燥における保存評価を行なった。結果として、エクソソームに内包したサポリンのサイトゾルでの生理活性に大きく影響することを初めて見出し、凍結乾燥によるエクソソーム内でのアグリゲーションやサイトゾルへの脱出効率の低下が考えられる知見が得られた。これらの結果は、エクソソーム製剤における凍結乾燥技術の問題点や、将来のさらなる保存技術改善の必要について提案する重要な基礎的知見である。

これらの学位論文の研究内容は、エクソソームを基盤とした薬物送達技術の開発研究において極めて重要な知見であり、世界的に進められているエクソソームを用いた細胞間コミュニケーションの人工制御や疾患治療技術の構築に大きく貢献できると考えられる。以上より、学位論文審査において本論文内容は博士学位取得に十分に値すると考える。

主査 准教授 中瀬 生彦  
副査 教授 藤井 郁雄  
副査 教授 木下 誉富  
副査 教授 佐藤 孝哉