

生体膜ナノ粒子の人工合成と生物学的機能の理解

金尾 英 佑*

Synthesis of Biomembrane Nanoparticles and Understanding Their Biology

Eisuke KANAO*

Natural extracellular vesicles excel as delivery carriers but suffer from low yield and heterogeneity. We generated artificial membrane nano-vesicles (AMNVs) by extruding HEK293T cells expressing MFG8-C1C2-mCherry-TurboID and mapped uptake using proximity labeling proteomics. AMNVs showed EV-like size/charge yet a richer proteome and higher predicted route propensity, engaging scavenger and macropinocytic pathways with compensatory uptake when micropinocytosis was inhibited. AMNVs may enable scalable, engineerable DDS and genome editing.

1. 緒言

Alejandro Zaffaroniがドラッグデリバリーシステム（DDS）の概念を提唱してから半世紀以上が経過した。DDSは創薬だけではなく、イメージングやセラノティクスにおいても欠かすことができない要素であり、分子科学の発展に伴って様々な技術が提案されてきた。それでもなお、体内での精密な物質輸送を可能にする画一的な方法論は存在しない。

他方で、生体内での精密な物質輸送を可能にするシステムは、自然界に古くから存在している。例えば、細胞外小胞（extracellular vesicles ; EVs）の主要サブタイプであるエクソソームは、膜表面分子のプロファイルに応じて臓器指向性を示し、がん転移における転移前ニッチ形成に関与し得ることが報告されている¹⁾。また、エンベロープウイルスは宿主由来膜を利用することで免疫認識を回避し、高い感染性・伝播性を獲得してきた²⁾。これらの生体膜ナノ粒子の機能は、天然の生体膜が持つ優れた標的指向能力と免疫回避能力に支えられており、その完成度の高さには畏敬の念を禁じ得ない。

天然の生体膜ナノ粒子はDDSの究極系とも言える性能を有しているが、産生量の低さや分離・精製の煩雑さ、機能制御の難しさなどの制約から臨床応用はほとんど進展していない。このような背景から、機械的・物理的刺激を細胞に与えることで、生体膜ナノ粒子を人工的に“作る”取り組みが行われてきた。人工生体膜ナノ粒子（Artificial membrane nano-vesicles ; AMNVs）の合成法としては、窒素キャビテーション、超音波、高圧ホモジナイゼーション、マイクロ流体せん断、遠心力³⁾を利用した様々な作製法が報告されてきており、なかでもポリカーボネート膜のナノ細孔に細胞を押し当てることでAMNVsを作製するエクストルージョン法は、同数の細胞からEVsの100倍近い数のAMNVsを製造可能な効率的な手法として広く用いられている⁴⁾。

人工材料であるAMNVsも細胞由来の生体膜から成るため、その分子組成は天然の生体膜ナノ粒子と同様に極めて複雑である。そのため、AMNVsの分子特性と生体に対する振る舞いに関しては依然として不明点が多い。ナノ粒子の評価法は、平均粒径やゼータ電位といったバルク物性を中心に行われるが、これらの特性が同一の場合であっても、生体膜を構成する分子組成が異なればその性質は大きく異なる。また、細胞への取り込み機構はDDSの設計において重要な情報であるが、蛍光イメージングや阻害剤スクリーニングで得られる情報は飽くまでも定性的なものであり、経路間のクロストークや阻害剤のオフターゲット効果によって解釈が困難となる。したがって、AMNVsの分子組成や取り込み経路に関する分子情報をバイアスなく取得する計測技術が求められている。

近接依存性標識プロテオミクス（Proximity Labeling Proteomics ; PLP）は、相互作用によって近接したタンパク質を特定の化学種で標識し、標識されたタンパク質を液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析（LC-MS/MS）で計測することによって、相互作用タンパク質群（インタラクトーム）を大規模に同定・定量する手法である。例えば我々の先行研究では、半径10 nm以内に存在する生体分子をビオチン化標識するTurboIDをEVsの脂質膜上に導入し、EVsと一過的に会合するレシピエント細胞タンパク質456種を同定することに成功した⁵⁾。本研究ではTurboIDハイブリッド型ナノ粒子によるPLPをAMNVsへと拡張し、同等粒径のEVsとの分子特性の違いと、その違いがレシピエント細胞への取り込み経路に与える影響を分子レベルで理解することを目指した（図1）。

2026年2月27日 受理

* 豊田理研スカラー

京都大学大学院薬学研究科

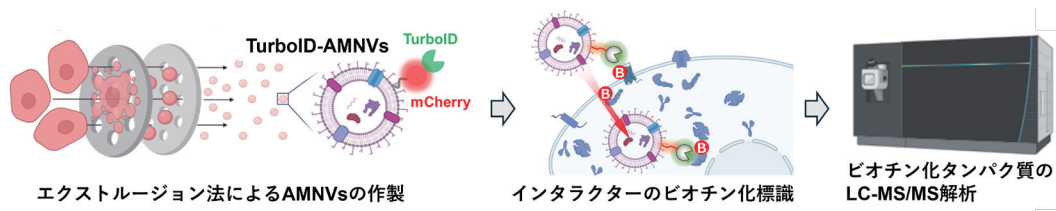


図1 AMNVsのPLPのワークフロー。

2. 結果と考察

MFGE8のC1C2ドメインは血液凝固因子VIIIに類似した領域であり、細胞やEVs表面に露出するホスファチジルセリンに結合する能力を持つ。本研究では、MFGE8のC1C2ドメインとmCherry-TurboIDの融合タンパク質をHEK293T細胞内に一過性発現させ、エクストルージョン法によってAMNVsを作製した。脂質二重膜の染色剤であるExoSparklerとイメージングフローサイトメトリーによる単粒子解析を行った結果、作製したAMNVsは脂質二重膜を保持していることが明らかとなった。また、ナノ粒子トラッキング解析と動的光散乱法による粒子径・ゼータ電位測定の結果、AMNVsは平均径約156 nm、ゼータ電位約 -32 mVで、HEK293T細胞から得られるEVsと概ね同等の物性値を持つことが明らかとなった。

HEK293T細胞から得られたAMNVsとEVsのプロテオーム解析を行った結果、AMNVsからは2,733タンパク質、EVsからは935タンパク質が同定され、AMNVsはEVsデータベースであるExoCarta (<http://www.exocarta.org/>)にEVマーカーTop100として登録されているタンパク質の86%が含まれていることが明らかとなった。また、2,019タンパク質がAMNVsのみで、221タンパク質がEVsのみで確認された。さらに、ナノ粒子の表面タンパク質からレシピエント細胞への取り込み経路を予測する指標 (route-propensity scores ; RPS) を作成し、それぞれのナノ粒子でのみ同定されたタンパク質と優位に発現量が上昇したタンパク質に対して適用した結果、EVsの取り込み経路であるmacropinocytosis (MACRO), integrin-assisted adhesion (INTE), clathrin-independent CLIC/GEEC (CLIC)に加えて、AMNVsではcaveolae-mediated uptake (CAV), scavenger/LDLR-like uptake (SCAV), phagocytic-like uptake (PHAGO) を介した多型路でレシピエント細胞に取り込まれることが示唆された。

さらに、AMNVsと一過的に会合するレシピエント細胞タンパク質を同定するために、AMNVsを安定同位体標識培地で培養したHEK293T細胞に添加してTurboID反応を行った後、AMNVsを取り込んだmCherry陽性細胞のみをFACSで回収した。回収した細胞からストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化タンパク質を濃縮し、プロテオーム解析を行った結果、CLIC、AMNVsを主経路として利用するEVsに対して、AMNVsはSCAV、MACROを主経路として利用することでレシピエント細胞に取り込まれていることが明らかとなった。また、EVsとの共通経路であるMACROをEIPAの添加によって阻害した結果、EVsでは細胞への取り込み効率が著しく減少したが、AMNVsではほとんど取り込み効率が変わらなかった。これは、特定の取り込み経路のみを利用するEVsに対して、AMNVsが複数の取り込み経路を利用することができるためであると考えられ、RPSによる予測結果と一致する。

3. 結論

本研究では、エクソソームとAMNVsのプロテオーム解析、PLPによるインタラクトーム解析によって、各ナノ粒子の分子組成と取り込み機構を分子レベルで明らかにすることに成功した。各ナノ粒子は粒径・表面電荷などの物性は類似しているが、AMNVsはEVsよりも多種多様な膜タンパク質を表面に有しており、EVsよりも多様な経路を介して細胞に取り込まれることが明らかとなった。これらの結果からAMNVsは、効率的なDDSやゲノム編集を達成するための基盤材料としての応用が期待される。今後は、標的細胞種や*in vivo*における再現性検証、AMNVsの膜組成 (表面タンパク質密度・配向、脂質非対称性、曲率など) の制御による経路誘導設計へ展開することで、AMNVsを基盤としたDDSの合理設計指針創出を目指す。

4. 謝辞

本研究は公益財団法人豊田理化学研究所からのご支援のもとで遂行されたものであり、ここに深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、数々のご助言を賜りました京都大学大学院工学研究科の佐々木 善浩先生、水田 涼介先生、理化学研究所の今見 考志先生に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) A. Hoshino, *et al.*, *Nature*, **527** (2015) 7578.
- 2) D. E. Gorden, *et al.*, *Nature*, **583** (2020) 459.
- 3) R. Mizuta, *et al.*, *Nano Letters*, **24** (2024) 12907.
- 4) P. Guo, *et al.*, *Advanced Functional Materials*, **31** (2021) 2008326.
- 5) Y. Li, *et al.*, *Analytical Chemistry*, **95** (2023) 14159.