

膜脂質組成の改変技術を用いた細胞内取込を促進する 高機能エクソソームの開発

安田 智一*

Engineering Highly Functional Exosome Promoting Intracellular Uptake by Modifying Membrane Lipid Composition

Tomokazu YASUDA*

Exosomes are small extracellular vesicles (sEVs) involved in distal cell–cell communication and cancer migration by transferring functional cargo molecules such as proteins and nucleic acids. Through our recent study, exosome membranes, enriched with sphingomyelin and cholesterol (Cho), showed the higher membrane orders and asymmetric topologies, which are similar to those of cell membranes with lipid rafts. However, the membrane dynamics of exosomes involved in regulating the activity of functional molecules such as proteins have hardly been elucidated.

In this study, we artificially prepared Cho-poor and Cho-rich exosomes by treating them with methyl- β -cyclodextrin, and observed the membrane dynamics of these exosomes with fluorescence spectroscopy and morphological observations. The result clarified the strong correlation of the concentration of Cho in exosome with membrane orders. Moreover, we observed the intracellular uptake of artificial Cho-modified exosomes with fluorescence microscopy. By comparing with the uptake of the intact exosomes, we obtained insight into the importance of the raft functional domains (Cho) of the exosomes, which likely play key roles in the biological functions and cellular uptake of exosomes by facilitating selective membrane interactions with target organs.

1. 研究背景と目的

細胞間でのタンパク質や核酸などの情報伝達の担い手として細胞外小胞（エクソソーム、図1）が非常に注目を集めている。近年では、がんなどの疾病診断のバイオマーカーや疾患治療における次世代の薬物送達ツールへの応用が大きく期待されている。エクソソームの細胞内への取込を制御する分子レベルの機構は不明であるが、細胞膜と同様に、ラフト脂質が豊富に存在するエクソソームにおいても、膜物性が膜上のタンパク質の活性制御に寄与していると考えられる。これまでに私たちは、エクソソーム膜は細胞膜のように内外葉の非対称性を示し、ラフト様ドメインが存在することを明らかにした(1)。また、これら膜動態はエクソソームを産生する細胞株に由来して多様性を示したことから、膜を構成する脂質組成がエクソソームによって異なることが要因であると考えた。しかしながら、こうした膜動態とエクソソーム機能との十分な関連付けには至っていない。

そこで、エクソソームの脂質組成を自在に操作する手法を確立して、膜動態を改変したエクソソームを人工的に作り出すことを目指した。さらにこの技術を用いて膜動態の違いがエクソソーム機能に与える影響を明らかにし、細胞内取込効率を増加させた高機能エクソソームを開発することを目的とした。

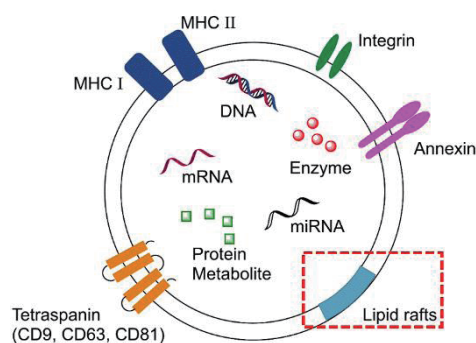


図1 エクソソームの構造

エクソソームを構成する脂質二重膜は、細胞膜上の機能性ドメインを構成する脂質である、コレステロール (Cho) やスフィンゴミエリン、スフィンゴ糖脂質などが細胞より多く存在する。

2023年2月15日 受理

* 豊田理研スカラー

大阪大学大学院理学研究科化学専攻

2. 実験手法

市販のミルクエクソソームとヒト前立腺がん細胞 (PC3) から分泌されたエクソソームを超速心法で精製したものをを用いて、以下に示す2つの項目に沿って本研究を推進した (図2)。

① メチルβシクロデキストリン (MβCD) を用いた改変エクソソーム作製法の確立とその膜物性評価

MβCDはChoを包接できるため、Choを膜から引き抜いたり、Choを包接したCD複合体によって膜にChoを挿入することが可能である。そこで、MβCDの分子包接機能を利用して、膜ドメインを構成し、エクソソームにも豊富に存在する(Cho)の膜中の量を調節した改変エクソソームの作製法を確立した。そして、改変エクソソームの膜物性や形態を蛍光分光法やゼータ電位測定などの各種分析手法によって評価した。

② 膜物性改変エクソソームの細胞内取込の評価

改変エクソソームの動態を正確に観察するために、膜の性質に影響を及ぼさない蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡によってエクソソームの細胞内移行を視覚的に捉えた。さらに、画像解析によって細胞内の蛍光強度を定量化することで、取り込まれたエクソソームの割合を見積もり、インタクトや膜動態が異なるエクソソームを比較した。

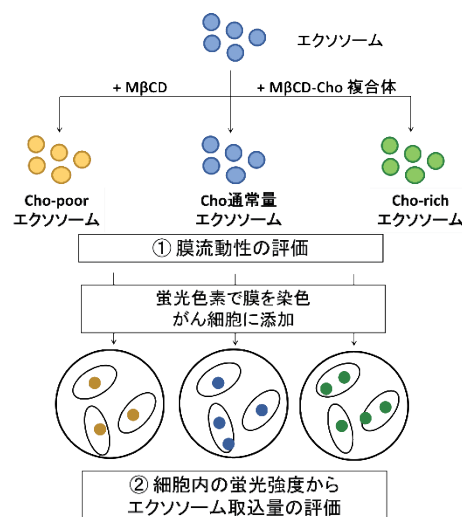


図2 本研究計画の流れ

3. 実験結果および考察

2種のエクソソームに添加するCD量を増加させるにつれて、エクソソームの膜流動性は増加する一方で、CD-Cho複合体の添加により膜流動性の低下が観測された。そして、これら改変エクソソームの膜中に残存するChoを定量することによって、エクソソームのCho濃度と膜動態は相関することを明らかにした。Choは主要なラフト脂質であるため、その濃度は改変エクソソームに存在するドメイン量に対応していると考えられる。これら改変エクソソームの形態はインタクトのものとは変わらなかったため、膜脂質組成(Cho含有率)を改変した各種エクソソームの作製に成功した。

続いて、膜動態改変エクソソームの膜を蛍光ラベルし、染色したインタクトのエクソソームの蛍光強度と同程度になるように調整した。PC3細胞へ添加し、インキュベーション時間によって蛍光強度の変化を観察すると、時間経過に応じて蛍光強度が増加したため、エクソソームが細胞に取り込まれていることが確認された。そして、24時間後の蛍光強度をインタクトなエクソソームと比較した結果、膜動態に応じて細胞内への取込量が異なることが示唆された。また、エクソソームを産生する細胞株に由来して、膜動態改変エクソソームの細胞内取り込み効率も異なることを明らかにした。

以上の結果より、エクソソームの細胞内取込の分子機構について、コレステロールを含むラフトドメインが、エクソソーム膜上に存在する接着分子のインテグリンや細胞内取込に関与しているとされるテトラスパニンのようなタンパク質を活性化して、標的細胞への結合・取り込みが起きると考えられる。

4. 今後の展望

今後は、スフィンゴミエリンに代表されるドメインを構成するリン脂質に関しても、同様に、脂質濃度(ドメイン量)を操作した改変エクソソームを作製し、その膜動態とエクソソーム機能との相関を解明していく予定である。また抗がん活性物質等を細胞内取り込みが増加した膜動態改変エクソソームに人工的に内包させて細胞に添加し、エクソソーム取込後の生細胞数より算出された生存率より、膜物性改変による細胞機能への影響を明らかにする。

本研究の成果は、脂質を基軸としてエクソソーム機能に対する理解を深めるだけでなく、高い取込効率を有し、細胞機能を制御する高機能エクソソームの開発にも寄与することが期待される。

REFERENCE

- 1) T. Yasuda, H. Watanabe, K. M. Hirose, K. G. N. Suzuki, K. Suga and S. Hanashima, *Langmuir*, **38** (2022) 14695-14703.