

京都大学	博士 (工学)	氏名	石川 良賀
論文題目	Development of Engineered Extracellular Vesicle-Liposome Hybrid Using Baculovirus-Expression System (バキュロウイルス発現系を用いて機能化された細胞外ベシクルーリポソームハイブリッドの開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、先端医療分野において近年注目を集めている細胞外ベシクル(Extracellular vesicle; EV) の機能化手法の確立およびドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) への応用について報告したものである。EV はあらゆる細胞が放出している膜小胞であり、その内部に核酸などの生理活性分子を内包し、他の細胞へと輸送することで細胞機能を制御していることが近年明らかとなりつつある。EV はその高い生体適合性・分子輸送能から DDS キャリアとしての応用が期待されているが、標的指向性の制御や薬剤の封入効率が十分でないなど、様々な問題が残っている。本論文では、高効率タンパク質発現系であるバキュロウイルス発現系を利用した膜タンパク質による EV 機能化手法の確立、および細胞内デリバリーキャリアとしての応用について報告した。遺伝子組み換えバキュロウイルスに感染した昆虫細胞が放出する EV に着目し、機能性膜タンパク質を EV 表面へ提示することにより、EV へのがん細胞標的性の付与を試みた。また、バキュロウイルス由来の膜融合性タンパク質により、EV とリポソームが融合したハイブリッド EV を構築し、EV 内への外来分子導入および細胞質内への内包物デリバリー機能について検討した。</p> <p>本論文は緒論と本論 4 章から構成されている。緒論では、EV の特性や医療応用、EV 機能の改変のためのエンジアリング手法の現状や課題について概説している。そして、研究背景について述べるとともに、本論文の研究目的を明確にし、最後に本論文の構成及び概要について論じた。</p> <p>第 1 章では、バキュロウイルス発現系により表面に機能性膜タンパク質を提示した昆虫細胞由来 EV の単離とその機能について評価した。T 細胞表面に存在する免疫チェックポイント膜タンパク質である PD-1 に着目し、PD-1 遺伝子にバキュロウイルスタンパク質 gp64 のシグナルペプチドを置換した PD-1 変異体を設計し、バキュロウイルス DNA に組み込んだ。その組み換えウイルスを Sf9 昆虫細胞に感染・培養し、細胞外に放出された EV (PD-1 EV) を回収したところ、PD-1 はリガンドタンパク質 PD-L1 との結合能を保持した状態で EV 表面に提示されていることが分かった。また、シグナルペプチドをウイルス由来の配列に置換することにより、EV 上への PD-1 の提示量が増加し、PD-1 EV と PD-L1 タンパク質との結合能も増加することが分かった。さらに、PD-1 EV を PD-L1 発現がん細胞である HeLa 細胞に添加し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、PD-1 EV 上の PD-1 と HeLa 細胞膜上の PD-L1 との相互作用により、HeLa 細胞内に PD-1 EV が効率的に取り込まれることを明らかにした。</p> <p>第 2 章では、Sf9 由来 EV の RNA 解析および糖鎖プロファイリング解析を行なった。Sf9 由来 EV から RNA を抽出し、マイクロチップ型電気泳動装置バイオアナライザーにより RNA の定量およびサイズ分布測定を行った。その結果、EV 内に micro RNA のよ</p>			

うな小分子 RNA の存在が確認され、その量はウイルスの感染により激増することが分かった。また、レクチンアレイを用いた Sf9 由来 EV の表面糖鎖のプロファイリングを評価した。糖鎖と結合するタンパク質群であるレクチンを 21 種類スポットしたアレイ基盤に、蛍光標識した Sf9 由来 EV を添加し、エバネッセント波蛍光スキャナーで各スポットの蛍光強度を測定することで、EV とレクチンの相互作用を評価した。その結果、他の種類の糖鎖に比べて、マンノース型糖鎖が Sf9 由来 EV 上に高発現していることが明らかとなった。昆虫細胞はタンパク質への糖鎖修飾の際に高マンノース型の糖鎖を修飾することが知られているため、この結果は Sf9 由来 EV の糖鎖が親細胞と同様のプロファイリングであることが示唆された。

第 3 章では、EV 上に発現した膜融合性タンパク質 gp64 の機能を利用して、EV とリポソームが融合したハイブリッド EV の構築について検討した。蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた Lipid mixing assay により、EV 上に発現した gp64 の酸性条件下での膜融合機能を評価した。EV と FRET リポソームを pH 7.5 で混合しても蛍光スペクトルに変化が見られなかったものの、pH 4.5 の条件で混合すると、脂質混合により FRET が解消されたため、EV とリポソームの酸性環境に応答した膜融合が確認された。また、gp64 抗体を添加すると FRET 解消が阻害されることから、膜融合反応は gp64 が媒介していることが示唆された。さらに、イメージングフローサイトメトリーを用いて、蛍光標識した EV とリポソームの膜融合を単粒子レベルで解析した。その結果、酸性条件において EV とリポソーム両者の蛍光が共局在しており、さらに EV とリポソームの量比を変化させることで、ハイブリッド EV の脂質組成を制御し得ることが単粒子レベルで明らかとなった。

第 4 章では、PD-1 EV とリポソームを融合した PD-1 ハイブリッド EV を用いた、内包物の細胞質デリバリー機能について評価した。PD-1 ハイブリッド EV を HeLa 細胞に添加し共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、ハイブリッド EV は PD-1/PD-L1 相互作用により HeLa 細胞内に取り込まれ、後期エンドソームやリソソームなどの酸性オルガネラに移行することが分かった。さらに、オルガネラ内の酸性環境において、EV 上の gp64 の機能により、ハイブリッド EV とオルガネラが膜融合することが示された。また、ハイブリッド EV 内に蛍光標識デキストランを内包させ HeLa 細胞に添加したところ、オルガネラから細胞質へとデキストランが放出されることが分かり、PD-1 ハイブリッド EV は細胞質デリバリーキャリアとして優れていることが明らかとなった。

以上のように、本論文ではバキュロウイルス発現系を用いて、機能性膜タンパク質を搭載した昆虫細胞由来 EV の構築、およびリポソームとの融合によるハイブリッド EV の構築に成功し、がん細胞を標的としたデリバリーキャリアの応用可能性を示した。これらの成果により、機能改変 EV を用いたバイオ医療分野の更なる発展が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、バキュロウイルス発現系を基盤とした新規な細胞外ベシクル (EV) 機能化手法の開発とそのドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 第1章では、バキュロウイルス発現系により、T細胞表面に存在する免疫チェックポイント膜タンパク質であるPD-1を提示した昆虫細胞由来EVの構築とその機能について評価した。PD-1にバキュロウイルス由来のシグナルペプチドを置換したコンストラクトを作製することで、EV表面におけるPD-1の提示量を増加させ、EVとPD-L1リガンドタンパク質との結合能を向上させることに成功した。また、作製したEVはPD-L1発現がん細胞に効率よく取り込まれることが明らかとなり、PD-L1を標的としたDDSキャリアとしての有用性が示された。
2. 第2章では、昆虫細胞由来EVのRNA解析およびレクチンアレイを用いた糖鎖プロファイリング解析を行なった。EV内に小分子RNAが存在し、その存在量はウイルス感染により増加することが分かった。また、昆虫細胞由来EVはマンノース型糖鎖が高発現していることが示され、ウイルスの感染によらず糖鎖プロファイリングは変化しないことが明らかとなった。
3. 第3章では、EV上に発現している膜融合性タンパク質gp64の機能により、酸性条件下でのEVとリポソームの融合挙動を、単粒子解析によりナノ粒子レベルで詳細に評価することに成功した。また、EVとリポソームの量比により、ハイブリッドEV脂質組成を制御できることが明らかとなった。
4. 第4章では、PD-1が提示されたハイブリッドEVがPD-L1発現がん細胞に取り込まれた後、リソソームや後期エンドソームなどの酸性オルガネラに輸送され、ハイブリッドEVと酸性オルガネラがgp64を介して膜融合することを明らかにした。さらに、内水相に蛍光多糖を内包したハイブリッドEVは、酸性オルガネラと膜融合した後、内包物を細胞質へと放出することが明らかとなり、核酸医薬などの細胞質へ送達することが必要とされるバイオ医薬品のデリバリーキャリアとしての有用性が示された。

以上、本論文はバキュロウイルス発現系を利用することで、機能性膜タンパク質PD-1が提示された新規昆虫由来細胞外ベシクルの構築、およびリポソームと融合した新規ハイブリッド細胞外ベシクルの開発に成功し、新規ドラッグデリバリーキャリアとしての有用性を明らかにしたものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和3年2月15日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規定第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。