

薬物キャリア応用に向けた
細胞外小胞の送達効率向上に関する研究

2025

中川 優奈

目 次

略語表	2
緒 言	3
第 1 章	5
序論	5
第 1 節 血清存在下における P4A や oxP4A のマクロピノサイトーシス誘導活性に対する アシル化の影響	7
第 2 節 stearyl-oxP4A 存在下でのオクタアルギニンのサイトゾル送達	16
第 3 節 stearyl-oxP4A による細胞外小胞の細胞内送達	17
第 2 章	22
序論	22
第 1 節 S-EV ^{10K} の調製	24
第 2 節 S-EV ^{10K} の ACE2 発現細胞への選択的な膜融合	26
第 3 節 S-EV ^{10K} の S タンパク質に基づいた膜融合メカニズム	31
第 4 節 S-EV ^{10K} による TMPRSS2 発現細胞への mRNA 送達	34
第 5 節 S-EV ^{10K} による TMPRSS2 阻害タンパク質 HAI-2 の mRNA 送達と SARS-CoV-2 の侵入阻害	36
討論と展望	40
総 括	43
実験の部	44
第 1 章の実験	44
第 2 章の実験	50
発表論文	57
引用文献	58
謝 辞	72

略語表

ACE2	angiotensin-converting enzyme 2
ANXA1	Annexin A1
α -MEM	α -minimum essential medium
CD9	cluster of differentiation 9
CD63	cluster of differentiation 63
CD81	cluster of differentiation 81
COVID-19	Coronavirus disease 2019
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	<i>N,N</i> -dimethyl formamide
DIC	differential interference contrast
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDT	1,2-ethanedithiol
EGFP	enhanced green fluorescent protein
EIPA	5-(<i>N</i> -ethyl-isopropyl)amiloride
EV	extracellular vesicles
EV ^{10K}	extracellular vesicles pelleted by centrifugation at $10,000 \times g$
EV ^{Mag}	extracellular vesicles isolated using MagCapture kit
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
F-actin	filamentous actin
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry
miRNA	microRNA
MWCO	molecular weight cut off
PBS	phosphate-buffered saline
PVDF	polyvinylidene difluoride
SARS-CoV-2	Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
SD	standard deviation
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SE	standard error
siRNA	small interfering RNA
S-EV ^{10K}	EV ^{10K} displaying the SARS-CoV-2 spike protein
S-VLP	SARS-CoV-2 spike protein-pseudotyped virus-like particles
TFA	trifluoroacetic acid
TMPRSS2	transmembrane serine protease 2
VSV-G	vesicular stomatitis virus glycoprotein

緒 言

エクソソーム、エクトソーム、アポトーシス小体を含む細胞外小胞（EV）は、細胞から放出されるナノサイズの脂質粒子であり、細胞間コミュニケーションを仲介する[1–4]。EV は、免疫細胞[5]、間葉系幹細胞[6]、内皮細胞[7]、上皮細胞[8]、およびがん細胞[9]など、さまざまな種類の細胞によって産生される。これらの EV は、タンパク質[10]、DNA[11]、および RNA（mRNA、miRNA、長鎖ノンコーディング RNA など）[12–14]といった様々なカーゴを含んでおり、血漿[15]、母乳[16]、脳脊髄液[17]、尿[18]、および精液[19]など、多くの体液中に見られる。EV は内包分子を他の細胞へと運搬することで細胞間コミュニケーションを担っており、生体内での役割や疾患との関連に関する研究が盛んに行われてきた[20–22]。その一方で、最近の研究から、EV が薬物送達キャリアとして数多くの応用可能性を持つことが明らかになっている[23–26]。EV は全ての構成要素が生物学的成分からなるため、リポソームやナノ粒子が有する毒性や迅速なクリアランスの問題を克服できる可能性があり[27]、siRNA[28]、miRNA[29]、mRNA[30]、およびタンパク質[31]の送達キャリアとしての利用が報告されている。

EV が内包する分子を標的細胞内に送達して機能を発揮させるためには、エンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれた後、エンドソーム膜と EV 膜が融合する、または形質膜と EV 膜が直接融合して、EV 内包分子がサイトゾルに放出される必要がある。しかし、近年細胞内取り込みと膜融合のいずれの効率も高くないことが明らかになってきた[32–34]。これには、EV が 50–200 nm 程度の直径を持つサイズの大きい粒子であることや、表面電荷が負電荷性であり負電荷を帯びた形質膜と反発すること、また膜融合活性をほとんど持たないことなどが原因となっている[35–38]。よって、EV を基盤とした高効率な薬物送達のプラットフォームを確立するためには、細胞内取り込みや膜融合の向上、および、細胞標的化のための戦略が不可欠である[39–42]。

EV の主要な細胞内取り込み機構として各種エンドサイトーシス経路や膜融合の関与が報告されている[43–46]。EV 膜表面には、産生細胞由来のタンパク質が搭載されており、それらと受容細胞とが相互作用することで、クラスリン依存性エンドサイトーシスやカベオラ介在性エンドサイトーシス、マクロピノサイトーシス、または直接膜融合によって細胞内に移行することが示されている。マクロピノサイトーシスはエンドサイトーシス経路の一種であり、その他のエンドサイトーシス経路と比較して大規模な細胞外物質の細胞内取り込みを可能にする[47–49]。そのためタンパク質や核酸などの膜透過性の低いバイオ高分子や、細胞外小胞や人工膜からなる脂質粒子の細胞内取り込みに有用であると考えられてきた。所属研究室において、マクロピノサイトーシスを誘導するペプチドが開発されており[50,51]、特に近年、P4A という強力なマクロピノサイトーシス誘導活性を持つペプチドが見出され、バイオ高分子の細胞内送達に有用であることが明らかとなった[52]。一方で、血清を含有する条件下ではその活性が著しく低下するという課題が残っていた。従来の細胞内送達活性を有するペプチドの多くで血清によって活性が減弱することが実用化への障壁となっている[53]。そこで、血清存在下においても活性を維持するようなペプチドの設計戦略によって、実用的なマクロピノサイトーシス誘導ペプチドの創製および EV の取り込み促進が実現できると考えられる。

一方で、EV の送達効率向上には取り込みだけでなく膜融合や細胞標的化も重要である。これまでに標的化に向けて、EV 表面の修飾や EV に発現するタンパク質の改変、機能性分子の脂質を介した挿入など多様なアプローチが検討されてきた[54–60]。また、膜融合の促進を狙ってウイルスの膜融合を引き起こす VSV-G が汎用されてきた[61–64]。VSV-G を EV に搭載することで EV 膜と細胞膜の融合が引き起こされ、内包分子の送達が促進されることが明らかになっている。しかし、VSV-G はさまざまな細胞種に対して膜融合を誘起するため標的細胞に選択的に EV 内包分子を送達することには課題が残る[65,66]。よって、標的細胞に対して選択的に EV の膜融合活性を発揮させるための新たな戦略が求められている。

そこで、本研究では、EV を基盤とした薬物送達キャリア創製に向けて EV の細胞内送達効率の向上および標的細胞選択的に膜融合を促進することを目的とした。第 1 章では、血清存在下においてもマクロピノサイトーシスを誘導可能なペプチドを創出し、これを用いて EV の細胞内取り込みおよび内包分子のサイトゾル送達を促進できることを明らかにした。第 2 章では、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質を EV 表面に提示することで、ウイルスの膜融合機構を模倣した高効率かつ細胞選択的な EV 内包分子の送達を達成した。

第1章

アシル化マクロピノサイトーシス誘導ペプチドによる
細胞外小胞の取り込み促進

序論

マクロピノサイトーシスはエンドサイトーシスの一形態であり、アクチン再構成と細胞膜の波状構造の形成を伴い、細胞外液を大量に取り込んで大型エンドソーム（マクロピノソーム）を形成する[47–49]。この経路はワクシニアウイルス、アデノウイルス、ピコルナウイルス、その他のウイルス科が宿主細胞に侵入する経路として[49]、また細胞透過ペプチド（CPP）による細胞内輸送の経路として利用される[67–69]。最近の研究では、マクロピノサイトーシスががん細胞における栄養摂取に重要な役割を果たすことも示されている[70–72]。マクロピノソームのサイズは数マイクロメートルに達すると報告されており、これはクラスリン依存性エンドサイトーシス（約 120 nm）やカベオラ依存性エンドサイトーシス（約 80 nm）など他の典型的なエンドサイトーシス経路によって形成されるエンドソームよりも著しく大きい[73]。この特性は、治療用の核酸やタンパク質の送達に極めて有望な小胞とされる細胞外小胞（EV）を含む、高分子やナノ粒子の細胞内送達に有益である可能性がある[24–26]。

所属研究室では、生体高分子およびナノ粒子の細胞内送達効率を高めるためにマクロピノサイトーシスの利用を検討してきた[50,51]。ケモカイン受容体 C-X-C motif chemokine receptor 4（CXCR4）のリガンドである間質細胞由来因子 1 α （SDF-1 α ）の N 末端 21 残基に由来する SN21 ペプチド（KPVSLSYRCPCRFFESHVARA-amide）がマクロピノサイトーシスを誘導することが見出された[74]。さらに、その部分配列を改変して創製された P4A（YRCACRFF-amide）およびその分子内酸化型である oxP4A は、SN21 と同等あるいはそれ以上のマクロピノサイトーシス誘導能を有していることが明らかとなった[52]。しかし、これらのペプチドの強力なマクロピノサイトーシス誘導能は血清存在下では減弱し、適用範囲が制限されている。そこで第1章では、P4A が血清存在下でも活性を発揮できるようにペプチド設計を改善し、改良したペプチドを用いて薬物キャリアとして期待される EV の送達効率を向上させることを目指した。

血清中でマクロピノサイトーシス誘導能が認められない潜在的な理由として、血清中のプロテアーゼによる機能性ペプチドの分解や血清タンパク質への非特異的結合が挙げられる[53,75,76]。ペプチドへの脂質の付加はプロテアーゼ抵抗性を付与し、薬理学的効力を向上させ、半減期を延長することが知られており、グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1）受容体作動薬リラグルチドやインスリンなどで用いられている[77]。脂質付加は血清タンパク質への非特異的結合を増加させる可能性があるが、同時に細胞膜との相互作用も増強する可能性がある。本研究では、血清含有条件下におけるペプチドのマクロピノサイトーシス誘導活性の向上を狙い、一連の N 末端アシル化 P4A 誘導体を調製し、N 末端脂肪アシル化の効果を検討した。異なる鎖長の脂肪酸（酢酸、デカン酸、ミリスチン酸、ステアリン酸）を用いたアシル化の効果を検討した結果、ステアリル化 P4A（stearyl-P4A）が最もマクロピノサイトーシスによる取り込みを強力に誘導した。分子内ジスルフ

イド架橋を有する類縁体である stearyl-oxP4A はさらに高い活性を示した。また stearyl-oxP4A は、マクロピノサイトーシスに重要なアクチン再構成を強力に誘導する能力を有し、ステアシル基は oxP4A の血清タンパク質への吸着を防ぐ役割を果たすことを明らかにした。stearyl-oxP4A が、血清含有培地において EV の細胞内取り込みおよび EV に内包された mRNA のサイトゾルへの送達を促進することを見出し、このペプチドが EV の効率的送達に応用できる可能性を示した。

第1節 血清存在下におけるP4AやoxP4Aのマクロピノサイトーシス誘導活性に対するアシル化の影響

前述の通り、SN21 と P4A はいずれも無血清培地では高いマクロピノサイトーシス誘導能を示したが、血清存在下ではその活性を失った。この活性の低下は、血清中のプロテアーゼによるペプチドの分解、あるいは血清タンパク質へのペプチドの非特異的な吸着によるものと推測した。ペプチドの脂質化は、血清安定性を向上させ細胞膜への親和性を高める実用的な戦略である[75]。そこで、P4A の N 末端アシル化により血清存在下でもマクロピノサイトーシス誘導能が保持され、細胞内送達が促進されるかを評価した (Fig. 1-1A)。炭化水素鎖の長さが異なるアシル基を有する P4A アナログ、アセチル (C2)、デカノイル (C10)、ミリスチル (C14)、ステアシル (C18) 基を有するアナログを合成した (Fig. 1-1B)。アシル化が P4A の活性向上をもたらすかどうかを評価するため、マクロピノサイトーシスマーカーであるテトラメチルローダミン標識の 70 kDa デキストラン (TMR-Dex70) の細胞内取り込みを評価した[47,78]。HeLa 細胞を、10%ウシ血清 (BS) を含む α -MEM [α -MEM(+)] 中で、TMR-Dex70 と各ペプチド (5 μ M) で 30 分間処理し、TMR-Dex70 の細胞内取り込みをフローサイトメトリーで解析した。従来 of 報告通り、血清含有条件下での P4A 処理では TMR-Dex70 取り込みの有意な増加は認められなかった。N 末端アセチル化およびデカノイル化も TMR-Dex70 取り込みにほとんど影響を与えなかったが、ミリスチル化およびステアシル化は、ペプチドを添加していない細胞と比較して、それぞれ 110%および 125%の取り込みをもたらした (Fig. 1-1C)。

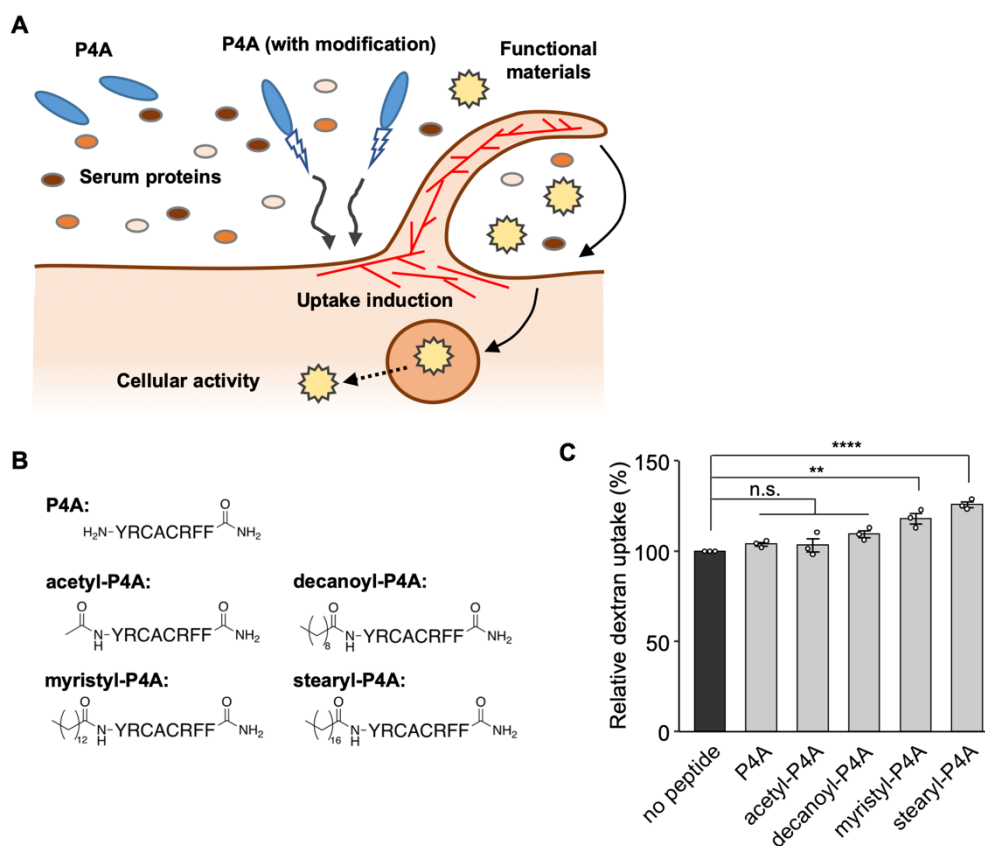


Figure 1-1. (A) Aim of this study: to develop derivatives of micropinocytosis-inducing peptide “P4A” to facilitate cellular uptake of functional molecules and nanoparticles in the presence of serum. (B) Acylated P4A derivatives. (C) Effect of acylated P4A derivatives to stimulate cellular uptake of tetramethylrhodamine-labeled 70 kDa dextran (TMR-Dex70) (micropinocytosis marker) in serum-containing medium for 30 min. Data are presented as mean $\pm$ standard error (SE) of three independent experiments ($n = 3$). ****, $p < 0.0001$; **, $p < 0.01$; n.s., not significant [one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett’s test].

次に、最も活性の高かったステアシル化 P4A (stearyl-P4A) の血清存在下におけるマクロピノサイトーシス誘導活性についてさらに検討した。P4A は培養培地中のシステインとチオール交換を起こしやすく、分子内酸化型 (oxP4A) に容易に変換され、副生成物として分子間架橋二量体も生成されることが報告されている[52]。さらに、無血清培地では、oxP4A は P4A よりもデキストランの取り込みをより増強することが示されている。そこで次に、stearyl-P4A においても分子内酸化型の stearyl-oxP4A を調製し、血清存在下における活性を調べた。stearyl-P4A の分子内酸化は methyl 3-nitro-2-pyridinesulfonate (NPyS-OMe) [79]を用いて行った (Fig. 1-2A)。

α -MEM(+)中で stearyl-P4A または stearyl-oxP4A の存在下、フルオレセイン標識 Dex70 (FL-Dex70) を 1 時間処理した細胞の共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察では、細胞内に点状のシグナルが認められ、FL-Dex70 がエンドソームに捕捉されたことが示唆された (Fig. 1-2B)。FL-Dex70 シグナルと LysoTracker (リソソーム指標) のシグナルの重なりも観察された。一方、ペプチドを添加しない細胞では、FL-Dex70 シグナルがほとんど見られなかった (Fig. 1-2B, no peptide)。これらの結果は、stearyl-P4A および stearyl-oxP4A の存在下で FL-Dex70 がマクロピノソームに捕捉されることを示唆している。また、FL-Dex70 シグナルと LysoTracker シグナルの共局在 (Fig. 1-2B, 黄色シグナル) が見られたことから、マクロピノソームの一部はリソソームと融合した可能性が示唆された。フローサイトメトリーによって TMR-Dex70 の取り込みを定量したところ、ペプチド未処理細胞と比べて stearyl-P4A は約 125%、stearyl-oxP4A は約 150%に TMR-Dex70 の取り込みが増加し、stearyl-oxP4A は血清含有培地において stearyl-P4A より強力にマクロピノサイトーシスによる取り込みを促進することが示された (Fig. 1-2C)。また、WST-8 アッセイ (ミトコンドリア脱水素酵素活性に基づくアッセイ) [80]による細胞毒性の評価を行い、stearyl-oxP4A は 10 μ M まで有意な毒性が見られないことを確認した (Fig. 1-2D)。以降の検討ではより高活性である stearyl-oxP4A を用いた。

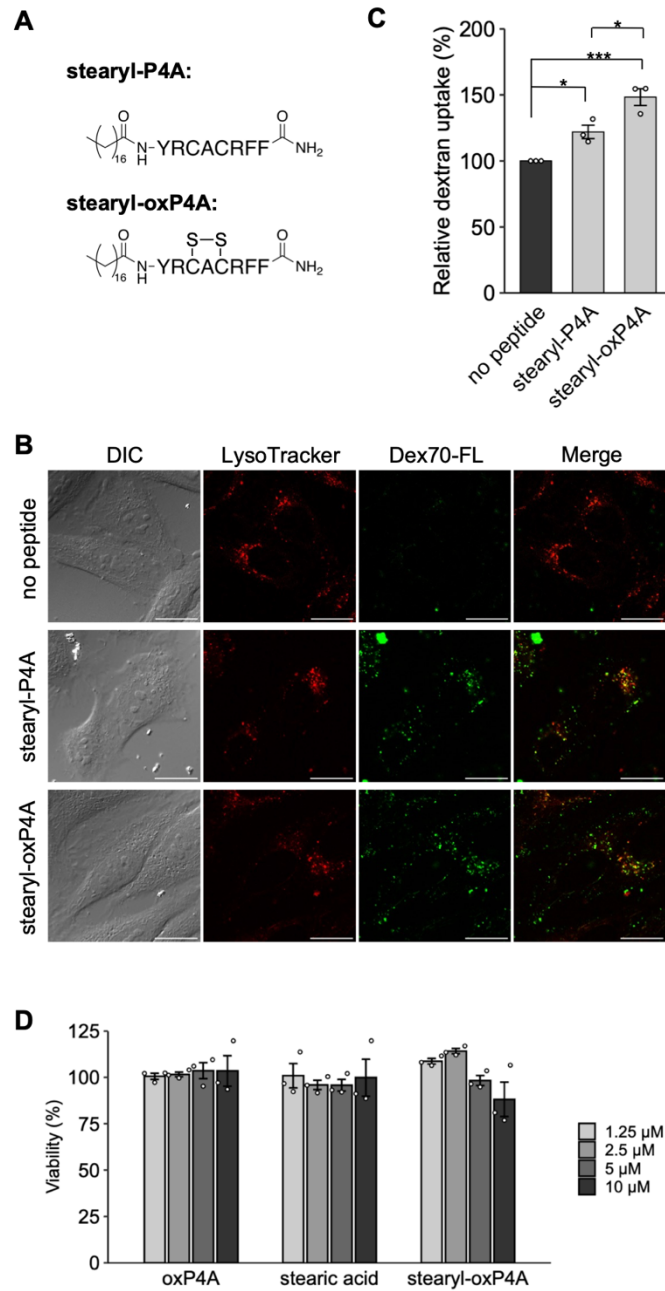


Figure 1-2. (A) Structures of stearyl-P4A and the oxidized form, stearyl-oxP4A. (B) Live-cell observation of the cells treated with FL-Dex70 in the presence of stearyl-P4A and stearyl-oxP4A in serum-containing medium for 1 h. A white arrowhead indicates an aggregate-like structure of FL-Dex70 formed in the presence of stearyl-P4A. Scale bars, 20 μm. (C) Effect of stearyl-P4A and stearyl-oxP4A on the cellular uptake of TMR-Dex70 (in α-MEM(+), 30 min) analyzed by flow cytometry. Data are presented as mean ± SE of three independent experiments (n = 3). ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer analysis). (D) Cytotoxicity of stearic acid, oxP4A, and stearyl-oxP4A treatment for 24 h. HeLa cells were treated with indicated concentrations of stearic acid, oxP4A and stearyl-oxP4A in α-MEM(+) for 24 h, followed by addition of WST-8 reagent and incubation for 2 h. Data are presented as the mean ± SE (n=3). n.s., no significant (one-way ANOVA followed by Dunnett's test).

stearyl-oxP4A 刺激による細胞内取り込みへのマクロピノサイトーシスの関与を、マクロピノサイトーシス阻害剤である EIPA および wortmannin を用いて検討した。EIPA は Na^+/H^+ 交換体阻害剤であり、受容体を介したエンドサイトーシスではなくマクロピノサイトーシスを阻害する[47,81,82]。一方、wortmannin はホスホイノシチド 3-キナーゼ阻害剤であり、マクロピノサイトーシスを阻害する[83]。stearyl-oxP4A によって刺激された TMR-Dex70 取り込みに対するこれらの阻害剤の影響を調べたところ、それほど劇的ではないものの、いずれの阻害剤処理においても、stearyl-oxP4A によって誘導される TMR-Dex70 取り込みの有意な減少が認められた (Fig. 1-3A, B)。

マクロピノサイトーシスは、動的なアクチン構造の変化と膜ラッフルの形成を伴い、細胞外の液体や分子をマクロピノソームに取り込む。stearyl-oxP4A による処理がマクロピノサイトーシスに特徴的なアクチン構造の変化を誘起するかについて調べた。Lifeact は、繊維状アクチン (F-アクチン) 構造に結合する 17 アミノ酸のペプチドであり[84]、蛍光タンパク質と融合させることで、生細胞でのアクチン構造の変化を可視化できる。そこで、Lifeact-mCherry を安定発現する HeLa 細胞を、血清含有培地中において stearyl-oxP4A で処理し、アクチンの動態を観察した。細胞のタイムラプス観察の結果、stearyl-oxP4A の処理によって、細胞外への動的なアクチン突起が形成されることが認められた (Fig. 3C、黄色矢尻)。一方、stearic acid や oxP4A による処理では、細胞骨格の F-アクチンに顕著な構造変化は観察されなかった (Fig. 1-3D)。

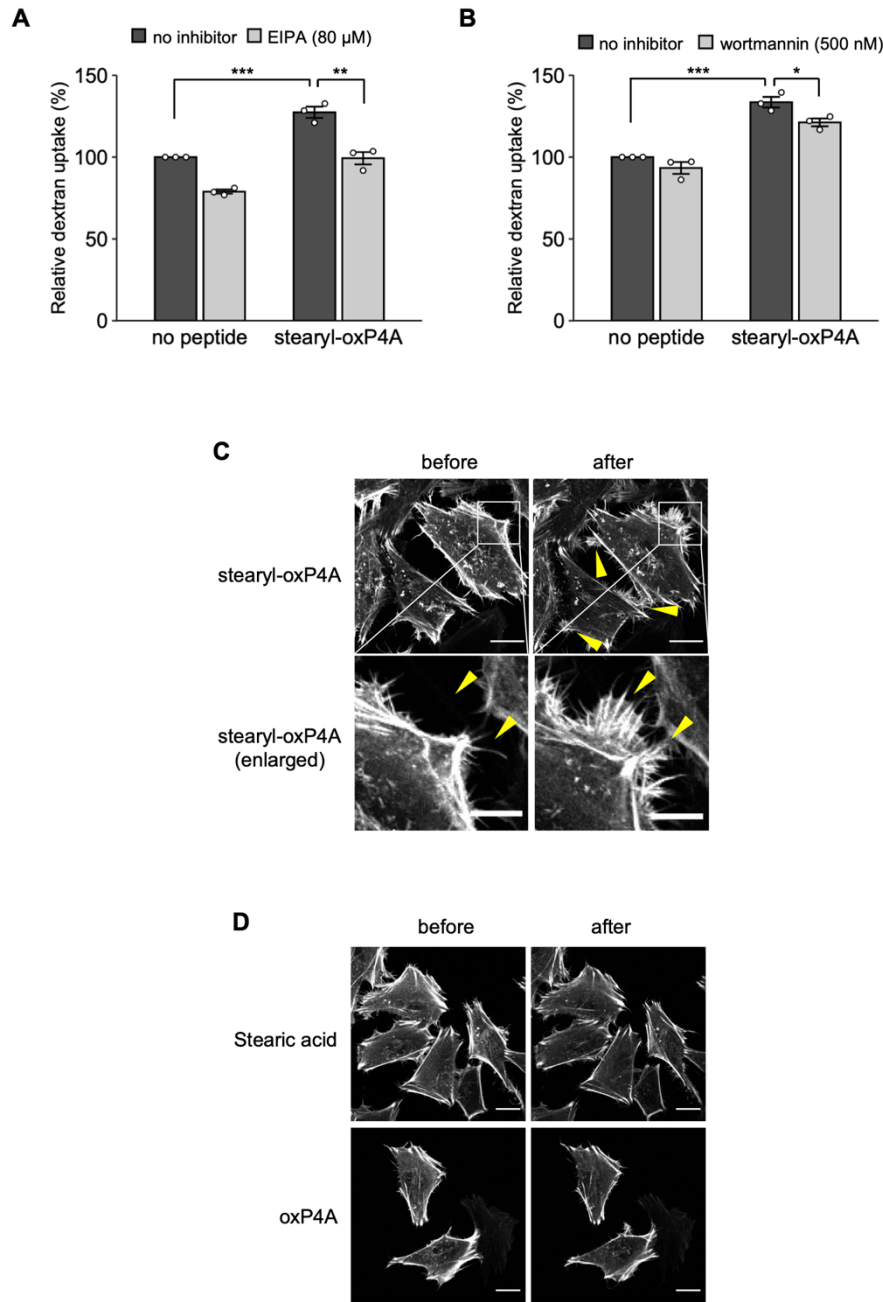


Figure 1-3. Effect of macropinocytosis inhibitors, EIPA (A) and wortmannin (B), on the cellular uptake of TMR-Dex70 in the presence of 5 μ M stearyl-oxP4A. Data are presented as mean $\pm$ SE of three independent experiments ($n = 3$). ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$ (one-way ANOVA followed by Turkey–Kramer analysis). (C) Structural alteration of F-actin (visualized using lifeact-mCherry) by the treatment with stearyl-oxP4A in serum-containing medium. Images were obtained 20 min after incubation with stearyl-oxP4A. Arrowheads represent the positions where dynamic actin projections were observed at 20 min after peptide treatment. Scale bars, 20 μ m (upper panels) and 10 μ m (lower panels). (D) No marked rearrangement of F-actin structures by the treatment with stearic acid or oxP4A (without stearylation). Scale bars, 20 μ m.

次に、P4A や oxP4A のステアシル化が血清の存在下でマクロピノサイトーシス誘導活性の向上をもたらす理由について検討を行った。理由として、ペプチドのステアシル化によって血清中のプロテアーゼによる分解が減少することと、血清タンパク質との非特異的結合を防ぎ、ペプチドが細胞表面と相互作用しやすくなることの2つの仮説が考えられたため、それぞれについての検証を行った。まず、血清中でのペプチドの分解を LC-MS で評価した。細胞内取り込み実験で使用した条件と同じ条件下において、oxP4A と stearyl-oxP4A の安定性を調べた結果、予想外にも oxP4A と stearyl-oxP4A の両方がほとんど分解されないことが示された (Fig. 1-4A)。また stearyl-P4A を同じ分析にかけると、元の stearyl-P4A ではなく、その酸化された形態 (stearyl-oxP4A) のピークが主に観察された (Fig. 1-4B)。これは、 α -MEM(+)培地中で stearyl-P4A が分子内酸化体に変換されやすいことを示唆している。生成された stearyl-oxP4A のピーク面積は 30 分間ほとんど変化しておらず (Fig. 1-4C)、ペプチドが stearyl-oxP4A に変換されて安定化することが示唆される。

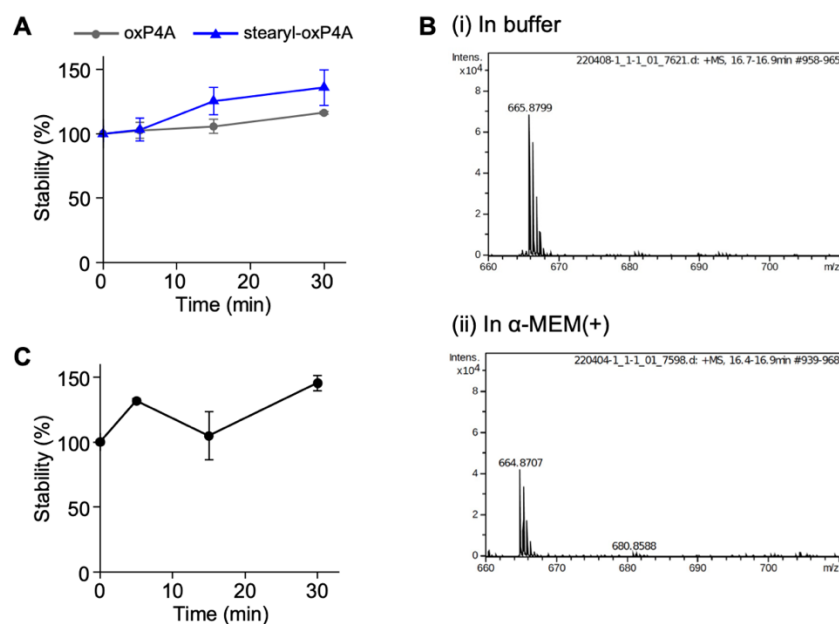


Figure 1-4. (A) Stability of oxP4A (gray) and stearyl-oxP4A (blue) in 10% bovine serum at 37 °C. Both peptides were highly stable in bovine serum after 30 min. (B) LC-MS of stearyl-P4A (i) in buffer and (ii) after dissolving in α -MEM(+) (time = 0). (C) Stearyl-P4A converted into stearyl-oxP4A, which retained its structure in serum-containing medium at 37 °C for 30 min.

2つ目の仮説検証のためにペプチドの血清タンパク質への結合について Native-PAGE を用いて調べた。5-カルボキシテトラメチルローダミン (TAMRA) 標識した oxP4A ペプチド (それぞれ stearyl-oxP4A-TAMRA と TAMRA-oxP4A) を、10%のウシ血清 (BS) または 60 μ M のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS 中でインキュベートした後、血清タンパク質をネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) により分離し、蛍光 (Fig. 1-5、TAMRA) とクマシーブルーリリアントブルー (CBB) 染色 (Fig. 1-5、CBB) で検出した。TAMRA 画像は、oxP4A および stearyl-oxP4A と結合した血清タンパク質および BSA を示し、CBB 画像は各サンプル中に含まれる全てのタンパク質を示している。BS のみをアプライしたレーン 7 の CBB 染色画像では、血清中に存在するさまざまなタンパク質成分が見られ、BSA のみをアプライしたレーン 8 では、矢印で示す主要なバンドに加えいくつかのバンドが見られた。PBS 中の BSA 濃度は、10% BS 中の濃度に相当するように設定しているが、レーン 8 の結果から BSA が自己会合により多量体を形成する可能性が示唆される[85]。

TAMRA-oxP4A を PBS 中で BS とインキュベートすると、BSA に対応する位置 (矢印) 以外に、特に高分子量領域に TAMRA のバンドが見られ、TAMRA-oxP4A が高分子量のタンパク質に吸着する可能性が示唆される (Fig. 1-4B、TAMRA、レーン 2)。TAMRA-oxP4A を PBS 中で 60 μ M BSA とインキュベートした場合にも複数の蛍光バンドが見られた (Fig. 1-5、TAMRA、レーン 3)。さらに、BSA の多量体と考えられるバンド位置において、BSA のみの CBB 染色のバンド強度と比較して、より強い TAMRA の蛍光が観察された (Fig. 1-5、CBB、レーン 3)。これは、TAMRA-oxP4A が複数のタンパク質で形成された複合体に非特異的に吸着する可能性があることを示唆している。一方、stearyl-oxP4A-TAMRA を BS および BSA とインキュベートすると、BSA に対応する位置に単一の主要なバンドが検出され (Fig. 1-5、TAMRA、レーン 5 および 6)、stearyl-oxP4A が BSA に優先的に結合することが示唆される。

次に、各ペプチドの血清への結合を超遠心法による分画を用いて評価した。BS と 20 μ M のペプチドを 37°C で 5 分間インキュベートし、超遠心により血清タンパク質への結合画分と非結合画分を分離した。上清画分における各ペプチド量をタンパク質に結合していない遊離ペプチドとして LC-MS により定量した結果、oxP4A の遊離画分はペプチド全体の 0.9%であったのに対し、stearyl-oxP4A の遊離画分は全体の 15%であり、stearyl-oxP4A は oxP4A より血清タンパク質への相互作用が減弱したことが示唆された。このことが、stearyl-oxP4A が血清含有培地中でマクロピノサイトーシスによる取り込みをより促進する能力が高いことの原因である可能性がある。

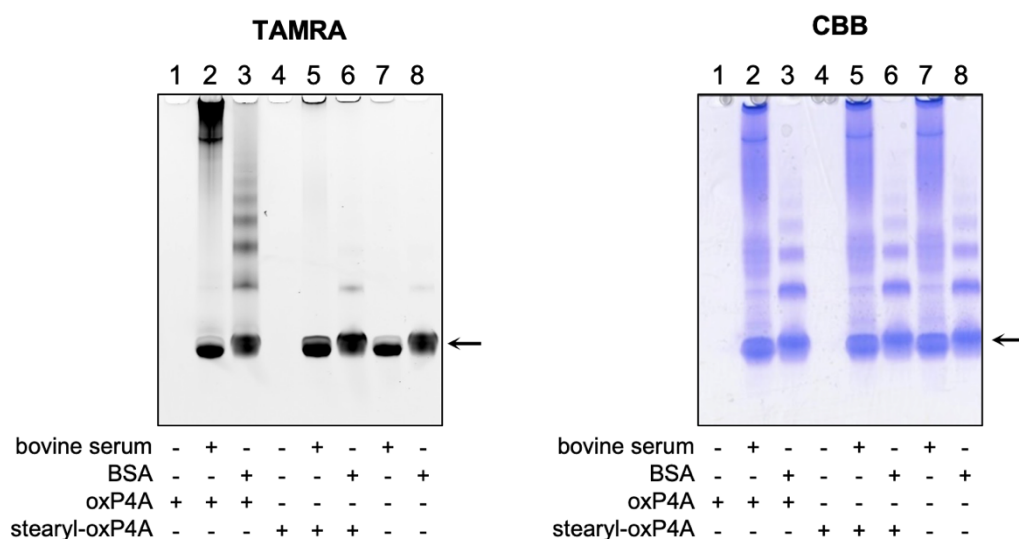


Figure 1-5. Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) analyses of the interaction of peptides with bovine serum or BSA. Each 5 μ M TAMRA-labeled peptide was incubated with 10% (v/v) serum-containing PBS, serum-free PBS, or 60 μ M BSA for 5 min at room temperature prior to analysis by native PAGE. The left image shows the detection of TAMRA-labeled peptide migrated with serum proteins. The image on the right shows the total proteins detected with CBB. Lane 1, TAMRA-oxP4A (5 μ M); lane 2, TAMRA-oxP4A (5 μ M) + 10% bovine serum; lane 3, TAMRA-oxP4A (5 μ M) + 60 μ M BSA; lane 4, stearyl-oxP4ATAMRA (5 μ M); lane 5, stearyl-oxP4A-TAMRA (5 μ M) + 10% bovine serum; lane 6, stearyl-oxP4A-TAMRA (5 μ M) + 60 μ M BSA; lane 7, 10% bovine serum; lane 8, 60 μ M BSA. Buffer: PBS containing 1% DMSO. Although no TAMRA-labeled peptides were added to the samples for lanes 7 and 8, intense bands were observed in these lanes. These might be due to intrinsic protein fluorescence observed at the relatively high concentration ranges of proteins used in this study[27].

第2節 stearyl-oxP4A存在下でのオクタアルギニンのサイトゾル送達

上記の結果は、stearyl-oxP4A が血清の存在下でマクロピノサイトーシスを誘起し、カーゴを細胞内に送達する可能性があることを示唆する。まず、アルギニンに富む CPP を使用して、細胞内送達への stearyl-oxP4A の適用性を分析した。

オクタアルギニン (R8) を含むアルギニンに富む CPP は、膜を透過しない分子の細胞内送達の手段として頻繁に用いられる。R8 はまた、マクロピノサイトーシスを誘導することでその細胞内取り込みを促進することが知られている[50,86]。これらの知見から、stearyl-oxP4A の存在下では、R8 による送達での相乗効果が期待された。これを確かめるため、HeLa 細胞を、血清含有培地中で stearyl-oxP4A (5 μ M) を添加、または非添加の条件で、C 末端を Alexa Fluor 488 で標識した R8 (R8-Alexa488) (10 μ M) で 30 分間処理し、CLSM で観察した (Fig. 1-6A, B)。stearyl-oxP4A がいない条件で R8-Alexa488 を処理した細胞では、核の周りに局在する顕著な点状の Alexa488 シグナルが観察され、R8 が主にエンドソーム内に捕捉されていることが示唆される[53]。一方で、stearyl-oxP4A の存在下で R8-Alexa488 を処理した細胞では、細胞全体に Alexa488 シグナルが拡散しているものも見られた。これは、ペプチドがサイトゾルへ移行したことを示唆する。100 以上の細胞の CLSM 画像から、サイトゾルに Alexa488 シグナルを持つ細胞の割合を計数したところ、stearyl-oxP4A がいない状態で処理した場合、サイトゾルに Alexa488 シグナルを持つ細胞の割合は 12%であったが、stearyl-oxP4A を添加した場合は 52%となり、stearyl-oxP4A の添加によって大幅に増加した (Fig. 1-6C)。Alexa488 は R8 によって送達される際の低分子医薬品のモデルと見なすことができ、この結果は、stearyl-oxP4A が機能性分子のサイトゾル移行を促進する潜在的な能力を持つことを示している。

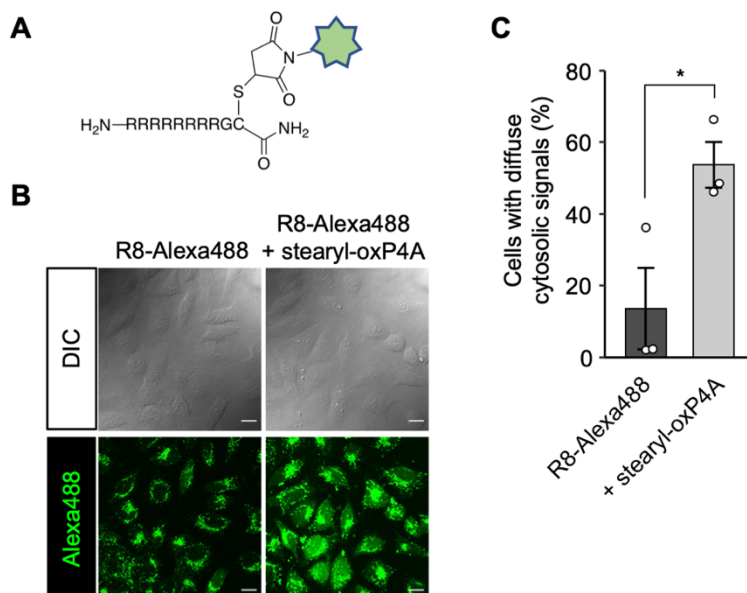


Figure 1-6. Stimulation of cytosolic distribution of R8-Alexa488 in the presence of stearyl-oxP4A. (A) Structure of R8-Alexa488. (B) CLSM observation of the cells treated with R8-Alexa488 (10 μ M) in the absence or presence of stearyl-oxP4A (5 μ M) in α -MEM(+) for 30 min. Scale bars, 20 μ m. (C) Percentage of the cells bearing diffuse cytosolic R8-Alexa488 signals. Data are presented as the mean $\pm$ SE of three independent experiments ($n = 3$). *, $p < 0.05$ (Student's t -test).

第3節 stearyl-oxP4Aによる細胞外小胞の細胞内送達

エクソソームやエクトソームを含む細胞外小胞 (EV) は細胞由来の小胞であり、内包するタンパク質や核酸などを細胞間で運搬することで、細胞間コミュニケーションを担う。この特徴から、EV は有望な薬物送達キャリアとして注目されてきたが[24-26]、細胞への取り込みや、EV の内包分子がレシピエント細胞へ移行する効率が比較的低いことが課題の一つである[25]。EV のエンドサイトーシスによる細胞内取り込みを促進する典型的なアプローチとして、標的細胞表面への親和性を高めるために、ペプチドやタンパク質で EV 表面を修飾する研究が行われており、この手法では送達における細胞特異性が付与される可能性もある。最近の研究では、オリゴアルギニンを含む細胞透過性ペプチドや、膜融合ペプチドで EV の表面を修飾する手法が報告されているが[55,61,87-91]、EV の取り込み効率にはまだ改善の余地がある。そこで本研究で開発した stearyl-oxP4A を用いて、細胞のマクロピノサイトーシスによる取り込みの促進することで、EV に内包されたカーゴのレシピエント細胞へのサイトゾル移行を促進できるかどうかを評価した。stearyl-oxP4A の EV カーゴ送達に対する効果を評価するために、(i) EV の細胞内への総取り込み量の評価と、(ii) EV に内包されたカーゴのレシピエント細胞のサイトゾルへの送達の評価を行った。

(i) の評価のため、EGFP を CD63 タンパク質の N 末端 (膜の内腔側) に融合させた EGFP-CD63 を発現する EV を用いた (Fig. 1-7A、EGFP-CD63-EV)。CD63 はテトラスパニンファミリーのタンパク質であり、エクソソームを含む EV のマーカータンパク質として頻繁に用いられている[92]。EGFP-CD63-EV を精製するために、まず EGFP-CD63 を発現する細胞の培養培地を遠心分離して、直径 200 nm 未満の EV 画分を得た[93,94]。その後、MagCapture Exosome Isolation Kit PS を用いて EGFP-CD63-EV を分離した[95]。このキットは、EV 表面に表示されるホスファチジルセリンに、 Ca^{2+} 依存的に特異的に結合する Tim4 タンパク質との相互作用によって、EV をアフィニティー精製できる。ナノ粒子トラッキング解析により、精製した EV 画分が約 100 nm の範囲の小胞で構成されていることが確認された (Fig. 1-7B)。分離した EV のウェスタンブロット分析から、EGFP と CD63 の両方が検出され、EV が CD63 を含み、EGFP で標識されていることが確認された (Fig. 1-7C)。

次に CLSM 分析を用いて、stearyl-oxP4A が EGFP-CD63-EV の細胞内取り込みに与える影響を評価した。5 μM の stearyl-oxP4A の存在下で EGFP-CD63-EV を処理した細胞では、EV の細胞内取り込みを示唆する点状の EGFP シグナルが多数観察された (Fig.1-7D)。一方、EGFP-CD63-EV のみで、stearyl-oxP4A がいない条件では、細胞内の EGFP のシグナルレベルが著しく低いことが観察された。これらの観察から、stearyl-oxP4A が EV の細胞内取り込みを増強することが明らかになった。stearyl-oxP4A の EV 取り込み促進効果は、フローサイトメトリー分析でも確認され、stearyl-oxP4A の存在下での EGFP-CD63-EV の細胞内取り込みは、ペプチド非存在下の 2.7 倍に増加した (Fig. 1-7E)。また、stearic acid と oxP4A は EV の細胞内取り込みに影響を与えないことも確認した (Fig.1-7F)。

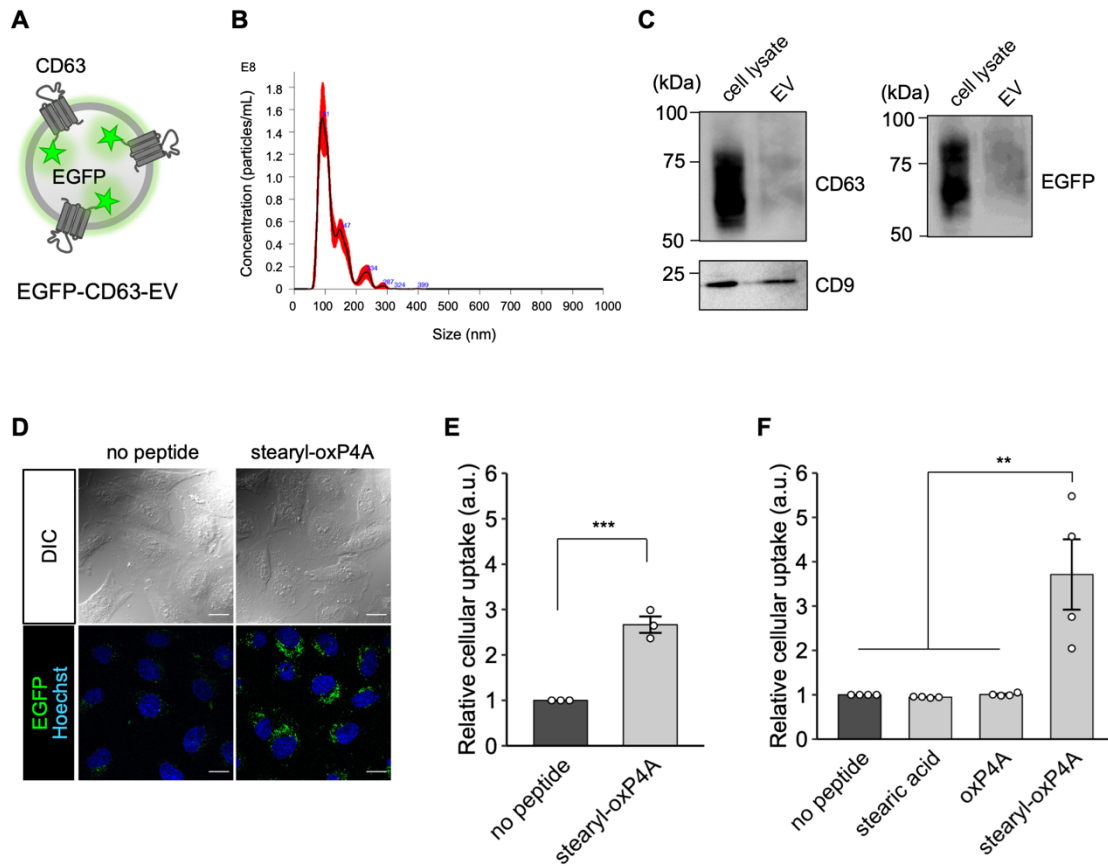


Figure 1-7. (A) Schematic illustration of sEV-bearing EGFP fused with CD63 (EGFP-CD63-sEV). (B) Size distribution from nanoparticle tracking analysis of the EGFP-CD63-EV isolated using MagCapture Exosome Isolation Kit. (C) Western blot analysis of CD63 and EGFP in the isolated EV. (D) CLSM analysis of the cells treated with EGFP-CD63-EV (green) in the absence or presence of stearyl-oxP4A (5 μ M). Nuclei were stained with Hoechst 33342 (blue). Scale bars, 20 μ m. (E) Enhanced cellular uptake of EGFP-CD63-EV in the presence of stearyl-oxP4A (5 μ M) analyzed by flow cytometry. Data are presented as mean $\pm$ SE of three independent experiments ($n = 3$). ***, $p < 0.001$ (Student's *t*-test). (F) Cellular uptake of EGFP-CD63-EV by stearic acid and oxP4A (without stearylation) (5 μ M each), compared with that of 5 μ M stearyl-oxP4A. Data are presented as mean $\pm$ SE ($n = 3$). **, $p < 0.01$ (one-way ANOVA followed by Tukey–Kramer) analysis.

薬物送達の観点から、EV が細胞内に取り込まれるだけでなく、EV に内包されたカーゴがレシピエント細胞内に放出されることが極めて重要である。上記の EGFP 蛍光の分析は、細胞に結合した、またはエンドサイトーシスされた EV 量と相関するはずであり、内包されたカーゴがレシピエント細胞内に送達されるかどうかは評価できなかった。EV カーゴのサイトゾルへの送達効率を評価するために、Fussenegger らによって報告された特定の RNA を EV に能動的にパッケージングするシステムを利用した[30] (Fig. 1-8A)。このシステムは、C/D box と呼ばれる短い RNA モチーフと、C/D box に特異的に結合するアーキアの L7Ae リボソームタンパク質を利用する。L7Ae タンパク質配列を CD63 の C 末端に融合し、L7Ae が EV 内腔内に提示されるようにした。EV に内包されたカーゴがレシピエント細胞に送達される効率を評価するためのレポーターとして分子量の小さいルシフェラーゼである NanoLuc (Nluc, 19 kDa) を用いた[96]。また Nluc-mRNA を EV に内包するため、C/D box 配列を 3'非翻訳領域 (3'-UTR) に挿入した (Nluc-C/D box mRNA)。

Nluc-C/D box mRNA を内包した EV (Nluc-mRNA-EV) は、CD63-L7Ae タンパク質および Nluc-C/D box mRNA をコードするプラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションした後、培養上清から MagCapture Exosome Isolation Kit PS を用いて Nluc-mRNA-EV を分離することによって得た。Nluc-mRNA-EV は、約 100 nm の範囲の直径を持ち (Fig. 1-8B)、EV マーカーである CD63 と CD9 を発現していることを確認した (Fig. 1-8C)。EV に内包された mRNA の送達に対する stearyl-oxP4A の効果は、2.5 μ M の stearyl-oxP4A を添加または非添加の条件で、Nluc-mRNA-EV を HeLa 細胞に添加し、37°C で 24 時間インキュベートした後、発現した Nluc のレベルを NanoGlo live-cell assay によって分析することで評価した。EGFP-CD63-EV の場合と同様に、stearyl-oxP4A の存在下では、ペプチド非存在下と比較して 2 倍以上の Nluc 活性由来の発光が見られた (Fig. 1-8D)。この結果は、stearyl-oxP4A 処理が、EV の細胞内取り込み量を増加させるだけでなく、EV カーゴのサイトゾル移行を促進するのにも効果的であることを示す。一方で、stearic acid や oxP4A の存在下では、Nluc 発現の増加は観察されなかった (Fig. 1-8E)。

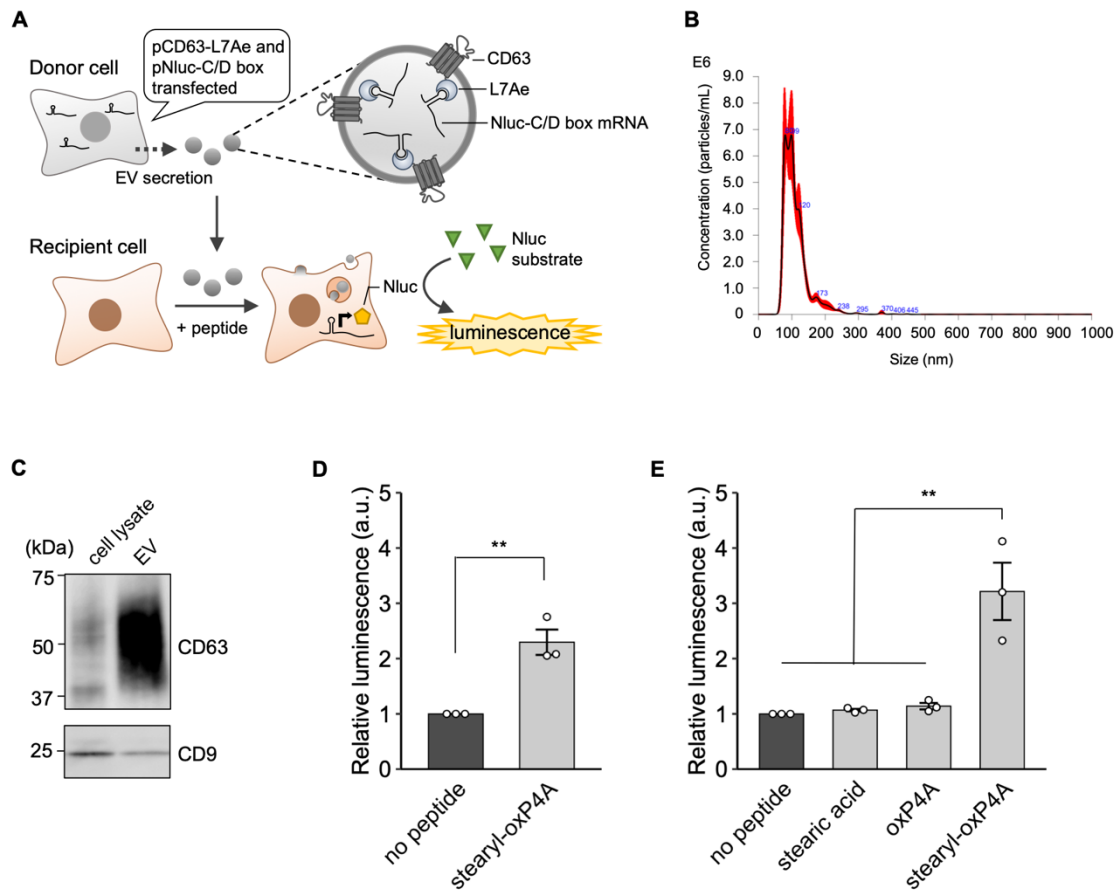


Figure 1-8. (A) Schematic illustration of the assay system analyzing the transfer of EV-encapsulated cargo using the active packaging of the Nluc reporter mRNA. (B) Size distribution from nanoparticle tracking analysis of Nluc-mRNA-EV. (C) Western blot analysis of CD63 and CD9 in the isolated EV. (D) Stearyl-oxP4A had the ability to enhance the transfer of EV encapsulates into the recipient cells. The efficacy was analyzed in terms of luciferase activity, which results from the cytosolic release of Nluc-C/D box mRNA in the recipient cells from Nluc-mRNA-EV. Data are presented as mean $\pm$ SE of three independent experiments ($n = 3$). **, $p < 0.01$ (Student's t-test). (E) Enhanced cellular uptake of Nluc-mRNA-EV and the Nluc expression in the recipient cells was observed in the presence of 2.5 μ M stearyl-oxP4A but not in the presence of stearic acid and oxP4A (2.5 μ M each). Data are presented as mean $\pm$ SE ($n = 3$). **, $p < 0.01$ (Turkey-Kramer method).

討論と展望

第 1 章では、血清存在下において強力にマクロピノサイトーシスを誘導するペプチドである *stearyl-oxP4A* を創製した。また、*stearyl-oxP4A* によるマクロピノサイトーシス誘導によって、EV の細胞内取り込みと EV 内包分子のサイトゾルへの送達を促進することを明らかにした。

マクロピノサイトーシス誘導活性を持つ P4A ペプチドは、血清存在条件では顕著に活性が低下するが[52]、本章では P4A の N 末端に長鎖のアシル基を導入することで、マクロピノサイトーシス誘導活性を向上させることに成功した (Figure 1-1)。ステアシル基の導入が最も効果的であり、TMR-Dex70 の取り込みをペプチドなしと比較して約 1.25 倍に増加した。本研究では炭素数 2 から 18 の飽和脂肪酸の導入を検討するにとどまったが、より長い脂肪酸の導入や不飽和脂肪酸の導入による活性への影響も今後の検討課題として興味深い。またアシル基を導入する位置に関しても、N 末端以外にペプチド配列内部や C 末端なども検討することで、さらなる活性向上の可能性が期待される。

ステアシル化が *oxP4A* の活性向上につながった理由について、ペプチドの血清での安定性と血清タンパク質との相互作用の観点から検討した。一般的にペプチドは血清中でプロテアーゼによって速やかに分解されることが多く、特にアルギニンや芳香族アミノ酸を含む配列が分解を受けやすいことが知られている[97–100]。しかし、意外にもステアシル化していない *oxP4A* も *stearyl-oxP4A* も分解が見られず安定であり、ステアシル化は安定性に寄与しないことが示唆された (Figure 1-4)。この安定性には分子内環化が影響している可能性が考えられる[101]。また、Figure 1-5 の Native-PAGE の結果から、ステアシル化によってペプチドの血清タンパク質への非特異的な吸着が減少し、アルブミンに特異的に相互作用するようになることが示唆された。この結果はペプチドの脂質付加がアルブミンへの結合親和性を付与するという先行研究と一致する[102,103]。これらの結果から、*oxP4A* は血清タンパク質との非特異的な吸着によりペプチドの活性部位がマスクされることで活性が失われるが、ステアシル基を導入することでアルブミンに特異的に結合して活性部位が露出した結果、活性が回復した可能性が考えられる。また、血清存在下におけるペプチドの活性発現には、血清タンパク質中の相互作用パートナーを制御することが重要であることも示唆される。Figure 1-1 でアシル基がより長い方が高活性を示した理由として、一般的に脂肪酸の炭素鎖長が長いほどアルブミンへの親和性が増加すると報告されており[104]、アルブミンとアシル化ペプチドとの親和性が関与している可能性が考えられる。

本章のアッセイシステムでは、ペプチドを EV と単に混合する手法を採用した。この条件で *stearyl-oxP4A* の有効性が示されたことから、本ペプチドによる EV あるいは他の生体ナノ粒子の直接的な表面修飾が、本研究で得られた結果と同様に送達効率を増加させる可能性が考えられ、今後の検討課題として興味深い。

また本研究から、レシピエント細胞における EV の内包分子の放出効率に関する新たな疑問も提起された。総細胞内取り込みと EV に内包された mRNA の放出の両方で、いずれも約 2~3 倍の改善効果が見られた (Figure 1-7, 1-8)。これは、EV の細胞内取り込みが、EV 内包分子のサイトゾルへの送達効率を決定する主要因である可能性を示唆している。

第2章

SARS-CoV-2 spike protein 搭載 EV による細胞選択的な mRNA 送達

序論

重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) は、コロナウイルス感染症 (COVID-19) のパンデミックを引き起こした[105]。COVID-19 治療のため、これまでに抗体療法[106]、ワクチン[107]、および低分子薬[108–110]が開発されてきたが、このような新興ウイルス感染症を迅速に治療できる新しいモダリティへの需要は高まっている。SARS-CoV-2 は、ウイルスのエンベロープ上にホモ三量体として表示されるスパイク糖タンパク質 (S タンパク質) を使用して宿主細胞に侵入する。S タンパク質は、S1 と S2 のサブユニットで構成されている。S1 サブユニットには、宿主細胞受容体であるヒトアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) に結合する受容体結合ドメイン (RBD) が含まれている。S2 サブユニットには、融合ペプチドと膜貫通ドメインが含まれている。S タンパク質が細胞表面の ACE2 受容体に結合すると、膜貫通型セリンプロテアーゼ 2 (TMPRSS2) によって S2 サブユニットの融合ペプチドの直前に位置する S2' サイトが開裂を受ける。この S2' サイトの開裂によって prefusion 構造から postfusion 構造への構造変化を起こす活性化状態になり、ウイルス膜と宿主細胞膜の融合が引き起こされ、ウイルスのゲノム RNA が宿主細胞内に放出される。また、S2 サブユニットの開裂は、ウイルス粒子がエンドサイトーシスで取り込まれた後、エンドリソソームプロテアーゼであるカテプシンによっても達成され、ウイルス膜とエンドソーム膜の融合が起こり、ウイルス RNA が宿主細胞の細胞質に放出される[111]。

上述のように SARS-CoV-2 感染には ACE2 受容体への結合とプロテアーゼによる切断が必要なため、ACE2 および TMPRSS2 を発現する細胞に感染することが明らかになっている[112]。したがって、SARS-CoV-2 の S タンパク質を発現する EV を開発すれば、SARS-CoV-2 感受性細胞に対して選択的に膜融合し、EV が内包する分子を送達することが可能であると考えた。そして S タンパク質発現 EV によって SARS-CoV-2 感染または増殖を阻害する分子を送達することで、ウイルス感染を抑制できるという仮説を立てた。これまでに S タンパク質は、SARS-CoV-2 ワクチンや SARS-CoV-2 感受性細胞への標的化のために、細菌由来 EV [113] や人工カプシドタンパク質 [114,115] 上に発現させて利用されてきた。しかし、これまでの研究では、SARS-CoV-2 感受性細胞への標的化と宿主細胞との効率的な膜融合の両方を狙って、全長の S タンパク質を発現する粒子を設計した例は報告されていない。

本研究では、SARS-CoV-2 感染を阻害する新しいモダリティとして、S タンパク質を発現する EV を開発することを目的とした。S タンパク質を発現する細胞の培養液を $10,000\times g$ で遠心した上清に含まれる EV では S タンパク質の発現がほとんど見られず、 $10,000\times g$ のペレット画分由来の EV (EV^{10K}) で発現が見られた。S タンパク質を発現する EV^{10K} (S-EV^{10K}) は、ACE2 発現細胞への選択的な膜融合を達成し、TMPRSS2 発現 Vero E6 細胞を用いて、TMPRSS2 阻害タンパク質である HAI-2 をコードする mRNA を効率的に送達可能であった。さらに、SARS-CoV-2 S タンパ

ク質ウイルス様粒子を用いたアッセイから、S-EV^{10K}を用いた mRNA 送達による HAI-2 の発現で SARS-CoV-2 感染が阻害されることを実証した。

第1節 S-EV^{10K}の調製

まず、SARS-CoV-2のSタンパク質がEV上に発現するかどうかを検証するため、Sタンパク質をコードするプラスミドをHEK293細胞にトランスフェクションし、Sタンパク質を発現させた(Fig. 2-1A)。細胞培養上清を300×gで5分間遠心分離した後、1,200×gで20分間、さらに10,000×gで30分間遠心分離することで、EVを精製した。主にエクソソームを含む10,000×gペレット画分をEV^{10K}画分と呼ぶ。さらに、最後の10,000×g遠心分離後の上清を、MagCaptureキットを用いてホスファチジルセリンに結合するタンパク質であるTim4により、エクソソームに富むEV画分(本研究ではEV^{Mag}と呼称)を精製した[95]。精製EVのウェスタンブロット分析から、Sタンパク質がEV^{10K}画分에만発現していることが示された(Fig. 2-1A)。加えて、各画分において、IEVマーカーであるCD9とアネキシンA1 [116]、およびsEVマーカーであるテトラスパニンCD63とCD81、シンテンニン(syntenin) [117,118]が発現することを確認した。これらの結果は、Sタンパク質の発現に関わらず、EVマーカーのタンパク質含量に顕著な変化がないことを示唆している。小胞体マーカーであるカルネキシン(calnexin)をEVのネガティブマーカーとして使用し、カルネキシンのシグナルはどのEVサンプルからも検出されず、EVが単離されたことを確認した。得られたEV^{Mag}とEV^{10K}の粒子サイズと粒子数を、ナノ粒子トラッキング解析(NTA)を用いて評価したところ、S-EV^{Mag}とS-EV^{10K}のサイズは、それぞれ、空ベクターであるpCIベクターをトランスフェクションしたHEK293細胞から回収されたコントロールEV^{Mag}(Cont-EV^{Mag})とCont-EV^{10K}と同程度であった(平均直径: Cont-EV^{Mag} 106 nm、S-EV^{Mag} 99 nm、Cont-EV^{10K} 170 nm、S-EV^{10K} 168 nm)。また、EVの粒子濃度はCont-EV^{Mag}が 3.7×10^{10} 粒子/mL、S-EV^{Mag}が 3.6×10^{10} 粒子/mL、Cont-EV^{10K}が 6.0×10^9 粒子/mL、およびS-EV^{10K}が 6.1×10^9 粒子/mLであり、Sタンパク質の有無で有意な差はなかった(Fig. 2-1B)。EV^{Mag}のNTA結果から、これらの粒子のほとんどが200 nm未満の粒子で構成されており、sEVの特徴と一致している。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて両方のEV^{10K}が典型的なEVの形態を示すことを確認し、このことからEVの単離が示された(Fig. 2-1C)。これらの結果は、Sタンパク質がEV^{10K}のプロファイルを変化させることなく、EV^{10K}上に発現していることを示している。

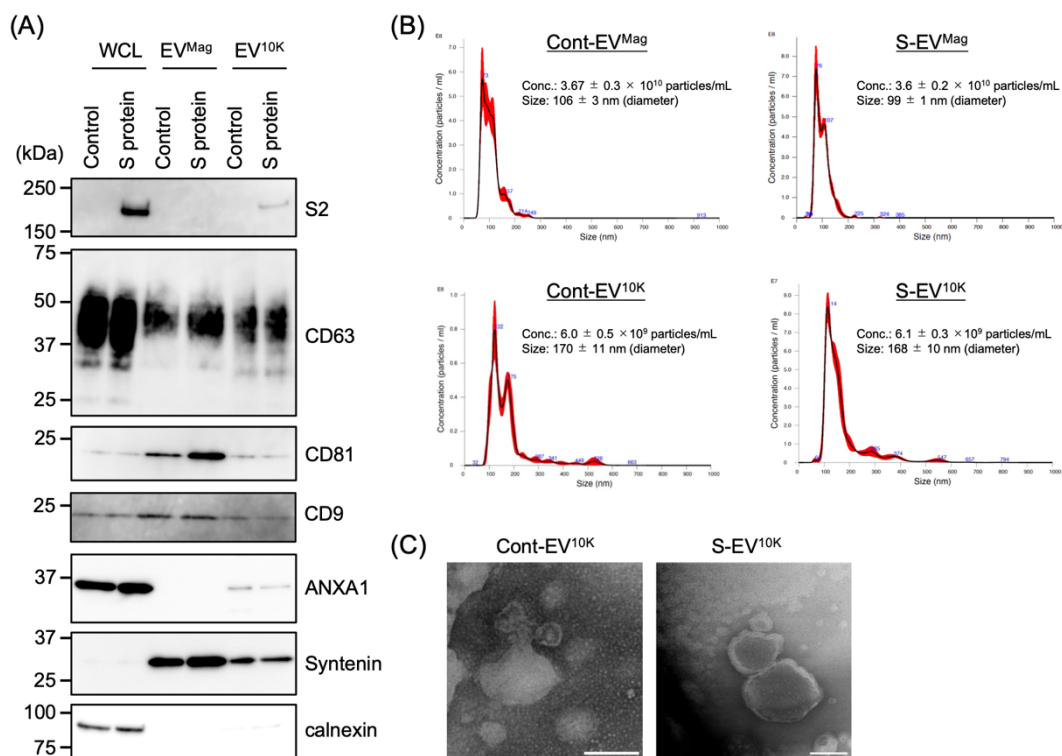


Figure 2-1. Characterization of S protein-displaying EV (S-EV^{10K}). (A) Western blot analysis of S protein in the whole cell lysates (WCL) or fractions of EV isolated using a MagCapture kit and EV pelleted by centrifugation at 10,000×g (EV^{Mag} and EV^{10K}, respectively) derived from S protein-expressing HEK293 cells or control HEK293 cells transfected with the pCI plasmid. CD63, CD81, and syntenin were used as sEV markers, CD9 and annexin A1 (ANXA1) as lEV markers, and calnexin as an endoplasmic reticulum marker. Control and S protein indicate HEK293 transfected with pCI control vector and S protein expressing vector, respectively. (B) Number and size of S-EV^{Mag}, S-EV^{10K}, control EV^{Mag} (Cont-EV^{Mag}), and Cont-EV^{10K}, determined using nanoparticle tracking analysis (NTA). The values present the mean $\pm$ standard error (SE). Representative NTA results among those measured are shown. (C) Transmission electron microscopic images of Cont-EV^{10K} and S-EV^{10K}. Scale bars, 200 nm.

第2節 S-EV^{10K}のACE2発現細胞への選択的な膜融合

所属研究室において、HiBiT と LgBiT からなるスプリットナノルシフェラーゼに基づく EV の取り込みと膜融合の定量評価系が開発されている。これは、膜融合効率（細胞に追加された EV 全量に対する、形質膜またはエンドソーム膜と融合した EV の割合）と総取り込み効率（細胞に追加された EV 全量に対する、形質膜またはエンドソーム膜と融合した EV、および細胞にエンドサイトーシスされ、まだエンドソームに捕捉されている EV の合計の割合）の両方を定量的に評価するものである（Fig. 2-2A）[32]。先行研究と同様に、スプリットナノルシフェラーゼの HiBiT ペプチド断片を CD63 の C 末端に融合させたタンパク質である CD63-HiBiT を含む S-EV^{10K} または Cont-EV^{10K} を作製し、続いてそれらの EV^{10K} を、LgBiT タンパク質を発現するレシピエント細胞に処理し、EV^{10K} の取り込みと膜融合における S タンパク質の効果を評価した。レシピエント細胞の形質膜またはエンドソーム膜との EV 膜が融合した場合、CD63-HiBiT と LgBiT が相互作用することから、生細胞内における化学発光に基づいて膜融合効率を計算した（Fig. 2-2A、live-cell assay）。さらに、レシピエント細胞を溶解した場合の化学発光を測定することで、細胞内に含まれるすべての HiBiT を検出し、膜融合した EV とエンドソームに閉じ込められたままの非融合 EV の合計を測定することによって総取り込み効率を計算した（Fig. 2-2A、cell lysis assay）。

SARS-CoV-2 の S タンパク質は、細胞表面上で TMPRSS2 依存的な切断を経て膜融合を起こす[112]。Vero E6 細胞は元より ACE2 受容体を発現しており、さらに TMPRSS2 を発現させた Vero E6 細胞（VeroE6-TMPRSS2 細胞）は、SARS-CoV-2 感染実験で頻繁に使用されている[119]。本研究では、LgBiT を安定発現する VeroE6-TMPRSS2 細胞（VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞）を樹立し、S-EV^{10K} および Cont-EV^{10K} で処理し（Fig. 2-2B）、スプリットナノルシフェラーゼ法を用いて総取り込みと膜融合効率を評価した（Fig. 2-2A）。総取り込みに対する S タンパク質の発現の効果は顕著であり、Cont-EV^{10K} の総取り込みは約 20%であったのに対し、S-EV^{10K} の総取り込みは Cont-EV^{10K} の約 3 倍の 56%となった（Fig. 2-2C）。この結果から、EV^{10K} の細胞内取り込みにおける S タンパク質と ACE2 の間の受容体相互作用の重要性が示唆される。また、S-EV^{10K} の宿主細胞膜との融合効率は 52%であったのに対し、Cont-EV^{10K} で処理した細胞ではごくわずかな膜融合しか観察されず、S タンパク質が EV^{10K} の宿主細胞との膜融合においても役割を果たすことが示された（Fig. 2-2D）。重要なことに、S-EV^{10K} によって達成された膜融合率（%）（Fig. 2-2D）はその総取り込み率（%）（Fig. 2-2C）と同程度であり、これは EV^{10K} 上の S タンパク質がほぼ定量的な膜融合と EV^{10K} 内包分子の宿主細胞のサイトゾルへの送達を達成可能であることを示唆している。S-EV^{10K} の膜融合における TMPRSS2 依存性を評価するため、TMPRSS2 を発現しない LgBiT 発現 Vero E6 細胞を S-EV^{10K} で処理し、総取り込みと膜融合効率を評価した（Fig. 2-2E）。Fig. 2-2C に示された VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞の結果と同様に、添加された S-EV^{10K} の約 60%が細胞に取り込まれた（Fig. 2-2F）。TMPRSS2 欠損細胞でも S-EV^{10K} の膜融合が観察されたが、膜融合率（%）は約 30%に減少した（Fig. 2-2G）。この傾向は、SARS-CoV-2 祖先株で観察される、TMPRSS2 発現 Vero E6 細胞に TMPRSS2 依存的な膜融合を介してより効率的に感染し、また ACE2 受容体への結合とエンドサイトーシスによる取り込み後、エンドリソソームのカテプシンによる S タンパク質の切断を経て、TMPRSS2 を発現しない Vero E6 細胞にも感染するという現象と同様である[120,121]。したがって、

S-EV^{10K}の細胞との膜融合は、TMPRSS2 またはカテプシンを介した S タンパク質の活性化によって達成されと考えられる。一方、Cont-EV^{10K}の総取り込みと膜融合においては、TMPRSS2 欠損による顕著な影響は観察されなかった (Fig. 2-2F, G)。

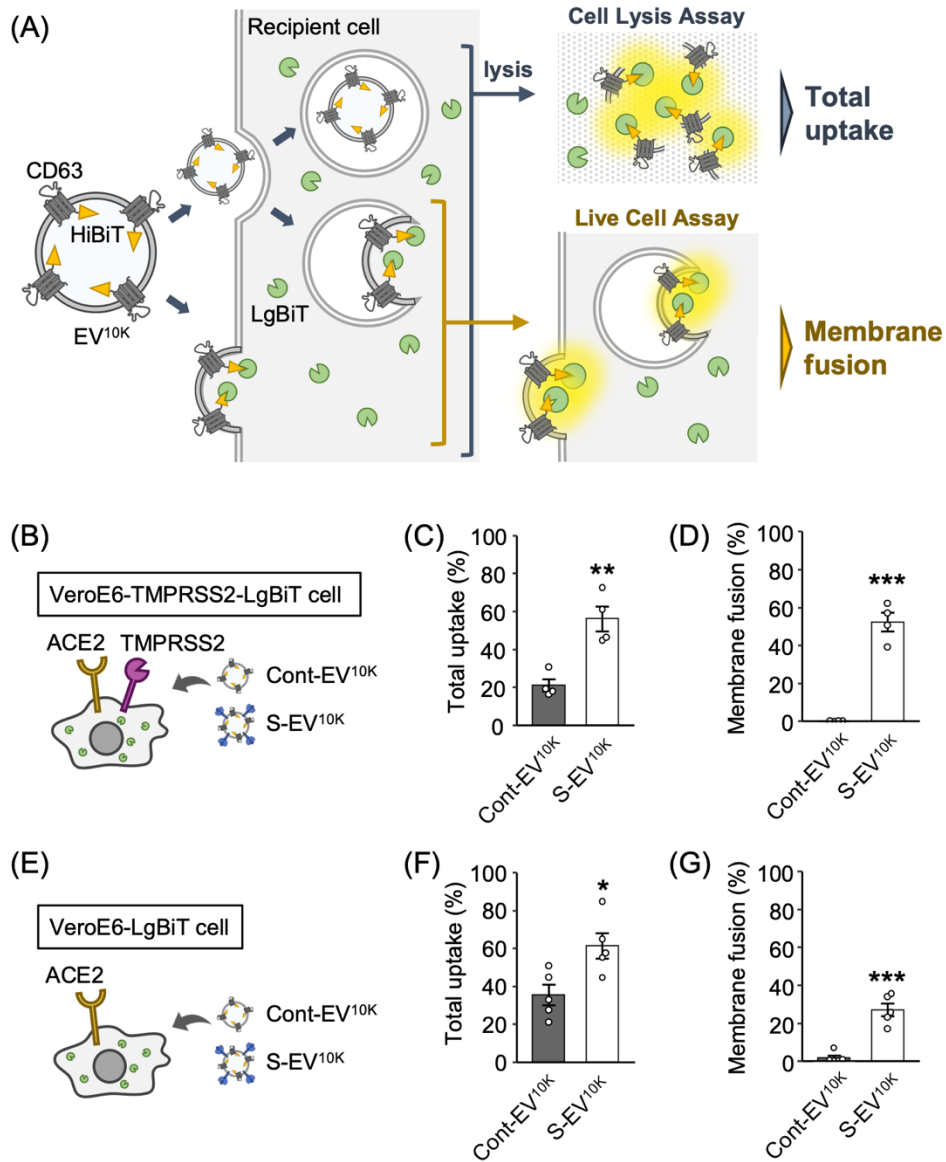


Figure 2-2. Evaluation of total uptake and membrane fusion efficiency of S-EV^{10K} in angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2)-expressing cells. (A) Evaluation system for total uptake and membrane fusion efficiency using the HiBiT-LgBiT split nanoluciferase system. [32] The total uptake of EV^{10K} is assessed by measuring the chemiluminescence of lysed recipient cells stably expressing LgBiT with EV^{10K} carrying HiBiT-fused CD63 (CD63-HiBiT). Membrane fusion is assessed by measuring chemiluminescence under live cell conditions. (B) Evaluation of total uptake and membrane fusion of S protein-displaying EV^{10K} in ACE2 and TMPRSS2-expressing cells. VeroE6-LgBiT cells expressing ACE2 and TMPRSS2 (VeroE6-TMPRSS2-LgBiT cells) were treated with Cont-EV^{10K} and S-EV^{10K} carrying CD63-HiBiT for 24 h, and chemiluminescence is measured under cell lysis and live cell conditions. (C) Total uptake (%) and (D) membrane fusion (%) in (B). (E) Evaluation of total uptake and membrane fusion of S protein-displaying EV^{10K} in ACE2-expressing cells. Vero E6 cells expressing ACE2 and LgBiT (VeroE6-LgBiT cells) were treated with Cont-EV^{10K} and S-EV^{10K} carrying CD63-HiBiT, and chemiluminescence is measured under cell lysis and live-cell conditions. (F) Total uptake (%) and (G) membrane fusion (%) in (E). Error bars represent the mean $\pm$ SE ($n \geq 4$). ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test.

さらに、EV^{10K} の細胞内取り込みにおける S タンパク質と ACE2 の間の相互作用の重要性について検討した。ACE2 を発現しない 293T-LgBiT 細胞を用いたところ、Cont-EV^{10K} も S-EV^{10K} においてもほとんど膜融合が見られなかった一方、ACE2 を発現させた 293T-LgBiT 細胞 (293T-ACE2-LgBiT 細胞) において、S-EV^{10K} を処理したことで 30%程度の膜融合効率が示された (Fig. 2-3)。よって、S-EV^{10K} の膜融合に S タンパク質の受容体である ACE2 が大きく寄与することが示唆された。

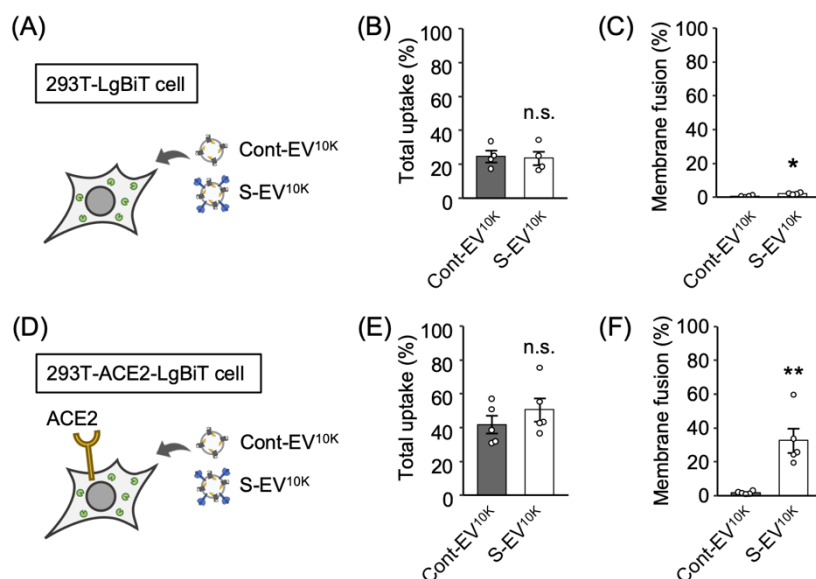


Figure 2-3. (A) Evaluation of total uptake and membrane fusion of S protein-displaying EV^{10K} in HEK293T cells that hardly express ACE2 and TMPRSS2. HEK293T cells stably expressing LgBiT (293T-LgBiT cells) were treated with Cont-EV^{10K} and S-EV^{10K} carrying CD63-HiBiT, and chemiluminescence is measured under cell lysis and live-cell conditions. (B) Total uptake (%) and (C) Membrane fusion (%) in (A). (D) HEK293T cells stably expressing ACE2 and LgBiT (293T-ACE2-LgBiT cells) were treated with Cont-EV^{10K} and S-EV^{10K} carrying CD63-HiBiT. (E) Total uptake (%) and (F) membrane fusion (%) in (D). Error bars represent the mean $\pm$ SE ($n \geq 4$). **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; n.s. signifies not significantly different for Cont-EV^{10K} versus S-EV^{10K}. The statistical analysis was conducted using Student's *t*-test. ACE2 overexpression in (D) increased the total uptake of S-EV^{10K} and the membrane fusion presumably due to the endolysosomal processing of the S protein.

また、細胞膜上の S タンパク質の発現は細胞融合を誘導し、多核細胞（シンシチウム）が形成される[122]。この細胞融合は細胞毒性をもたらすことから、安全性の点で懸念される。そこで、S-EV^{10K} が細胞間の融合を引き起こすかどうかを確認した[123]。EGFP を発現する VeroE6-TMPRSS2 細胞を、赤色蛍光タンパク質（RFP）を発現する Vero E6 細胞と共培養し、これらの細胞を S-EV^{10K} または Cont-EV^{10K} で処理した。S-EV^{10K} および Cont-EV^{10K} で処理した細胞では、緑色と赤色の蛍光シグナルが共局在する顕著なシンシチウム形成は観察されなかった（Fig. 2-4）。

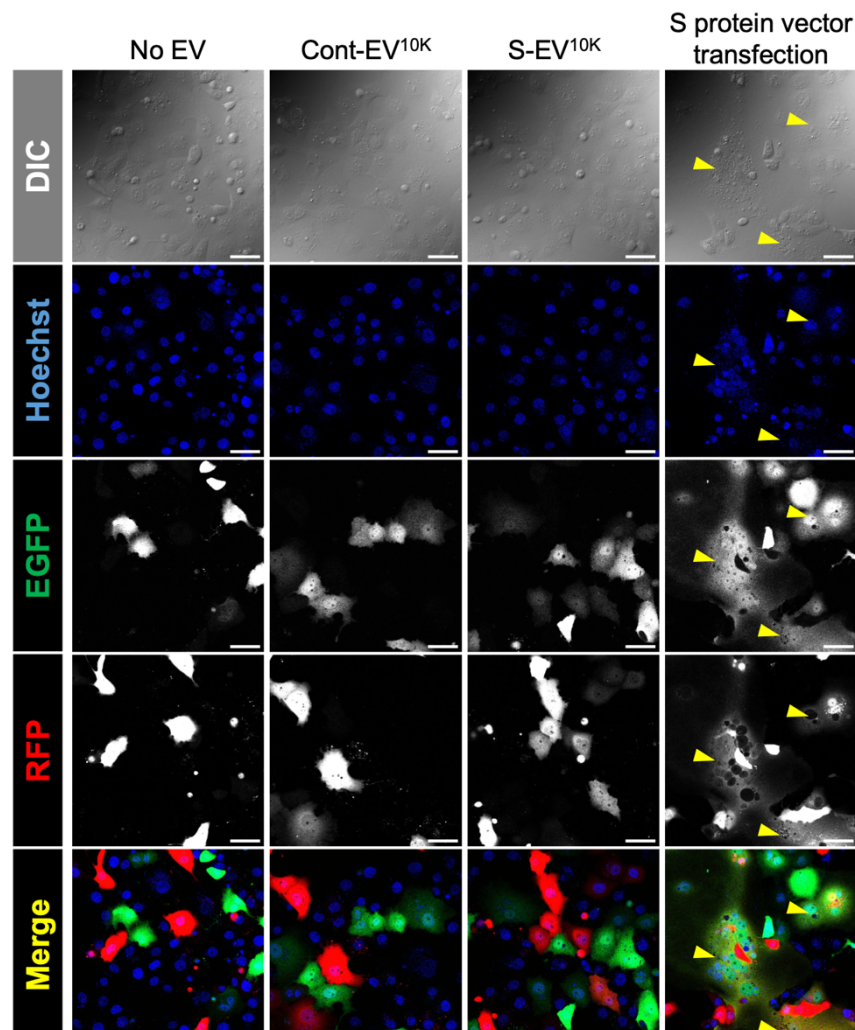


Figure 2-4. Confirmation of inability of S-EV^{10K} treatment to induce fusion among cells. EGFP-expressing cells and RFP-expressing cells were co-incubated, and the occurrence of cell fusion by the addition of EV^{10K} was monitored by observing fluorescence-merged multinucleated cells. No EV, Cont-EV^{10K}, and S-EV^{10K} represented cells without treated with EV^{10K}, and those treated with Cont-EV^{10K} and S-EV^{10K}, respectively. S protein vector transfection: EGFP-expressing cells were mixed with RFP-expressing cells and transfected with pS protein; merge of the EGFP and RFP signals and multinucleated cells were only observed in this setup (yellow arrowheads). Hoechst: nuclear staining with Hoechst33342. Scale bars, 50 μ m.

第3節 S-EV^{10K}のSタンパク質に基づいた膜融合メカニズム

SARS-CoV-2 は TMPRSS2 およびカテプシンを介した経路で細胞に感染することから[124,125]、S-EV^{10K} は内包されたカーゴをサイトゾルに送達する際にいずれの経路も利用すると考えられる (Fig. 2-2A)。そこで、様々な阻害剤を用いて、VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞における S-EV^{10K} の細胞内送達経路を詳細に検討した (Fig. 2-5A)。S-EV^{10K} を 4°C で 4 時間細胞に処理すると、総取り込みが約 75%、膜融合が約 90% 減少した (Fig. 2-5B)。これは、細胞内取り込みと膜融合にエネルギー依存的なプロセスが関与していることを示唆する。次に、様々な SARS-CoV-2 阻害剤が S-EV^{10K} の細胞内取り込みと膜融合に与える影響を調べた。SARS-CoV-2 阻害剤として、S タンパク質 RBD と宿主細胞受容体 ACE2 の結合を阻害する抗 RBD 中和抗体[126]、TMPRSS2 阻害剤である nafamostat[127]、SARS-CoV-2 膜融合阻害ペプチド 1a と 3a [128]、カテプシン阻害剤である E-64d と Z-FA-FMK [129]、およびエンドソームの酸性化を阻害する chloroquine と concanamycin A (ConcA) [130]を用いた (Fig. 2-5A)。

S タンパク質と ACE2 受容体の結合の重要性を調べるため、S-EV^{10K} をレシピエント細胞に加える前に、抗 RBD 抗体で S-EV^{10K} を前処理した。その結果、抗 RBD 抗体によって膜融合と細胞内取り込みの両方が有意に阻害されたが、中和活性のないコントロール抗体では阻害されなかった (Fig. 2-5C)。このことから、S-EV^{10K} の細胞内取り込みと膜融合には S タンパク質と ACE2 受容体の結合が重要であることが示唆された。

次に、TMPRSS2 阻害剤である nafamostat で VeroE6-TMPRSS2 細胞を処理することで、細胞表面での TMPRSS2 による S タンパク質の切断が S-EV^{10K} の細胞内取り込みと膜融合に与える影響を調べた (Fig. 2-5D)。S-EV^{10K} の総取り込みに有意な減少は観察されなかったが、膜融合は 50% 以上減少し、S-EV^{10K} の膜融合において TMPRSS2 が重要であることが示された。一方で、カテプシン阻害剤である E-64d (カテプシン B、H、および L を阻害) または Z-FA-FMK (カテプシン B および L を阻害) で細胞を処理した場合、S-EV^{10K} の細胞内取り込みも膜融合も阻害されなかった (Fig. 2-5E)。この結果から、VeroE6-TMPRSS2 細胞においてエンドサイトーシスによる取り込み後のカテプシンを介した S-EV^{10K} の活性化の寄与は、TMPRSS2 よりも有意性が低い可能性が示された。さらに、SARS-CoV-2 感染に寄与するエンドソームの酸性化[121]についても検討したところ、chloroquine と v-ATPase 阻害剤である ConcA による処理では、総取り込みへの影響はほとんどなく、膜融合はわずかな減少をもたらしたのみであった (Fig. 2-5F)。これらの結果は、TMPRSS2 発現細胞ではエンドソーム酸性化の阻害は部分的に SARS-CoV-2 感染を阻害するものの、カテプシンを介した SARS-CoV-2 感染経路の寄与が小さいという以前の報告と一致していた[121,131]。

最後に、S-EV^{10K} が S タンパク質によって膜融合しているか明らかにするために、辻らが開発した SARS-CoV-2 の S タンパク質の膜融合に寄与する S2 ドメインを標的とした強力な融合阻害ペプチドを用いた[128]。これらのペプチド (引用文献 128 の 1a とより強力な類縁体である 3a (Table 2)) で細胞を処理すると、膜融合の有意な阻害 (約 75%) が観察された (Fig. 2-5G)。一方で、コントロールとしてヒト免疫不全ウイルス (HIV) 膜融合阻害ペプチド SC34 [132]で処理した細胞では、取り込みまたは膜融合効率に有意な変化は観察されなかった。したがって、EV^{10K} 上に発現している S タンパク質は、SARS-CoV-2 ウイルス上の S タンパク質と同様の膜融合メカニズムを保

持しており、EV 膜と細胞膜との融合を引き起こすと言える。

これらの阻害剤実験の結果をまとめると、S-EV^{10K} の膜融合が、ACE2 と TMPRSS2 に駆動される S タンパク質に起因したメカニズムによって達成されることを強く示唆しており、TMPRSS2 発現細胞における SARS-CoV-2 感染経路との類似点が示された。

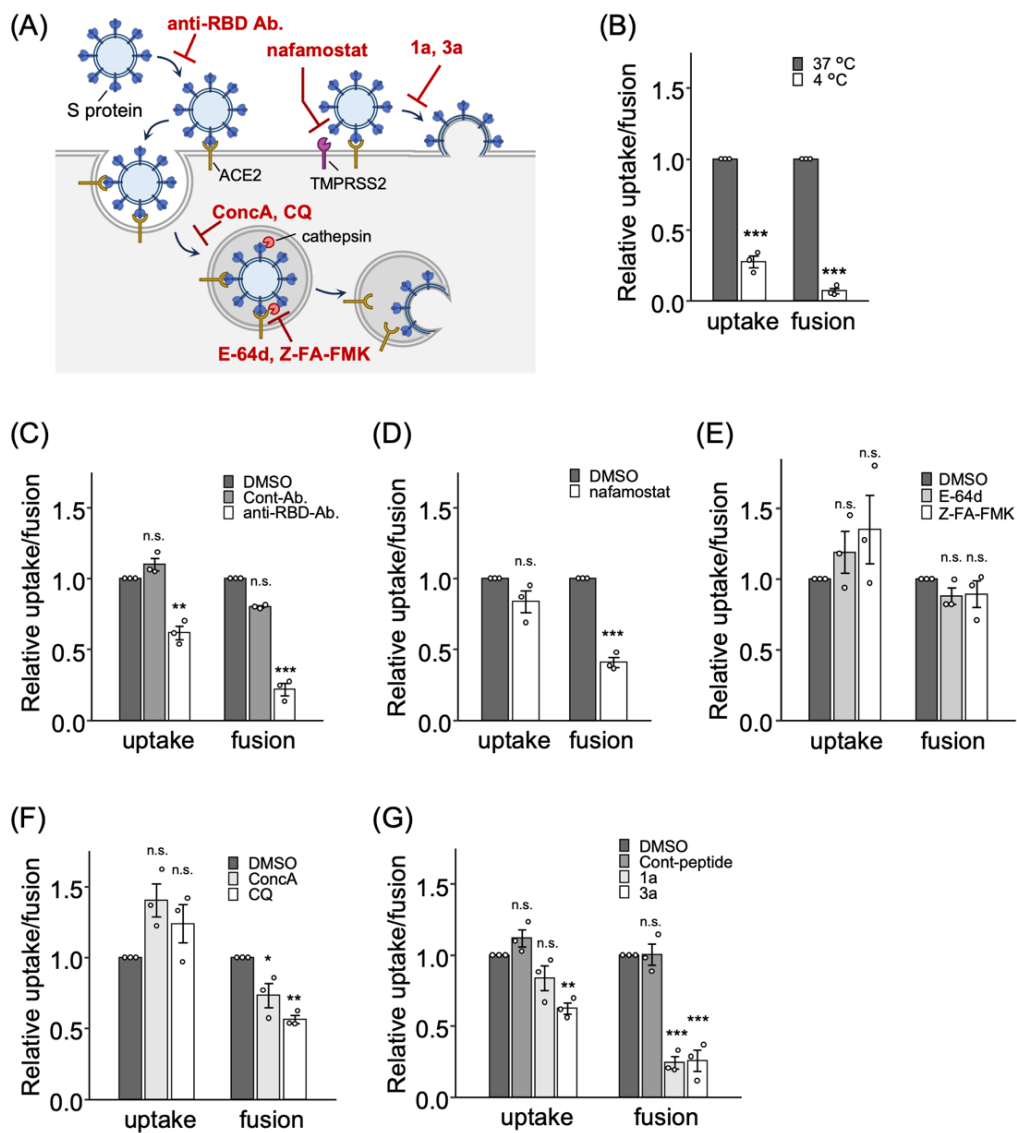


Figure 2-5. Analysis of the mechanisms for cellular uptake and membrane fusion of S-EV^{10K}. (A) Schematic diagram indicating the points of inhibition by various inhibitors. (B) Cellular uptake efficiency and membrane fusion efficiency at 4°C. The values at 37 °C as the control group are each set to 1. The results are presented as the mean $\pm$ SE ($n = 3$). ***, $p < 0.001$. Statistical analyses were conducted using Student's t -test. Cellular uptake and membrane fusion efficiencies after treatment with (C) a control antibody (anti-S2 antibody) which does not inhibit SARS-CoV-2 infection or an anti-RBD antibody, (D) TMPRSS2 inhibitor, nafamostat, (E) cathepsin inhibitors E-64d or Z-FA-FMK, (F) endosome acidification inhibitors concanamycin A (ConcA) or chloroquine (CQ), and (G) SARS-CoV-2 membrane fusion inhibitory peptides (1a and 3a in reference 128). An HIV membrane fusion inhibitory peptide, SC34, in reference 132, as a control. (C-G) The values are expressed relative to the DMSO-treated condition as the control group, which is set to 1. Treatment was done for 4 h. The results are presented as the mean $\pm$ SE ($n = 3$). ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; n.s., not significant. Statistical analyses were conducted using one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's test.

第4節 S-EV^{10K}によるTMPRSS2発現細胞へのmRNA送達

S-EV^{10K}に内包された mRNA が VeroE6-TMPRSS2 細胞に送達され、タンパク質発現を誘導できるかどうかを検討するため、HiBiT-LgBiT に基づくスプリットルシフェラーゼを用いた評価系を設計した (Fig. 2-6A)。S タンパク質に加えて、先行研究の方法[30]に従って mRNA 内包を促進するため、EV マーカータンパク質である CD63 と、mRNA の C/D box モチーフに結合する RNA 結合タンパク質である L7Ae の融合体 CD63-L7Ae を EV^{10K} に搭載した。HiBiT タグ付き HSP70 (HSP70-HiBiT) と 3'末端に C/D box をコードする配列を含む mRNA を使用し、HSP70-HiBiT mRNA を内包した Cont-EV^{10K} と S-EV^{10K} (それぞれ HSP70/Cont-EV^{10K}、HSP70/S-EV^{10K}) を調製した。VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞をこれらの EV^{10K} で 24 時間処理し、ナノルシフェラーゼに由来する化学発光を測定することで HSP70-HiBiT の発現、ひいては EV^{10K} が内包する mRNA の送達を評価した。その結果、これらの EV^{10K} 間で観察された発光は顕著な差が見られ、HSP70/S-EV^{10K} の処理では HSP70/Cont-EV^{10K} と比較して 44 倍もの発光の増加が見られた (Fig. 2-6B)。HSP70/Cont-EV^{10K} と HSP70/S-EV^{10K} の粒子サイズと粒子数は NTA で測定し、S タンパク質発現による顕著な差がないことを確認した (Fig. 2-7A)。また各 EV^{10K} が内包する HSP70-HiBiT mRNA のコピー数を定量 PCR (qPCR) で分析し、いずれも EV^{10K} が 100 粒子あたり約 2 コピーと同等であることが示された (Fig. 2-7B)。したがって、HSP70/S-EV^{10K} に内包された mRNA は、S タンパク質による ACE2 の認識と膜融合を介して標的細胞に効率的に送達され、タンパク質発現が達成されたと考えられる。

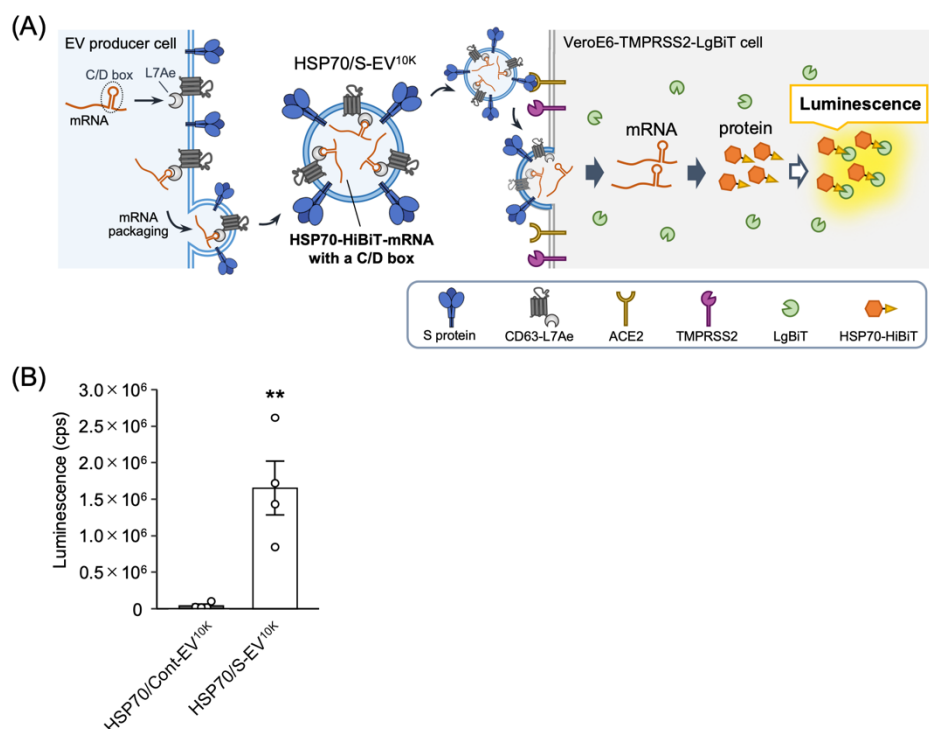


Figure 2-6. Delivery of HSP70-HiBiT-mRNA to recipient cells via S-EV^{10K}. (A) Schematic representation of the evaluation system for mRNA delivery to recipient cells by S-EV^{10K}. HSP70/S-EV^{10K} containing HSP70-HiBiT-mRNA with a C/D box and CD63-L7Ae for mRNA capture are exposed to recipient VeroE6-TMPRSS2-LgBiT cells. mRNA delivery into recipient cells resulted in HSP70-HiBiT expression and association with LgBiT, which was evaluated by measuring luminescence derived from reconstituted nanoluciferase under live cell conditions. (B) Luminescence in VeroE6-TMPRSS2-LgBiT cells treated with HSP70/Cont-EV^{10K} or HSP70/S-EV^{10K} which contain HSP70-HiBiT-mRNA. Error bars represent the mean ± SE (n = 4). **, $p < 0.01$ for HSP70/Cont-EV^{10K} versus HSP70/S-EV^{10K}. Statistical analyses were conducted using Student's *t*-test.

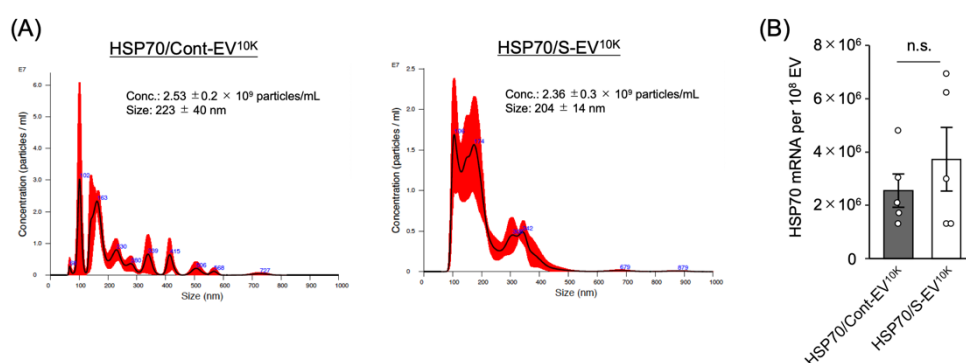


Figure 2-7. (A) The number and size of HSP70/Cont-EV^{10K} or HSP70/S-EV^{10K} determined by nanoparticle tracking assay (NTA). The values present the mean ± standard error. Representative NTA results are shown. (B) Loading of HSP70-HiBiT mRNA in HSP70/Cont-EV^{10K} and HSP70/S-EV^{10K}. Error bars represent the mean ± SE (n = 5). n.s. signifies not significantly different for Cont-EV^{10K} versus S-EV^{10K}. The statistical analysis was conducted using Student's *t*-test.

第5節 S-EV^{10K}によるTMPRSS2阻害タンパク質HAI-2のmRNA送達とSARS-CoV-2の侵入阻害

これまでの結果から、S-EV^{10K} が SARS-CoV-2 感受性細胞へ選択的かつ効率的に mRNA を送達できることが示された。S-EV^{10K} の SARS-CoV-2 感染阻害への適用可能性を示すため、S-EV^{10K} を介した感染阻害タンパク質をコードする mRNA の送達と阻害効果を検討した。本研究では感染阻害タンパク質として、S タンパク質活性化に重要なセリンプロテアーゼである TMPRSS2 を阻害することで知られる HAI-2 [133]を採用した。HAI-2 は SARS-CoV-2 感染を阻害することが報告されている[134]。HAI-2 mRNA を内包する S-EV^{10K} (HAI-2/S-EV^{10K}) の調製には、上述と同様の C/D box と L7Ae を利用したシステムを利用した。HAI-2/S-EV^{10K} を調製するために EV 産生細胞に HAI-2-C/D box をコードするプラスミドをトランスフェクションしたが、これは産生細胞における HAI-2 タンパク質の発現ももたらした。したがって、結果として得られた HAI-2/S-EV^{10K} は、HAI-2 mRNA を含有するだけでなく (Fig. 2-8A-a)、HAI-2 タンパク質も含有しており (Fig. 2-8A-b)、S-EV^{10K} 上に発現する HAI-2 による TMPRSS2 活性と SARS-CoV-2 侵入のさらなる阻害効果が期待された。阻害効果を評価するため、HIV Gag を介して形成された SARS-CoV-2 S タンパク質シェードタイプウイルス様粒子 (S-VLP) を使用した。これを用いることにより、本物のウイルスを使用せずに SARS-CoV-2 阻害剤のスクリーニングが可能であり、BSL3 実験室を必要としないアッセイシステムとして確立されている[135,136]。S-VLP は SARS-CoV-2 の S タンパク質を発現しており、ルシフェラーゼを含んでいる。そのため、S-VLP の阻害効果はルシフェラーゼ活性を測定することで評価できる。

HAI-2 mRNA を内包する HAI-2/S-EV^{10K} を L7Ae-C/D box のシステムを用いて調製するため、S タンパク質、CD63-L7Ae、および HAI-2-FLAG-C/D box をコードするプラスミドを EV 産生細胞にトランスフェクションした。ウェスタンブロット分析により、S タンパク質の有無に関わらず、細胞内と EV^{10K} の両方において HAI-2 の発現が確認された (Fig. 2-8B)。HAI-2/S-EV^{10K} のサイズと粒子数は、S タンパク質発現がない HAI-2-EV^{10K} (HAI-2/Cont-EV^{10K}) と同等であった (Fig. 2-8C)。qPCR 分析により、HAI-2/S-EV^{10K} が HAI-2/Cont-EV^{10K} と同様の量の HAI-2 mRNA を含んでいることを確認した (Fig. 2-8D)。レシピエント細胞を HAI-2-EV^{10K} で処理した際にレシピエント細胞内で HAI-2 が発現するかどうかを、ウェスタンブロッティングで調べた。その結果、HAI-2/S-EV^{10K} で処理した細胞で HAI-2 発現が確認されたが、HAI-2/Cont-EV^{10K} で処理した細胞では発現が見られなかった (Fig. 2-8E)。

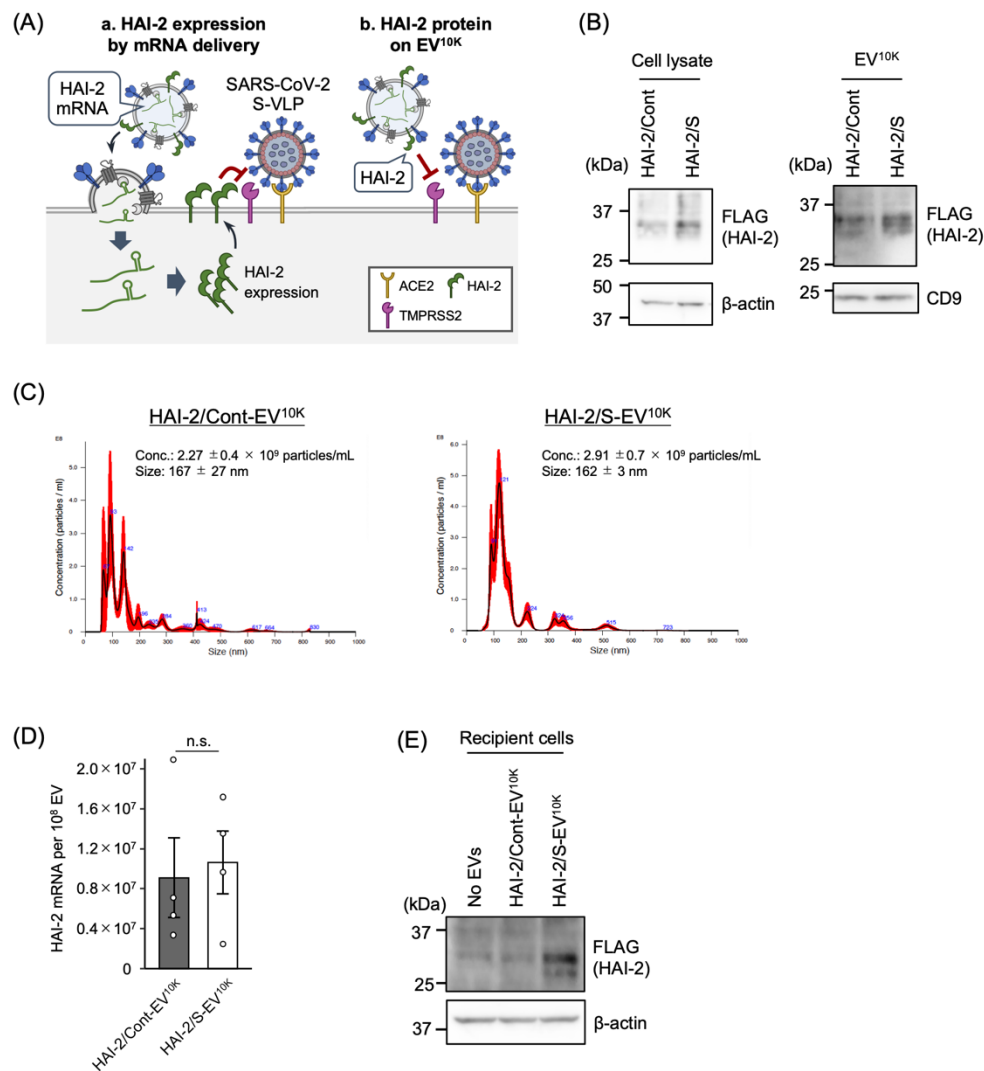


Figure 2-8. Evaluation of the inhibitory effect of S-EV^{10K} delivering HAI-2 mRNA on SARS-CoV-2 entry. (A) Schematic representation of the mechanism by which SARS-CoV-2 or S-VLP entry is inhibited by HAI-2 protein which translated in recipient cells from mRNA delivered via S-EV^{10K}. HAI-2 mRNA carried by S-EV^{10K} is delivered to VeroE6-TMPRSS2 cells, where the expressed HAI-2 inhibits TMPRSS2 on the cell surface, thereby preventing S protein cleavage of S-VLP (a, left panel). Alternatively, the HAI-2 protein displayed by S-EV^{10K} may directly inhibit TMPRSS2 localized on the cell surface (b, right panel). (B) Western blot analysis of HAI-2 protein in the cell lysate (left panel) of EV^{10K}-producing cells or in HAI-2/Cont-EV^{10K} and HAI-2/S-EV^{10K} (right panel). Beta-actin was used as a loading control, and CD9 was used as an EV marker. We used FLAG-tagged HAI-2 in this study and confirmed the expression using anti-FLAG primary antibody. (C) The number and size of HAI-2/Cont-EV^{10K} or HAI-2/S-EV^{10K} determined by nanoparticle tracking assay (NTA). The values present the mean $\pm$ standard error (SE). Representative NTA results are shown. (D) Loading of HAI-2 mRNA in HAI-2/Cont-EV^{10K} and HAI-2/S-EV^{10K}. Error bars represent the mean $\pm$ SE (n = 4). n.s. signifies not significantly different for HAI-2-EV^{10K} versus HAI-2/S-EV^{10K}. The statistical analysis was conducted using Student's t-test. (E) Western blot analysis of HAI-2 protein in cell lysate prepared from VeroE6-TMPRSS2 cells treated with HAI-2/Cont-EV^{10K} or HAI-2/S-EV^{10K}. Beta-actin was used as a loading control.

次に、SARS-CoV-2 祖先株の S タンパク質 VLP (S^{WT} -VLP) の侵入に対する HAI-2-EV^{10K} の阻害効果を評価した。VeroE6-TMPRSS2 発現細胞を HAI-2/Cont-EV^{10K} または HAI-2/S-EV^{10K} と 24 時間インキュベートし、その後 S^{WT} -VLP に 16 時間曝露し、 S^{WT} -VLP によって送達されたルシフェラーゼに由来する化学発光を測定した (Fig. 2-9A)。その結果、HAI-2/S-EV^{10K} による処理は有意に S^{WT} -VLP の侵入を阻害し、その阻害効果は S タンパク質の切断と SARS-CoV-2 感染を阻害することで知られるセリンプロテアーゼ阻害剤 nafamostat を用いた場合と同程度であった (Fig. 2-9B) [127]。対照的に、S タンパク質を発現せず、HAI-2 mRNA を内包している HAI-2/Cont-EV^{10K} の処理では、 S^{WT} -VLP 侵入に対する顕著な阻害効果は見られなかった。また、この化学発光の減少が、細胞毒性による細胞の減少によるものではないことを確認した (Fig. 2-9C)。したがって、S-EV^{10K} に内包された HAI-2 mRNA は、レシピエント細胞に効率的に送達され、HAI-2 の発現とそれに続く TMPRSS2 阻害による S^{WT} -VLP の侵入抑制を引き起こしたと考えられる。さらに、最近流行した SARS-CoV-2 変異株に対する有効性を評価するため、オミクロン変異株 BA.2.75 (S^{BA} -VLP) および XBB.1.5 (S^{XBB} -VLP) の S タンパク質を発現する S-VLP を用いて同様の実験を行った。その結果、HAI-2/S-EV^{10K} による処理で感染が有意に減少した (BA.2.75 で 29%、XBB.1.5 で 36% ; Fig. 2-10)。オミクロン変異株に対する阻害効果は、祖先株に対するものよりも小さかったが、これはオミクロン変異株の侵入に対する TMPRSS2 依存性が減少するという先行研究の報告と一致する [137,138]。今後、S-EV^{10K} の *in vivo* での細胞選択性を評価し、より高い感染阻害活性を持つタンパク質をコードする mRNA や、ウイルス RNA を標的とする siRNA または miRNA を細胞内に送達することで、将来的に SARS-CoV-2 に対する治療法や予防法の創出につながる可能性がある。

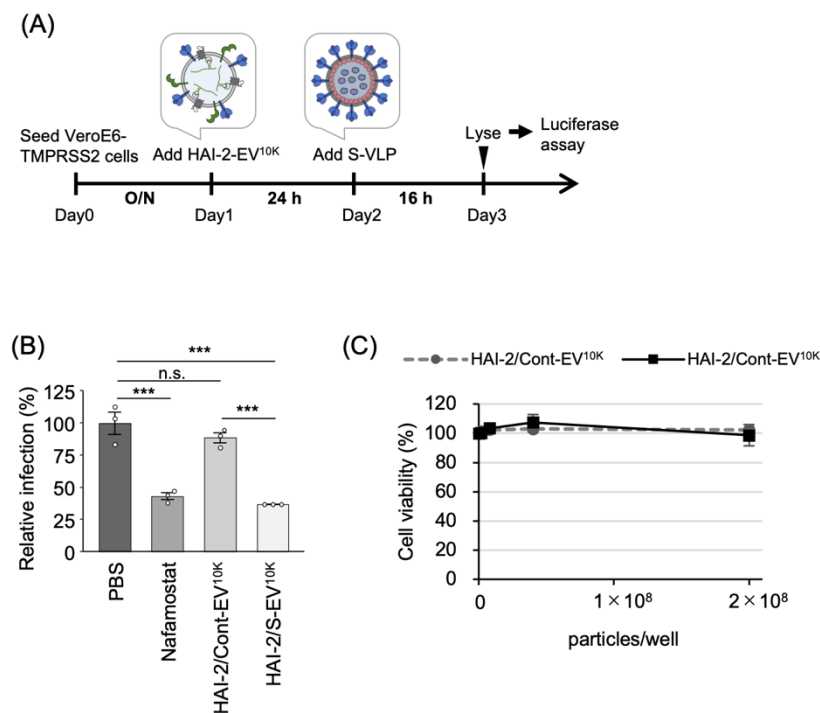


Figure 2-9. (A) Experimental scheme for evaluating the inhibition of S-VLP entry. VeroE6-TMPRSS2 cells seeded in a microplate were treated with nafamostat, HAI-2/Cont-EV^{10K}, or HAI-2/S-EV^{10K}. After 24 h, S-VLP were added, and luminescence from S-VLP-derived luciferase was measured after 16 h. (B) Evaluation of chemiluminescence from S^{WT}-VLP-derived luciferase. The values are expressed as a percentage relative to cells pretreated with phosphate buffered saline (PBS), set as 100% entry. Error bars represent the mean ± SE (n = 3). ***, $p < 0.001$; n.s. indicates not significantly different compared to the PBS treatment group. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's test. (C) Cell viability in VeroE6-TMPRSS2 cells treated with HAI-2/Cont-EV^{10K} and HAI-2/S-EV^{10K} for 24 h. Error bars represent the mean ± SE (n = 3).

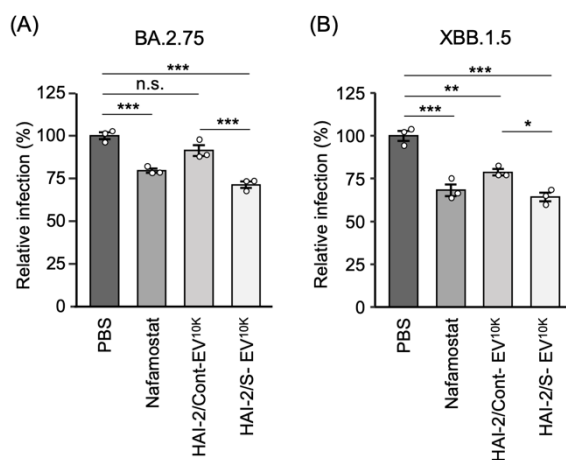


Figure 2-10. Evaluation of the inhibitory effect of S-EV^{10K} delivering HAI-2 mRNA on entry of Omicron variants S protein VLP, (A) S^{BA}-VLP (BA.2.75) and (B) S^{XBB}-VLP (XBB.1.5). The values are expressed as a percentage relative to cells pretreated with phosphate buffered saline (PBS), set as 100% entry. Error bars represent the mean ± SE (n = 3). ***, $p < 0.001$; **, $p < 0.01$; *, $p < 0.05$; n.s. indicates not significantly different compared to the PBS treatment group. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA, followed by Tukey's test.

討論と展望

本研究では、SARS-CoV-2 感染を阻害するための新しいモダリティとして、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質（S タンパク質）を EV^{10K} 上に発現させた S-EV^{10K} を開発した。このアプローチは、SARS-CoV-2 感受性細胞への効率的な mRNA 送達を可能にし、特に新興感染症に対する抗ウイルス療法のための新しいプラットフォームとなることが期待される。

まず、SARS-CoV-2 S タンパク質を発現する細胞由来の EV^{10K} において、S タンパク質が EV^{10K} に提示されることを示した。先行研究では、S タンパク質を発現するリポソームなどの人工膜をワクチン抗原として使用した例が報告されているが[139,140]、S タンパク質は通常エクソソーム上には発現されないことも報告されている[114]。この報告と一致して、本研究では EV^{Mag} 上には S タンパク質がほとんど存在しないか、あるいは全く存在しないことが示された。一方、EV^{10K} 上では S タンパク質が明確に検出された (Fig. 2-1A)。S タンパク質が細胞表面に発現し、細胞間融合を促進することが報告されていることを考えると (Fig. 2-4 右列) [122,141]、形質膜由来のエクソソームを多く含む EV^{10K} 上に S タンパク質が存在することは合理的な結果であると言える。また、VSV-G 発現 EV において、sEV よりも IEV の方が膜融合活性が高いことが報告されており[32]、本研究においても比較的大きなサイズの EV^{10K} 画分で S タンパク質発現に起因する高効率な膜融合が見られた。この結果から、形質膜由来のエクソソームを含む画分に機能性タンパク質を提示することで、薬物送達活性の高い EV を創出できる可能性が高いことが示唆された。

所属研究室で開発された HiBiT-LgBiT に基づくアッセイシステムを利用して[32]、S-EV^{10K} において細胞に取り込まれた割合と膜融合を起こした割合を定量的に評価した。その結果、S-EV^{10K} の取り込みと膜融合の両方が ACE2 と TMPRSS2 の発現に依存し、SARS-CoV-2 と同様の挙動を示すことが明らかとなった (Fig. 2-2)。特に、VeroE6-TMPRSS2 細胞において、S-EV^{10K} は高い膜融合活性を示した。これは、SARS-CoV-2 祖先株が、TMPRSS2 が発現する細胞においては TMPRSS2 を介した形質膜での膜融合経路 (TMPRSS2 経路) を優先的に利用し、TMPRSS2 が発現しない細胞ではエンドソームからの膜融合 (エンドソーム経路) が優位になることを実証した先行研究の結果と一致する[112,142]。また、TMPRSS2 の過剰発現が SARS-CoV-2 の感染性を高めることが報告されており[120]、これは TMPRSS2 発現細胞において S-EV^{10K} の膜融合が高い効率で起きるという本研究での結果をさらに支持するものである。一方で、S タンパク質を発現しない Cont-EV^{10K} では膜融合は観察されず、EV^{10K} が本来融合活性をほとんど持たないことが確認された[32]。

ACE2 を発現させた 293T 細胞と ACE2 を発現させていない 293T 細胞とを比較すると、S-EV^{10K} の取り込みは同程度であったが、膜融合は ACE2 発現細胞でのみ有意に増加した (Fig. 2-3)。この結果は、ACE2 への結合が SARS-CoV-2 S タンパク質の切断による活性化と膜融合に不可欠であるという報告と一致する[124,143]。

これらの発見は、S タンパク質を発現する EV^{10K} が、SARS-CoV-2 と同様の細胞指向性と膜融合特性を示し、ACE2 と TMPRSS2 を発現する標的細胞との選択的な膜融合を可能にすることを示唆する。したがって、S-EV^{10K} は、SARS-CoV-2 の侵入経路を模倣する薬物キャリアとしてだけでなく、ウイルス侵入と膜融合メカニズムを解明するための研究ツールとしても機能することが期待される。

また、本研究では膜融合経路を詳細に調べるため、阻害剤実験を行った。VeroE6-TMPRSS2 細胞における S-EV^{10K} の膜融合は、TMPRSS2 阻害剤である nafamostat によって顕著に抑制されたが (Fig. 2-5D)、カテプシン阻害剤では抑制されなかった (Fig. 2-5E)。これは、SARS-CoV-2 祖先株の感染が TMPRSS2 に依存するという報告と一致する[112,121]。エンドソーム酸性化阻害剤である ConcA による処理は、膜融合をわずかに減少させた。これは、エンドソーム pH 中和剤である塩化アンモニウムが TMPRSS2 発現細胞における SARS-CoV-2 感染をわずかに阻害するという以前の報告と同様である[121]。これらの結果は、S-EV^{10K} の膜融合が主に TMPRSS2 を介した経路によって駆動され、ウイルスの膜融合メカニズムと類似していることを強く示唆している。さらに、S-EV^{10K} はシンシチウム形成や細胞毒性を引き起こさず (Fig. 2-4, 2-9C)、安全な送達キャリアとなりうる可能性を示した。将来的な実用化には、TurboID のような近接標識ツール[144]を用いた研究を行い、S-EV^{10K} の *in vivo* での生体内分布を解明し、生物学的安全性プロファイルをさらに検証していく必要がある。また、本研究では ACE2 発現細胞への標的化は示されたが、ACE2 は肺のみならず、小腸、腎臓、心臓や血管内皮など多くの臓器に広く発現しているため[145]、特定の組織を狙うことは困難であると考えられる。標的組織への選択的な送達を達成するためには、今後 S-EV^{10K} の投与方法の工夫やさらなる標的化戦略を検討する必要がある。

本研究では、mRNA を S-EV^{10K} に内包し、VeroE6-TMPRSS2 細胞などの標的細胞に送達することで、HSP70-HiBiT や HAI-2 を含む機能性タンパク質の標的細胞での発現を達成した (Fig. 2-6B, 2-8E)。HAI-2 は II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ阻害剤であり、TMPRSS2 活性を抑制することで、SARS-CoV-2 を含む TMPRSS2 依存性ウイルスの感染を抑制する[134,146]。本研究では、S-EV^{10K} を介して HAI-2 mRNA の送達することで、SARS-CoV-2 祖先株の S タンパク質を持つ VLP の侵入を効果的に阻害されることを明らかにした (Fig. 2-9B)。本研究は抗ウイルス性タンパク質をコードする mRNA が、S タンパク質を発現する EV^{10K} によって感受性細胞に選択的に送達され、ウイルス侵入を阻害することを実証した最初の報告である。これらの発見は、S-EV^{10K} が新しい選択的な抗ウイルス mRNA 送達プラットフォームとなる可能性を示すものと言える。

さらに、HAI-2/S-EV^{10K} は、オミクロン由来のスパイクタンパク質を持つ VLP に対しても阻害活性を示したが、その効果は祖先株に対する効果と比較して減弱していた (Fig. 2-10)。先行研究において、オミクロン変異株で TMPRSS2 への依存性が減少しており、nafamostat などの TMPRSS2 阻害剤に対する感受性が低いということが報告されており[137,138]、HAI-2 による TMPRSS2 阻害の効果が減弱したと考えられる。本研究では HAI-2 をモデル分子として使用したが、長さが異なる HSP70 と HAI-2 の両方の mRNA 送達に成功したことから、S-EV^{10K} システムは他の治療用 mRNA や薬物カーゴに対して適応できる可能性が示唆される。例えば、3CL プロテアーゼなど変異の影響を受けにくい保存性の高いウイルス因子を標的とすることで、本送達戦略はより広範な抗ウイルス効果を目指した応用や、新興変異株への適用にも展開できると考えられる。今後、このプラットフォームの実用可能性を示すために、*in vitro* および *in vivo* において、阻害タンパク質をコードする mRNA を内包した S-EV^{10K} が、実際の SARS-CoV-2 に対して抗ウイルス活性を示すかどうかを評価することが重要である。

総括すると、本研究では S タンパク質を発現する EV^{10K} が、SARS-CoV-2 の細胞侵入メカニズム

を模倣しつつ、機能性 mRNA を選択的に標的細胞のサイトゾルへと送達可能な新しい薬物送達プラットフォームであることを示した。本戦略は、抗ウイルス研究と治療薬開発にとって有望なアプローチを提示するものである。さらに、他のウイルス由来の膜融合タンパク質を発現するように EV^{10K} を工学的に改変することで、このアプローチは SARS-CoV-2 に限らず、ウイルス特異的な標的化および送達を可能とし、他のウイルス感染症に対する治療応用へと拡張可能であると考えられる。

総 括

細胞外小胞 (EV) は、その高い安定性と生体適合性、低免疫原性、内包分子の送達能から、次世代の薬物送達キャリアとして注目されている。しかし、依然として内包分子の送達効率や標的化に課題が残る。そこで本研究で、EV を基盤とした細胞内送達プラットフォームの確立を目指し、EV 内包分子の送達効率を高めるために 2 つの戦略について検討した。第 1 章では、アシル基を付加したマクロピノサイトーシス誘導ペプチドを利用し、血清存在下においても EV の細胞内取り込みおよび内包 mRNA の細胞質送達効率が向上することを示した。本成果は、EV 送達における取り込み量の制御が、EV 内包分子のサイトゾルへの送達において重要な要素であることを示唆している。*in vivo* への展開を考慮すると、EV そのものに直接ペプチドを修飾する方法を確立する必要があるが、血清含有条件においてもマクロピノサイトーシスを誘導し、EV 内包分子を効率的に送達できるペプチドを見出したという本成果は、EV やその他のナノ粒子の送達効率改善にむけて有用な知見をもたらすことが期待される。

一方、第 2 章では、SARS-CoV-2 の S タンパク質を EV 表面に提示することで、特定の受容体を発現する細胞に対して選択的かつ効率的な EV 内包分子のサイトゾル送達が可能であることを示した。ウイルス由来の膜融合タンパク質を薬物送達へと利用する本戦略は、SARS-CoV-2 のみならずその他の新興感染症にも応用可能であると期待される。また、本章では mRNA の送達を実施したが、EV 内に siRNA や miRNA、タンパク質など任意の機能性分子を搭載することが可能になれば、本研究と同様の戦略でそれらの内包分子を高効率に送達し、様々な疾患に対して多様な治療効果を得られる可能性がある。

総合すると、本研究は EV を基盤とした分子送達の効率化に向けて、細胞内取り込みと EV 内包分子のサイトゾルへの送達という二つの本質的な課題に着目し、異なるアプローチから解決策を提示し、それぞれの戦略が効果的であることを示した点に意義がある。今後 EV 送達の目的に応じて、これらの戦略を複数組み合わせることで、相乗的な効果が得られることが期待される。また、本研究で得られた知見は、EV を用いた核酸医薬や治療用タンパク質送達の効率化にとどまらず、他の薬物送達ツールの合理的な設計にも展開可能と考えられ、今後の薬物送達研究の発展に貢献することが期待される。

実験の部

第 1 章の実験

試薬

特に記載のない限り、すべての化学物質、材料、細胞培養培地はペプチド研究所、Thermo Fisher Scientific、富士フィルム和光純薬から購入した。methyl 3-nitro-2-pyridinesulfonate (NPyS-OMe) [23] は林良雄教授（東京科学大学）から提供された。pCD63-L7Ae と pNluc-C/D box[42]は Martin Fussenegger 教授（チューリッヒ工科大学）から提供された。pCD63-EGFP C2 は Addgene から得た (#62964)。

ペプチド合成

ペプチドは、Rink アミド樹脂 (TGS-RAM、島津製作所) 上に Fmoc 固相ペプチド合成法で合成した [147]。アシル化ペプチドの合成は、ペプチドレジンの N 末端を、5 当量の 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate、5 当量の 1-hydroxybenzotriazole、10 当量の N,N-diisopropylethylamine (DIEA) 存在下において、それぞれの脂肪酸で 23°C、2 時間処理することで合成した。その後、TFA/EDT (95:5 (v:v)) で 23°C、3 時間静置することで脱保護とレジンからの切り出しを行なった。切り出したペプチドは COSMOSIL C_{18} AR-II カラム (Nacalai Tesque) を用いた逆相高速液体クロマトグラフィー (RT-HPLC) により精製し、得られたペプチドの質量が正しいことを MALDI-TOF MS (Bruker) により確認した。合成した各ペプチドのアミノ酸配列と質量の計算値、実測値、および保持時間 (R_t) は以下の Table 1 の通りである。

Table 1. List of prepared peptides.

Peptide	Sequence	$[M+H]^+_{\text{calc.}}$ (Da)	$[M+H]^+_{\text{obs.}}$ (Da)	R_t (min)
P4A	YRCACRFF-amide	1064.49	1064.48	13.28
oxP4A	YRC*AC*RFF-amide	1062.48	1062.64	12.97
acetyl-P4A	CH ₃ CONH-YRCACRFF-amide	1106.50	1106.64	16.69
decanoyl-P4A	CH ₃ (CH ₂) ₈ CONH-YRCACRFF-amide	1218.63	1218.66	24.50
myristyl-P4A	CH ₃ (CH ₂) ₁₂ CONH-YRCACRFF-amide	1274.69	1247.74	28.14
stearyl-P4A	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CONH-YRCACRFF-amide	1330.75	1330.80	31.26
stearyl-oxP4A	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CONH-YRC*AC*RFF-amide	1328.74	1328.87	30.67
TAMRA-oxP4A	K(TAMRA)GYRC*AC*RFF-amide	1928.01	1928.14	16.67
stearyl-oxP4A-TAMRA	CH ₃ (CH ₂) ₁₆ CONH-YRC*AC*RFFGK(TAMRA)-amide	1926.00	1926.81	30.19

* Intramolecularly disulfide bridged

分子内ジスルフィド結合形成

精製ペプチドを H₂O/CH₃CN (1:1) に溶解し、CH₃CN で溶解した NPyS-OMe を添加して室温で一晩攪拌した (NPyS-OMe およびペプチドの終濃度はそれぞれ 0.5 mM および 0.1 mM)。生成物は RP-HPLC で精製し、質量は MALDI-TOF-MS で確認した。MS の実測値、および R_t は Table 1 の通りである。

TAMRA-oxP4A の合成

保護ペプチド Lys(Mtt)-Gly-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Cys(Trt)-Ala-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Phe-NH-resin (Mtt = 4-methyltrityl; tBu = *tert*-butyl; Pbf = 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl; Trt = trityl) は前述の方法で調製した。N 末端の Boc 保護は、di-*tert*-butyl dicarbonate (5 当量) および *N*-methylmorpholine (10 当量) を DMF 中で室温 3 時間反応させることにより行った。樹脂を DMF、methanol (MeOH)、diethyl ether (DEE) でそれぞれ 5 回洗浄し、真空下で乾燥した。保護ペプチド樹脂を dichloromethane (DCM) 中で 30 分間膨潤させた。Mtt 脱保護は、1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-propanol/DCM (1:4) 溶液中で室温 3 時間行った[148]。ペプチドを DCM、DMF、MeOH、DEE でそれぞれ 5 回洗浄し、乾燥させた。TAMRA 標識は、樹脂を 6-carboxytetramethylrhodamine, succinimidyl ester (1.1 当量) および DIEA (10 当量) の存在下で DMF 中、室温で 3 時間反応させることにより行った。最終脱保護、樹脂からの切断、精製は前述の方法で行った。精製ペプチドの分子内ジスルフィド形成は、DMSO/H₂O (1:1) 中、室温で一晩攪拌した後、RP-HPLC による精製と MALDI-TOF-MS による分析を行った。得られた質量と R_t は Table 1 に示す。

stearyl-oxP4A-TAMRA の合成

stearyl-Tyr(tBu)-Arg(Pbf)-Cys(Trt)-Ala-Cys(Trt)-Arg(Pbf)-Phe-Phe-Gly-Lys(Mtt)-NH 樹脂の保護ペプチドを調製した。Mtt 脱保護、TAMRA 標識、最終脱保護、精製、および分子内ジスルフィド形成は前述の方法に従って実施した。RP-HPLC による精製と MALDI-TOF-MS 分析を行った。得られた質量および R_t は Table 1 に示す。

細胞毒性評価 (WST-8 アッセイ)

細胞毒性試験は Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて実施した。HeLa 細胞を 96-well plate (1 × 10⁴ cells/well) に播種し、一晩培養した。PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.2) で洗浄後、α-MEM(+)中で stearic acid、oxP4A、または stearyl-oxP4A (1.25、2.5、5、10 μM) を添加し、37°C で 24 時間処理した。細胞を PBS で 2 回洗浄した後、α-MEM(-) 100 μL と WST-8 試薬 10 μL を添加し、2 時間インキュベートした後、450 nm での吸光度を測定した (参照波長: 650 nm)。

デキストラン取り込みアッセイ

HeLa 細胞 (6 × 10⁴ cells/well) を 24-well plate (IWAKI) に播種し、37°C で一晩培養した。細胞を PBS で 3 回洗浄し、α-MEM(+)中で 5 μM のペプチドと、0.5 mg/mL のテトラメチルローダミン標識

70 kDa デキストラン (TMR-Dex70) で 30 分間処理した。インキュベーション後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.01% トリプシンで細胞を剥離し、マイクロ遠心チューブに回収し、遠心分離 (800 ×g、4 °C、5 分) した。上清を廃棄した後、細胞を PBS で洗浄し、400 μL の PBS に再懸濁し、Attune NxT flow cytometer を用いてフローサイトメトリー分析を行った。分析はサンプルあたり 10,000 個の細胞に対して実施した。

阻害剤処理では、HeLa 細胞を PBS で洗浄し、α-MEM(+) 中において 80 μM の EIPA および 500 nM の wortmannin でそれぞれ 30 分間前処理した。培地を除去し、5 μM stearyl-oxP4A、0.5 mg/mL TMR-Dex70、およびそれぞれの阻害剤を含む新しい培地を添加した。30 分間のインキュベーション後、前述の方法でデキストランの取り込みを分析した。

血清安定性アッセイ

各ペプチド (DMSO 中 5 mM、1 μL) を α-MEM(+) (99 μL) に加え、37 °C でインキュベートした。各時間点 (0、5、15、30 分) において、内部標準として 100 μM のデキサメタゾンを含むアセトニトリル 200 μL を混合液に添加し、タンパク質を沈殿させた。沈殿したタンパク質は遠心分離 (15,000 ×g、4 °C、5 分) により分離した。各サンプルの上清を回収し、0.1% TFA を含む等量の H₂O と混合した。サンプルは、電気噴霧イオン化 (ESI) 源を備えた Impact HDUHR-Q-TOF-MS (Bruker) に接続した島津 LC-20AD HPLC システムを用いた液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) により定量分析した。クロマトグラフィー分離は、oxP4A については Cosmosil ₅C₁₈-AR-II (4.6 × 150 mm)、stearyl-oxP4A については Cosmosil ₅C₄-AR-300 (4.6 × 150 mm) を用いて実施した。カラムオーブンは 40 °C に維持した。oxP4A の分析条件は以下の通り：流速 0.2 mL/min、溶媒 A：0.1% TFA 含有水 H₂O、溶媒 B：0.1% TFA 含有 CH₃CN、グラジエント：A 中に B を 5-95% 20 分。stearyl-oxP4A の分析条件は以下の通り：流速 0.2 mL/min；溶媒 A、0.1% TFA 含有 H₂O；溶媒 B、0.1% TFA 含有 CH₃CN；グラジエント、A 中に B 50-95%；20 分。oxP4A および stearyl-oxP4A の [M+2H]²⁺ イオンである m/z 531.7 および m/z 664.9、ならびにデキサメタゾン (内部標準) の [M+H]⁺ イオンである m/z 393.2 の抽出イオンクロマトグラムを Compass Data Analysis ソフトウェア (Bruker) を用いてそれぞれ算出した。各ペプチドの量は内部標準のピーク面積に対して正規化した。

Native-PAGE

TAMRA-oxP4A または stearyl-oxP4A-TAMRA を、血清含有 PBS、血清フリー PBS、または BSA (60 μM) で 5 μM に希釈し、室温で 5 分間インキュベートした後、5-20% ポリアクリルアミドゲル (富士フィルム和光純薬) を用いて Native-PAGE による分析を行った。対照としてウシ血清アルブミン (60 μM) および 10% ウシ血清を用いた。TAMRA 標識ペプチドは Typhoon scanner RGB システム (Cytiva) で検出後、タンパク質をクマルシンブルー (CBB) で染色した。

ペプチドの血清結合評価

各ペプチド（DMSO 中に 2 mM）2 μ L を BS 198 μ L に添加し、37 °C で 5 分間インキュベートした。その後、サンプルを卓上遠心機 OptimaL100XP（Beckmann Coulter）を用いて 61,000 rpm（224,400 $\times$ g）、20 °C で 4 時間 30 分遠心し、3 層に分離した。リポプロテインを含む上清を除去し、中間層 50 μ L をタンパク質フリー画分として回収した。内部標準として 100 μ M のデキサメタゾンを含むアセトニトリル 100 μ L をサンプルに添加し、4 °C、15,000 $\times$ g で 5 分間遠心した。各サンプルの上清を回収して、0.1% TFA を含む H₂O を等量加えて混合し、上述の方法と同様にして LC-MS でサンプルを解析した。

EV の精製

EV の精製は MagCapture ビーズ（富士フイルム和光純薬）を使用し、メーカー推奨のプロトコルに従って実施した。HeLa 細胞を 100 mm dish に 1.2×10^6 cells/dish で播種し一晩培養した。細胞は、メーカー推奨のプロトコルに従い、Lipofectamine LTX（Invitrogen）を用いて pEGFP-CD63 C2 または pCD63-L7A と pNluc-C/D box をトランスフェクションした。細胞を PBS で 3 回洗浄し、10% の EV 除去 FBS（Exosome-depleted FBS Media Supplement Heat Inactivated, System Biosciences）を含む α -MEM（10 mL）中で 48 時間培養した。培養液を 4 °C で 300 $\times$ g、5 分間遠心した。上清を回収し、4 °C で 1200 $\times$ g、20 分間遠心した後、さらに 4 °C で 10,000 $\times$ g、30 分間遠心分離した。最終上清を 0.22 μ m シリンジフィルター（KURABO）でろ過し、Amicon Ultra-15 100K（Merck）による限外ろ過で 1 mL 以下に濃縮後、MagCapture ビーズに添加し、4 °C で一晩インキュベートした。ビーズに捕捉した EV は洗浄し、メーカーの仕様に従って溶出させた。タンパク質濃度は、Pierce BCA Protein Assay Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いた enhanced BCA アッセイにより測定した。

EV の特性評価

EV のサイズ分布は、NanoSight NS300 および Nanoparticles Tracking Analysis（NTA）ソフトウェア（Malvern Panalytical）により測定した。EV マーカーおよび EGFP はウエスタンブロット解析により確認した。細胞は、1 $\times$ cOmplete プロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche）を含む radio-immunoprecipitation assay（RIPA）バッファー（50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1% Triton X-100、0.1% SDS、0.1% sodium deoxycholate、pH 7.6）で溶解した。細胞溶解液と EV サンプルに SDS-PAGE ローディングバッファーを加え、5 分間沸騰させた後、SDS-PAGE ゲル（5–20% SuperSep Ace、富士フイルム和光純薬）にロードした。25 mA で 60 分間電気泳動した後、分離したタンパク質を Trans-Blot Turbo Transfer System（BioRad）を用いて Transblot Turbo Mini PVDF Membrane に転写した。転写後のメンブレンを 0.05% Tween 20 含有 Tris 緩衝生理食塩水（TBST、pH 7.6）で洗浄後、5% BSA（w/v）を溶解した TBST（5% BSA-TBST）を用いて、室温で 1 時間ブロッキングを行った。ブロッキング後のメンブレンに、5% BSA-TBST で希釈した一次抗体を加え、4 °C で一晩振盪した。使用した一次抗体は以下の通りである。抗 CD63 モノクローナル抗体（3-13）（富士フイルム和光純薬、1:500）、抗 CD9 モノクローナル抗体（Ts9）（Invitrogen、1:500）、抗 GFP ポリクローナル抗体（Invitrogen、1:1000）。その後メンブレンを TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、5% BSA-TBST で希釈した二次抗体を添加して室温で 1 時間浸透した [抗マウス IgG ホ

スファターゼ結合(GE Healthcare、1:5000);抗ウサギ IgG、HRP 結合抗体(Cell Signaling Technology、1:2000)」。検出は ECL Prime ウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham) を用いて行い、LAS-3000 Mini (GE Healthcare) で化学発酵を検出した。検出後、メンブレンは Restore PLUS Western Blotting Stripping Buffer を用いてストリッピングし、必要に応じて再プローブした。

EGFP-CD63-EV の細胞内送達

HeLa 細胞を 24-well plate に 6.0×10^4 cells/well で播種し、37°Cで一晩培養した。細胞を PBS で 3 回洗浄し、10% の EV 除去 FBS を含む α -MEM 中で、5 μ M stearyl-oxP4A を含むまたは含まない条件で、単離した EGFP-CD63-EV (総タンパク質、1.3 μ g/mL) を添加し 37°C で 24 時間処理した。インキュベーション後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.01%トリプシン処理後、マイクロ遠心チューブに回収し、フローサイトメトリー解析を行った。

ルシフェラーゼ mRNA を内包した EV の細胞内送達

pCD63-L7Ae および pNluc-C/D box を一過性にトランスフェクションした HeLa 細胞を、10% の EV 除去 FBS を含む α -MEM で 48 時間インキュベートした後、培養液を遠心分離および限外濾過し、前述と同様に MagCapture ビーズを用いて Nluc-C/D box mRNA を封入した EV (Nluc-mRNA-EV) を回収した。HeLa 細胞を 12-well plate に 1.0×10^5 cells/well で播種し、37°Cで一晩培養した。細胞を PBS で 3 回洗浄し、10% EV 除去 FBS を含む α -MEM 中で、2.5 μ M stearyl-oxP4A を添加または非添加の条件で、分離した Nluc-mRNA-EV (総タンパク質 1.3 μ g/mL) を添加し、37°C で 24 時間処理した。処理後、細胞を PBS で 3 回洗浄し、0.01%トリプシン処理後、マイクロ遠心チューブに回収した。細胞懸濁液を 4°Cで $800 \times g$ 、5 分間遠心分離し、上清を除去した。細胞を 30 μ L の Opti-MEM に懸濁し、そのうち 25 μ L を NanoGlo live-cell assay 試薬 (NanoGlo LCS dilution buffer : NanoGlo live-cell substrate = 19:1、Promega) 25 μ L と混合した。混合液を 384-well white plate (15 μ L/well) に添加し、25°Cで 5 分間インキュベートした後、Nivo プレートリーダーで発光を測定した。

共焦点レーザー走査顕微鏡 (CLSM)

HeLa 細胞を 35 mm glass-bottomed dish (IWAKI) に 2×10^5 cells/dish で播種し、37°Cで一晩培養した。細胞を PBS で洗浄後、 α -MEM(+)に 5 μ M のペプチドおよび 0.5 mg/mL の FL-Dex70 を加え 1 時間処理した。インキュベーション後、PBS で洗浄し、リソソーム染色のため LysoTracker Deep Red で 2 時間処理した。その後 PBS で洗浄し、Olympus FV3000 CLSM システムを用いて観察した。

繊維状アクチン (F-アクチン) 構造の観察には、lifeact-mCherry を安定発現する HeLa 細胞を 35 mm glass-bottomed dish に 1.5×10^5 cells/dish で播種し、37°Cで一晩培養した。細胞を PBS で洗浄後、 α -MEM(+)を 150 μ L 添加した。35 mm glass-bottomed dish を FV3000 CLSM システム上のステージ トップインキュベーター (Tokai Hit) に設置し、5 分間静置した後、1 分間隔でタイムラプス画像

を撮影した。5分後、stearyl-oxP4Aを含む α -MEM(+) (50 μ L)を最終ペプチド濃度が10 μ Mとなるように添加し、その後さらに20分間(合計25分間)撮影を継続した。

Alexa fluor 488でC末端標識したR8 (R8-Alexa488) (10 μ M)の細胞質移行を観察するため、CLSM解析前に α -MEM(+)中でstearyl-oxP4A (5 μ M)存在下および非存在下でR8-Alexa488を30分間処理した。R8-Alexa488の細胞質分布は、100個以上の細胞のCLSM画像から解析した。

EGFP-CD63-EVの細胞内取り込みの解析では、HeLa細胞を35 mm glass-bottomed dishに播種し、37°Cで一晩培養した。細胞をPBSで洗浄し、10%のEV除去FBSを含む α -MEM中で、5 μ M stearyl-oxP4Aの存在下または非存在下で、精製したEGFP-CD63-EV(総タンパク質量1.3 μ g/mL)を添加して37°Cで24時間処理した。細胞をPBSで洗浄し、Olympus FV3000 CLSMシステムを用いて観察した。

第2章の実験

試薬

特に記載のない限り、すべての化学物質、材料、細胞培養培地は Sigma-Aldrich、Thermo Fisher Scientific、富士フイルム和光純薬から購入した。DNA プライマーは Eurofins から購入した。

プラスミド構築

CD63-L7Ae と Nluc-C/D box は第1章と同様に Martin Fussenenner 教授(チューリッヒ工科大学)から提供された。

HSP70-HiBiT-C/D box プラスミドは In-Fusion Snap Assembly Master Mix (TaKaRa Bio) と DNA Ligation Kit (TaKaRa Bio) を用いてメーカー推奨のプロトコルに従って構築した。まず、HSP70-HiBiT プラスミドを以下のように作製した。2つのプライマーペア (5'-cgctaccggctgccaccatggttagtggtgagactattcaagaagatctcgggtggatcaggaggaggtagtagtggccaaagccgcggtacc-3' と 5'-atcgccgctggttggccatactacctctctgatccaccaccgagatcttctgaatagtcctaccactaaccatggtggcgaccggttagcgc-3') をアニーリングすることで HiBiT ペプチドをコードする DNA フラグメントを得た。In-Fusion Snap Assembly Master Mix を用いて、得られたフラグメントを heat shock protein 70 (HSP70) と緑色蛍光タンパク質 (EGFP) の融合タンパク質をコードするプラスミド (Addgene, 15215 [149]) に挿入した。次に、HSP70-HiBiT プラスミドと、Nluc-C/D box プラスミドから増幅した C/D box をコードする DNA 断片 (SacI サイトを含む forward プライマー: 5'-ggcgagctctgcaaaatagacttttagagggtacc-3' と SalI サイトを含む reverse プライマー: 5'-ggcgtcgacaccgggtctcgagttcg-3' を用いて増幅。) を、SacI/SalI で切断し、DNA Ligation Kit を用いて連結することで HSP70-HiBiT-C/D box プラスミドを作製した。

HAI-2-FLAG-C/D box プラスミドの構築には、まず GeneArt (Thermo Fisher Scientific) を用いて HA タグ付き肝細胞増殖因子活性化因子阻害剤 2 (HAI-2) をコードするプラスミドを設計・購入した。次に、HAI-2-HA プラスミドの HA タグを、KOD-Plus-Mutagenesis Kit (TOYOBO) を用いて逆ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により FLAG タグに置換した (forward プライマー: 5'-tgagaattcacgcgtggtacc-3'、reverse プライマー: 5'-cttgctcgctcgctcctttagtcgcccaggacatatgtgttc-3')。Nluc-C/D box から増幅した C/D box をコードする DNA 断片を、forward プライマー: 5'-ggcgaattctgcaaaatagacttttagagggtacc-3' および reverse プライマー: 5'-ggcgtcgacaccgggtctcgagttcg-3' を用いて増幅し、得られた DNA 断片を EcoRI/SalI で切断し、DNA Ligation Kit を用いて HAI-2-FLAG プラスミドの対応する部位 (EcoRI/SalI) にクローニングした。

pcDNA5/FRT-CD63-HiBiT プラスミドは、CD63-HiBiT プラスミド [32] から CD63-HiBiT をコードする DNA 断片を、NheI/ApaI で切断した pcDNA5/FRT プラスミド (Invitrogen) に挿入することで得た。

SARS-CoV-2 祖先株 (MN908947) の S タンパク質発現用プラスミド (pS protein) は、EcoRI/XhoI で切断したスパイクタンパク質をコードする DNA 断片と pCA7 ベクター [150] を連結させることで構築した。

CD63-HiBiT を安定発現する HEK293 細胞の構築

CD63-HiBiT 安定発現 HEK293 細胞は、メーカー推奨のプロトコルに従い Flp-In-293 細胞 (Invitrogen) から作製した。Flp-In-293 細胞を 100 mm dish に播種し、一晚培養した。その後、Lipofectamine LTX (33 μ L) および PLUS reagent (11 μ L) (Invitrogen) を用いてトランスフェクションを行い、10% (v/v) の熱不活化 FBS (Gibco) を含む高グルコース DMEM (DMEM-HG) [DMEM-HG(+)] 中で 3 時間培養した後、PBS で洗浄し、2 日間培養した。培養液を 400 μ g/mL の hygromycin B を含有する DMEM-HG(+) に交換し、3 週間の抗生物質選択後、CD63-HiBiT 細胞を安定発現するクローン (HEK293-CD63-HiBiT 細胞) を得た。

TMPRSS2 を安定発現する Vero E6 細胞および ACE2 を安定発現する HEK293T 細胞の樹立

Vero E6 細胞および HEK293T 細胞は、それぞれ ATCC および理化学研究所細胞バンクより入手した。TMPRSS2 または ACE2 コード領域を CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd (RIKEN BRC) または pLVSIN-CMV Pur (TaKaRa Bio) にサブクローニングし、CSII-CMV-TMPRSS2-IRES2-Bsd または pLVSIN-ACE2-Pur を構築した。自己不活性化型レンチウイルスベクターは、CSII-CMV-TMPRSS2-IRES2-Bsd または pLVSIN-ACE2-Pur と、Lentiviral High Titer Packaging Mix (TaKaRa Bio) を、メーカーのプロトコルに従ってトランスフェクションすることにより調製した。TMPRSS2 を安定発現する Vero E6 細胞および ACE2 を安定発現する HEK293T 細胞は、それぞれのレンチウイルスベクターを処理し、blasticidin (20 μ g/mL) または puromycin (10 μ g/mL) 存在下で培養することにより樹立した。

LgBiT を安定発現する細胞株の樹立

既報[32]と同様に、LgBiT を安定発現する細胞株をレシピエント細胞として樹立した。pBiT1.1-C[TK/LgBiT] (Promega) から LgBiT をコードする領域を CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd (RIKEN BRC) または pLVSIN-CMV Pur (TaKaRa Bio) にサブクローニングし、CSII-CMV-LgBiT-IRES2-Bsd または pLVSIN-LgBiT-Pur を構築した。自己不活性化型レンチウイルスベクターは、メーカーのプロトコルに従い、CSII-CMV-LgBiT-IRES2-Bsd および Lentiviral High Titer Packaging Mix (TaKaRa Bio) をトランスフェクションすることで調製した。LgBiT を安定的に発現する細胞株は、レンチウイルスベクターを処理し、blasticidin (20 μ g/mL) または puromycin (10 μ g/mL) の存在下で培養することにより確立した。

細胞培養およびトランスフェクション

Flp-In-293 細胞 (HEK293 細胞) は、Thermo Fisher Scientific から購入した。HEK293 細胞および HEK293-CD63-HiBiT 細胞は、DMEM-HG(+) で培養した。Vero E6 細胞、VeroE6-TMPRSS2 細胞、VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞、VeroE6-LgBiT 細胞、HEK293T-ACE2-LgBiT 細胞、および HEK293T-LgBiT 細胞は、10% (v/v) FBS を含む低グルコース DMEM [DMEM-LG(+)] で培養した。全ての細胞は、5% CO₂、37°C のインキュベーター内で培養し、2~4 日ごとに継代した。

プラスミドのトランスフェクションは、PEI MAX (Polysciences) を用いて実施した。HEK293 ま

たは HEK293-CD63-HiBiT 細胞を、poly-L-lysine でコーティングした 100 mm dish (IWAKI) に 3.0×10^6 cells/dish で播種し、一晩培養した。PEI MAX (60 μ g) およびプラスミド (12 μ g) をそれぞれ 687.5 μ L の Opti-MEM で希釈し、これらの試薬を混合した。室温で 15 分間インキュベートして DNA/PEI 複合体を形成させた後、DMEM-HG(+)中の細胞に添加した。4 時間インキュベート後、細胞を PBS で洗浄した後、10 % (v/v) の熱処理による非働化処理を施した EV 除去 FBS (System Biosciences) を含む DMEM-HG で 2 日間培養し、EV を産生させた。

EV 精製

100 mm dish で培養したトランスフェクション後の HEK293 細胞または HEK293-CD63-HiBiT 細胞を、10 % (v/v) 非働化処理済み EV 除去 FBS を含む DMEM-HG で 2 日間培養した。その後回収した培養液を 4°C で $300 \times g$ 、5 分間遠心分離し、さらに上清を回収し、4°C で $1,200 \times g$ 、20 分間遠心分離した後、4°C で $10,000 \times g$ 、30 分間遠心分離した。EV^{10K} の分離では、ペレットを 500 μ L の PBS で洗浄し、再度 $10,000 \times g$ で遠心分離した後、100 μ L の PBS に再懸濁した。10,000 $\times g$ 上清からエクソソームを多く含む EV (EV^{Mag}) を分離するため、MagCapture Exosome Isolation Kit PS Ver. 2 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) をメーカーのプロトコルに従って用いた。上清は、上清の体積が 1 mL 未満になるまで、Amicon Ultra-15 100K デバイス (Merck) を用いて 4 °C ($4,000 \times g$) で限外ろ過により濃縮した後、Tim4 固定化磁気ビーズと混合し、4 °C で一晩インキュベートした。磁気ビーズを洗浄バッファーで 3 回洗浄した後、EV^{Mag} を溶出バッファー 50 μ L で 2 回溶出した。

EV の特性評価

EV の粒子数および粒径は、NanoSight NS300 および NTA ソフトウェア (Malvern Panalytical) を用いて測定した。

精製した EV および EV 産生細胞における EV マーカーおよび S タンパク質の発現は、ウェスタンブロッティングにより確認した。細胞は 1 $\times$ cComplete プロテアーゼ阻害カクテル (Roche) を含む RIPA バッファーで溶解し、細胞溶解液に SDS サンプルバッファーを添加した。EV は直接 SDS サンプルバッファーと混合した。タンパク質濃度は、Pierce BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) を用いて BCA 法により測定した。5 μ g のタンパク質を含む細胞溶解液または 0.5 μ g のタンパク質を含む EV サンプルを 95°C で 5 分間加熱した後、ポリアクリルアミドゲル (SuperSep Ace、5%–20%、13 ウェル；富士フイルム和光純薬) にロードし、SDS-PAGE により分離した。分離したタンパク質は、Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad) を用いて Transblot Turbo Mini PVDF Membrane (BioRad) に転写した。転写後のメンブレンを TBST で洗浄後、20–25 °C で 1 時間、5% BSA-TBST でブロッキングし、続いて 5% BSA-TBST で希釈した一次抗体を添加して 4 °C で一晩振盪した。本研究で使用了した一次抗体とその希釈率は以下の通りである：抗 S2 モノクローナル抗体 (GeneTex 社、GTX632604、1:1000)、抗 CD63 モノクローナル抗体 (富士フイルム和光純薬、012-27063、1:1000)、抗 CD9 モノクローナル抗体 (富士フイルム和

光純薬、014-27763、1:1000)、抗 CD81 モノクローナル抗体 (Thermo Fisher Scientific、10630D、1:1000)、抗アネキシン A1 モノクローナル抗体 (Abcam、ab214486、1:2000)、抗シンテニンモノクローナル抗体 (abcam、ab133267、1:1000)、抗カルネキシンモノクローナル抗体 (Medical & Biological Laboratories、M178-3、1:1000)。メンブレンを TBST で 10 分間ずつ 3 回洗浄し、5% BSA-TBST で希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識二次抗体 [抗マウス IgG HRP 標識 F(ab')₂ フラグメント (Cytiva 社、NA9310、1:5000)、抗ウサギ IgG、HRP 標識抗体 (Cell Signaling Technology 社、7074、1:2000)] を添加し、20–25°C で 1 時間振盪した。検出には ECL Prime ウェスタンブロットリング検出試薬 (Cytiva) を用い、Amersham ImageQuant 800 (Cytiva) で化学発光を検出した。検出後、Restore PLUS Western Blotting Stripping Buffer (Thermo Fisher Scientific) でメンブレンから抗体を除去し、必要に応じて再度抗体反応を行った。

透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像については、EV 懸濁液を各 2.5 μ L、親水化処理したカーボンコーティング銅グリッドに塗布し、0.5% 酢酸ウラン溶液 (等量) で 1 分間ずつ 2 回染色した。TEM 画像は、加速電圧 120kV の JEM-1400 (日本電子株式会社) を用いて取得した。

EV の細胞内取り込みと膜融合の定量評価

EV の細胞内取り込みと膜融合は、以前の報告[32]と同様に Nano-Glo Lytic Detection System (Promega) と Nano-Glo Live-Cell Assay System (Promega) を用いて定量した。レシピエント細胞は 24-well plate に播種し (VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞、VeroE6-LgBiT 細胞: 7.0×10^4 cells/well、HEK293T-ACE2-LgBiT 細胞、HEK293T-LgBiT 細胞: 1.5×10^5 cells/well)、一晩培養した。これらの LgBiT 発現細胞を HEK293-CD63-HiBiT 細胞由来の EV^{10K} (1.0×10^8 particles/well) で 24 時間処理した。PBS で 2 回洗浄した後、0.05% トリプシンを 37°C で 10 分間処理してウェルから細胞を剥離し、マイクロチューブに回収した。回収した細胞懸濁液を 4°C で $800 \times g$ 、5 分間遠心し、上清を除去した。EV の細胞内取り込みを定量するために、回収した EV 処理細胞を 50 μ L の Opti-MEM で懸濁し、また EV 量と発光強度の検量線 (x 軸: EV 粒子数、y 軸: 発光強度) を作成するために、EV 未処理細胞も同様に回収し、合計 50 μ L となるように粒子数既知の EV と Opti-MEM で細胞を懸濁した。次に、細胞を 50 μ L の HiBiT lytic assay 試薬 (バッファー: 基質 = 50:1) と 96-well plate 内で 10 分間混合し、Nivo プレートリーダー (PerkinElmer) を用いて発光強度 (count per second, cps) を測定した。EV の膜融合を定量するため、EV 処理細胞を 80 μ L の Opti-MEM に懸濁し、96-well plate 内で基質を含む live-cell assay 試薬 20 μ L (バッファー: 基質 = 19:1) と混合し、Nivo プレートリーダーを用いて発光強度を測定した。

エネルギー依存性経路を阻害するため、VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞を 4°C で 30 分間前処理した後、分離した S-EV^{10K} (1.0×10^8 particles/well) を添加して 4°C で 4 時間インキュベートした。処理後、EV の細胞内取り込みと膜融合の定量を実施した。

抗受容体結合ドメイン (RBD) 中和抗体 (抗 RBD) (GeneTex 社製 GTX635792)、対照抗体として中和活性を有さない抗 S2 抗体 (GeneTex 社製 GTX632604)、SARS-CoV-2 膜融合阻害ペプチド 1a および 3a [128]、ならびに HIV 膜融合阻害ペプチド SC34 [132] (ネガティブコントロール) (ペプチド配列は以下の Table 2 参照) による阻害効果を検討するために、分離した S-EV^{10K} (1.0×10^8

particles) を、20 nM の抗体または 10 μ M のペプチドと共に、10 %熱不活化 EV 除去 FBS を含む DMEM-HG 中で 37°C、1 時間前処理を行い、その後混合物を VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞に加えた。4 時間インキュベーション後、定量実験を実施した。

TMPrSS2 阻害剤 (nafamostat)、カテプシン阻害剤 (E-64d および Z-FA-FMK)、またはエンドソーム酸性化阻害剤 (CQ および ConcA) の場合、VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞を、25 μ M nafamostat、25 μ M E-64d、50 μ M Z-FA-FMK、20 μ M CQ または 20 nM ConcA を含有する DMEM-HG(+) 培地で 37 °C で 30 分間の前処理を行い、同様の濃度の阻害剤含有条件で 10 %非働化済み EV 除去 FBS を含む DMEM-HG 中で S-EV^{10K} (1.0 $\times$ 10⁸ particles/well) を添加して、4 時間処理し、膜融合の定量実験を実施した。

Table 2. List of fusion inhibitor peptides.

Peptide	Sequence
1a	Ac- ISGINASVVNIQKEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE -amide
3a	Ac- ISGINASVVNIQEEIKRLNEVAKKLNESLIDLQE -amide
Control-peptide	Ac- WXEWDKIEEYTKKIKKLIIESQEQEKNEKELK -amide (X : norleucine residue)

細胞間融合アッセイ

VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞を 6-well plate (IWAKI) に 2.0 $\times$ 10⁵ cells/well で播種し、一晚培養した。細胞を、Lipofectamine 3000 (7.5 μ L) および P3000 (4 μ L) (Invitrogen) を用いて pEGFP (2 μ g) または pRFP (2 μ g) でトランスフェクションし、EGFP または赤色蛍光タンパク質 (RFP) を発現させた。6 時間インキュベート後、細胞を剥離し、混合 (EGFP : RFP = 1 : 1) したものを、35 mm glass-bottomed dish に 4.0 $\times$ 10⁵ cells/dish で再播種した。一晚培養後、分離した Cont-EV^{10K} または S-EV^{10K} (2.0 $\times$ 10⁸ particles/dish) で 24 時間処理した。細胞間融合のポジティブコントロールとして、混合細胞に pS protein をトランスフェクションした。0.5 μ g/mL Hoechst33342 で 10 分間核染色後、FV1000 Olympus CLSM (Olympus) を用いて細胞を観察した。

mRNA 搭載 EV の送達評価

HSP70-HiBiT mRNA 送達評価には、Nano-Glo Live Cell Assay System (Promega) を用いた。HEK293 細胞に pS protein または空ベクター (pCI Mammalian Expression Vector, Promega)、pCD63-L7Ae および pHiBiT-HSP70-C/D box (2:1:1) を先述の方法と同様に PEI を用いてトランスフェクションし、EV 除去 FBS 10%含有 DMEM-HG 中で 2 日間培養した後、培養上清を遠心分離して EV を分離した。mRNA を搭載した EV^{10K} (2.0 $\times$ 10⁸ particles/well) を、前日 12-well plate に 1.0 $\times$ 10⁵ cells/well で播種した VeroE6-TMPRSS2-LgBiT 細胞に添加し、24 時間培養した。処理後、前項と同様に Nano-Glo Live Cell Assay を実施した。

HAI-2-mRNA を内包した EV^{10K} (HAI-2-EV^{10K}) で処理した VeroE6-TMPRSS2 細胞における HAI-

2 発現を確認するため、ウエスタンブロッティングを実施した。HAI-2-EV^{10K} は、pS protein または空ベクター、pCD63-L7Ae、pHAI-2-FLAG-C/D box (2:1:1) をトランスフェクションした HEK293 細胞の培養液から分離した。前日に 24-well plate に 7.0×10^4 cells/well で播種した VeroE6-TMPRSS2 細胞を、HAI-2-EV^{10K} (1×10^9 particles/well) で 24 時間処理した。次に、細胞を RIPA バッファーで溶解し、SDS サンプルバッファーと混合した。SDS-PAGE、ブロッティング、抗体反応 [Anti-FLAG M2 抗体 (Sigma-Aldrich, F3165, 1:5000) および抗マウス IgG HRP 標識 F(ab')₂ フラグメント (Cytiva, NA9310, 1:5000)]、化学発光検出は先述の方法と同様に実施した。

リアルタイム定量 PCR

分離した EV から NucleoSpin RNA Plus (TaKaRa Bio) を用いて EV の RNA を抽出し、PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa Bio) を用いてメーカーの指示に従い cDNA へ逆転写した。リアルタイム定量 PCR (RT-qPCR) は、PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) および以下のプライマーを用いて実施した：HSP70 mRNA 用 (forward, 5'-cgacctgaacaagagcatca-3'; reverse, 5'-aagatctgcgtctgcttgggt-3')、HAI-2 mRNA 用 (forward, 5'-aacagctaccgctctgagga-3'; reverse, 5'-ttcttcaccagctgctcctt-3')。蛍光シグナルは QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) で測定した。濃度が既知の DNA 溶液 (10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 copies/ μ L) を用いた標準曲線法により定量した。標準曲線の作成には、各プライマーペアを用いて標的配列をコードするプラスミドを増幅し、アガロースゲルから精製した溶液を用いた。RT-qPCR で定量した mRNA 分子数と NTA で測定した EV 粒子数から、EV 1 個あたりの mRNA コピー数を算出した。

WST-8 アッセイ

細胞生存率は、メーカー推奨のプロトコルに従い Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いて測定した。VeroE6-TMPRSS2 細胞を 96-well plate (IWAKI) に 1.0×10^4 cells/well で播種し、一晩培養した。細胞を HAI-2/Cont-EV^{10K} または HAI-2/S-EV^{10K} (0、 1.6×10^6 、 8.0×10^6 、 4.0×10^7 、または 2.0×10^8 particles/well) で 24 時間処理した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、WST-8 を 10 μ L 含む DMEM-LG(+) を 100 μ L を添加した。2 時間インキュベート後、マイクロプレートリーダーを用いて 450 nm における吸光度を測定 (参照波長：650 nm) し、細胞生存率を算出した。

SARS-CoV-2 擬似ウイルス様粒子侵入阻害アッセイ

ウイルス様粒子は既報の方法[135,136]に従い調製した。0 日目に HEK293T 細胞を 100 mm dish に 3.0×10^6 cells 播種し、DMEM-HG(+) 中、37°C/5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。1 日目に HEK293T 細胞に 60 μ L の Lipofectamine 2000 を用いて 3 つのプラスミド (pHLS-EF1 α -DmrA-HIVgag-A: 11 μ g, pHLS-EF1 α -DmrC-Luc-A: 11 μ g, pCAGGS-SARS-CoV-2-Spike: 1.5 μ g) をトランスフェクションした。SARS-CoV-2 の S タンパク質の配列は武漢株に由来する配列をヒトコドンに最適化して用いた。さらに、感染性を高めるため、スパイク配列には D614G 変異と C 末端における 19 アミノ酸の欠失を導入した。オミクロンスパイク配列 (BA.2.75 および XBB.1.5) は GISAID データベースから取得した。2 日目、培地を新たな DMEM-HG(+) に交換し、DmrA および DmrC ドメインを

二量体化させてルシフェラーゼをウイルス様粒子に封入するために、300 nM の AP21967 (A/C ヘテロダイマー、TaKaRa、635055) を添加した。3 日目に培養上清を回収し、0.45 μm シリンジフィルター (PES 膜、GVS、J25BSCPS004AL01) でろ過した。ろ過した培地を 8,800 $\times g$ で 16 時間遠心分離した。遠心分離後、上清を慎重に取り除き、ウイルス様粒子のペレットを冷却した 100 μL の Hank's Balanced Salt Solution に 1 時間浸し、穏やかに再懸濁した。

VeroE6-TMPRSS2 細胞を 96-well plate (IWAKI) に 1.0×10^4 cells/well で播種し、一晚培養した後、HAI-2/Cont-EV^{10K} または HAI-2/S-EV^{10K} (2.0×10^8 particles/well) で 1 日間処理した。次に、SARS-CoV-2 ウイルス様粒子を細胞に添加した。SARS-CoV-2 感染の対照阻害剤として、nafamostat (10 μM) を用いた。16 時間インキュベート後、製造元のプロトコルに従い ONE-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼアッセイを実施した。具体的には、各ウェルに培養液と同量の ONE-Glo 試薬を添加し、室温で 10 分間インキュベートした後、発光を EnVision (PerkinElmer) で測定した。

発表論文

第 1 章

1. Stearylated macropinocytosis-inducing peptides facilitating the cellular uptake of small extracellular vesicles.

Yuna Nakagawa, Jan Vincent V. Arafiles, Yoshimasa Kawaguchi, Ikuhiko Nakase, Hisaaki Hirose, Shiroh Futaki

Bioconjugate Chemistry (2022) 33(5), 869-880. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.2c00113.

第 2 章

2. SARS-CoV-2 inhibition through mRNA delivery using engineered extracellular vesicles displaying the spike protein.

Yuna Nakagawa, Yoshimasa Kawaguchi, Hisaaki Hirose, Takao Hashiguchi, Joseph Lee, Akitsu Hotta, Jun Kawamoto, Michihito Sasaki, Hirofumi Sawa, Shiroh Futaki

Biomaterials (2026) 325, 123594. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2025.123594

その他

3. Structural dissection of epsin-1 N-terminal helical peptide: the role of hydrophobic residues in modulating membrane curvature.

Motoki Nishimura, Yoshimasa Kawaguchi, Kakeru Kuroki, Yuna Nakagawa, Toshihiro Masuda, Takayuki Sakai, Kenichi Kawano, Hisaaki Hirose, Miki Imanishi, Tomoka Takatani-Nakase, Sergii Afonin, Anne S. Ulrich, Shiroh Futaki

Chemistry – A European Journal (2023) 29(29), e202300129. DOI: doi.org/10.1002/chem.202300129.

引用文献

- [1] M. Tkach, C. Théry, Communication by extracellular vesicles: where we are and where we need to go, *Cell* 164 (2016) 1226–1232. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>.
- [2] M. Colombo, G. Raposo, C. Théry, Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30 (2014) 255–289. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.
- [3] G. van Niel, G. D’Angelo, G. Raposo, Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19 (2018) 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
- [4] R. Kalluri, V.S. LeBleu, The biology, function, and biomedical applications of exosomes, *Science* 367 (2020) eaau6977. <https://doi.org/10.1126/science.aau6977>.
- [5] C.Y. Soo, Y. Song, Y. Zheng, E.C. Campbell, A.C. Riches, F. Gunn-Moore, S.J. Powis, Nanoparticle tracking analysis monitors microvesicle and exosome secretion from immune cells, *Immunology* 136 (2012) 192–197. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2012.03569.x>.
- [6] T. Katsuda, R. Tsuchiya, N. Kosaka, Y. Yoshioka, K. Takagaki, K. Oki, F. Takeshita, Y. Sakai, M. Kuroda, T. Ochiya, Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1197. <https://doi.org/10.1038/srep01197>.
- [7] H. Song, X. Li, Z. Zhao, J. Qian, Y. Wang, J. Cui, W. Weng, L. Cao, X. Chen, Y. Hu, J. Su, Reversal of osteoporotic activity by endothelial cell-secreted bone targeting and biocompatible exosomes, *Nano Lett.* 19 (2019) 3040–3048. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.9b00287>.
- [8] A. Kulshreshtha, T. Ahmad, A. Agrawal, B. Ghosh, Proinflammatory role of epithelial cell-derived exosomes in allergic airway inflammation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 131 (2013) 1194–1203.e14. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2012.12.1565>.
- [9] B.D. Lehmann, M.S. Paine, A.M. Brooks, J.A. McCubrey, R.H. Renegar, R. Wang, D.M. Terrian, Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells, *Cancer Res.* 68 (2008) 7864–7871. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6538>.
- [10] L. Song, S. Tang, X. Han, Z. Jiang, L. Dong, C. Liu, X. Liang, J. Dong, C. Qiu, Y. Wang, Y. Du, KIBRA controls exosome secretion via inhibiting the proteasomal degradation of Rab27a, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1639. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09720-x>.
- [11] L. Balaj, R. Lessard, L. Dai, Y.-J. Cho, S.L. Pomeroy, X.O. Breakefield, J. Skog, Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences, *Nat. Commun.* 2 (2011) 180. <https://doi.org/10.1038/ncomms1180>.
- [12] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J.J. Lee, J.O. Lötvall, Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells, *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 654–659. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>.
- [13] J. Skog, T. Würdinger, S. van Rijn, D.H. Meijer, L. Gainche, W.T. Curry, B.S. Carter, A.M. Krichevsky, X.O. Breakefield, Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour

- growth and provide diagnostic biomarkers, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008) 1470–1476. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>.
- [14] Z. Sun, S. Yang, Q. Zhou, G. Wang, J. Song, Z. Li, Z. Zhang, J. Xu, K. Xia, Y. Chang, J. Liu, W. Yuan, Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment, *Mol. Cancer* 17 (2018) 82. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0831-z>.
- [15] M.-P. Caby, D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo, C. Bonnerot, Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma, *Int. Immunol.* 17 (2005) 879–887. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh267>.
- [16] C. Lässer, V. Seyed Alikhani, K. Ekström, M. Eldh, P. Torregrosa Paredes, A. Bossios, M. Sjöstrand, S. Gabrielsson, J. Lötval, H. Valadi, Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages, *J. Transl. Med.* 9 (2011) 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>.
- [17] Y. Yagi, T. Ohkubo, H. Kawaji, A. Machida, H. Miyata, S. Goda, S. Roy, Y. Hayashizaki, H. Suzuki, T. Yokota, Next-generation sequencing-based small RNA profiling of cerebrospinal fluid exosomes, *Neurosci. Lett.* 636 (2017) 48–57. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.10.042>.
- [18] J. Nilsson, J. Skog, A. Nordstrand, V. Baranov, L. Mincheva-Nilsson, X.O. Breakefield, A. Widmark, Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer, *Br. J. Cancer* 100 (2009) 1603–1607. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605058>.
- [19] L. Vojtech, S. Woo, S. Hughes, C. Levy, L. Ballweber, R.P. Sauteraud, J. Strobl, K. Westerberg, R. Gottardo, M. Tewari, F. Hladik, Exosomes in human semen carry a distinctive repertoire of small non-coding RNAs with potential regulatory functions, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 7290–7304. <https://doi.org/10.1093/nar/gku347>.
- [20] R. Shah, T. Patel, J.E. Freedman, Circulating extracellular vesicles in human disease, *N. Engl. J. Med.* 379 (2018) 958–966. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1704286>.
- [21] E.I. Buzas, The roles of extracellular vesicles in the immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 23 (2023) 236–250. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00763-8>.
- [22] R. Kalluri, K.M. McAndrews, The role of extracellular vesicles in cancer, *Cell* 186 (2023) 1610–1626. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2023.03.010>.
- [23] X. Luan, K. Sansanaphongpricha, I. Myers, H. Chen, H. Yuan, D. Sun, Engineering exosomes as refined biological nanoplatforms for drug delivery, *Acta Pharmacol. Sin.* 38 (2017) 754–763. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.12>.
- [24] K.B. Johnsen, J.M. Gudbergsson, M.N. Skov, L. Pilgaard, T. Moos, M. Duroux, A comprehensive overview of exosomes as drug delivery vehicles — Endogenous nanocarriers for targeted cancer therapy, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1846 (2014) 75–87. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.04.005>.
- [25] P. Vader, E.A. Mol, G. Pasterkamp, R.M. Schiffelers, Extracellular vesicles for drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 106 (2016) 148–156. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006>.
- [26] S.G. Antimisiaris, S. Mourtas, A. Marazioti, S.G. Antimisiaris, S. Mourtas, A. Marazioti, Exosomes

- and exosome-inspired vesicles for targeted drug delivery, *Pharmaceutics* 10 (2018) 218. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040218>.
- [27] E.V. Batrakova, M.S. Kim, Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery, *J. Controlled Release* 219 (2015) 396–405. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.07.030>.
- [28] M.-C. Didiot, L.M. Hall, A.H. Coles, R.A. Haraszti, B.M. Godinho, K. Chase, E. Sapp, S. Ly, J.F. Alterman, M.R. Hassler, D. Echeverria, L. Raj, D.V. Morrissey, M. DiFiglia, N. Aronin, A. Khvorova, Exosome-mediated delivery of hydrophobically modified siRNA for huntingtin mRNA silencing, *Mol. Ther.* 24 (2016) 1836–1847. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.126>.
- [29] Z. Naseri, R.K. Oskuee, M.R. Jaafari, M.F. Moghadam, Exosome-mediated delivery of functionally active miRNA-142-3p inhibitor reduces tumorigenicity of breast cancer in vitro and in vivo, *Int. J. Nanomedicine* 13 (2018) 7727–7747. <https://doi.org/10.2147/IJN.S182384>.
- [30] R. Kojima, D. Bojar, G. Rizzi, G.C.-E. Hamri, M.D. El-Baba, P. Saxena, S. Ausländer, K.R. Tan, M. Fussenegger, Designer exosomes produced by implanted cells intracerebrally deliver therapeutic cargo for Parkinson's disease treatment, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1305. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03733-8>.
- [31] N. Yim, S.-W. Ryu, K. Choi, K.R. Lee, S. Lee, H. Choi, J. Kim, M.R. Shaker, W. Sun, J.-H. Park, D. Kim, W.D. Heo, C. Choi, Exosome engineering for efficient intracellular delivery of soluble proteins using optically reversible protein–protein interaction module, *Nat. Commun.* 7 (2016) 12277. <https://doi.org/10.1038/ncomms12277>.
- [32] H. Hirose, Y. Hirai, M. Sasaki, H. Sawa, S. Futaki, Quantitative analysis of extracellular vesicle uptake and fusion with recipient cells, *Bioconjug. Chem.* 33 (2022) 1852–1859. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.2c00307>.
- [33] E. Bonsergent, E. Grisard, J. Buchrieser, O. Schwartz, C. Théry, G. Lavieu, Quantitative characterization of extracellular vesicle uptake and content delivery within mammalian cells, *Nat. Commun.* 12 (2021) 1864. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22126-y>.
- [34] M. Somiya, S. Kuroda, Reporter gene assay for membrane fusion of extracellular vesicles, *J. Extracell. Vesicles* 10 (2021) e12171. <https://doi.org/10.1002/jev2.12171>.
- [35] V. Sokolova, A.-K. Ludwig, S. Hornung, O. Rotan, P.A. Horn, M. Eppe, B. Giebel, Characterisation of exosomes derived from human cells by nanoparticle tracking analysis and scanning electron microscopy, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87 (2011) 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.05.013>.
- [36] G. Midekessa, K. Godakumara, J. Ord, J. Viil, F. Lättikivi, K. Dissanayake, S. Kopanchuk, A. Rinken, A. Andronowska, S. Bhattacharjee, T. Rinken, A. Fazeli, Zeta potential of extracellular vesicles: toward understanding the attributes that determine colloidal stability, *ACS Omega* 5 (2020) 16701–16710. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01582>.
- [37] S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao, M.A. Hamaly, M.Y. Alkawareek, E.C. Dreaden, D. Brown, A.M. Alkilany, O.C. Farokhzad, M. Mahmoudi, Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell,

- Chem. Soc. Rev. 46 (2017) 4218–4244. <https://doi.org/10.1039/C6CS00636A>.
- [38] T. Tian, Y.-L. Zhu, F.-H. Hu, Y.-Y. Wang, N.-P. Huang, Z.-D. Xiao, Dynamics of exosome internalization and trafficking, *J. Cell. Physiol.* 228 (2013) 1487–1495. <https://doi.org/10.1002/jcp.24304>.
- [39] K. O'Brien, K. Breyne, S. Ughetto, L.C. Laurent, X.O. Breakefield, RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 585–606. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>.
- [40] W. Meng, C. He, Y. Hao, L. Wang, L. Li, G. Zhu, Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source, *Drug Deliv.* 27 (2020) 585–598. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1748758>.
- [41] S. Zhao, Y. Di, H. Fan, C. Xu, H. Li, Y. Wang, W. Wang, C. Li, J. Wang, Targeted delivery of extracellular vesicles: the mechanisms, techniques and therapeutic applications, *Mol. Biomed.* 5 (2024) 60. <https://doi.org/10.1186/s43556-024-00230-x>.
- [42] M.E. Hung, J.N. Leonard, A platform for actively loading cargo RNA to elucidate limiting steps in EV-mediated delivery, *J. Extracell. Vesicles* 5 (2016) 31027. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31027>.
- [43] J.G. van den Boorn, M. Schlee, C. Coch, G. Hartmann, SiRNA delivery with exosome nanoparticles, *Nat. Biotechnol.* 29 (2011) 325–326. <https://doi.org/10.1038/nbt.1830>.
- [44] S.R. Jackson Cullison, J.P. Flemming, K. Karagoz, P.J. Wermuth, M.G. Mahoney, Mechanisms of extracellular vesicle uptake and implications for the design of cancer therapeutics, *J. Extracell. Biol.* 3 (2024) e70017. <https://doi.org/10.1002/jex2.70017>.
- [45] A. Gonda, J. Kabagwira, G.N. Senthil, N.R. Wall, Internalization of exosomes through receptor-mediated endocytosis, *Mol. Cancer Res.* 17 (2019) 337–347. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-18-0891>.
- [46] H. Costa Verdera, J.J. Gitz-Francois, R.M. Schiffelers, P. Vader, Cellular uptake of extracellular vesicles is mediated by clathrin-independent endocytosis and macropinocytosis, *J. Controlled Release* 266 (2017) 100–108. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.019>.
- [47] O. Meier, K. Boucke, S.V. Hammer, S. Keller, R.P. Stidwill, S. Hemmi, U.F. Greber, Adenovirus triggers macropinocytosis and endosomal leakage together with its clathrin-mediated uptake, *J. Cell Biol.* 158 (2002) 1119–1131. <https://doi.org/10.1083/jcb.200112067>.
- [48] A.T. Jones, Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides, *J. Cell. Mol. Med.* 11 (2007) 670–684. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00062.x>.
- [49] J. Mercer, A. Helenius, Virus entry by macropinocytosis, *Nat. Cell Biol.* 11 (2009) 510–520. <https://doi.org/10.1038/ncb0509-510>.
- [50] S. Futaki, Functional peptides that target biomembranes: design and modes of action, *Chem. Pharm. Bull.* 69 (2021) 601–607. <https://doi.org/10.1248/cpb.c21-00140>.
- [51] S. Futaki, J.V.V. Arafiles, H. Hirose, Peptide-assisted intracellular delivery of biomacromolecules,

- Chem. Lett. 49 (2020) 1088–1094. <https://doi.org/10.1246/cl.200392>.
- [52] J.V.V. Arafiles, H. Hirose, Y. Hirai, M. Kuriyama, M.M. Sakyamah, W. Nomura, K. Sonomura, M. Imanishi, A. Otaka, H. Tamamura, S. Futaki, Discovery of a Macropinocytosis-inducing peptide potentiated by medium-mediated intramolecular disulfide formation, *Angew. Chem. Int. Ed.* 60 (2021) 11928–11936. <https://doi.org/10.1002/anie.202016754>.
- [53] M. Kosuge, T. Takeuchi, I. Nakase, A.T. Jones, S. Futaki, Cellular internalization and distribution of arginine-rich peptides as a function of extracellular peptide concentration, serum, and plasma membrane associated proteoglycans, *Bioconjug. Chem.* 19 (2008) 656–664. <https://doi.org/10.1021/bc700289w>.
- [54] X. Gao, N. Ran, X. Dong, B. Zuo, R. Yang, Q. Zhou, H.M. Moulton, Y. Seow, H. Yin, Anchor peptide captures, targets, and loads exosomes of diverse origins for diagnostics and therapy, *Sci. Transl. Med.* 10 (2018) eaat0195. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat0195>.
- [55] I. Nakase, K. Noguchi, I. Fujii, S. Futaki, Vectorization of biomacromolecules into cells using extracellular vesicles with enhanced internalization induced by macropinocytosis, *Sci. Rep.* 6 (2016) 34937. <https://doi.org/10.1038/srep34937>.
- [56] D.G. You, G.T. Lim, S. Kwon, W. Um, B.H. Oh, S.H. Song, J. Lee, D.-G. Jo, Y.W. Cho, J.H. Park, Metabolically engineered stem cell-derived exosomes to regulate macrophage heterogeneity in rheumatoid arthritis, *Sci. Adv.* 7 (2021) eabe0083. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abe0083>.
- [57] S. Ohno, M. Takanashi, K. Sudo, S. Ueda, A. Ishikawa, N. Matsuyama, K. Fujita, T. Mizutani, T. Ohgi, T. Ochiya, N. Gotoh, M. Kuroda, Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor microRNA to breast cancer cells, *Mol. Ther.* 21 (2013) 185–191. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>.
- [58] S.A.A. Kooijmans, C.G. Aleza, S.R. Roffler, W.W. van Solinge, P. Vader, R.M. Schiffelers, Display of GPI-anchored anti-EGFR nanobodies on extracellular vesicles promotes tumour cell targeting, *J. Extracell. Vesicles* 5 (2016) 31053. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.31053>.
- [59] T.J. Antes, R.C. Middleton, K.M. Luther, T. Ijichi, K.A. Peck, W.J. Liu, J. Valle, A.K. Echavez, E. Marbán, Targeting extracellular vesicles to injured tissue using membrane cloaking and surface display, *J. Nanobiotechnology* 16 (2018) 61. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0388-4>.
- [60] L. Jiang, J. Luirink, S.A.A. Kooijmans, K.P.M. van Kessel, W. Jong, M. van Essen, C.W. Seinen, S. de Maat, O.G. de Jong, J.F.F. Gitz-François, W.E. Hennink, P. Vader, R.M. Schiffelers, A post-insertion strategy for surface functionalization of bacterial and mammalian cell-derived extracellular vesicles, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 1865 (2021) 129763. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129763>.
- [61] C. Meyer, J. Losacco, Z. Stickney, L. Li, G. Marriott, B. Lu, Pseudotyping exosomes for enhanced protein delivery in mammalian cells, *Int. J. Nanomedicine* 12 (2017) 3153–3170. <https://doi.org/10.2147/IJN.S133430>.
- [62] X. Zhang, Q. Xu, Z. Zi, Z. Liu, C. Wan, L. Crisman, J. Shen, X. Liu, Programmable extracellular

- vesicles for macromolecule delivery and genome modifications, *Dev. Cell* 55 (2020) 784-801.e9. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.11.007>.
- [63] X. Yao, P. Lyu, K. Yoo, M.K. Yadav, R. Singh, A. Atala, B. Lu, Engineered extracellular vesicles as versatile ribonucleoprotein delivery vehicles for efficient and safe CRISPR genome editing, *J. Extracell. Vesicles* 10 (2021) e12076. <https://doi.org/10.1002/jev2.12076>.
- [64] Y. Yang, Y. Hong, G.-H. Nam, J.H. Chung, E. Koh, I.-S. Kim, Virus-mimetic fusogenic exosomes for direct delivery of integral membrane proteins to target cell membranes, *Adv. Mater.* 29 (2017) 1605604. <https://doi.org/10.1002/adma.201605604>.
- [65] I.S. Kim, S. Jenni, M.L. Stanifer, E. Roth, S.P.J. Whelan, A.M. van Oijen, S.C. Harrison, Mechanism of membrane fusion induced by vesicular stomatitis virus G protein, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114 (2017) E28–E36. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618883114>.
- [66] D. Finkelshtein, A. Werman, D. Novick, S. Barak, M. Rubinstein, LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>.
- [67] I. Nakase, M. Niwa, T. Takeuchi, K. Sonomura, N. Kawabata, Y. Koike, M. Takehashi, S. Tanaka, K. Ueda, J.C. Simpson, A.T. Jones, Y. Sugiura, S. Futaki, Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement, *Mol. Ther.* 10 (2004) 1011–1022. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.010>.
- [68] S. Futaki, I. Nakase, Cell-surface interactions on arginine-rich cell-penetrating peptides allow for multiplex modes of internalization, *Acc. Chem. Res.* 50 (2017) 2449–2456. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.7b00221>.
- [69] P. Lönn, S.F. Dowdy, Cationic PTD/PPP-mediated macromolecular delivery: charging into the cell, *Expert Opin. Drug Deliv.* 12 (2015) 1627–1636. <https://doi.org/10.1517/17425247.2015.1046431>.
- [70] C. Ramirez, A.D. Hauser, E.A. Vucic, D. Bar-Sagi, Plasma membrane V-ATPase controls oncogenic RAS-induced macropinocytosis, *Nature* 576 (2019) 477–481. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1831-x>.
- [71] N. Tejeda-Muñoz, L.V. Albrecht, M.H. Bui, E.M. De Robertis, Wnt canonical pathway activates macropinocytosis and lysosomal degradation of extracellular proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (2019) 10402–10411. <https://doi.org/10.1073/pnas.1903506116>.
- [72] V. Jayashankar, A.L. Edinger, Macropinocytosis confers resistance to therapies targeting cancer anabolism, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1121. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14928-3>.
- [73] S.D. Conner, S.L. Schmid, Regulated portals of entry into the cell, *Nature* 422 (2003) 37–44. <https://doi.org/10.1038/nature01451>.
- [74] J.V.V. Arafles, H. Hirose, M. Akishiba, S. Tsuji, M. Imanishi, S. Futaki, Stimulating macropinocytosis for intracellular nucleic acid and protein delivery: a combined strategy with membrane-lytic peptides to facilitate endosomal escape, *Bioconjug. Chem.* 31 (2020) 547–553. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.0c00064>.

- [75] J.A. Hutchinson, S. Burholt, I.W. Hamley, Peptide hormones and lipopeptides: from self-assembly to therapeutic applications, *J. Pept. Sci.* 23 (2017) 82–94. <https://doi.org/10.1002/psc.2954>.
- [76] G. Tünnemann, R.M. Martin, S. Haupt, C. Patsch, F. Edenhofer, M.C. Cardoso, Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells, *FASEB J.* 20 (2006) 1775–1784. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5523com>.
- [77] S.K. Garg, The role of basal insulin and glucagon-like peptide-1 agonists in the therapeutic management of type 2 diabetes—A comprehensive review, *Diabetes Technol. Ther.* 12 (2010) 11–24. <https://doi.org/10.1089/dia.2009.0127>.
- [78] A. Yoshimura, Adenovirus-induced leakage of co-endocytosed macromolecules into the cytosol, *Cell Struct. Funct.* 10 (1985) 391–404. <https://doi.org/10.1247/csf.10.391>.
- [79] A. Taguchi, K. Kobayashi, A. Kotani, K. Muguruma, M. Kobayashi, K. Fukumoto, K. Takayama, H. Hakamata, Y. Hayashi, 3-nitro-2-pyridinesulfenates as efficient solution- and solid-phase disulfide bond forming agents, *Chemistry – A European Journal* 23 (2017) 8262–8267. <https://doi.org/10.1002/chem.201700952>.
- [80] M. Ishiyama, Y. Miyazono, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno, A highly water-soluble disulfonated tetrazolium salt as a chromogenic indicator for NADH as well as cell viability, *Talanta* 44 (1997) 1299–1305. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(97\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(97)00017-9).
- [81] M. Koivusalo, C. Welch, H. Hayashi, C.C. Scott, M. Kim, T. Alexander, N. Touret, K.M. Hahn, S. Grinstein, Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling, *J. Cell Biol.* 188 (2010) 547–563. <https://doi.org/10.1083/jcb.200908086>.
- [82] N. Araki, M.T. Johnson, J.A. Swanson, A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages., *J. Cell Biol.* 135 (1996) 1249–1260. <https://doi.org/10.1083/jcb.135.5.1249>.
- [83] Z. Zhao, Y. Aliwarga, M.D. Willcox, Intrinsic protein fluorescence interferes with detection of tear glycoproteins in SDS-polyacrylamide gels using extrinsic fluorescent dyes, *J. Biomol. Tech. JBT* 18 (2007) 331–335.
- [84] J. Riedl, A.H. Crevenna, K. Kessenbrock, J.H. Yu, D. Neukirchen, M. Bista, F. Bradke, D. Jenne, T.A. Holak, Z. Werb, M. Sixt, R. Wedlich-Soldner, Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin, *Nat. Methods* 5 (2008) 605–607. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1220>.
- [85] S. Chatterjee, T.K. Mukherjee, Effect of Self-association of bovine serum albumin on the stability of surfactant-induced aggregates of allylamine-capped silicon quantum dots, *J. Phys. Chem. B* 117 (2013) 16110–16116. <https://doi.org/10.1021/jp4091188>.
- [86] S. Futaki, I. Nakase, A. Tadokoro, T. Takeuchi, A.T. Jones, Arginine-rich peptides and their internalization mechanisms, *Biochem. Soc. Trans.* 35 (2007) 784–787. <https://doi.org/10.1042/BST0350784>.
- [87] I. Nakase, K. Noguchi, A. Aoki, T. Takatani-Nakase, I. Fujii, S. Futaki, Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient

- intracellular delivery, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1991. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02014-6>.
- [88] I. Nakase, S. Futaki, Combined treatment with a pH-sensitive fusogenic peptide and cationic lipids achieves enhanced cytosolic delivery of exosomes, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10112. <https://doi.org/10.1038/srep10112>.
- [89] M. Morishita, Y. Takahashi, M. Nishikawa, R. Ariizumi, Y. Takakura, Enhanced class I tumor antigen presentation via cytosolic delivery of exosomal cargos by tumor-cell-derived exosomes displaying a pH-sensitive fusogenic peptide, *Mol. Pharm.* 14 (2017) 4079–4086. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00760>.
- [90] H. Xu, C. Liao, S. Liang, B.-C. Ye, A novel peptide-equipped exosomes platform for delivery of antisense oligonucleotides, *ACS Appl. Mater. Interfaces* 13 (2021) 10760–10767. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c00016>.
- [91] M. Zhuang, X. Chen, D. Du, J. Shi, M. Deng, Q. Long, X. Yin, Y. Wang, L. Rao, SPION decorated exosome delivery of TNF- α to cancer cell membranes through magnetism, *Nanoscale* 12 (2019) 173–188. <https://doi.org/10.1039/C9NR05865F>.
- [92] M.S. Pols, J. Klumperman, Trafficking and function of the tetraspanin CD63, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 1584–1592. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.020>.
- [93] K. Brennan, K. Martin, S.P. FitzGerald, J. O’Sullivan, Y. Wu, A. Blanco, C. Richardson, M.M. McGee, A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1039. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57497-7>.
- [94] S. Mastoridis, G.M. Bertolino, G. Whitehouse, F. Dazzi, A. Sanchez-Fueyo, M. Martinez-Llordella, Multiparametric analysis of circulating exosomes and other small extracellular vesicles by advanced imaging flow cytometry, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1583. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01583>.
- [95] W. Nakai, T. Yoshida, D. Diez, Y. Miyatake, T. Nishibu, N. Imawaka, K. Naruse, Y. Sadamura, R. Hanayama, A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles, *Sci. Rep.* 6 (2016) 33935. <https://doi.org/10.1038/srep33935>.
- [96] M.P. Hall, J. Unch, B.F. Binkowski, M.P. Valley, B.L. Butler, M.G. Wood, P. Otto, K. Zimmerman, G. Vidugiris, T. Machleidt, M.B. Robers, H.A. Benink, C.T. Eggers, M.R. Slater, P.L. Meisenheimer, D.H. Klaubert, F. Fan, L.P. Encell, K.V. Wood, Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate, *ACS Chem. Biol.* 7 (2012) 1848–1857. <https://doi.org/10.1021/cb3002478>.
- [97] R. Böttger, R. Hoffmann, D. Knappe, Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum, *PLOS One* 12 (2017) e0178943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178943>.
- [98] C. Palm, M. Jayamanne, M. Kjellander, M. Hällbrink, Peptide degradation is a critical determinant for cell-penetrating peptide uptake, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1768 (2007) 1769–1776. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.03.029>.

- [99] L.T. Nguyen, J.K. Chau, N.A. Perry, L. de Boer, S.A.J. Zaat, H.J. Vogel, Serum stabilities of short tryptophan- and arginine-rich antimicrobial peptide analogs, *PLOS One* 5 (2010) e12684. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012684>.
- [100] M.L. Biniossek, M. Niemer, K. Maksimchuk, B. Mayer, J. Fuchs, P.F. Huesgen, D.G. McCafferty, B. Turk, G. Fritz, J. Mayer, G. Haecker, L. Mach, O. Schilling, Identification of protease specificity by combining proteome-derived peptide libraries and quantitative proteomics, *Mol. Cell. Proteomics MCP* 15 (2016) 2515–2524. <https://doi.org/10.1074/mcp.O115.056671>.
- [101] H. Zhang, S. Chen, Cyclic peptide drugs approved in the last two decades (2001–2021), *RSC Chem. Biol.* 3 (2022) 18–31. <https://doi.org/10.1039/D1CB00154J>.
- [102] A. Zorzi, S.J. Middendorp, J. Wilbs, K. Deyle, C. Heinis, Acylated heptapeptide binds albumin with high affinity and application as tag furnishes long-acting peptides, *Nat. Commun.* 8 (2017) 16092. <https://doi.org/10.1038/ncomms16092>.
- [103] R. Kowalczyk, P.W.R. Harris, G.M. Williams, S.-H. Yang, M.A. Brimble, Peptide lipidation – a synthetic strategy to afford peptide based therapeutics, *Pept. Pept.-Based Biomater. Their Biomed. Appl.* 1030 (2017) 185–227. https://doi.org/10.1007/978-3-319-66095-0_9.
- [104] G.V. Richieri, R.T Ogata, A.M. Kleinfeld, Equilibrium constants for the binding of fatty acids with fatty acid-binding proteins from adipocyte, intestine, heart, and liver measured with the fluorescent probe ADIFAB, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23918–23930. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)51026-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)51026-2)
- [105] T. Acter, N. Uddin, J. Das, A. Akhter, T.R. Choudhury, S. Kim, Evolution of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) as coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic: A global health emergency, *Sci. Total Environ.* 730 (2020) 138996. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138996>.
- [106] D. Focosi, S. McConnell, A. Casadevall, E. Cappello, G. Valdiserra, M. Tuccori, Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2, *Lancet Infect. Dis.* 22 (2022) e311–e326. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00311-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00311-5).
- [107] R. Patel, M. Kaki, V.S. Potluri, P. Kahar, D. Khanna, A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson, *Hum. Vaccines Immunother.* 18 (2022) 2002083. <https://doi.org/10.1080/21645515.2021.2002083>.
- [108] A.J. Pruijssers, A.S. George, A. Schäfer, S.R. Leist, L.E. Gralinski, K.H. Dinno, B.L. Yount, M.L. Agostini, L.J. Stevens, J.D. Chappell, X. Lu, T.M. Hughes, K. Gully, D.R. Martinez, A.J. Brown, R.L. Graham, J.K. Perry, V.D. Pont, J. Pitts, B. Ma, D. Babusis, E. Murakami, J.Y. Feng, J.P. Bilello, D.P. Porter, T. Cihlar, R.S. Baric, M.R. Denison, T.P. Sheahan, Remdesivir inhibits SARS-CoV-2 in human lung cells and chimeric SARS-CoV expressing the SARS-CoV-2 RNA polymerase in mice, *Cell Rep.* 32 (2020) 107940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107940>.
- [109] R.L. Hoffman, R.S. Kania, M.A. Brothers, J.F. Davies, R.A. Ferre, K.S. Gajiwala, M. He, R.J. Hogan, K. Kozminski, L.Y. Li, J.W. Lockner, J. Lou, M.T. Marra, L.J.Jr. Mitchell, B.W. Murray, J.A. Nieman,

- S. Noell, S.P. Planken, T. Rowe, K. Ryan, G.J.I. Smith, J.E. Solowiej, C.M. Steppan, B. Taggart, Discovery of ketone-based covalent inhibitors of coronavirus 3CL proteases for the potential therapeutic treatment of COVID-19, *J. Med. Chem.* 63 (2020) 12725–12747. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01063>.
- [110] Y. Unoh, S. Uehara, K. Nakahara, H. Nobori, Y. Yamatsu, S. Yamamoto, Y. Maruyama, Y. Taoda, K. Kasamatsu, T. Suto, K. Kouki, A. Nakahashi, S. Kawashima, T. Sanaki, S. Toba, K. Uemura, T. Mizutare, S. Ando, M. Sasaki, Y. Orba, H. Sawa, A. Sato, T. Sato, T. Kato, Y. Tachibana, Discovery of S-217622, a noncovalent oral SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor clinical candidate for treating COVID-19, *J. Med. Chem.* 65 (2022) 6499–6512. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00117>.
- [111] Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao, H. Peng, S.M. Sterling, R.M. Walsh, S. Rawson, S. Rits-Volloch, B. Chen, Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein, *Science* 369 (2020) 1586–1592. <https://doi.org/10.1126/science.abd4251>.
- [112] M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder, N. Krüger, T. Herrler, S. Erichsen, T.S. Schiergens, G. Herrler, N.-H. Wu, A. Nitsche, M.A. Müller, C. Drosten, S. Pöhlmann, SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor, *Cell* 181 (2020) 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
- [113] L. Jiang, T.A.P. Driedonks, W.S.P. Jong, S. Dhakal, H. Bart van den Berg van Saparoea, I. Sitaras, R. Zhou, C. Caputo, K. Littlefield, M. Lowman, M. Chen, G. Lima, O. Gololobova, B. Smith, V. Mahairaki, M. Riley Richardson, K.R. Mulka, A.P. Lane, S.L. Klein, A. Pekosz, C. Brayton, J.L. Mankowski, J. Luirink, J.S. Villano, K.W. Witwer, A bacterial extracellular vesicle-based intranasal vaccine against SARS-CoV-2 protects against disease and elicits neutralizing antibodies to wild-type and Delta variants, *J. Extracell. Vesicles* 11 (2022) e12192. <https://doi.org/10.1002/jev2.12192>.
- [114] Y. Fu, S. Xiong, Tagged extracellular vesicles with the RBD of the viral spike protein for delivery of antiviral agents against SARS-COV-2 infection, *J. Controlled Release* 335 (2021) 584–595. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.05.049>.
- [115] H. Furukawa, S. Nakamura, R. Mizuta, K. Sakamoto, H. Inaba, S. Sawada, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, K. Matsuura, Enveloped viral replica equipped with spike protein derived from SARS-CoV-2, *ACS Synth. Biol.* 13 (2024) 2029–2037. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.4c00165>.
- [116] D.K. Jeppesen, A.M. Fenix, J.L. Franklin, J.N. Higginbotham, Q. Zhang, L.J. Zimmerman, D.C. Liebler, J. Ping, Q. Liu, R. Evans, W.H. Fissell, J.G. Patton, L.H. Rome, D.T. Burnette, R.J. Coffey, Reassessment of exosome composition, *Cell* 177 (2019) 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>.
- [117] M.F. Baietti, Z. Zhang, E. Mortier, A. Melchior, G. Degeest, A. Geeraerts, Y. Ivarsson, F. Depoortere, C. Coomans, E. Vermeiren, P. Zimmermann, G. David, Syndecan–syntenin–ALIX regulates the biogenesis of exosomes, *Nat. Cell Biol.* 14 (2012) 677–685. <https://doi.org/10.1038/ncb2502>.
- [118] M.A. Kumar, S.K. Baba, H.Q. Sadida, S.A. Marzooqi, J. Jerobin, F.H. Altemani, N. Algehainy, M.A. Alanazi, A.-B. Abou-Samra, R. Kumar, A.S. Al-Shabeeb Akil, M.A. Macha, R. Mir, A.A. Bhat,

- Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases, *Signal Transduct. Target. Ther.* 9 (2024) 27. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>.
- [119] N.S. Ogando, T.J. Dalebout, J.C. Zevenhoven-Dobbe, R.W.A.L. Limpens, Y. van der Meer, L. Caly, J. Druce, J.J.C. de Vries, M. Kikkert, M. Bárcena, I. Sidorov, E.J. Snijder, SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology, *J. Gen. Virol.* 101 (2020) 925–940. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001453>.
- [120] S. Matsuyama, N. Nao, K. Shirato, M. Kawase, S. Saito, I. Takayama, N. Nagata, T. Sekizuka, H. Katoh, F. Kato, M. Sakata, M. Tahara, S. Kutsuna, N. Ohmagari, M. Kuroda, T. Suzuki, T. Kageyama, M. Takeda, Enhanced isolation of SARS-CoV-2 by TMPRSS2-expressing cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117 (2020) 7001–7003. <https://doi.org/10.1073/pnas.2002589117>.
- [121] J. Koch, Z.M. Uckelely, P. Doldan, M. Stanifer, S. Boulant, P. Lozach, TMPRSS2 expression dictates the entry route used by SARS-CoV-2 to infect host cells, *EMBO J.* 40 (2021) e107821. <https://doi.org/10.15252/emboj.2021107821>.
- [122] H. Ma, Z. Zhu, H. Lin, S. Wang, P. Zhang, Y. Li, L. Li, J. Wang, Y. Zhao, J. Han, Pyroptosis of syncytia formed by fusion of SARS-CoV-2 spike and ACE2-expressing cells, *Cell Discov.* 7 (2021) 73. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00310-0>.
- [123] G. Papa, D.L. Mallery, A. Albecka, L.G. Welch, J. Cattin-Ortolá, J. Luptak, D. Paul, H.T. McMahon, I.G. Goodfellow, A. Carter, S. Munro, L.C. James. Furin cleavage of SARS-CoV-2 Spike promotes but is not essential for infection and cell-cell fusion, *PLOS Pathog.* 17 (2021) e1009246. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009246>.
- [124] C.B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe, Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23 (2022) 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>.
- [125] J. Shang, Y. Wan, C. Luo, G. Ye, Q. Geng, A. Auerbach, F. Li, Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117 (2020) 11727–11734. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003138117>.
- [126] B. Ju, Q. Zhang, J. Ge, R. Wang, J. Sun, X. Ge, J. Yu, S. Shan, B. Zhou, S. Song, X. Tang, J. Yu, J. Lan, J. Yuan, H. Wang, J. Zhao, S. Zhang, Y. Wang, X. Shi, L. Liu, J. Zhao, X. Wang, Z. Zhang, L. Zhang, Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection, *Nature* 584 (2020) 115–119. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2380-z>.
- [127] T. Hempel, L. Raich, S. Olsson, N.P. Azouz, A.M. Klingler, M. Hoffmann, S. Pöhlmann, M.E. Rothenberg, F. Noé, Molecular mechanism of inhibiting the SARS-CoV-2 cell entry facilitator TMPRSS2 with camostat and nafamostat, *Chem. Sci.* 12 (2021) 983–992. <https://doi.org/10.1039/D0SC05064D>.
- [128] K. Tsuji, K.B.-A. Owusu, Y. Miura, T. Ishii, K. Shinohara, T. Kobayakawa, A. Emi, T. Nakano, Y. Suzuki, H. Tamamura, Dimerized fusion inhibitor peptides targeting the HR1–HR2 interaction of SARS-CoV-2, *RSC Adv.* 13 (2023) 8779–8793. <https://doi.org/10.1039/D2RA07356K>.
- [129] J. Hu, Q. Gao, C. He, A. Huang, N. Tang, K. Wang, Development of cell-based pseudovirus entry assay to identify potential viral entry inhibitors and neutralizing antibodies against SARS-CoV-2,

- Genes Dis. 7 (2020) 551–557. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2020.07.006>.
- [130] J. Liu, R. Cao, M. Xu, X. Wang, H. Zhang, H. Hu, Y. Li, Z. Hu, W. Zhong, M. Wang, Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro, *Cell Discov.* 6 (2020) 16. <https://doi.org/10.1038/s41421-020-0156-0>.
- [131] A.J.B. Kreutzberger, A. Sanyal, A. Saminathan, L.-M. Bloyet, S. Stumpf, Z. Liu, R. Ojha, M.T. Patjas, A. Geneid, G. Scanavachi, C.A. Doyle, E. Somerville, R.B.D.C. Correia, G. Di Caprio, S. Toppila-Salmi, A. Mäkitie, V. Kiessling, O. Vapalahti, S.P.J. Whelan, G. Balistreri, T. Kirchhausen, SARS-CoV-2 requires acidic pH to infect cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119 (2022) e2209514119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2209514119>.
- [132] A. Otake, M. Nakamura, D. Nameki, E. Kodama, S. Uchiyama, S. Nakamura, H. Nakano, H. Tamamura, Y. Kobayashi, M. Matsuoka, N. Fujii, Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells, *Angew. Chem. Int. Ed.* 41 (2002) 2937–2940. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20020816\)41:16%253C2937::AID-ANIE2937%253E3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20020816)41:16%253C2937::AID-ANIE2937%253E3.0.CO;2-J).
- [133] C.-J. Ko, T.-W. Hsu, S.-R. Wu, S.-W. Lan, T.-F. Hsiao, H.-Y. Lin, H.-H. Lin, H.-F. Tu, C.-F. Lee, C.-C. Huang, M.-J.M. Chen, P.-W. Hsiao, H.-P. Huang, M.-S. Lee, Inhibition of TMPRSS2 by HAI-2 reduces prostate cancer cell invasion and metastasis, *Oncogene* 39 (2020) 5950–5963. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01413-w>.
- [134] Y. Tomita, S. Matsuyama, H. Fukuhara, K. Maenaka, H. Kataoka, T. Hashiguchi, M. Takeda, The physiological TMPRSS2 inhibitor HAI-2 alleviates SARS-CoV-2 infection, *J. Virol.* 95 (2021) e00434-21. <https://doi.org/10.1128/JVI.00434-21>.
- [135] P. Gee, M.S.Y. Lung, Y. Okuzaki, N. Sasakawa, T. Iguchi, Y. Makita, H. Hozumi, Y. Miura, L.F. Yang, M. Iwasaki, X.H. Wang, M.A. Waller, N. Shirai, Y.O. Abe, Y. Fujita, K. Watanabe, A. Kagita, K.A. Iwabuchi, M. Yasuda, H. Xu, T. Noda, J. Komano, H. Sakurai, N. Inukai, A. Hotta, Extracellular nanovesicles for packaging of CRISPR-Cas9 protein and sgRNA to induce therapeutic exon skipping, *Nat. Commun.* 11 (2020) 1334. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14957-y>.
- [136] J. Lee, Y. Naoe, U. Bang, Y. Nakagama, A. Saito, Y. Kido, A. Hotta, Neutralization sensitivity of SARS-CoV-2 Omicron variants FL.1 and GE.1 by therapeutic antibodies and XBB sera, *Virology* 595 (2024) 110067. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110067>.
- [137] B. Meng, A. Abdullahi, I.A.T.M. Ferreira, N. Goonawardane, A. Saito, I. Kimura, D. Yamasoba, P.P. Gerber, S. Fatihi, S. Rathore, S.K. Zepeda, G. Papa, S.A. Kemp, T. Ikeda, M. Toyoda, T.S. Tan, J. Kuramochi, S. Mitsunaga, T. Ueno, K. Shirakawa, A. Takaori-Kondo, T. Brevini, D.L. Mallery, O.J. Charles, J.E. Bowen, A. Joshi, A.C. Walls, L. Jackson, D. Martin, K.G.C. Smith, J. Bradley, J.A.G. Briggs, J. Choi, E. Madissoon, K.B. Meyer, P. Ilcochova, L. Ceron-Gutierrez, R. Doffinger, S.A. Teichmann, A.J. Fisher, M.S. Pizzuto, A. de Marco, D. Corti, M. Hosmillo, J.H. Lee, L.C. James, L. Thukral, D. Veesler, A. Sigal, F. Sampaziotis, I.G. Goodfellow, N.J. Matheson, K. Sato, R.K. Gupta, Altered TMPRSS2 usage by SARS-CoV-2 Omicron impacts infectivity and fusogenicity, *Nature* 603

- (2022) 706–714. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04474-x>.
- [138] A.Z. Mykytyn, T.I. Breugem, M.H. Geurts, J. Beumer, D. Schipper, R. van Acker, P.B. van den Doel, M.E. van Royen, J. Zhang, H. Clevers, B.L. Haagmans, M.M. Lamers, SARS-CoV-2 Omicron entry is type II transmembrane serine protease-mediated in human airway and intestinal organoid models, *J. Virol.* 97 (2023) e00851-23. <https://doi.org/10.1128/jvi.00851-23>.
- [139] Z. Wang, K.D. Popowski, D. Zhu, B.L. de Juan Abad, X. Wang, M. Liu, H. Lutz, N. De Naeyer, C.T. DeMarco, T.N. Denny, P.-U.C. Dinh, Z. Li, K. Cheng, Exosomes decorated with a recombinant SARS-CoV-2 receptor-binding domain as an inhalable COVID-19 vaccine, *Nat. Biomed. Eng.* 6 (2022) 791–805. <https://doi.org/10.1038/s41551-022-00902-5>.
- [140] K.S. Park, J.D. Bazzill, S. Son, J. Nam, S.W. Shin, L.J. Ochyl, J.A. Stuckey, J.L. Meagher, L. Chang, J. Song, D.C. Montefiori, C.C. LaBranche, J.L. Smith, J. Xu, J.J. Moon, Lipid-based vaccine nanoparticles for induction of humoral immune responses against HIV-1 and SARS-CoV-2, *J. Controlled Release* 330 (2021) 529–539. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.031>.
- [141] J. Cattin-Ortolá, L.G. Welch, S.L. Maslen, G. Papa, L.C. James, S. Munro, Sequences in the cytoplasmic tail of SARS-CoV-2 Spike facilitate expression at the cell surface and syncytia formation, *Nat. Commun.* 12 (2021) 5333. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25589-1>.
- [142] D. Bestle, M.R. Heindl, H. Limburg, T.V.L. Van, O. Pilgram, H. Moulton, D.A. Stein, K. Hardes, M. Eickmann, O. Dolnik, C. Rohde, H.-D. Klenk, W. Garten, T. Steinmetzer, E. Böttcher-Friebertshäuser, TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells, *Life Sci. Alliance* 3 (2020). <https://doi.org/10.26508/lsa.202000786>.
- [143] A.C. Walls, Y.-J. Park, M.A. Tortorici, A. Wall, A.T. McGuire, D. Veisler, Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein, *Cell* 181 (2020) 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- [144] Y. Li, E. Kanao, T. Yamano, Y. Ishihama, K. Imami, TurboID-EV: proteomic mapping of recipient cellular proteins proximal to small extracellular vesicles, *Anal. Chem.* 95 (2023) 14159–14164. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.3c01015>.
- [145] F. Hikmet, L. Méar, Å. Edvinsson, P. Micke, M. Uhlén, C. Lindskog, The protein expression profile of ACE2 in human tissues, *Mol. Syst. Biol.* 16 (2020) e9610. <https://doi.org/10.15252/msb.20209610>.
- [146] Y. Zhang, S. Sun, C. Du, K. Hu, C. Zhang, M. Liu, Q. Wu, N. Dong, Transmembrane serine protease TMPRSS2 implicated in SARS-CoV-2 infection is autoactivated intracellularly and requires N-glycosylation for regulation, *J. Biol. Chem.* 298 (2022) 102643. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2022.102643>.
- [147] I. Nakase, A. Tadokoro, N. Kawabata, T. Takeuchi, H. Katoh, K. Hiramoto, M. Negishi, M. Nomizu, Y. Sugiura, S. Futaki, Interaction of Arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis, *Biochemistry* 46 (2007) 492–501. <https://doi.org/10.1021/bi0612824>.
- [148] Y. Kawaguchi, T. Takeuchi, K. Kuwata, J. Chiba, Y. Hatanaka, I. Nakase, S. Futaki, Syndecan-4 is a

- receptor for clathrin-mediated endocytosis of arginine-rich cell-penetrating peptides, *Bioconjug. Chem.* 27 (2016) 1119–1130. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00082>.
- [149] X.-C. Zeng, S. Bhasin, X. Wu, J.-G. Lee, S. Maffi, C.J. Nichols, K.J. Lee, J.P. Taylor, L.E. Greene, E. Eisenberg, Hsp70 dynamics in vivo: effect of heat shock and protein aggregation, *J. Cell Sci.* 117 (2004) 4991–5000. <https://doi.org/10.1242/jcs.01373>.
- [150] M. Takeda, S. Ohno, F. Seki, Y. Nakatsu, M. Tahara, Y. Yanagi, Long untranslated regions of the measles virus M and F genes control virus replication and cytopathogenicity, *J. Virol.* 79 (2005) 14346–14354. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.22.14346-14354.2005>.

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始ご懇篤なるご指導並びにご鞭撻を賜りました京都大学名誉教授（現、薬学研究科特任教授）二木 史朗 先生と、京都大学化学研究所 今西 未来 教授に謹んで感謝の意を表します。

研究生活において、直接ご指導を賜りました、京都大学化学研究所 川口 祥正 助教、コロラド州立大学 広瀬 久昭 博士に深く感謝申し上げます。また、多くの示唆に富むご助言をいただきました、広島大学大学院医系科学研究 河野 健一 准教授に深く感謝申し上げます。

第1章において、EV 実験に関する様々なご助言を賜りました大阪公立大学大学院理学研究科 中瀬 生彦 教授に深く御礼申し上げます。また、第1章でペプチドのジスルフィド架橋試薬 NPys-OMe をご供与いただきました、東京薬科大学薬学部 林 良雄 教授、LC-MS 分析のご協力、ご指導いただきました、国立研究開発法人産業技術総合研究所 上田 善弘 主任研究員と、超遠心装置をご使用させていただきました京都大学エネルギー理工学研究所 中田 栄司 教授に深く御礼申し上げます。

第2章での研究を遂行するにあたり、数々のご助言をいただきました京都大学医生物学研究所 橋口 隆生 教授に心より感謝申し上げます。また、ウイルス様粒子の感染阻害実験に関して、多大なるご協力を賜りました京都大学 iPS 細胞研究所 堀田 秋津 准教授、Joseph Lee 氏に深く感謝申し上げます。第2章において、貴重なご助言を賜り、また安定発現細胞株をご供与いただきました、北海道大学ワクチン研究開発拠点 澤 洋文 教授、北海道大学人獣共通感染症国際共同研究所 佐々木 道仁 准教授に深く感謝申し上げます。第2章の EV の TEM 観察にご協力いただきました、京都大学化学研究所 川本 純 准教授に深く感謝申し上げます。SARS-CoV-2 膜融合阻害ペプチドをご供与いただきました、東京科学大学生体材料工学研究所 玉村 啓和 教授、辻 耕平 准教授に深く感謝申し上げます。

研究の遂行のみならず、日々の研究生活をあらゆる面で支えていただきました、Jan Vincent V. Arafiles 博士、音成 兼光 博士、同期の田中 和無為 氏、工藤 南加 氏をはじめとする京都大学化学研究所生体機能設計化学研究領域の卒業生並びに在学生の皆様心より感謝申し上げます。

本研究は、日本学術振興会 DC1 の支援を受けて実施されたものであり、深く御礼申し上げます。

最後に、研究活動を温かく見守り、支えてくださった家族、友人の皆様に心より感謝申し上げます。