

細胞外微粒子の細胞内取り込みとマクロピノサイトーシス

二木 史朗, 広瀬 久昭

マクロピノサイトーシスはアクチンフィラメントの再構築と細胞膜の隆起・融合を伴い、大量の細胞外液を細胞内に取り込む液相エンドサイトーシスである。この際生じる取り込み小胞（マクロピノソーム）の直径は数 μm に達することが知られている。この経路は非特異的に多くの細胞外物質を細胞内に取り込むことが可能と考えられ、さまざまな形態や物性を有する細胞外微粒子の細胞内取り込み経路となりうる。本稿では、細胞外微粒子の細胞内への取り込みにおける、マクロピノサイトーシスの寄与とその同定に関する課題について紹介する。

1. はじめに

細胞は、ナノメートルからマイクロメートルまでのさまざまなサイズの細胞外微粒子を取り込みうることが知られている。これらの微粒子は、細胞の機能に影響を与えることがあり、ポリマー／脂質ベースのナノ材料、マイクロプラスチック、PM2.5などの外来微粒子、マイクロベシクルやエクソソームをはじめとする細胞外小胞などの生体内由来の微粒子がある。これらの微粒子の細胞内取り込み様式や細胞内動態を理解することは、細胞外微粒子による生体反応を解明し制御するために非常に重要である。また、ナノ粒子を用いた細胞内への薬物送達や抗体などの高分子医薬品の細胞内送達の加速という観点からも重要である。

エンドサイトーシスの形態としてよく知られるクラスリン依存性エンドサイトーシスやカベオラ依存性エンドサイトーシスにおいて形成される小胞の大きさは、一般に数十～200 nm程度とされている（図1）¹⁾。したがって、サブマイクロメートルからマイクロメートルサイズの細胞外微粒子の細胞内への取り込みには、これより大きなサイズの小

胞を生じるエンドサイトーシス形態が必要となり、ファゴサイトーシスとマクロピノサイトーシスが取り込み経路の候補となる。ファゴサイトーシスは主に食細胞でみられるエンドサイトーシスで、微生物病原体を含む大きな細胞外粒子の周囲に細胞膜を密着させ、細胞外液を排除する形で細胞内に取り込む。この細胞膜の密着は細胞骨格タンパク質のアクチンフィラメントの再構成により行われる。マクロピノサイトーシスも、ファゴサイトーシスと同様、アクチン駆動性エンドサイトーシスであるが、アクチンフィラメントの再構成により細胞膜の波打ち状態（ラッフルング）が誘起され、細胞外液（および溶質）を細胞内に取り込む液相エンドサイトーシスである。

マクロピノサイトーシスは特にマクロファージや樹状細胞など免疫をつかさどる食細胞、さらに一部のがん細胞で恒常的に起こっている。一方、非食細胞においては、成長因子などの刺激を受けて一過的に誘導されることが知られている。マクロピノサイトーシスによって形成される小胞（マクロピノソーム）の直径は数 μm に達することがい

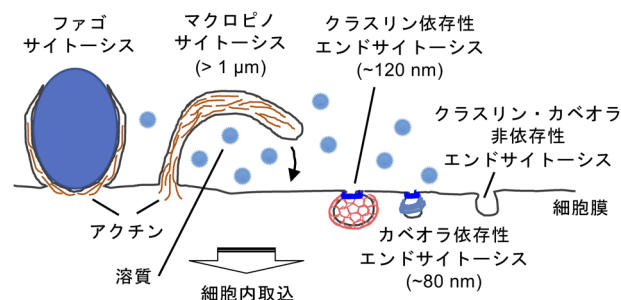


図1 細胞の飲食作用（文献4から許可を得て転載）

京都大学化学研究所（〒611-0011 宇治市五ヶ庄）

Contribution of macropinocytosis in the cellular uptake of extra-cellular fine particles

Shiroh Futaki and Hisaaki Hirose (Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji, Kyoto 611-0011, Japan)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950157

© 2023 公益社団法人日本生化学会

れており²⁾、マクロピノサイトーシスは、細胞外微粒子を非食細胞へ取り込む主要経路の一つとなりうる。マクロピノサイトーシスは進化的にもよく保存された取り込み機構であることが知られているが、マクロピノサイトーシスによる取り込みを可能とする微粒子側の要因や、これに関与する細胞側の制御機構は、他のエンドサイトーシス経路と比較して不明な点が多い。

本稿では、細胞外微粒子の細胞内への取り込みにおける、マクロピノサイトーシスの寄与とその同定に関する課題に関して論述したい。

2. マクロピノサイトーシスによる取り込み様式と判断基準

上述のように、マクロピノサイトーシスは刺激により誘導される液相エンドサイトーシスの一形態であり、細胞骨格であるアクチンフィラメントの再構築と細胞膜の隆起・融合を伴い、広い範囲の細胞外液を細胞内に取り込む。この際生じるマクロピノソームの直径は数 μm にもおよび、他のエンドサイトーシス経路（クラスリンエンドサイトーシスやカベオラエンドサイトーシス）における取り込み小胞（0.2 μm 以下）に比べて有意に大きい。また、この経路は非特異的に多くの細胞外物質を細胞内に取り込むことが可能であり、さまざまな形態や物性を有する細胞外微粒子の細胞内への送達を可能にする経路と考えられる。

マクロファージなどの食細胞以外では、マクロピノサイトーシスは外的刺激に依存して一過的に誘起されることが知られている。外的刺激としては、たとえば上皮成長因子 (epidermal growth factor: EGF) などの成長因子による受容体刺激が細胞内 Ras, Rac などの活性化 (GTP 結合型への変化)、また、ホスファチジルイノシトールのリン酸化 [PI(4,5) P2 から PI(3,4,5) P3 への変換] を介してアクチン重合と細胞膜のラフリングを誘導することが知られている^{3,4)}。マクロピノサイトーシスは非特異的で成長因子などの刺激を受けたときのみに活性化される限定的なエンドサイトーシスであると捉えられていたが、近年、Ras 変異がん細胞ではマクロピノサイトーシスが恒常的に活性化されていることが報告され、がん細胞における栄養取り込み・増殖との関連や、この経路を利用した抗がん剤の送達とがん治療との関連から、大きな注目を集めている⁵⁾。

細胞内取り込みにおけるマクロピノサイトーシスの関与は、細胞膜の構造変化や阻害剤への感受性から判断されてきた。マクロピノサイトーシスの誘導により、アクチンフィラメントの再構築や細胞膜のラメリポディア形成やラフリング、あるいはカップ状の細胞膜変形とその閉包により細胞外液を細胞内に取り込む様子が観察される。これらは電子顕微鏡や光学顕微鏡を用いた細胞形態の観察や、アクチンフィラメントの染色・可視化、あるいはマクロピノサイトーシス阻害剤への感受性によって評価される。阻害剤としては、cytochalasin D (アクチン重合阻害

剤)、5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl) amiloride [EIPA: Na^+/H^+ exchanger (NHE) 阻害剤]、wortmannin [phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) 阻害剤、エンドソーム膜融合阻害] などが用いられる。クラスリン依存性エンドサイトーシスなどでは、細胞内に取り込まれる受容体タンパク質などをマーカーとして当該のエンドソームの細胞内挙動を追跡可能である。一方、マクロピノサイトーシスは非特異的な液相エンドサイトーシスであることもあり、その取り込みマーカーとして 70 kDa デキストランが頻用される²⁾。

3. 微粒子の取り込みに関わるマクロピノサイトーシス

マクロピノサイトーシスは、アデノウイルスなどのウイルス粒子の細胞への感染に関与することが報告されている²⁾。また、種々のリポソームや脂質ナノ粒子（特に表面がカチオン性を帯びた粒子）、あるいはポリマーや金属ナノ粒子の細胞内移行においてもマクロピノサイトーシスが関与することが示唆されている^{6,7)}。

マクロピノサイトーシスを誘導する能力のあるペプチドやポリマーで修飾することで、ナノ粒子の細胞内移行を促進させる試みも数多く報告されている⁸⁾。アルギニンに富む塩基性ペプチドの中にはマクロピノサイトーシスを誘導するとともに、細胞内に薬物やタンパク質を送達する能力を持つものがある。これらのペプチドは細胞透過ペプチド (cell-penetration peptides: CPPs) と総称され、オリゴアルギニンや HIV-1 Tat タンパク質由来の塩基性ペプチド (TAT ペプチド: GRKKRRQRRRPQ) がこの代表例である⁹⁾。たとえば、リポソームやエクソソームを含む細胞外小胞の表面をオクタアルギニン (R8) や TAT で修飾することにより、これらの微粒子の細胞内取り込みが促進されることが報告されている^{10,11)}。マクロピノサイトーシスを誘導可能な分子は、薬物送達促進という観点から有望であり、我々もこの能力を持ったペプチドやタンパク質の探索と開発、さらには細胞内移行機序の解析を行っている。

この過程で、我々はドデカアルギニン (R12) がケモカイン受容体 CXCR4 を介してマクロピノサイトーシスを活性化することや、CXCR4 の本来のリガンドであるストロマ細胞由来因子 SDF-1 α もマクロピノサイトーシスを誘導することを見いだした¹²⁾。さらに SDF-1 α の N 末端ペプチド (SN21: KPVSLSYRCPCRFESHVARA-amide) やその短鎖類似ペプチド (P4A: YRCACRFF-amide) もマクロピノサイトーシス誘導能と自らの取り込み促進能を有することを見いだしている^{13,14)}。エクソソームを含む細胞外小胞は新しいタイプの薬物キャリアとして応用が図られているが、細胞外小胞の細胞内への移行効率は必ずしも高くなく、この向上を目的とするアプローチが必要となる。上述の SN21 や P4A は高いマクロピノサイトーシス誘起能と細胞内送達能を有するが、血清存在下ではその効果が現れにくい。N 末端をステアリル化した分子内酸化型の P4A (C18-oxP4A: stearyl-YRC*AC*RFF-amide; C* 間がジスル

フィド架橋)は血清存在下でも高いマクロピノサイトーシス誘導能と細胞内移行促進能を有することが示された¹⁵⁾。このペプチド存在下に、エクソソーム内包mRNAの受容細胞内での発現レベルを検討したところ、C18-oxP4A非添加時に比べて2~3倍のmRNAの発現がみられ、このペプチドの細胞外小胞を含む細胞外微粒子の細胞内送達への促進効果が示された。

このように、種々の細胞外微粒子の細胞内取り込みにマクロピノサイトーシスが関与していたり、あるいはマクロピノサイトーシスによって取り込みが促進されることが報告されてきている。ここで注意すべきは、少なからぬ数の論文において、阻害剤に対する感受性のみを判断基準として微粒子の細胞内取り込みにおけるマクロピノサイトーシスの関与が論じられていることである。エンドサイトーシスの阻害剤は細胞内プロセスに複数の影響を及ぼすことが多く、阻害剤に対する感受性は細胞の種類や培養条件によって異なりうる¹⁶⁾。同一のナノ粒子の細胞への取り込みにおいても、細胞や処理条件により異なる取り込み様式を示す場合もある。たとえば、次節に示すようにマクロピノサイトーシスと共通した阻害剤の効果を示すものの、マクロピノサイトーシスとは異なる細胞内移行様式もありうる。マクロピノサイトーシスの概念には含まれるものの、詳細に検討すると今まで強く認識されていなかったサブタイプが存在する可能性もありうる。これらの理由で、阻害剤に加えて顕微鏡観察や種々の細胞生物学的評価を総合して、マクロピノサイトーシスの関与を論じることが望ましい。

4. 膜のラッフリング誘導やEIPA感受性をマクロピノサイトーシスと共有する細胞内取り込み系

我々は、クモ毒由来の溶血活性を有するカチオン性両親媒性ペプチドM-lycotoxinの疎水性アミノ酸の一つである17位のロイシンをグルタミン酸に置換したL17Eペプチド(IWLTALKFLGKHA AKHEAKQQLSKL-amide)存在下に抗体(IgG)や他のタンパク質、細胞外小胞の細胞内への取り込みが促進されることを見いだした¹⁷⁾。当初、L17E処理によってマクロピノサイトーシスと類似の細胞応答が誘起される可能性が示唆された。しかしながら、L17Eと抗体を細胞培養液に投与すると5分後には抗体はサイトゾルに到達しており、大部分の抗体はエンドソームに取り込まれてからサイトゾルへ放出されるというよりは、エンドサイトーシスのきわめて初期の段階あるいは細胞膜からほぼ直接的にサイトゾルに移行する可能性が示唆された¹⁸⁾。

また、抗体の*in vivo*送達を想定して、我々はIgGのFc領域に結合性を有するペプチドFcBPとL17Eの三量体とのコンジュゲート[FcB(L17E)₃]を作製し、IgGとの混合により、IgGの細胞内移行が達成されるかを確認することとした¹⁹⁾。Alexa488で蛍光ラベルしたIgG(IgG-Alexa)とFcB(L17E)₃を1:2のモル比で混合し、細胞に投与すると効果的なIgGの細胞内(サイトゾル)移行が確認された。予想

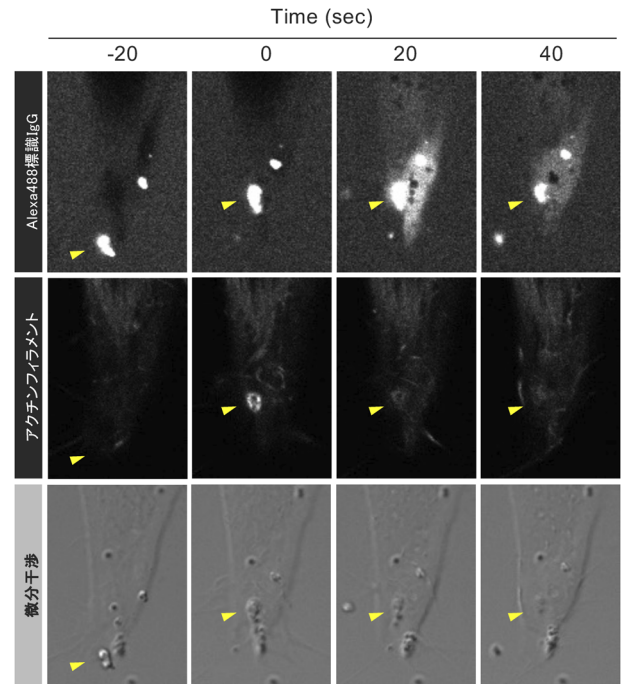


図2 液滴中のIgGの細胞内への流入
Alexa488標識IgGとFcB(L17E)₃により生成した液滴(矢尻, -20sec)が細胞膜と接すると(0sec), アクチンフィラメント(Lifeact-mCherryで標識・可視化)が液滴の周囲を取り囲む(細胞膜も液滴を取り囲むことを示唆)。Alexa488標識IgGのサイトゾルへの拡散に伴い(20, 40sec), アクチンフィラメントの集積と膜上の液滴は消失する(文献19から許可を得て転載・改変)。

外であったことに、(i) IgG-AlexaとFcB(L17E)₃を混合すると液-液相分離により液滴が形成されること、(ii) 液滴が細胞膜と接して取り込まれた後、IgGが細胞内に一気に拡散し、1分程度でIgGは細胞全体に行きわたること、(iii) FcBPはL17Eの三量体に疎水性を付与し、液滴形成には重要な役割を果たすが、FcBPとIgGの結合自体は必ずしも必要ないこと、(iv) Alexa488の負電荷が液滴形成に重要であること、などがその後の検討により確認された。注目すべき点は、この細胞への流入は単純な膜への小孔形成により起こるのではなく、細胞側の応答が必要であることである。液滴が細胞に取り込まれる際には、液滴の周囲をアクチンが取り巻くような形で一過的に集積する一方、抗体が細胞内に流入するにつれ集積は解消される(図2)。また、ATP産生阻害条件下や、マクロピノサイトーシス阻害剤(cytochalasin D, EIPA, wortmannin)存在下では抗体の細胞内流入は顕著に抑制される。したがって、この細胞内流入には、マクロピノサイトーシスやそれと機序を共有する細胞応答が関与するが、L17Eによる抗体の細胞内への送達と同様、機序解明にはさらなる検討が必要である。

5. おわりに

本稿ではマクロピノサイトーシスとその細胞外微粒子取り込みへの関与について概観した。一方では、阻害剤への

感受性などからマクロピノサイトーシスの関与を結論づけているこれまでの報告においても、典型的なマクロピノサイトーシスとは様相の異なるエンドサイトーシスあるいは他の動的なアクチンフィラメントの再構成を伴う細胞内への取り込み様式の存在を見過している可能性もあることを指摘した。クラスリン依存性エンドサイトーシスの多くは、リガンドと受容体の間に特異的な結合がみられる場合が多いが、マクロピノサイトーシスは細胞外液と溶質を非特異的に取り込む経路の総称であり、70kDaデキストラン以外のマーカーはほとんど知られていない。詳細に検討することによって、マクロピノサイトーシスという概念の下にまとめられたさまざまなサブタイプが存在することも容易に想定できる。

さまざまな大きさや起源を持つ細胞外微粒子が細胞に取り込まれ、その機能に影響を与える。細胞内への取り込み過程を理解することは、これらの微粒子の細胞への影響を理解し、その内在化を制御する手段を開発するためにきわめて重要である。マクロピノサイトーシスを参照軸とした今後の詳細な検討によって、いままで知らなかった新たな細胞内への微粒子取り込み様式が明らかになってくる可能性がある。本稿では深くふれなかったが、がん細胞の増殖とマクロピノサイトーシスの関連、がん治療への応用の可能性に関しても今後の検討が待たれる。

謝辞

本記事はJST CREST (Grant Number JPMJCR18H5) の支援によるものである。

文 献

- Conner, S.D. & Schmid, S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature*, **422**, 37–44.
- Mercer, J. & Helenius, A. (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 510–520.
- Egami, Y., Taguchi, T., Maekawa, M., Arai, H., & Araki, N. (2014) Small GTPases and phosphoinositides in the regulatory mechanisms of macropinosome formation and maturation. *Front. Physiol.*, **5**, 374.
- 二木史朗, 広瀬久昭 (2021) マクロピノサイトーシスを活用した細胞内送達の可能性. *生化学*, **93**, 137–140.
- Zhang, Y. & Comisso, C. (2019) Macropinocytosis in cancer: A complex signaling network. *Trends Cancer*, **5**, 332–334.
- Xiao, Y., Xu, W., Komohara, Y., Fujiwara, Y., Hirose, H., Futaki, S., & Niidome, T. (2020) Effect of surface modifications on cellular uptake of gold nanorods in human primary cells and established cell lines. *ACS Omega*, **5**, 32744–32752.
- Means, N., Elechalawar, C.K., Chen, W.R., Bhattacharya, R., & Mukherjee, P. (2022) Revealing macropinocytosis using nanoparticles. *Mol. Aspects Med.*, **83**, 100993.
- Nakase, I., Akita, H., Kogure, K., Gräslund, A., Langel, U., Harashima, H., & Futaki, S. (2012) Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides. *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1132–1139.
- Nakase, I., Takeuchi, T., Tanaka, G., & Futaki, S. (2008) Methodological and cellular aspects that govern the internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 598–607.
- El-Sayed, A., Futaki, S., & Harashima, H. (2009) Delivery of macromolecules using arginine-rich cell-penetrating peptides: Ways to overcome endosomal entrapment. *AAPS J.*, **11**, 13–22.
- Nakase, I., Noguchi, K., Aoki, A., Takatani-Nakase, T., Fujii, I., & Futaki, S. (2017) Arginine-rich cell-penetrating peptide-modified extracellular vesicles for active macropinocytosis induction and efficient intracellular delivery. *Sci. Rep.*, **7**, 1991.
- Tanaka, G., Nakase, I., Fukuda, Y., Masuda, R., Oishi, S., Shimura, K., Kawaguchi, Y., Takatani-Nakase, T., Langel, U., Gräslund, A., et al. (2012) CXCR4 stimulates macropinocytosis: Implications for cellular uptake of arginine-rich cell-penetrating peptides and HIV. *Chem. Biol.*, **19**, 1437–1446.
- Arafiles, J.V.V., Hirose, H., Hirai, Y., Kuriyama, M., Sakyiamah, M.M., Nomura, W., Sonomura, K., Imanishi, M., Otaka, A., Tamamura, H., et al. (2021) Discovery of a macropinocytosis-inducing peptide potentiated by medium-mediated intramolecular disulfide formation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **60**, 11928–11936.
- Arafiles, J.V.V., Hirose, H., Akishiba, M., Tsuji, S., Imanishi, M., & Futaki, S. (2020) Stimulating macropinocytosis for intracellular nucleic acid and protein delivery: A combined strategy with membrane-lytic peptides to facilitate endosomal escape. *Bioconjug. Chem.*, **31**, 547–553.
- Nakagawa, Y., Arafiles, J.V.V., Kawaguchi, Y., Nakase, I., Hirose, H., & Futaki, S. (2022) Stearoylated macropinocytosis-inducing peptides facilitating the cellular uptake of small extracellular vesicles. *Bioconjug. Chem.*, **33**, 869–880.
- Dutta, D. & Donaldson, J.G. (2012) Search for inhibitors of endocytosis: Intended specificity and unintended consequences. *Cell. Logist.*, **2**, 203–208.
- Akishiba, M., Takeuchi, T., Kawaguchi, Y., Sakamoto, K., Yu, H.H., Nakase, I., Takatani-Nakase, T., Madani, F., Gräslund, A., & Futaki, S. (2017) Cytosolic antibody delivery by lipid-sensitive endosomolytic peptide. *Nat. Chem.*, **9**, 751–761.
- Akishiba, M. & Futaki, S. (2019) Inducible Membrane Permeabilization By Attenuated Lytic Peptides: A new concept for accessing cell interiors through ruffled membranes. *Mol. Pharm.*, **16**, 2540–2548.
- Iwata, T., Hirose, H., Sakamoto, K., Hirai, Y., Arafiles, J.V.V., Akishiba, M., Imanishi, M., & Futaki, S. (2021) Liquid droplet formation and facile cytosolic translocation of IgG in the presence of attenuated cationic amphiphilic lytic peptides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **60**, 19804–19812.

著者寸描

●二木 史朗 (ふたき しろう)

京都大学化学研究所 教授. 薬学博士.

その他については本誌93巻1号 (2021), p. 140をご参照ください.

●広瀬 久昭 (ひろせ ひさあき)

京都大学化学研究所 特定准教授. 博士 (薬学).

その他については本誌93巻1号 (2021), p. 140をご参照ください.