

磁性ナノ粒子と磁場による初期エンドソーム膜損傷の制御

Magnetic control of membrane damage in early endosomes by internalized magnetic nanoparticles

(日本細胞生物学会推薦)

代表研究者	岩手大学	芝 陽子	Iwate University	Yoko SHIBA
協同研究者	岩手大学	芝崎 祐二	Iwate University	Yuji SHIBASAKI
	岩手大学	小林 悟	Iwate University	Satoru KOBAYASHI
	岩手大学	大柳 洸一	Iwate University	Koichi OYANAGI

Endosomal escape is essential for effective drug delivery, however, the membrane property of endosomes is poorly understood. In this work, we internalized 20nm magnetic nanoparticles (MNPs) into the human breast cancer cell line, MCF7, and applied magnetic field while the MNPs were localized in early endosomes. We found that at a 50-100 mT of a direct-current (DC) magnetic field for 5 minutes induced membrane damage, as detected by Galectin-3 (Gal3), a marker of membrane rupture. This signal colocalized with EEA1, an early endosome marker, suggesting MNPs under DC magnetic field conditions specifically damaged early endosomal membranes. Notably, under this condition, increase of Gal3 to lysosomes was not observed, indicating that the membrane damage was specific in early endosomes. Furthermore, when a stronger DC magnetic field (200-300 mT) was applied for 20 minutes, the colocalization of MNPs and Gal3 was decreased, which may suggest endosomal escape of MNPs. Further studies are required to determine the minimal number of MNPs necessary to induce membrane damage and to confirm whether the MNPs indeed escaped from early endosomes. This work provides insight into the biophysical properties of early endosomal membranes and contributes to understanding of endosomal escape mechanisms in drug delivery systems.

研究目的

哺乳動物細胞には膜で囲われた様々な細胞小器官(オルガネラ)が存在し、タンパク質や脂質など積荷をやり取りしている。栄養分など外から入ってくる積荷は、細胞膜が陥入して取り込むエンドサイトーシスによって取り込まれ、初期エンドソームへ輸送される。初期エンドソームでは積荷の選別が行われ、ゴルジ体や細胞膜へ選別される積荷もあるが、選別されなかった積荷は、初期エンドソームが後期エンドソーム、リソソームと成熟するに伴い、リソソームへ輸送されて分解される。病原体や薬剤などもこの分解経路を通るが、病原体はよくエンドソームを脱出し、細胞質で増殖する。病原体は細胞膜よりエンドソームから細胞質へ脱出する方が細胞毒性が低

いことが知られ¹、ドラッグデリバリーシステム(DDS)などもpHの低いエンドソームに輸送されてから薬剤を放出する設計が行われている。しかしながら、エンドソーム脱出の効率は1-3%と低い²。エンドソーム膜の性質を知ることはエンドソーム脱出のメカニズムを知るために重要である。

磁性ナノ粒子は磁性を持ったナノサイズの粒子のことで、DNAの精製やMRIの造影剤、ハイパーサーミアなどに使用され、生体適合性が高く、磁場による制御が可能である。本研究では、磁性ナノ粒子をヒト乳がん細胞MCF7に取り込ませ、初期エンドソームに局在するタイミングで磁場を印加し、初期エンドソーム特異的に磁場によって膜が損傷できるかを試みた。

研究経過

本研究では 10-15nm の Fe_3O_4 による磁性ナノ粒子を熱分解法により作製し、Polyglycidol で表面修飾を行い、FITC をつけ、最終的に 20nm 程度のサイズになった磁性ナノ粒子を用いた。この磁性ナノ粒子を MCF7 に取り込ませ、初期エンドソームマーカー EEA1、リソソームマーカー Lamp1 との共局在を共焦点顕微鏡で観察したところ、20-40 分で初期エンドソーム、60 分以降でリソソームへ輸送されることがわかった。

磁性ナノ粒子を 20 分取り込ませた条件で、まず磁気ヨークを用いて、最大 20mT の直流と交流磁場を印加したところ、直流磁場 5 分の印加で、膜損傷マーカー Galectin-3 (Gal3) と磁性ナノ粒子の共局在が観察された。同条件で、損傷膜を修復する ESCRT 複合体の一つ CHMP4B、および膜損傷時に細胞質側に露出するフィンゴミエリンに結合する Eqt-SM も磁性ナノ粒子共局在したため、直流磁場 20mT、5 分で膜が損傷することが示唆された。オートファジーマーカー LC3 も観察したが、共局在は見られなかった。

より強い直流磁場を長時間印加するため、磁性ナノ粒子を 20 分取り込ませた MCF7 に、ネオジム磁石を用いて 20-300mT の磁場を 5、20 分印加し、Gal3 を用いて共局在を調べたところ、50mT 以上 5 分で磁性ナノ粒子と Gal3 との共局在が観察された。特に 100mT では、磁場の印加 5、20 分の両方で磁性ナノ粒子と Gal3 の共局在が観察されたため、この条件で最もよく磁性ナノ粒子は Gal3 と共局在すると考えられる。興味深いことに、200-300mT の直流磁場を 20 分印加すると、磁性ナノ粒子と Gal3 の共局在率が低下することが観察された。これは損傷した膜付近から、磁性ナノ粒子が移動したと考えられる。

Gal3 が局在しているオルガネラが初期エンドソームかどうかを確かめるため、磁性ナノ粒子と、EEA1、Gal3 の三者の共局在を調べたところ、直流磁場 100mT、5 分の印加で三者の共局在が見られたため、磁性ナノ粒子が直流磁場によって損傷したオルガネラは初期エンドソームであることが確かめられた (図 1)。磁性ナノ粒子と Lamp1、Gal3 の三者の共局在も調べたが、100mT、5 分、および 300mT、20 分の直流磁場で Gal3 は Lamp1 とは共局在を示さなかったため、リソソームは損傷していないことが示唆された。

200-300mT の直流磁場で 20 分以上印加すると磁

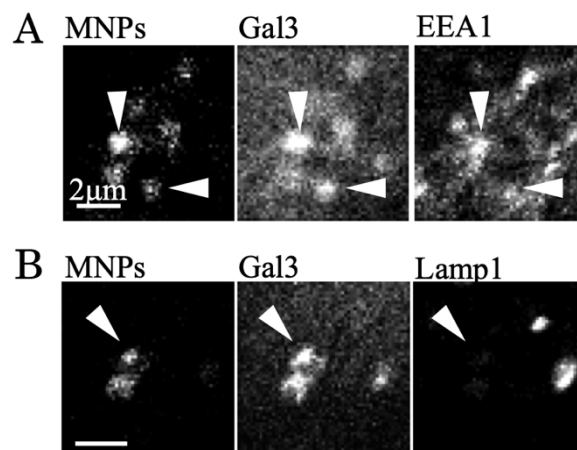
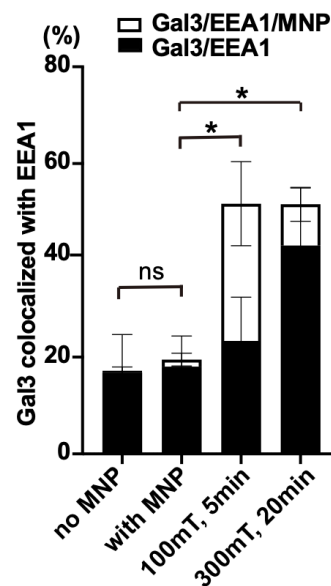


図 1. 磁性ナノ粒子(MNPs)を MCF7 に 20 分取り込ませ、100mT、5 分磁場を印加した時の MNPs 陽性の点状構造の拡大図。A は Gal3 と EEA1, B は Gal3 と Lamp1 で、MNPs との局在を比較している。A では MNPs、Gal3、EEA1 と三者の共局在が見られるが、B の Lamp1 とは共局在が見られなかった。

図 2. Gal3 と EEA1 の共局在を定量した。

MNPs と三者で共局在した細胞の割合を白バー、Gal3 と EEA1 のみ共局在した割合を黒バーで示す。100mT、5 分では三者の共局在が見られたが、300mT、20 分ではその割合が減少した。

*; $p < 0.05$, ns; not significant



性ナノ粒子と Gal3 の共局在の低下が見られていた。300mT、20 分の直流磁場を印加した時に磁性ナノ粒子と Gal3 と EEA1 の三者の共局在を調べたが、やはり Gal3 と EEA1 は共局在したものの、その区画に磁性ナノ粒子は観察されなかった (図 2)。さらに磁性ナノ粒子と CHMP4B の共局在を 100mT、5 分と 300mT、20 分の条件で観察した。100mT、5 分では磁性ナノ粒子と CHMP4B の共局在の増加が見られたが、やはり 300mT、20 分ではその共局在が低下した。これらの結果は 300mT、20 分では磁性ナノ粒子が損傷した膜付近から離脱していることを支持している。

LC3B と磁性ナノ粒子の共局在を 300mT、20 分で観察したが、磁性ナノ粒子と LC3 の共局在は観察されず、強い磁場を長時間印加しても、この条件ではオートファジーは誘発されなかったと考えられる。

膜の損傷が本当に起こっているのか調べるため、MTT assay で細胞生存率を調べた。直流磁場の印加 5 分では、300mT であっても生存率に変化は見られなかった。20 分の直流磁場の印加では、50mT 以上で細胞生存率が低下したため、やはり膜損傷は起こっていると考えられる。しかし、5 分、または 20 分磁場を印加し 24 時間後に MTT assay を行うと、細胞生存率の低下はほとんど見られなかった。このことから磁場により膜損傷をしても、時間が経つと細胞が回復しており、この条件においては膜の損傷は修復可能であることが支持される。

考察

本研究では FITC をつけた 20nm 程度の磁性ナノ粒子を用いて初期エンドソームを外部磁場によって特異的に損傷できるか Gal3 を用いて検証した。直流磁場で 100mT、5 分の磁場で効率的に初期エンドソームが損傷できることが明らかとなった。細胞膜は 20-50pN 程度の膜張力があると報告されているが³、10nm 程度の一個の磁性ナノ粒子が培地中で生み出す力を計算すると、0.0067pN で、非常に小さい(未発表)。しかしながら、Gal3 と磁性ナノ粒子の共局在が増加していることから、膜損傷そのものは起こっていると考えられる。カチオン化したラテックスビーズなどは磁場を印加しなくてもエンドソーム脱出することは知られる。この場合はエンドソーム膜がカチオン化したナノ粒子の周りに結合して膜の流動性が下がるため、損傷すると考えられ、エンドソームの損傷によってオートファジーが起こり、細胞毒性も大きい。本研究で作製した磁性ナノ粒子にはカチオン化や膜に結合する分子による修飾を特にしていない。また磁場を印加しても LC3 と磁性ナノ粒子の共局在は増加しなかったことから、大きな膜損傷は起こっていないと考えられる。CHMP4B や Eqt-SM が磁性ナノ粒子と共局在していることから、ESCRT やスフィンゴミエリンなどの経路で損傷膜が修復された可能性は高く、Gal3 は必ずしも大きな損傷ではなくても、一時的に内部の糖鎖が露出すればエンドソームに結合が可能だと考えられる。

本研究では、200mT 以上の直流磁場を 20 分印加

すると、磁性ナノ粒子は Gal3 や EEA1 とは共局在をしないことが観察された。100mT、20 分では磁性ナノ粒子は Gal3 と共局在したままであることから、200、300mT の時だけ磁場を印加した 20 分の間に磁性ナノ粒子がリソソームに輸送されたとは考えにくい。200mT 以上、20 分の磁場印加で磁性ナノ粒子が初期エンドソーム膜を脱出して細胞質に局在したことが考えられるが、上述したように、10nm の磁性ナノ粒子が 100mT の磁場で生み出す力は非常に小さい。正確な力の計算のためには磁性ナノ粒子がいくつあれば膜が損傷するのか、また実際に細胞内で磁場勾配がどれくらいあるのか、を透過型電子顕微鏡および磁性ナノ粒子のイメージングで明らかにする必要がある。また本当に磁場を印加した時に磁性ナノ粒子がエンドソーム脱出をして、細胞質に移動したのかは、細胞質中の磁性ナノ粒子を検出する実験系が必要である。

本研究では磁性ナノ粒子を哺乳動物細胞に取り込ませ、磁場で初期エンドソームを特異的に膜損傷できることが示された。エンドソーム脱出の効率は低い、脱出することは知られている。本研究は磁性ナノ粒子を用いて薬剤などを細胞質に送達する技術に役立つとともに、まだ不明な点が多いエンドソーム脱出の機構の解明に役立つと考えている。

参考文献

1. C. J. Provoda, K.-D. Lee, Bacterial pore-forming hemolysins and their use in the cytosolic delivery of macromolecules, *Advanced Drug Delivery Reviews* 41, 209–221, 2000
2. S.F. Dowdy, Endosomal escape of RNA therapeutics: How do we solve this rate-limiting problem? *RNA*, 29, 396–401, 2023
3. Bruno Pontes, Pascale Monzo, Nils C. Gauthier, Membrane tension: A challenging but universal physical parameter in cell biology, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 71, 30–41, 2017

研究の発表

ポスター発表

1. 磁性ナノ粒子を用いたエンドソーム膜の損傷評価, 米川 悠太、Boldbaatar Bayarkhuu、及川 一

- 貴、及川 歩起、山田 凌平、西館 直樹、西條 未来、大柳 洸一、小林 悟、芝崎 祐二、芝 陽子、第 76 回日本細胞生物学会大会, 2P42, 7/17-19, 2024
2. オレイン酸被覆磁性体ナノ粒子の簡便な水溶性化とグリセリンポリマーによる被覆、蛍光ラベル化、ならびに細胞内への導入, 川村綾音, 及川歩起, Boldbaatar Bayarkhuu, 米川悠太, 及川一貴, 小林悟, 大柳洸一, 芝陽子, 芝崎 祐二, 第40回DDS学会、つくば国際会議場、7/9-7/11, 2024
3. 磁性ナノ粒子を用いたオルガネラ膜損傷の研究, Boldbaatar Bayarkhuu、西館 直樹、西條 未来、米川 悠太、及川 歩起、大柳 洸一、小林 悟、芝崎 祐二、芝 陽子、第75回日本細胞生物学会大会, P-D2-P001-059, 6/28-30, 2023

誌上発表

1. Magnetic control of membrane damage in early endosomes using internalized magnetic nanoparticles, Yuta Yonekawa, Kazuki Oikawa, Boldbaatar Bayarkhuu, Kizuna Kobayashi, Nana Saito, Ibuki Oikawa, Ryohei Yamada, Yu-han Chen, Koichi Oyanagi, Yuji Shibasaki, Satoru Kobayashi, and Yoko Shiba, *Cell Structure and Function*, 50, 25–39, 2025
2. Fabrication of hyperbranched-polyglycidol-Fe₃O₄ nanocomposite labeled with fluorescein isothiocyanate via rapid ligand exchange reaction, A.Kawamura, M. Saijyo, B. Bayarkhuu, N. Nishidate, I. Oikawa, S. Kobayashi, K. Oyanagi, Y. Shiba, T. Tsukamoto, Y. Oishi, Y. Shibasaki, *Polymer*, 294, 126724, 2024