

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：13302

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02536

研究課題名（和文）膜ダイナミクスを用いた生理応答の可視化と評価系開発

研究課題名（英文）Visualization and evaluation of physiological responses by membrane dynamics

研究代表者

高木 昌宏（TAKAGI, MASAHIRO）

北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：00183434

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：痛み・搔痒感・鎮静・興奮等、感覚刺激を引き起こす生理活性物質と人工細胞膜との相互作用がもたらす膜ダイナミクス（膜構造変化、膜相分離変化）を網羅的に解析する事で、「生理応答の可視化・定量評価」を試みた。さらに、分子間の相互作用を数理モデル・動画解析を導入して考察し、ダイナミクスから生理作用を類推できる定量性のある評価システムを構築し、動物実験代替法への道筋をつけた。さらに、これらを通して、医療等の分野で利用できる有効で安全な化合物の動物実験に頼らない評価・デザインへ結びつけ、実際にアルツハイマー病の発症メカニズムについて、示唆に富むデータを取得、予防法に対する提案もできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物実験は、残酷な方法であり、定量性に乏しい。我々は、動物実験代替法として、細胞サイズリポソームの構造変化を通して、化合物による生理応答を可視化、定量化する方法を検討してきた。その結果、リポソームの構造変化と、痛み、痒み等との相関関係に対して情報を集積し、正確な判断が行える実験系をデザインする事ができた。この手法を用いて、各種界面活性剤を評価し、刺激性の少ない、安全な界面活性剤の処方を開発する事ができた。さらに、医療分野に於いても、アルツハイマー病の原因である、アミロイドペプチドと膜相分離構造との相互作用を、小胞体ストレスモデル膜をデザインする事で検討し、神経細胞毒性との関係性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We attempted to visualize and quantitatively evaluate physiological responses by comprehensively analyzing membrane dynamics (changes in membrane structure and phase separation) caused by the interaction between artificial cell membranes and bioactive substances that induce sensory stimuli such as pain, itchiness, sedation, and excitation. In addition, we have introduced mathematical models and image analysis to examine interactions between molecules, and constructed a quantitative evaluation system that can analogize physiological actions from dynamics, paving the way for an alternative method to animal experiments. Furthermore, through these efforts, we were able to design and evaluate effective and safe compounds that can be used in the field of medicine without relying on animal experiments, and we obtained suggestive data on the actual pathogenic mechanism of Alzheimer's disease and proposed a preventive method.

研究分野：生物工学

キーワード：人工膜 リポソーム 生理応答 画像解析 界面活性剤 アミロイド アルツハイマー病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

【背景1】細胞膜と脂質メディエーター・生理応答

動物細胞の一番外には細胞膜が存在し、物理的・化学的刺激により細胞膜が損傷すると、イオン輸送が破綻し、カルシウムイオンは細胞内へと流れ込み、カルモジュリンと結合し、ホスホリパーゼ A2(PLA2)を活性化、アラキドン酸を遊離させる。アラキドン酸はシクロオキシゲナーゼによりプロスタグランジン類に変換される(アラキドン酸カスケード)[1]。プロスタグランジン類は、多くの生理作用を持ち、結果として我々は痛みや刺激を感じる[2]。

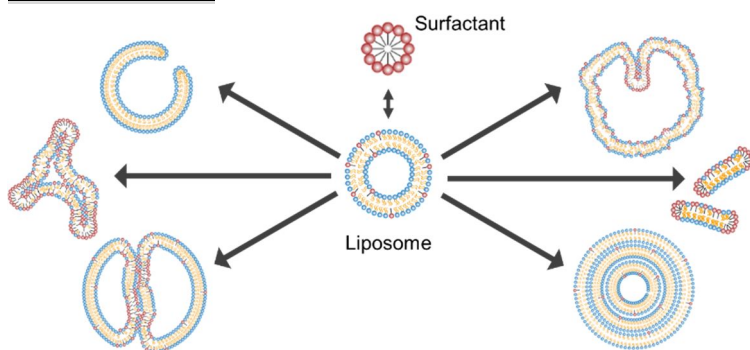
【背景2】動物実験代替法

化合物の刺激性については、動物実験であるドレイズ試験が用いられてきた。動物愛護の観点、ヒトの目視判定であるため客観性に乏しい点、個体差による結果の違いが大きい点等、多くの問題点も含んでいる[3]。代替法としては、角膜細胞を用いた方法がある[4]。細胞生存率から刺激性を求める方法であるが、ドレイズスコア 15 以上の界面活性剤を用いると細胞生存率は 0%、15 以下の場合にはほぼ 100%と、全く定量性が無い [4]。

【背景3】細胞サイズリポソーム

リポソームの中でも、直径 10 μm 程度の細胞サイズリポソームは、細胞膜、細胞小器官膜等のモデル系として用いられている。組成が単純なので、数理モデルを立てたり、シミュレーションを行うにも適した実験系である。

2. 研究の目的



我々は、界面活性剤が人工細胞膜(細胞サイズリポソーム)に引き起こすダイナミクスを調べれば、刺激の種類、強さに応じた膜ダイナミクスが存在すると考えた(図1)[5]。そこで、各種界面活性剤や生理活性物質が引き起こす膜ダイナ

図1：化合物が引き起こす膜ダイナミクス

ミクスを解析し、さらに、それらの特徴について、画像解析、数理モデル、粗視化シミュレーション等を組み合わせる事により、分子レベルでの動態と、生理応答との関連性を調べる事を目的とした。

3. 研究の方法

生理活性物質の引き起こす膜ダイナミクス解析

・網羅的ダイナミクス画像取得 生理応答を引き起こす化合物による膜ダイナミクスを、レーザー共焦点顕微鏡を用いて網羅的に観察する。界面活性剤の種類に応じて、蛍光標識したリポソームの多様なダイナミクスを、詳細に検討し、さらに冷感・温感・搔痒感・興奮等を起こす化合物について、系統的・網羅的な解析を行う。また、リポソームの種類についても、相分離（ラフト構造）[6]の有無や細胞膜だけではなく、小胞体をイメージしたリポソームをデザインする。

数理モデル・粗視化シミュレーション

理論的シミュレーション（粗視化分子動力学シミュレーション）を行うことにより、分子間相互作用に関する情報を得る。全原子分子動力学モデルではなく、膜の場合脂質1分子を球をつないだ粗視化したモデルで表現し、大きな時空間スケールを扱う。

スティンギングテスト

スティンギングは、化粧品使用の際、生じるひりつき、かゆみ等の感覚刺激を評価する方法である。第三者が客観的な評価を行うことができないこうした主観的な刺激を、従来のパッチテスト、動物試験で評価することは困難であるため開発された試験方法である。通常では、温度・湿度が管理された室内で、被験者の部位を水洗後、被験物質を塗布し、一定時間後に感覚的な刺激の強さを自己申告してもらった。

4. 研究成果

界面活性剤による刺激の強さによって、8種類の形態変化が認められた。刺激性の強い界面活性剤（ex. Triton X-100）を添加するとリポソームの過剰表面積が増加し、刺激性の低い界面活性剤（ex. Tween20）を添加すると収縮が観察された（図2）。

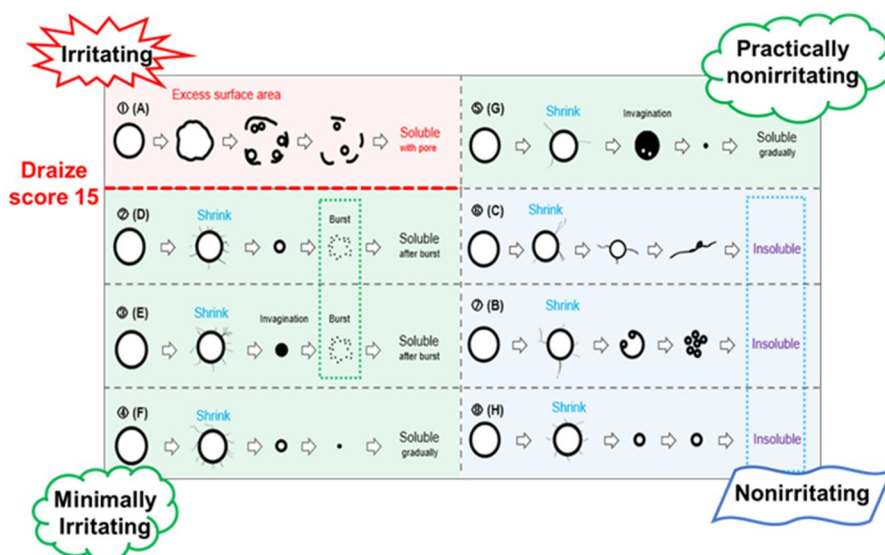


図2：リポソームの形態変化と生理応答

かゆみを誘起しやすいラウロイルグルタミン酸ナトリウムについて、かゆみのダイナミクス、さらにそれを低減する処方についても考えた。

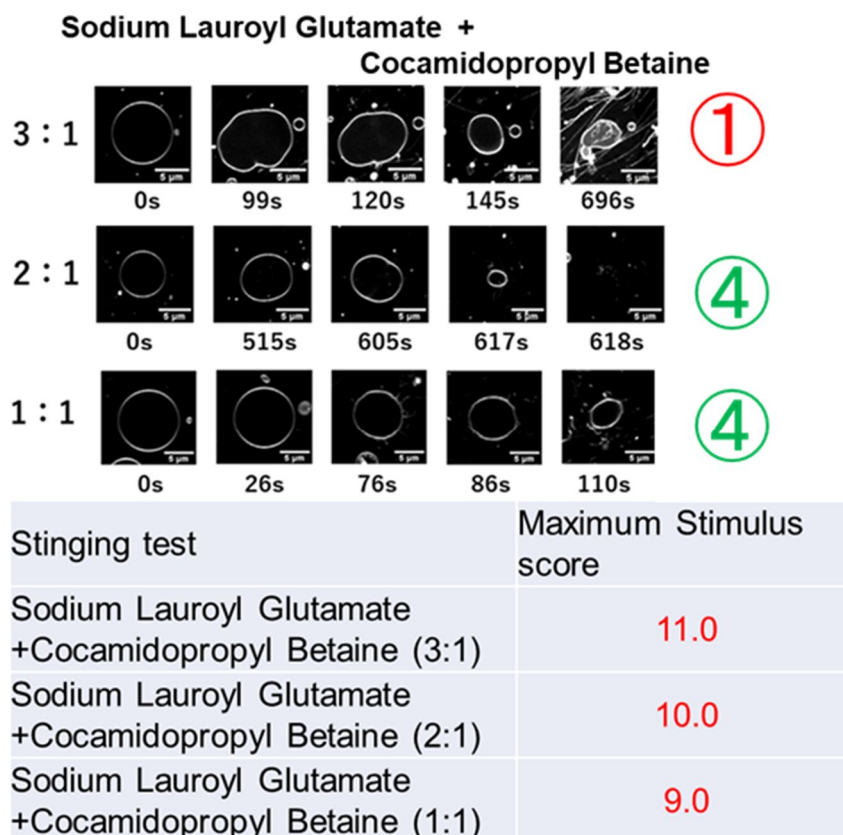


図3：ラウロイルグルタミン酸と両性界面活性剤の混合による刺激低減効果

結果、短鎖長脂肪酸を疎水部に有するアニオンまたは両性界面活性剤を添加することにより、かゆみを低減できることをリポソーム試験、スティンギング試験の両方により、明らかにできた（図3）。つまり、ラウロイルグルタミン酸ナトリウム単体よりも、カプロイルメチルタウリンナトリウムとの混合溶液の方が CMC 値は低く、かゆみの低下に働いている可能性が考えられた。

リポソームの膜動態によれば、刺激性の強い界面活性剤の場合、界面活性剤の膜への侵入速度 (V_{in}) と膜内 Flip-Flop 速度 ($V_{Flip-Flop}$) が膜からの離脱速度 (V_{out}) よりも大きい。一方、刺激性の弱い界面活性剤では、 $V_{in} < V_{Flip-Flop} < V_{out}$ が成り立つ。これらのことから、本研究では、疎水部が小さい界面活性剤を混合すると、ミセルの安定化とサブミセルの減少が起き、膜へ侵入できる分子が減少する（= 侵入速度が低下することにより、かゆみが抑制されたと推測される。

かゆみ低減にも、低分子と高分子のミセル構成分子が、単体の分子で構成されるよりも強い相互作用で結びついたことによる効果が影響したと考えられる。

小胞体ストレス膜の相分離ダイナミクス

アルツハイマー病は、アミロイドと呼ばれるペプチドが小胞体に蓄積し、そのストレスにより、神経細胞毒性を示すことによって引き起こされることが分かっている。

疎水性ビタミン E (VE) の 2 つの形態、 α -トコフェロール (Toc) および γ -トコトリエノール (Toc3) がアルツハイマー病 (AD) に有効であることが提唱されている。

アルツハイマー病の病因として小胞体ストレスが関与していると考えられているが、これまでの研究では、Toc および Toc3 がアルツハイマー病のリスクに及ぼす影響について、相反する報告がなされていた。

我々は、小胞体膜の相分離を模倣したリポソームを調製し、VE がアミロイド (A β) との相互作用にどのような影響を与えるかを研究した。

その結果、Toc は、Toc3 よりも有意に固体秩序相の形成を抑制できることを見出した (図 4)。

さらに、ER ストレスを模擬した膜への A β の吸着は、Toc によって Toc3 よりも強く抑制された [7]。

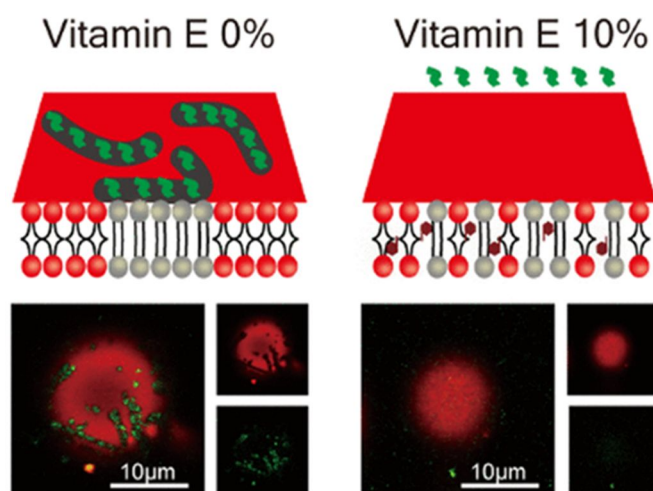


図 4 : ビタミン E による固体秩序相形成阻害とアミロイド β の結合

したがって、VE は、小胞体膜の固体秩序相を不安定にすることで小胞体ストレスを緩和し、その後、膜に結合している A β の量を減少させ、小胞体ストレスを緩和すると結論付けた。さらに Toc は Toc3 よりも強い効果を発揮した。

これらの研究途上、画像解析は威力を発揮し、また分子シミュレーションについても、ある程度の成果が得られた。

しかしながら、申請書に書いている深層学習については、残念ながら十分な成果を得られていない。

【参考文献】

- [1] Nat Rev Rheumatol. 10:295(2014) [2] Nature 435:104 (2005) [3] OECD Test Guideline 405
- [4] In Vitro, 22:760 (2008) [5] *J. Phys. Chem. Lett.*, 3, 430 (2012) [6] Nature, 387, 569 (1997)
- [7] *J. Phys. Chem. Lett.* 13, 11955 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yusuke Nakatani, Naofumi Shimokawa, Yasuomi Urano, Noriko Noguchi, Masahiro Takagi	4. 巻 13
2. 論文標題 Suppression of Amyloid- Adsorption on Endoplasmic Reticulum Stress-Mimicking Membranes by Tocopherol and -Tocotrienol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Phys Chem Lett	6. 最初と最後の頁 11955-11960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.2c03098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noriyuki Uchida, Yunosuke Ryu, Yuichiro Takagi, Ken Yoshizawa, Kotonno Suzuki, Yasutaka Anraku, Itsuki Ajioka, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Norihisa Hoshino, Tomoyuki Akutagawa, Teruhiko Matsubara, Toshinori Sato, Yuji Higuchi, Hiroaki Ito, Masamune Morita, and Takahiro Muraoka	4. 巻 145
2. 論文標題 Endocytosis-Like Vesicle Fission Mediated by a Membrane-Expanding Molecular Machine Enables Virus Encapsulation for In Vivo Delivery	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc.	6. 最初と最後の頁 6210-6220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.2c12348	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kazuki Uchida, Hiroki Obayashi, Kosuke Minamihata, Rie Wakabayashi, Masahiro Goto, Naofumi Shimokawa, Masahiro Takagi, Noriho Kamiya	4. 巻 38
2. 論文標題 Artificial Palmitoylation of Proteins Controls the Lipid Domain-Selective Anchoring on Biomembranes and the Raft-Dependent Cellular Internalization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 9640-9648
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.2c01205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Jingyu Guo, Hiroaki Ito, Yuji Higuchi, Klemen Bohinc, Naofumi Shimokawa, and Masahiro Takagi	4. 巻 37
2. 論文標題 Three-Phase Coexistence in Binary Charged Lipid Membranes in a Hypotonic Solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 9683-9693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.1c00967	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wanjae Choi, Hyunil Ryu, Ahmed Fuwad, Seulmini Goh, Chaoge Zhou, Jiwook Shim, Masahiro Takagi, Soonjo Kwon, Sun Min Kim, and Tae-Joon Jeon	4. 巻 11
2. 論文標題 Quantitative Analysis of the Membrane Affinity of Local Anesthetics Using a Model Cell Membrane	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Membranes	6. 最初と最後の頁 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/membranes11080579	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 下川直史 高木昌宏	4. 巻 21
2. 論文標題 界面活性剤刺激性評価法	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PHARMSTAGE	6. 最初と最後の頁 49-55
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Masahiro TAKAGI
2. 発表標題 Membrane Dynamics and Its Application to Biotechnology
3. 学会等名 The 17th India-Japan Festival BICON 2022-2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Masahiro Takagi, Yusuke Nakatani, Naofumi Shimokawa, Yurie Mandai, Gang An, Shuichi Takase, Yoshio Tsujino
2. 発表標題 Surfactant-induced membrane dynamics and skin irritation
3. 学会等名 International Federation of Societies of Cosmetic Chemists (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 下川 直史, 益田 藍子, 高木 昌宏
2. 発表標題 多価負電荷脂質による相分離ドメイン線張力の低下
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郭 ジンウ, 永田 佳嗣, 秀瀬 涼太, 藤原 伸介, 下川 直史, 高木 昌宏
2. 発表標題 金属イオン、ポリアミンによる荷電脂質膜ドメインの熱安定性
3. 学会等名 日本物理学会第76回年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中谷 祐将, 下川 直史, 浦野 泰臣, 野口 範子, 高木 昌宏
2. 発表標題 Amyloid と膜相互作用への飽和度が異なるVitamin Eの効果
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会(2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田 和希, 大林 洋貴, 南畑 孝介, 若林 里衣, 後藤 雅宏, 下川 直史, 高木 昌宏, 神谷 典穂
2. 発表標題 酵素反応を利用した脂質修飾によるタンパク質の膜ドメイン選択的提示
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 郭 ジンウ, 永田 佳嗣, 下川 直史, 高木 昌宏
2. 発表標題 荷電脂質膜の相分離における添加塩の構造と温度依存性
3. 学会等名 日本物理学会第2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中谷 祐将, 下川 直史, 浦野 泰臣, 野口 範子, 高木 昌宏
2. 発表標題 疎水部の異なるビタミンEを含む生体模倣膜でのドメイン形成とA の吸着挙動
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中谷 祐将, 下川 直史, 浦野 泰臣, 野口 範子, 高木 昌宏
2. 発表標題 飽和度の異なるビタミンE添加による膜相分離形成への影響とAmyloid 吸着挙動
3. 学会等名 2020年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 郭 ジンウ, 永田 佳嗣, 秀瀬 涼太, 藤原 伸介, 下川 直史, 高木 昌宏
2. 発表標題 温度と添加塩の構造に依存する荷電脂質膜の相分離
3. 学会等名 2020年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 真田 憧持, 下川 直史, 高木 昌宏
2. 発表標題 匂い分子オイゲノールミスチン添加による人工細胞膜の相分離形成
3. 学会等名 2020年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田野 優輔, 下川 直史, 高木 昌宏
2. 発表標題 温感剤が引き起こす細胞模倣膜での相分離
3. 学会等名 2020年度北陸地区講演会と研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Radhika Biyani, Manish Biyani, Masahiro Takagi
2. 発表標題 Virtual reality for Virus-X
3. 学会等名 BICON-2020 Virtual Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北陸先端科学技術大学院大学 高木研究室ホームページ
<http://www.jaist.ac.jp/ms/labs/takagi/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	下川 直史 (SHIMOKAWA NAOFUMI) (20700181)	北陸先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・講師 (13302)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関