

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06992

研究課題名（和文）リポソームによる細胞接着装置に対する戦略的制御法の開発

研究課題名（英文）Development of strategic control methods for cell adhesion apparatus by liposomes

研究代表者

伊納 義和（Inoh, Yoshikazu）

愛知学院大学・薬学部・准教授

研究者番号：90434547

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、正電荷リポソームが細胞接着装置に及ぼす影響を検討してきた。その結果、肥満細胞においては、肥満細胞のインテグリンを介した接着シグナルを抑制していることを明らかにした。またリポソームのサイズと表面電荷が肥満細胞の細胞接着装置の活性化抑制に及ぼす影響について検討した。その結果、リポソームのサイズではなく、表面電荷がマスト細胞の活性化を抑制する役割を果たしていることを明らかにした。さらに、正電荷リポソームの構成する脂質の種類による影響を検討したところ、構成脂質の種類に依存することなく、表面電荷が肥満細胞の活性化抑制に影響を及ぼしていることも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで核酸や蛋白質の標的部への運び屋として注目されてきた正電荷リポソームが細胞接着装置に及ぼす影響を検討してきた。その結果、肥満細胞においては細胞接着装置の活性化を抑制することを明らかにした。

今後は、さまざまな細胞に対し、最適な物性を有するリポソームを作製し、その効果を明らかにすることで、細胞接着装置の異常が引き起こす疾患に対する治療法となり得ると考えられる。また、リガンド等の修飾による目的細胞への標的化や、リポソームへの治療用遺伝子・タンパク質の付与により、さらに効果的な治療効果が得られる可能性が高く、画期的な治療法となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we have examined the effects of cationic liposomes on the cell adhesion apparatus. As a result, we found that the liposomes suppressed mast cell integrin-mediated adhesion signaling in mast cells.

We also examined the effects of liposome size and surface charge on the inhibition of mast cell adhesion machinery activation. We found that surface charge, but not liposome size, played a role in suppressing mast cell activation. Furthermore, we examined the effect of the type of lipid constituting the positively charged liposome and found that the surface charge, independent of the type of lipid constituting the liposome, played a role in the inhibition of mast cell activation.

研究分野：生物物理

キーワード：正電荷リポソーム 細胞接着装置

## 1. 研究開始当初の背景

(1)細胞接着は大きく細胞同士の接着(細胞-細胞間接着)と細胞-基質間接着に分類される。前者は細胞同士を結び付けて組織を構築し、後者は異なる組織同士を結び付けて高次な器官を構築する。これらの細胞接着には、細胞膜を貫通する接着分子とそれを支える細胞骨格系から成る「接着装置」が中心的役割を担っている。細胞接着装置の異常は、器官形成や筋委縮、がん転移、骨粗しょう症などの多くの疾患の発症に関与している。さらに、異種細胞間においても、接着装置の異常が疾患の原因となる。例えば、神経細胞-免疫細胞の接着部位における相互作用の異常によりアトピー性皮膚炎、炎症性腸疾患や自己免疫疾患の発症が生じることや、神経細胞-膵島細胞の接着により、ストレス性の糖尿病が発症する。

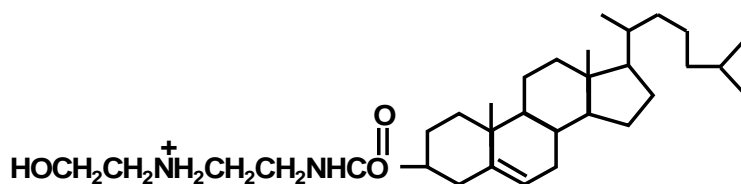
(2)脂質二重膜からなるリポソームは、これまで核酸やタンパク質の標的部位への運び屋として注目されてきた。申請者は最近、リポソーム自身が肥満細胞や筋管細胞の活性化時におけるサイトカイン分泌を抑制することを見出した。その要因について検討したところ、リポソームが微小管の安定性を抑制し細胞内顆粒の細胞膜への移行を抑制すること、添加するリポソームの組成により微小管の安定性が大きく異なり、それに伴う細胞内顆粒の細胞膜への移行を制御できることを明らかにしてきた。

## 2. 研究の目的

微小管は細胞接着装置において重要な役割を担っているため、リポソームを戦略的に適用することで、細胞接着装置を制御できると考えた。そこで本研究では、リポソームの組成を変えて細胞接着が要因となる疾患に対する各細胞の接着装置を自在に制御し、細胞接着装置が関与する疾患に対して、リポソームによる画期的治療法につなげることを目的とした。

## 3. 研究の方法

正電荷リポソームは、正電荷コレステロール誘導体 OH-Chol (右図)を、中性リン脂質 DOPE, DOPC や負電荷リン脂質 DOPS, DOPG と異なる混



合比で混合し、超音波処理法により数種の正電荷リポソームを作製した。また、エクストル ジョン法を用い、粒子径の異なる数種類の正電荷リポソームを作製した。

各細胞の活性化の指標としては主に細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  イオンの上昇を指標とするため、 $\text{Ca}^{2+}$  プローブ (Fura2-AM, Fluo4-AM) を用いて、分光光度計や共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定、解析をおこなった。また、エクソサイトーシスの測定として刺激後のサイトカイン産生量の測定を行った。また、細胞接着装置に関係する分子の活性化は Western blotting 法により測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 細胞 基質間の接着装置として膜貫通型タンパク質インテグリンが接着受容体として機能している。また、インテグリンにはタリン等の接着分子群が集積している。我々はこれまでの研究により、正電荷性リポソームは、貯蔵作動型  $Ca^{2+}$  の侵入と高親和性 IgE 受容体 (FcεRI) の架橋による微小管のアセチル化を阻害することで、細胞膜への分泌顆粒の輸送を抑制し、肥満細胞の脱顆粒を抑制することを見出している。インテグリンを介した細胞内シグナルは微小管のアセチル化を促進することから、マスト細胞におけるインテグリンを介したシグナルに対する正電荷リポソームの効果を調べた。はじめに肥満細胞の微小管の安定性にもっとも抑制効果が大きい組成の正電荷リポソームを用いて、インテグリン活性化の指標として、タリンの細胞膜への移行に着目した。その結果、正電荷リポソームは肥満細胞活性化に伴うタリンの細胞膜への移行を阻害することがわかった (図1)。

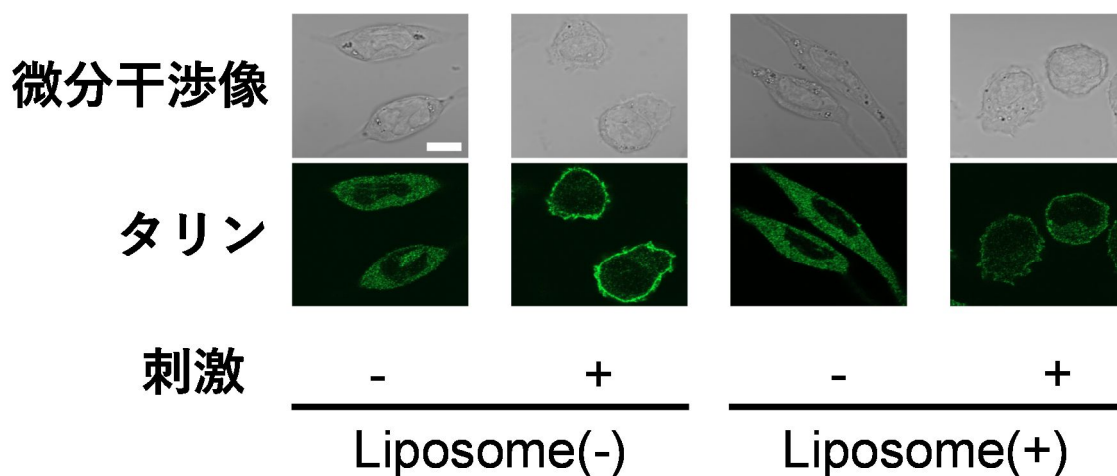


図1 正電荷リポソームがタリンの細胞膜移行に及ぼす影響 (Bar = 10  $\mu$ m)

次に、正電荷リポソームがタリンの活性化に関与する低分子量 G タンパク質 Rap1 へ及ぼす影響を検討したところ、正電荷リポソームは Rap1 の活性化を抑制することが明らかになった (図2)。

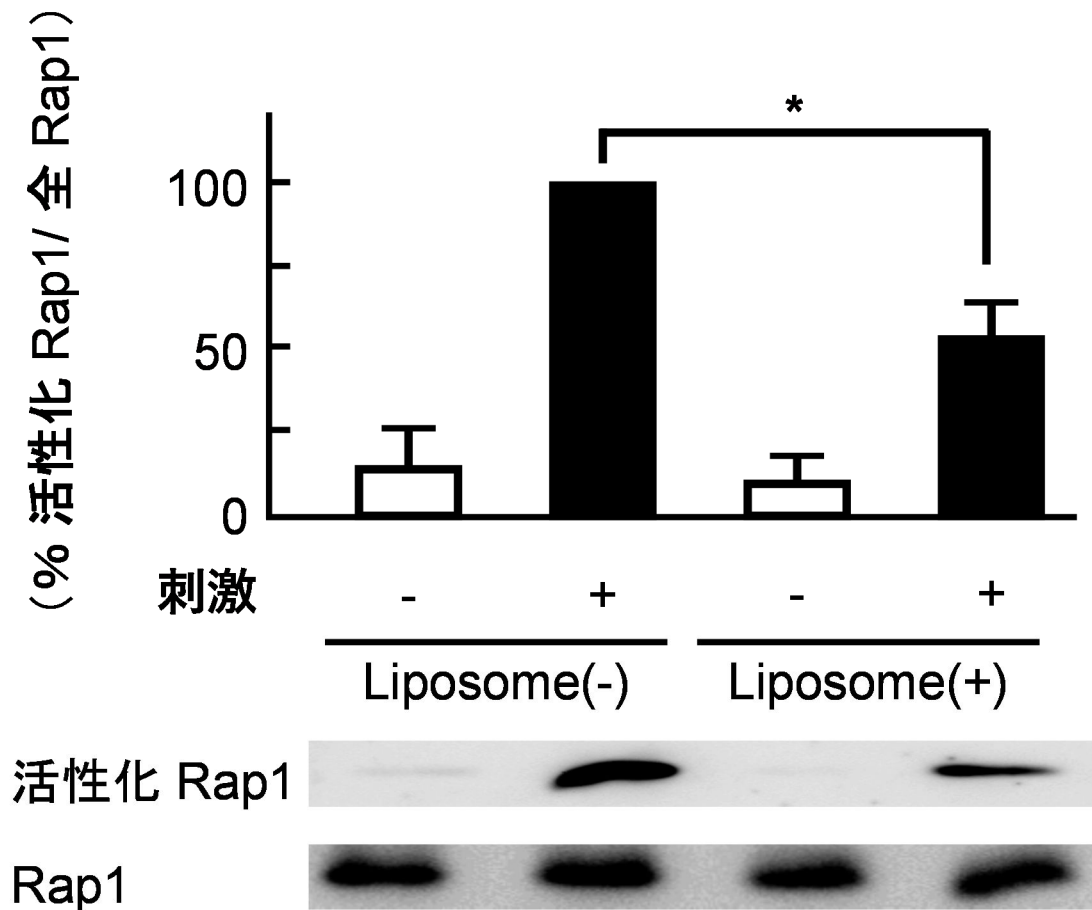


図2 正電荷リポソームが Rap1 の活性化に及ぼす影響

(Data are the mean  $\pm$  SE from three independent experiments. \* $p < 0.05$  by Tukey-Kramer's t-test.)

また、Focal adhesion kinase や paxillin といった細胞 基質間の接着点を構成するタンパク質の活性化 (リン酸化) も、正電荷リポソームの前処理によって阻害された (データ示さず)。

さらに、インテグリンの基質におけるリガンドであるフィブロネクチンをコートして、肥満細胞の活性化に伴う脱顆粒量の測定を行った。その結果、正電荷リポソームはフィブロネクチンコートによる脱顆粒増強効果をキャンセルすることが明らかになった (図3)。これらの結果から、正電荷リポソームは、Rap1 を介したタリンの細胞膜への移行を阻害することにより、肥満細胞のインテグリンを介した接着シグナルを抑制していることを明らかにした。

(2) 我々はこれまでの研究結果により、正電荷リポソーム中の OH-Chol と DOPE の組成比を変えると、肥満細胞の活性化抑制効果が増加することを明らかにしている。しかし、正電荷リポソームの組成比は、作製される正電荷リポソームの表面電荷とサイズが変化するため、正電荷リポソームの表面電荷とサイズ等の物理化学的特性が肥満細胞のどのように影響するのかがまだ不明である。従来法では、作製した正電荷リポソームのサイズは不均一であったため、エクス

トレーション法を用いて均一なサイズを有する正電荷リポソームの作製を試みた。その結果、約 300nm, 500nm, 800nm の均一な粒子径を有するリポソームを調製することに成功した。

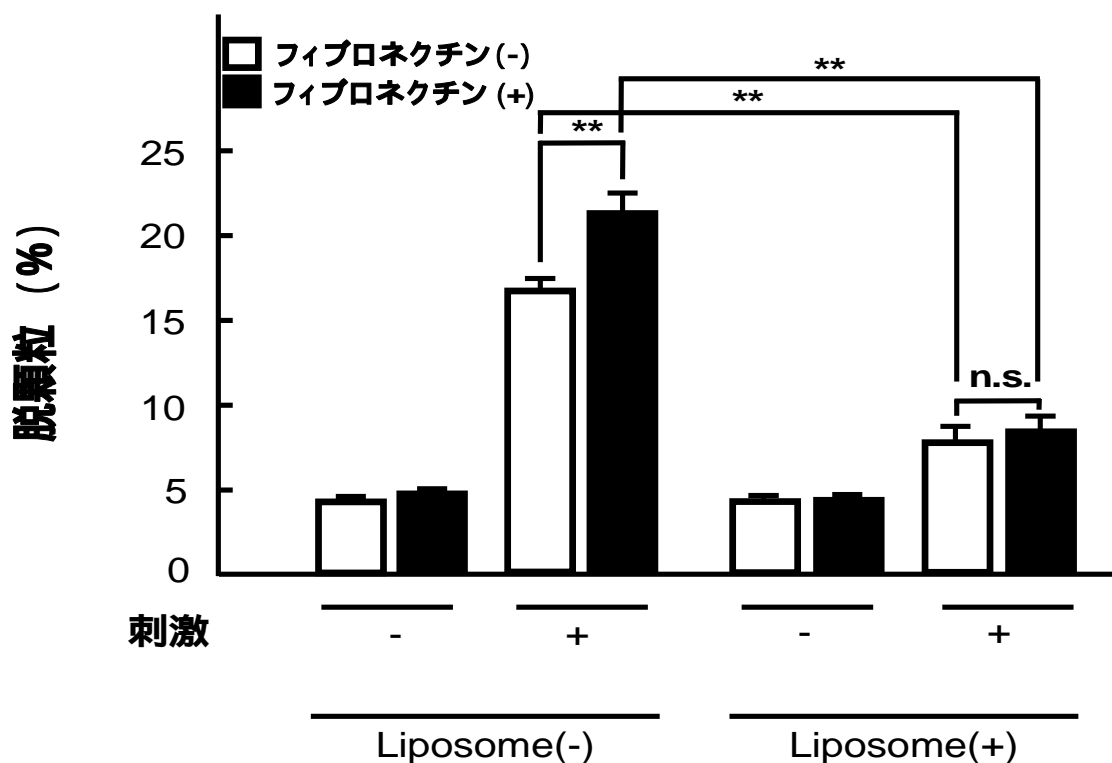


図3 正電荷リポソームがフィブロネクチンを介した脱顆粒活性化に及ぼす影響

(Data are the mean  $\pm$  SE from nine independent experiments. \*\* $p < 0.01$ ; n.s., no significance by Tukey-Kramer's t-test.)

そこでリポソームのサイズと表面電荷が肥満細胞の活性化に及ぼす影響について検討した結果、リポソームのサイズではなく、表面電荷が mast 細胞の活性化を抑制する役割を果たしていることを明らかにした。また、OH-Chol と 2 種類の中性脂質 (DOPC、DOPE) からなる正電荷リポソームと、脂質成分が正電荷コレステロール誘導体と 2 種類の負電荷脂質 (DOPS、DOPG) からなる弱い正電荷を有するリポソームを作製し、粒子径は同程度であるが、表面電荷が大きく異なるリポソームを用い、肥満細胞への影響を検討した。その結果、脂質組成の種類に依存することなく、表面電荷が肥満細胞の活性化抑制に影響を及ぼしていることも明らかにした。

最後に、作製した表面電荷の異なる数種類の正電荷リポソームを、細胞接着装置の異常が疾患に関与する膵島細胞 (細胞、細胞) 神経細胞 (中枢神経・末梢神経) 筋細胞等に添加し、その影響を測定・解析したが、各細胞における最適なりポソームの表面電荷の決定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 0件）

1. 著者名 Inoh Yoshikazu, Hirose Takuya, Yokoi Asami, Yokawa Satoru, Furuno Tadahide	4. 巻 231
2. 論文標題 Effects of lipid composition in cationic liposomes on suppression of mast cell activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104948 ~ 104948
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.chemphyslip.2020.104948	査読の有無 有
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 Inoh Yoshikazu, Tsuchiya Yuuki, Nakanishi Yokiko, Yokawa Satoru, Furuno Tadahide	4. 巻 44
2. 論文標題 Involvement of intracellular caveolin 1 distribution in the suppression of antigen induced mast cell activation by cationic liposomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Biology International	6. 最初と最後の頁 1068 ~ 1075
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbin.11297	査読の有無 有
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 Suzuki Ruriko, Inoh Yoshikazu, Yokawa Satoru, Furuno Tadahide, Hirashima Naohide	4. 巻 534
2. 論文標題 Receptor dynamics regulates actin polymerization state through phosphorylation of cofilin in mast cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 714 ~ 719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.012	査読の有無 有
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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀優紀、伊納義和、横川 慧、古野忠秀
2. 発表標題 正電荷リボソームがマスト細胞の接着シグナルに及ぼす影響
3. 学会等名 第65回 日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊納 義和、伊藤 菜浪、横川 慧、古野 忠秀
2. 発表標題 正電荷リボソームの表面電荷が肥満細胞の活性化に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 外山 真希、伊納 義和、横川 慧、古野 忠秀
2. 発表標題 ポリアクリルアミドゲル上でのマスト細胞の刺激応答
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	大井 義明  (Ohi Yoshiaki)  (50334735)	愛知学院大学・薬学部・准教授   (33902)	
研究 分担者	古野 忠秀  (Furuno Tadahide)  (80254308)	愛知学院大学・薬学部・教授   (33902)	

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
---------	---------