

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14798

研究課題名(和文)水産複合脂質を膜素材とするリポソームの腸管透過及び取り込み性

研究課題名(英文)Transport and uptake of the liposomes composed of marine complex lipids

研究代表者

高橋 是太郎 (TAKAHASHI, KORETARO)

北海道大学・水産科学研究院・特任教授

研究者番号：90125328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水産複合脂質を膜材としたリポソーム(サブミクロン小胞のこと)を調製し、M細胞を発現させた小腸上皮細胞モデルを用いて、リポソーム膜の複合脂質組成がリポソームの透過性及び上皮細胞内への取り込み性にどのような影響を与えるのかを調べたものである。各種阻害剤によって取り込みのメカニズムを調べ、リポソームがSUV(スモールユニラメラベシクル)であるかまたはMLV(マルチラメラベシクル)であるか、及び脂質クラスの選択によって、リポソームの取り込み性が大きく変化することを明らかにした。また、原子間力顕微鏡による観察で、リポソーム表面の性状は、リポソームの腸管への取り込みに影響しないことも示した。

研究成果の概要(英文)：This work was done to investigate the transport and uptake effects of the liposomes composed of marine complex lipids on two types of liposomes i.e. multi lamella vesicles (MLV) and small unilamellar vesicles (SUV) in small intestinal epithelial cell model. The results of experiments done with endocytosis inhibitors indicated some mechanisms of the individual complex lipid SUV and MLV liposomes. The results of atomic force microscopy (AFM) showed that the surface statuses of the cholesterol containing marine complex lipid liposomes were smooth, but it did not seem to affect the transport through the small intestinal epithelial cell model.

研究分野：水産化学

キーワード：水産複合脂質 リポソーム 小腸上皮細胞モデル 腸管モデル ホスファチジルコリン ホスファチジルセリン スルホキノボシルジアシルグリセロール M細胞

1. 研究開始当初の背景

水産リン脂質は、融点が低いことから、温度を上げてリン脂質の分散を均一化する必要がなく、少量の水親和性溶媒と共存させることにより、室温においても粒子径の揃ったリポソームを作成できる。このことは水産リン脂質に代表される高度不飽和リン脂質をリポソームとして容易に活用できることを意味する。水産リン脂質リポソームの機能性面での有用性については、応募者が Lipid Nanotechnology という本(2011年に AOCSS Press 社が出版)の Marine phospholipid liposomes という章に纏めているように、当該リポソームに内包する水溶性機能性物質や脂溶性機能性物質の作用を促進する働きがある。具体的には グルカン(アガリクスの水抽出物)の抗腫瘍性を促進する作用、フコキサンチン(脂溶性)の抗肥満性を促進する作用が一例である。また、レチノイン酸(脂溶性)やジブチリルサイクリックアデノシンモノリン酸(水溶性)のヒト前骨髄性白血病細胞に対する分化誘導作用を、水産リン脂質(ドコサヘキサエン酸(DHA)結合型リン脂質)が促進することが知られていることから、DHA 結合型の水産リン脂質リポソームに前記の細胞分化誘導物質を封入することにより、封入物使用量の軽減を期待できることが強く示唆された。封入された機能性物質は、即効性が望ましい場合と、少しずつ持続的に機能した方が望ましい場合とがあるが、応募者は、リポソーム膜の素材や組成比の工夫により、これらの特性(即効性か持続性か)を自在に制御できるものと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

上記のように、当該研究実施までに本研究代表者高橋によって、機能性成分は水産リン脂質を膜材とするリポソームという小包に封入した形態にしてから投与すると、効果が高まることが強く示唆されていた。このことから、応募者はリポソームの膜材の組成及び分

子種を変えることにより、小腸上皮細胞の単層膜における透過性と取り込み性が大きく変化するものと考えた。本研究ではこの実証を行い、どのような膜材が透過性及び取り込み性に大きく影響し、その透過性と取り込み性の差異が如何なる理由によるのかを明らかにすることを目指した。これにより、機能性物質を封入したリポソームの膜素材の制御によって、所望の腸管透過・吸収特性を有するリポソームを創生することが可能であるか否かを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

先ず当該リポソームの基材である DHA 結合型ホスファチジルコリン(DHA-PC)をクロロホルム/メタノール抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、スルメイカの皮より調製した。DHA-PC の一部をホスホリパーゼ D を用いたホスファチジル基転移反応によって、同じ脂肪酸残基を有する DHA 結合型ホスファチジルセリン(DHA-PS)に変換し、負の荷電を有するリン脂質を調製した。また、エゾノネジモク等の雑海藻よりクロロホルム/メタノール抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって、スルホキノボシルジアシルグリセロール(SQDG)、ジガラクトシルグリセロール(DGDG)及びモノガラクトシルグリセロール(MGDG)を調製した。

DHA-PC をリポソーム膜の基材とし、その半量を DHA-PS に置き換えて負電荷を持たせた場合、及び同様の負電荷を PS に換わり SQDG に置き換えることによって得た場合、さらには SQDG と同様に糖脂質に分類されるが、電荷を持たない MGDG または DGDG に置き換えた場合の各種リポソームの小腸上皮細胞単層膜における透過性への影響を、M 細胞を発現させた Caco-2 細胞単層膜を用いて、カルセインを内包させたそれぞれのリポソームによって調べた。Raji 細胞の共培養による M 細胞への分化の確認は、アルカリフォスファターゼ活性及びラテックスビーズ貪食能の発現、蛍光顕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

微鏡観察、及び走査型電子顕微鏡観察を通じた微柔毛喪失の確認によった。以上の実験系によって、リポソーム膜の基材であるリン脂質分子の塩基部分が変更したときの腸管透過性への影響、リン脂質と同様に両親媒性を有するが、リン酸基を分子内に持たない分子でリポソーム膜の素材を部分的に置き換えた場合の影響を現象面より明らかにした。次いで、このようなリポソームの腸管透過及び取り込み性への影響の差が、小腸上皮細胞の如何なる透過機構を介して生じたものであるかを、各種エンドサイトーシスに対応する阻害剤を用いて明らかにした。具体的には、マクロピノサイトーシス阻害剤であるEIPA、クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤であるクロルプロマジン及びエンドサイトーシスとファゴサイトーシス全般の阻害剤であるサイトカラシンDを導入し、これらの阻害剤の存在下での、各種リポソームの透過試験を行った。

小腸上皮単層膜の細胞間経路への影響については、蛍光剤(ルシファーイエロー)の基底膜側への漏出度によって調べた。

平成28年度は、フランスロレーヌ大学のLinder教授の元で博士研究員として、脂質ナノカプセルの原子間力顕微鏡像を撮り続けているAdria博士に依頼して、上記の各種リポソームの表面画像を取り込み、数値化・解析した。これによって、リポソーム膜表面の柔軟度及び平滑性の度合い等と、膜素材組成との関連付けを行った。

4. 研究成果

小腸上皮細胞モデルを用いて、(1)PC : Chol = 10 : 10 (mol/mol)、(2)PC : PS = 10 : 10 (mol/mol)、(3)PC : SQDG : Chol = 5 : 5 : 10 (mol/mol/mol)を膜材とするMLVおよびSUVの透過率と細胞内への取り込み率を測定し、リポソーム膜の脂質組成比の違いが腸管における透過に及ぼす影響について検討した。その

結果、(1)を膜材とするリポソームと(2)を膜材とするリポソームとの間で(2)に有意な透過率の上昇が認められた。同様にSQDGを添加した(3)を膜材とするリポソームにおいても、(1)のリポソームに対して透過率が有意に向上した(図1)。

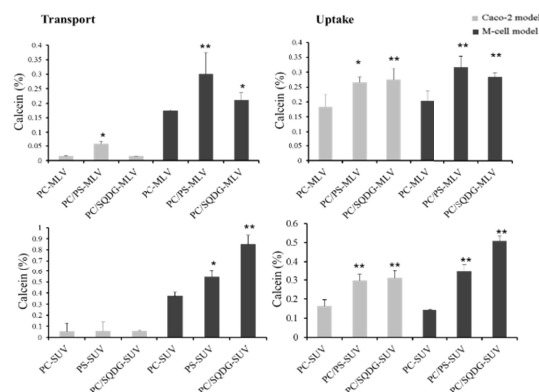


図1 水産複合脂質リポソームの小腸上皮 Caco-2 単層膜モデルと M 細胞発現単層膜モデルにおける透過及び取り込み

続いて、細胞内に取り込まれたリポソーム量を内包したカルセイン量によって測定した。その結果、リポソーム透過試験の結果と同様に、(1)を膜材とするリポソームに対して、(2)及び(3)を膜材とするリポソームで細胞内への取り込みが有意に上昇した。PS や SQDG の添加によりリポソーム膜表面が帯電した結果、細胞膜との親和性が向上し透過率が向上したことが推察されるため、次にリポソームの透過率向上メカニズムの一端を解明しようとした。エンドサイトーシス阻害剤を使用して、透過経路を調べることに先立ち、先ず透過試験時に高濃度カルセイン内包リポソームから漏出したカルセインがタイトジャンクション(TJ)を通過する可能性があることと推察したことから、ルシファーイエロー(LY)を使用し、リポソームの TJ 開口作用確認試験を行った。その結果、図2のように、PC/SQDG-MLV を添加した場合にのみ、コントロールである HBSS(1%

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

FBS)に分散させたLYと比較して、LYの透過量の増大がCaco-2単層膜およびM細胞モデルで確認できた。このことから、PC/SQDG-MLVはTJ開口作用を持つことが示唆された。

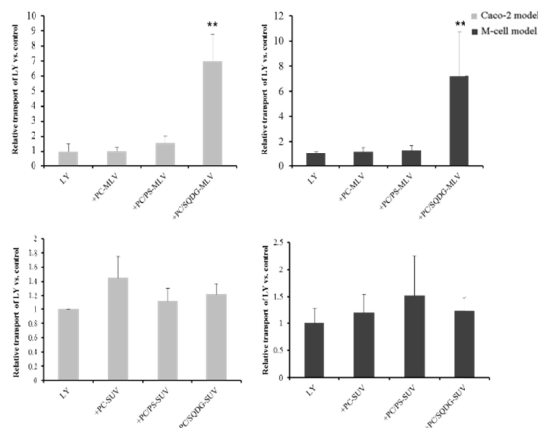


図2 水産複合脂質リポソームの小腸上皮 Caco-2 単層膜モデルとM細胞発現単層膜モデルのタイトジャンクションにおける蛍光物質ルシファーイエローの透過

次いでエンドサイトーシス阻害剤であるEIPA またはChlorpromazineを使用することにより、それぞれ、マクロピノサイトーシス、クラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害した状態で各種リポソームの透過試験を行った。対照として、HBSS(1% FBS)に分散させたリポソームでの透過試験及び取り込み試験を行った。その結果、透過試験では、M細胞モデルにPC-MLVを添加し、マクロピノサイトーシス阻害剤であるEIPAを使用した場合、M細胞モデルにPC-SUVを添加し、両阻害剤をそれぞれ使用した場合、PC/SQDG-SUVでは、M細胞モデルに添加し、Chlorpromazineを使用した場合に、コントロールであるHBSS(1% FBS)に分散させた各種リポソームと比較して、透過率の低下が認められた。このことから、PC-MLVはマクロピノサイトーシスを介して透過すること、PC-SUVはマクロピノサイトーシスとクラスリン依存性エンドサイトーシスを介して

透過すること、PC/SQDG-SUVは、クラスリン依存性エンドサイトーシスを介して透過することが示唆された。これに対し、PC/PS-MLV、PC/SQDG-MLV、PS-SUVは何れの阻害剤を使用した場合も、透過率の低下は認められなかったことから、ファージサイトーシスを介して透過することが推察された(図3及び図5)。

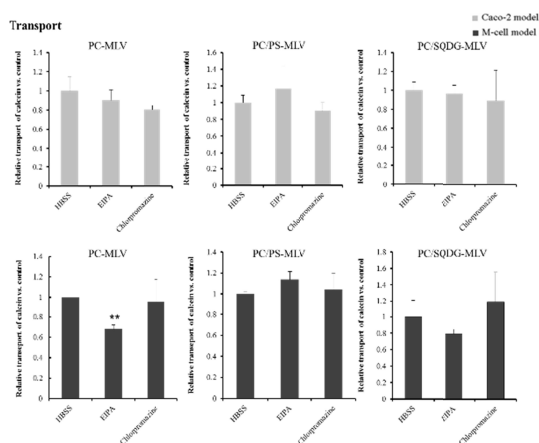


図3 各種エンドサイトーシス阻害剤存在下における水産複合脂質 MLV リポソームの小腸上皮 Caco-2 単層膜モデルとM細胞発現単層膜モデルでの透過

次に、細胞内取り込み試験を行い、その結果より、M細胞モデルにPC-SUVを添加し、何れの阻害剤を使用した場合も、コントロールと比較して、取り込み率の低下が認められた。特にEIPAを使用した場合には大きな低下が見られたことから、PC-SUVは主にマクロピノサイトーシスを介し細胞内に取り込まれ、一部はクラスリン依存性エンドサイトーシスで取り込まれることが示唆された。また、M細胞モデルにPC/SQDG-SUVを添加し、何れの阻害剤を使用した場合も、コントロールと比較して、取り込み率の低下が認められた。特にChlorpromazineを使用した場合に大きな低下が見られたことから、PC/SQDG-SUVは主にクラスリン依存性エンドサイトーシスを介し細胞内に取り込まれ、一部はマクロピノサイトーシスで取り込まれることが示唆された。各

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

種 MLV、PC/PS-SUV は何れのエンドサイトーシス阻害剤においても、コントロールと比較して取り込み率の大きな低下は認められなかった。このことより、これらのリポソームの細胞内への取り込みは、ファゴサイトーシスによって取り込まれることが推察された(図4及び図6)。

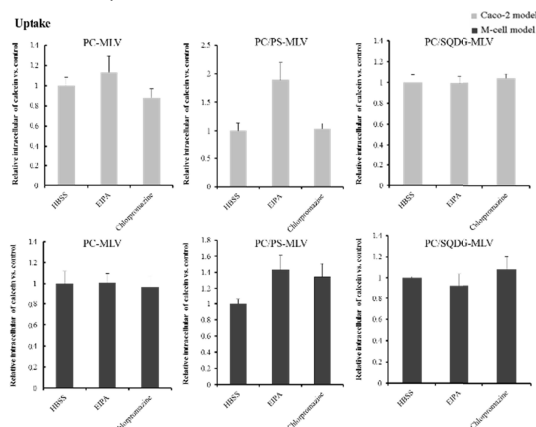


図4 各種エンドサイトーシス阻害剤存在下における水産複合脂質 MLV リポソームの小腸上皮 Caco-2 単層膜モデルと M 細胞発現単層膜モデルでの取り込み

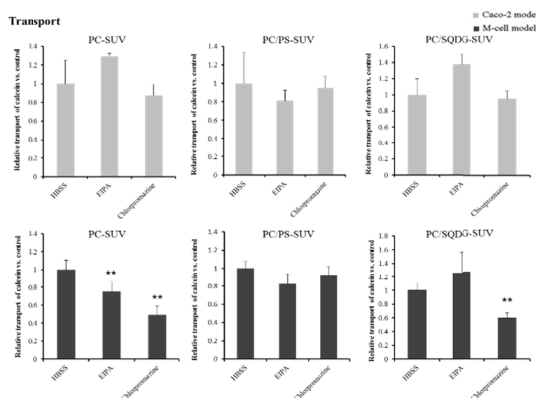


図5 各種エンドサイトーシス阻害剤存在下における水産複合脂質 SUV リポソームの小腸上皮 Caco-2 単層膜モデルと M 細胞発現単層膜モデルでの透過

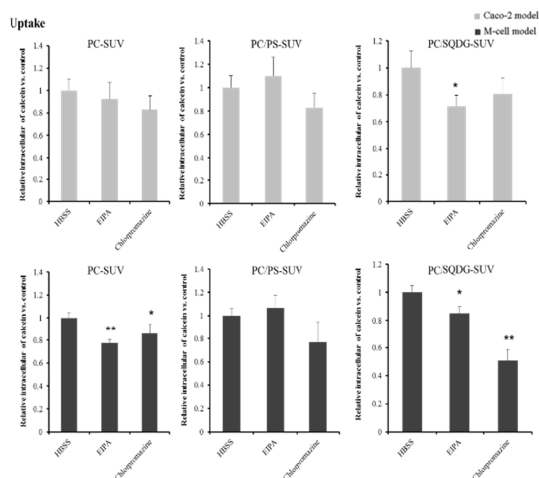


図6 各種エンドサイトーシス阻害剤存在下における水産複合脂質 SUV リポソームの小腸上皮 Caco-2 単層膜モデルと M 細胞発現単層膜モデルでの取り込み

最後に、原子間力顕微鏡によるそれぞれのリポソームの表面観察を行った。その結果、コレステロールはリポソームの表面を滑らかにするものの、リポソームの腸管への取り込みには影響しないことが示された。

以上、本研究により、脂質クラスの選択と組成比を制御することによって、リポソームの取り込み性が大きく変化することが明らかになった。

5. 主な発表論文等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高橋 是太郎 (TAKAHASHI, Koretaro)
北海道大学・大学院水産科学研究院・特任教授
研究者番号：90125328

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし

(4) 研究協力者
リンダー ミカエル (LINDER, Michel)