

令和元年6月10日現在

機関番号：16301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15550

研究課題名(和文) 脂腺細胞の分泌膜小胞セボゾームの構築と周辺組織への脂質供給機構

研究課題名(英文) Structure and Function of Sebosomes in Sebocytes, supply their molecules to surrounding cells

研究代表者

永井 彩子(Nagai, Ayako)

愛媛大学・医学部附属病院・助教(病院教員)

研究者番号：90420562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット脂腺細胞は増殖中に多数の小型脂質顆粒を含む膜小胞「セボゾーム」を生成・分泌するが、本研究により、セボゾームの分泌は脂肪芽細胞や線維芽細胞などの脂質顆粒では認められない特異的な現象であった。同生成過程には、小胞輸送に作用する複数の因子の関与が示唆された。また、セボゾームには皮脂主成分のスクアレンや抗菌作用が期待されるヒストンの他、RNAが濃縮されており、周辺細胞への情報伝達の役割などが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

皮膚の脂腺細胞は、皮脂を分泌し、紫外線や細菌から皮膚表面を保護するが、我々が発見し命名した同細胞の分泌膜小胞のセボゾームは他の組織細胞には見られない脂肪滴を持ち、特異的な3つの有用な新機能が期待される。(1) 周辺の表皮細胞に皮脂及び塩基性のタンパク質のヒストンH3を移送・補給し、脂質、脂溶性ビタミン、サイトカインや抗菌活性を与える。(2) がん細胞などで多数報告され、細胞間の情報交換に貢献するエクソソームと同様の機能が予想され、さらに脂肪滴の付加機能も与える。(3) 細胞の脂肪滴には感染防御機能や抗炎症作用が報告されているが、セボゾームにも同様の機能を持つことが示唆される。

研究成果の概要(英文)：We discovered "Sebosomes", novel secretory membrane vesicles in cultured rat sebocytes (Nagai et al. Endocrinology, 2005). They concentrated squalene and histones, with antimicrobial activities. We suggested that the Sebosomes contained multiple subcellular organelles, including lysosomes and endosomes. In lipid supplemented culture medium, both of undifferentiated sebocytes and preadipocytes accumulated multiple lipid droplets. Most of the lipid droplets in the sebocytes were found in the Sebosomes and eventually secreted, but in contrast, the droplets in the preadipocytes were not released and stayed in the cells. When the sebocytes were incubated with Cy-3 labeled siRNA and cultured, the fluorescence was detected in the Sebosomes. It was suggested that Sebosomes could contain RNAs.

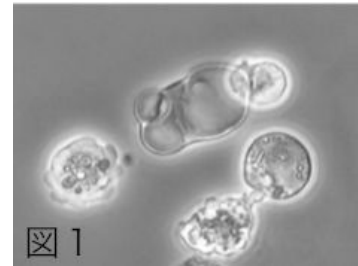
研究分野：分子細胞生物学、内科学

キーワード：セボゾーム 脂腺細胞 分泌膜小胞

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

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚表面に分布する皮脂腺は、スクアレンを主成分とする多量の皮脂(2g/日,成人)を分泌する。皮膚を乾燥や感染、紫外線などから保護する機能を持つ。同活性化には、皮脂腺の代謝活性の調節などの皮脂分泌の分子機構の解明は必須である。しかし、脂腺細胞の培養が困難であるために、同機構の詳細は不明なところが多い。申請者らは、ハムスターの株化脂腺細胞で、ステロイドホルモンによる分化促進機構や分化マーカー蛋白質であるペリリピンの発現動態を報告した(*J Invest Dermatol* 124:1127 -1133 2005)。また、申請者らは眼瞼の脂腺であるマイボーム腺の細胞培養にも成功し、ADRP(脂質結合蛋白質 PLIN2)が脂肪滴に局在することを報告(*Exp Eye Res* 84(4):687-693 2007)した。近年、脂腺細胞によるステロイドホルモンの合成が報告され、皮脂腺は末梢の「内分泌器官」と位置づけられた。更に、皮脂により抗酸化活性を持つビタミン E は皮膚表面へ供給され、ディフェンシン蛋白質、パルミトオレイン酸、サピエン酸、スクアレンなどの脂成分には抗菌活性があると報告された。申請者らは、ラットの初代培養脂腺細胞やハムスターの皮膚から分離した株化脂腺細胞が分泌する、脂質顆粒を含む特異的な膜小胞を発見し、「セボゾーム」と命名した(図 1:直径 1-10  $\mu\text{m}$ 、*Endocrinology* 2005)。セボゾームにはスクアレンと、ヒストン H3 が濃縮されていることを明らかにし、これらから保湿機能や抗菌活性が示唆された。申請者は、LC-MS/MS を用いたプロテオミクス解析や蛍光蛋白質(GFP)融合蛋白質発現解析法により、セボゾームはリソソーム、リサイクリングおよび、早期-後期エンドソーム、脂質ラフトマーカーを含有することを明らかにした(2009 年日本分子生物学会年会にて発表、投稿準備中)。更に申請者らは、セボゾームが脂質顆粒を含有し、複数の膜系、オルガネラを含む特異的な分泌膜小胞であり、分泌リソソームやエクソソーム、アポトーシス小体といった既知の細胞外分泌小胞とは異なる、細胞外分泌小胞の特徴的な構成成分を併せ持つ新規の分泌膜小胞であることを示唆した(2012 年日本分子生物学会年会ワークショップにて発表、投稿準備中)。



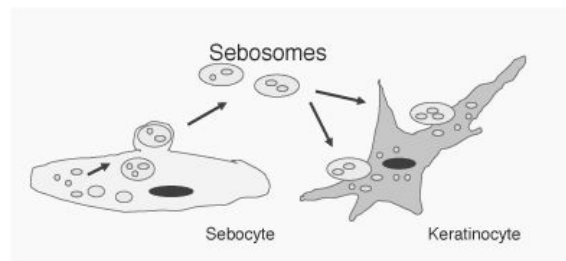
### 2. 研究の目的

本研究では、蛍光オルガネラトレーサー、蛍光脂質トレーサー、及び蛍光蛋白質融合蛋白質を用いて、セボゾームの生成・分泌機能を解析し、また同機能を活性化する分子機構を解明して、皮膚・全身の保護及び健康の補強への応用を目的とする。

(1) 脂腺細胞や他組織由来の細胞での脂質顆粒の蓄積と同顆粒を含む膜小胞の分泌の関係を検討した。

(2) 細胞に添加した RNA がセボゾームへと移送された後、細胞外へ輸送される可能性について検討した。

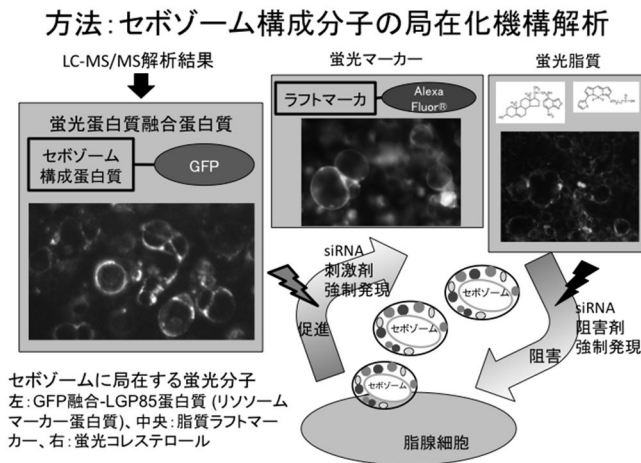
(3) セボゾームに含まれる幾つかの分子について、siRNA によるノックダウン実験によりセボゾームの生成・分泌に関わる因子を検討した。



### 3. 研究の方法

(1) では培養条件を揃えるため脂腺細胞および脂肪芽細胞は D'MEM で培養維持し、(2)、(3) では脂腺細胞は EGF 添加 D'MEM で培養維持した。また、オレイン酸添加で脂質蓄積を促進した。

アポトーシスは、Annexin V-EGFP Apoptosis Kit (BioVision) で検出した。脂質顆粒は、Oil Red O 染色、NBD-cholesterol、BODIPY-fatty acid analog (Life Tech. Corp.)で検出した。リソゾーム成分は LysoTracker (Life Tech. Corp.)で染色して確認した。RNA は SYTO RNASelect Green Fluorescent Cell Stain(Life Tech. Corp.)で、DNA は Hoechst33342(Life Tech. Corp.)で染色、蛍光顕微鏡で観察した。Cy3 標識ネガティブコントロール siRNA(Life Tech. Corp.)はリポフェクションで脂腺細胞に導入した。Rab5a siRNA (Qiagen)、Rab7 siRNA (Qiagen)をそれぞれリポフェクションで脂腺細胞に導入し、セボゾームの生成・分泌を観察した。セボゾームの蛍光免疫細胞染色は 1 次抗体として抗 Rab5 マウス抗体 (BD Biosciences)、抗 Rab7 ウサギ抗体 (Santa Cruz Biotech.)、2 次抗体として CF488-抗マウス IgG 抗体 (Biotium)、CF555-抗ウサギ IgG 抗体 (Biotium)を用いた。



#### 4. 研究成果

(1) 脂腺細胞や他の組織由来細胞での脂質顆粒の蓄積と脂質顆粒を含む膜小胞との分泌の関係  
脂腺細胞と脂肪芽細胞は共に、分化後大型の脂質滴を形成し、多量の脂肪を蓄積した。培地への脂肪酸添加で、増殖中の両細胞は、共に多数の小型脂質顆粒を蓄積した。その後、脂腺細胞は脂質顆粒を含む膜小胞セボゾームを生成・分泌した。一方、脂肪芽細胞では膜小胞形成や脂質顆粒分泌を認めなかった。また、セボゾーム分泌中の脂腺細胞にはアポトーシスは検出されなかった。以上の結果、増殖中の脂腺細胞は、細胞死を伴わず、組織特異的な脂質顆粒を含むセボゾームを形成し細胞外へ分泌する。これには、細胞分化は必須条件ではないと考えられた。

(2) セボゾームへの細胞に添加した RNA の移送、細胞外への輸送の検討

SYTO RNASelect の蛍光はセボゾームに検出された。Hoechst33342 の蛍光は脂腺細胞の核では検出され、セボゾームには検出されなかった。Cy3 標識ネガティブコントロール siRNA の蛍光は細胞質内とセボゾームに検出された。以上より、培養脂腺細胞のセボゾームはヒストン H3 やスクアレンなど、特定のタンパク質や脂質を濃縮する他に、RNA も凝集し、細胞外へ分泌することが示唆された。また、セボゾームには DNA 断片が検出されなかった事実により、RNA やヒストン H3 は細胞死に伴い廃棄された核の断片としてではなく、より積極的に選択的にセボゾームへ移送されていると考えられた。

(3) セボゾームに含まれる幾つかの分子の、セボゾームの生成・分泌への関与の検討

Rab5a, Rab7 単独での siRNA によるノックダウンでは、セボゾームの生成・分泌は完全には抑制されなかった。しかし、蛍光免疫細胞染色法により、Rab5、Rab7 はセボゾームに検出された。理由として、ノックダウン後から細胞内のタンパク質発現量の減少までのタイムラグが予想以上に長い、ノックダウン後に残存したごく少量のタンパク質発現量でもセボゾームの生

成・分泌が起きる可能性も考えられ、今後の課題である。更に、Rab GTPase はエンドサイトーシス経路の主要な調節因子であり、その中、今回注目した Rab5、Rab7 にも複数のアイソフォームが知られている。ノックダウンに使用した Rab GTPase の siRNA は複数のアイソフォームのうちの 1 種類ずつであり、アイソフォームを区別しない抗体を使用した蛍光免疫細胞染色ではノックダウンした細胞からも同タンパク質が検出された。この結果から、他のアイソフォームでセボゾームの生成・分泌作用が補われた可能性が考えられた。また一方で、Rab5 非依存性のエンドサイトーシス経路も知られており、同経路に関する因子がセボゾームで検出された。以上の結果より、培養脂腺細胞のセボゾームの生成・分泌には、Rab5、Rab7 なども含めた膜輸送に関する複数の分子が発現し関与する可能性が示唆され、今後更に詳細な検討を進める予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

(1) 永井 彩子、澄田 道博

培養脂腺細胞の Sebosomes の生成・分泌の調節因子

第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年、神奈川県横浜市

(2) Michihiro Sumida, Ayako Nagai, and Toshihiro Yorozyua

Characteristics of Sebosomes, Secretory Membrane Vesicles in Cultured Rat Sebocytes.  
BIT 's 4<sup>th</sup> Annual World Congress of Smart Materials-2018.

2018 年, Osaka, Japan. (国際学会、招待講演)

(3) Ayako Nagai, Michihiro Sumida

Specific molecules concentrated in Sebosomes.

2017 年度 生命科学系学会合同年次大会、2017 年、兵庫県神戸市

(4) Michihiro Sumida, Toshihiro Yorozyua, and Ayako Nagai

Sebosomes, Novel Secretory Membrane Vesicles in Cultured Rat Sebocytes.  
BIT 's 3<sup>rd</sup> Annual World Congress of Smart Materials-2017.

2017 年, Bangkok, Thailand. (国際学会、招待講演)

(5) 永井 彩子、澄田 道博

未分化脂腺細胞における脂質顆粒の蓄積と分泌

第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年、神奈川県横浜市

(6) Michihiro Sumida, Toshihiro Yorozyua, and Ayako Nagai

Secretion and Function of Sebosomes, Novel Secretory Membrane Vesicles in Cultured Sebocytes.

EMN Meeting on Membranes -2016.

2016 年, Dubai, UAE. (国際学会、招待講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。