

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08255

研究課題名(和文)細胞選択的エクソサイトーシス制御リポソーム製剤の開発

研究課題名(英文)Development of cell selective exocytosis regulated by liposomes

研究代表者

伊納 義和 (Yoshikazu, Inoh)

愛知学院大学・薬学部・講師

研究者番号：90434547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は最近、リポソームそのものが肥満細胞からの即時型ヒスタミン分泌(エクソサイトーシス)を抑制することを見出した。そこで、本研究では、肥満細胞、のほか、数種の細胞活性化に伴うサイトカインの分泌に正電荷リポソームが及ぼす影響を検討した。その結果、正電荷リポソームは、肥満細胞においては、抗原刺激によるIL-4の分泌を抑制することが明らかとなった。筋芽細胞においても、刺激に伴うIL6の分泌を正電荷リポソームが抑制することが明らかとなった。一方、マクロファージにおいては刺激物質によるサイトカインの分泌を抑制しなかった。神経細胞においてはATPによる活性化を試みたが、細胞死が誘発され検討できなかった。

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のエクソサイトーシス抑制効果に着目して数種の細胞に対して検討してきた。その結果、エクソサイトーシス抑制効果の得られる細胞と得られない細胞があることが明らかとなった。効果の得られた細胞に関しては、正電荷リポソームにリガンド等を修飾し、目的細胞に標的化することで、エクソサイトーシス過剰分泌由来の疾患に対して、副作用の少ない治療法となりうると考えられる。また、リポソームに治療用遺伝子、治療用タンパク質を付与させることで、より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)：We recently found that the liposome itself inhibits immediate histamine secretion (exocytosis) from mast cells. In this study, we investigated the effects of cationic liposomes on the secretion of cytokines after cell activation in mast cells, as well as in several other cell types.

The results showed that cationic liposomes inhibited antigen-stimulated IL-4 secretion in mast cells. In myoblasts, cationic liposomes inhibit the stimulation-induced secretion of IL6. In contrast, macrophages did not inhibit the secretion of cytokines by stimulants. In the case of nerve cells, we tried to activate the cells by ATP, but could not be studied because the stimulants induced cell death.

研究分野：薬学

キーワード：リポソーム エクソサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

脂質二分子膜からなる閉鎖小胞であるリポソームは、目的部位への効果的な薬物の“運び屋”としての有用性が広く研究されてきた。また、リポソームは、医薬品だけでなく、アンチセンス、siRNA、DNA 等の核酸医薬品の有用な運び屋としての研究も盛んに行なわれている。申請者のグループは、これまで蛋白質・核酸のキャリアーとして、分子イメージング法を基盤とした解析から高い蛋白質・核酸導入効率を有するリポソームの開発に独自の視点から取り組み、多くの成果を得てきた。最近申請者は、リポソームの *in vivo* への展開を考え、リポソームがアレルギー反応を誘導するか否かについて検討してきた。その結果、リポソーム自身が、肥満細胞による炎症性物質の細胞外への放出(エクソサイトーシス)を抑制することを世界で初めて発見した [1]。

ところで、エクソサイトーシスが要因となって発症する疾患は多く報告されている。例えば、糖尿病では、膵島 α 細胞がエクソサイトーシスによって血中に放出するグルカゴン濃度の異常分泌も糖尿病の重要な因子であると考えられている。また血管内皮細胞におけるフォンビルブランド因子、P-セレクトリンなどは、血管内に分泌されると血栓形成や血管の炎症を強力に惹起する。その他にも、Tリンパ球によるサイトカインの異常分泌、神経細胞における神経伝達物質の異常分泌による疾患が挙げられる。しかし、高効率かつ特異的にこれらの細胞のエクソサイトーシスを抑制する方法はほとんどなく、対症療法に依存している。我々は、これまでの一連の研究結果からリポソーム自身が、エクソサイトーシスが原因となる疾患治療の有効なツールになり得ると考えた。

2. 研究の目的

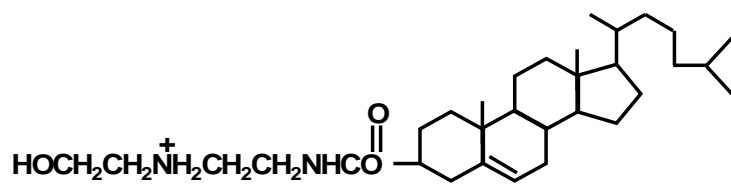
肥満細胞、マクロファージ、神経芽細胞、骨芽細胞の活性化条件を決定する。次に物性の異なる正電荷リポソームを多種類作製し、各細胞の活性化、エクソサイトーシスに及ぼす影響を検討する。次に、エクソサイトーシス制御メカニズムを解明し、リポソームへの修飾を施すことで細胞選択性の高いエクソサイトーシス制御リポソームの開発を目的とする。

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)と中性リン脂質 DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine)を異な

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。

各細胞の活性化の指標としては細胞内 Ca^{2+} イオンの上昇を指標とするため、 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。24 well プレートに播種し(5×10^4 cells/well) 各種細胞に正電荷リポソームを添加した。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下で 3 時間培養した後に、培養培地で 2 回洗浄した各細胞を刺激物質で刺激し、3 時間後の上清を採取した。細胞上清に分泌されたサイトカイン量を ELISA 法により測定した。



4. 研究成果

(1) 正電荷リポソームが肥満細胞（ラット好塩基性白血球：RBL-2H3）のエクソサイトーシスに及ぼす影響

肥満細胞においては、活性化条件の決定は完了している。そこで数種の正電荷リポソームが、抗原（DNP-OVA）刺激によるエクソサイトーシスに及ぼす影響を ELISA 法により検討した。その結果、OH-Chol と DOPE をある組成比で作製した正電荷リポソームが、抗原刺激後の肥満細胞の IL-4 のエクソサイトーシスが抑制されることが明らかとなった。一方、数種の正電荷リポソームで処理しても、肥満細胞の抗原刺激後の TNF- α の分泌は抑制されなかった（Fig. 1）。我々の予備的検討により、IL-4 と TNF- α は別々の細胞内顆粒に存在することが明らかとなっており、正電荷リポソームは一方の顆粒の分泌のみを抑制することが示唆された。TNF- α の細胞外への分泌は炎症反応を誘発するため、今後は TNF- α の分泌を抑制する正電荷リポソームの開発が必要である。

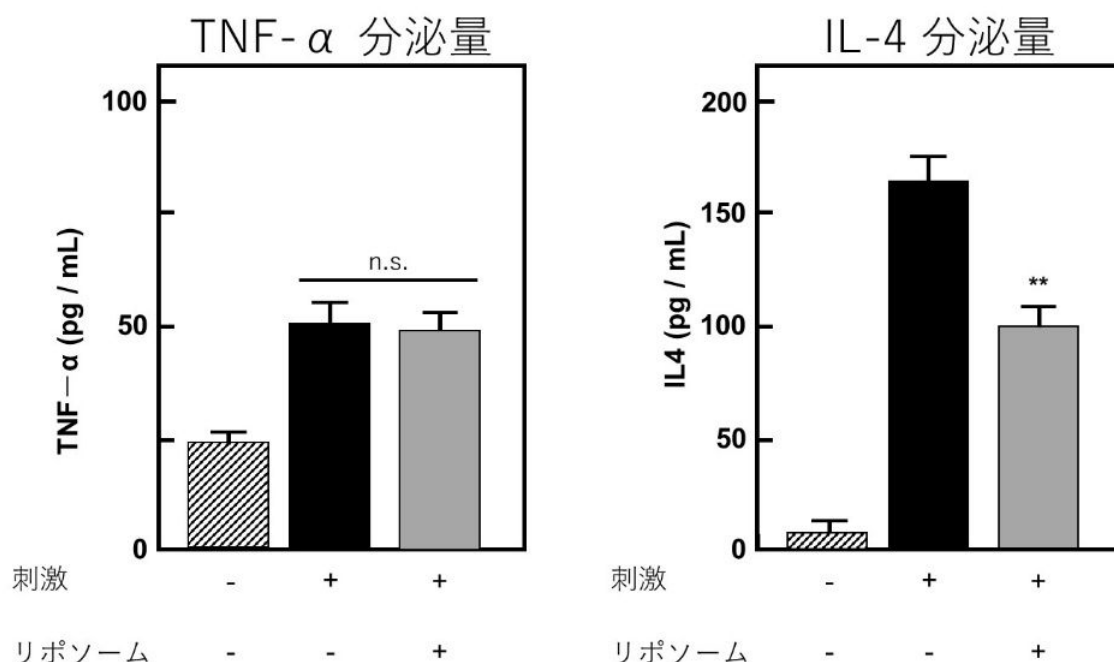


Fig. 1 正電荷リポソームが肥満細胞のサイトカイン分泌に及ぼす影響
(mean \pm SE, n = 3 **:p < 0.01 vs リポソーム(-), 刺激(+)) by t-test)

(2) 正電荷リポソームがマクロファージ（マウス単球・マクロファージ様細胞株：J774A.1）のエクソサイトーシスに及ぼす影響

マクロファージは肥満細胞と同様に免疫細胞として重要な役割を果たしている。マクロファージ活性化症候群のようにマスト細胞の異常な活性化はサイトカインの異常分泌により、時には重篤な症状となり得る。本研究ではマクロファージ株 J774A.1 のリポポリサッカライドによる活性化条件の決定し、正電荷リポソームによる TNF- α 分泌量を測定した。数種類の組成の異なるリポソームを用いても、サイトカイン分泌量に及ぼす影響は認められなかった。共焦点レーザー顕微鏡において検討したところ、正電荷リポソームはマクロファージ内にすべて取り込まれていた（データ示さず）。正電荷リポソームがマクロファージに貪食された結果、正電荷リポソ

ムによる効果が得られなかった可能性があり検討が必要である。

(3) 正電荷リポソームが筋管細胞(マウス筋芽細胞:C2C12)のエクソサイトーシスに及ぼす影響
筋ジストロフィー筋疾患は、筋委縮や筋強直が主な原因である。最近、筋委縮は骨格筋でのIL-6の産生亢進が主な原因であると報告された。そこで、正電荷リポソームがマウス筋芽細胞C2C12細胞を分化させた筋管細胞のIL-6分泌に及ぼす影響を検討した。その結果、ある種の正電荷リポソームを添加することで、正電荷リポソームの添加量依存的にIL-6の分泌量が抑制された(Fig.2)。

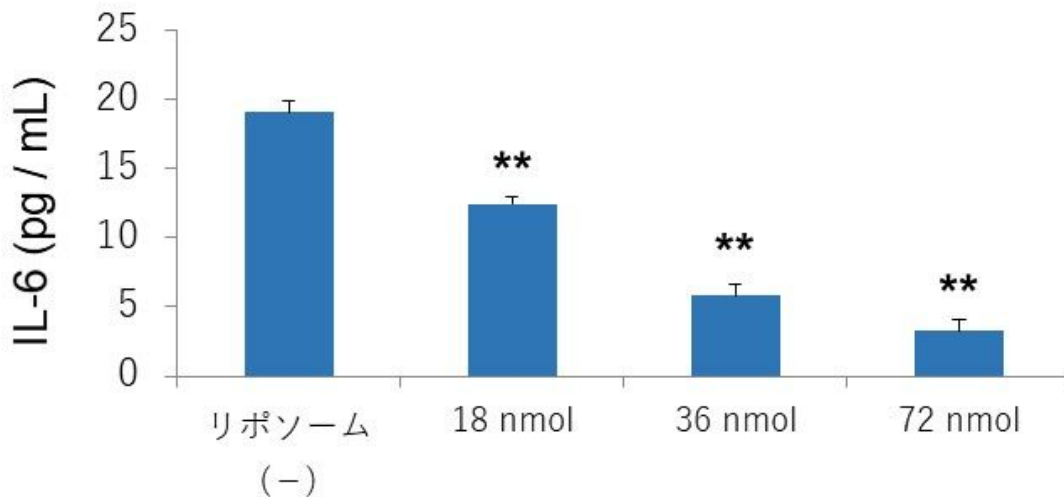


Fig. 2 正電荷リポソームが筋管細胞のIL-6分泌に及ぼす影響

(mean \pm SE, n = 3 **:p < 0.01 vs リポソーム(-), 刺激(+)) by Tukey-Kramer test)

(4) 正電荷リポソームが神経芽細胞(マウス脳神経芽細胞:Neuro-2a)の活性化に及ぼす影響

神経細胞のサイトカイン分泌を検討する前に、神経芽細胞の活性化に正電荷リポソームが及ぼす影響を検討した。

神経芽細胞の細胞膜上にはP2Y₂受容体とP2X₇受容体が発現しており、ATPがP2Y₂受容体に結合するとIP₃が産生される。産生されたIP₃が小胞体膜に存在するIP₃受容体に結合すると、小胞体内から細胞内にCa²⁺が放出される。小胞体内のCa²⁺濃度が低下したことをSTIMが感知すると、STIM、Orai相互作用が働き細胞外からCa²⁺が流入することで細胞内Ca²⁺濃度が上昇することが知られている。また、P2X₇受容体にATPが結合すると、受容体が活性化され細胞内にCa²⁺が流入することも知られている。そこで、ある組成の正電荷リポソームを3時間添加した後、ATP刺激に伴う細胞内Ca²⁺濃度上昇率について共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察し、解析した。その結果、正電荷リポソームを添加することでATP刺激による細胞内Ca²⁺濃度が上昇した(Fig.3)。この結果より、正電荷リポソームは神経芽細胞においては肥満細胞の場合とは異なり、刺激物質による活性化を促進することが明らかとなった。この結果は、数種の組成の正電荷リポソームにおいても同様であった。現在、正電荷リポソームが神経芽細胞においてATP刺激による活性化を促進するメカニズムについて検討中である。

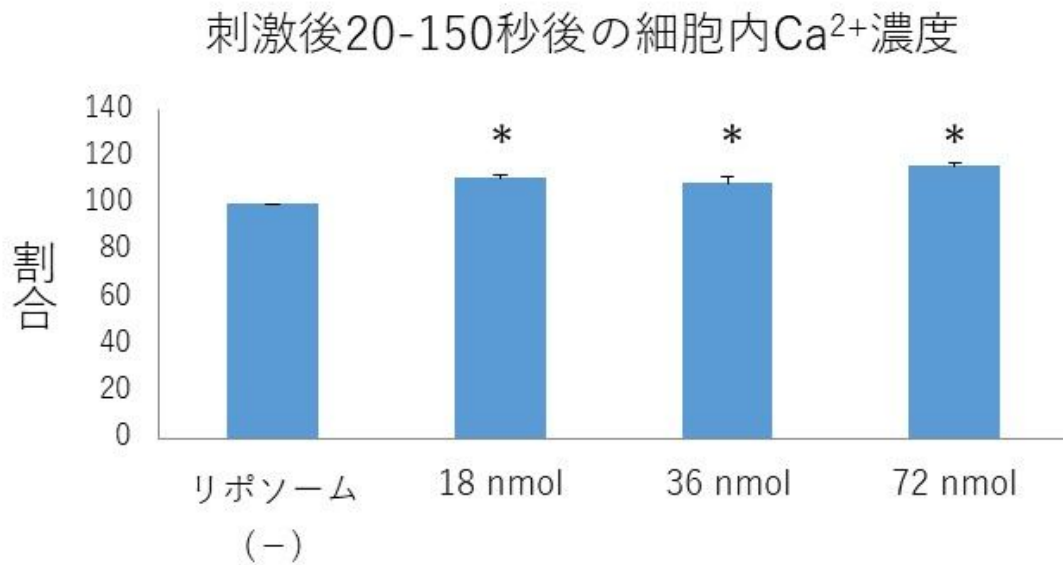


Fig. 3 正電荷リポソームが Neuro-2a 細胞内 Ca²⁺濃度上昇に及ぼす影響

Lipo. (-)の値を 100 として AUC を求めた。

(mean ± SE, n=71-144 *:p<0.05 vs リポソーム. (-) by Dunnet test)

以上の結果より、OH-chol と DOPE からなる正電荷リポソームを用いるといくつかの細胞でエクソサイトーシスの抑制効果が見られた。現在、正電荷リポソームによる、エクソサイトーシス抑制メカニズムを解明し、細胞ごとに最適な組成のリポソームの開発を試みている。また、正電荷リポソームの構成脂質による効果の違いも検討中である。

【引用文献】

[1] Inoh, Y., Haneda, A., Satoshi T., Yokawa, S., Furuno T.

Cationic liposomes suppress intracellular calcium ion concentration increase via inhibition of PI3 kinase pathway in mast cells. BBA, 1859(12), 2461-2466 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Watabe Kiyoto, Yokawa Satoru, Inoh Yoshikazu, Suzuki Takahiro, Furuno Tadahide	4. 巻 446
2. 論文標題 Decreased intracellular granule movement and glucagon secretion in pancreatic cells attached to superior cervical ganglion neurites	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 83 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11010-018-3275-2	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 Yokawa Satoru, Suzuki Takahiro, Hayashi Ayumi, Inouye Satoshi, Inoh Yoshikazu, Furuno Tadahide	4. 巻 6
2. 論文標題 Video-Rate Bioluminescence Imaging of Degranulation of Mast Cells Attached to the Extracellular Matrix	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 74-74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2018.00074	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 Shiki Atsushi, Inoh Yoshikazu, Yokawa Satoru, Furuno Tadahide	4. 巻 68
2. 論文標題 Promotion of microtubule acetylation plays an important role in degranulation of antigen-activated mast cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 181 ~ 184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00011-018-1203-2	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 Inoh Yoshikazu, Haneda Aki, Tadokoro Satoshi, Yokawa Satoru, Furuno Tadahide	4. 巻 1859
2. 論文標題 Cationic liposomes suppress intracellular calcium ion concentration increase via inhibition of PI3 kinase pathway in mast cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 2461 ~ 2466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2017.09.025	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Atsushi Shiki, Yoshikazu Inoh, Satoru Yokawa, Tadahide Furuno
2. 発表標題 Inhibition of degranulation in mast cells cultured on hydrogel
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Satoru Yokawa, Takahiro Suzuki, Ayumi Hayashi, Satoshi Inouye, Yoshikazu Inoh, Tadahide Furuno
2. 発表標題 Video-rate Bioluminescence imaging of degranulation of mast cells attached to the extracellular matrix
3. 学会等名 第56回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊納 義和, 土屋 侑輝, 横川 慧, 古野 忠秀
2. 発表標題 正電荷リボソームはマスト細胞の抗原刺激によるcaveolin-1 の細胞膜移行を阻害する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古野 忠秀, 志岐 敦, 伊納 義和, 横川 慧
2. 発表標題 マスト細胞の脱顆粒に及ぼす微小管アセチル化の影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊納義和、羽根田亜紀、横川 慧、古野忠秀
2. 発表標題 正電荷リボソームはマスト細胞の抗原刺激による活性化を抑制する
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (Conbio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 伊納義和、田所哲、横川慧、古野忠秀
2. 発表標題 正電荷リボソームによるマスト細胞内Caイオン濃度上昇抑制機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018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)	