

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05703

研究課題名(和文) 白色メラノソームを利用する薬物送達システムの開発

研究課題名(英文) White melanosome for the DDS system

研究代表者

竹森 洋 (Takemori, Hiroshi)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：90273672

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)：メラノソームを大量放出させる化合物の検証を実施し、オートファージとの連動が示唆された。オートファージはメラノソームを分解し、細胞内メラニン量を低下させることが報告されているが、今回はメラノソーム放出促進で、細胞内メラニン量が低下した。加えて、メラニン合成酵素の発現や活性を抑制することでメラニン蓄積が少ないメラノソームの放出剤も同定した。この低メラニン含有メラノソームは蛍光化合物も同定でき、他の細胞への取り込みも評価できた。今回単離したメラノソームはケラチノサイトのみならずマクロファージへもメラノソームが取り込まれ、薬物送達のシーズをととしての利用が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メラノソームが薬物送達の素材として活用できる可能性が示唆された。また、メラノソームをラベルできる化合物は、送達する薬物のリンカーとしても機能することから、今後の改良が期待される。一方で、メラノソームを取り込む細胞が、ケラチノサイトやマクロファージなどの貪食機能が亢進している細胞であったことから、今後は、細胞特異的にメラノソームを導入する手法の構築へと進めていく。また、ケラチノサイトのメラノソーム取り込みは、皮膚の色素沈着にも繋がる。そのため、メラノソームをメラノサイト内の止めておく技術の開発も望まれる。

研究成果の概要(英文)：The compounds that release large amounts of melanosomes were validated, suggesting that they are linked to autophagy. Autophages have been reported to degrade melanosomes and reduce intracellular melanin levels, in this case, a compound reduced melanin levels by promoting melanosome release. In addition, another melanosome release compound was also identified that inhibited the expression and activity of melanin synthase, resulting in low melanin accumulation. The low melanin-containing melanosomes also allowed the identification of fluorescent compounds and their uptake into other cells could be assessed. The melanosomes isolated in this study were taken up not only by keratinocytes but also by macrophages, suggesting their use as seeds for drug delivery.

研究分野：物質化学

キーワード：メラノソーム オートファジー メラニン合成抑制 薬物送達 構造活性相関

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究は白色メラノソームという新たな概念での薬物送達担体の開発である。薬の有効性向上と副作用低減における薬物送達システム「DDS」の重要性から、カプセル・抗体を利用した様々な形態・手法が実用化されている。また最近では、miRNA の輸送にエクソソームの利用が注目を集めている。しかし、エクソソームはサイズが 100nm 以下しかないので、実用化を目指したエクソソームの制御法開発には、特殊な機器・試薬及び技能を必要とする。

2. 研究の目的

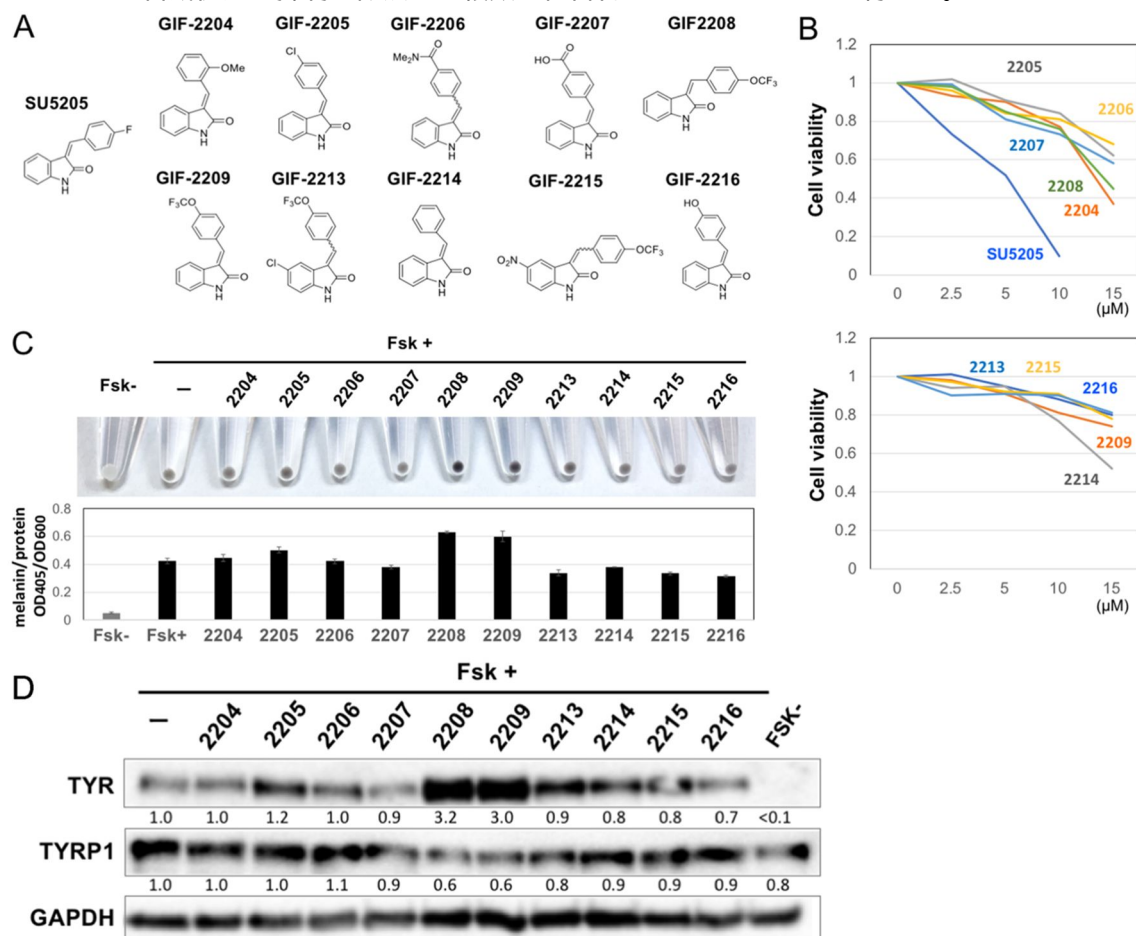
本研究では、1 μ m サイズのメラノソーム(エクソソームと起源が同一)に着目し、欠点を克服する次の研究を通じて、新規薬物送達システムの可能性を検証する。・動態追跡を困難にする黒色素メラニンを含むしない白色メラノソームの開発・メラノソームの機能に紐付けされた蛍光ラベル分子のメラノソーム表面発現化・メラノソームを目的(標的)細胞へ特異的に送達する技術の構築・メラノソームへの低分子化合物の内包と、送達後に放出する技術の構築を目的とする。

3. 研究の方法

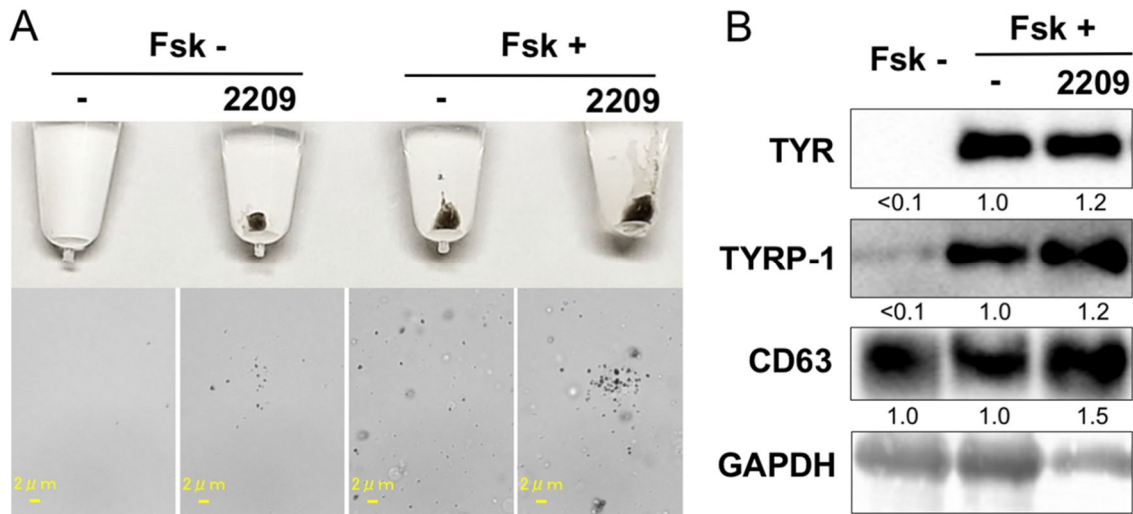
メラニン合成促進及び抑制作用と、メラノソーム放出促進・抑制作用の双方から低分子化合物をスクリーニングし、メラニン含量の少ないメラノソームを大量生産する。次いで、低メラノソームをラベル可能な蛍光化合物を合成し、メラノソームを蛍光追跡する。また、メラノソーム親和性低分子化合物の基本骨格をリンカーとして、複数の位置に蛍光基を導入し、その蛍光基の転移で薬物放出のモデルとする系を構築し評価する。

4. 研究成果

メラニン合成促進・抑制の観点から複数の化合物をスクリーニングを行った。

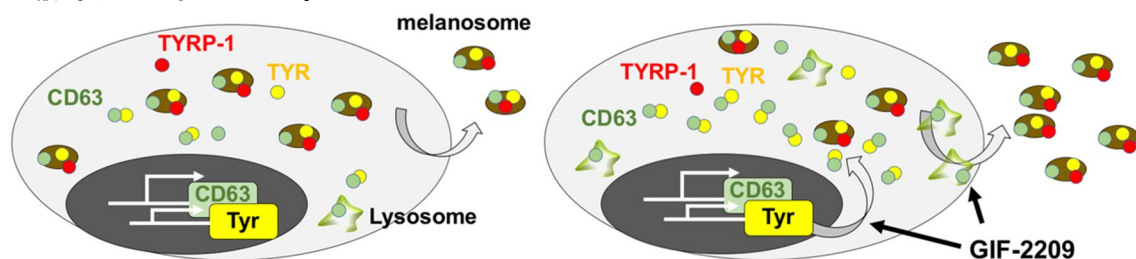


その結果、GIF-2208/2209 に高いメラニン誘導活性が観察された。2 種のメラニン合成酵素のタンパク質量解析では、TYR(チロシナーゼ)タンパク質は上昇していたが、TYRP1 タンパク質は低下する矛盾が生じていた。そこで、培地中のメラノソームの放出を検討した。

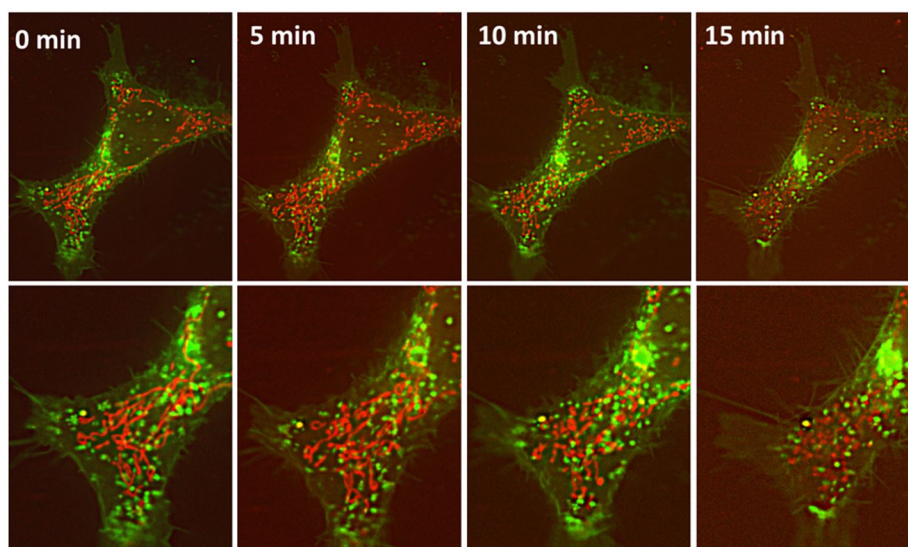


GIF-2209 処理で、メラノソームの放出量が増加した。一方、放出メラノソーム内の TYR と TYRP-1 量は影響を受けないことから、複数の機構が作用していることが示唆された。1 つは、TYR 特異的誘導機構で、他方は、メラノソーム放出促進である。細胞内の TYR と TYRP-1 の量的矛盾は、メラノソームの放出促進に伴う、TYRP-1 の供給不足と予想された。意外なことに、解糖系の酵素の GAPDH がメラノソームで検出された。

また、GIF-2209 は Lysosome を活性化させることも示唆され、メラノソームがオートファジーを誘導すると予想される。



平行して、メラノソームラベリング剤を複数同定できた。特徴として、弱く「+」に帯電している化合物である。これらは、弱くメラノソームと結合しているため、細胞内導入解析は、絶対的な結論は得づらい。そこで、共有結合型の蛍光剤を開発した。例えば、MitoMM のような蛍光剤である。MitoMM は生細胞ではミトコンドリアを染色でき、ミトコンドリアの運命を追跡できることで、他の用途にも応用できた。



MitoMM (赤) を利用した、ミトコンドリアの運命追跡 (丸は萎縮ミトコンドリア)

現在、MitoMM をはじめ、複数の蛍光剤をリンカーとして開発しているところである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Miyu Watanabe, Kyoka Kawaguchi, Yusuke Nakamura, Kyoji Furuta, Hiroshi Takemori	4. 巻 27
2. 論文標題 GIF-2209, an oxindole derivative, accelerates melanogenesis and melanosome secretion via the modification of lysosomes in B16F10 mouse melanoma cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules27010177	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 Takemori H, Koga K, Kawaguchi K, Furukawa S, Ito S, Imaishi J, Watanabe M, Maeda M, Mizoguchi M, Oh-Hashi K, Hirata Y, Furuta K	4. 巻 62
2. 論文標題 Visualization of mitophagy using LysoKK, a 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole-(arylpropyl)benzylamine derivative	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mitochondrion	6. 最初と最後の頁 S1567-7249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mito.2021.12.004	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 Yoko Hirata, Yoshiyuki Tsunekawa, Mayu Takahashi, Kentaro Oh-hashii, Kyoka Kawaguchi, Masumi Hayazaki, Miyu Watanabe, Ken-ichi Koga, Yurika Hattori, Hiroshi Takemori, Kyoji Furuta	4. 巻 174
2. 論文標題 Identification of novel neuroprotective N,N-dimethylaniline derivatives that prevent oxytosis/ferroptosis and localize to late endosomes and lysosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 225-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2021.08.015.	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 Maeda M, Suzuki M, Takashima S, Sasaki T, Oh-Hashi K, Takemori H	4. 巻 562
2. 論文標題 The new live imagers MitoMM1/2 for mitochondrial visualization.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 50-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.05.040.	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 Isogawa Kenta, Asano Masataka, Hayazaki Masumi, Koga Kenichi, Watanabe Miyu, Suzuki Keiichi, Kobayashi Takahiro, Kawaguchi Kyoka, Ishizuka Akane, Kato Shinya, Ito Hironari, Hamamoto Akie, Koyama Hiroko, Furuta Kyoji, Takemori Hiroshi	4. 巻 122
2. 論文標題 Thioxothiazolidin derivative, 4 OST, inhibits melanogenesis by enhancing the specific recruitment of tyrosinase containing vesicles to lysosome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 667-678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jcb.29895	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 Kawaguchi K, Watanabe M, Furukawa S, Koga K, Kanamori H, Ikemoto M, Takashima S, Maeda M, Oh-Hashi K, Hirata Y, Furuta K, Takemori H	4. 巻 50
2. 論文標題 Intermittent inhibition of FYVE finger-containing phosphoinositide kinase induces melanosome degradation in B16F10 melanoma cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Bio Rep	6. 最初と最後の頁 5917-5930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-023-08536-9	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 今石 潤, 濱本 明恵, 竹森 洋
2. 発表標題 エクソソーム標識剤の開発と応用
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古川 紗帆, 竹森洋, 古閑 謙一, 伊藤 誠弥, 古田享史
2. 発表標題 環境応答性エンドソームイメージャー
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川口 馨加、竹森 洋、古田享史
2. 発表標題 メラノソームオートファジーのライブイメージャーの開発
3. 学会等名 日本色素細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊 実夢、川口 馨加、竹森 洋、古閑 謙一、中村優介、古田 享史
2. 発表標題 白色メラノソームの合成と利用
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川口馨加 渡邊美夢 竹森 洋 古田享史
2. 発表標題 PIKfyve阻害剤後のメラノソーム分解とオートファジーの関与
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 化合物、ミトコンドリア染色剤およびミトコンドリアの蛍光染色方法	発明者 竹森洋、大橋健太郎、高島茂雄、前田美和、古江美保、坂	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-070021	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 化合物、細胞性小胞染色剤および細胞性小胞の蛍光染色方法	発明者 竹森 洋、古田享史、森田洋子	権利者 岐阜大学
産業財産権の種類、番号 特許、2021-012443	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	古田 享史 (Furuta Kyoji) (40173538)	岐阜大学・工学部・教授 (13701)	

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