

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21906

研究課題名(和文) リポソームと好塩基球を融合したハイブリッド分泌系の構築と細胞治療・DDSへの展開

研究課題名(英文) Construction of basophil/liposome hybrid secretory system and its application to cell therapy and DDS.

研究代表者

平嶋 尚英 (Hirashima, Naohide)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授

研究者番号：10192296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者はこれまで、リポソームを基盤としたDDSの構築を目指して、細胞サイズの巨大リポソームに微小リポソームを内包させた人工のエクソサイトーシス(開口放出)系の構築を行ってきた。一方、抗体を介して標的依存的にエクソサイトーシスによる分泌を行う好塩基球に、新たに遺伝子を導入して細胞を改変し、極めて高い標的特異性をもった標的細胞治療系やDDSに展開する試みを行ってきた。本研究では、これまでの研究成果を融合させ、すなわち、人工細胞と実在の分泌細胞を融合させ、両者の長所を生かしたハイブリッドの型の分泌系の開発とその応用研究を行い、全く新しいタイプの細胞治療・ドラッグデリバリーシステムを構築する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全く新しい細胞治療およびDDSの観点からは、細胞サイズの巨大リポソームを基盤とした人工分泌細胞と実在の分泌細胞の長所を生かした、ターゲット特異的分泌を行うハイブリッド分泌系の構築であること。生物と非生物という観点からは、細胞サイズのリポソームと生細胞を融合させたハイブリッド系を、どこまで生細胞の性質と機能を保持して生存できるか、について挑戦することであり、その意義は応用面からも基礎研究の面からも極めて大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Aiming to construct a unique drug delivery system (DDS) based on liposomes, we have so far constructed an artificial exocytosis system by encapsulating small-liposomes in cell-sized giant liposomes. We also constructed targeting-cell therapy systems with high target specificity by modifying mast cells and basophils, which secrete by exocytosis in a target-dependent manner through antibodies. In this research, we fused the results of previous research, that is, fusing an artificial secretory cell and a living secretory cell (RBL-2H3 cell), resulting in a new cellular therapy method and drug delivery system.

研究分野：生物物理学

キーワード：分泌細胞 巨大リポソーム 人工細胞 細胞治療 DDS

1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)において、重要な寄与をしており、実際リポソームを用いた製剤が上市され、新型コロナウイルス感染症の mRNA ワクチンにも利用されている。DDS にもちいられているリポソームは直径が 100 nm 程度のサイズのものであるが、近年細胞サイズ(直径が数~数十 μm)のリポソームが容易に作れるようになって、人工細胞の研究にも応用されている。一方、我々は抗体を介して標的依存的にエクソサイトーシスによる分泌を行うマスト細胞や好塩基球に、新たに遺伝子を導入して細胞を改変し、抗体と分泌小胞局在化生理活性物質を介して、極めて高いターゲット認識能をもったターゲット細胞治療系やターゲット特異的 DDS に展開する試みを行ってきた(改変好塩基球、図1)。また、並行して細胞サイズの巨大リポソームを用いてマスト細胞のような人工の分泌細胞(人工エクソサイトーシス系)の構築に成功した(図2)。

これらの系を DDS として展開させるには、それぞれ欠点を有していた。すなわち、改変好塩基球の分泌小胞に分泌させたい生理活性物質を封入するためにシグナル配列を付加して分泌小胞に局在させるため、封入できる生理活性物質はペプチドや蛋白質に限られた。一方、人工エクソサイトーシス系は、微小リポソーム内に任意の物質を封入できるが、ターゲット認識能とそれと連動したリポソーム内 Ca^{2+} 濃度情上昇機構が欠落していた。

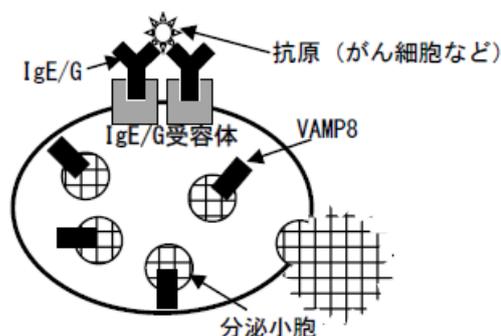


図1 改変好塩基球

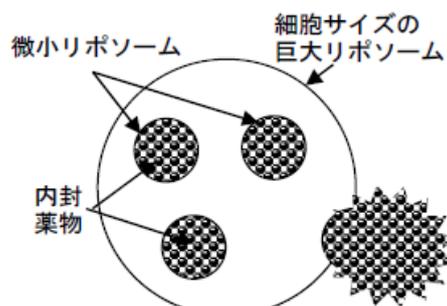


図2 人工エクソサイトーシス系

2. 研究の目的

上述のように改変好塩基球はターゲットに対して分泌できる物質に制限があり、人工エクソサイトーシス系は、ターゲット認識能とリポソーム内 Ca^{2+} 濃度情上昇機構が欠落していた。

本研究では、これらの欠点を互いに補う系として、人工エクソサイトーシス系と改変好塩基球を細胞融合法により融合させ、両者の長所を生かした(欠点を補いあった)ハイブリッドの型の分泌系の開発を行い、全く新しいタイプの細胞治療・ドラッグデリバリーシステムへと展開することを目的とする(図3)。これによって、例えば、がん細胞を認識しそれに向けて、分泌小胞に局在化させたアポトーシス誘導サイトカインと微小リポソームに封入した低分子抗癌剤を同時に分泌できる DDS が構築できる。また、細胞サイズのリポソームと実在の生細胞の融合細胞の viability や分泌という機能を発揮できるのかという基礎研究的観点からも追究する。

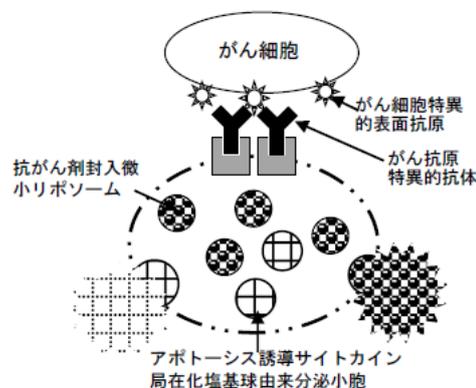


図3 ハイブリッド系

3. 研究の方法

上述の欠点を克服するために、両者を改変し、さらに融合させたハイブリッド系を構築する。

好塩基球としてはラット白血病細胞株(RBL-2H3)を用いた。

(1) 好塩基球のエクソサイトーシスによる分泌は、いわゆる SNARE 仮説、すなわち、分泌小胞膜にある VAMP8 と細胞膜にある syntaxin3/4 および SNAP23 によって引き起こされる。そこで、VAMP8 を組み込んだ微小リポソームに薬物を封入し、それを細胞サイズの巨大リポソームに内包させる。VAMP8 は大腸菌による発現系と無細胞発現系の両方を試みた。

(2) 好塩基球のもつ分泌小胞内容物の分泌を阻害するため、好塩基球の分泌小胞に発現する endogenous VAMP8 を CRISPER-Cas9 によってノックアウトした改変好塩基球を構築する。

(3) 細胞サイズの巨大リポソームと改変好塩基球を electrofusion 法により融合させ、両者の短所を克服したハイブリッド分泌系、すなわち、ターゲットを認識して巨大リポソーム内包した微小リポソームの内容物のみ分泌する系、を構築する。

4. 研究成果

(1) VAMP8 の発現と精製

①大腸菌発現系による VAMP8 の発現と精製

His タグを結合した VAMP8 (VAMP8-His) を発現する大腸菌 M15 (Qiagen) を培養し、IPTG で発現誘導後、大腸菌を溶解、Ni-NTA Agarose (Qiagen) で精製した。その結果、VAMP8 を発現・精製することに成功した (図 4)。

精製した VAMP8 は可溶化再構成により微小リポソームにくみ込んだ。モル比が POPC : DOPS : NBD-PE : Rho-PE = 82 : 15 : 1.5 : 1.5 のリン脂質のクロロホルム溶液を減圧乾固後、N-Octyl- β -D-glucoside を含む VAMP8 蛋白質溶液として可溶化後、BIO-BEADS SM-2 (BIO RAD) を加えた reconstitution buffer で 4°C、16 時間透析して、再構成リポソームを調製した。

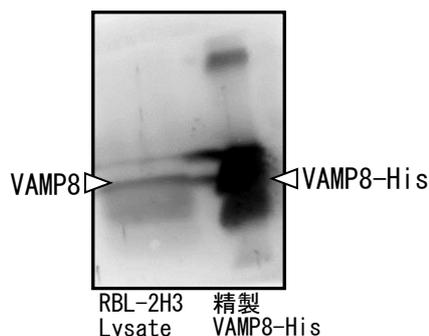


図 4 抗 VAMP-8 抗体による Western Blotting

②無細胞発現系による VAMP8 の発現と精製

無細胞発現系である PURE SYSTEM のタンパク質発現用ベクターである PURE2 ベクターの EcoR I サイトと Xho I サイトに VAMP8 の DNA をサブクローニングし、発現させた。しかしながら、無細胞発現系では VAMP8 の発現は確認できなかった。

(2) VAMP8 ノックアウト好塩基球の構築

RBL-2H3 のもつ分泌小胞内容物の分泌を阻害するため、RBL-2H3 の分泌小胞に発現する endogenous VAMP8 を、CRISPER-Cas9 システムによってノックアウトした改変好塩基球株の構築を試みた。gRNA と Cas9 を pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 によって、EGFP とや PuroR を pCRIS-PITChv2FBL でノックインすることを試みたが、ノックアウト株の構築には至らなかった。

(3) 好塩基球と細胞サイズの融合系の構築

RBL2H3 と細胞サイズの巨大リポソームを電場融合法により融合させることを試みた。

①巨大リポソームの調製

細胞サイズのリポソーム (DOPC, DOPG、コレステロール) は、W/O エマルション遠心法によって調製した。巨大リポソーム内の溶液組成は、

90 mM スクロース、210 mM マンニトール、0.1 mM MgCl₂、0.1 mM CaCl₂とした。

巨大リポソームのサイズを RBL-2H3 細胞のサイズと同等にするために、エマルション調製時のリポソーム内溶液量を変化させ、10 μ L を 5 回に分けて加えることで、直径が約 10-20 μ m の巨大リポソームを得た (図 5)。

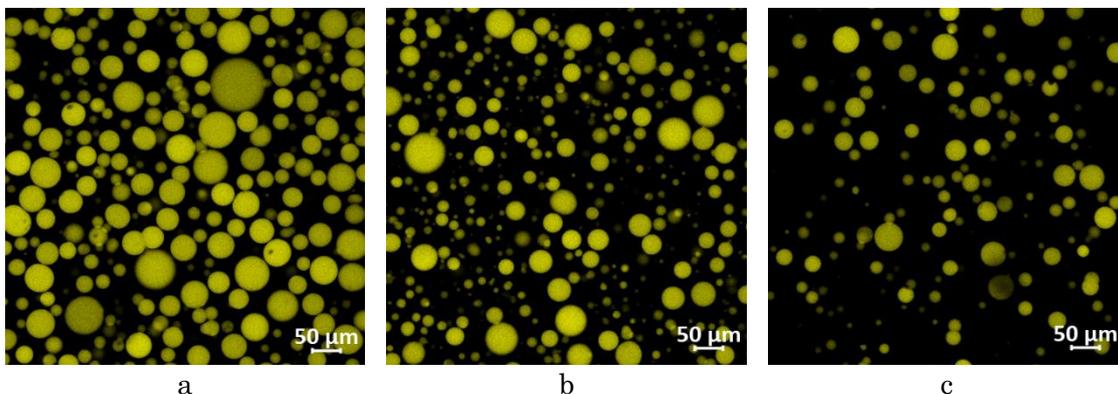


図 5 水溶性蛍光色素カルセインを封入した巨大リポソーム

エマルション調製時のリポソーム内溶液の量を a. 50 μ L \times 1 回、b. 10 μ L \times 5 回、c. 5 μ L \times 10 回として調製した。

②巨大リポソームと RBL-2H3 細胞の融合

巨大リポソームと RBL-2H3 細胞の融合は、Saito らの方法に従って、電場融合装置 (ECFG21, NEPA GENE, Japan) 行った (Saito et al., Introducing Micrometer-Sized Artificial Objects into Live Cells, Plos One e106853 (2014))。

融合を確認するために、RBL-2H3 細胞の核を Hoechst 33342 で、巨大リポソームの膜を RhodB-DHPE で、染色し、巨大リポソーム内の水相をカルセインで、それぞれ蛍光染色した。

蛍光画像は、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM800, Zeiss) を用いて行った。

電場融合では、交流電場をかけて、誘電泳動によって電極間に細胞とリポソームが数珠状につながったパールチェーンを形成させ、その後直流パルス印加して、膜融合を誘導する。

Post fusion として、交流電場をかけ、融合効率の向上と細胞のダメージを回復を図る。

本研究では、主に次の条件を試みた。

交流電場			
条件	電圧(Vrms)	時間(s)	周波数(MHz)
1	30	30	1
2	40	90	1
3	40	30	1
4	40	30	1
5	40	45	1
6	20	60	1

直流パルス					
電圧 (V)	パルス幅 (μ s)	パルス間隔 (s)	回数	減衰率 (%)	極性
350	50	0.5	5	10	+

Post fusion		
電圧 (Vrms)	時間 (s)	減衰
30	10	ON

上表の2の条件で最も巨大リポソームと RBL-2H3 細胞の融合が認められた (図6)。

生細胞と巨大リポソームの融合については確認できたが、融合効率が悪く、ハイブリッド融合系の収率が非常に低い。そのために、今後さらに、融合条件の検討、電極間の距離を変えるなどの融合チャンバー自体の改良が望まれる。

この点が克服されれば、

- ・ハイブリッド融合系の viability の評価
- ・ハイブリッド融合系が RBL-2H3 細胞のもつ、抗原刺激に伴う系内カルシウムイオン濃度の測定
- ・ハイブリッド融合系が RBL-2H3 細胞由来の分泌小胞による分泌能を保持しているかどうかの検証
- ・ハイブリッド融合系が巨大リポソーム由来の微小リポソーム内の内容物の放出能を有しているかの検証

ができるようになり、本ハイブリッド系の有用性を正しく評価できるものと考えられる。

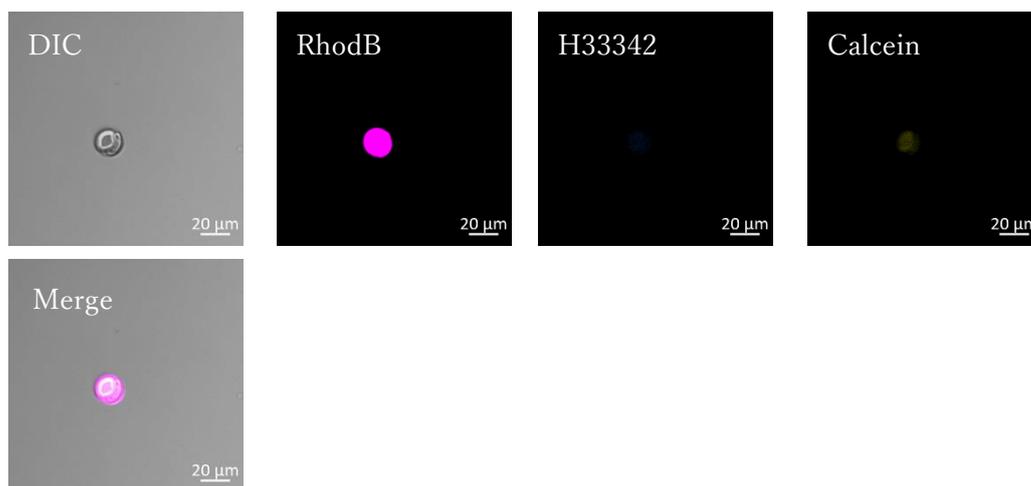


図6 好塩基球と巨大リポソームの融合系の蛍光像

DIC : 微分干渉像、RhodB : 巨大リポソーム膜の蛍光像、H333342 : 好塩基球由来の核の蛍光像
Calce : 巨大リポソームの水相由来の蛍光像、Merge : 重ね合せ画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野ホームページ
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>

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

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