

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870354

研究課題名(和文)オートファジー誘導制御による老化抑制技術の開発

研究課題名(英文) Enhancement of basal level autophagy by gelatin hydrogel nanosphere incorporating rapamycin

研究代表者

松井 誠 (Matsui, Makoto)

京都大学・再生医科学研究所・研究員

研究者番号：40572376

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)：in vitro、およびin vivoにおいてオートファジーを誘導するために、細胞が取り込み可能なナノ粒子(Rapa-GltN NS)を作製した。作製した粒子のサイズを測定したところ、粒径は100-400 nmであった。また、Rapa-GltN NSは細胞に取り込まれ、1週間にわたって細胞内に残存することが観察された。取り込まれたナノ粒子は、リソソーム内に局在していた。Rapa-GltN NSを取り込んだ細胞では、異常タンパク質の蓄積が抑制されていた。さらに、Rapa-GltN NSの投与によって、1週間にわたってオートファジーが誘導されることがわかった。

研究成果の概要(英文)：The objective this study is to evaluate the basal level autophagy induced by gelatin hydrogel nanospheres incorporating rapamycin (Rapa-GltN NSs). The size distribution of Rapa-GltN NSs was mean diameter of 344 ± 51.1 nm. In vitro release tests demonstrated that the rapamycin was released from gelatin hydrogel nanospheres with time. For the degradation of Rapa-GltN NSs, the time profile of rapamycin release was in good correspondence with that of gelatin hydrogel degradation. Furthermore, the phosphorylation of p70 ribosomal S6 kinase was not inhibited in the cells treated with Rapa-GltN NSs. The ubiquitinated proteins in MG132-treated hMSC decreased in hMSC treated with Rapa-GltN NSs. In addition, the injection of Rapa-GltN NSs induced the autophagy at injected site 1, 3, and 7 day after injection, in remarked contrast to non-treatment group. These results indicated that Rapa-GltN NSs is promising to enhance the basal level autophagy in vitro and in vivo.

研究分野：バイオマテリアル、組織工学

キーワード：バイオマテリアル 組織工学 細胞生物学

1. 研究開始当初の背景

老化した細胞は、異常タンパク質や機能異常を起こしたオルガネラが蓄積しやすく、神経変性疾患の発症や発癌などのリスクが高くなっている。近年、異常タンパク質の蓄積など、細胞内浄化作用の破綻が原因となる神経変性疾患や悪性腫瘍に対する予防法や治療法として、オートファジーの誘導制御が注目されているが、応用の可能性は現実的に困難である。報告されている研究として、生理活性物質の投与による一過的で過剰な誘導や、遺伝子改変による恒常的で過剰な誘導に関する研究があるが、必要な場所で、必要な期間、オートファジーの誘導を人為的に制御する技術の研究開発は、国内外を通じて皆無である。その理由として、細胞が正常な生命活動を維持するためには、タンパク質の合成と分解とのバランスが適切にコントロールされていることが重要で、生理活性物質の投与や遺伝子改変による誘導では、過剰な分解を誘導してしまい、合成とのバランスをコントロールすることが困難なためである。培養細胞を用いた実験において、生理活性物質の添加でオートファジーを誘導し、神経変性疾患モデル細胞で、異常タンパク質凝集体の蓄積を抑制できたが、動物モデルに応用するためには、オートファジーの誘導を制御する必要があると考察されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞内のタンパク質分解を人為的に誘導し、細胞の老化抑制技術を開発することである。そのために、細胞が本来もっている分解機構であるオートファジーを誘導する因子(ラパマイシン)を利用して、細胞の老化抑制を試みる。具体的には、細胞内でのラパマイシンの濃度、および作用期間を変化させる徐放化技術を開発し、オートファジーの誘導制御技術を確立する。近年、オートファジーを誘導することで、細胞が老化する原因となる老化ミトコンドリアの蓄積が抑制できることが示唆されている。

申請者らはこれまでに、ゼラチンハイドロゲルを用いることで、生理活性物質を必要な場所で、必要な期間、徐放する技術を報告してきた。そこで、このゼラチンハイドロゲルを用いた徐放技術を応用し、ラパマイシンを、時間的・空間的に、必要量作用させ、基底レベルのオートファジーの誘導を制御し、細胞の老化抑制技術を構築するという着想にいたった。

3. 研究の方法

①ラパマイシン内包ゼラチンハイドロゲルの作製

ラパマイシンをゼラチンハイドロゲルから徐放させるために、疎水性薬物であるラパマイシンを水可溶化した。ラパマイシンを水可溶化するためには、乳酸オリゴマーをゼラチンのアミノ基に導入したゼラチン誘導体を用いてラパマイシンをミセル化した。作製したラパマイシン内包ゼラチンミセルと牛骨由来酸性ゼラチン(等電点 5.0)水溶液とを混合し、液体窒素中に噴霧した。作製したゼラチン微粒子を凍結乾燥した後、160°Cにて熱脱水処理することによって化学架橋したラパマイシン内包ゼラチンハイドロゲル(Rapa-GltN NS)を作製した。得られたRapa-GltN NSを水に再分散後、ホモジナイザーで粉碎し、凍結乾燥した。

②Rapa-GltN NSの性質評価

作製したRapa-GltN NSのサイズは、マルバーン社製ゼータサイザーを用いて測定した。Rapa-GltN NSを蒸留水に分散後、動的光散乱法によってサイズを測定した。また、Rapa-GltN NSの形態は、日立ハイテック社製SU3500走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて観察した。さらに、ハイドロゲルの分解とラパマイシンの放出量とをin vitroにて検討した。すなわち、Rapa-GltN NSをPBSで12時間洗浄後、上清を回収した。さらに、コラゲナーゼ水溶液を添加後、経時的に上清を回収し、280 nmの吸光度を測定することによって、

in vitro におけるハイドロゲルの分解を調べた。同時に、上清に含まれるラパマイシンを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて定量した。

③Rapa-Gltn NS の細胞への取り込み

培養液に分散させた Rapa-Gltn NS をヒト間葉系幹細胞 (hMSC) に添加し、Rapa-Gltn NS の細胞への取り込みを観察した。具体的には、緑色蛍光色素 (FITC) 標識 Rapa-Gltn NS を hMSC に添加した。添加 1 時間後、上清を除去し、細胞を 3 回洗浄した。Life technologies 社製 LysoTrackr® Red DND-99 試薬で細胞を染色し、経時的にカールツァイス社製 LSM 500 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

④Rapa-Gltn NS によるオートファジー誘導評価

Rapa-Gltn NS を取り込んだ細胞内でオートファジーが誘導されるかを評価するために、Rapa-Gltn NS を hMSC に添加し、経時的にマーカータンパク質を観察した。具体的には、Rapa-Gltn NS を hMSC に添加し、1 時間後に 3 回洗浄した。1 日、3 日、および 7 日後に 4%パラホルムアルデヒド水溶液で細胞を固定した。比較対照群として、DMSO に溶解したラパマイシン溶液で刺激した細胞を用意した。固定した細胞は、抗 LC-3 抗体で免疫染色し、オートファゴソームを観察した。

さらに、Rapa-Gltn NS によるオートファジーの誘導を生化学的手法でも観察した。タンパク質を抽出は、Rapa-Gltn NS 刺激後、3 日、および 7 日後に行った。比較対照群として、DMSO に溶解したラパマイシン溶液で刺激した細胞を用意した。抽出したタンパク質は、ウェスタンブロット法にて抗 LC3 抗体、抗リン酸化 p70 リボソーム S6 キナーゼ (pS6K) 抗体、および抗 S6K 抗体を用いてそれぞれのタンパク質を検出した。

⑤Rapa-Gltn NS による細胞内浄化効果評価

Rapa-Gltn NS による細胞内浄化効果の評価するために、プロテアソーム阻害剤 MG132

で刺激して異常タンパク質を蓄積させた hMSC に、Rapa-Gltn NS を作用させた。MG132 と Rapa-Gltn NS とで刺激後 3 日、および 7 日後に細胞を回収し、抗ユビキチン抗体を用いたウェスタンブロット法にて細胞内浄化効果を評価した。

⑥in vivo におけるオートファジー誘導評価

in vivo における Rapa-Gltn NS のオートファジー誘導効果は、正常マウスを用いた小動物実験にて評価した。PBS に分散させた Rapa-Gltn NS を、正常マウスの右下肢に筋肉内注射し、1 日、3 日、および 7 日後に筋肉組織を摘出した。摘出した筋肉組織からタンパク質を抽出し、抗 LC-3 抗体、抗 pS6K 抗体、および抗 S6K 抗体を用いたウェスタンブロット法にてオートファジー誘導効果を評価した。

4. 研究成果

①. Rapa-Gltn NS の性質評価と細胞内への取り込み

図 1A は、SEM によって撮像された Rapa-Gltn NS の形態を示す。ほとんどの Rapa-Gltn NS は、楕円形であることがわかった。図 1B は、DSL による Rapa-Gltn NS のサイズ分布を示す。Rapa-Gltn NS のサイズは、約 344 ± 51.1 nm に分布していた。また、図 2 は、Rapa-Gltn NS の細胞への取り込みを示す。Rapa-Gltn NS が細胞内に取り込まれ、リソソーム内に蓄積していることがわかった。近年、ほとんどの接着系細胞は、粒子径 200~500 nm の粒子をエンドサイトーシスによって取り込むという報告がある。また、他の研究では、真球の粒子より楕円形の粒子の方が細胞に取り込まれやすいという結果を報告している。このことから、細胞に添加された Rapa-Gltn NS は、細胞に取り込まれやすい性質であると考えられる。また、Rapa-Gltn NS は、細胞に取り込まれた後、リソソーム内に蓄積していたことから、エンドサイトーシスによって取り込まれたと考えられる。

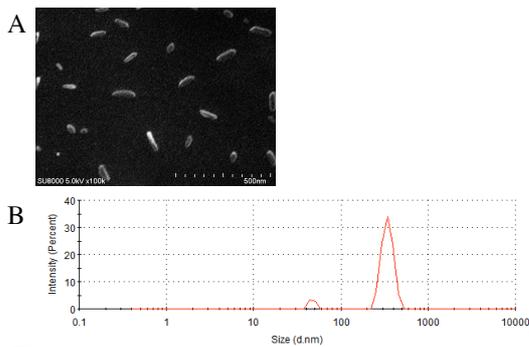


図 1) Rapa-GltN NS の性質評価。

(A) SEM によって撮像された Rapa-GltN NS の形態。

(B) DLS による Rapa-GltN NS のサイズ分布。

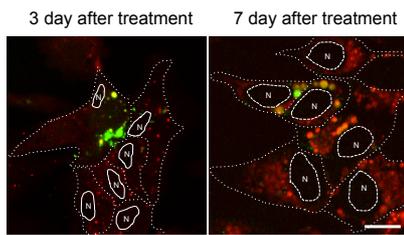


図 2) Rapa-GltN NS の細胞内への取り込み。

Rapa-GltN NS を hMSC に添加して 3 日後 (左)、および 7 日後 (右)。緑: FITC で標識された Rapa-GltN NS。赤: リソソーム。

②. Rapa-GltN NS からのラパマイシン徐放性の評価

Rapa-GltN NS に PBS を添加し、ハイドロゲルから遊離したラパマイシンを定量した。同時に、Rapa-GltN NS をコラゲナーゼにて分解させ、*in vitro* におけるハイドロゲルの分解とハイドロゲルからのラパマイシン徐放とを比較した。図 3 は、ラパマイシンの徐放率と、ゼラチンハイドロゲルの分解率とをプロットしたグラフである。コラゲナーゼを含まない PBS 中でも少量のラパマイシンが放出されるものの、コラゲナーゼ水溶液を添加することにより、ゼラチンハイドロゲルが分解され、それにともないラパマイシンがハイドロゲルから放出されることがわかった。これまでにわれわれは、ゼラチンハイドロゲルからさまざまな薬物を徐放できることを報告してきた。また、ハイドロゲルは、酸性条件下において酸加水分解され、ハイドロゲルの分解にともなって内包した薬物が徐放されることもわかっている。図 2 で示すように、

Rapa-GltN NS は、細胞に取り込まれた後、リソソーム内に蓄積していた。リソソームは、さまざまなタンパク質分解酵素を含んだ低 pH のオルガネラである。このことから、リソソーム内に蓄積した Rapa-GltN NS は、酵素分解、および酸加水分解をうけて分解され、内包されたラパマイシンが細胞内で徐放されていると推測される。

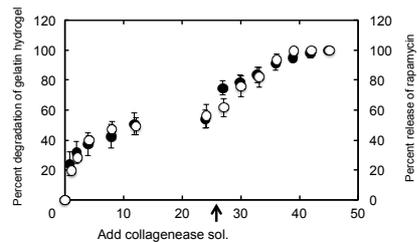


図 3) コラゲナーゼ水溶液中でのゼラチンハイドロゲルの分解とラパマイシンの徐放の評価

(●) *in vitro* におけるコラゲナーゼ水溶液中でのゼラチンハイドロゲルの分解、(○) *in vitro* におけるコラゲナーゼ水溶液中でのラパマイシンの徐放化。矢印: コラゲナーゼ水溶液添加のタイミング。

③. Rapa-GltN NS によるオートファジー誘導評価

図 4 は、Rapa-GltN NS を取り込んだ細胞の抗 LC3 抗体を用いた免疫染色の結果を示す。抗 LC3 抗体陽性ドットの数、Rapa-GltN NS を添加した後 3 日において約 94 ± 25 個/細胞、添加 7 日後において 72 ± 12 個/細胞だった。一方、ラパマイシン溶液を添加した細胞では、3 日後においては 65 ± 15 個/細胞、7 日後においては 26 ± 12 個/細胞だった。図 5 には、オートファジー誘導を生化学的手法で検出した結果を示す。Rapa-GltN NS を添加した細胞では、LC3-II 型のバンドが濃くなっていることから、Rapa-GltN NS の添加した 3 日、および 7 日後ともに、オートファジーが誘導されていることがわかった。さらに、Rapa-GltN NS を添加した細胞では、pS6K のバンドが検出された。一方、ラパマイシン溶液を添加した細胞では、pS6K のバンドは検出されなかった。これらの結果から、Rapa-GltN NS を取り込んだ細胞では、少なくとも 7 日間オートフ

ファジーが誘導され、タンパク質合成を阻害しないことが示された。また、MS132 の添加により蓄積した抗ユビキチン抗体陽性のタンパク質は、Rapa-Gltn NS の添加により減少した。このことは、Rapa-Gltn NS によって誘導されたオートファジーによって細胞内浄化作用が増強されたことを示している。

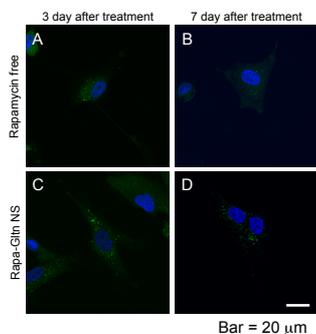


図 4) Rapa-Gltn NS によるオートファジー誘導効果。

hMSC にラパマイシン溶液を添加して 3 日後(A)、および 7 日後。hMSC に Rapa-Gltn NS を添加して 3 日後(C)、および 7 日後(D)。緑：抗 LC3 抗体陽性のオートファゴソーム。青：細胞核。

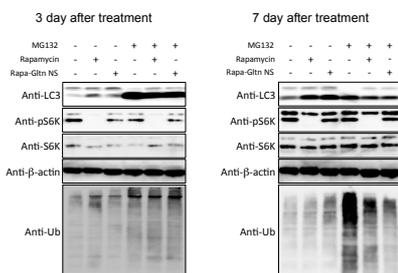


図 5) Rapa-Gltn NS によるオートファジー誘導効果と細胞内浄化効果。

MG132 でプロテアソームを阻害した細胞に Rapa-Gltn NS、もしくはラパマイシン溶液を添加した細胞から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロットを行った。右：Rapa-Gltn NS、もしくはラパマイシン溶液を添加して 3 日後 (左)、および 7 日後 (右)。

上段から、抗 LC3 抗体、抗 pS6K 抗体、抗 S6K 抗体、抗β-アクチン抗体、および抗ユビキチン抗体。

④. in vivo におけるオートファジー誘導評価

図 6 には、正常マウスに Rapa-Gltn NS を注射した際のオートファジー誘導効果を示す。正常マウスの下肢筋肉内に Rapa-Gltn NS、お

よびラパマイシン溶液をそれぞれ注射し、3 日、および 7 日後に筋肉組織を採取した。採取した筋肉組織からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法にて Rapa-Gltn NS によるオートファジー誘導効果を解析した。その結果、Rapa-Gltn NS を注射した群では、LC3-II のバンドが観察された。同時に、Rapa-Gltn NS を注射した群では、pS6K のバンドも検出された。これらのことから、Rapa-Gltn NS は、in vivo においても少なくとも 7 日間オートファジーを誘導でき、タンパク質合成を阻害しないことが示された。

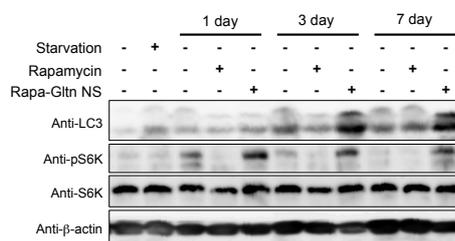


図 6) in vivo におけるオートファジー誘導効果。Rapa-Gltn NS、もしくはラパマイシン溶液を筋肉内注射したマウスより抽出した筋肉組織から抽出したタンパク質を用いてウェスタンブロットを行った。

上段から、抗 LC3 抗体、抗 pS6K 抗体、抗 S6K 抗体、および抗β-アクチン抗体。

⑤. 今後の展望

本研究では、ラパマイシンを細胞内で徐放させ、7 日間にわたってオートファジーを誘導することができた。徐放材料を用いることでオートファジーを誘導制御する技術は国内外を通じて皆無であり、本研究成果は非常にインパクトの大きいものである。また、Rapa-Gltn NS を用いることで、タンパク質合成の阻害が確認されなかったため、ラパマイシンによる副作用の軽減が認められた。近年の報告では、ラパマイシンの長期摂取により寿命が延長するとの報告があるが、雄マウスに長期間投与すると、糖尿病を発症してしまうとの報告もある。しかし、これらの報告は、ラパマイシンを経口で投与しており、全身的に作用させている。これまでに、われわれは、ゼラチンハイドロゲルを用いたさまざまな薬剤の徐放技術を報告してきた。合わせて、

このゼラチンハイドロゲルは、薬剤を局所で作用させることが可能である。マウス左下肢に Rapa-GltN NS を投与し、未投与の右下肢においてオートファジーが誘導されるかも検討した結果、オートファジーは Rapa-GltN NS を投与した左下肢のみで誘導されていた。本研究結果を応用することで、神経変性疾患やがんなどの難治性疾患に対する予防・治療法の開発や、細胞老化の抑制技術の開発が期待できる。得られた結果は、学術論文に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

①松井 誠、永田 純平、田畑 泰彦、「神経細胞の恒常性維持を目指したラパマイシン徐放化ハイドロゲルの開発」、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、2014 年 11 月 18 日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

②永田 純平、松井 誠、田畑 泰彦、「オートファジー活性を制御する生体吸収性微粒子の作製」、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会、2014 年 11 月 18 日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

③松井 誠、永田 純平、田畑 泰彦、「ゼラチンハイドロゲルを用いたラパマイシン細胞内徐放によるオートファジー誘導」、第 30 回日本 DDS 学会大会、2014 年 7 月 30 日、慶応義塾大学薬学部芝共立キャンパス (東京都港区)

④松井 誠、永田 純平、田畑 泰彦、「ラパマイシン内包ゼラチンハイドロゲルによる細胞内活性型インフラマソーム除去効果」、第 35 回日本炎症・再生医学会大会、2014 年 7 月 2 日、万国津梁館 (沖縄県名護市)

⑤松井 誠、永田 純平、田畑 泰彦、「オートファジー誘導制御技術を用いた炎症抑制」、日本再生医療学会、2014 年 3 月 6 日、京都国際会館 (京都府京都市左京区)

⑥永田 純平、松井 誠、田畑 泰彦、「細胞内オートファジー制御を目指したラパマイ

シン細胞内徐放」、2014 年 3 月 5 日、京都国際会館 (京都府京都市左京区)

⑦松井 誠、永田 純平、田畑 泰彦、「細胞内徐放システムを用いたオートファジー活性の制御」、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013 年 11 月 26 日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

⑧永田 純平、松井 誠、田畑 泰彦、「ラパマイシンの細胞内徐放による細胞内オートファジー制御」、第 35 回日本バイオマテリアル学会大会、2013 年 11 月 25 日、タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

⑨松井 誠、齊藤 高志、田畑 泰彦、「ラパマイシン徐放化ゼラチンハイドロゲルによる細胞内浄化システムの構築」、第 34 回日本炎症・再生医学会大会、2013 年 7 月 3 日、京都国際会館 (京都府京都市左京区)

⑩松井 誠、齊藤 高志、田畑 泰彦、「ラパマイシン徐放化ゼラチンハイドロゲルによる神経細胞保護効果」、2013 年 3 月 21 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市西区)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 誠 (Makoto Matsui)

京都大学再生医科学研究所・生体材料学分野
特定研究員

研究者番号: 40572376

(2) 研究分担者

無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

無し ()

研究者番号: