

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460041

研究課題名(和文) 巨大リポソームを用いた標的特異的分泌系の開発とDDS及び間接経口投与系への展開

研究課題名(英文) Development of target-specific secretion system and its application to DDS

研究代表者

平嶋 尚英 (Hirashima, Naohide)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10192296

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞サイズの巨大リポソームに特定の分子を認識することで、エクソサイトーシス様の機構によって分泌されるシステムを構築するために、巨大リポソーム膜にCaチャンネル(Orai-1)を組み込むことを試みた。Orai-1の恒常的な活性化変異体を大腸菌にGST結合分子として発現させ、単離・精製に成功した。しかしながら、リポソームの組成、巨大リポソームの調製法を種々試みたが、十分量のOrai-1を組みこむには至らなかった。

研究成果の概要(英文)： In this study, we tried to develop the exocytosis-like secretion system that secretes intra-vesicular content in response to the recognition of specific molecule. To construct such a system, we tried to introduce Ca channel Orai-1 into a cell-sized giant liposome. Orai-1 was expressed in E.coli and we succeeded in isolation and purification of Orai-1. We tried various ways to reconstitute the channel into the liposome, such as changing phospholipids that form liposomes and changing the preparation methods of giant liposomes. However, we could not reconstitute enough channels into liposomes.

研究分野：生物物理学

キーワード：DDS 人工細胞 リポソーム エクソサイトーシス

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、エクソサイトーシスによる分泌を行う典型的な分泌細胞であるマスト細胞の分泌機構について研究をおこなってきた。その過程で、リボソームを用いた人工膜系によるエクソサイトーシスの研究を並行して行った (Sakiyama and Hirashima, *Inflamm. Res.* **58**, (2009); Tadokoro and Hirashima, *Cell. Immunol.*, **261** (2010); Nagai and Hirashima, *BBA Biomembranes* **1808** (2011)). さらに、より実際の系に近づけるために、直径 10 μm 以上の細胞サイズの巨大リボソーム内に、分泌小胞を模した小リボソームを含有させた人工分泌細胞の構築を行い、Ca イオノフォア刺激による Ca イオン流入によってエクソサイトーシス様の分泌を誘導することに成功した (図 1、Sasai and Hirashima, Artificial exocytotic system that secretes intravesicular contents upon Ca^{2+} influx; *Langmuir* **26**, 14788-14792 (2010))

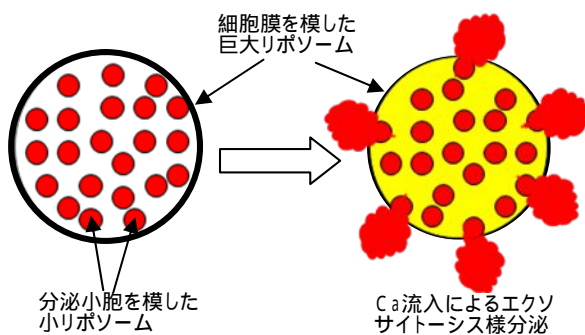


図1 人工エクソサイトーシス系

しかしながらこの系は、Ca イオノフォアによって巨大リボソーム内の Ca イオン濃度を強制的に上げることによって分泌を引き起こすものであって、外界の刺激を認識して分泌する系ではない。この系をドラッグデリバリーシステムへと展開するには、標的分子を認識して初めて分泌する系の構築を行わなければならない。

これまでに、標的を認識することが刺激となり、分泌がトリガーされる人工細胞系は国内外でも報告されていない。

2. 研究の目的

本研究は、申請者らがこれまでに開発した、**細胞サイズの巨大リボソームを用いた人工分泌系に、分子認識能を付与し、標的・特異的に分泌する系を開発する。**そしてこれを**標的・特異的に薬物を分泌する DDS**へと展開する。

本研究により、全く新しいタイプの DDS が開発されるとともに、これによって、さらに、経口投与できない薬物を予めこの標的・特異的分泌系で体内に導入しておくことによって、**必要なタイミングで、経口投与により目的薬物の血中濃度をあげることのできる間接経口投与法の開発**への展開が期待される (図 2)。本研究は機能を有した人工細胞としてだけでなく、DDS や間接経口投与という新しい投与法の開発にもつながり、薬学的応用としても大きな意義をもつ。

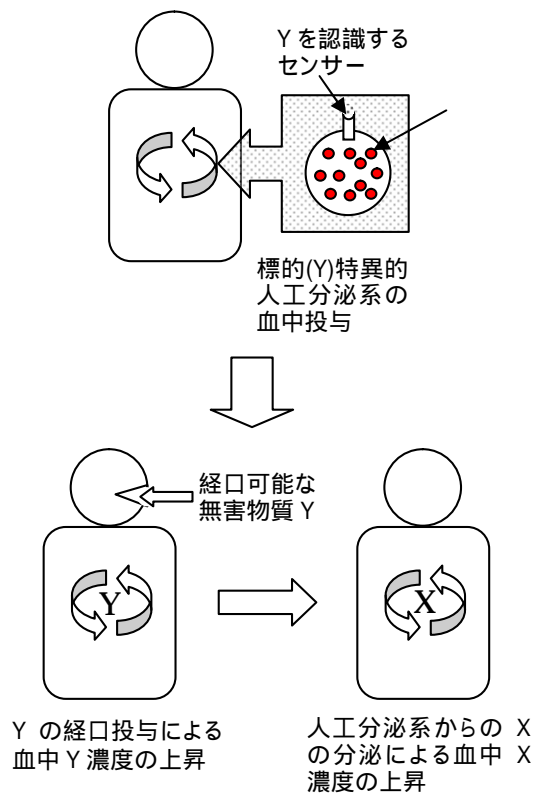


図2 標的・特異的人工分泌系を用いた間接経口投与

3. 研究の方法

標的を特異的に認識して、分泌を行う細胞サイズの人工分泌系を開発する。

申請者らはすでに、リポソームベースの細胞サイズの人工分泌系の開発に成功しており、Ca イオノフォアで、巨大リポソーム内の Ca イオン濃度を上げることで分泌を誘導する系を開発した。本研究ではこの系に分子認識能とその情報を分泌とカップルさせる機構を導入する。そのために、抗体を用いた分子認識機構と Ca チャネルを形成するサブユニットのモノマーを結合させ、分子認識により Ca チャネルが形成され、巨大リポソーム内の Ca イオン濃度が上昇するようにする。まずは、プロトタイプとしてアビジン-ビオチン系を用い、次に抗体の Fab フラグメントを用いる系を構築する。実際に、がん細胞を認識し抗がん剤を分泌する系を構築し、培養がん細胞を用いて評価する。また、経口摂取可能な抗原により、血中のインスリン濃度を上昇させるインスリンの間接経口投与系を構築し、マウスの個体を用いて評価を行う。

4. 研究成果

(1) カルシウムチャネルの精製 カルシウムチャネル Orai-1 の発現と単離・精製

リポソームに組込む Ca チャネルとしては、次の観点から、Orai-1 を選択した。

- ・高発現が期待でき、分子量が小さいこと
- ・単離精製が容易なこと、4量体で Ca チャネルを形成すること
- ・constitutive active な変異体があること
- ・細胞外ループ領域に Lys 残基があり、Fab フラグメントとの conjugation が可能であること
- ・我々が長年研究してきた分泌細胞であるマスト細胞に発現し、開口放出を担っていること

マスト細胞株である RBL-2H3 細胞から RT-PCR により Orai-1 の cDNA および constitutive active mutation (G98D) の cDNA を得た。これらを、GST あるいは His タグつ

きのタンパク質として大腸菌 (BL21 (DE3)) に発現させるために、発現ベクター pGEX および pET28a プラスミドに組み込んだ。

種々の発現条件の検討の結果、His タグでは十分な発現が見られなかったが、GST タグを結合させた Orai-1 の発現と単離精製に成功した (図 3)。

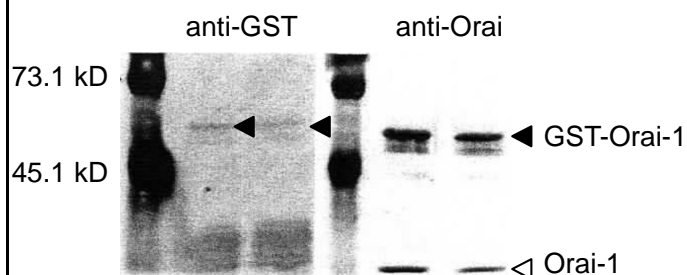


図3 GST-Orai-1 の発現
単離精製した GST-Orai のウエスタンブロット
(左:抗 GST 抗体、右:抗 Orai-1 抗体)

(2) Orai-1 のリポソームへの組込み

細胞サイズのリポソームは、W/O エマルション法により行ない、DOPC:DOPS=4:1 の組成で、直径約 10 μm の細胞サイズの巨大リポソームを調製した (図 4)。

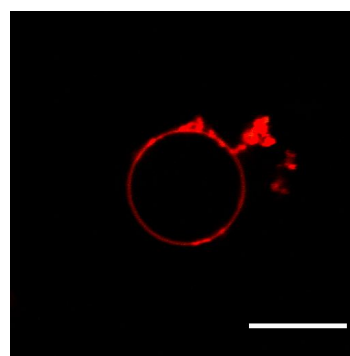


図4 細胞サイズの巨大リポソーム
エマルション法により作成した巨大リポソーム
ローダミン標識 PE でリポソームをラベルした (bar: 10 μm)

単離精製した Orai-1 を巨大リポソームインキュベーションすることにより、Orai-1 のリポソームへの組込みを行なったが、抗 Orai-1 抗体による免疫染色を行なったが、リポソーム膜の染色は観察されなかった。また、リポソームへの組込み効率を上げるた

めに、正電荷をもつリン脂質である DOTAP を用いて巨大リポソームを調製したが、組込み効率の向上は認められなかった。

そこで、W/O エマルション法を見直し、W/O エマルション法で巨大リポソームを調製する際に、予め Orai-1 を油層でリン脂質と混合してリポソームを調製(図5)したが、巨大リポソームは調製できたが、Orai-1 の組込みは観察されなかった。

また、W/O エマルション法で巨大リポソームを調製する際に、水層界面のリン脂質層に Orai-1 を置いてリポソームを調製(図5)したが、巨大リポソームそのものが形成されなかった。

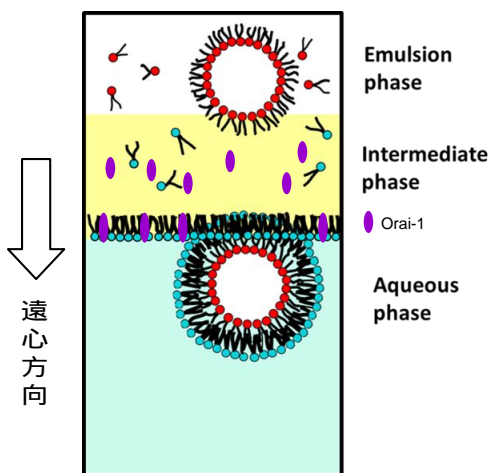


図5 細胞サイズの巨大リポソーム
エマルション法により巨大リポを調製する際、Orai-1 を油層(クリーム色の領域)、あるいは水層界面のリン脂質層におき、遠心する。

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 1 件)

Tadokoro S, Hirashima N, Utsunomiya-Tate N., Effect of Complexin II on Membrane Fusion between Liposomes Containing Mast Cell SNARE Proteins. Biol Pharm Bull. 39, 446-449 (2016).

doi: 10.1248/bpb.b15-00751.

〔学会発表〕(計 1 件)

真野 安由美, GUV liposome と細胞の集合体形成における分子間相互作用と接着形態の解析、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台(宮城県)

〔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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ybu/HP/index/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平嶋 尚英 (HIRASHIMA, Naohide)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：10192296

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()