

生体膜親和性物質の機能解明と医療への応用

笹井 雅夫

平成 25 年 4 月 26 日

略語一覽

AA	Arachidonic acid
BNCT	Boron neutron capture therapy
BND	Boron nano device
BPA	4-Boronophenylalanine
BPB	Bromphenol blue
BSA	Bovine serum albumin
BSH	Mercaptoundecahydrododecaborate
CD	Cluster of differentiation
CHAPS	3-(3-cholamidopropyl) dimethylammonio-1-propanesulphonate
CLSM	Confocal laser microscopy
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNP	Dinitrophenyl
DOPC	Dioleoyl phosphatidylcholine
DOPE	Dioleoyl phosphatidylethanolamine
DOPG	Dioleoyl phosphatidylglycerol
DOPS	Dioleoyl phosphatidylserine
DSBL	Distearoyl boron lipid
ECL	Enhanced chemiluminescence
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	Extracellular regulated kinase (signal-regulated)
FBS	Fetal bovine serum
GTP	Guanosine triphosphate
GUV	Giant unilamellar vesicle
GV	Giant vesicle
HA	Hyaluronic acid
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
IgE	Immunoglobulin E
IgG	Immunoglobulin G
IKK2	Inhibitor of nuclear factor kappa 2
IP ₃	Inositol trisphosphate
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JRR4	Japan research reactor-4

LAT	Linker for activation of T cell
LTC ₄	Leukotriene C ₄
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEL	Mannosylerythritol lipid
MEM	Minimal essential medium
MLV	Multi-lamellar vesicles
NBD	4-Fluoro-7-nitobenzofurazan
NF-κB	Nuclear factor-kappa B
NP-40	Polyoxyethylene(9)octyphenyl ether
PBS	Phosphate buffered saline
PEG2K	Polyethylene glycol 2,000
PIP ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate
PKC	Protein kinase C
PL	Phospholipase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC _γ	Phospholipase C gamma
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RBL-2H3	Rat basophilic leukemia 2H3 cloned cell line
Rho	Rhodamine
rpm	Round per minute
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SM	Sphingomyelin
SNAP	Synaptosomal-associated protein
SNARE	Soluble N-ethyl maleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SRD	Sulforhodamine
SUV	Small unilamellar vesicle
TBS	Tris-buffered saline
TG	Triglyceride
TNF-α	Tumor necrosis factor-alpha
t-SNARE	Target SNARE
VAMP	Vesicle-associated membrane protein
v-SNARE	Vesicle SNARE

目次

第一章 序論	3
1.1 生体膜及び生体膜親和性物質	3
1.2 医療への応用	5
第二章 生体膜親和性物質の機能解明	8
2.1 はじめに	8
2.2 試薬及び実験方法	9
2.2.1 試薬	9
2.2.2 微小リポソームの作製	9
2.2.3 巨大リポソームの作製に用いる脂質薄膜の調製	10
2.2.4 カルシウム指示薬含有巨大リポソームの作製	10
2.2.5 微小リポソーム含有巨大リポソームの作製	10
2.2.6 Cell-tak®コートディッシュの作製	11
2.2.7 Osmolarity gap 状況下での観察	11
2.2.8 共焦点レーザー顕微鏡による画像解析	12
2.3 結果及び考察	13
2.3.1 微小リポソーム含有巨大リポソームの作製	13
2.3.2 巨大リポソームの作製及びカルシウムイオン流入	14
2.3.3 α -hemolysin による巨大リポソーム膜の評価	15
2.3.4 人工開口放出系の作製	16
2.4 小括	25
第三章 生体膜に作用する物質の機能解明	26
3.1 はじめに	26
3.2 試薬及び実験方法	29
3.2.1 試薬	29
3.2.2 MEL の調製	29
3.2.3 細胞培養	29
3.2.4 β -ヘキソサミニダーゼ放出量の定量	29
3.2.5 TNF- α 放出量の定量	30
3.2.6 LTC ₄ 放出量の定量	30
3.2.7 細胞内カルシウムイオン濃度変化の測定法	30
3.2.8 Whole cell lysate の作製	31
3.2.9 リン酸化タンパク質の単離	31
3.2.10 Western Blotting	32

3.2.11	統計処理.....	32
3.3	結果及び考察.....	33
3.3.1	抗原刺激によるエクソサイトーシスに対する MEL の作用.....	33
3.3.2	カルシウムイオノフォアと PKC 活性化剤の共刺激によるエクソサイトーシス に対する MEL の作用	34
3.3.3	抗原刺激による TNF- α 分泌に対する MEL の作用.....	35
3.3.4	抗原刺激による LTC ₄ 分泌に対する MEL の作用.....	36
3.3.5	細胞内カルシウムイオン濃度上昇に対する MEL の作用	38
3.3.6	MAP キナーゼリン酸化に対する MEL の作用	40
3.3.7	SNARE タンパク質リン酸化に対する MEL の作用.....	42
3.4	小括	45
第四章	生体膜の接着機能及び医療への応用.....	46
4.1	はじめに	46
4.2	試薬及び実験方法.....	49
4.2.1	試薬.....	49
4.2.2	細胞.....	49
4.2.3	CD44 接着阻害試験	49
4.2.4	BNCT による細胞致死活性試験	50
4.2.5	胸膜中皮腫担がんマウスの作製.....	50
4.2.6	輸送.....	50
4.2.7	ホウ素製剤の投与	50
4.2.8	中性子照射	51
4.2.9	剖検.....	52
4.2.10	解析.....	52
4.3	結果及び考察.....	53
4.3.1	ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫細胞への接着性.....	53
4.3.2	細胞致死活性試験	53
4.3.3	胸膜中皮腫モデルマウスを用いた試験	55
4.4	小括	58
第五章	総括.....	59
	謝辞	60
	引用文献.....	61

第一章 序論

1.1 生体膜及び生体膜親和性物質

生体膜は、細胞という生体を構成する最小単位を形成する境界の役割を担っており、その構造に関して 1935 年 Danielli と Davson により「細胞膜は脂質の二重層からなり、疎水基（炭化水素）は膜の内側へそれぞれ配向して、外側はタンパク質によって被覆されている」というモデルが提唱された[1]。その後、1972 年に Singer と Nicolson により「生体膜は脂質二重層の中にタンパク質がモザイク状に入り混じっており、タンパク質はその中に浮遊して拡散によって異動している」という流動モザイクモデルが提唱され[2]、生体膜（脂質二重膜及び膜タンパク質）に関する知見が蓄積されてきた。生体膜の役割として、生体を構成する最小単位を形成するという境界の役割だけでなく、シナプス伝達等で観察される受容体による情報の感受や、肝臓細胞におけるグルコースの取込み等で観察される輸送体による選択透過性、能動輸送及び促進拡散や、表面抗原タンパク質による免疫特性の発現等が明らかとされてきた[3][4]。

生体膜の機能解明は精力的に行われ、膜タンパク質を介したシグナル伝達等が生体膜に多くの機能を付すことが明らかにされてきたが、生体膜には、数多くの膜タンパク質が存在することから、膜タンパク質の機能解明においては、系を単純化する目的から人工的な脂質二重膜、又はリポソームと呼ばれる脂質二重膜からなる小胞が用いられてきた。リポソームは 1964 年に Bangham らの発表がはじまりと言われている。Bangham らはレシチンの懸濁液を電子顕微鏡で観察し、ラメラ構造（水相と油相の層状構造）の二分子膜からなる小胞が形成されていることを見出した[5]。以後、リポソームは生体膜モデルとして、膜に作用する物質の作用機序の解明に用いられてきた[6]-[8]。また、外界と隔離された閉鎖空間を作り出す特性から、マイクロリアクターとして利用され[9][10]、さらに脂質の機能修飾が容易に行えることから、遺伝子導入試薬やドラッグデリバリーのキャリアとして応用されている[11][12]。

そして、リポソーム作製法も初期の単純水和法から、electroformation 法[13]、自発形成法等様々な作製法が開発され[14][15]、効率化及び均質化が高められてきた[16]-[18]。また、近年、細胞を単純化したモデルが提唱され、人工細胞の研究が進められてきた。例えば、リポソーム内に DNA を封入してタンパク質発現

系を持つ人工細胞の報告がある[9][10][19]。また、ヘモグロビンを内包した機能性リポソームは人工赤血球として臨床応用に適応されつつある[20]。しかしながら、実際の細胞は内部に様々なオルガネラを持っており、細胞膜で囲まれた細胞内でさらに膜で囲まれた領域（内膜系）が多数存在するにも関わらず、これまでの人工細胞の研究において、機能する内膜系を持つ例は報告されていない。

機能する内膜系の一例として、エクソサイトーシス（開口放出）が挙げられる。エクソサイトーシスは、細胞内の小胞（内膜系）に蓄積された生理活性物質等を、外部からの刺激により細胞外へ放出する現象であり、シナプスにおける神経伝達物質の細胞外への放出や、アレルギー担当細胞であるマスト細胞が、アレルゲンに感作して活性化された際の、炎症性メディエーターの放出等に観察される現象として知られている[21]-[23]。エクソサイトーシスによる細胞内物質の放出には、細胞内の小胞が、細胞膜と膜融合することが必須であり、その膜融合には、生体膜にある数種類の膜タンパク質によって制御されていることが明らかとなっている[24][25]。しかしながら、生体膜の重要な構成要素の一つである脂質二重膜の役割に関しては、解明が進んでいない。

第二章では、膜融合の脂質二重膜の役割を解明するためにリポソームという閉じた系の内部にさらなる閉鎖空間を持ち、それが外界からの刺激に応答し、機能を発揮するという系を確立させることを目的として、エクソサイトーシスを引き起こす人工系（人工エクソサイトーシス系）の作製について検討した。

研究方法として、生体膜を構成するリン脂質を数種類用いて、微小リポソーム（SUVs）含有巨大リポソーム（GUV）を作製し、当該リポソーム（SUVs含有 GUV）を共焦点レーザー顕微鏡下で、カルシウムイオノフォアである ionomycin を用いて GUV 内にカルシウムイオンを流入させ、経時的に画像を取得・評価した。

その結果、SUVs を構成する蛍光脂質（NBD-PE）に由来する蛍光が GUV の輪郭に移行していく経時的な変化を捉えることができた。その現象は、ホスファチジルセリンが GUV の構成脂質に含まれていること及び GUV 内外に一定以上の osmolarity gap が含まれていることが必要であることを確認できた。

第三章では、生体膜に作用する物質の、細胞が有する機能への影響について

検討した。生体膜に作用する物質として、酵母等の菌が生産するバイオサーファクタントに着目した[26]。バイオサーファクタントは、界面活性剤として知られる両親和性（同一分子内に新水性及び疎水性の構造を有する）物質である。当該物質の生体膜への影響、及び生体反応に対する影響を評価した。具体的には、抗原等の外界からの刺激により、細胞内物質を細胞外へ放出することが知られているアレルギー担当細胞であるマスト細胞のエクソサイトーシス（開口放出）に与える影響の有無を評価した。

研究方法としては、マスト細胞（RBL-2H3細胞）を用いて、バイオサーファクタントであるマンノシルエリスリトール脂質（MEL）を添加した際の細胞内カルシウム濃度への影響、炎症性メディエーター放出への影響をカルシウム指示薬による蛍光変化及びELISA法を用いた β -ヘキソサミニダーゼ（炎症性メディエーター放出の際の指標物質として知られている）等の放出量を測定した。

その結果、MELの添加により、細胞内のカルシウム濃度は、非処置の細胞に比べ低くなること並びに β -ヘキソサミニダーゼ、TNF- α 及びLTC₄の放出量が減少することを確認できた。

第四章では、後述する医療への応用を視野に生体膜へ特異的に接着する物質、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸をリガンドとするCD44に関して評価した。

研究方法としては、CD44を発現している胸膜中皮腫細胞に着目し、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸で修飾したリポソーム製剤を用いて、CD44に結合する蛍光標識したヒアルロン酸の接着阻害率を評価した。

その結果、ヒアルロン酸濃度依存的に蛍光標識したヒアルロン酸の胸膜中皮腫細胞への接着を阻害すること、つまりヒアルロン酸及びヒアルロン酸修飾リポソーム製剤が胸膜中皮腫細胞へ接着することを確認できた。

1.2 医療への応用

ヒアルロン酸修飾リポソーム製剤が、CD44を発現する細胞を標的として、接着することが明らかとなったことから、ヒアルロン酸修飾リポソーム製剤を悪性胸膜中皮腫の治療法へ利用することを検討した。

本邦における死亡の原因は、2012年の人口動態統計月報年計（概数）によると、悪性新生物 29.5%、心疾患 15.8%、脳血管疾患 10.3%であり、男女ともに

悪性新生物が一番の原因となっている。また、悪性新生物の中でも、肺がん、大腸がんが増加傾向にある（厚生労働省「平成 22 年人口動態統計月報年計（概数）の概況」<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai10/kekka03.html>）。

悪性胸膜中皮腫は、石綿（アスベスト）曝露が原因とされている。悪性胸膜中皮腫の特徴として、アスベスト曝露から発病までの期間が、一般的に 30 年から 40 年と言われている。そのため、本邦におけるアスベストの輸入量のピークが 1974 年であることを考慮すると、今後、患者数の増加が予想される。悪性胸膜中皮腫細胞の予後は極めて不良であり、1 年生存率は 50%、2 年生存率は 20%と言われている[27]。悪性胸膜中皮腫に対する治療法として、外科手術、放射線療法及び化学療法が存在しているが、有効な治療法が確立されていないため、有効な治療法の開発が望まれている。

そこで、ヒアルロン酸と CD44 との接着性を薬剤のデリバリーシステムとして利用することを検討した。送達する薬剤には、脳や皮膚がんに対して開発が行われているホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) に着目し、ホウ素製剤を使用した。

ホウ素中性子捕捉療法は、細胞内に取り込まれたホウ素 (^{10}B) に、中性子が衝突することで α 線とリチウム (^7Li) に分離し、分離したそれらが細胞致死を引き起こすことを利用する治療法である。分離した α 線やリチウムは細胞致死活性を有するが、効果を発揮する距離はごく短距離であるため、ホウ素 (^{10}B) が細胞内に取り込まれることが必要な条件となる。また、ホウ素 (^{10}B) が存在する空間に中性子が照射されると正常・異常に関わらず周囲に傷害を引き起こす可能性があるため、標的外細胞への致死活性に関しては制御する必要がある。そのため、標的とする細胞内のホウ素濃度を高め、標的外のホウ素濃度を低めることが必要であり、それが実現できた場合は、標的細胞のみを致死できるという治療の実施が可能となる[28][29]。

機能性の高いホウ素製剤は独立行政法人新エネルギー・産業技術創造開発機構 (NEDO) の支援により、筑波大学、学習院大学、日本原子力研究開発機構、ステラケミファ等で開発されている[30]。そして、これらのホウ素製剤は、精力的に開発が進められ、次々に改良されており、本技術の臨床応用が期待されている[31]。

本研究では、ヒアルロン酸で修飾したリポソームにホウ素製剤（ボロカプテイト;BSH）を含有させた、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイス（HA-BND-S）を用いて、胸膜中皮腫細胞への細胞致死活性試験（*in vitro* 試験）及び胸膜中皮腫細胞を胸腔内に接種したマウス（胸膜中皮腫モデルマウス）の生存試験（*in vivo* 試験）を行い、ホウ素中性子捕捉療法（BNCT）効果を検討した。

研究方法として、胸膜中皮腫細胞の培養液中に、ホウ素製剤（HA-BND-S 又は BSH）を添加し、中性子を照射し、その細胞生存率を評価した（*in vitro* 試験）。また、胸膜中皮腫モデルマウスに対して、HA-BND-S を局所投与（BSH に関しては腹腔内投与）し、中性子を照射後、生存期間を評価した（*in vivo* 試験）。

その結果、*in vitro* 試験では、ホウ素製剤に曝露した後に中性子を照射した細胞の細胞生存率はホウ素製剤に曝露しなかった対照群と比べ減少し、ホウ素が取り込まれた細胞の致死が確認できた。また、*in vivo* 試験では、HA-BND-S を投与した群は、観察期間（胸膜中皮腫細胞接種後 28 日目）を終了した段階で、全例が生存していた（対照群は胸膜中皮細胞接種後約 18 日前後で死亡）。また、剖検を行ったところ、5 例中 3 例において、腫瘍を認めなかった。

本論文の結論は、以下の 3 点になる。

1. 生体膜親和性物質の機能解明に活用できる二重の閉鎖空間を有したリポソーム（人工エクソサイトーシス系）を開発した。
2. 生体膜親和性物質の作用として、Ca²⁺と生体膜を構成するリン脂質であるホスファチジルセリンが反応することによる膜融合を示し、マンノシルエリスリトール脂質がエクソサイトーシス関連タンパク質のリン酸化を抑制することにより生体膜を安定化すること（マスト細胞から炎症性メディエーターが放出されることを抑制すること）を確認した。
3. ヒアルロン酸修飾リポソーム製剤が胸膜中皮腫細胞に接着することを確認した。また、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイス（HA-BND-S）が胸膜中皮腫細胞に対して BNCT による細胞致死活性を有すること、及び胸膜中皮腫モデルマウスに対して BNCT による生存期間の延長を確認し、BNCT が胸膜中皮腫の治療に有用となる可能性を示した。

第二章 生体膜親和性物質の機能解明

2.1 はじめに

序論で記述したように生体膜は、脂質二重膜と膜タンパク質から成る。膜タンパク質の種類は多く、その機能も多岐に渡るため、生体膜に影響を与える物質の機能解明には、その多様性ゆえに評価が困難となる。そのため、単純化した試験系を構築することは、生体膜を構成する成分の機能解明に有用である。これまでの研究は、リポソームを、物質を入れる容器、あるいはその中で化学反応を起こさせる反応容器として利用するものであった[9][10]。実際の細胞は内部に様々なオルガネラを持っており、細胞膜で囲まれた細胞内でされに膜で囲まれた領域（内膜系）が多数存在するにも関わらず、これまでの人工細胞の研究において、機能する内膜系を持つ例は報告が少ない。そこで、本研究では、リポソームという閉じた系の内部にされなる閉鎖空間を持ち、それが外界からの刺激に応答し、機能を発揮するという系の確立を試みた。実際には、エクソサイトーシス（開口放出）を引き起こす人工系（人工エクソサイトーシス系）の作製を行った。

エクソサイトーシスは、シナプスにおける神経伝達物質の放出、膵臓β細胞におけるインスリン分泌、マスト細胞活性化に伴う炎症性メディエーターの放出等、生体内の様々な場面に観察される重要な分泌現象である[21]-[23]。したがって、エクソサイトーシスに関する研究は精力的になされ、そのメカニズムが解明されてきた。例えば、神経において、シナプス小胞に VAMP2、形質膜に Syntaxin1-A、SNAP-25 といった SNARE タンパク質群がエクソサイトーシスにおける膜融合を精密に制御することが明らかにされた[24][25]。そして、マスト細胞におけるエクソサイトーシスにおいても VAMP7 や VAMP8、Syntaxin3、SNAP-23 などの SNARE タンパク質群の関与が明らかになっている[32][33]。さらに、シナプスのアクティブゾーンに局在するタンパク質である Munc13-1 がマスト細胞においてもエクソサイトーシスを正に制御すること[34]や、サイトカインの産生に関与する NF-κB 経路の関連タンパク質である IKK2 が SNARE タンパク質の SNAP23 をリン酸化することで開口放出を制御していること[35]など、タンパク質のエクソサイトーシスに関与する役割は大きく解明が進んで

いる。しかしながら、生体膜のもう一つの主な構成要素である膜脂質のエクソサイトーシスにおける関与に関してはあまり研究が進んでいない。その中で、加藤らはエクソサイトーシスにおいて、細胞膜のリン脂質成分が重要な役割を果たしていることを報告している[36]。また、ある脂質を添加することで、膜融合が抑制される可能性[37]の報告や、セカンドメッセンジャーを産生する膜脂質である PIP_2 が、DAG と IP_3 の産生だけでなく、細胞膜から消失することもエクソサイトーシスに関与しているという報告[38]もあり、膜脂質の重要性が示唆されている。本研究で開発した人工エクソサイトーシス系は膜脂質の組成を自由に変えられるため、これを利用してエクソサイトーシスにおける膜脂質の影響を調べることで、エクソサイトーシスのさらなる詳細な制御機構を解明されることを期待できる。

2.2 試薬及び実験方法

2.2.1 試薬

DOPC、cholesterol、 α -hemolysin、カリウムイオノフォアである valinomycin 及び sulforhodamine (SRD) は SIGMA から購入した。DOPE、DOPG、PEG2K-PE は Avanti polar Lipids から購入した。NBD-PE、Rho-PE 及びカルシウム指示薬である oregongreen® 488 BAPTA-5N は Molecular probes から購入した。カルシウムイオノフォアである ionomycin は CALBIO CHEM から購入した。Cell-tak® は BD Bioscience から購入した。Sephadex™ G-50 は Amersham Biosystems から購入した。カルセインは DOJINDO から購入した。リン酸緩衝液 (PBS ; 136.9 mM NaCl、 1.4 mM KCl、 20.4 mM Na_2HPO_4 、 1.5 mM KH_2PO_4 、 pH = 7.4) 及び 0.1 M sucrose 溶液 (0.1 M sucrose、 1 mM EGTA、 pH = 7.0) を用いた。

2.2.2 微小リポソームの作製

なす形フラスコ 15/25 10 mL (SIBATA、Japan) に、クロロホルムに溶解したリン脂質を DOPC / DOPS / DOPE / Cholesterol / NBD-PE = 2000 : 150 : 420 : 400 : 30 (nmol) となるように加えて混合した。アルミホイルで遮光し、ロータリーエバポレーター (EYELA N-N series、Tokyo Rikakikai、Japan) を用いてクロロホルムを減圧除去し、脂質薄膜を形成させた。ここに PBS ($\times 1$)

など、水和水を 3 mL 加え、室温で 60 分間水和させた。その後、バス型ソニケーター (Branson Yamato 1200、Branson) を用いて 5 分間、脂質薄膜を剥離し、多重膜リポソーム (MLVs) を得た。これを 5 mL の茶褐色スクリー管 (Maruemu) に移し、プローブ型ソニケーター (Branson Sonifier 250、Branson) により 10 分間超音波処理を行い、SUVs を調製した。水溶性蛍光色素を含有させるときは水和水を加える際に目的とする濃度となるように調製した。そして、超音波処理後、ゲル濾過分離操作 (Sephadex™ G-50) により精製した。

2.2.3 巨大リポソームの作製に用いる脂質薄膜の調製

内径 12 mm のガラスチューブ (NICHIDEN RIKI GLASS、Japan) に、クロロホルムに溶解したリン脂質を DOPC / DOPG / DOPS / DOPE / PEG2K-PE / Cholesterol = 97 : 98 : 2 : 1 : 3 : 14 (nmol) となるように加え、ボルテックスしながら窒素ガスを噴射し、溶媒を揮発させ脂質薄膜を得た。その後、減圧デシケーター内に 10 時間以上静置させ、残留溶媒を完全に除去した。

2.2.4 カルシウム指示薬含有巨大リポソームの作製

PBS (×1) 0.1 M sucrose を 1 μ L、PBS (×1) 0.2 M sucrose を 0.75 μ L、oregongreen® 488 BAPTA-5N (KOH) を 0.75 μ L それぞれ取り、これらをパラフィルム上で混合し、全量 2.5 μ L として、2.2.3 で調製した脂質薄膜上加えた。これをパラフィルムで密閉し、アルミホイルで遮光しながら、45°C、10 分間水浴上で加温した。その後、水和水を 200 μ L 加え、再びパラフィルムで密閉して 37°C、120 分間静置した。その後、10100×g、室温で 25 分間遠心 (Kubota 1920) して、多重膜ジャイアントベシクル (GVs) を沈殿させ、上清にある GUV を採取した。

2.2.5 微小リポソーム含有巨大リポソームの作製

2.2.2 で調製した SUVs 溶液を Microcon® YM-30 (Millipore) に 500 μ L 加えた。これを 7400×g、4°C、45 分間遠心し濃縮した (Kubota 1920)。濃縮された SUVs は 2800×g、4°C、10 分間の遠心で回収した。この濃縮した SUVs 溶液 2.5 μ L を 2.2.3 で調製した脂質薄膜上加えパラフィルムで密閉した後、アルミホイルで遮光し、45°C、10 分間水浴上で加温した。次に、水和水を 200 μ L

加え、再びパラフィルムで密閉して 37°C、120 分間静置した。その後、10100 ×g、室温で 25 分間遠心して、多重膜 GV_s を沈殿させ、上清にある GUV を採取した。

2.2.6 Cell-tak®コートディッシュの作製

ガラスボトムディッシュ（ホールの内径 10 mm）（MATSUNAMI GLASS、Japan）一枚に対して、製品マニュアルに従い、Cell-tak®を 2 μL、1 mM NaOH を 1 μL、0.1 M NaHCO₃（pH=8.0）を 147 μL をシリコナイズされたエッペンドルフチューブに取り、氷上で混和後、直ちにガラスボトムディッシュのホール部分に滴下した。4°C で 20 分間静置した後、milliQ 水（超純水）を用いて、2 回洗浄した。

2.2.7 Osmolarity gap 状況下での観察

Cell-tak®でコートしたガラスボトムディッシュに、外液 PBS を 126 μL、調製したリポソーム溶液を 20 μL 加え、15 分間静置した。なお、外液 PBS には、GUV 内外に以下で定義する osmolarity gap が生じるよう調製した PBS を用いた。また、各 osmolarity gap の溶媒組成は下表によるものを調製した（表 2.1）。

$$\text{Osmolarity gap} = \frac{\text{GUV 外液の OsM}}{\text{GUV 内液の OsM}}$$

表 2.1 各 osmolarity gap における溶媒組成

Osmolarity gap	GUV 内液	mOsM
2.8	PBS (×1/6.67) + 0.1 M sucrose	46.5 + 100 = 146.5
3.2	PBS (×1/11.0) + 0.1 M sucrose	28.1 + 100 = 128.1
3.6	PBS (×1/22.3) + 0.1 M sucrose	13.9 + 100 = 113.9
4.0	PBS (×1/124) + 0.1 M sucrose	2.5 + 100 = 102.5

※ GUV 外液 : PBS (×1) 0.1 M glucose (310 + 110 = 410 mOsM)

2.2.8 共焦点レーザー顕微鏡による画像解析

Arイオンレーザー 488 nm と He-Neレーザー543 nm を励起光とし、505-530 nm (NBD-PE) 及び 585 nm 以上 (Rho-PE 又は SRD) の蛍光を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) (LSM510 ; ×63 oil NA 1.4、Carl Zeiss) を用いて解析した。Time series は 3 秒間に 1 枚で経時的に画像を取得した。そして、ソフトウェアを用いて蛍光強度変化を定量した。Ca²⁺流入の測定では、GUV に収まる円形領域を計測範囲とした。GUV と SUVs との膜融合を観察時には、計測範囲を下図のように設定した (図 2.1)。3D 画像は Z-stack 機能を用いて、1 枚毎のスライス間隔を 0.5 μm と固定して取得した。

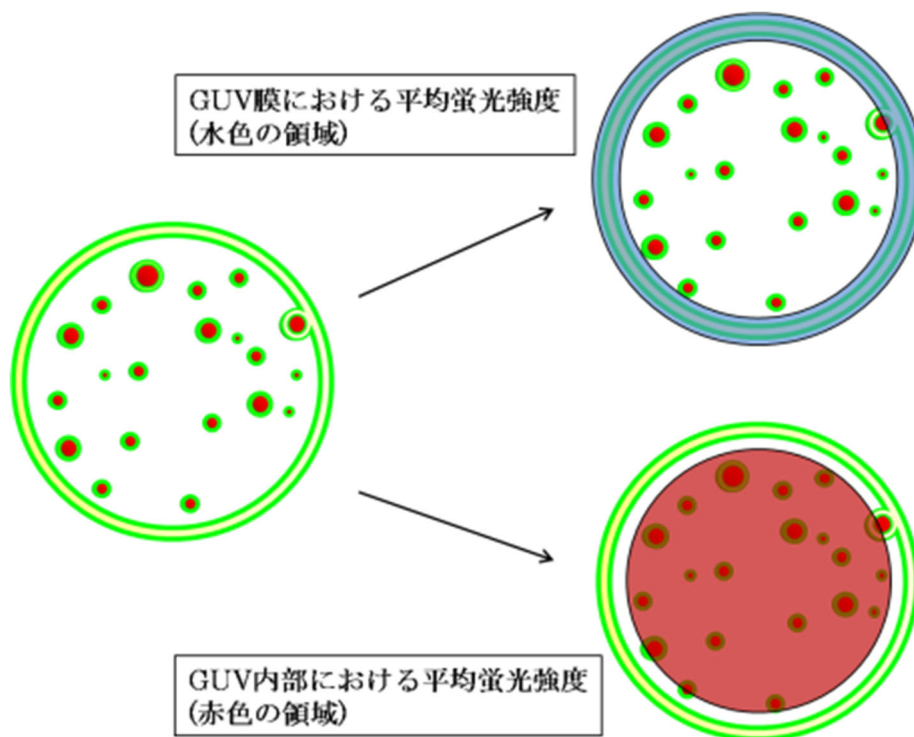


図 2.1 蛍光強度変化の計測範囲

2.3 結果及び考察

2.3.1 微小リポソーム含有巨大リポソームの作製

従来の GUV 作製法において、水和時に加えることで内包させることのできる化合物にはサイズ制限があった[39][40]。したがって、SUV のような微小なりポソームであっても、その大きさは直径約 50 nm から 80 nm の球形であるため、水和時に加えるだけでは GUV に内包させることができなかった。しかしながら、有機溶媒を除去した脂質薄膜を極少量の水溶液で浸潤させる段階である前水和 (pre-hydration) 時に SUVs 溶液を加えることによって、SUVs を GUV に内包させることができた (図 2.2)。

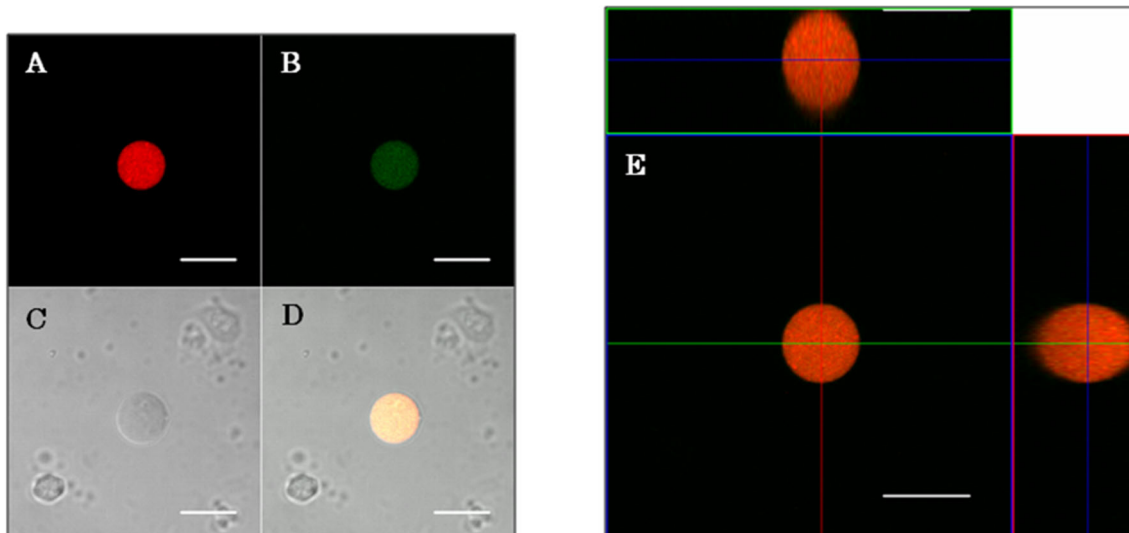


図 2.2 SUVs 含有 GUV

(A) SUVs 内水相である SRD 由来の蛍光画像。(B) SUVs 膜脂質である NBD-PE 由来の蛍光画像。(C) 透過光画像。(D) merge 画像。(E) 3D 画像。
Scale bar = 10 μm

2.3.2 巨大リポソームの作製及びカルシウムイオン流入

次に、マスト細胞におけるエクソサイトーシスには細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇が必須であること、また、PS 含有リポソームに Ca^{2+} を添加することで膜融合が引き起こされること[41]が知られているため、外部からの刺激として、GUV 内の Ca^{2+} 濃度を上昇させることを考えた。そこで、カルシウムイオノフォアである *ionomycin* によって、GUV 内に Ca^{2+} を流入させることができるかを検討した。GUV の作製時に用いる溶媒に Ca^{2+} が存在していると GUV の作製が困難であるため、顕微鏡下で観察した際に Ca^{2+} を加え、 Ca^{2+} を拡散させるためにしばらく静置した後、*ionomycin* を添加した。外液に Ca^{2+} を添加しただけでは、GUV 内の蛍光強度に変化がなかったが、*ionomycin* 添加によって一過性の蛍光強度増加を観察できた (図 2.3)。これは、*ionomycin* によって GUV 外の Ca^{2+} が GUV 内に導入され、GUV 内のカルシウム指示薬 (*oregongreen*[®] 488 BAPTA-5N) と反応したため蛍光が増加したと考えられる。この蛍光強度上昇は外液 Ca^{2+} 非存在下では起こらなかった。また、外液 Ca^{2+} 存在下において、カルシウムイオンではなく、カリウムイオンを透過させるカリウムイオノフォアの *valinomycin* の添加によっても蛍光強度上昇は見られなかった。

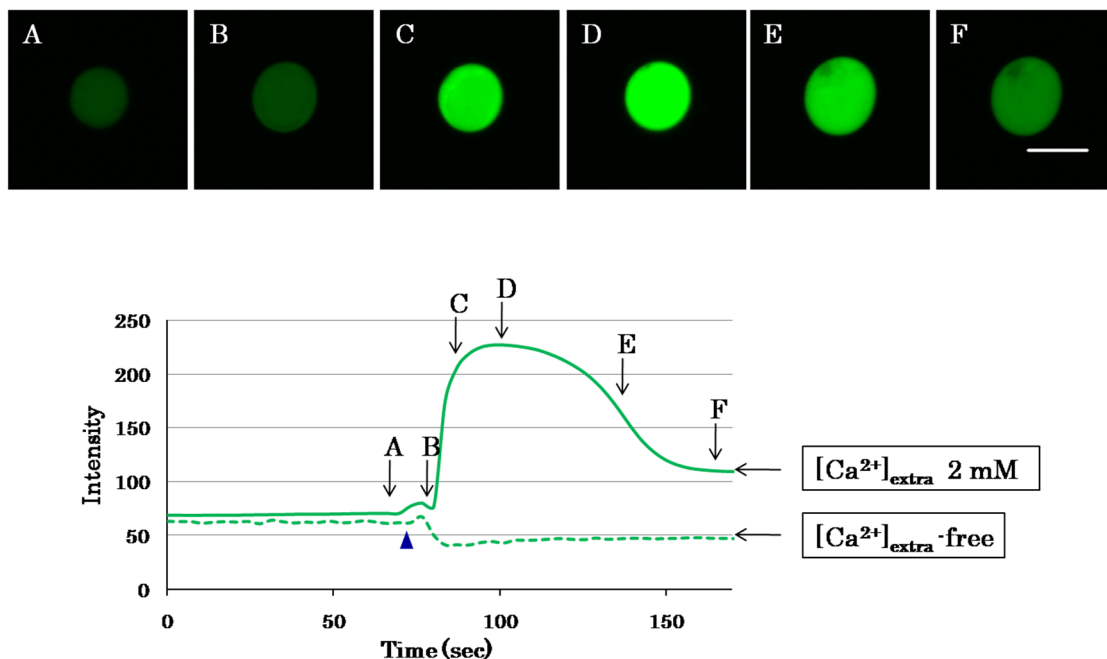


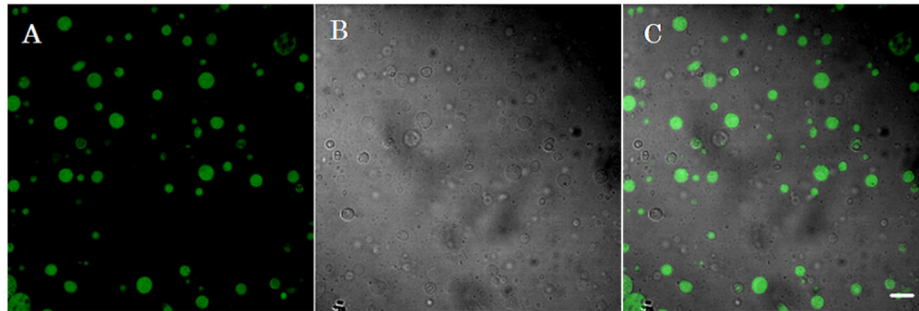
図 2.3 *ionomycin* 刺激による GUV 内への Ca^{2+} 流入

画像 (A) から (F) はそれぞれグラフ上の (A) から (F) の場面での GUV を表している。ionomycin はグラフの矢頭 (▲) で添加した (緑色 ; カルシウム指示薬 (oregongreen® 488 BAPTA-5N) 由来の蛍光)。Scale bar = 10 μ m

2.3.3 α -hemolysin による巨大リポソーム膜の評価

PEG2K-PE を用いた GVs の調製では脂質薄膜間の反発力が大きくなることから、一枚膜になることが知られている[42]。しかしながら、水和法による GUV の作製はバラツキがあり、すべての GV が一枚膜になるわけではない。我々の目的とする人工エクソサイトーシス系は一枚膜でなければ SUVs 内容物の放出が起こらないと考えられる。そこで、PEG2K-PE を用いた水和法による GUV の作製において、どの程度 GUV が作製されるかを、生体膜に作用してポアを形成し、内容物を漏出させるタンパク質として知られている α -hemolysin を用いて評価した[10][43]。その結果、 α -hemolysin 添加前では多くの GV 内に水溶性蛍光色素による蛍光が観察されていたが、 α -hemolysin 添加後、2 割程の GV に形態変化が認められたが、およそ 6 割の GV は形態が変化せずに水溶性蛍光色素の漏出が起こったと考えられる蛍光の消失が観察された (図 2.4)。

α -hemolysin添加前



α -hemolysin添加後

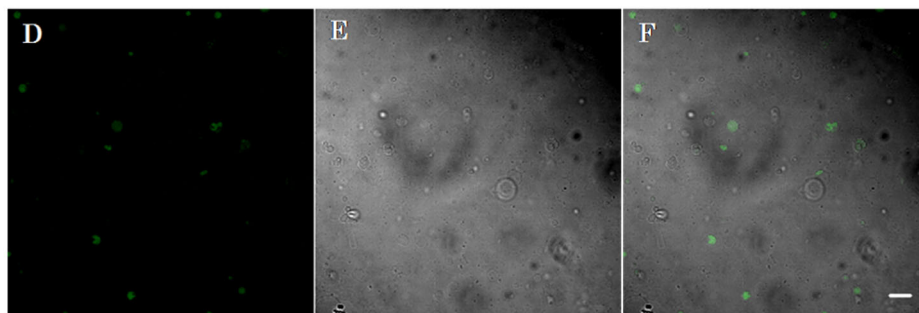


図 2.4 α -hemolysin による GUV 内蛍光色素の漏出

(A) から (C) α -hemolysin 添加前。(A) 水溶性蛍光色素カルセインによる蛍光画像。(B) 透過光画像。(C) merge 画像。(D) から (F) α -hemolysin 添加後。(D) 水溶性蛍光色素カルセインによる蛍光画像。(E) 透過光画像。(F) merge 画像。Scale bar = 10 μ m

2.3.4 人工開口放出系の作製

2.3.4.1 巨大リポソーム内への Ca^{2+} 流入による膜融合の観察

リポソームは水溶液中では安定であり、膜融合を引き起こすためには、向かい合った二つの脂質二重膜のうち、外側の一層同士のみが融合し、内側の層が元のままに保持された状態であるヘミフュージョン化が起こらなければならない。そのため、膜融合には膜間距離を縮める複合体の形成[44]や膜融合ペプチド[45][46]などを必要とする。しかしながら、それらを用いる系では、膜融合ペプチドによる膜融合への影響のため、リポソームの内部が外界からの刺激に応答

して、機能を持つという系のリン脂質の役割を評価する目的を達成することは困難であると考えられる。そこで、本実験では膜融合ペプチドを用いず、 Ca^{2+} 流入のみによって脂質二重膜の不安定化を引き起こし、さらに、GUV内外に osmolarity gap をつけることで溶媒間に発生する力学的エネルギーを膜融合の原動力にすることを考えた (図 2.5) [47]。また、osmolarity gap をつけることにより、GUV がある程度縮小し、その結果、GUV 内に存在する SUVs が濃縮されることで GUV の膜付近へ SUVs を接近させる効果もあったと考えられた [50]。そのため、GUV 膜付近において、SUVs の接触の頻度が高くなる可能性が考えられた。したがって、外液が高張液の中で SUVs 含有 GUV を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。観察中に、外液の Ca^{2+} を最終濃度 2 mM になるように添加し、十分に自然拡散させた後、ionomycin (0.5 mM) を 3.0 μL 加えた。その結果、ionomycin を加えた直後に、GUV 内の NBD と SRD 由来の蛍光強度が減少し、GUV 膜において NBD 由来の蛍光強度が増加した (図 2.6)。これは、SUVs と GUV の膜融合により、SUVs の内容物である SRD が GUV 外に放出され、SUVs の膜脂質である NBD が GUV 膜に拡散したためと考えられた。また GUV の直径が増加したことからも SUVs の融合が引き起こされたことが考えられた。これらの現象は外液 Ca^{2+} 非存在下での ionomycin 刺激を行った場合、及び Ca^{2+} 存在下での valinomycin 刺激を行った場合では見られなかった。

Osmolarity gapによる溶媒の流れ

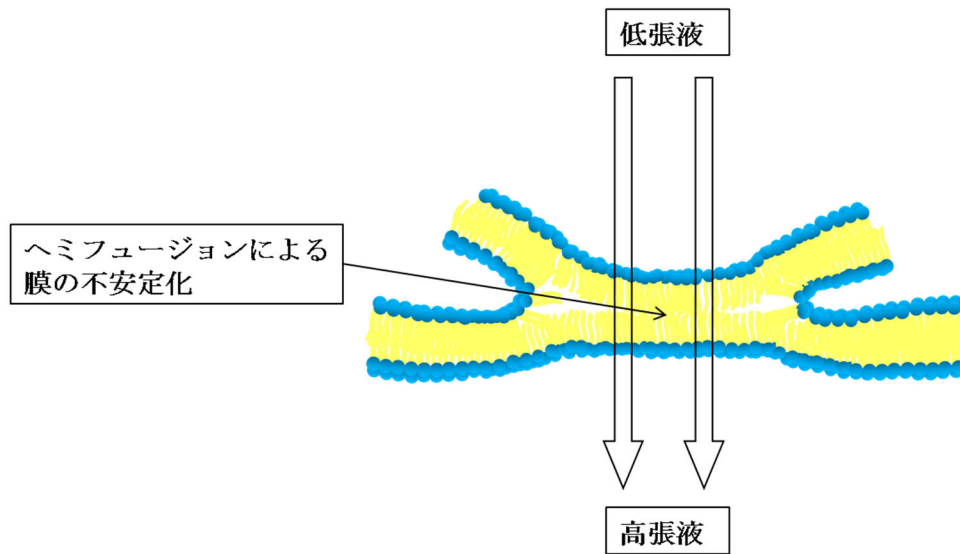


図 2.5 osmolarity gap による膜融合誘起現象のイメージ

ヘミフュージョン化によって二つの脂質二重膜が、一つの脂質二重膜になる領域において高張液側から低張液側への溶媒移動が起こり、それが原動力となって膜融合が引き起こされる際のイメージ。

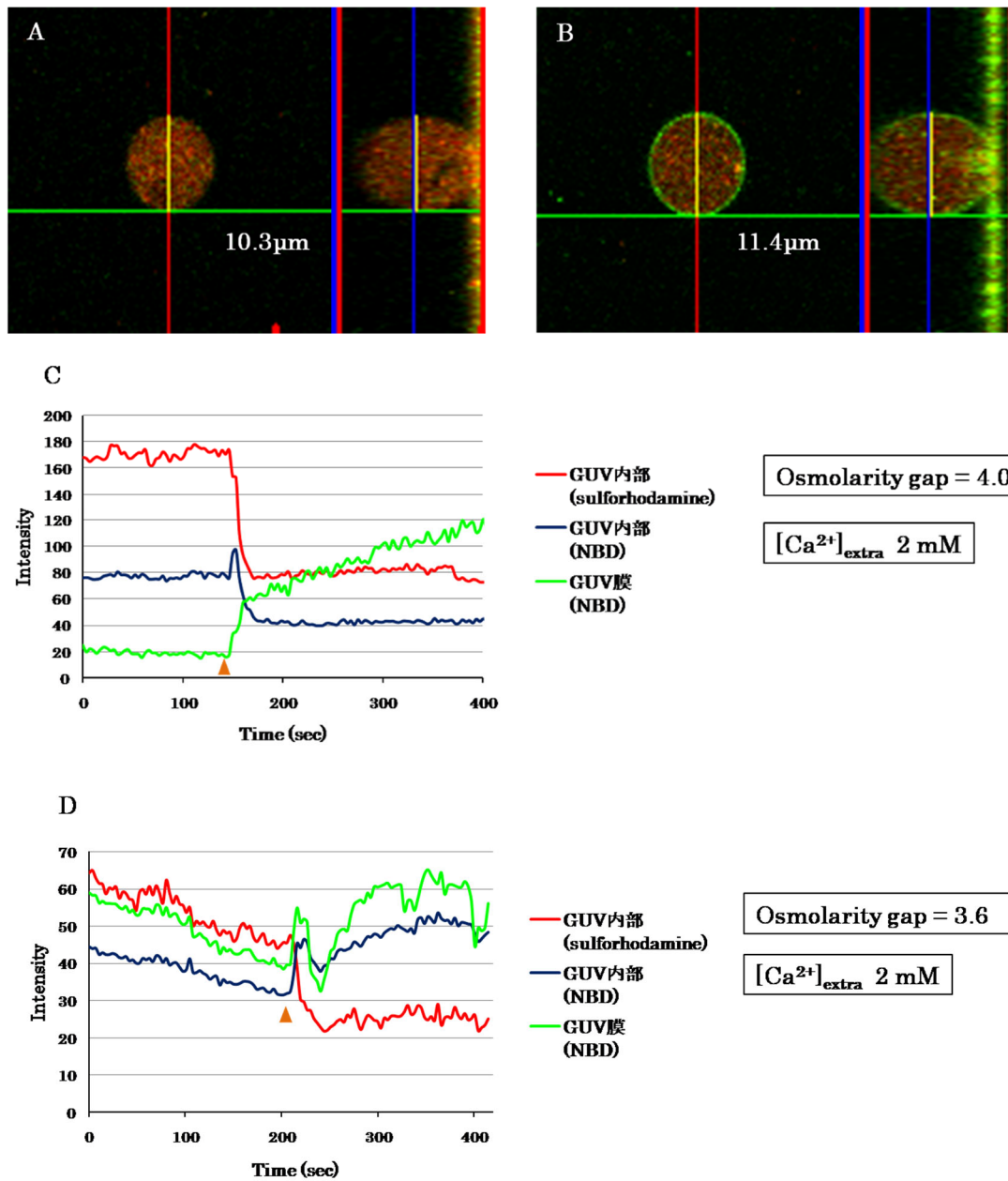


図 2.6 ionomycin により誘導されたエクソサイトーシス

ionomycin 刺激前の蛍光画像 (A) 及び刺激後の蛍光画像 (B) (osmolarity gap = 4.0) (緑色 ; SUVs 膜脂質である NBD-PE 由来の蛍光。赤色 ; SUVs 内容物である SRD 由来の蛍光)。(C)、(D) 時間経過による蛍光強度変化。矢頭 (▲) のところで ionomycin を添加した (osmolarity gap = 4.0 (C)、= 3.6 (D))。

この現象は、GUV内外の osmolarity gap を 3.2、2.8 と低くした場合は観察できなかった (図 2.7)。これらの結果より、この実験系においては osmolarity gap の大きさが膜融合を引き起こすかどうかを決定する因子の一つであることが示唆された。

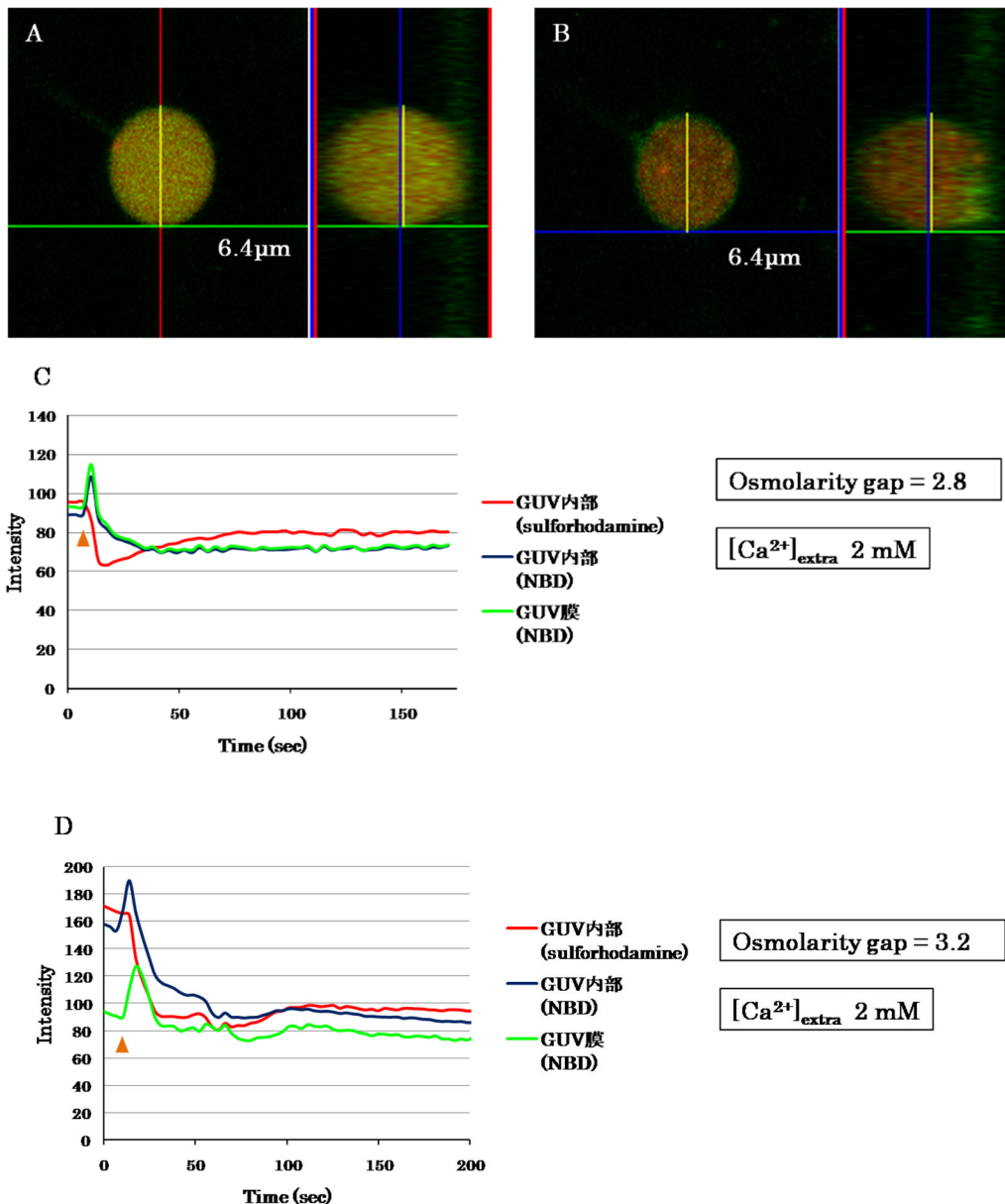


図 2.7 ionomycin 刺激による GUV 蛍光強度変化

ionomycin 刺激前の蛍光画像 (A) 及び刺激後の蛍光画像 (B) (osmolarity gap = 2.8) (緑色 ; SUVs 膜脂質である NBD-PE 由来の蛍光。赤色 ; SUVs 内容物

である SRD 由来の蛍光)。(C)、(D) 時間経過による蛍光強度変化。矢頭 (▲) のところで ionomycin を添加した (osmolarity gap = 2.8 (C)、= 3.2 (D))。

2.3.4.2 Osmolarity gap 及び Ca^{2+} の必要性

生体膜において、膜リン脂質は主に細胞表層 (外層) に多く存在する phosphatidylcholine (PC) や sphingomyelin (SM)、細胞質側層 (内層) に多く存在する phosphatidylserine (PS) や phosphatidylethanolamine (PE) などで非対称分布を示している。その生体膜の非対称性において内層に多く存在する PS は Ca^{2+} と相互作用し、PS 含有リポソームに Ca^{2+} を添加することで膜融合が引き起こされることが知られている[41]。本実験においても、osmolarity gap と Ca^{2+} の必要性を裏付けるために、高張液で調製した SUVs を外液に存在させて Ca^{2+} 添加のみで、低張液で調製した GUV との膜融合が起こるかどうかを確認した。その結果、 Ca^{2+} 添加後、SUVs 由来の蛍光脂質で GUV 膜が染まり、SUVs 内容物を GUV 内に蓄えたりポソームが観察された (図 2.8)。これは、GUV 膜と SUVs が膜融合し、蛍光脂質が拡散した結果、GUV 膜が染色され、かつ SUVs 内容物を GUV 内に放出したと考えられる。そして、この実験系においても GUV 膜と SUVs との接着面における浸透圧差が融合を引き起こす力学的なエネルギーになると考えられる。しかしながら、GUV と SUVs が近接するのは偶発的なので、膜融合したとされる SUVs は非常に少ないと考えられた。

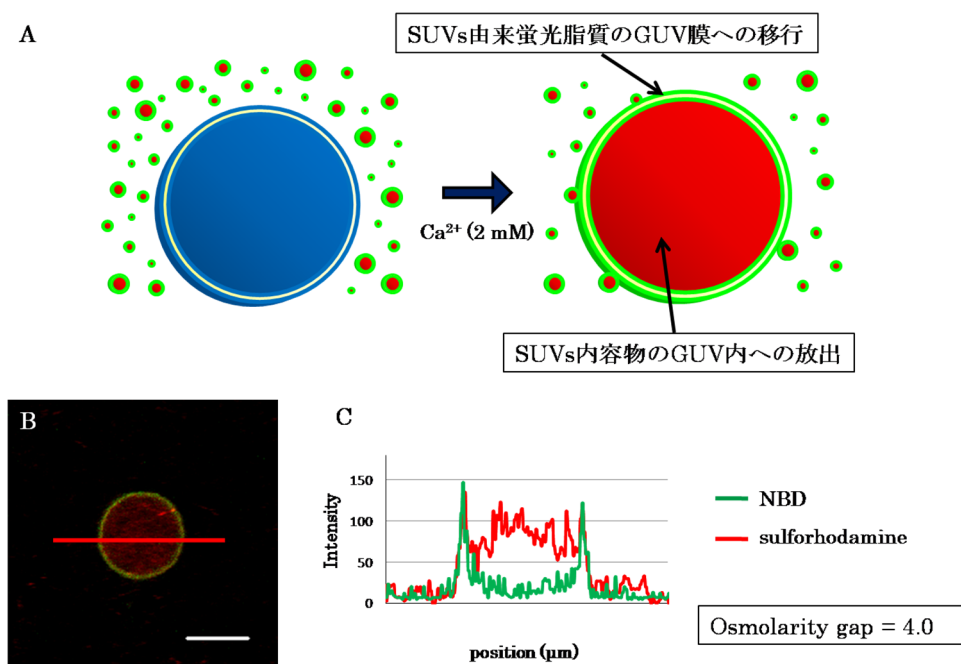


図 2.8 Ca^{2+} 添加による GUV と SUVs の融合

(A) 本実験のスキーム。(B) GUV 画像（緑色；SUVs 膜脂質である NBD-PE 由来の蛍光、赤色；SUVs の内容物である SRD 由来の蛍光）。(C) 画像 (B) 中の赤線における蛍光強度。Scale bar = 5 μm

2.3.4.3 リポソームの脂質組成が与える膜融合の影響

人工的にエクソサイトーシスが誘導できる系を確立できたので、この人工細胞を利用して脂質組成を変化させて膜融合への影響を調べた。

2.3.4.3.1 脂質組成を変化させた GUV および SUVs の調製

基本的な調製法は同様で、GUV や SUVs を下記の表のような脂質組成で調製した (表 2)。DOPS から DOPG に変えることで、 Ca^{2+} との相互作用が強いリポソームから Ca^{2+} との相互作用が弱いリポソームになると考えられ、 Ca^{2+} と脂質の相互作用の影響を調べることを目的とした。また PS (-)、PG (-) としたリポソームでは、負電荷脂質が存在しないため、電氣的に中性なりポソーム

が調製されると考えられた。これらを用いて膜融合と電荷の影響を調べることを目的とした。

GUVの脂質組成 (nmol)	PS (+)	PS (-)
DOPC	96	96
DOPS	2	-
DOPG	98	100
DOPE	1	1
PEG2K-PE	3	3
Cholesterol	14	14

SUVの脂質組成 (nmol)	PS (+)	PG (+)	PS(-), PG (-)
DOPC	2000	2000	2150
DOPS	150	-	-
DOPG	-	150	-
DOPE	420	420	420
NBD-PE	30	30	30
Cholesterol	400	400	400

表 2.2 GUV、SUVs の脂質組成

2.3.4.3.2 各脂質組成における ionomycin 刺激に対する応答

これまでの研究で効率的に SUVs 含有 GUV が観察でき、かつエクソサイトーシスを誘導しやすいことがわかった osmolarity gap = 4.0 において、2 mM Ca²⁺存在下で ionomycin による刺激を行った。GUV の脂質組成が PS (+) かつ、SUVs の脂質組成が PS (+)、または PS (-)、PG (-) の場合において、エクソサイトーシスを引き起こすことができた。また GUV の脂質組成において PS (-) の場合は SUVs の脂質組成に関係なく、エクソサイトーシスは起こらなかった (図 2.9)。この結果から、GUV と SUVs との膜融合において、GUV の PS が重要であることが示唆された。また、SUVs の脂質組成の影響では、PG (+) のとき、つまり SUVs が負電荷を帯び、かつ Ca²⁺との相互作用が弱い場

合では、電荷的な反発力が優勢になり、膜融合が起こる距離まで接近できなかったことが考えられた。一方、PS (-)、PG (-) のリポソームでは osmotic energy が優勢となり膜融合が起こる距離まで接近できたと考えられる結果となった。

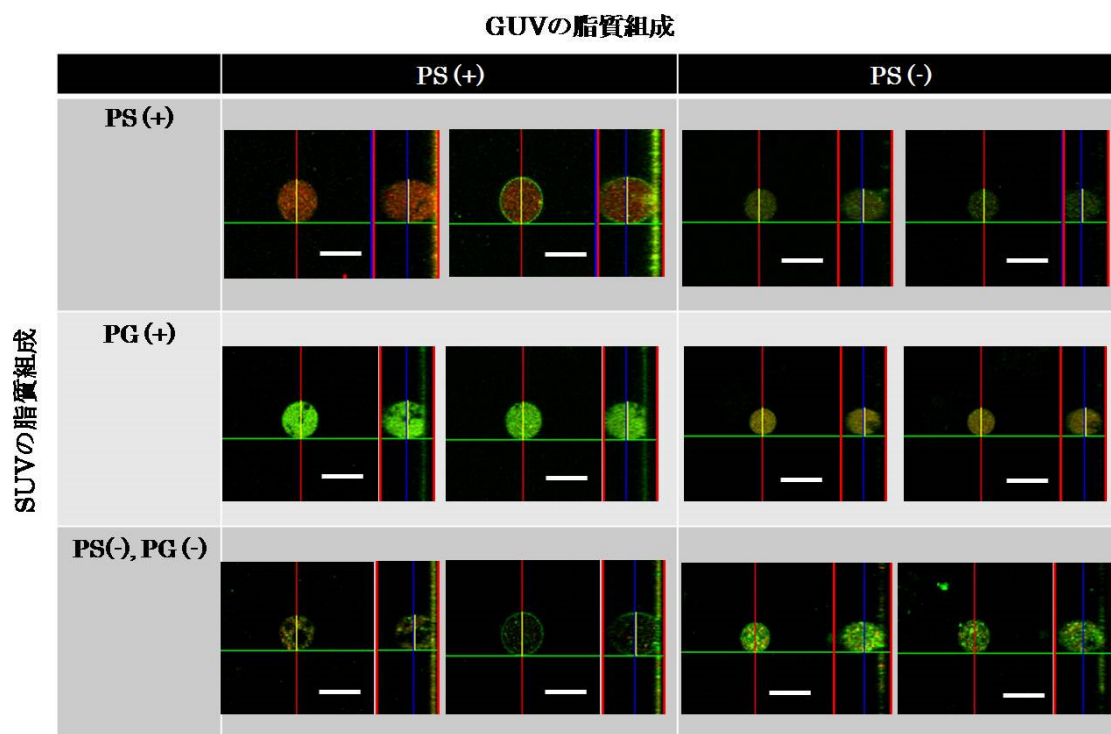


図 2.9 エクトサイトーシス誘導人工細胞における脂質組成の影響

各脂質組成における SUVs 含有 GUV。いずれも左側が ionomycin 刺激前であり、右側が ionomycin 刺激後である（緑色；SUVs 膜脂質である NBD-PE 由来の蛍光、赤色；SUVs 内容物である SRD 由来の蛍光）。Scale bar = 10 μ m

2.4 小括

本章では、生体膜を構成するリン脂質を用いて、人工エクソサイトーシス系を作製に成功し、以下の知見を得た。

1. 脂質による閉鎖空間であるリポソームの内部にさらなる閉鎖空間を持った、多重に閉鎖空間を持つリポソーム (SUVs 含有 **GUV**) を作製した。
2. 閉鎖空間の内部にあるリポソームが、外部からの刺激に対して膜融合を伴いその内容物を外部に放出するというエクソサイトーシスを模した現象により応答するという系が確立できた。また、作製した系においては、カルシウムイオン、ホスファチジルセリン及び **osmolarity gap** が必要であることが示唆された。

第三章 生体膜に作用する物質の機能解明

3.1 はじめに

本研究ではアレルギー担当細胞であるマスト細胞に着目し、マスト細胞が IgE により感作されることで引き起こされるエクソサイトーシスに影響を与える物質の機能解明について検討した。機能解明を行う物質として、微生物が産生する界面活性剤（バイオサーファクタント）の一つであるマンノシルエリスリトール脂質（MEL）に着目し、研究を実施した。

マスト細胞は造血幹細胞に由来される免疫系細胞であり、アレルギー疾患や寄生虫に対する防御反応等、IgE が関与する免疫反応において中心的な役割を担っている[49]。マスト細胞の細胞表面には高親和性 IgE 受容体である FcεRI が発現しており、受容体に結合した IgE が抗原と結合すると受容体の架橋が起こり、マスト細胞が活性化する。その結果、様々なメディエーターの分泌が引き起こされる。例えば、ヒスタミンやセロトニン等、あらかじめ生成され顆粒に貯蔵されていた化学伝達物質がエクソサイトーシスにより放出され、即時型アレルギーを引き起こす。また、糖脂質であるリン脂質（PL）が PLA₂ によりアラキドン酸（AA）として遊離され、AA が様々な酵素により変換されることで分泌される脂質由来炎症性メディエーター（プロスタグランジン、トロンボキササン及びロイコトリエン（LT））も気管支喘息等のアレルギー性疾患に深く関与している[50]。さらには、MAP キナーゼがリン酸化されることで核内へ以降し、転写因子の活性化を引き起こすことで産生されるサイトカインもアレルギー反応の遅延型に関与し、マスト細胞の活性化により生成が誘導され、数時間のうちに分泌される[51]。このようにマスト細胞は活性化により複雑なシグナル伝達を介し、様々な炎症性メディエーターを分泌するアレルギー反応における重要な役割を持つ細胞であると言える。

マスト細胞の活性化は抗原による FcεRI の架橋から始まり、Lyn による FcεRI のリン酸化が起こり、続いて Syk がリン酸化される。その後、Lyn および Syk は Linker for activation of T cells（LAT）を活性化し、活性化 LAT によりリン酸化された PLCγ は PIP₂ を IP₃ と DAG に加水分解する[52]。さらに IP₃ は小胞

体にある IP_3 受容体と結合することで小胞体ストアからのカルシウムイオンの一過性な放出を起こす。さらに小胞体ストアのカルシウムイオンが枯渇すると、細胞外から長期的にカルシウムイオンが流入する[53]。このカルシウムイオンの流入によりエクソサイトーシスや脂質由来のメディエーターおよびサイトカイン産生が引き起こされる[54]。

エクソサイトーシスに繋がる細胞内シグナル伝達の最終段階として、膜融合がある。マスト細胞の分泌顆粒の膜融合には SNARE タンパク質と呼ばれる膜融合タンパク質が関与していることが報告されている[55][56]。SNARE タンパク質は形質膜に存在する t-SNARE (Syntaxin や SNAP) と、小胞膜に存在する v-SNARE (VAMP) に分類される。分泌小胞が形質膜付近まで運ばれることで小胞と膜の距離が近づくことで SNARE 複合体が形成され、小胞膜と形質膜の融合を引き起こしエクソサイトーシスが起こる[23]。

こうして放出される様々な炎症性メディエーターにより即時型アレルギー反応が惹起され、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、蕁麻疹、花粉症等のアレルギー疾患が引き起こされる[57]。これらの疾患の患者数は年々増加しており、そのような社会的背景からアレルギー性疾患の緩和・治療を確立することが早急に望まれている。

バイオサーファクタントは、1960年代に始まった「炭化水素発酵」の研究からはじまっている。ある種の微生物を、炭化水素類を原料として培養すると、その培地中に両親媒性の脂質が生産することがわかっていた。バイオサーファクタントに関する研究が開始されてからしばらくの間は、生分解性及び安全性に優れた「環境適合性界面活性剤」への応用研究が主流であった。しかし、今般、ナノテクノロジー及びライフサイエンスでの研究に用いられることにより、従来の界面活性剤（例えば、アニオン性界面活性剤である脂肪酸ナトリウム（石鹼）、カチオン性界面活性剤であるアルキルトリメチルアンモニウム塩（柔軟剤）等）には見られない高度な分子集合能（自己組織化）及び生理活性（細胞活性化）などを持つことが明らかにされてきた。また、バイオサーファクタントは微生物プロセスによって量産可能な高機能性脂質であり、バイオマスの利用促進や化学物質に由来する環境負荷低減といった社会的要請と相まって、各種技術分野での利用が期待されている[26]。

バイオサーファクタントの生産には、主として大豆油、菜種油等の植物油脂類が用いられる。また、生産菌としては、一般的な酵母菌や細菌（納豆菌）が知られている。特定のバイオサーファクタントを得るためには、まずその生産菌を効率的に取得することが必要である。通常は、特定の選択培地を用いて、自然界から幅広く探索を行う。本研究で用いた MEL は、大豆油を含んだ選択培地を用いて幅広く探索した結果、果皮等に存在する酵母菌（*Pseudozyma antarctica*）により効率良く生産されることが明らかになった[58]。また、MEL には、官能基の組合せにより、MEL-A、MEL-B 及び MEL-C 存在することが明らかとなっている（図 3.1）[58]。

本研究では、バイオサーファクタントである MEL-A 及び MEL-B がマスト細胞のエクソサイトーシスに与える影響を評価することを目的とした。エクソサイトーシスに与える影響の評価は、主にケミカルメディエーターの放出量を測定することで行った。また、その分子機構を解明するため、マスト細胞内へのカルシウムイオンの流入及び膜タンパク質のリン酸化に対する影響を評価した。

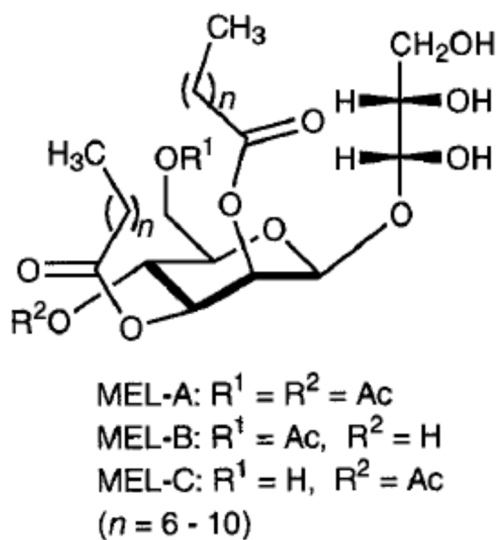


図 3.1 MEL の構造式

3.2 試薬及び実験方法

3.2.1 試薬

本研究で用いた MEL (MEL-A 及び MEL-B) は東洋紡績株式会社より供与された。Fura2-AM は DOJINDO より購入した。Thapsigargin は Wako より購入した。Ionomycin は CALBIOCHEM より購入した。PMA は SIGMA より購入した。イーグル MEM 培地はニッスイから購入した。FBS は GIBCO から購入した。

3.2.2 MEL の調製

MEL をクロロホルムに希釈した後、rotary evaporator で 8 分間減圧乾燥を行い、ナスフラスコ中に MEL film を形成させた。その後、PBS (×1) を加え 1 分間ボルテックスをかけ MEL 懸濁液として用いた。

3.2.3 細胞培養

ラット好塩基球白血病細胞株 RBL-2H3 細胞は、イーグル MEM 培地に L-glutamine (0.29 mg/mL) および NaHCO₃ (2 mg/mL) を混合し、これに FBS を 10% 加えた培地を用いて、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。

3.2.4 β-ヘキソサミニダーゼ放出量の定量

エクソサイトーシスは分泌顆粒内に含まれるβ-hexosaminidase の放出量を測定することによって評価した。前日に 24 well plate に 1.5×10^5 cell/well とし、てまき接着させた細胞を complete HEPES buffer で洗浄した。抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μg/mL) を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした後、complete HEPES buffer で 1 回洗浄した。その後、DNP-BSA (500 ng/mL) による抗原刺激を 20 分間行った。また、IgE 受容体を介さずにエクソサイトーシスを引き起こす場合は、1 μM calcium ionophore、ionomycin と 50 ng/mL PKC 活性化剤、PMA による共刺激を 20 分間行った。

刺激後の上清と substrate solution (2 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-β-D-glucosaminide in 100 mM citrate (pH=4.5)) を混合し、60 分間 37°C でインキュベートし酵素反応させた後、84 mM NaCO₃・83 mM NaHCO₃ 溶液で反応を停止させ、405 nm の吸光度を測定した。

β -hexosaminidase 放出量は界面活性剤である Triton X-100 で処理した細胞中の総 β -hexosaminidase 量を 100%としたときの相対値として示した。

$$\text{Value (\%)} = \frac{\text{O.D.405 (sample)}}{\text{O.D.405 (total } \beta \text{-hexosaminidase)}} \times 100$$

3.2.5 TNF- α 放出量の定量

測定前日に 24 well plate に 2×10^5 cells/well として播種し、接着させた細胞を complete HEPES buffer で洗浄した。抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μ g/mL) を添加し、37°C で 15 分間インキュベートし、complete HEPES buffer で 1 回洗浄した。その後、DNP-BSA (200 ng/mL) を添加したイーグル MEM 培地 (FBS (-)) で抗原刺激を行った。CO₂ インキュベーター内で 4 時間インキュベートした後、培養上清を回収した。TNF- α の放出量は、測定用 ELISA キット (R&D systems #RTA00) のプロトコルに従い定量した。

3.2.6 LTC₄放出量の定量

測定前日に 24 well plate に 2×10^5 cells/well として播種し、接着させた細胞を complete HEPES buffer で洗浄した。抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μ g/mL) を添加し、37°C で 15 分間インキュベートした後、complete HEPES buffer で 1 回洗浄した。その後、DNP-BSA (200 ng/mL) を添加したイーグル MEM 培地 (FBS (-)) で抗原刺激を 20 分間行い、培養上清を回収した。LTC₄ の放出量は測定用 ELISA キット (assay designs #900-070) のプロトコルに従い定量した。

3.2.7 細胞内カルシウムイオン濃度変化の測定法

① 4.5×10^5 cells の細胞懸濁液にカルシウム蛍光指示薬 Fura2-AM (1 μ M) 及び抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μ g/mL) を添加し、37°C で 30 分間処理し、遠心機 (CF16RX II、HITACHI) で 1500 rpm、3 分間遠心した後、上清を吸引し細胞ペレットを HEPES buffer (140 mM NaCl、5 mM KCl、1 mM CaCl₂、0.6 mM MgCl₂、0.1% BSA、0.1 mg/mL sulfinpyrazone、and 10mM HEPES、pH 7.4) で 2 回洗浄した。再度 HEPES buffer に細胞を懸濁し、蛍光分光光度計 (RF-5300PC、Shimadzu) を用いて抗原刺激後の細胞内 Ca²⁺濃度変化を測定

した。

② 4.5×10^5 cells の細胞懸濁液にカルシウム蛍光指示薬 Fura2-AM (1 μ M) 及び抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μ g/mL) (抗原刺激の場合) を添加し、37°C で 30 分間処理し、遠心機 (CF16RX II、HITACHI) で 1500 rpm、3 分間遠心した後、上清を吸引し細胞ペレットを Ca^{2+} free HEPES buffer (140 mM NaCl、5 mM KCl、0.6 mM MgCl_2 、0.1% BSA、0.1 mg/mL sulfinpyrazone、and 10mM HEPES、pH 7.4) で 2 回洗浄した。再度 Ca^{2+} free HEPES buffer に細胞を懸濁し、蛍光分光光度計 (RF-5300PC、Shimadzu) を用いて抗原または thapsigargin (TG) 刺激を行い、その後のカルシウム添加による細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を測定した。

細胞内 Ca^{2+} 濃度変化は、Fura2-AM の 340 nm と 360 nm で励起した際の 500 nm の蛍光を経時的に測定し、その蛍光強度比 (F340/F360) として示した。

3.2.8 Whole cell lysate の作製

前日に 60 mm dish にまき接着させた細胞液を HEPES buffer で洗浄した。抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μ g/mL) を添加し 37°C で 15 分間インキュベートした。その後、HEPES buffer で洗浄した後、DNP-BSA (200 ng/mL) による抗原刺激を 5 分間行った。刺激後、反応を冷 TBS (137 mM NaCl、2.7 mM KCl、25mM Tris (pH=7.4)) で停止後、細胞を回収した。回収した細胞を NP-40 Lysis buffer (20 mM HEPES (pH=7.9)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、1 mM dithiothreitol、10 mM Na_3VO_4 、10% glycerol、0.1% NP-40) により 30 分間氷上で可溶化した。遠心機 (CF16RX II、HITACHI) で 15,000 rpm、4°C で 20 分間遠心した後、上清を回収し等量の 2× sample buffer (0.125 M Tris (pH=6.8)、10% 2-Mercaptoethanol、4% SDS、10% sucrose、0.01% BPB) を加え 5 分間ボイルした。これを Whole cell lysate とした。

3.2.9 リン酸化タンパク質の単離

細胞ライセートからのリン酸化タンパク質の単離は PhosphoProtein Purification Kit (QIAGEN #37101) により行った。RBL-2H3 細胞 (1×10^7 cells) を HEPES buffer で洗浄し、抗 DNP-IgE 抗体 (1.6 μ g/mL) を添加し 37°C で 15 分間インキュベートした。その後、HEPES buffer で洗浄した後、DNP-BSA

(200 ng/mL) による抗原刺激を 5 分間行った。刺激後、反応を冷 TBS で停止させ細胞を回収した。回収した細胞は 0.25% CHAPS を含む 5 mL lysis buffer に懸濁し 30 分間氷上で可溶化した。これを遠心機 (CF16RX II、HITACHI) で $10,000 \times g$ 4°C で 30 分間遠心し、得られた上清はタンパク質濃度が 0.1 mg/mL になるように調整した。この上清を平衡化した PhosphoProtein Purification Column にアプライし、非リン酸化タンパク質を含む flow-through 画分を得た。6 mL lysis buffer で洗浄した後、column に結合したリン酸化タンパク質を 0.25% CHAPS を含む 2.5 mL elution buffer で溶出し、リン酸化タンパク質を含む elute 画分を得た。得られた flow-through 画分と elute 画分は、Nanosep Ultrafiltration column を用いて濃縮した。

3.2.10 Western Blotting

3.2.8、3.2.9 で得られた cell lysate を SDS-PAGE で分離し、PVDF 膜 (Bio Rad) に転写した。0.5% casein in TBS でブロッキングし、0.1% Tween 20 in TBS で洗浄した後、一次抗体を 4°C 、over night で反応させた。一次抗体としては以下のものを用いた。抗リン酸化 ERK 抗体 (dilution 1:1000 ; Cell signaling #4370)、抗リン酸化 p38 抗体 (dilution 1:1000 ; cell signaling #4511)、抗リン酸化 JNK 抗体 (dilution 1:250 ; BD Transduction Laboratories#612540)、抗 ERK 抗体 (dilution 1:1000 ; cell signaling#9102)、抗 p38 抗体 (dilution 1:4000 ; BD Transduction Laboratories#612168)、抗 JNK 抗体 (dilution 1: 250 ; BD Transduction Laboratories#610627)、抗 Syntaxin4 (dilution 1:1000 ; Synaptic Systems#110 042)、抗 VAMP8 (dilution 1:1000 ; Synaptic Systems#104 302)、抗 SNAP23 (dilution 1: 1000 ; Synaptic Systems#111 202)。0.1% Tween 20 in TBS で洗浄した後、二次抗体、Peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (dilution 1:1000 ; Santa Cruz biotechnology#sc-2004) または Peroxidase 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (dilution 1:1000 ; MBL#330) を 1 時間室温で反応させた。0.1% Tween 20 in TBS で洗浄した後、ECL (GE Healthcare) を用いて LAS3000 mini (Fuji Film) でバンドを検出した。

3.2.11 統計処理

有意差の検定は Student の t 検定を行った。

3.3 結果及び考察

3.3.1 抗原刺激によるエクソサイトーシスに対する MEL の作用

マスト細胞は分泌顆粒を備えており、分泌顆粒中にはヒスタミンなどのケミカルメディエーターが蓄えられている。マスト細胞が活性化されることで、分泌顆粒内のケミカルメディエーターの放出が起こる（エクソサイトーシス）。エクソサイトーシスはアレルギー疾患を惹起する主な要因である。MEL のアレルギー反応に対する作用を評価するためにエクソサイトーシスに対する作用を検討した。

7.5、15、30 μM の各濃度の MEL で RBL を前処理し抗原刺激を行ったところ、開口放出は MEL の濃度依存的に抑制されることが判明した。高濃度の MEL では 5 割程度開口放出を抑制した (図 3.2 A)。また、図に示した時間において、高濃度の MEL を前処理することで MEL の抑制は比較的短時間で効果を示すことが判明した (図 3.2 B)。

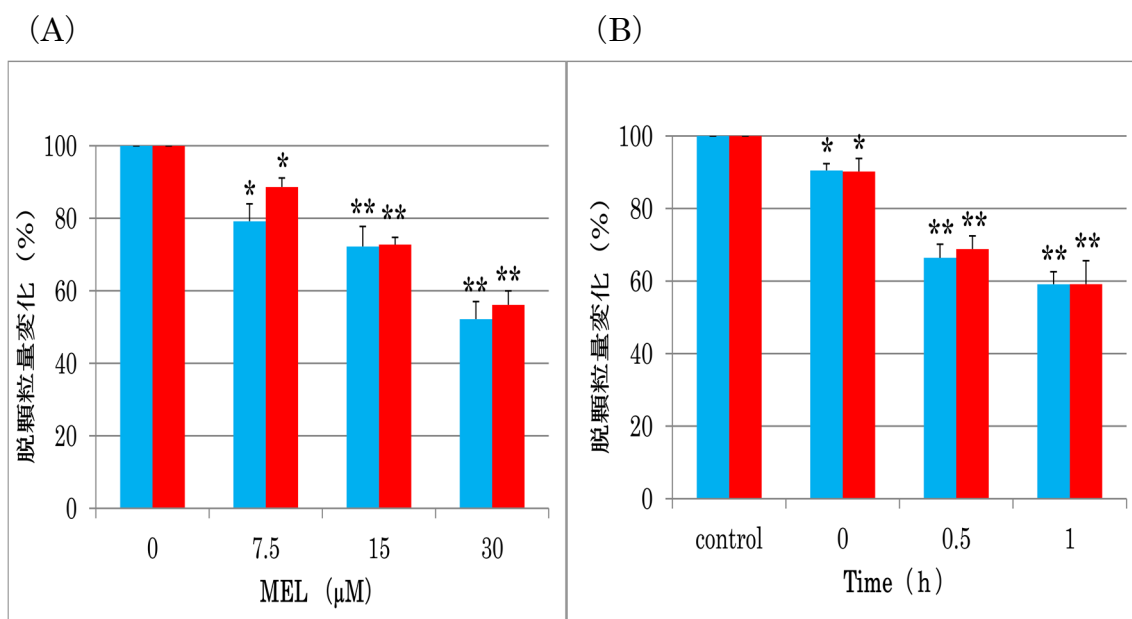


図 3.2 抗原刺激時のエクソサイトーシスにおける MEL (blue : MEL-A、red : MEL-B) の抑制効果

(A)各濃度の MEL を 8 時間前処理した後、IgE 抗体感作 15 分および DNP-BSA 刺激を 20 分間行った。(MEL-A : 0 μM (n=9)、7.5 μM (n=5)、15 μM (n=6)、30 μM (n=8)、MEL-B : 0 μM (n=9)、7.5 μM (n=5)、15 μM (n=5)、30 μM

(n=8)) (error bar=s.e.m)

(B) 30 μ M の MEL を示した時間前処理した後、IgE 抗体感作 15 分および DNP-BSA 刺激を 20 分間行った。0h は DNP-BSA と MEL の同時刺激を示す。

(MEL-A : control (n=25)、0 h (n=3)、0.5 h (n=12)、1 h (n=10)、MEL-B : control (n=17)、0 h (n=5)、0.5 h (n=7)、1 h (n=9))

エクソサイトーシスとして、刺激 20 分後の上清に含まれる β -hexosaminidase の量を測定した。さらに、MEL 未処理のときの放出量を 100%として結果を示した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ vs MEL (-)

3.3.2 カルシウムイオノフォアと PKC 活性化剤の共刺激によるエクソサイトーシスに対する MEL の作用

マスト細胞が抗原刺激により活性化されると、PLC の活性化に伴い PIP_2 が IP_3 と DAG に分解される。 IP_3 は小胞体ストアからのカルシウムイオンの放出とそれに伴う細胞外からのカルシウムイオン流入を引き起こし、DAG は PKC を活性化することが知られており、この二つの経路の活性化はエクソサイトーシスに大きく関与している。

MEL はカルシウムイオノフォアと PKC 活性化剤の共刺激によるエクソサイトーシスを濃度依存的に抑制した。高濃度の MEL では約 6 割エクソサイトーシスを抑制した(図 3.3 A)。示された時間高濃度の MEL を前処理することで MEL の抑制は比較的短時間で効果を示すことが判明した(図 3.3 B)。その抑制効果は抗原刺激によるエクソサイトーシスの抑制より高く、MEL のエクソサイトーシス抑制効果は PKC 活性化と細胞内カルシウムイオン濃度上昇により引き起こされるエクソサイトーシスの経路に強く関与していると示唆された。

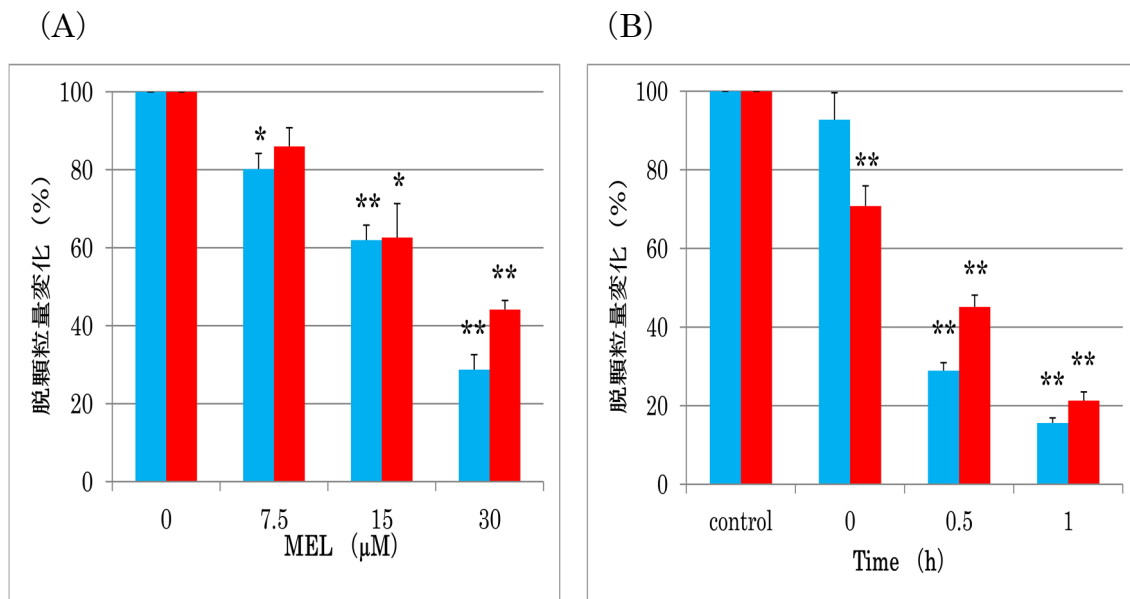


図 3.3 カルシウムイオノフォアと PKC 活性化剤の共刺激によるエクソサイトーシスにおける MEL (blue : MEL-A、red : MEL-B) の抑制効果

(A) 各濃度の MEL を 8 時間前処理した後、PMA (50 ng/mL) 及び ionomycin (1 μM) による刺激を 20 分間行った。(MEL-A (n=5)、MEL-B : 0 μM (n=4)、7.5 μM (n=4)、15 μM (n=4)、30 μM (n=3))

(B) 30 μM の MEL を示した時間前処理した後、PMA (50 ng/mL) 及び ionomycin (1 μM) による刺激を 20 分間行った。0h は DNP-BSA と MEL の同時刺激を示す (MEL-A (n=4)、MEL-B : 0 μM (n=7)、7.5 μM (n=5)、15 μM (n=7)、30 μM (n=7))。

エクソサイトーシスとして、刺激 20 分後の上清に含まれるβ-hexosaminidase の量を測定した。さらに、MEL 未処理のときの放出量を 100%として結果を示した。*p < 0.05、**p < 0.005 vs MEL (-) (error bar=s.e.m)

3.3.3 抗原刺激による TNF-α分泌に対する MEL の作用

マスト細胞の活性化に伴い、核内の転写因子が活性化されることで数時間の内に分泌されるサイトカインはアレルギー反応の遅発相に参与している。MEL

のアレルギー反応に対する作用を評価するためサイトカイン分泌に対する作用を検討した。サイトカインとしてはマスト細胞が産生する代表的な炎症性サイトカインである TNF- α について調べた。

7.5、15、30 μM の各濃度の MEL で RBL-2H3 細胞を前処理し抗原刺激を行ったところ、TNF- α の分泌量は MEL の濃度依存的に抑制されることが判明した。高濃度の MEL では 4 割程度 TNF- α の分泌量を抑制した (図 3.4)。

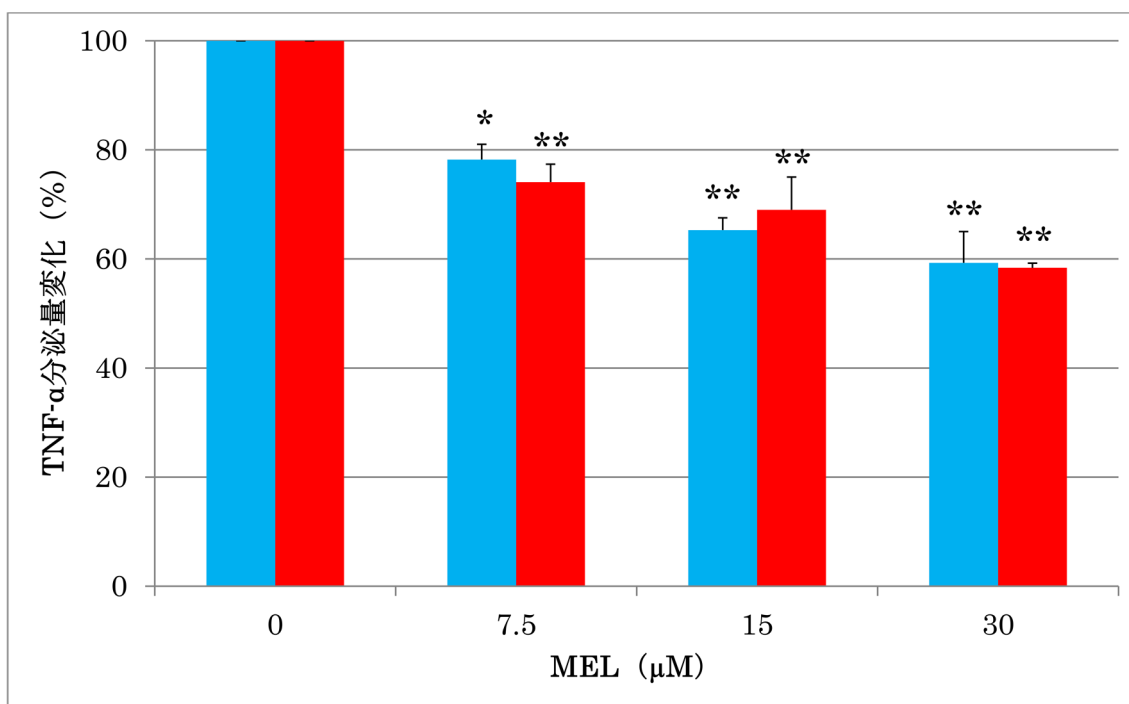


図 3.4 抗原刺激時の TNF- α 分泌における MEL (blue: MEL-A、red: MEL-B) の抑制効果

各濃度の MEL を 8 時間前処理した後、IgE 抗体感作 15 分および DNP-BSA 刺激を 4 時間行ったときの上清に含まれる濃度を測定した。さらに、MEL 未処理のときの TNF- α 分泌量を 100% として結果を示した。(MEL-A : 0 μM (n=4)、7.5 μM (n=3)、15 μM (n=3)、30 μM (n=4)、MEL-B : (n=5)) *p<0.05、**p<0.005 vs MEL (-) (error bar=s.e.m)

3.3.4 抗原刺激による LTC₄ 分泌に対する MEL の作用

マスト細胞の活性化に伴い、細胞膜リン脂質が PLA₂ により放出されることで

生成されるアラキドン酸を原料とした様々な脂質メディエーターは炎症反応において重要な役割を示す物質である。その中で LTC₄ は気管支収縮や血管透過性亢進により気管支喘息等のアレルギー疾患に関与する。MEL のアレルギー反応に対する作用を評価するため LTC₄ 分泌に対する作用を検討した。

7.5、15、30 μM の各濃度の MEL で細胞を前処理し抗原刺激を行ったところ、LTC₄ の分泌量は MEL の濃度依存的に抑制されることが判明した。高濃度の MEL では 8 割程度 LTC₄ の分泌量を抑制した (図 3.5)。

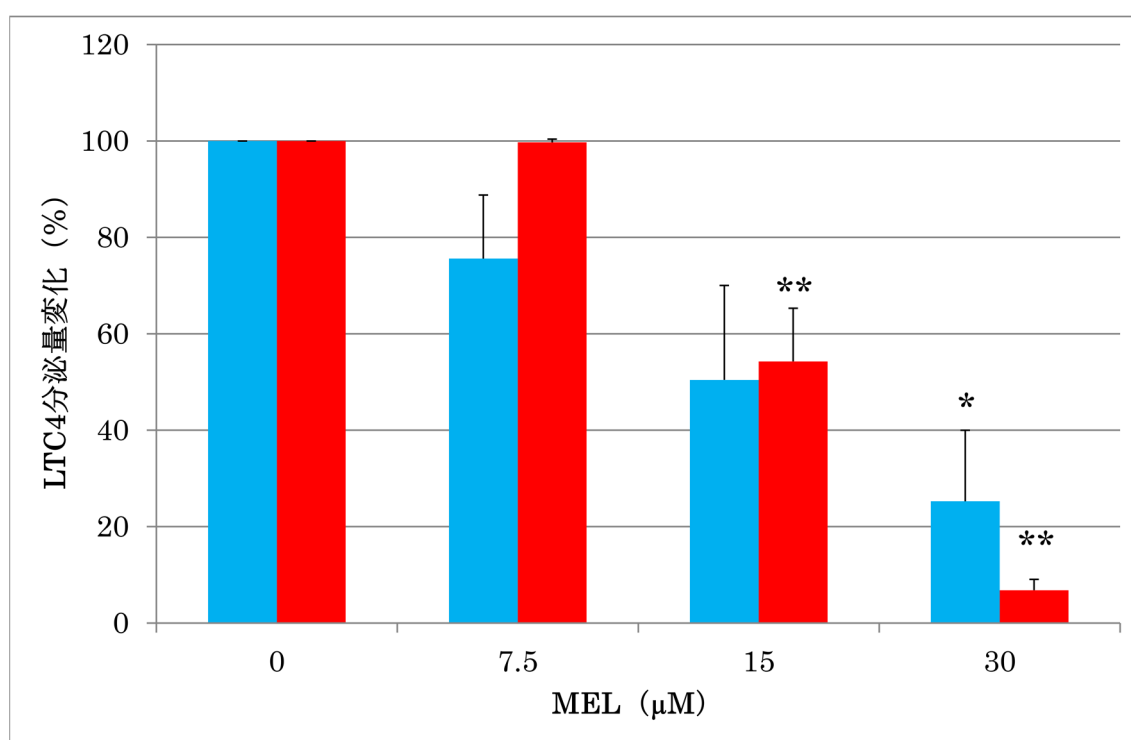


図 3.5 抗原刺激時の LTC₄ 分泌における MEL (blue : MEL-A、red : MEL-B) の抑制効果

各濃度の MEL を 8 時間前処理した後、IgE 抗体感作 15 分および DNP-BSA 刺激を 20 分間行ったときの上清に含まれる濃度を測定した。さらに、MEL 未処理のときの LTC₄ 分泌量を 100% として結果を示した。(MEL-A : (n=5)、MEL-B : 0 μM (n=8)、7.5 μM (n=5)、15 μM (n=8)、30 μM (n=8)) * $p < 0.05$ 、** $p < 0.005$ vs MEL (-) (error bar=s.e.m)

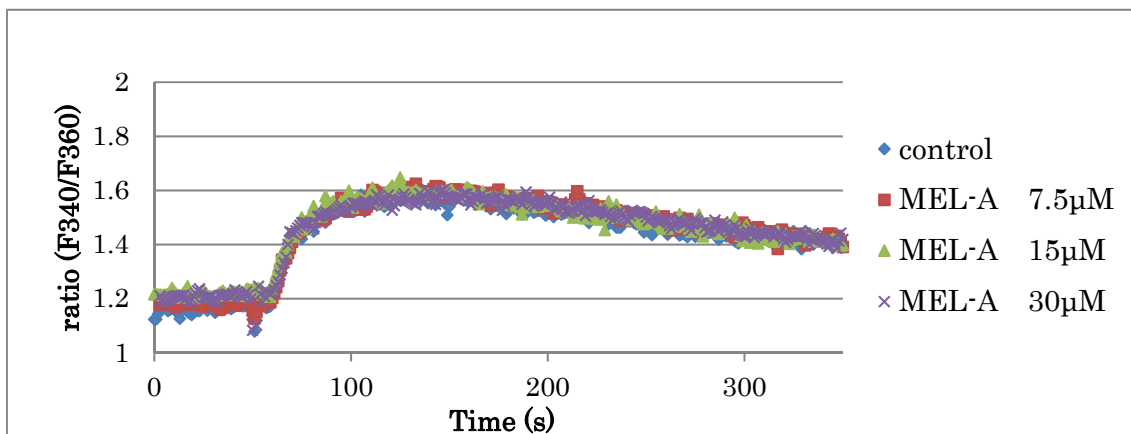
3.3.5 細胞内カルシウムイオン濃度上昇に対する MEL の作用

MEL が様々な炎症性メディエーターの分泌を抑制すること、さらに細胞内に取り込まれることが判明したため、MEL の抑制効果は細胞内におけるシグナル伝達への影響であると推測した。そこで MEL の作用点を明確にするために、まずは細胞内カルシウムイオン濃度上昇に対する作用を検討した。

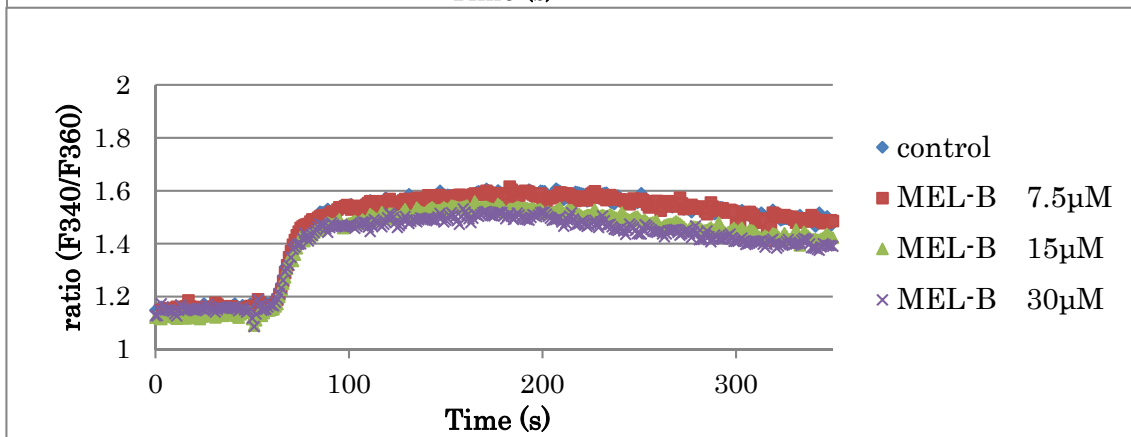
細胞内カルシウムイオン濃度上昇は転写因子の活性化やエクソサイトーシス、更にはアラキドン酸カスケードにおける PLA₂ の活性化等を引き起こし様々な炎症性メディエーターの産生、分泌における重要な役割を担っている。

MEL の細胞内カルシウム濃度上昇に対する作用を検討したところ、MEL-A は抗原刺激による細胞内カルシウムイオン濃度上昇に対し大きな影響を与えなかったが MEL-B は濃度依存的な抑制を示した (図 3.6 A、B)。そこで MEL-B の細胞内カルシウム濃度上昇抑制の作用機序を検討するため、外液に Ca²⁺が存在しない状態で抗原および thapsigargin 刺激を行い、その後 Ca²⁺を添加することで生じる細胞内カルシウム濃度上昇を測定した。その結果、thapsigargin によるカルシウムストアの枯渇には影響を与えないが、抗原刺激によるカルシウムストアからの放出に対し抑制効果が見られた (図 3.6 C、D)。このことは、MEL-B が上流のシグナルを介した細胞内カルシウム濃度上昇に影響を与えていることを示唆した。

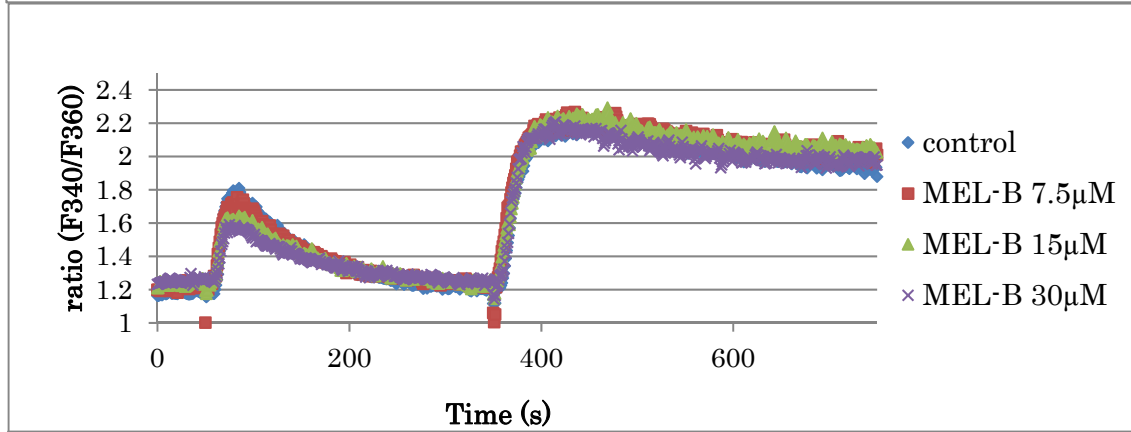
A



B



C



D

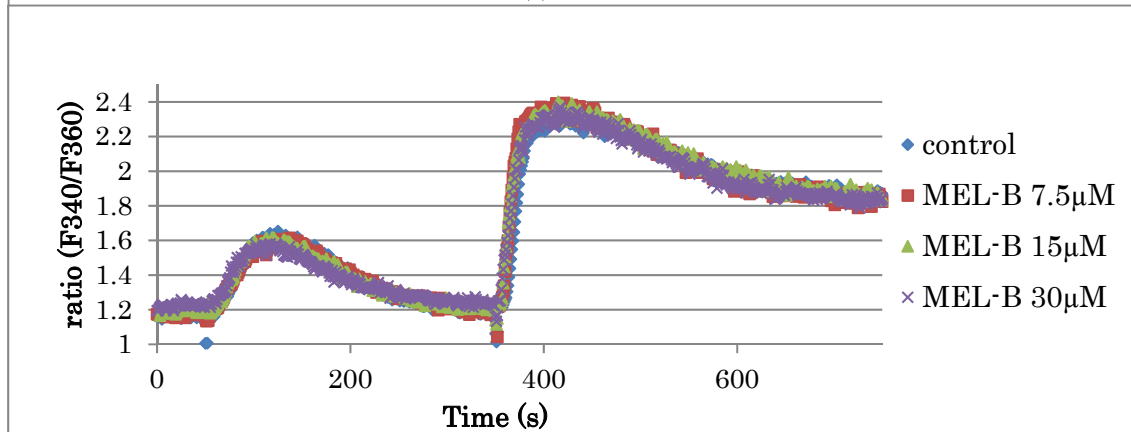


図 3.6 抗原刺激および thapsigargin 刺激による細胞内カルシウム濃度上昇における MEL の効果

(A)、(B) IgE と共に各濃度の MEL で 30 分間処理した細胞を、外液 Ca^{2+} (1 mM) 存在下で測定開始 50 秒後 DNP-BSA 刺激した時の細胞内カルシウム濃度の変化を測定した (A : n=4、B : n=3)。

(C) IgE と共に各濃度の MEL-B で 30 分間処理した細胞を、外液 Ca^{2+} 非存在下で測定開始 50 秒後 DNP-BSA 刺激および 350 秒後 CaCl_2 添加 (外液 Ca^{2+} : final 1 mM) による細胞内カルシウム濃度の変化を測定した (n=10)。

(D) 各濃度の MEL-B で 30 分間処理した細胞を、外液 Ca^{2+} 非存在下で測定開始 50 秒後 thapsigargin 刺激および 350 秒後 CaCl_2 添加 (外液 Ca^{2+} : final 1 mM) による細胞内カルシウム濃度の変化を測定した (n=2)。

3.3.6 MAP キナーゼリン酸化に対する MEL の作用

MAP キナーゼファミリータンパク質 (ERK、p38、JNK) はセリン/スレオニンキナーゼの一種である。マスト細胞が抗原などの刺激を受けることでシグナル伝達を開始され、いくつかの分子を介し MAP キナーゼの上流にあたるキナーゼ (MAP キナーゼキナーゼ) が活性化され、それにより MAP キナーゼがリン酸化されることで核内へ移行して転写活性を制御することができる。このような MAP キナーゼファミリータンパク質は、マスト細胞のサイトカイン産生においても重要なタンパク質である。一方で、ERK をリン酸化する MEK や p38 の阻害剤によりエクソサイトーシスや LTC_4 の分泌が減少することが報告されているなど、MAP キナーゼがエクソサイトーシスや LTC_4 のような炎症性メディエーターの分泌を正に制御することが示唆されており、MAP キナーゼの活性化はマスト細胞の活性化において重要な段階である[60]-[63]。そこで MEL の MAP キナーゼリン酸化に対する作用を検討した。

図 3.7 に示すように①～⑤の条件で whole cell lysate を作製した。ERK、p38、JNK のリン酸化抗体を用いて Western Blotting を行ったところ、どのタンパク質においても抗原刺激によりリン酸化が亢進されていることが確認できた (図 3.7 ①、②)。また、MEL により濃度依存的に ERK および p38 のリン酸化の抑

制が確認できた (図 3.7 ②~⑤)。

以上より、MELによる様々な炎症性メディエーターの分泌抑制効果にはMAPキナーゼの活性化の抑制が寄与していることが示唆された。

	①	②	③	④	⑤
IgE(1.6 μ g/mL)	-	+	+	+	+
DNP-BSA(200ng/mL)	-	+	+	+	+
MEL(μ M)	-	-	7.5	15	30

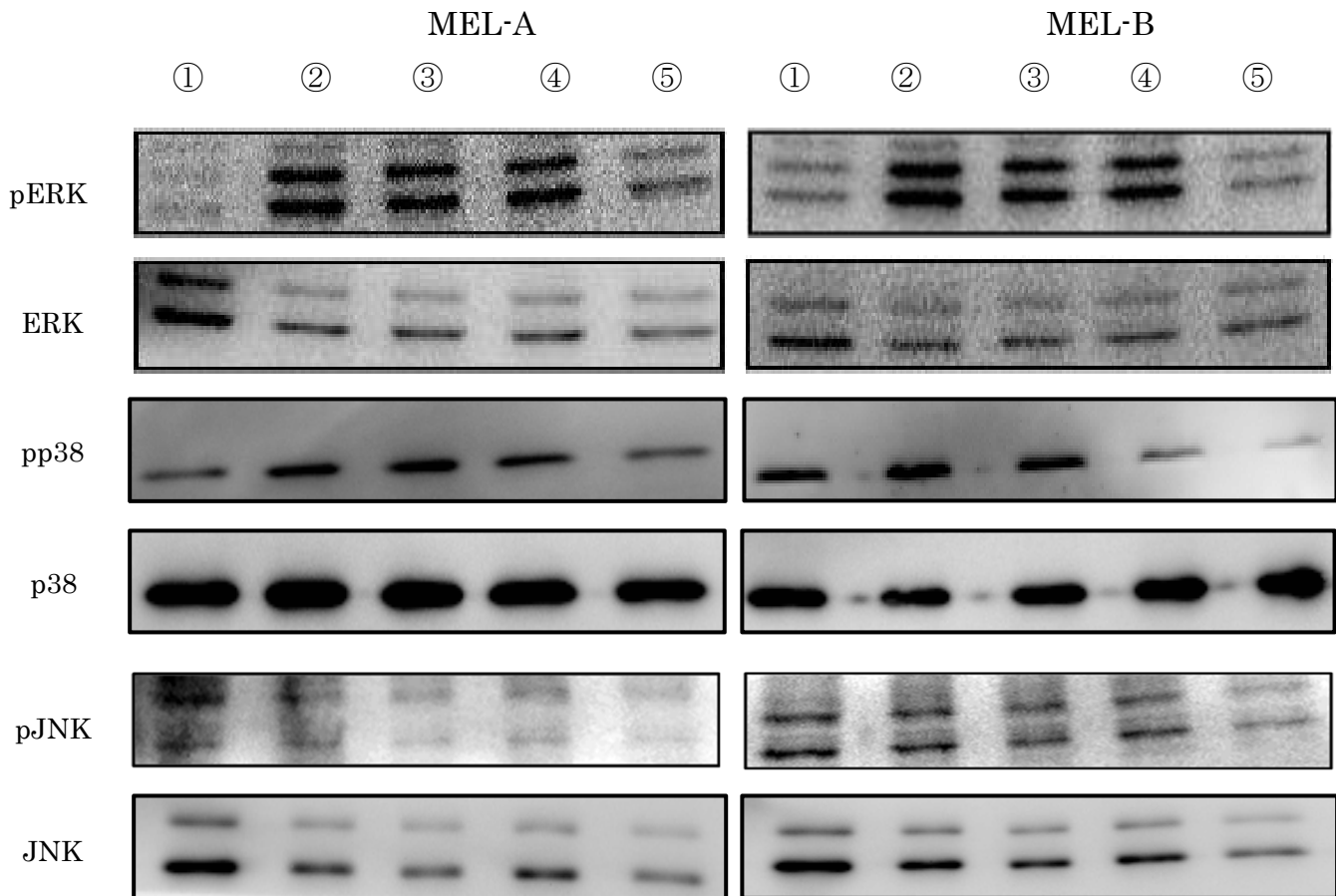


図 3.7 MAP キナーゼのリン酸化に対する MEL の抑制効果

各濃度の MEL を 8 時間前処理した後、IgE 抗体感作 15 分および DNP-BSA 刺激を 5 分間行った後の whole cell lysate を電気泳動し、PVDF 膜に転写後、抗リン酸化 ERK 抗体 (pERK)、抗リン酸化 p38 抗体 (pp38)、抗リン酸化 JNK

抗体 (pJNK)、抗 ERK 抗体 (ERK)、抗 p38 抗体 (p38) 、抗 JNK 抗体 (JNK) でブロットイングした。

3.3.7 SNARE タンパク質リン酸化に対する MEL の作用

SNARE タンパク質はエクソサイトーシスの最終段階である分泌顆粒と形質膜の膜融合において重要な役割を持っている。げっ歯類やヒトのマスト細胞は分泌顆粒に存在する v-SNARE タンパク質として VAMP2、VAMP3、VAMP7、VAMP8 が発現しており、形質膜に存在する t-SNARE タンパク質として SNAP-23、Syntaxin2、Syntaxin3、Syntaxin4、Syntaxin6 を発現していることが報告されている[64]。分泌顆粒が形質膜付近まで輸送されると、VAMP と SNAP、Syntaxin の相互作用が高まり SNARE 複合体を形成する。その効果により、分泌顆粒と形質膜の距離が縮まり、膜融合し、結果、エクソサイトーシスが引き起こされる。

SNARE タンパク質によるエクソサイトーシスの制御には、SNARE タンパク質のリン酸化や Synaptotagmin、Munc18 といった SNARE 調節分子が関与していることが明らかになっている。例えば、PKC は様々な細胞においてエクソサイトーシスを調整しているプロテインキナーゼであるが、神経細胞において SNAP-25 や Munc18 をリン酸化することによりエクソサイトーシスを調節していることが報告されている[65][66]。

上記のように SNARE タンパク質については神経細胞での研究が中心であったが、近年リン酸化に関する研究がマスト細胞においても行われている。マスト細胞のモデル細胞株である RBL-2H3 細胞では SNAP-23 のリン酸化部位のアミノ酸残基を変異させることでエクソサイトーシスが抑制されたという報告がある[67]。また、小胞輸送に関与する Rab GTPase スーパーファミリーと相互作用している Rak3D というキナーゼが Syntaxin4 のリン酸化に関与するという報告があり、SNARE タンパク質のリン酸化が SNARE 複合体の形成や解離に関与することがわかってきた[68]。また、抗原刺激による SNARE タンパク質や調節分子の研究において、PKG や PI3K 等により SNAP-23、Syntaxin2、4、6、Munc18-3 のリン酸化が確認され、エクソサイトーシスを最大限引き起こす為には複数の SNARE タンパク質のリン酸化が必要であると報告され、さらに、1 種類もしくは 2 種類の SNARE タンパク質のリン酸化が阻害されればエクソ

サイトーシスは十分に減少してしまうとしている。これらの報告からも、**SNARE** タンパク質のリン酸化はエクソサイトーシスにおいて大変重要な過程であるといえる[69]。

3.3.1、3.3.2 で述べたように **MEL** はエクソサイトーシスを抑制したが、その作用点は明確にはわかっていない。そこで、**MEL** による抗原刺激に伴う **SNARE** タンパク質のリン酸化に対する影響を検討した。

図 3.8 に示すように①～④の条件で **whole cell lysate** を作製した後、リン酸化タンパク質画分 (**eluate**) と非リン酸化画分 (**flow-through**) を分取し **Western Blotting** を行った。まず、各 **SNARE** タンパク質のリン酸化が抗原刺激により亢進していることが確認できた (図 3.8 ①、②)。さらに、高濃度の **MEL** により各 **SNARE** タンパク質のリン酸化が抑制されたことが確認できた (図 3.8 ②、③、④)。このことから **MEL** のエクソサイトーシスに対する抑制効果に、**SNARE** タンパク質のリン酸化の抑制が寄与していることが示唆された。

	①	②	③	④
IgE(1.6 μ g/mL)	-	+	+	+
DNP-BSA(200ng/mL)	-	+	+	+
MEL(μ M)	-	-	A 30	B 30

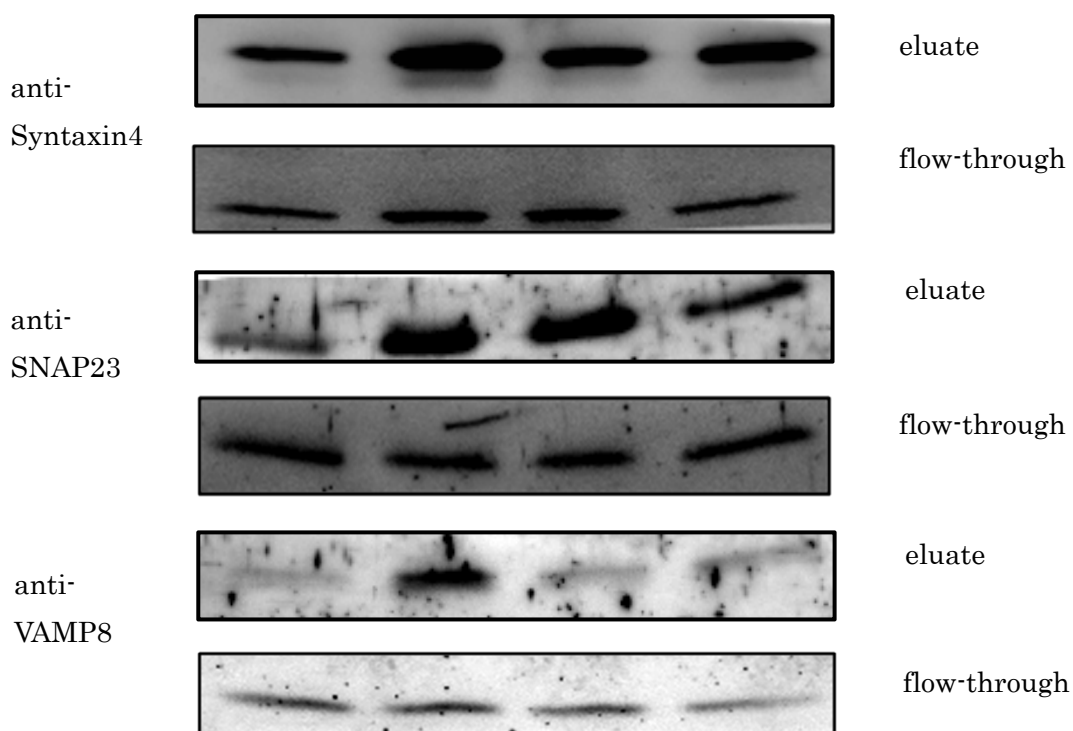


図 3.8 SNARE タンパク質のリン酸化に対する MEL の抑制効果

各濃度の MEL を 8 時間前処理した後、IgE 抗体感作 15 分および DNP-BSA 刺激を 5 分間行った後の whole cell lysate を PhosphoProtein Purification Column によりリン酸化タンパク質 (eluate) と非リン酸化タンパク質 (flow-through) とに分けそれぞれ分取した。その後電気泳動し、PVDF 膜に転写後、抗 Syntaxin4 抗体、抗 SNAP23 抗体、抗 VAMP8 抗体でブロッティングした。

3.4 小括

MEL はマスト細胞の活性化により引き起こされる様々な炎症性メディエーターの分泌を抑制した。また、それらの抑制効果には MAP キナーゼおよび SNARE タンパク質のリン酸化の抑制や細胞内カルシウム濃度上昇の抑制が寄与していることが示唆された。

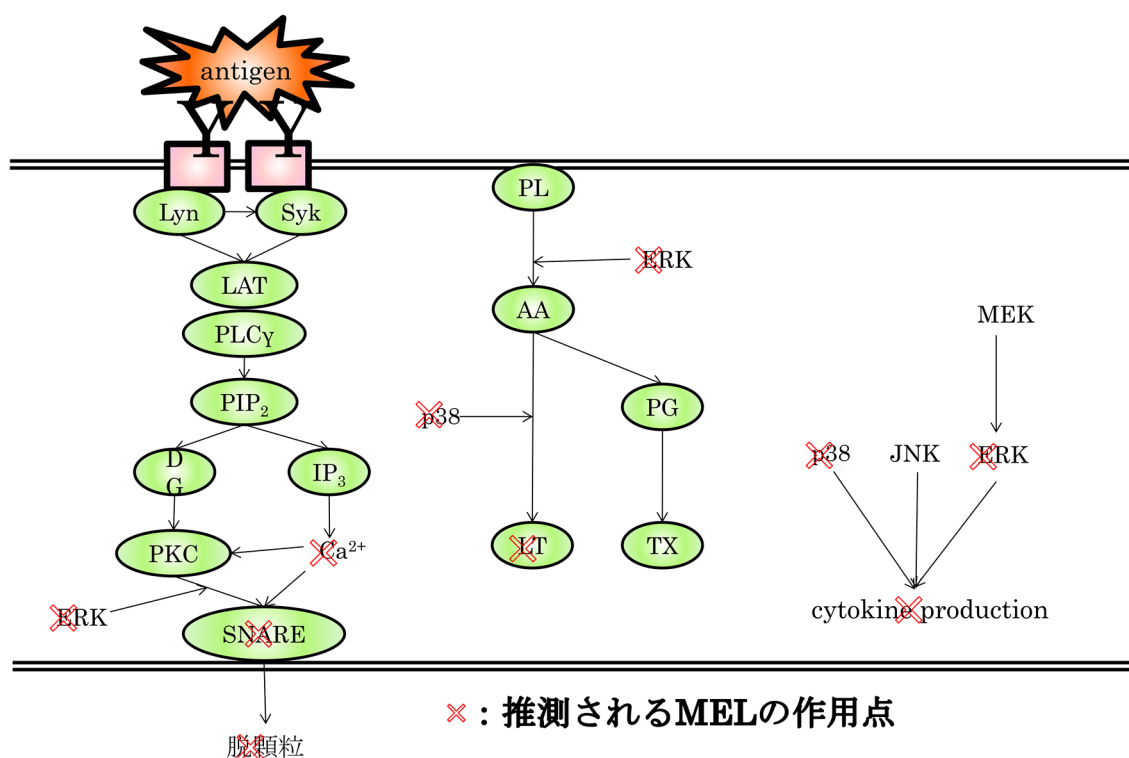


図 3.9 推測される MEL の作用点

エクソサイトーシスの抑制に関しては、SNARE タンパク質のリン酸化の阻害及び MAP キナーゼのリン酸化の阻害が関与している可能性がある。また、MEL-B に関しては細胞内カルシウムイオン濃度上昇の阻害の影響も示唆される。LTC $_4$ の分泌抑制に関しては、PLA $_2$ の活性に関わるとされる ERK のリン酸化阻害及び 5-リポキシゲナーゼの活性に関与するとされる p38 のリン酸化阻害に寄与すると考えられる。TNF- α の分泌抑制に関しては、ERK と p38 のリン酸化阻害が関与している可能性がある。

第四章 生体膜の接着機能及び医療への応用

4.1 はじめに

本研究では生体膜の持つ接着機能に関与する物質に着目した。生体膜の接着という機能は、多細胞生物において、組織を形成する上で必須の役割を果たしていると考えられており、生体膜を介した接着には、細胞同士及び細胞と細胞外基質との接着がある。その生体膜の接着を担う分子には、カドヘリン、インテグリン等が知られている。また、生体膜の接着に関与する膜タンパク質には、細胞内へのシグナル伝達を担っているものがあり、細胞特異的に発現するものも存在している[70]。本研究では、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸をリガンドとする CD44 に着目した。

CD44 は N 結合糖鎖部位、O 結合糖鎖部位、コンドロイチン硫酸結合部位が複数存在しており、糖鎖に富む膜タンパク質として知られている。また、癌幹細胞に発現していることが知られており、胸膜中皮腫細胞においても CD44 の発現が確認されている[71]。

胸膜中皮腫は、多くの場合、石綿（アスベスト）曝露が原因とされている。そして、曝露から発病までの期間は、一般的に 30 年から 40 年と言われており、本邦におけるアスベストの輸入量のピークが 1974 年であることを考慮すると、患者数の増加が予想される。悪性胸膜中皮腫の予後は極めて不良であり、1 年生存率は 50%、2 年生存率は 20%と言われている[27]。悪性胸膜中皮腫に対する治療法として、外科手術、放射線療法及び化学療法が存在しているが、有効な治療法が確立されていないため、有効な治療法の開発が望まれている。

そこで、ヒアルロン酸と CD44 との接着を薬剤のデリバリーシステムとして利用することを目的とした。送達する薬剤には、脳や皮膚がんに対して開発が行われているホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) に着目し、ホウ素製剤を使用した。

中性子捕捉療法は、その原理が 1936 年、Locher により提唱された。原理としては、ホウ素 (^{10}B) のような同位体核種に、中性子を照射することで核反応を起こし、その核反応により発生する高エネルギー体 (α 線、 ^7Li) を利用して細胞を致死させるというものである。このように発生した高エネルギー体は、目的とする細胞以外にも致死活性を有しているが、核反応により発生する高エネルギー体は数マイクロメートル程度しか飛行しないため[28][29]、同位体核種

を細胞内に取り込んだ細胞のみを致死させるという選択性を生み出すことが可能となる。したがって、目的とする細胞に高濃度で同位体核種を取り込ませ、目的外の細胞、組織及び血中では低濃度となる化合物あるいは投与方法の開発が、中性子捕捉療法成功のカギを握ると言える。現在、様々なホウ素製剤が開発され、悪性黒色腫、肝細胞癌等の腫瘍細胞に対して BNCT 効果を検討されている[30][72][73]。

中性子捕捉療法の臨床応用は、中性子の発生源となる医療用原子炉が完成してから、世界中で試みられている。日本においては、1968年に梶中らによって医療照射が、日立製作所の日立炉において行われた。さらに、腫瘍細胞への選択的蓄積という点でホウ素化合物（BPA）が開発され、この化合物を用いた悪性脳腫瘍に対する臨床応用が行われている[74][75]。

中性子を利用するためには、これまで原子炉と必要としていたが、近年、病院の施設において設置可能な中性子発生装置として、サイクロトロン等の加速器が開発されている[76]。中性子発生装置の開発に伴い、BNCTの臨床開発が進んでいくためには、ホウ素製剤を効率良く目的細胞に送達することが必要である。

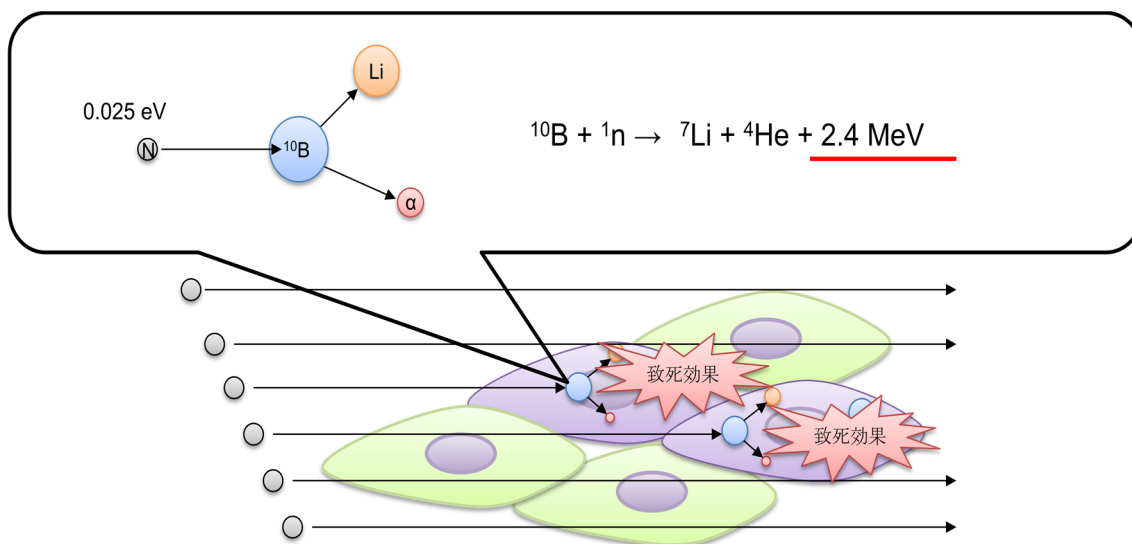


図 4.1 ホウ素中性子捕捉療法の実理

出典：医用原子力技術研究振興財団 (http://antm.or.jp/06_bnct/0101.html)

(一部を改変)

本研究では、ヒアルロン酸とそのリガンドである CD44 を利用し、ホウ素製剤を効率良く目的細胞へ送達するデリバリーシステムの開発を目的とした。具体的には、ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスに用いて、マウス胸膜中皮腫細胞を用いた細胞致死活性試験 (*in vitro* 試験) 及び胸膜中皮腫モデルマウスを用いた生存試験 (*in vivo* 試験) を実施し、BNCT 効果を評価した。

4.2 試薬及び実験方法

4.2.1 試薬

DMEM 及び FBS は nacalai tesque、non-essential amino acids (100×)、sodium pyruvate、L-glutamine、2-mercaptoethanol、Penicillin-Streptomycin、Liquid は GIBCO より購入した。BD Matrigel™、注射針(30G)は BD Bioscience、Midazolam はアステラス製薬より購入した。Butorphanol tartrate はファルマ株式会社、Medetomidine は日本全薬工業株式会社より購入した。Cell Counting Kit-8 は DOJINDO、Fluorescein 標識ヒアルロン酸 (FAHA-L1) は岩井化学薬品株式会社より購入した。また、BSH、HA-BND-S、HA-DSBL 及び HA (-)-BND-S は学習院大学中村浩之教授より供与された。

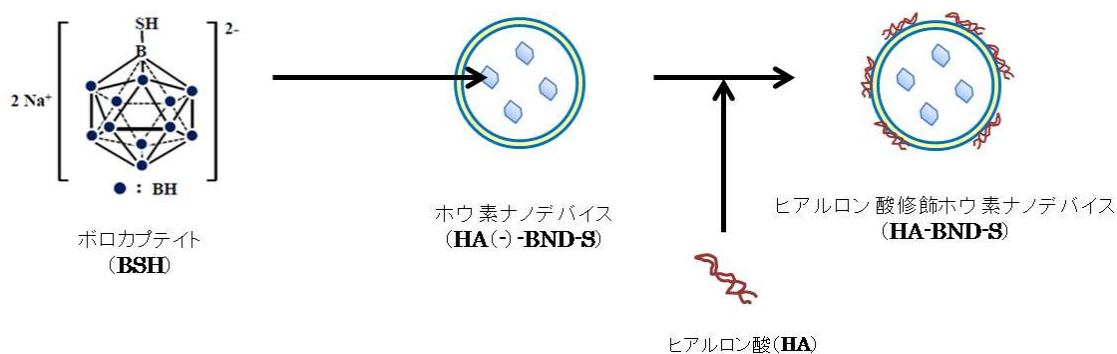


図 4.2 ホウ素製剤の製造シエーマ

4.2.2 細胞

マウス胸膜中皮腫細胞は、DMEM に、10%FBS、1% v/v non-essential amino acids (100×)、1 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine、50 μM 2-mercaptoethanol、100 units/mL penicillin、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin を加えた培地を用いて、5%CO₂ 存在下 37°C で培養した。

4.2.3 CD44 接着阻害試験

マウス胸膜中皮腫細胞を 1×10^4 cells/well となるように 96 well plates に播種し、培養した後、パラフォルムアルデヒドにて固定した。その後、HA、HA-BND-S、HA-DSBL の各ヒアルロン酸製剤あるいは HA (-)-BND-S、BSH を添加した。

PBS を用いて洗浄した後、Fluorescein 標識ヒアルロン酸を添加して、20 分間静置した。PBS を用いて洗浄した後、プレートリーダー (Trister LB 941、BERTHOLD) にて蛍光度 (ex. 490 nm、Em.520 nm) を測定した。

4.2.4 BNCT による細胞致死活性試験

マウス胸膜中皮腫細胞を、35 mm 培養皿に播種し、ホウ素製剤である HA-BND-S あるいは BSH を培養液中に添加して 24 時間あるいは 1 時間インキュベートした。ホウ素濃度は 0.003 ppm/cells とした。ホウ素製剤を取り除いた後、PBS で洗浄後、それぞれの細胞群をエッペンドルフチューブに回収した。中性子照射は、JRR4 にて、 1.8×10^{12} neutrons/cm² で 23 分間行った。中性子照射後、細胞を PBS で洗浄し、96 well plates に、2,000/200 μ L/well となるように播種した。5%CO₂ 存在下 37°C で培養を再開し、再開後、3 日目、4 日目及び 6 日目に Cell Counting Kit-8 を用いて、細胞生存率を測定した。

4.2.5 胸膜中皮腫担がんマウスの作製

6、7 週齢の BALB/cA マウスは CREA から購入した。標準的な飼育環境の下、1 週間順化を行った。胸膜中皮腫細胞の移植は、三種混合麻酔[77] (midazolam 0.3 mg/kg、butorphanol tartrate 5 mg/kg、medetomidine 5 mg/kg) を用いた麻酔下で、BD Matrigel™ 100 μ L と混合して、胸腔内に接種した。接種細胞数は 2.0×10^6 cells/body とした。

4.2.6 輸送

胸膜中皮腫担がんマウスは、中性子照射 2 日前に到着するように、大阪大学医学部附属動物実験施設から日本原子力研究機構へ輸送した。

4.2.7 ホウ素製剤の投与

中性子照射 1 日前に、三種混合麻酔下にて、胸腔内にホウ素製剤 (HA-BND-S) を 200 μ L/body (ホウ素濃度 ; 10,000 ppm/body 又は 2,000 ppm/body) 投与した。また、中性子照射 2 時間前に BSH (ホウ素濃度 ; 10,000 ppm/body) を投与した。

4.2.8 中性子照射

胸膜中皮腫担がんマウスを、HA-BND-S 投与群（ホウ素濃度；10,000 ppm/body 群及び 2,000 ppm/body 群）、BSH 投与群、無処置群の 4 群として、アクリル板に固定した。1 枚のアクリル板に 10 匹から 12 匹のマウスを固定し、2 枚のアクリル板を原子炉 1 回の稼働で中性子を照射した。照射時は、イソフラボン麻酔が行われた。また、中性子が照射される範囲をマウスの胸部となるようにコリメータ設置した。原子炉は、3 MWh で稼働し、1 枚のアクリル板に対して 17 分間中性子照射が行われた。中性子照射後、アクリル板に固定したマウスを回収し、封じ込め環境で飼育した。

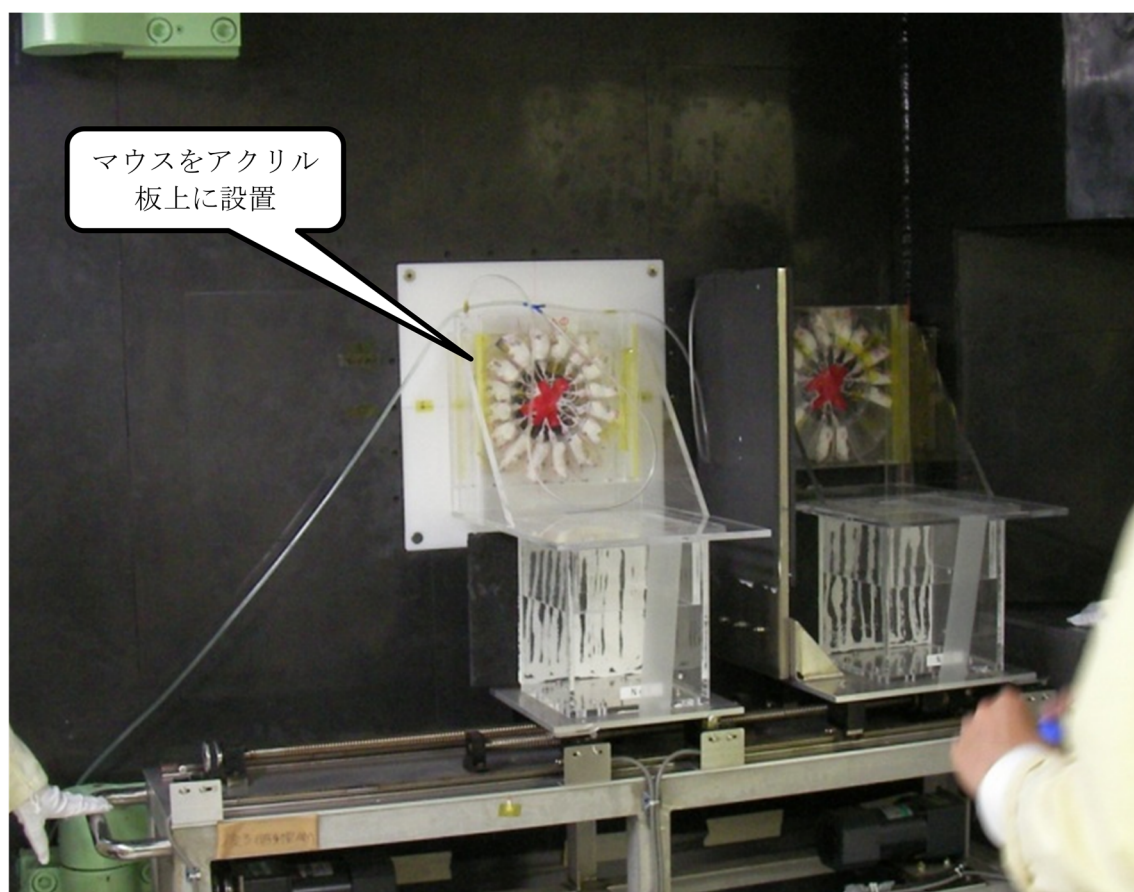


図 4.3 日本原子力研究開発機構 JRR-4 における中性子照射

4.2.9 剖検

剖検の際は、三種混合麻酔を実施した後、大量採血によって失血死させた。仰臥位で固定し、医療用ハサミを用いて肋骨を腹側部から切開し、胸腔内部を露出させ、肉眼的に腫瘍組織の有無を確認した。

4.2.10 解析

Kaplan-Meier の生存曲線を作製した。統計は log-rank test 用いた。

4.3 結果及び考察

4.3.1 ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫細胞への接着性

ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイス (HA-BND-S 及び HA-DSBL) は、ヒアルロン酸と同程度に Fluorescein 標識ヒアルロン酸のマウス胸膜中皮腫細胞への接着を阻害し、ホウ素ナノデバイス製剤の腫瘍細胞への親和性が BSH と比べ、高い可能性があることが明らかとなった。また、HA-BND-S 及び HA-DSBL の Fluorescein 標識ヒアルロン酸の腫瘍細胞への接着阻害率は、ホウ素ナノデバイスの修飾に用いたヒアルロン酸の濃度依存的に上昇した (図 4.1)。

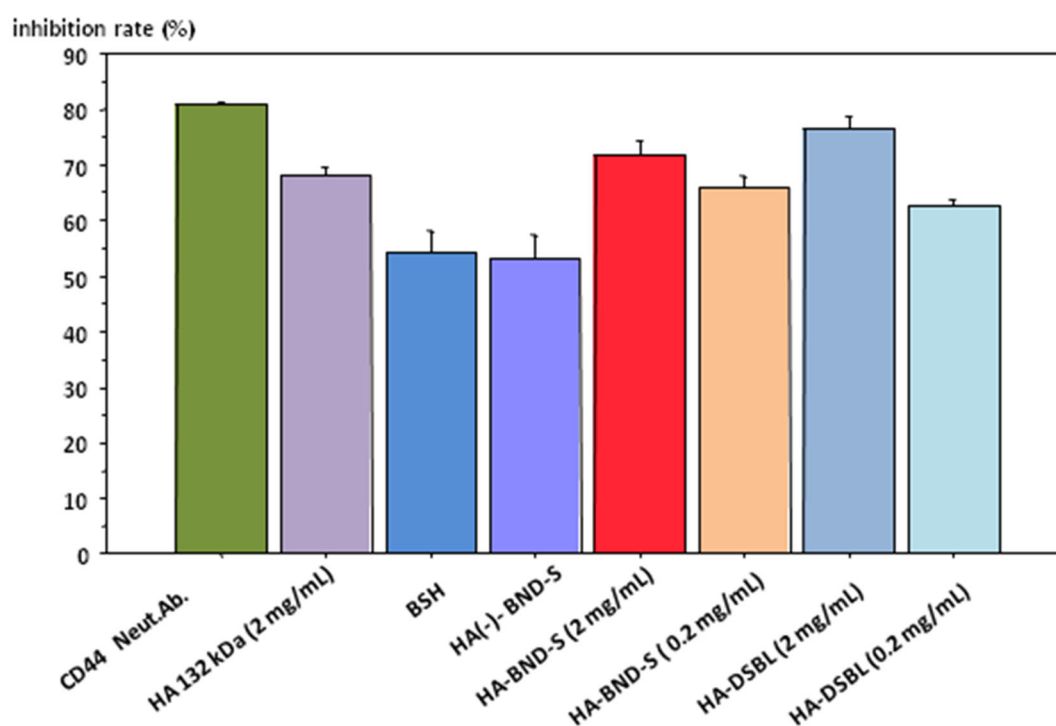


図 4.4 ホウ素ナノデバイスの機能評価 (マウス胸膜中皮腫細胞への接着性)

横軸左より CD44 Neutralizing Ab.、HA132 kDa (2 mg/mL)、BSH、HA (-)-BND-S、HA-BND-S (2 mg/mL)、HA-BND-S (0.2 mg/mL)、HA-DSBL (2 mg/mL)、HA-DSBL (0.2 mg/mL) (n=3、error bar=s.d.)

4.3.2 細胞致死活性試験

BNCT の効率を高めるためには、目的とする細胞にホウ素が高濃度に取り込まれることが必要である。そこで、ヒアルロン酸が CD44 に接着したことにと

ってホウ素製剤が細胞内に取込まれ、BNCT 効果を発揮することを示すために、HA-BND-S を 24 時間、胸膜中皮腫細胞と共培養した群と、BSH を 1 時間共培養した後、洗浄した群と、BSH を 1 時間共培養した後、洗浄しない群の 3 群について BNCT 効果を、細胞致死活性を指標に評価した。BSH を洗浄により取り除かなかった群は、細胞内の BSH 濃度が溶媒中の BSH 濃度と同様になると考えられる。そのため、HA-BND-S と共培養したとしても、細胞内への取込みがなければ洗浄とともに取り除かれ、細胞致死活性は発揮しないことが考えられる。以上を踏まえると、図 4.2 に示したように、培養液中の BSH を取り除かない群も含め、他のホウ素製剤群と比較しても、HA-BND-S で最も強い細胞致死活性が認められたことは、ヒアルロン酸と CD44 を介して接着したホウ素製剤は、細胞内に取込まれ BNCT 効果を発揮したことが示されたと言える。

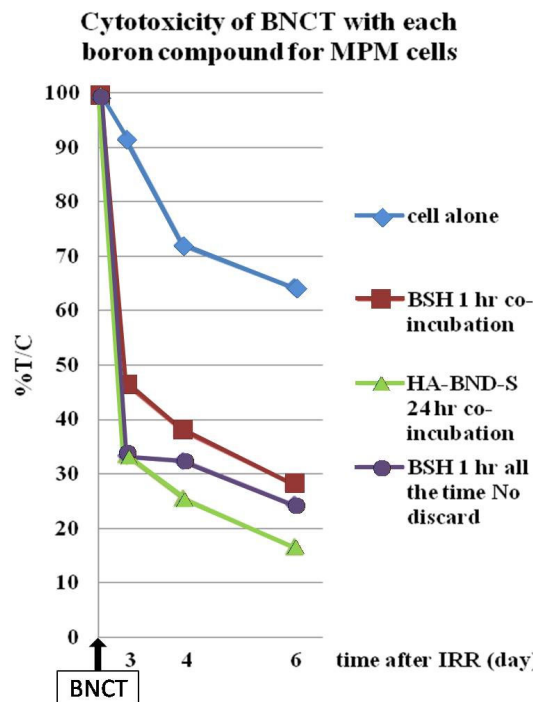


図 4.5 BNCT 実施後の培養細胞生存率

青線グラフ：細胞のみ（コントロール群）。赤線グラフ：BSH を 1 時間共存培養し、中性子照射前に洗浄操作を行って BSH を取り除いた群。紫線グラフ：BSH が培養液中の存在する状態で中性子を照射した群。黄緑線グラフ：HA-BND-S を 24 時間共存培養し、中性子照射前に洗浄操作を行い培養液中の HA-BND-S を取り除いた群。

4.3.3 胸膜中皮腫モデルマウスを用いた試験

4.3.3.1 胸膜中皮腫接種マウスの生存曲線

各群の平均生存期間は、Control 群が 15.1 日、中性子照射のみ (IRR alone) の群が 15.3 日であり、BSH 10,000 ppm 群が 19.8 日、HA-BND-S 2,000 ppm 群が 21.2 日とともに Control 群と差を認めなかったことに対し、HA-BND-S 10,000 ppm 群は 28 日間の観察期間において 5 匹全例が生存しており、有意に生存率の延長を認めた ($p < 0.05$)。

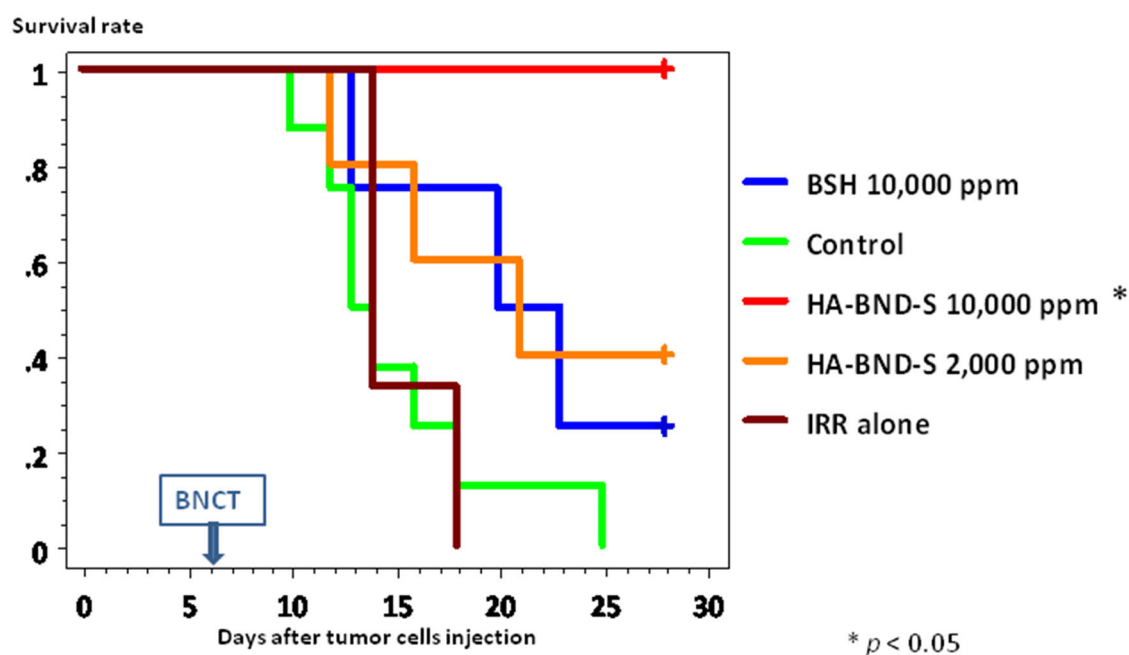


図 4.6 BNCT 実施後のマウス生存曲線

グラフ横軸は、腫瘍細胞接種後の日数を示し、縦軸は生存率を示す。BNCT を細胞接種後 6 日目に施行後の各ホウ素製剤投与マウスの生存率を示す。

表 4.1 マウスの平均生存期間

群	平均生存期間 (日)	Logrank 検定 (vs 対照群)
Control 群	15.1±1.7	
IRR alone 群	15.3±1.3	$p=0.7345 > 0.05$
BSH 投与群 (10,000 ppm)	19.8±2.5	$p=0.1312 > 0.05$
HA-BND-S (2,000 ppm)	21.2±6.9	$p=0.0659 > 0.05$
HA-BND-S (10,000 ppm)	28 [*]	$* p < 0.05$

* 観察期間の 28 日間、全例が生存した。

4.3.3.2 剖検所見

HA-BND-S 10,000 ppm 群における 28 日目の胸腔内を観察すると 5 匹中 3 匹において腫瘍を認めなかった。Control 群の剖検所見から、マウス胸膜中皮腫細胞を胸腔内に接種すると、胸腔内で爆発的に増殖し、短期間のうちに縦隔・心臓を覆い尽くし呼吸器及び心臓循環器系を機能不全に至らしめた結果、死に至らしめると考えられる。したがって、胸膜中皮腫細胞の増殖を抑制もしくは死滅させることで、生存期間の延長が期待される。施設における飼育期間から、28 日目に全例を剖検したが、剖検所見から更なる生存期間の延長が考えられた。

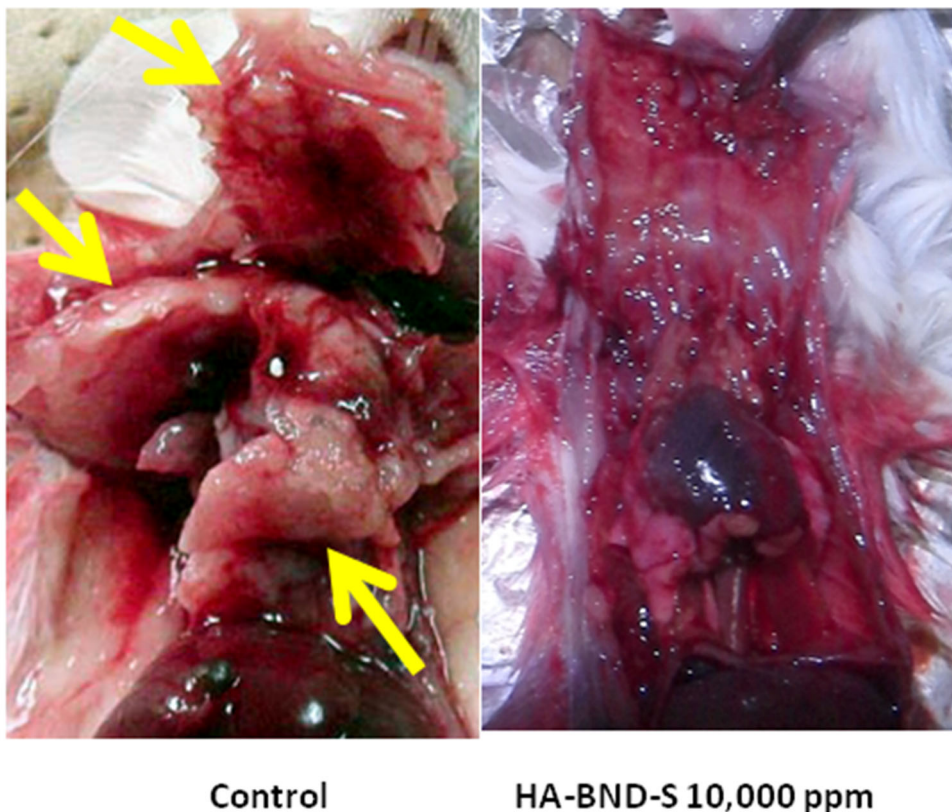


図 4.7 マウス胸膜中皮腫細胞接種後の剖検所見

左図は Control 群の代表的な所見、黄色矢印に示す胸膜中皮腫細胞が両側胸腔内から縦隔・心臓を覆い尽くしている。一方、HA-BND-S 10,000 ppm 投与群では、腫瘍細胞接種後 28 日目（BNCT 後 22 日目）での胸腔内において、生存 5 匹中 3 匹で肉眼的には腫瘍を認めなかった。

4.4 小括

本章における実験の結果から、ヒアルロン酸及びヒアルロン酸を用いて修飾したホウ素リポソーム製剤は、胸膜中皮腫細胞に発現する表面抗原である CD44 に接着することが示された。

本研究により、ヒアルロン酸を用いて修飾したホウ素ナノデバイスを曝露させた後、中性子を照射することにより、*in vitro* 試験において胸膜中皮腫細胞への細胞致死活性を確認できた。また、*in vivo* 試験においても、胸膜中皮腫細胞播種モデルマウスに対して、BNCT 効果を示す生存期間の延長及び剖検において腫瘍消失という結果を得た。

第五章 総括

近年、疾病の原因となる目的細胞への指向性の向上は、抗癌剤、遺伝子治療等の発展に不可欠な要素である。目的細胞への指向性の向上には、その細胞の特性を解明し、利用することが考えられる。本研究では、生体膜が関与する機能、及び生体膜親和性物質の機能を解明することで、目的細胞への指向性又は医療技術への応用を目的としたものである。本研究で得られた知見を要約する。

1. 人工開口放出系の作製と膜融合におけるリン脂質の役割

SUVs 含有 GUV を作製できた。SUVs 含有 GUV において膜融合を引き起こすためには、GUV の構成脂質にホスファチジルセリンが含まれていること及びGUV内外に osmolarity gap があることが必要であることが明らかとなった。

2. バイオサーファクタントの生体膜に対する作用

バイオサーファクタントである MEL は生体膜を構成する膜タンパク質のリン酸化を抑制すること及び細胞内へのカルシウムイオン流入を抑制することで、マスト細胞の炎症性ケミカルメディエーターを放出するエクソサイトーシスを抑制することが明らかとなった。

3. ヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスの胸膜中皮腫細胞への接着

胸膜中皮腫細胞に発現している CD44 に対して、ヒアルロン酸で修飾したホウ素リポソーム製剤が、ヒアルロン酸と同等に CD44 に接着することを、Fluorescein 標識ヒアルロン酸の結合阻害率によって示した。

4. 胸膜中皮腫細胞に対する BNCT 効果 (*in vitro* 試験及び *in vivo* 試験による評価)

胸膜中皮腫細胞に対する細胞致死活性及び胸膜中皮腫細胞を胸腔内に接種したモデルマウスの生存期間の延長から、胸膜中皮腫に対してヒアルロン酸修飾ホウ素ナノデバイスを用いた BNCT の有用性を示した。

謝辞

本研究の過程において、終始懇切なるご指導とご鞭撻を賜り、本論文をまとめるに際して、親身にご助言と励ましを頂いた、中村浩之教授に心より感謝を申し上げます。

大阪大学大学院医学系研究科ならびに大阪大学医学部附属病院での研究生生活において、終始熱いご指導とご鞭撻を賜り、本論文の作成に際して、多くのご助言と励ましを頂いた、李千萬准教授に心より感謝を申し上げます。

また、本論文の作成にあたり、有益なご助言及びご高閲を賜りました学習院大学理学部 馬淵一誠教授及び岡田哲二教授に心より感謝を申し上げます。

これまでの研究過程において、数々のご指導を賜りました、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の平嶋尚英教授、田中正彦准教授、田所哲助教に感謝いたします。

原子炉の使用にあたり、親身にご助言頂きました京都大学原子炉実験所粒子線腫瘍学研究センターの鈴木実教授、東京大学原子力研究総合センターの川手稔助手に感謝いたします。

3年間の大学・大学院生活において、苦楽を共にし、支え続けてくれた名古屋市立大学大学院薬学研究科 平嶋研究室の皆さま、また4年間の社会人生活において、多くの励まし頂きました大阪大学大学院医学系研究科ならびに大阪大学医学部附属病院未来医療開発部の皆さまに感謝いたします。ありがとうございます。

引用文献

- [1] H. Davson, J. F. Danielli, “Studies on the permeability of erythrocytes”, *The Biochemical Journal* **30**(2): 316-320 (1936).
- [2] S. J. Singer, G. L. Nicolson, “The fluid mosaic model of structure of cell membranes”, *Science* **175** (4023): 720-731 (1972).
- [3] C. A. Goresky, “Uptake in the liver: the nature of the process”, *International Rev Physiol* **21**: 65-101 (1980)
- [4] M. Esisin, “Class I MHC molecules as probes of membrane patchiness: from biophysical measurements to modulation of immune responses”, *Immunol Res.* **47**(1-3): 265-272 (2010).
- [5] A. D. Bangham, R. W. Horne, “Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope”, *Journal of Molecular Biology* **8**: 660-668 (1964).
- [6] F. Nomura, M. Nagatam, T. Inada, H. Hotani, K. Takiguchi, “Capabilities of liposomes for topological transformation”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(5): 2340-2345 (2001).
- [7] Y. Tamba, T. Tanaka, T. Yahagi, Y. Yamashita, M. Yamazaki, “Stability of giant unilamellar vesicles and large unilamellar vesicles of liquid-ordered phase membranes in the presence of Triton X-100”, *Biochimica et Biophysica Acta* **1667**(1): 1-6 (2004).
- [8] T. Tanaka, R. Sano, Y. Yamashita, M. Yamazaki, “Shape changes and vesicle fission of giant unilamellar vesicles of liquid-ordered phase

- membrane induced by lysophosphatidylcholine”, *Langmuir* **20**(22): 9526-9534 (2004).
- [9] P.-A. Monnard, “Liposome-entrapped polymerases as models for microscale/nanoscale bioreactors”, *Journal of Membrane Biology* **191**(2): 87-97 (2003).
- [10] V. Noireaux, A. Libchaber, “A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**(51): 17669-17674 (2004).
- [11] K. Tahara, H. Yamamoto, H. Takeuchi, Y. Kawashima, “Development of gene delivery system using PLGA nanospheres”, *YAKUGAKU ZASSHI* **127**(10): 1541-1548 (2007).
- [12] R. Suzuki, Y. Oda, E. Namai, T. Takizawa, Y. Negishi, N. Utoguchi, K. Tachibana, K. Maruyama, “development of site specific gene delivery system with sonoporation”, *YAKUGAKU ZASSHI* **128**(2): 187-192 (2008).
- [13] D. J. Estes, M. Mayer, “Giant liposomes in physiological buffer using electroformation in a flow chamber”, *Biochimica et Biophysica Acta* **1712**(2): 152-160 (2005).
- [14] A. Yamada, T. Yamanaka, T. Hamada, M. Hase, K. Yoshikawa, D. Baigl, “Spontaneous transfer of phospholipid-coated oil-in-oil and water-in-oil micro-droplets through an oil/water interface”, *Langmuir* **22**(24): 9824-9828 (2006).
- [15] K. Takiguchi A. Yamada, M. Negishi, Y. Tanaka-Takiguchi, K. Yoshikawa, “Entrapping desired amounts actin filaments and molecular motor protein in giant liposomes”, *Langmuir* **24**(20): 11323-11326 (2008).

- [16] S. Pautot, B. J. Frisken, D. A. Weitz, “Engineering asymmetric vesicles”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**(19): 10718-10721 (2003).
- [17] U. Massing, S. Cicko, V. Ziroli, “Dual asymmetric centrifugation (DAC)-a new technique for liposome preparation”, *Journal of Control Release* **125**(1): 16-24 (2008).
- [18] K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita, T. Yoshimura, “Efficient formation of giant liposomes through the gentle hydration of phosphatidylcholine films doped with sugar”, *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces* **68**(1): 98-105 (2009).
- [19] K. Ishikawa, K. Sato, Y. Shima, I. Urabe, T. Yamo, “Expression of a cascading genetic network within liposomes”, *Federation of European Biochemical Societies Letters* **576**(3): 387-390 (2004).
- [20] H. Sakai, Y. Masada, H. Horinouchi, E. Ikeda, K. Sou, S. Takeoka, M. Suematsu, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida, “Physiological capacity of the reticuloendothelial system for the degradation of hemoglobin vesicles (artificial oxygen carriers) after massive intravenous doses by daily repeated infusions for 14 days”, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **311**(3): 874-884 (2004).
- [21] J. Richmond, “Synaptic function”, *WormBook(C. elegans BIOLOGY)*, 1-14 (2005).
- [22] C. B. Wollheim, P. Maechler, “ β -cell mitochondria and insulin secretion messenger role of nucleotides and metabolites”, *Diabetes* **51**, S37-42 (2002).

- [23] U. Blank, J. Rivera, “The ins and outs of IgE-dependent mast-cell exocytosis”, *TRENDS in Immunology* **25**(5): 266-273 (2004).
- [24] K. L. Lynch, R. R. Gerona, E. C. Larsen, R. F. Marcia, J. C. Mitchell, T. F. Martin, “Synaptotagmin C2A loop 2 mediates Ca²⁺-dependent SNARE interactions essential for Ca²⁺-triggered vesicle exocytosis”, *Molecular Biology of the Cell* **18**(12): 4957-4968 (2007).
- [25] D. Tareste, J. Shen, T. J. Melia, J. E. Rothman, “SNAREpin/Munc18 promotes adhesion and fusion of large vesicles to giant membranes”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(7): 2380-2385 (2008).
- [26] D. Kitamoto, “Naturally engineered glycolipid biosurfactants leading to distinctive self-assembling properties”, *YAKUGAKU ZASSHI* **128**(5): 695-706 (2008).
- [27] G. V. Le, K. Takahashi, E. K. Park, V. Delgermaa, C. Oak, A.M. Qureshi, S. M. Aljunid, “Asbestos use and asbestos-related diseases in Asia: past, present and future”, *Respirology* **16**(5): 767-775 (2011).
- [28] R.F. Barth, J. A. Coderre, M. G. Vicente, T. E. Blue, “Boron neutron capture therapy of cancer: Current status and future prospects”, *Clin Cancer Res* **11**(11): 3987-4002 (2005).
- [29] H. Nakamura, “Liposomal boron delivery system for neutron capture therapy”, *YAKUGAKU ZASSHI* **128**(2): 193-208 (2008).
- [30] 「次世代 DDS 型悪性腫瘍治療システムの研究開発事業／中性子捕捉療法 (BNCT)」事後評価報告書 (2009).

- [31] H. Nakamura, "Minimally invasive cytoselective radiation therapy using boron neutron capture reaction", *YAKUGAKU ZASSHI* **130**(12): 1687-1694 (2010).
- [32] L. E. Sander, S. P. Frank, S. Bolat, U. Blank, T. Galli, H. Bigalke, S. C. Bischoff, A. Lorentz, "Vesicle associated membrane protein (VAMP)-7 and VAMP-8, but not VAMP-2 or VAMP-3, are required for activation-induced degranulation of mature human mast cells", *European Journal of Immunology* **38**(3): 855-863 (2008).
- [33] S. Takamori, M. Holt, K. Stenius, E. A. Lemke, M. Grønborg, D. Riedel, H. Urlaub, S. Schenck, B. Brügger, P. Ringler, S. A. Müller, B. Rammner, F. Gräter, J. S. Hub, B. L. De Groot, G. Mieskes, Y. Moriyama, J. Klingauf, H. Grubmüller, J. Heuser, F. Wieland, R. Jahn, "Molecular anatomy of a trafficking organelle", *Cell* **127**(4): 831-846 (2006).
- [34] K. Miura, H. Nomura, M. Nakanishi, N. Hirashima, "Munc13-1, an active zone protein, regulates exocytosis in mast cells", *Bioimages* **16**: 11-18 (2008).
- [35] K. Suzuki, I. M. Verma, "Phosphorylation of SNAP-23 by I κ B kinase 2 regulates mast cell degranulation", *Cell* **134**(3): 485-495 (2008).
- [36] N. Kato, M. Nakanishi, N. Hirashima, "Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells", *Biochemistry* **41**(25): 8068-8074 (2002).
- [37] T. J. Melia, D. You, D. C. Tareste, J. E. Rothman, "Lipidic antagonists to SNARE-mediated fusion", *The Journal of Biological Chemistry* **281**(40): 29597-29605 (2006).

- [38] G. R. Hammond, S. K. Dove, A. Nicol, J. A. Pinxteren, D. Zicha, G. Schiavo, "Elimination of plasma membrane phosphatidylinositol(4, 5)-bisphosphate is required for exocytosis from mast cells", *Journal of Cell Science* **119**(Pt 10): 2084-2094 (2006).
- [39] L. M. Dominak, C. D. Keating, "Polymer encapsulation within giant lipid vesicles", *Langmuir* **23**(13): 7148-7154 (2007).
- [40] L. M. Dominak, C. D. Keating, "Macromolecular crowding improves polymer encapsulation within giant lipid vesicles", *Langmuir* **24**(23): 13565-13571 (2008).
- [41] J. Wilschut, D. Papahadjopoulos, "Ca²⁺-induced fusion of phospholipid vesicles monitored by mixing of aqueous contents", *Nature* **281**(5733): 690-692 (1979).
- [42] Y. Yamashita, M. Oka, T. Tanaka, M. Yamazaki, "A new method for the preparation of giant liposomes in high salt concentrations and growth of protein microcrystals in them", *Biochimica et Biophysica Acta* **1561**(2): 129-134 (2002).
- [43] H. Ostolaza, B. Bartolomé, I. Ortia de Zárata, F. de la Cruz, F. M. Goñi, "Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin α -haemolysin", *Biochimica et Biophysica Acta* **1147**(1): 81-88 (1993).
- [44] C. K. Haluska, K. A. Riske, V. Marchi-Artzner, J. M. Lehn, R. Lipowsky, R. Dimova, "Time scales of membrane fusion revealed by direct imaging of vesicle fusion with high temporal resolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(43): 15841-15846 (2006).

- [45] V. P. Torchilin, R. Rammohan, V. Weissig, T. S. Levchenko, "TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**(15): 8786-8791 (2001).
- [46] N. Kahya, E. I. Pécheur, W. P. de Boeij, D. A. Wiersma, D. Hoekstra, "Reconstitution of membrane proteins into giant unilamellar vesicles via peptide-induced fusion", *Biophysical Journal* **81**(3): 1464-1474 (2001).
- [47] V. Knecht, S. -J. Marrink, "Molecular dynamics simulations of lipid vesicle fusion in atomic detail", *Biophysical Journal* **92**(12): 4254-4261 (2007).
- [48] M. M. A. E. Claessens, F. A. Leermakers, F. A. Hoekstra, M. A. Stuart, "Osmotic shrinkage and reswelling of giant vesicles composed of dioleoylphosphatidylglycerol and cholesterol", *Biochimica et Biophysica Acta* **1778**(4): 890-895 (2008).
- [49] D. D. Metcalfe, D. Baram, Y.A. Mekori. "Mast cells", *Physiol Rev.* **77**(4): 1033-79 (1997).
- [50] M. Peters-Golden, M. M. Gleason, A. Togias, "Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis", *Clin Exp Allergy.* **36**(6): 689-703 (2006).
- [51] J. Rivera, A. M. Gilfillan, "Molecular regulation of mast cell activation", *J Allergy Clin Immunol.* **117**(6): 1214-25 (2006).
- [52] P. S. Thomas, "Tumour necrosis factor-alpha: the role of this multifunctional cytokine in asthma", *Immunol Cell Biol.* **79**(2): 132-40 (2001).

- [53] M. Vig, J. P. Kinet, "Calcium signaling in immune cells", *Nat Immunol.* **10**(1): 21-7 (2009).
- [54] A. M. Gilfillan, C. Tkaczyk, "Integrated signalling pathways for mast-cell activation", *Nat Rev Immunol.* **6**(3): 218-30 (2006).
- [55] Guo Z, Turner C, Castle D., "Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells." *Cell.* **94** (4): 537-48 (1998).
- [56] F. Paumet, J. Le Mao, S. Martin, T. Galli, B. David, U. Blank, M. Roa, "Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein8-containing secretory compartment", *J Immunol.* **164**(11): 5850-7 (2000).
- [57] T. C. Theoharides, D. Kalogeromitros, "The critical role of mast cells in allergy and inflammation", *Ann N Y Acad Sci.* **1088**: 78-99 (2006).
- [58] D. Kitamoto, H. Isoda, T. Nakahara, "Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants from energy-saving materials to gene delivery carriers", *J Biosci Bioeng.* **94**(3): 187-201 (2002).
- [59] J. H. Im, T. Nakane, H. Ynagishita, T. Ikegami, D. Kitamoto, "Mannosylerythritol lipid, a yeast extracellular glycolipid, shows high binding affinity towards human immunoglobulin G", *BMC Biotechnol.* ; **1**: 5 (2001).
- [60] D. A. Hanson, S. F. Ziegler, "Regulation of ionomycin-mediated granule release from rat basophil leukemia cells", *Mol Immunol.* ; **38** (16-18): 1329-35 (2002).

- [61] G. T. Kampen, S. Stafford, T. Adachi, T. Jinguan, S. Quan, J. A. Grant, P. S. Skov, L. K. Poulsen, R. Alam, "Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases", *Blood*. **95**(6): 1911-7 (2000).
- [62] O. Werz, E. Bürkert, L. Fischer, D. Szellas, B. Samuelsson, O. Rådmark, D. Steinhilber, "Extracellular signal-regulated kinases phosphorylate 5-lipoxygenase and stimulate 5-lipoxygenase product formation in leukocytes", *FASEB J*. **16**(11): 1441-3 (2002).
- [63] O. Werz, J. Klemm, B. Samuelsson, O. Rådmark, "5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase -dependent MAPKAP kinases", *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**(10): 5261-6 (2000).
- [64] T. Hibi, N. Hirashima, M. Nakanishi, "Rat basophilic leukemia cells express syntaxin-3 and VAMP-7 in granule membranes", *Biochem Biophys Res Commun*. **271**(1): 36-41 (2000).
- [65] Y. Shu, X. Liu, Y. Yang, M. Takahashi, K. D. Gillis, "Phosphorylation of SNAP-25 at Ser187 mediates enhancement of exocytosis by a phorbol ester in INS-1 cells", *J Neurosci*. **28**(1): 21-30 (2008).
- [66] A. Morgan, R. D. Burgoyne, J. W. Barclay, T. J. Craig, G. R. Prescott, L. F. Ciufo, G. J. Evans, M. E. Graham, "Regulation of exocytosis by protein kinase C", *Biochem Soc Trans*. **33** (Pt 6): 1341-4 (2005).
- [67] R. Hepp, N. Puri, A. C. Hohenstein, G. L. Crawford, S. W. Whiteheart, P. A. Roche, "Phosphorylation of SNAP-23 regulates exocytosis from mast cells", *J Biol Chem*. **280**(8): 6610-20 (2005).
- [68] I. Pombo, S. Martin-Verdeaux, B. Iannascoli, J. Le Mao, L. Deriano, J. Rivera, U. Blank, "IgE receptor type I-dependent regulation of a

- Rab3D-associated kinase: a possible link in the calcium-dependent assembly of SNARE complexes”, *J Biol Chem.* **276**(46): 42893-900 (2001).
- [69] M. Nanamori, J. Chen, X. Du, R.D. Ye, “Regulation of leukocyte degranulation by cGMP-dependent protein kinase and phosphoinositide 3-kinase: potential roles in phosphorylation of target membrane SNARE complex proteins in rat mast cells”, *J Immunol.* **178**(1):416-27 (2007).
- [70] A. E. Aplin, A. Howe, S. K. Alahari, R. L. Juliono, “Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: The role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins”, *Pharmacol Rev.* **50**(2): 197-263 (1998).
- [71] M. B. Penno, F. B. Askin, H. Ma, M. Carbone, M. P. Vargas, H. I. Pass, “High CD44 expression on human mesothelioma mediates association with hyaluronan”, *Cancer J Sci Am* **1**(3): 196-203 (1995).
- [72] H. Fujii, A. Matsuyama, H. Komoda, M. Sasai, M. Suzuki, T. Asano, Y. Doki, M. Kirihata, K. One, Y. Tabata, Y. Kaneda, Y. Sawa, C. M. Lee, “Cationized gelatin-HVJ envelope with sodium borocaptate improved the BNCT efficacy for liver tumors in vivo”, *Radiation oncology* **6**(8): (2011).
- [73] N. Morita, J. Hiratsuka, H. Kondoh, M. Uno, T. Asano, Y. Niki, Y. Sakurai, K. Ono, T. Harada, Y. Imajo, “Improvement of the tumor-suppressive effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma by intratumoral injection of the tyrosinase gene”, *Cancer Res.* **66**(7): 47-53 (2006).

- [74] T. Yamamoto, K. Nakai, A. Matsumura, "Boron neutron capture therapy for glioblastoma", *Cancer Lett.* **262**(2): 143-152 (2008).
- [75] R. F. Barth, M. G. Vicente, O. K. Harling, W. S. 3rd Kiger, K. J. Riley, P. J. Binns, F. M. Wagner, M. Suzuki, T. Aihara, I. Kato, S. Kawabata, "Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer", *Radiat Oncol.* **7**: 146 (2012).
- [76] M. Suzuki, H. Tanaka, Y. Sakurai, G. Kashino, L. Yong, S. Masunaga, Y. Kinashi, T. Mitsumoto, S. Yajima, H. Tsutsui, T. Sato, A. Maruhashi, K. Ono, "Impact of accelerator-based boron neutron capture therapy (AB-BNCT) on the treatment of multiple liver tumors and malignant pleural mesothelioma", *Radiother Oncol.* **92**(1): 89-95 (2009).
- [77] S. Kawai, Y. Takagi, S. Kaneko, T. Kurosawa, "Effect of three types of mixed anesthetic agents alternate to ketamine in mice", *Exp. Anim.* **60**(5): 481-487 (2011).