

博士学位論文

ヒト細胞由来リポソームの
生成と分離に関する研究

山中 誠

目次

第1章 序論	4
1.1 研究背景	4
1.2 研究目的	7
1.3 従来研究	8
第2章 ヒト細胞由来リポソーム 生成技術の構築	14
2.1 緒言	14
2.2 IgM 複合体によるリポソーム生成	14
2.3 薬剤刺激によるリポソーム生成の誘導	17
2.3.1 酪酸ナトリウム刺激によるリポソーム生成誘導処理	17
2.3.2 細胞由来リポソームの生成	18
2.3.3 リポソーム生成誘導処理の薬剤濃度の最適化	19
2.3.4 リポソーム生成の薬剤濃度依存性	20
2.3.5 細胞由来リポソームの安定性の確認	21
2.3.6 結論	21
2.4 細胞膜リポソームを生成する細胞の同定	22
2.4.1 緒言	22
2.4.2 各種細胞株のリポソーム生産誘導実験	22
2.4.3 リポソーム生成が可能な細胞株の同定	23
2.4.4 結論	24
2.5 細胞由来リポソームに担持された膜タンパク質の検出	24
2.5.1 緒言	24
2.5.2 細胞由来リポソームの回収	25
2.5.3 リポソーム膜表面の IgM の検出	26
2.5.4 遺伝子導入により発現したリポソーム膜表面の Glut5 の検出	28
2.5.5 結論	30
2.6 結論	30

第3章	ヒト細胞由来リポソーム 生成分離デバイス	33
3.1	緒言	33
3.2	細胞由来リポソーム生成分離の原理	33
3.3	細胞由来リポソーム生成分離デバイスの設計	34
3.3.1	細胞培養デバイスの条件	34
3.3.2	デバイスの構造	37
3.3.3	デバイスの製作	37
3.4	細胞固定のための表面修飾法の検討	42
3.4.1	緒言	42
3.4.2	細胞膜アンカー	42
3.4.3	細胞膜アンカーによる表面修飾	43
3.4.4	細胞膜アンカーにより基板に固定された細胞の観察	45
3.4.5	結論	46
3.5	微小孔デバイスを用いた細胞由来リポソーム生成分離	46
3.5.1	緒言	46
3.5.2	実験手順	47
3.5.3	微小孔アレイ基板（微小孔径 5 μm ）によるリポソーム生成分離	47
3.5.4	微小孔アレイ基板（微小孔径 3 μm ）によるリポソーム生成分離	51
3.5.5	結論	52
3.6	同調培養の検討	54
3.6.1	緒言	54
3.6.2	細胞周期	54
3.6.3	細胞周期分布の測定	55
3.6.4	同調培養法	57
3.6.5	細胞周期の S 期制御による同調培養	58
3.6.6	同調細胞の細胞周期進行	60
3.6.7	結論	63
3.7	同調培養による細胞侵入の抑制	63
3.7.1	緒言	63
3.7.2	実験手順	63
3.7.3	結果	64
3.7.4	結論	65
3.8	同調培養を利用したリポソーム生成分離実験	65
3.8.1	緒言	65
3.8.2	実験手順	66

3.8.3	結果	66
3.8.4	結論	67
3.9	結論	67
第4章	ヒト細胞由来リポソームの 応用技術	68
4.1	緒言	68
4.2	細胞由来リポソームを用いた薬剤輸送システムの構築	69
4.2.1	緒言	69
4.2.2	ハイブリドーマ由来リポソームによるイムノリポソーム	69
4.2.3	肺腺ガン細胞株 A549 に対する薬剤輸送実験	70
4.2.4	A549 を標的とした抗生物質の輸送	72
4.2.5	結論	74
4.3	膜タンパク質を利用したバイオセンサの構築	75
4.3.1	緒言	75
4.3.2	細胞由来リポソームを固定した QCM センサ	75
4.3.3	膜タンパク質固定センサによるバイオマーカーの検出	81
4.3.4	結論	82
4.4	結論	82
第5章	結論	83
5.1	結論	83
5.2	今後の課題と展望	84
参考文献	87
研究業績	93
A:	学術論文	93
B:	国際学会	93
C:	国内学会	94
謝辞	96

第1章 序論

1.1 研究背景

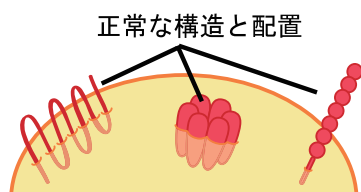
・膜タンパク質研究の重要性

人体を構成する細胞は相互に情報を伝達・制御・共有することで、高度に連携したシステムを構築している。細胞間の情報伝達に使用されているものが、細胞表面に存在するレセプタとそれらに対するサイトカインなどのリガンドである[1]。近年、これらレセプタを対象としたペプチドやタンパク質を用いたバイオ医薬の創薬研究が盛んに行われている[2][3]。これらバイオ医薬は、疾病の原因となるレセプタに直接作用させることで、高い薬理効果が期待できる。また、原因遺伝子や原因レセプタが明らかになることで、難治療性疾患や希少疾患に対する薬剤の開発も可能になると期待されている。これら創薬研究はプロテオミクス研究により得られた知見に基づいて行われる。プロテオミクス研究とは、タンパク質間相互作用を解明する研究などの事を指し、ここで得られた知見はタンパク質の機能を推定する情報となる。タンパク質間相互作用を評価する方法として、従来から様々な研究手法が考案されてきた。例えば、ペプチドアレイによる結合タンパク質の網羅解析[4]、アフィニティークロマトグラフィーによるリガンドの分離、ペプチドマッピングによるリガンドタンパク質の同定[5]、SPR（表面プラズモン共鳴）やQCM（水晶発振子マイクロバランス）を用いたカイネティクス解析などが挙げられる[6]。例えば、レセプタに親和性の高い物質を探索することで、レセプタに結合することでシグナル伝達を阻害し、非常に高い薬理作用を示すブロックバスター型医薬の開発が可能になる。また、レセプタに結合する生体分子を診断マーカーとして検出する臨床検査チップの開発が期待される。このように、レセプタを創薬研究の対象とすることは、創薬・医療技術研究において非常に有効で重要となる。そのため、これら細胞表面のレセプタを構成する膜タンパク質を対象とした研究が注目されている。その一方で、膜タンパク質を用いた研究は、膜タンパク質の性質により生じる取り扱いの難しさから、実験条件の最適化に時間を要してしまい、十分な結果を得られない場合も多い。

・膜タンパクを有するリポソームの生成

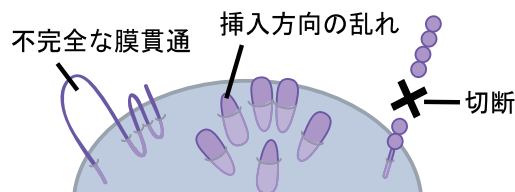
膜タンパク質は細胞膜に対する親和性が高い疎水性の細胞膜貫通部位を有する。そのため、水溶液中では疎水性部位の凝集や親水性の低い器壁表面へ吸着が生じてしまい、単体では不安定である。そこで、リン脂質のミセルやリポソームに担持した状態で使用される。現在の標準的な膜タンパク質を有するリポソームの調製方法は、以下の通りである。まず細胞培養を行い、遺伝子操作などにより膜タンパク質を発現させる。次に、ホモジナイザや界面活性剤を使用して細胞の破碎と溶解を行い、クロマトグラフィーなどにより膜タンパク質の抽出と精製を行う。そうして得られた膜タンパク質を、リン脂質と共にクロロフォルムに溶解し、器壁表面に乾燥してリン脂質二重膜を成膜する。そして、水溶液中で超音波を印加させながら水和させることでリポソームを生成させる[9]。しかし、この手法は、各処理工程で生じた温度変化や衝撃、有機溶媒により膜タンパク質に変性が生じる恐れがある。また、7回膜貫通型タンパク質のように複雑な挿入形態をとるタンパク質は、一度膜から分離すると貫通形態を正確に復元することは困難であり、構造が崩壊して機能が消失する。さらに、挿入方向が制御できないため、外側に提示させるべき部位が逆転して内側に提示されてしまうなどの問題がある。さらに、タンパク質に施された糖鎖修飾も切断される恐れがある。そのため、従来方法に換わる様々なリポソーム生成法が検討されている。また、現在、完全ヒト型膜タンパク質は、生産や精製が困難であることから市場より入手することも困難である。特に、ヒト細胞以外を用いて生産を行った場合、タンパク質の糖鎖修飾の様式が異なることで生理活性が変化してしまうため[10][11]、ヒト本来の膜タンパク質を取得するにはヒト細胞を生産に用いることが求められる。市場から入手できない場合、研究者が目的のヒト由来膜タンパク質を得るためには、遺伝子組み換え技術と細胞培養技術、および分離精製の一連の生産工程を行う必要が生じる。また、多種類の膜タンパク質を用いて検討を行う場合、各々の膜タンパク質に対して生産が必要となるため、実施は容易ではない。そこで、これらを解決する方法として、ヒト細胞に目的の膜タンパク質を発現させ、細胞から直接リポソームを取得する技術の開発が期待される。細胞膜から直接リポソームを生成すれば、本来の構造や糖鎖修飾を維持したまま完全ヒト型膜タンパク質を取得することが可能となる。また、遺伝子操作などにより発現可能な膜タンパク質を利用することが出来る。こうして得られた完全ヒト型膜タンパク質を有する細胞由来リポソームは機能解析や創薬技術への応用が期待できる。これまでに、細胞由来リポソーム生成技術は幾つか報告されているが、強毒性を有する薬剤による処理やウイルスタンパク質の遺伝子導入を行うなど、生産性や安全性に問題がある。そこで、新たに安全性と生産性が高い細胞由来リポソーム生成技術の確立が求められる。Fig.1.1に細胞由来リポソームの利点と従来法の課題について示す。

・細胞由来リポソーム



- ・本来の構造や修飾を保ち、機能が維持される。
- ・遺伝子発現可能な膜タンパク質に適用可能。
- ・糖脂質や脂質ラフト構造を有している。
- ・未知の膜タンパク質も回収できる。

・再構成リポソーム



- ・精製や再構成の間に損傷や失活が生じる。
- ・入手可能な膜タンパク質に適用に限られる。
- ・厳密な脂質組成は再現できない。
- ・クロロホルムなどの有機溶媒を使用する。

Fig.1.1 細胞由来リポソームの利点と従来のリポソームの課題

・細胞培養技術の改善

従来の細胞工学技術は、作業者の熟練に依存した工程が多く、煩雑な手技操作は生産性や再現性を低下させる原因となる。さらに、培養環境が完全には隔離されておらず、外界からの微生物やウイルスによる汚染が常に問題となる。近年では、細胞工学的手法の再現性向上や安全対策を目的として、ロボットを使用した完全自動細胞培養装置の構築が試みられているが、大型の機器を導入する必要があるため一般的ではない。一方、近年、半導体加工技術より派生した微細加工技術を用いて製作したマイクロ流体デバイスが研究されている。マイクロ流体デバイスは、ガラスやシリコンチップ上に形成した数 μm の精密な流路や構造物により構成された微小環境を有している。この微小環境を用いることで、生化学・化学合成や細胞培養操作を効率よく再現性良く行うことが可能となり、従来の製薬プロセスやバイオ技術を一新することが予見されている。しかし、これまでに様々な細胞工学用マイクロデバイスが報告されているが、培養温度や無菌状態の管理が不十分であったり、細胞培養と薬剤刺激が連携されていないなど単一機能のみであったり、複数のチューブ接続や送液ポンプが必要であったりするなどして取扱が煩雑であり、従来の細胞工学技術と大きくかい離したものが多い。そのため、細胞培養用マイクロデバイスを用いて新たな生物学的知見を得たとする報告はまだ少ない。

細胞由来リポソームを用いて、バイオマーカーセンサアレイや膜タンパク質ライブラリの構築を行う場合、生産する膜タンパク質の種類が増加する。それに応じて、多数の細胞株を培養する必要がある。そのため、細胞培養と細胞由来リポソームの生産分離操作への移行を、作業者の熟練に依存しない方法で、かつ複数同時に実施可能な技術の確立が求められる。そこで、本研究では、微細加工技術を用いることで、単純な操作で使用可能な細胞由来リポソーム生成分離技術の構築を試みた。

1.2 研究目的

本研究の目的は、細胞操作技術と微細加工技術を融合し、ヒト細胞から本来の構造や修飾を維持した完全ヒト型膜タンパク質を有する細胞由来リポソームを大量に生成し、かつ効率よく分離する技術を構築することである。これにより、本来の構造や修飾を維持した完全ヒト型膜タンパク質を容易に取得することが可能になれば、遺伝子導入などで発現させた膜タンパク質が直ぐに利用可能になるため、様々な膜タンパク質を対象に研究を行うことが可能になる。さらに、大量培養により膜タンパク質の高い生産量が確保できれば、医薬やセンシング技術などの消費量が多い用途への利用も可能になる (Fig.1.2)。これを実現するにあたり、ヒト細胞の薬剤刺激によるリポソーム生成誘導技術の構築を試みる。人体を対象とした創薬において、ヒト由来タンパク質を指標に用いることで、もっとも生理活性の高い薬剤を開発することが可能となる。ヒト細胞を用いることで、これらの評価に使用できる完全ヒト由来膜タンパク質が得られることが期待できる。次に、微細加工技術を用いたリポソーム生成分離を行うマイクロ流体デバイスの構築を試みる。生成したリポソームは破損が生じ易いため、高粘度溶液を用いる密度勾配遠心分離法などの分離手法は使用できない。この分離工程を、マイクロ流体デバイス内で実現することで、リポソームの生成と、細胞とリポソームの分離を容易にする。具体的には、細胞より孔径の小さい微小孔アレイ有する培養デバイスを構築することで、生産効率を下げることなく、細胞とリポソームを分離する技術の確立を試みる。さらに、薬剤処理による細胞周期制御技術の適用を行うことで、分離効率の向上を試みる。この結果を基に、微小孔アレイを用いた場合の細胞の挙動と、細胞の同調培養が分離効率に与える影響を考察する。また、ヒト細胞より膜タンパク質を生体に近い状態で回収することが可能となれば、それら膜タンパク質の特性を利用した医薬や創薬スクリーニングが構築できるようになると考えられる。そこで、得られた膜タンパク質の医療診断や新薬開発などへの応用技術の検証として、細胞由来リポソーム上の膜タンパク質を用いた DDS (Drug delivery system) や、膜タンパク質に結合する生体分子を検出するバイオセンサの構築を行い、評価を行う。

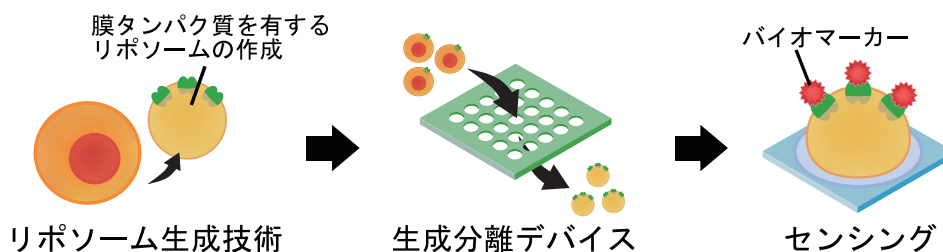


Fig.1.2 膜タンパク質を有する細胞由来リポソームの生成と応用

1.3 従来研究

リポソームは、一般には人工的に作成したリン脂質などの脂質の二重膜からなる小胞のことを指す。リン脂質は疎水性相互作用により自己組織化を生じ、二重膜を形成する (Fig.1.3)。これは、細胞と類似の構造をしていることからもっともシンプルな人工細胞といえる。リポソームは、作成する手法により直径数 10 nm の小さなリポソームから細胞に匹敵する大きさのジャイアントリポソーム(直径 100 μm 以上)まで、種々の大きさのものを作り分けできる。

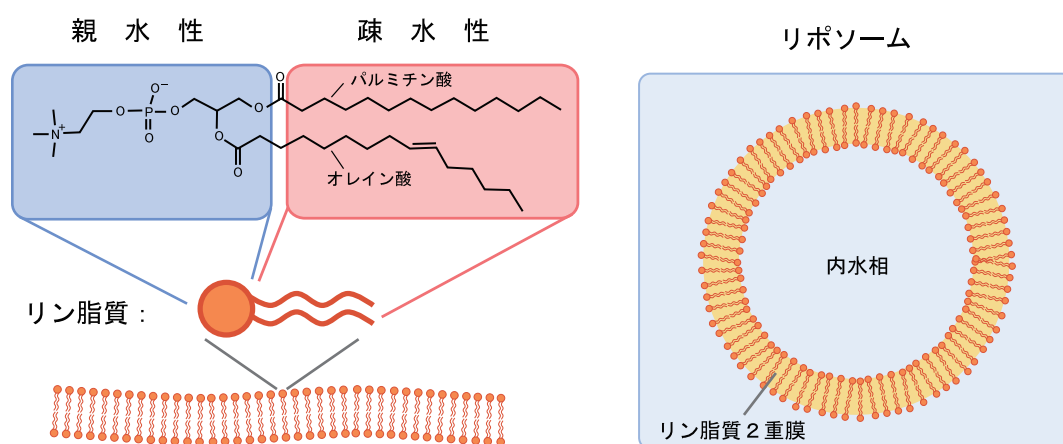


Fig.1.3 リン脂質とリン脂質二重膜の構造

リポソームは、内部の水相に水溶性薬剤や遺伝子、また、リン脂質二重膜内部の疎水性の脂質相には脂溶性薬物を可溶し得ることから、薬剤やタンパク質などの輸送担体として利用されている。リポソームは生体適合性も高く、タンパク質や機能性物質を修飾することで、様々な機能を付加しえるのが特長である。さらに、リポソームは以下のような利点を有する。

1. 非共有結合の集合体であるため、脂質組成、サイズ、荷電などを容易にコントロールできる。
2. 高分子、糖質や抗体など、種々の表面修飾が可能。
3. 毒性が低く、抗原性が低い。
4. 薬剤の膜透過性を制御できる。
5. 脂溶性分子、水溶性分子、両親媒性分子など異なる性質やタンパク質や酵素、核酸などの分子量が大きい溶質を保持できる。

・従来のリポソーム調製方法

現在、リポソーム調製法として用いられる代表的な手法は、リン脂質有機溶液をフラスコ表面にて乾燥してリン脂質薄膜を成膜し、水和させることでリポソームとする水和法である (Fig.1.4). 他にも、水-有機溶媒エマルジョンを減圧・有機溶媒除去を行う有機溶媒除去法、界面活性剤の濃度調節による界面活性剤除去法などが存在する. また、膜タンパク質をリポソームに担持するには、膜タンパク質を界面活性剤の水溶液に溶解し、リン脂質二重膜を成膜する際に添加することで膜に導入する方法がある. これら手法は、調製が簡便である一方、有機溶媒や界面活性剤、振盪操作などを必要とするため、タンパク質などは損傷が生じて本来の機能が失われる恐れがあり、安定した物質にしか適用できない. また、担持した膜タンパク質は、膜への挿入方向が制御できないために挿入向きが逆転が発生する. これらは結合性や機能が変化し、非特異的な反応の原因となる.

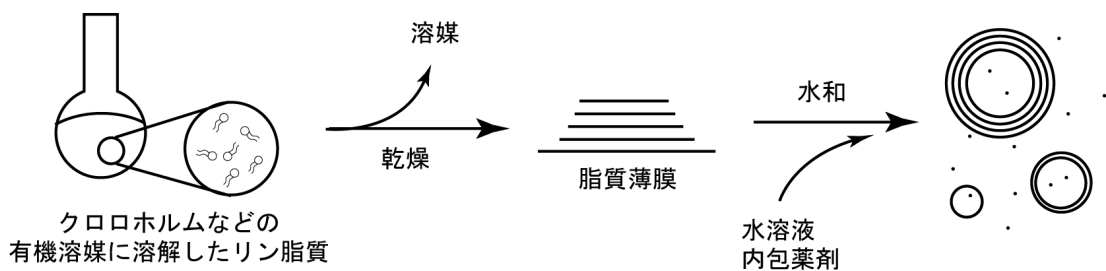


Fig.1.4 水和による調製法

・微小形状を利用したリポソームの生成

Taylor らは、微細加工技術により製作したマイクロパターンを有するスタンプを使用して ITO 透明電極上にリン脂質の成膜を行った後に、水溶液中で交流電圧を印可することで、温和な条件でも効率良く細胞サイズリポソームを生成している (Fig.1.5(a)) [13]. Takeuchi らは、微小孔上に生成したリン脂質二重膜にジェット水流を吹き掛けることで、細胞サイズリポソームを形成している (Fig.1.5(b)) [12]. これらの手法は、調製時間が短縮でき、振盪操作によるストレスが生じないため、安定性に乏しい物質をリポソーム内部に内包できる.

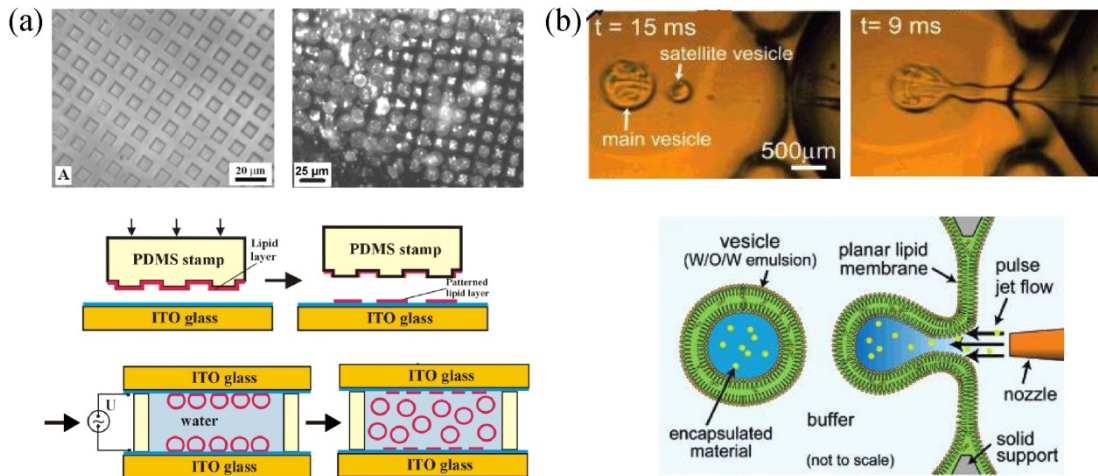


Fig.1.5 効率的な細胞サイズリポソームの形成方法

・膜タンパク質を担持したリポソームの作成

さらに、Takeuchi らは、微細加工技術を用いて製作したマイクロ流路を作成し、その内部でリン脂質溶液を介して水滴を接触させることで、リン脂質二重膜を形成した (Fig.1.6) [16][17][18]. そこに、細胞膜にイオン透過性を付与する膜タンパク質 Gramicidin A や α -Hemolysin を付加することでイオンチャンネルを形成し、細胞膜モデルを構築している. しかし、上記の研究で用いられている膜タンパク質は、水溶性の膜結合型タンパク質であり、強制的に細胞膜に孔を形成して細胞溶解を引き起こす抗生物質としての機能を有する. 従って、本研究の目的とする細胞間シグナル伝達に関わる膜タンパク質とは性質が大きく異なる.

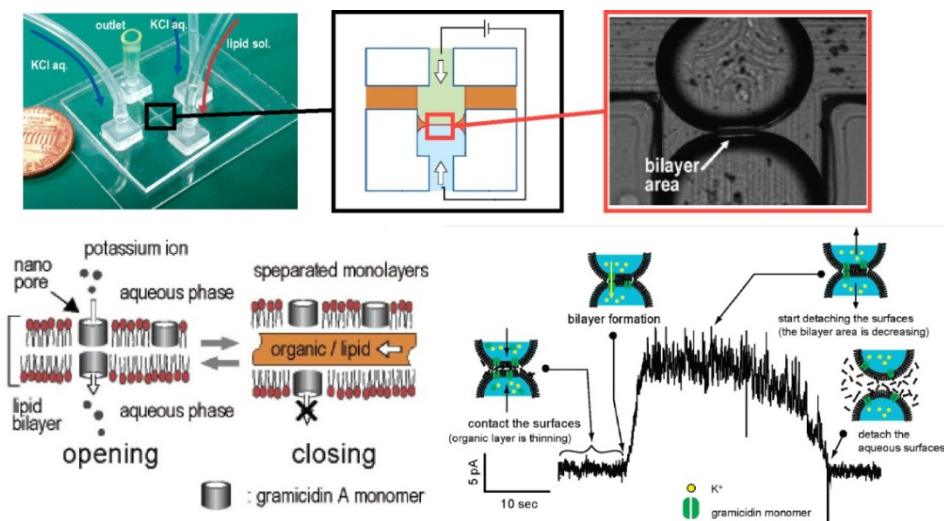


Fig.1.6 マイクロ流体デバイスを用いた細胞膜モデル

・無細胞タンパク質合成系を使用した膜タンパク質リポソームの形成

無細胞タンパク質合成系は、細胞からタンパク質合成機能を抽出したもので、細胞を使用せずにタンパク質の合成が可能となる。Shimono らは、界面活性剤としてコール酸を含む溶液にリン脂質を分散した後、無細胞タンパク質合成を行うことで膜タンパク質を溶解した状態で合成している (Fig.1.7(a)) [19]. そして、コール酸を徐々に除去することで、リン脂質二重膜を段階的に集合させ、最終的に膜タンパク質を有するリポソームが得られる。Akiyoshi らは、成膜したリン脂質二重膜を水和する際に、膜タンパク質遺伝子を加えた無細胞タンパク質合成系溶液を添加することで、膜タンパク質を有するリポソームを生成している (Fig.1.7(b)) [20]. 細胞間の物質移動に関わる膜タンパク質 Connexin を使用し、形成途中のリポソーム内部に無細胞タンパク質合成系を輸送することで、リポソーム内部で合成した膜タンパク質を有するリポソームが形成される。さらに、このリポソームを使用して細胞への蛍光物質や遺伝子の輸送を実現している。しかし、これら手法で得られた膜タンパク質は糖鎖修飾がなされていない。

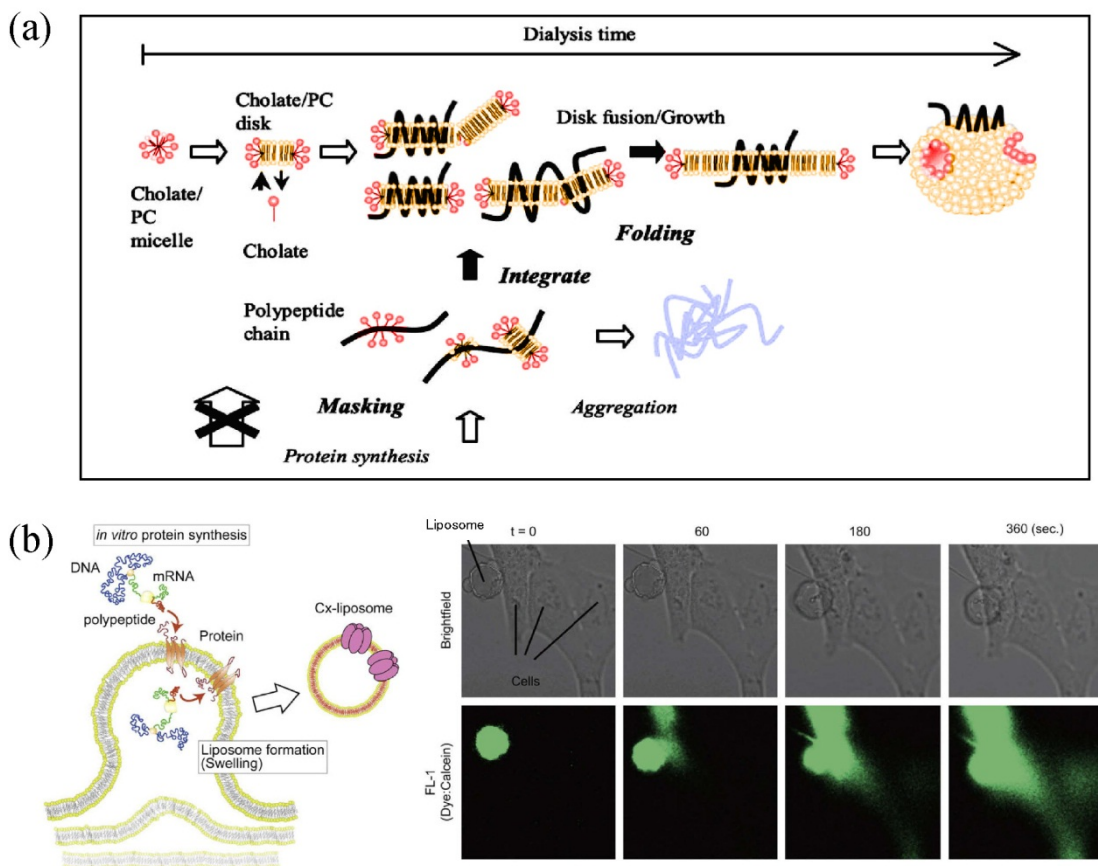


Fig.1.7 無細胞タンパク質合成系を使用した膜タンパク質リポソーム

・細胞由来リポソーム

細胞に薬剤処理や遺伝子導入を行うことでリポソームを生成させ、細胞膜を分離する方法はいくつか報告が成されている。

Baird らは、細胞膜を架橋剤のアルデヒドで架橋処理した後に、低浸透圧の細胞外液を用いることで細胞膜を膨張させ、細胞サイズのリポソームを分離する方法を報告している (Fig.1.8(a)) [21]. この手法は、細胞膜脂質の研究を目的としたものであり、架橋剤による膜タンパク質の変成が生じる。また、リポソーム形成率は処理細胞の 5 %程度と効率は低く、リポソームを形成するために複数回の溶液の交換が求められるため、製造プロセスも煩雑となる。

Vogel らは、細胞に細胞骨格形成を阻害する薬剤である Cytochalasin B を作用させることで、細胞膜上に微小な小胞形成させ、それらを分離する方法を報告している (Fig.1.8(b)) [22]. この方法は、リポソームを大量に生産できる一方、Cytochalasin B は毒性の強い薬剤であることから、取得したリポソームを細胞刺激に用いるなどの細胞実験に使用するには十分な洗浄が必要となり、容易に使用することができない。また、Garnier らは、レンチウイルス生産用細胞株に細胞膜の裏打ち構造となるタンパク質を遺伝子導入により発現させることで、細胞膜上の膜タンパク質を有する 100 nm 程度のウイルス類似粒子を生産している (Fig.1.8(c)) [23]. この技術は、十分に確立された技術である一方、生産細胞株が限られ、粒子生成の度に遺伝子導入が必要となる。また、ウイルスタンパク質により構成されるため、免疫学的評価を試みる際に、ウイルスタンパク質に対する排除反応が生じることが懸念される。そのため、得られたリポソームを直接使用する応用技術の開発には制限が生じる。しかし、これらの手法で得られた細胞由来リポソームは、細胞が有する膜タンパク質を正常な状態のまま引き継いでいると考えられる。また、細胞膜上のコレステロールなどにより構成される脂質ラフト構造も引き継いでいると考えられる。この、脂質ラフト構造は膜タンパク質の正常な機能発現に重要である[24][25][26].

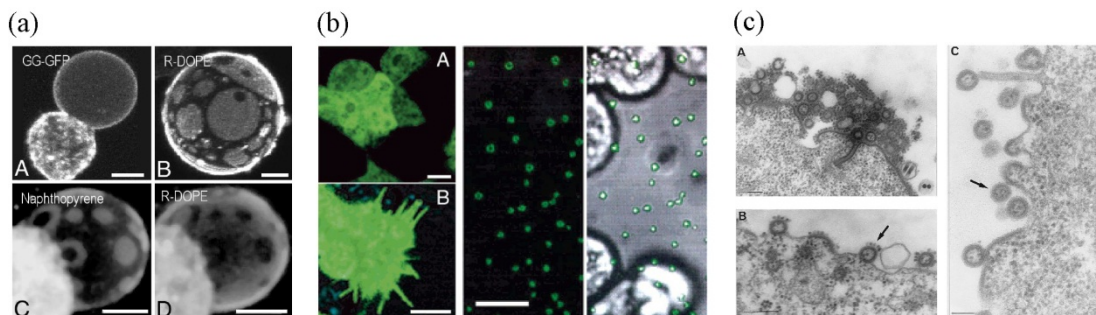


Fig.1.8 細胞由来リポソームの作成

論文構成

本論文は、5章より構成される。以下に、各章の概要を紹介する。

第1章 序論

膜タンパク質の有用性と課題，研究の目的，膜タンパク質とリポソームに関連する従来研究について述べた。

第2章 ヒト細胞由来リポソーム生成技術の構築

薬剤刺激を用いて細胞から直接リポソームを取得する手法について述べた。

第3章 ヒト細胞由来リポソーム生成分離デバイス

製作した微小孔を用いた細胞由来リポソームの効率的な生成分離デバイスの構築について述べた。また，製作したデバイスを用いた細胞由来リポソームの生成分離実験について述べた。さらに，細胞由来リポソームの生成分離効率を向上するための細胞周期制御と微小孔侵入抑制について述べた。

第4章 ヒト細胞由来リポソームの応用技術

細胞由来リポソームの応用方法として，DDS やバイオセンサの構築について述べた。

第5章 結論

本研究の結論をまとめ，今後の展望について述べた。

第2章 ヒト細胞由来リポソーム

生成技術の構築

2.1 緒言

ヒト由来膜タンパク質を取得するには、ヒト由来細胞より膜タンパク質を有するリポソームを取得する方法が最も適していると考えられる。また、細胞サイズのリポソームは取扱いが容易である。そこで、ヒトリンパ球細胞より細胞由来リポソームを生成し、細胞膜と共に膜タンパク質を取得する手法を検討した。また、細胞由来リポソームの生成技術の最適化を行い、生産量の向上を試みた。こうして得られた細胞由来リポソームの表面に、膜タンパク質が存在するか評価を行った。同様に、遺伝子操作技術により発現させた膜タンパク質についても評価を行った。

2.2 IgM 複合体によるリポソーム生成

Biardらは、アルデヒドを用いて細胞膜表面の膜タンパク質を架橋し、連結した複合体を形成させることで細胞膜を強化し、細胞から細胞サイズのリポソームを生成している[21]。すなわち、何らかの方法で細胞膜上に連結する複合体を形成することで、アルデヒドなどの架橋剤を使わなくともリポソームを生成できると考えられる。ところで、免疫担当細胞のBリンパ球は、抗体(Immunoglobulin: Ig)と呼ばれるタンパク質を生産する。抗体は、遺伝情報に依存せずに様々な構造を作り出す可変領域と、細胞の成熟状態により構造が変化する定常領域を有している。B細胞が未成熟な時期に生産されるIgMには、膜上でレセプタとして機能する単量体の膜型IgMと、血中に分泌されて異物の排除を行う多量体の分泌型IgMが存在する(Fig.2.1)。これらは定常領域の末端以外の構造は共通の構造を有している[28]。

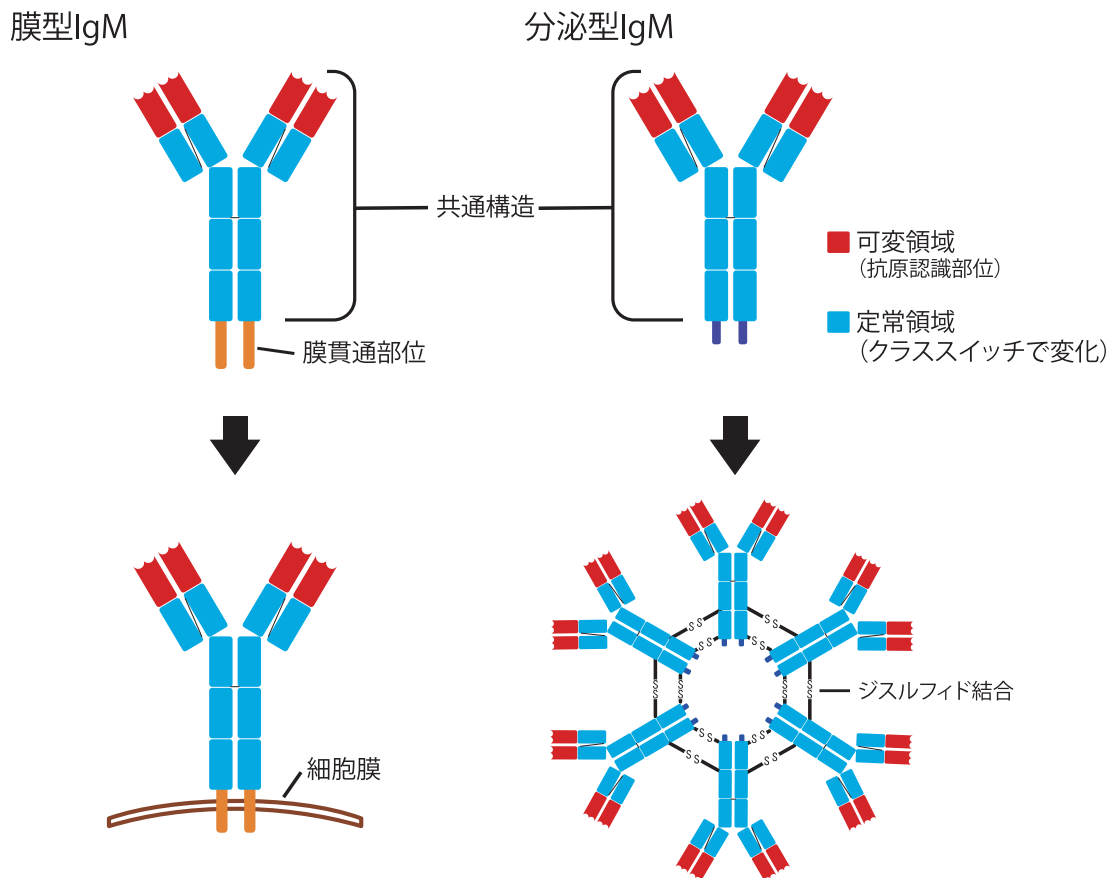


Fig.2.1 IgM 抗体の構造

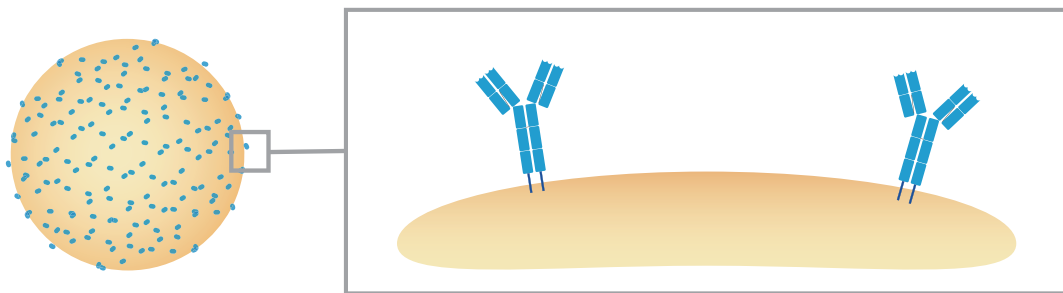
ここで、分泌型 IgM が複合体を形成しているように、構造が類似している膜型 IgM も分泌膜型 IgM と複合体を構成可能であると考えられる。これにより、細胞膜上に複合体が形成できれば、細胞膜が強化され、リポソーム形成が可能になると考えられる。しかし、細胞膜と膜タンパク質は、細胞骨格を形成するタンパク質による裏打ち構造により保持されており、形状や位置は自然には変化しない。膜型 IgM も自由な移動が制限されて複合体を形成出来ないと考えられる。そこで、薬剤処理することで細胞にアポトーシスを誘導し、細胞骨格を消失させることで細胞膜の流動性を上げてリポソームの形成が可能になると考えられる。

IgM の介在によりリポソームが形成する原理として以下が考えられる (Fig.2.2)。

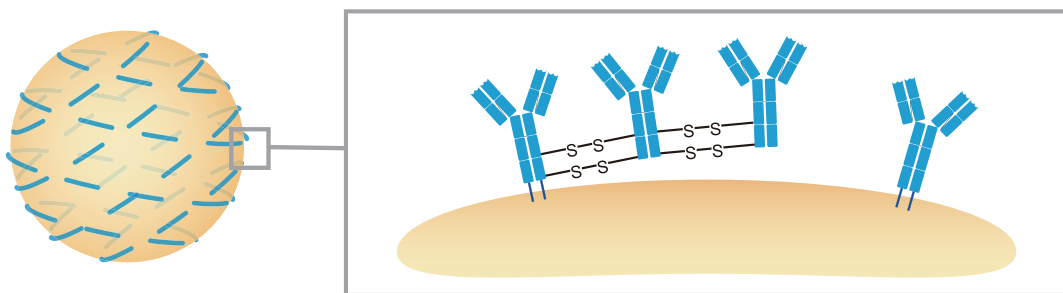
1. 薬剤により細胞にはアポトーシスが生じる。
2. 細胞膜上に存在する膜型 IgM と分泌型 IgM の間にジスルフィド結合が形成され、連結が生じて細胞膜上に複合体が形成される。

3. 細胞膜上にリンク状の構造物が形成され、膜の安定性が向上する。
4. 細胞内浸透圧バランスが崩れ、細胞膜が成長し小胞が形成される。
5. 小胞がある程度大きくなると、細胞との間のくびれ部分が閉じ、リポソームが形成される。

• 点在するリポソーム膜上の膜型IgM



• 膜型IgMと分泌型IgMの複合体形成



• リポソーム膜強度の亢進

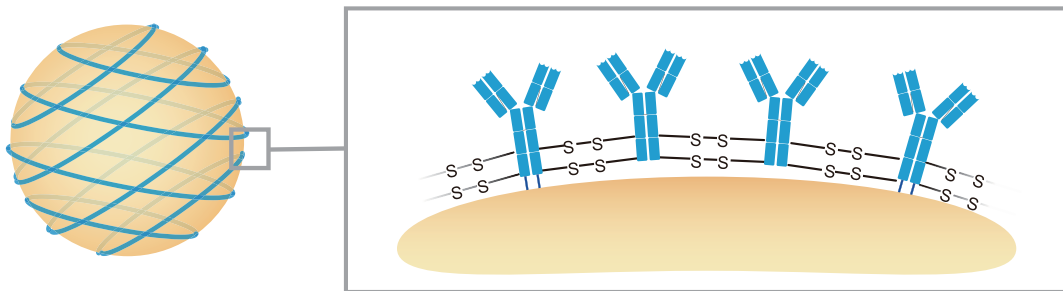


Fig.2.2 リポソーム膜上における IgM 複合体の形成

2.3 薬剤刺激によるリポソーム生成の誘導

2.3.1 酪酸ナトリウム刺激によるリポソーム生成誘導処理

細胞には、薬剤感受性が高く IgM 抗体を大量に生産するバーキットリンパ腫由来 B 細胞由来株 Ramos を使用した[29][30]。この細胞は、増殖速度が 20 時間程度と短いことや、浮遊性細胞であることから、大量培養に適した細胞である。この細胞に薬剤処理によりアポトーシスを誘導し、リポソーム生成誘導処理とした。

リポソーム形成誘導に用いる薬剤を検討した。アポトーシス誘導薬剤として報告が多い薬剤は、Actinomycin D などの強力な抗生物質である。これらは、薬剤処理後の生成物を細胞試験などに使用することを目的とする場合、残留薬剤による副作用の発生が懸念される。一方、効果は低いですが、同様にアポトーシス誘導を行う薬剤としてヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC, Histone deacetylase) の阻害剤が挙げられる。遺伝子から RNA の合成を行う過程において、クロマチン (DNA-ヒストン複合体) 中のヒストンがアセチル化されることで凝集状態が解除され、転写因子や RNA ポリメラーゼの結合が促進される。これを凝集状態に復元する酵素は HDAC である。ここで、HDAC の機能が阻害されると、遺伝子は異常に活性化された状態となる。これにより細胞に過剰なストレスが生じ、アポトーシスが誘導される。高い阻害効果を有する HDAC 阻害剤として報告されている Trichostatin A や Apicidin は、有効濃度が nM オーダーと低いため、微量でも薬剤が残留すると副作用が発生することが懸念される。一方、低分子の飽和脂肪酸塩である酪酸ナトリウムも HDAC を阻害する作用を示す。酪酸ナトリウムは、低濃度では、物質生産の亢進や細胞の分化・脱分化を促す作用があり、高濃度では増殖停止やアポトーシスが生じることが報告されている[31][32][33]。そして、酪酸ナトリウムがアポトーシス誘導効果を示すためには 1~10mM 程度の高濃度が求められる。また、低分子であることから細胞内への残留が生じにくく、除去が容易となる。さらに、ヒト大腸内にも存在することから、アレルギーの原因物質となる恐れも少ない。以上より、酪酸ナトリウムをリポソーム生成に用いるアポトーシス誘導薬剤として使用した。

細胞の薬剤処理は次の手法にて行った。まず、細胞を最も物質生産が盛んとなる対数増殖期を維持するように培養した。その後、培養液を、酪酸ナトリウムを 10 mM に調製した 10 %FBS-ERDF (極東製薬) 培地に交換し、細胞密度 4×10^5 cells/ml に調製した。次に、培養液を 35 mm 培養シャーレに 2 ml 分注し、37 °C の 5 %CO₂ インキュベータで培養を行った。薬剤刺激 25 時間後、リポソームの生成を顕微鏡観察にて確認した。

2.3.2 細胞由来リポソームの生成

Ramos の酪酸ナトリウムの高濃度処理により，細胞サイズの細胞由来リポソームが生成することが認められた (Fig.2.3)．また，細胞密度 $2\sim 6 \times 10^5$ cells/ml で継代維持した細胞においてリポソームの生成が多く生じた．これは，対数増殖期の細胞は活性が高く，細胞膜や内在のタンパク質も新生したばかりのものであるため強度や酵素活性が高いためと考えられる．細胞状態の悪化は，IgM 生産量の低下や細胞膜の損傷，ネクロシス（細胞壊死）の原因となり，リポソーム生成率減少の原因となると考えられる．

薬剤刺激後の細胞は，以下のような挙動でリポソームの形成を行った (Fig.2.4)．

1. 細胞は，酪酸ナトリウムの薬剤師激によりアポトーシスを生じた．一時的な細胞膜の変形であるブレッピングが認められた．
2. その後，細胞膜の一部が膨張を開始した．
3. 細胞膜がおおよそ細胞サイズになると，外力を必要とせず自然に細胞から乖離した．また，薬剤誘導からリポソームが形成するまでおおよそ 20 時間を要した．

細胞由来リポソーム

ヒトリンパ球細胞

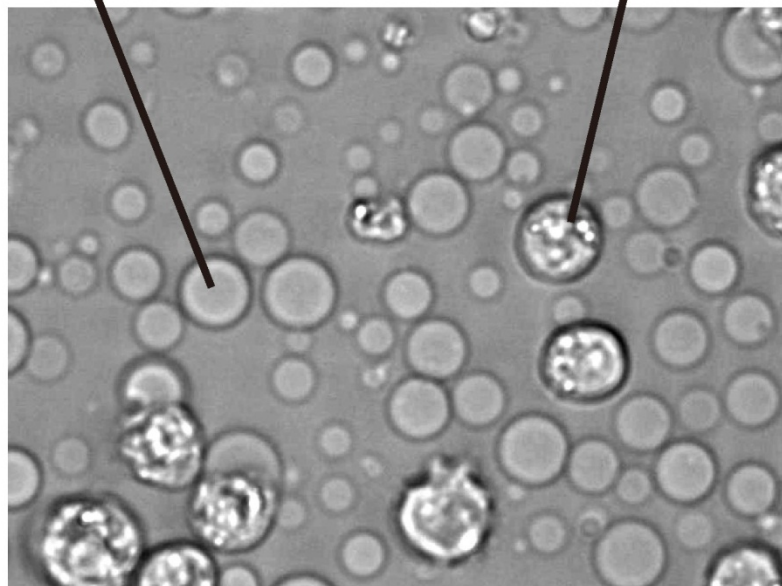


Fig.2.3 ヒトリンパ球から生成された細胞由来リポソーム

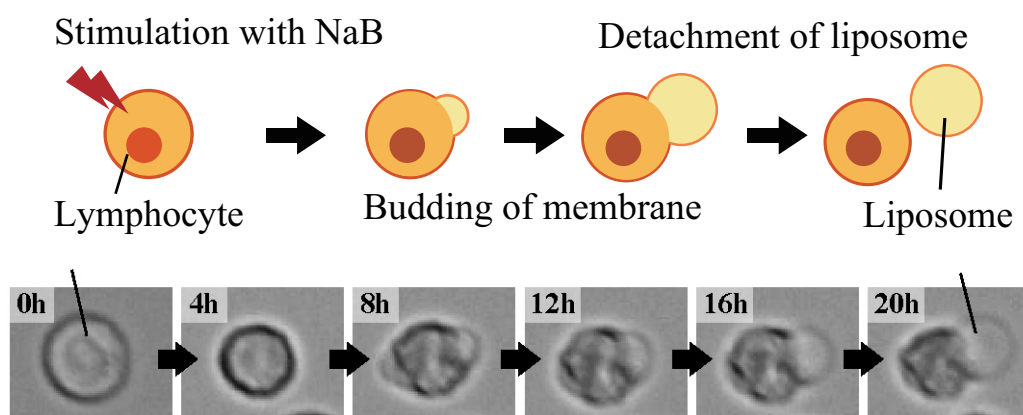


Fig.2.4 リポソーム形成プロセス

生成したリポソームは、内部に核を含まない。しかし、形成時には細胞膜や細胞質は細胞と一体になっていることから、膜タンパク質や細胞質に由来するタンパク質やRNAなどを内包していると考えられる。また、リポソーム生成した細胞は、死滅してしまうため、リポソームの生成は一度しか誘導できない。

2.3.3 リポソーム生成誘導処理の薬剤濃度の最適化

酪酸ナトリウムは、培地中に高濃度で存在する場合は細胞にアポトーシスを誘導するが、低濃度では細胞に加わる刺激が不十分となり、リポソームが生成されない恐れがある。また、もっとも効率よくリポソームを得られる薬剤刺激濃度を同定するためにも、種々の酪酸ナトリウム濃度にて細胞を刺激することでリポソーム生成誘導の薬剤濃度依存性を評価した。また、比較実験として、無血清培地を用いて試験を行った。これは、血清に含まれる成分が、細胞の恒常性向上の作用や、薬剤の吸着を起こすことで、薬剤刺激が軽減される恐れがあるため、これを除去する為に行った。

培養液を、酪酸ナトリウムを 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 10 mM にそれぞれ調製した 10 %FBS-ERDF 培地に交換し、細胞密度 2×10^5 cells/ml に調製した。次に、これら培養液を 24 ウェル培養プレートに各ウェルに 1 ml ごと分注し、37 °C の 5 %CO₂ インキュベータで培養を行った。薬剤刺激 25 時間後、リポソーム生成量を調べるために培養液を回収し、血球計算盤を用いて培養液中のリポソーム密度の計測を行い、リポソーム生成率の測定を行った。それらの結果より、酪酸ナトリウム濃度のリポソーム生成効率に対する影響を評価した。また、血清代替品として、10 µg/ml Insulin, 35 µg/ml Transferrin, 10 mM Ethanolamine, 2.5 nM Sodium Selenite (ITES) を添加した ERDF 培地を用いて酪酸ナトリウム添加培地を調製し、同様の評価を行った。

計測にはビルケルチュルク式血球計算盤（メルク社）を用いて、培地中のリポソーム密度を計測した。また、細胞密度に対するリポソーム密度より、リポソーム生成率を算出した。

2.3.4 リポソーム生成の薬剤濃度依存性

実験の結果を以下に示す。基本培地に FBS-ERDF 培地を用いた場合には、酪酸ナトリウム添加濃度 0.5 mM 付近よりリポソーム生成が生じ始めた (Fig.2.5)。また、5 mM 以上になると著しくリポソーム生成量が増加した。また、ITES-ERDF 培地を用いた場合には、薬剤刺激がなくとも 10 %程度のリポソームが生じた (Fig.2.6)。また、酪酸ナトリウム刺激を行った場合には、5 mM においてリポソーム量とリポソーム生成率は最大値となり、薬剤処理を行った細胞数に対して生成されたリポソーム数の割合は 50 %を示した。

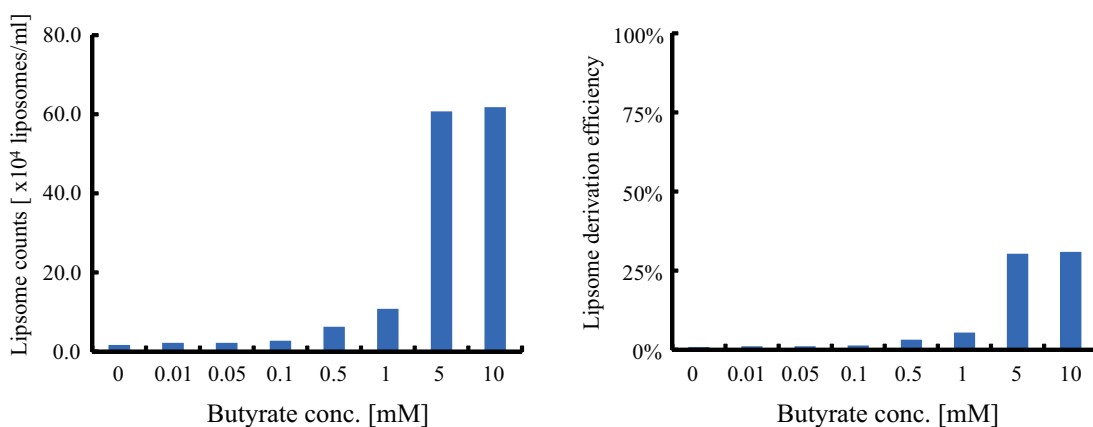


Fig.2.5 血清含有培地下におけるリポソーム生成率の薬剤濃度依存性

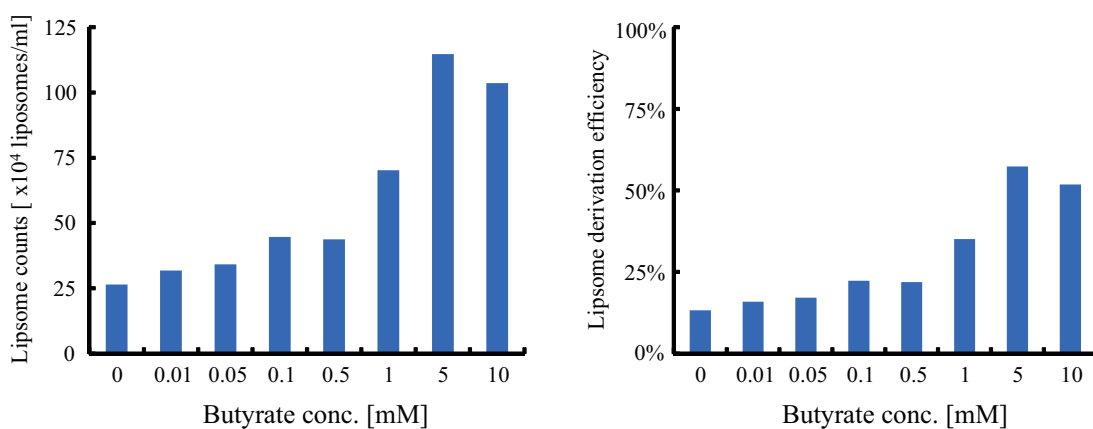


Fig.2.6 無血清培地下におけるリポソーム生成率の薬剤濃度依存性

2.3.5 細胞由来リポソームの安定性の確認

得られたリポソームは、4 °Cに冷却した状態で5~7日の間形状が保たれた。細胞由来リポソームの膜は、細胞と同様に高いタンパク比率を有しており、タンパク質分解酵素の影響を受けると考えられる。タンパク質分解酵素阻害剤を添加することで、安定して保存することが出来ると考えられる。

・細胞膜の完全性

リポソーム膜の孔の有無を確認する為に、細胞由来リポソーム分散液に Trypan Blue 細胞染色液を用いたりポソームの染色試験を行った。Trypan Blue は細胞の生死判断に使用される色素染料であり、生細胞の場合は細胞膜に損傷による穴が存在しないことから、細胞は膜を透過出来ず、細胞質は染色されない。一方、死細胞の場合は、細胞膜に損傷による穴が発生することから細胞質が染色される。試験の結果、リポソーム内部は染色されなかったことから細胞膜に孔は存在せず、完全な膜を有していることが認められた (Fig.2.7)。

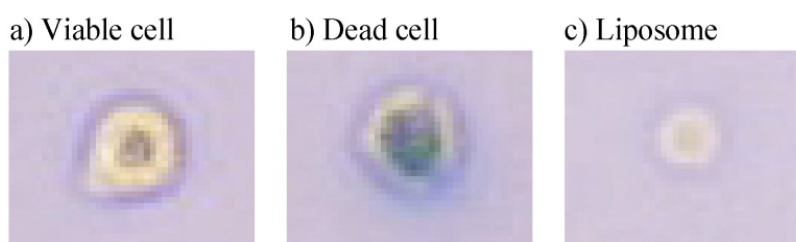


Fig.2.7 色素溶液中の細胞とリポソーム

・還元処理による表面のチオール結合の分解

Dithiothreitol (DTT) はタンパク質分析において、タンパク質分子中のジスルフィド結合の還元で使用される。また、血液検査において IgM の複合体分解による失活処理にも使用される。そこで、DTT を細胞由来リポソーム分散液に 10 mM になるように添加し、37 °Cに加熱した。試験の結果、リポソーム膜の崩壊が認められた。

2.3.6 結論

細胞は、高濃度の酪酸ナトリウムで処理したときにリポソームを生成した。血清含有培地を用いた場合、酪酸ナトリウムが 5 mM 以上になるとリポソームの生成量が急激に増加した。また、無血清培地を用いた場合では、より多くのリポソームの生成が生じた。しかし、酪酸ナトリウム 5 mM 添加時よりも、10 mM 添加時にてリ

ポソーム生成量が減少したのは、高濃度薬剤刺激により細胞膜の損傷とネクローシス（壊死）が生じ、リポソーム生成を行った細胞が減少したためと考えられる。また、薬剤を添加しない場合でも若干リポソームが生じたのは、細胞にストレスがかかりアポトーシスが誘導されたと考えられる。

この細胞由来リポソーム生成技術により得られた細胞由来リポソームは安定性が高く、孔が無い完全な膜を有していることが認められた。その一方で、還元剤の処理により崩壊が生じたことから、リポソーム膜の維持には表面の膜タンパク質間に生じたジスルフィド結合が寄与していることが認められた。

2.4 細胞膜リポソームを生成する細胞の同定

2.4.1 緒言

接着細胞などがアポトーシスを生じても、リポソームは生成することはない。よって、酪酸ナトリウム刺激によるリポソーム生成現象は細胞株に依存していると考えられる。様々な細胞株に対してリポソーム生成の誘導処理を行うことで、リポソームを生成する細胞株を同定する。細胞株はそれぞれ発現するタンパク質が異なるため、リポソーム生成が可能な細胞株に共通の特性から、リポソーム形成の原理を類推することが可能になる。

2.4.2 各種細胞株のリポソーム生産誘導実験

既にリポソームを形成することが明らかな Ramos は B リンパ球由来細胞株である。そこで、血球系細胞を中心に生成試験を行った。使用した細胞株を下記に記す。

・バーキットリンパ腫由来細胞株 (Ramos (RA1) (JCRB9119), Nawalwa (IFO50040)) : IgM 抗体を生産する未成熟 B 細胞由来株。両細胞株とも Epstein-Barr ウイルスの感染の影響で遺伝子の一部が転座し、細胞の未成熟化に関与する c-Myc が過剰発現することにより無限増殖能を得た未成熟 B 細胞に由来する。球状の浮遊性細胞で、培養器壁面には接着しない。

・T 細胞由来細胞株 (Molt4 (JCRB9031)) : ヒト急性リンパ芽球性白血病由来 T 細胞株。T 細胞は免疫系のコントロールを行う細胞であるので抗体生産能は有さない。浮遊性細胞で、培養器壁面には接着しない。

・ハイブリドーマ (HB4C5, AE6, BD9) : HB4C5 は肺がん患者のリンパ球と Nawalwa

由来融合パートナー細胞株 NAT-30 との細胞融合株であり，抗肺がん IgM 抗体を生産する[34][35]．AE6 と BD9 は，Molt4 由来融合パートナー細胞株 A4H12 と肺がん抗原を用いて体外免疫法にて活性化したヒト末梢血リンパ球を細胞融合することにより樹立されたハイブリドーマ細胞株である[36][37]．AE6 は IgM 抗体，BD9 は IgG 抗体を生産する．いずれも浮遊性細胞で，培養器壁面には接着しない．

- ・赤芽球由来細胞株 (K562 (JCRB0019))：赤血球の前駆細胞である赤芽球より樹立された細胞株．抗体生産能は有さない．浮遊性細胞であり，培養器壁面には接着しない．

- ・ヒト末梢血リンパ球由来細胞株 (PBCL-1)：正常ヒト末梢血リンパ球を，変異原性を有する MNNG (N-methyl N'-nitro N-nitrosoguanidine) と PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) を用いて薬剤処理を行うことで変異誘導を行い，安定増殖する細胞を分離して樹立した細胞株である．IgM 抗体を生産する．1～2 本の細い仮足を有する浮遊性細胞であり，培養器壁面には接着しないが，細胞同士が集まった密度の粗いコロニーを形成する．

- ・単球細胞株 (U937 (JCRB9021))：単球細胞 (未成熟マクロファージ) 細胞．浮遊性細胞であり，培養器壁面には接着しない．PMA により活性され，マクロファージに分化する．

これらの細胞株を，10 mM 酪酸ナトリウムを含有する FBS-ERDF 培地にて薬剤刺激培養を行った．薬剤刺激 25 時間後，リポソーム生成の有無を顕微鏡観察にて確認した．

2.4.3 リポソーム生成が可能な細胞株の同定

試験の結果，IgM 抗体を生産する細胞にのみリポソームの生成が生じた (Fig.2.8)．このことから，IgM 抗体がリポソームの形成に深く関与することが示唆される．また，細胞種によってリポソームの生成に要する時間に差異が見られた．もっとも生成が早く大量に生じたのはバーキットリンパ腫由来細胞株を用いた場合であった．

細胞株名	由来・種類	抗体生産	リポソーム形成
Ramos (RA1)	Bリンパ細胞株	IgM	○
Nama Iwa	Bリンパ細胞株	IgM	○
PBCL-1	Bリンパ細胞株	IgM	○
HB4C5	ヒト-ヒトハイブリドーマ	IgM	○
AE6	ヒト-ヒトハイブリドーマ	IgM	○
BD9	ヒト-ヒトハイブリドーマ	IgG	×
Molt-4	Tリンパ細胞株	-	×
U937	単球系前駆細胞株	-	×
K562	赤芽球様細胞株	-	×

Fig.2.8 細胞腫とリポソーム生成能

2.4.4 結論

ウイルス変異によるバーキットリンパ腫を由来とする IgM 生産細胞株のみならず、正常ヒト末梢血リンパ球由来細胞株においてもリポソームが生成されたことから、ウイルスによる変異はリポソーム生成には関与しないと考えられる。また、抗体生産能を有さない Molt-4 はリポソームを生産しないが、Molt-4 と正常ヒト末梢血リンパ球の融合細胞であるハイブリドーマにおいては IgM 生産株のみにリポソームの形成が認められ、IgG 生産株にはリポソーム生産が認められなかった。これらの由来が類似している細胞株においても、IgM 生産株のみにリポソームの形成が生じたことから、リポソームの生成には IgM が関連している可能性が非常に高いことが認められた。

2.5 細胞由来リポソームに担持された膜タンパク質の検出

2.5.1 緒言

得られた細胞由来リポソームを評価に使用するためには、細胞由来リポソーム膜上に膜タンパク質が存在することを確認する必要がある。そこで、培養液から細胞由来リポソームを回収し、膜タンパク質発現の評価を行った。しかし、得られる細胞由来リポソームは少量であるため、大量の試料を必要とする電気泳動やクロマトグラフィーによるタンパク質解析は行えない。そこで、測定粒子一個で検出が可能な蛍光抗体染色法を用いて評価を行った。

2.5.2 細胞由来リポソームの回収

生成直後の細胞由来リポソームは、生成細胞と混在した状態である。そこで、以下の方法にて分離回収を行った (Fig.2.9)。

1. 培養用シャーレに細胞固定用糊としてムラサキガイ由来接着ペプチドの Cell-Tak (BD) を全面に塗布する。
2. シャーレに PBS で攪拌した細胞を播種する。細胞が底面に沈降して細胞が固定されるまで、インキュベータ内で 10 分静置する。
3. 静置後、固定されなかった細胞を除去するために培地で洗浄する。(細胞が剥がれないように水流が直接当たらないように行う。)
4. 酪酸ナトリウムを含む培養液をシャーレに注入し、リポソーム生成を誘導する。
5. およそ 25 時間経過してリポソームが生成した後、細胞が混入しないように培養液の上方のみを回収する。細胞は Cell-Tak 処理面から剥がれても、核を内包し比重が高いため底面に沈降している。一方、リポソームは核を有さないため培地中を浮遊しているものが存在する。上方の上澄みのみを採取することで、リポソームを選択的に回収することが可能となる。

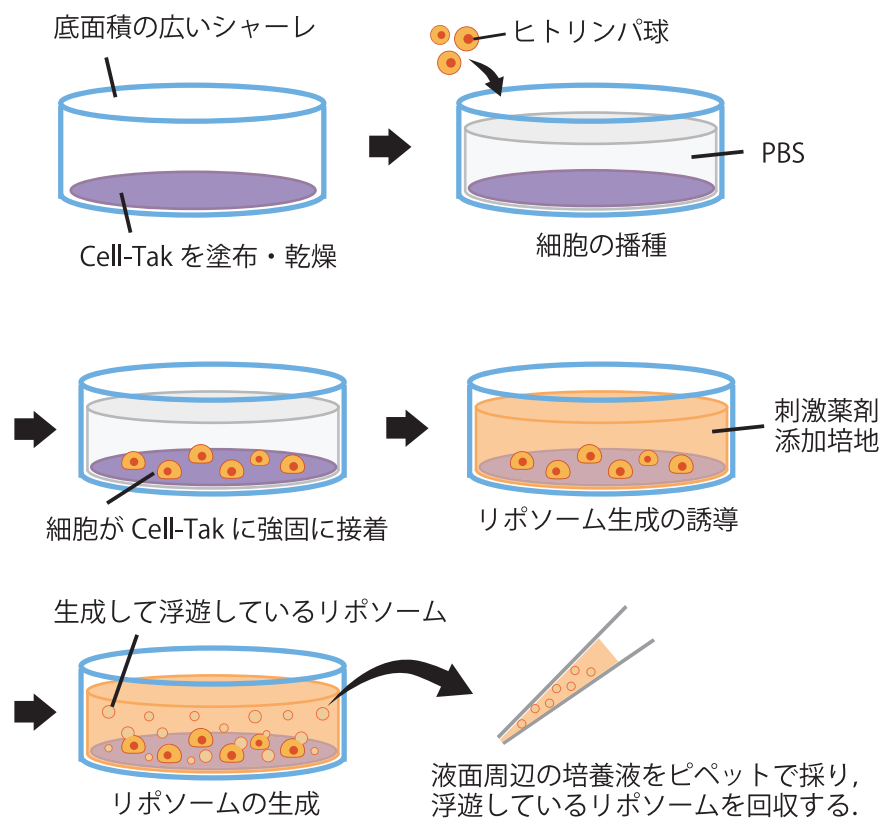


Fig.2.9 シャーレを用いたリポソーム分離法

2.5.3 リポソーム膜表面の IgM の検出

本検討で使用した Ramos は IgM 抗体を大量に生産することから、細胞膜表面にも高密度の IgM 抗体が存在すると考えられる。この細胞よりリポソームを取得したため、リポソーム膜表面にも IgM 抗体が存在すると考えられる。評価には抗原抗体反応による蛍光染色法を使用した。評価は以下の行程にて行った (Fig.2.10)。

1. 細胞を通常培養する。
2. 薬剤添加培地を使用してリポソーム生成を誘導する。
3. リポソームを含む培地を回収する。
4. 観察用カバーガラスに Cell-Tak を塗布する。
5. 遠心分離により培地を除去し、PBS に置換する。(Cell-Tak は血清タンパク質の吸着により細胞接着能が低下するため、血清を含む培地を洗浄する必要がある。)
6. Cell-Tak 塗布面に細胞リポソーム混合液を滴下し、底面に沈降して固定されるまで 10 分室温静置する。
7. 4 °C に冷却した PBS で洗浄する。リン脂質二重膜で構成される細胞膜は 37 °C 付近では液晶状態で流動性を有するが、冷蔵することで結晶質となり硬度が上昇する。これにより染色中の溶液交換に伴うせん断力による細胞膜の損傷を抑制することが出来る。
8. 非特異結合を抑制するために、10 %FBS/PBS を滴下し、30 分室温静置する。
9. 4 °C に冷却した 1 %FBS/PBS で洗浄する。
10. FITC 標識済み抗 IgM 抗体を含む 10 %FBS/PBS を滴下して 30 分室温静置する。
11. 4 °C に冷却した 1 %FBS/PBS で洗浄する。
12. 4 °C に冷却した PBS で洗浄する。
13. カバーガラスに蛍光褪色防止剤を塗布したスライドガラス上にマウントしてプレパラートを作成し、倒立式蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察を行なう。

蛍光染色による評価により、リポソーム膜上に IgM 抗体分子が存在することが認められた (Fig.2.11)。しかし、細胞を染色したものと比較すると、染色強度が減少していた。細胞膜は複雑な起伏を有しており、見かけの表面積より広い表面積を有している。これに対して、リポソームは膜が引き伸ばされるように形成されているため、細胞に比較して表面積が減少し、膜タンパク質の総量が少なくなったためと考えられる。

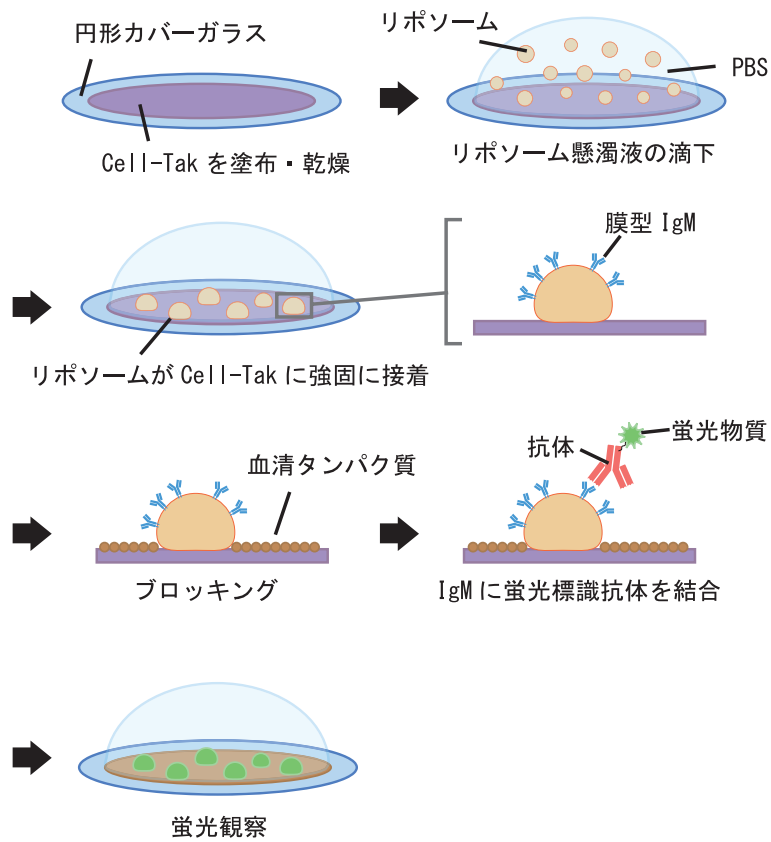


Fig.2.10 リポソーム上の IgM の蛍光染色

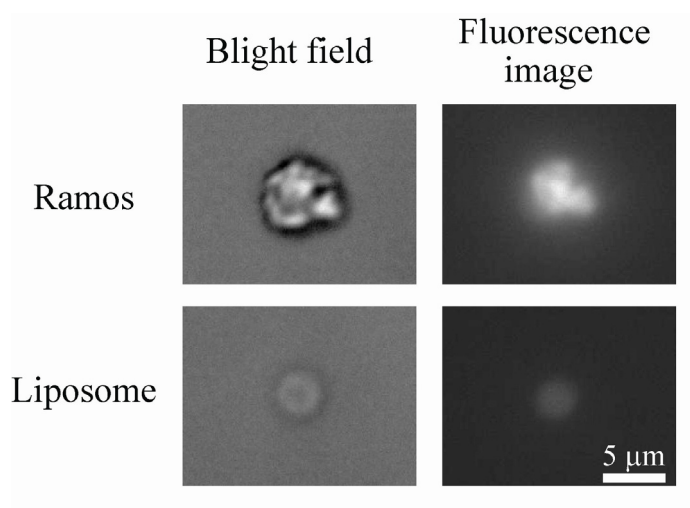


Fig.2.11 IgM を有するリポソームの蛍光観察像

2.5.4 遺伝子導入により発現したリポソーム膜表面の Glut5 の検出

遺伝子操作技術を用いて導入した外来遺伝子より発現した膜タンパク質がリポソーム上に担持されるか評価を行った。発現させる膜タンパク質は、12回膜貫通型膜タンパク質のフルクトーストランスポーター Glut5 を使用した。導入用遺伝子は Tukamoto らにより開発された Glut5 遺伝子含有プラスミドベクターを使用した [38][39]。この導入用遺伝子は、細胞内に常在する転写因子が結合する CMV プロモーター配列を転写開始配列として使用しているため、細胞内の状態にかかわらず RNA 転写が行われる。また、Glut5 は Ramos では発現していないため、細胞膜上に確認された Glut5 は導入遺伝子由来タンパク質であると言える。膜タンパク質の発現とリポソームの蛍光染色は以下の行程で行った (Fig.2.12, Fig.2.13)。

1. Glut5 遺伝子プラスミドベクターを遺伝子導入用カチオン性リポソームのリポフェクトアミン (Invitrogen) を用いて Ramos に遺伝子導入した[40]。(Ramos に導入された遺伝子から Glut5 が発現し、細胞膜に輸送されて担持される。)
2. 酪酸ナトリウムを培地に添加してリポソーム生成を誘導する。
3. 細胞とリポソームを含む培地を回収する。

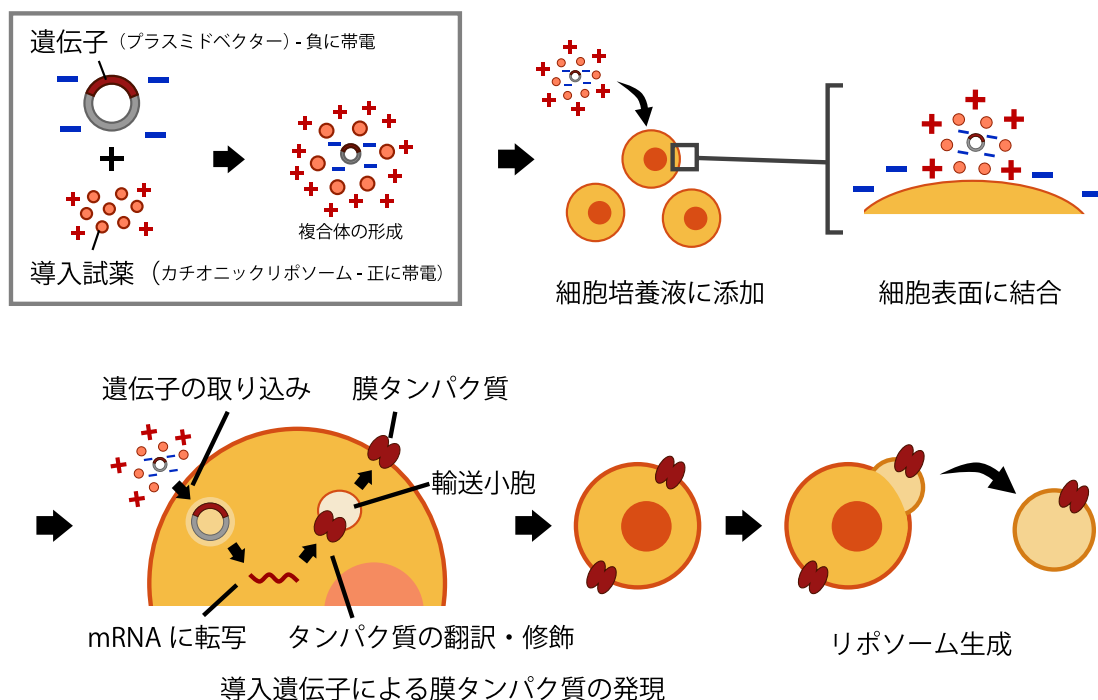


Fig.2.12 遺伝子導入による任意の膜タンパク質保有リポソームの形成

4. リポソーム上の IgM の蛍光染色の 4 から 9 と同様の作業を行う。
5. 抗 Glut5 ラビット抗体を含む 10 %FBS/PBS を滴下して 30 分室温静置する。
6. 4 °C に冷却した 1 %FBS/PBS で洗浄する。
7. PE 標識済み抗ラビット Ig's 抗体を含む 10 %FBS/PBS を滴下して 30 分室温静置する。
8. 4 °C に冷却した 1 %FBS/PBS で洗浄する。
9. 4 °C に冷却した PBS で洗浄する。
10. カバーガラスを、蛍光褪色防止剤を塗布したスライドガラス上にマウントしてプレパラートを作成し、倒立式蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察を行なう。

蛍光染色による評価により、リポソームの膜上に蛍光が観察されたことから、Glut5 が存在することが認められた (Fig.2.14)。

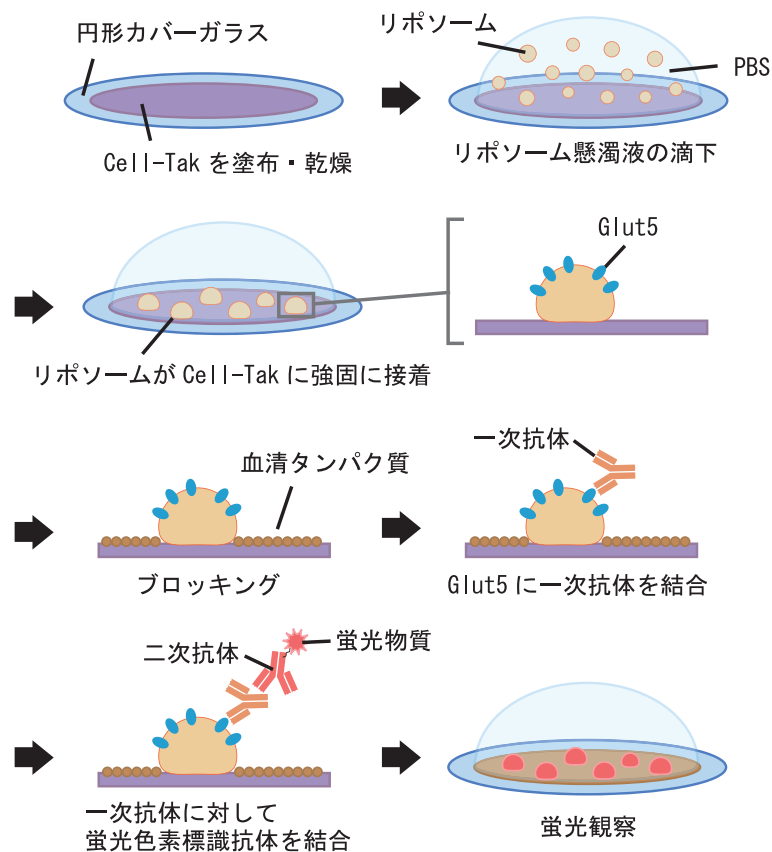


Fig.2.13 リポソーム上の Glut5 の蛍光染色

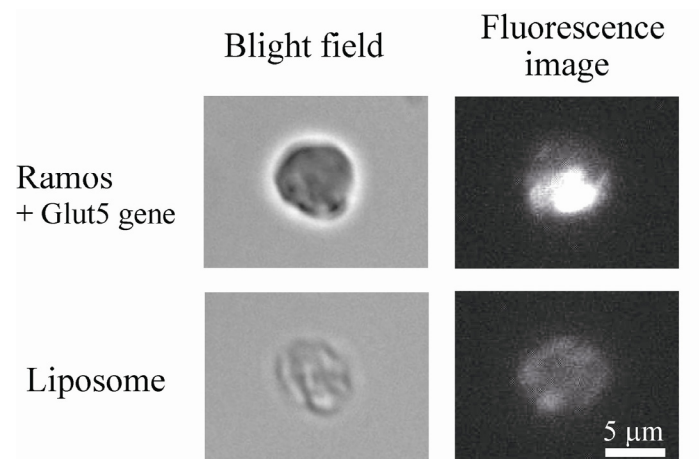


Fig.2.14 Glut5 を有するリポソームの蛍光観察像

2.5.5 結論

細胞由来リポソームの表面に膜タンパク質が存在することが認められた。また、遺伝子導入を行った細胞においても目的の膜タンパク質が表面に発現していることが認められた。以上より、細胞由来リポソームの手法により、遺伝子発現可能な任意の膜タンパク質を有するリポソームを取得可能であることが認められた。

2.6 結論

新たに細胞に薬剤師激を行うことでリポソームを形成させる方法を見出した。IgM 生産細胞 Ramos を酪酸ナトリウムで処理することでリポソームを得ることが可能であることが認められた。細胞のリポソーム生成率は細胞の状態により大きく上下し、最大で 70 % 付近の効率でリポソームが生成する場合も認められた。また、リポソーム形成時に原理が不明解な挙動が認められたので、それらを以下に示す。

・細胞膜の膨張

薬剤刺激により、細胞は同じ大きさのリポソームを生成する。しかし、細胞はリポソーム内部を満たす余分な細胞質は有していない。そのため、リポソーム形成時には外液から成分を取り込む必要が生じる。また、小胞が膨張する間は、膜が膨張する為に必要な圧力を維持する必要が生じる。これには、物質透過性を有するトランスポーターが、常に外液を取り込む作用をしていると考えられる。

- ・細胞-小胞間のくびれ形成

細胞内浸透圧のバランスが崩れて細胞膜が膨張するのであれば、細胞全体が膨張する通常である。しかし、リポソーム生成の際には、細胞膜のごく一部分が膨張して小胞が発生する。小胞の成長が進むと細胞との結合部はくびれた状態となる。また、小胞の成長が進行しても連結部の大きさは変化しない。これは、細胞膜が内側より固定されているか、くびれ部分にリング状の構成物が形成していることが示唆される。

- ・リポソーム膜の閉塞原理

リポソーム形成の最終段階において、細胞との連結部位のくびれよりリポソーム膜の閉塞が生じる。この閉塞は容易に生じ、リポソームが崩壊することはない。この、膜が閉塞する際には、向かい合った細胞膜の融合が求められる。膜同士が接近すると、リン脂質の配向が変化して融合が生じる。しかし、連結部位の大きさはほぼ変化しないにもかかわらず、リポソームが細胞サイズまで成長するまでは細胞膜の閉塞は生じない。この細胞膜の融合を抑制する物質が細胞膜内側に存在すると考えられる。例えば、細胞膜の裏打ち構造の細胞骨格タンパク質が融合を阻害していると考えられる。また、時間の経過とともに細胞骨格タンパク質が分解され、細胞膜の流動性が向上し、融合が可能になると考えられる。

リポソーム形成機構がより詳細に明らかとなり、それを基に IgM 生産細胞以外の細胞株についてもリポソーム生産が可能とする手法が確立できれば、より多様で純度の高い膜タンパク質を取得することが可能になると考えられる。また、細胞由来リポソームには生成細胞由来の膜タンパク質が担持されていることが確認できた。また、遺伝子操作技術により任意の膜タンパク質を担持することが可能であることが認められた。これは、膜タンパク質を対象とした分析や新薬の開発における試料の供給方法としての利用が期待できる。また、膜タンパク質の機能を直接利用した細胞刺激手法も可能になると考えられる。これにより、従来の分泌型サイトカインの利用が中心であった分化制御研究において、新たに膜タンパク質による細胞間シグナルを用いた手法が可能になると考えられる。また、膜タンパク質の結合性を利用した新規センシング技術の開発が可能になると考えられる。

一方で、細胞由来リポソーム自体の分析も必要である。その一つが、構成成分の解析である。その項目として以下のものが挙げられる。

- ・タンパク質組成分析

細胞由来リポソームの構成している膜タンパク質の種類や分量は不明である。これらを明らかとするのは、電気泳動による分子量分画や等電点分画、および質量分析である。これらの分析を行うことで、細胞由来リポソームの形成に関わるタンパク質が同定されれば、リポソーム生成原理の解明に繋がると考えられる。また、それらタンパク質の発現を直接制御することで、細胞死を伴わずに細胞由来リポソームの生成が可能になることが期待できる。

- ・脂質組成分析

細胞膜を構成するリン脂質は、脂肪酸やリン酸基の構造により分類される。リン脂質を有機溶媒で溶解した後に疎水性クロマトグラフィーにより分画することで分析する。この分析を行うことで、膜の物質透過性を類推することが可能となる。

しかし、上記の組成分析を行うにはおよそ $1\ \mu\text{g}$ の試料が必要となる。いずれの分析方法もカラムやメンブレンに吸着させた試料を展開することで分画を行う手法である。試料が希釈されてしまうため、十分な試料濃度が無いと検出が困難となるためである。また、リポソーム誘導後の死細胞の持つ断片化した核などは、分析の障害となるため、除去する必要がある。すなわち、細胞を含まない純度の高いリポソームを大量に取得する必要がある。現在のシャーレを用いた回収方法では、上記の分析に耐えうるだけの量と純度のリポソームは回収できないため、新たに、細胞由来リポソームの生成分離技術を検討する必要がある。

第3章 ヒト細胞由来リポソーム

生成分離デバイス

3.1 緒言

細胞由来リポソーム上の膜タンパク質を利用した様々な応用が期待できる。例えば、膜タンパク質を固定したプロテインチップの構築や、膜タンパク質の細胞間シグナル機能を効果として有する医薬を開発することが挙げられる。この場合、細胞由来リポソームを大量に生産する必要が生じる。また、細胞由来リポソームの詳細な分析を行うには、試料とする大量のリポソームを取得する必要がある。また、細胞はセンシングや分析の障害となるため混入しないことも重要である。従来の細胞をシャーレに細胞を接着させて浮遊したリポソームを回収する方法では、平坦で広い培養面積を有する培養器と大量の培地、そして大量の接着性コーティング材料が必要となる。しかし、この方法はリポソームの密度が低く、回収する溶液の量は多くなる。また、混入細胞の管理と除去も困難となるなど、様々な問題があり、非効率的である。細胞由来リポソームを用いた検討を容易とするためには、より簡便にリポソームを生成分離可能な技術が必要となる。そこで、微細加工技術を用いた、高密度で大量に細胞由来リポソームの生成分離を行うマイクロ流体デバイスの構築を試みた。

3.2 細胞由来リポソーム生成分離の原理

本研究が目的とする、細胞に負担が生じないリポソーム分離方法として、リポソームの形成と同時に細胞から分離する方法が考えられる (Fig.3.1)。まず、細胞が通過しない孔径の微小孔アレイ上に細胞を培養する。次に、細胞を微小孔に保持する。そして、薬剤刺激によりリポソーム形成を誘導する。この時、リポソームが微小孔

を通過しながら形成すると、生成直後に細胞と分離されると考えられる。そこで、この分離方法を実現するデバイスの構築を試みた。

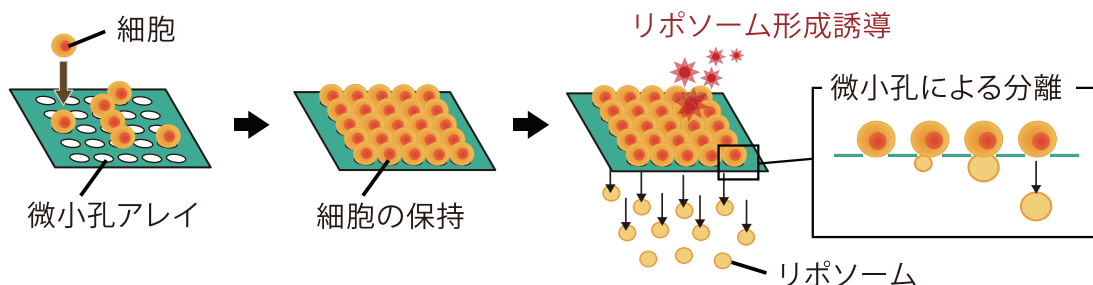


Fig.3.1 リポソーム生成分離原理

3.3 細胞由来リポソーム生成分離デバイスの設計

3.3.1 細胞培養デバイスの条件

細胞培養デバイスを生体から分離した細胞や組織は、単体では生存できないため、適切な培養環境下におく必要がある。

・無菌環境

細胞培養に用いる培地は、糖やアミノ酸、タンパク質が豊富に含まれるため、微生物汚染が生じやすい。微生物汚染が生じると、細胞の活性低下や死滅が生じ、実験として成立しなくなるため、微生物を混入させないように配慮が必要となる。微生物は大気中にも浮遊しているため、細胞の播種操作はすべて無菌環境内で行う必要がある。また、デバイスにも微生物が付着している恐れがあるため、予め滅菌処理を施す必要がある。

・温度、CO₂、湿度

培養細胞は、温度変化や pH の変化で活性が低下する。それら培養環境の変動を最低限に抑えるために、インキュベータから取り出した細胞は速やかに作業を完了し、インキュベータに戻す必要がある。インキュベータ内は 37 °C・5 %CO₂・湿度 100 % の環境に保たれおり、培地の温度と pH を安定させ、培地の蒸発も防いでいる。デバイス構成材料として使用する PDMS (Polydimethylsiloxane) はガスや水蒸気を透過するため、デバイスはインキュベータ内に設置するのが望ましい。

・培地

細胞の培養には糖やアミノ酸、ビタミンと増殖シグナルとなるタンパク質を配合した培養培地が用いられる。この培養培地をデバイス内に供給する必要がある。一方で、細胞からは乳酸などが老廃物として放出される。そのため、培地は定期的に変換する必要がある。Ramos の場合、最適培養密度は $1\sim 10 \times 10^5$ cells/ml であり、2~3 日毎に細胞密度の調整と培養液の交換を行う（継代作業）。このとき、1 細胞を培養するために必要な培地容量は約 1 nl となる。マイクロデバイス製細胞培養デバイスの培地の供給方法として、以下のものが挙げられる。

・静置式

デバイス内に溶液を注入した後は静置する。シャーレで行う一般的な細胞培養に近い手法で、細胞に流れによるストレスを与えないので軟弱な細胞にも使用できる。また、自己分泌した増殖因子の濃縮により培地の馴化が起こることで、細胞の活性が保持される。培地や薬液の使用量が少なくて済む。システム全体のサイズが小型になり、取り扱いが容易になり、同時に多数の評価が容易となる。デバイスに出入りする物質が制限されるため、微生物がデバイス外部から持ち込まれて汚染が生じる危険性を大幅に削減できる。また、インキュベータ内に保管が可能になるため、培地温度や pH の管理が容易となる。設置時のすべての作業を無菌ベンチ内で行うことができるため、無菌状態を維持した作業が容易となる。

・フロー式

培地をポンプで輸送する方法で、水圧を利用した細胞のハンドリングが可能になる。必要に応じてポンプを選択する必要がある。特に、細胞に有害な金属イオンや油脂などの成分を放出しない事が求められる。長期間の無菌性を優先する場合はチューブポンプを使用するが、脈動も生じるため精密な制御が難しくなる。制御性を優先する場合はギヤポンプを使用するが、ポンプ内を完全に滅菌処理することは困難なため、微生物汚染の危険性が生じる。また、インキュベータ内にポンプを設置する場合は、高湿度環境下でも動作可能なポンプが必要になる。また、デバイスやポンプとチューブの煩雑な接続作業を無菌環境下で行う必要が生じる。インキュベータ外にポンプを設置する場合は、デバイス-ポンプ間のチューブが長くなるため、操作が非常に煩雑となる。

培地をポンプにより循環させる循環フロー式デバイスの場合、系内の培地成分が流動しているので、局所的な栄養の枯渇が生じにくく、高細胞密度で長期的の培養が可能になる。また、自己分泌した増殖因子も蓄積するので細胞の活性が維持され

る。しかし、デバイス内から細胞が流出し、チューブ内でも増殖するため、意図しない作用をもたらす恐れがある。また、細胞がポンプ内に流れ込んだ場合は機械的な損傷を受け、破片が培地内に分散する。還流用チューブ内壁に培地由来成分や細胞老廃物が付着して凝集塊が発生する。また、細胞に流体による力がかかることで、細胞の破損や死細胞の断片化が生じ、DNA凝集体の形成が生じる恐れがある。これらは数 mm サイズの塊を形成するため、マイクロ流路が閉塞する恐れが生じる。長期間運用すると、培地水分がチューブを通して蒸発し、培地濃度の上昇が生じることで細胞状態が悪化する。

常に新鮮な培地を供給する連続フロー式デバイスの場合、循環式に比べてシステムは簡略化され、流出した細胞の活動や培地の劣化を考慮する必要もないが、培地や薬剤を大量に消費するため運用コストが大きくなる。また、自己分泌した増殖因子の蓄積が生じないため、細胞の活性が低下する。

本研究では、細胞を微小孔に保持することを動作原理の一部としている。送液ポンプなどの圧力源を用いることで微小孔の間に圧力差を設け、細胞を吸引固定することは比較的容易に可能である。しかし、微小孔アレイは空孔率が高く、通過する流量が多いため、細胞を捕捉するためには圧力差を大きくする必要がある。圧力差を大きくすることで、細胞を捕捉することができるが、微小孔が細胞で満たされた時点で大きな圧力差が細胞に印加され、細胞が微小孔内に引き込まれて損傷する恐れが生じる。細胞を捕捉した後に圧力差を小さくすることで、細胞が微小孔に引き込まれないようすることは可能であるが、一部でも細胞が微小孔から脱落すると、その周辺の微小孔の圧力差が急減し、細胞を捕捉できなくなる恐れがある。その場合、再度圧力差を大きくし、細胞の捕捉を行う必要がある。これらの圧力制御を頻繁に行う必要があり、送液ポンプの送液量を常に制御する必要が生じる。また、細胞由来リポソームは比重が培地に近い。そのため、底面に沈降せずに培地中に浮遊しているものも多い。フロー式システムをリポソーム生成分離デバイスへ適用した場合、浮遊したリポソームが培地と共にデバイス外部に流出するほかに、流路やチューブ内壁にリポソームが付着することで、回収が困難になることが懸念される。以上より、静置式が有益と考えられるため静置式リポソーム生成分離デバイスの設計と製作を試みた。また、以下の点に配慮してデバイスを製作した。

- ・ 培地の注入と細胞の播種作業と刺激作業が容易。
- ・ 圧力を必要としない細胞の固定方法を有すること。
- ・ リポソームの紛失が生じにくく、回収作業が容易であること。
- ・ 無菌操作を容易とする為に、細胞培養シャーレに収納可能な大きさのデバイス。

3.3.2 デバイスの構造

製作したデバイスの全体の大きさは 10 mm 角で，一般的な細胞培養用 35 mm ディッシュに保管出来るサイズに設計した．デバイスはマイクロウェルアレイを有するシリコン基板，2 個の PDMS 製チャンバ，ガラス基板で構成されている (Fig.3.2)．マイクロウェル基板は，辻橋らにより提案されたものを変更して製作した [42][43][44]．マイクロウェルは Si ウエハの異方性エッチングで製作されている．また，ウェル底面は膜厚 1 μm の SiN 透明膜により成り，孔径 5 μm の微小孔が 24 x 24 個配されている．

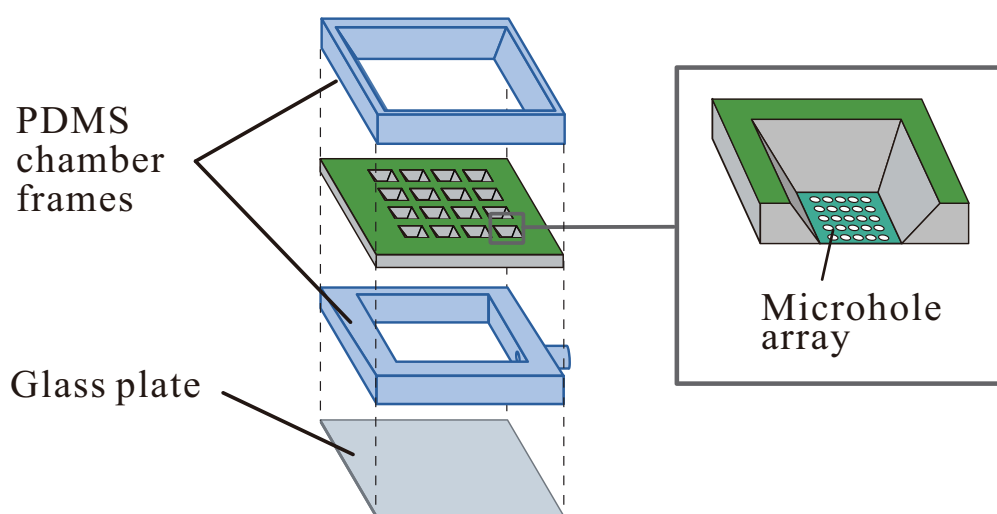


Fig.3.2 リポソーム生成分離デバイスの概要図

3.3.3 デバイスの製作

・ウェルアレイ

ウェルアレイは，デバイス上に 4 x 4 個形成されている．ウェル底面は一辺約 350 μm の正方形の自立 SiN 膜である．Fig.3.3(a)に示す形状のウェルアレイ用マスクを使用して製作を行った．ウェル上面の大きさは 770 μm ，ウェルピッチ間は 1 mm である．ウェルアレイのパターニングで使用するレジストとして OFPR (東京応化工業 OFPR-800LB 23C) を使用した．OFPR はポジレジストであるので，非エッチング部分をマスクした．ウェルアレイを形成する為に，Si 基板を TMAH (Tetra methyl ammonium hydroxide) 水溶液を用いて異方性エッチングを行った．Si 基板は，エッチング速度が速い(100)表面が上下面に出ており，エッチング速度が遅い(111)面は，ウエハ表面に対して約 54.74° の角度を持つため，V 字型にエッチングされる．そのため，ウェル上面の大きさに対してウェル底面は小さくなる．ウェル上面側の Si

には SiN 膜が 1.5 μm 成膜されており，必要以上に Si がエッチングされないよう保護する役割を果たしている．これは Si エッチングの際，SiN 膜が約 1 μm エッチングされるためである．この SiN 膜は，北九州学術研究都市内の共同研究開発センター内のプラズマ CVD 装置を用いて成膜した．

・微小孔アレイ

微小孔アレイはウェル底面の自立 SiN 膜に形成される．SiN 膜は，成膜時に引っ張り応力を膜に残留させることで丈夫でたわみの生じない自立膜を形成する．Fig.3.3(b)に示す形状の微小孔アレイ用マスクを使用して，微小孔アレイの製作を行った．マスク上のホール径は 3~7 μm で，1つのウェル底面に対し 24 x 24 個形成される．ウェル底面に微小孔アレイを配置するため，微小孔アレイの間隔はウェルの間隔と同じく 1 mm である．SiN 膜は (株)アルバックの受託サービスを利用して成膜したものを使用した．この SiN 膜は，窒素含有量が高く，残留応力が低い (+20 MPa 程度) ため，共同研究開発センターで成膜した SiN 膜と比較して，破損しにくい膜が得られる．

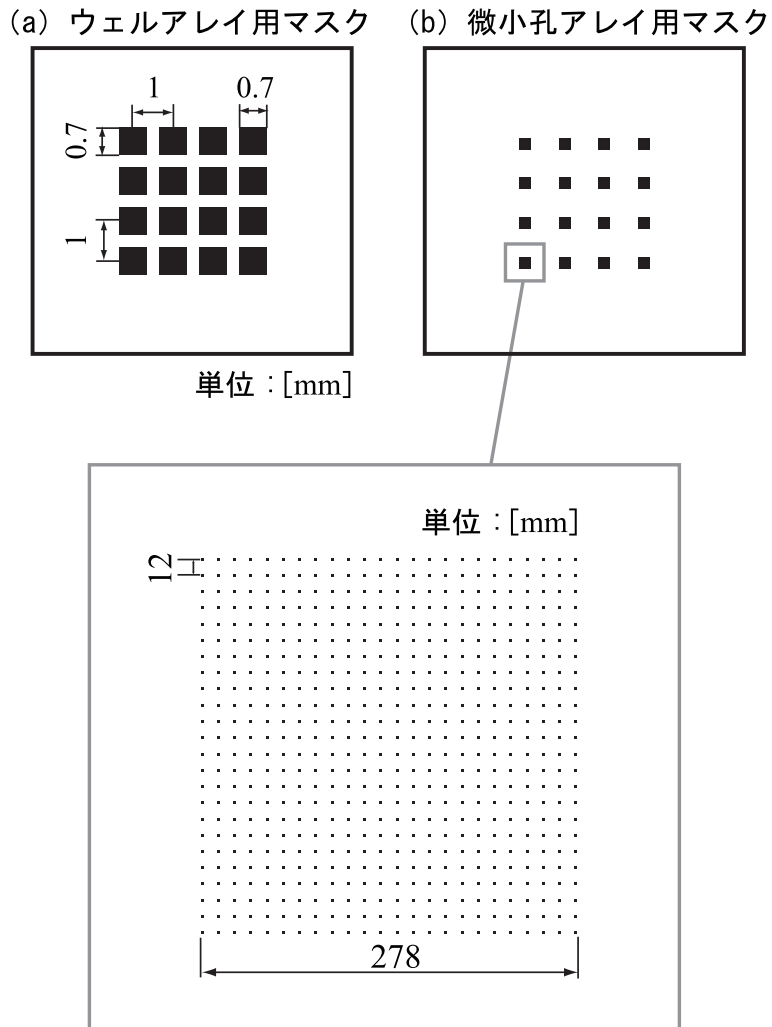


Fig.3.3 微小孔ウェル基板マスク形状

リポソーム生成分離用のマイクロウェルおよび微小孔の製作方法を示す。まず、プラズマ CVD により Si 基板の両面に厚さ $1\ \mu\text{m}$ の SiN 膜を形成し、微小孔を形成する面側にポジ・フォトレジストの OFPR を塗布した後、 $90\ ^\circ\text{C}$ でプリバークする (Fig.3.4(a))。次に、微小孔のパターンをレジスト上に転写して現像を行った後、 CF_4 プラズマエッチングにより、SiN 膜をエッチングして微小孔を形成する (Fig.3.4(b))。Si 基板の反対側の面も同様に、OFPR を塗布してウェルアレイのパターンを転写した後、SiN 膜をエッチングしてウェル上面を製作する (Fig.3.4(c))。その後、25 %TMAH 水溶液を用いて Si を異方性エッチングすると、ウェル底面の自立した SiN 膜だけが残る、微小孔を有するマイクロウェルが完成する (Fig.3.4(d))。

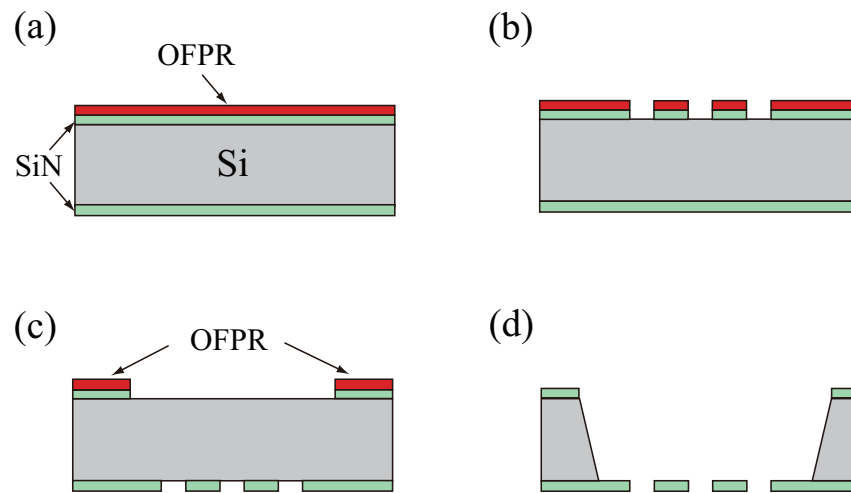


Fig.3.4 微小孔培養ウェル基板の製造プロセス

製作した微小孔アレイを有する培養ウェル基板を Fig.3.5 に示す.

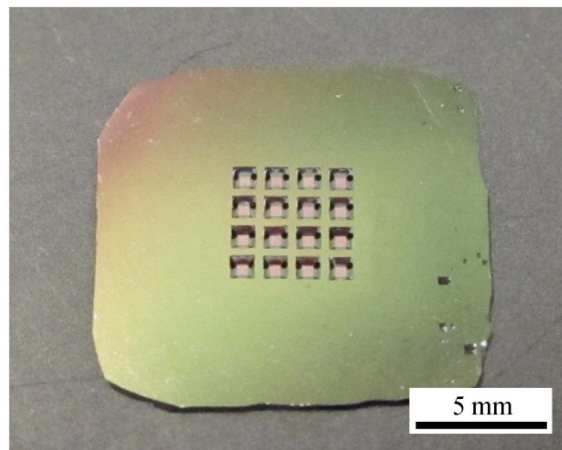


Fig.3.5 微小孔培養ウェル基板の外見

また、微小孔の孔径の種類を増やすために、微小孔側レジストの露光面-マスク板間距離（露光ギャップ）と露光時間を制御することで数種類の孔径の微小孔の製作した (Fig.3.6).

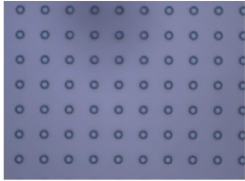
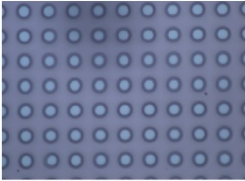
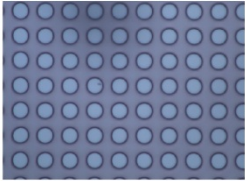
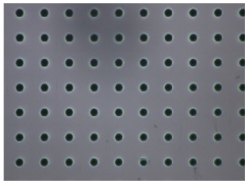

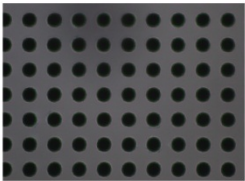
	微小孔径		
	3 μm	5 μm	7 μm
露光ギャップ	10 μm	20 μm	30 μm
露光時間	11.3 sec	20 sec	31.3 sec
SiN膜 (エッチング前)			
SiN膜 (エッチング後)			

Fig.3.6 微小孔パターニングの露光条件と形成した微小孔

・PDMS チャンバの製作

細胞播種に使用する PDMS チャンバは、3D モデリングマシンにて製作したアクリル樹脂製鋳型を使用して製作した (Fig.3.7).

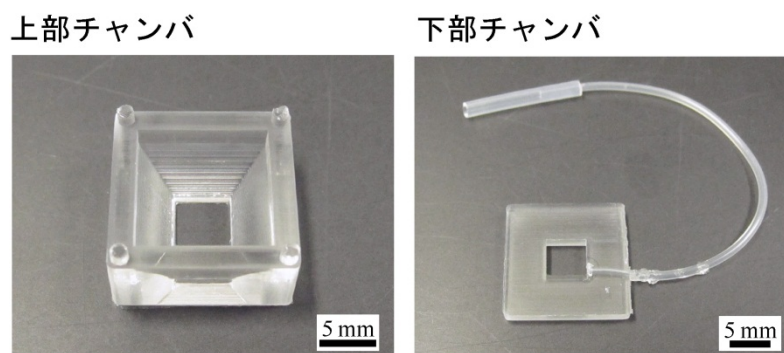


Fig.3.7 PDMS リザーバーの外見

以上、製作した部品を組み合わせるリポソーム生成分離デバイスとし、リポソーム生成分離実験に使用した (Fig.3.8).

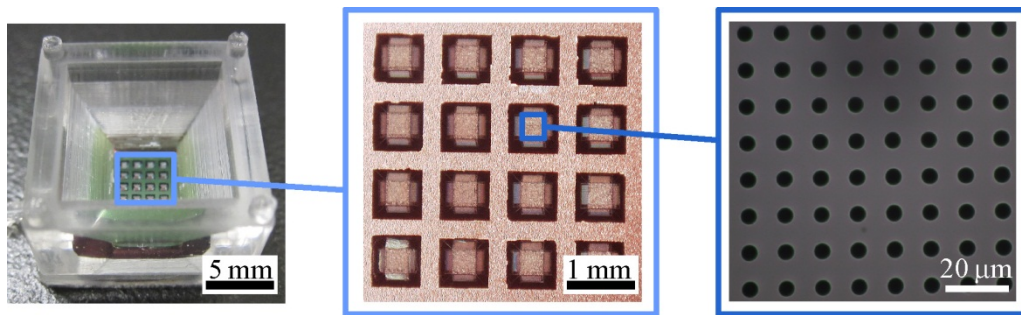


Fig.3.8 製作したリポソーム生成分離デバイス

3.4 細胞固定のための表面修飾法の検討

3.4.1 緒言

本デバイスでは、細胞を微小孔上に固定する必要がある。リポソーム生成に使用する Ramos は浮遊性細胞であり、基板表面に対する接着能力を有さないため、デバイス側に細胞を固定する機能が求められる。静置型デバイスを構築するためには、基板の表面処理により細胞を保持する性質を付加する必要がある。一般的に、細胞を基板に固定する際には、ポリ-L-リジンなどのアミノ基を提示する物質が接着性コーティング剤として多用される。細胞は表面が負に帯電しているため、アミノ基により正に帯電した基板表面に吸着しやすくなる。しかし、これらのコーティングは培地成分が吸着することにより接着性の減少や消失が生じる（ブロッキング作用）。そのため、細胞を固定するには、細胞分散液を PBS に置換し、基板上に播種して接着させた後に、培地に交換する必要がある。これらの溶液の置換作業は煩雑となる恐れがある。また、作業により生じた振動や水流で固定した細胞が剥がれる恐れもある。また、デバイス内は構造が複雑であり、溶液が残存することで置換が完全に行われない恐れがある。また、固定した細胞の保持力も培地成分の影響を受け、時間経過とともに減少する。また、培地中の水分により膨潤し、コーティング膜が基板から剥離する恐れがある。これらの理由から、培地成分や水分の影響を受けない細胞固定用コーティング方法を検討した。

3.4.2 細胞膜アンカー

細胞膜はリン脂質のアシル基が配列することで構成された疎水性部位を有している。脂肪酸はこの疎水性部位と親和性が高いため、細胞膜に容易に挿入される。本研究では細胞膜アンカー（BAM : Biocompatible anchor for membrane）を使用した。

BAMは、オレイン酸にスペーサーとしてPEG鎖が結合し、末端にNHS活性化部位を有した分子構造を有している (Fig.3.9) [44]. オレイン酸部位は細胞膜と親和性が高いため、細胞膜に挿入され、細胞膜表面にPEG鎖を介して活性化部位に結合した物質を細胞表面に修飾することが可能となる。そして、予めBAMを基板表面に修飾することで、細胞と基板をPEG鎖で連結させることが可能となる。また、オレイン酸が細胞膜に挿入される作用は疎水性相互作用によるものであり、培地成分に阻害されないため、細胞を安定して保持することができると考えられる。NHS活性化部位はアミノ基とカップリング反応を生じ、アミド結合を形成する。基板表面にアミノ基を有する強固なコーティング膜を形成し、そこに結合させることで、水中でも高い安定性を得ることが可能になると考えられる。

・細胞膜アンカー (BAM:Biocompatible Anchor for Membrane)

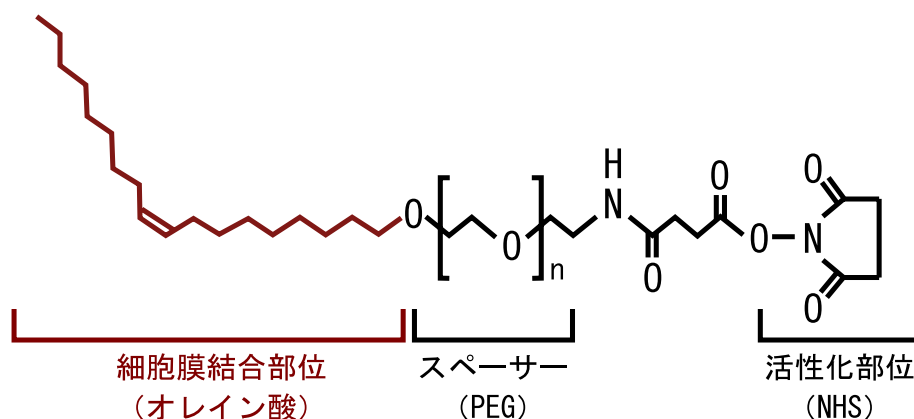


Fig.3.9 細胞膜アンカーの分子構造

3.4.3 細胞膜アンカーによる表面修飾

微小孔アレイは SiN で構成されている。ここに、細胞を保持する機能を付加するために、以下の方法にて細胞膜アンカーの修飾を行った (Fig.3.10)。まず、アミノ基を SiN 表面に付加するために、APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane, 信越化学) を 1% に調製した 0.1% 酢酸水溶液をスピコートにて塗布し、ホットプレート上にて 90 °C、5 分間加熱した。次に、細胞アンカー分子を APTES 上のアミノ基に結合させるために、細胞膜アンカー (OE-040CS, 日油) の 1 mM 水溶液に浸漬し、25 °C、1 時間静置した。そして、基板を超純水で洗浄し、細胞膜アンカー修飾基板を得た。

3.4.4 細胞膜アンカーにより基板に固定された細胞の観察

細胞膜アンカーを修飾したガラス基板上に細胞を播種し、細胞の遊走を観察した。観察の結果、細胞は細胞膜アンカーにより基板上に安定して固定された。また、培地中においても長時間にわたり固定されることが認められた。Fig.3.12 中の白丸で示した細胞を例にとると、25 時間経過後も、ほぼ同一に位置することが認められる。一方、細胞に細胞分裂が生じた場合、一時的に細胞膜アンカーによる捕捉から離脱することが認められた。

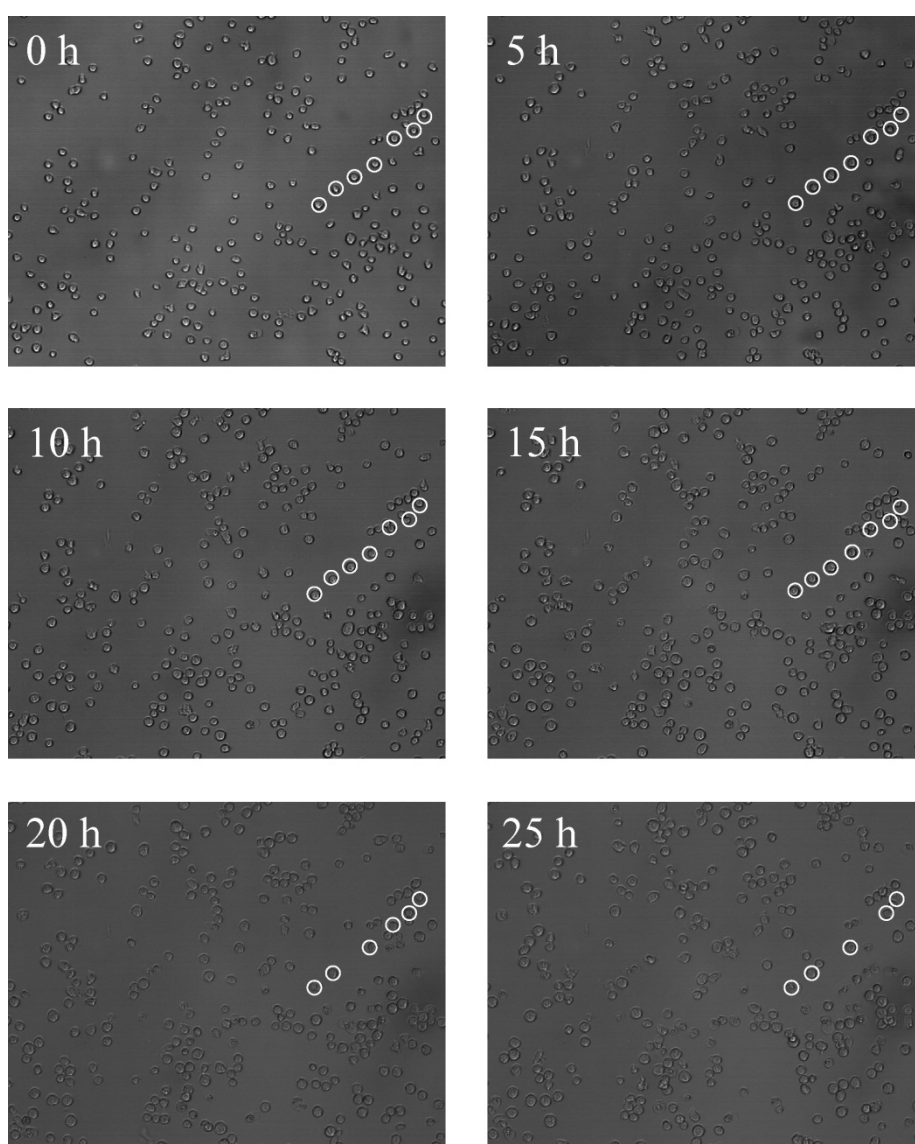


Fig.3.12 細胞膜アンカー上に播種した細胞の観察

3.4.5 結論

浮遊細胞は基板との接着性を有さないため、未処理基板を用いた場合、一定の位置に留まることはない。また、培地の血清により基板がブロッキングされるため、非特異吸着も生じなくなる。一方、細胞膜アンカー修飾基板では、培地成分による阻害を受けることなく基板上に固定化されることが認められた。そのため、血清を含む培地に分散した細胞をそのまま基板上に播種し、固定することが可能となった。また、時間経過による保持力の低下も生じず、長時間の安定した固定が可能となった。これにより、圧力源や溶液交換を必要としないリポソーム生成分離デバイスの設計が可能となった。表面に細胞膜アンカーを有する微小孔アレイ上に細胞を播種すると、細胞は細胞膜アンカーにより細胞に保持される (Fig.3.13(a))。その後、薬剤刺激によりリポソーム形成が誘導され、微小孔を通してリポソームが形成して分離される (Fig.3.13(b))。

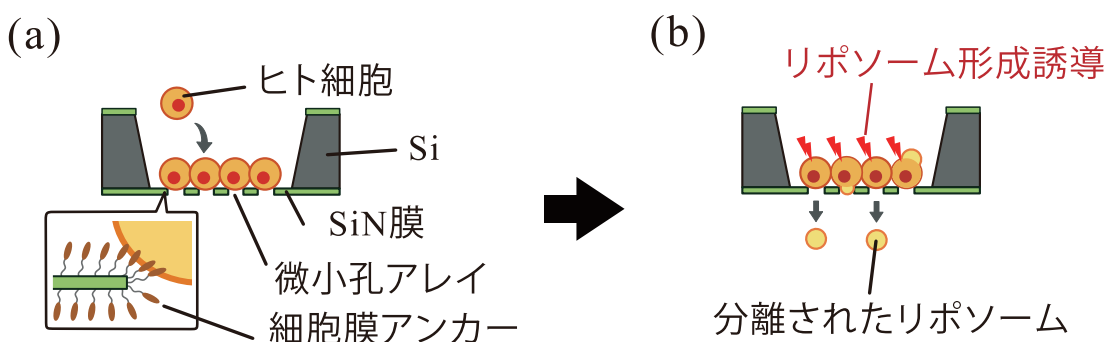


Fig.3.13 細胞由来リポソーム生成分離デバイスの動作概要

3.5 微小孔デバイスを用いた細胞由来リポソーム生成分離

3.5.1 緒言

製作した微小孔デバイスを用いて、細胞由来リポソームが生成分離されることを確認するために細胞を用いて評価を行った。また、細胞膜アンカーの表面修飾が効果を示すことを検証するために、表面未処理のデバイスと PEG を表面修飾したデバイスを用いて生成分離実験を行った。表面未処理のデバイスは、微小孔アレイ構造自体のリポソーム分離能を評価するため、PEG を表面処理したデバイスは、細胞膜アンカーのスペーサー部位が PEG で構成されているため、細胞膜結合部位のオレイン酸の有無がリポソームの生成分離に寄与することを検証するために使用した。細胞の播種作業はすべて無菌操作にて行った。

3.5.2 実験手順

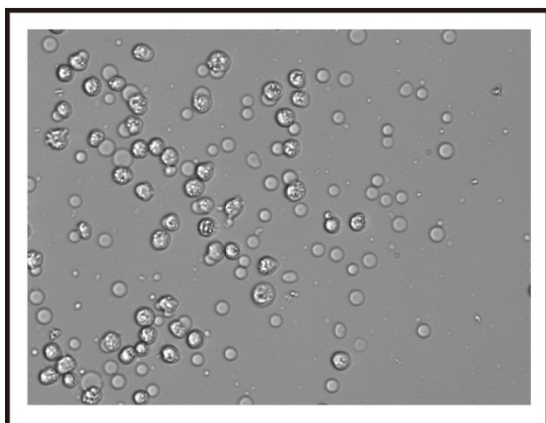
各部品を 75 %エタノール水溶液に浸漬して除菌を行った。次に、クリーンベンチ内で余分なエタノール水溶液を除去し、殺菌灯照射と風乾を行った。滅菌済みピンセットを用いてガラス基板、下部チャンバ、微小孔アレイ基板（微小孔径 5 μm ）、上部チャンバの順に貼り付けてデバイスを組み上げた。貼り付け作業は PDMS の吸着性を利用して接着させた。組み上げたデバイスは 35 mm ディッシュ内に収納した。次に、下部チャンバに酪酸ナトリウムを 10 mM に調製した 10 %FBS-ERDF 培地（以下、リポソーム誘導培地と記す）を、下部チャンバに接続されたチューブを通して 50 μl 注入した。注入操作はピペットマンを用い、チップ先端をチューブに取り付け、チャンバ内に気泡が残らないようにデバイスを傾けて空気を除去しながら行った。注入後、培地がチューブから漏出するのを防止するために、チューブ注入口にポリエチレン製の栓をした。次に、上部チャンバにリポソーム誘導培地を 250 μl 注入した。次に、リポソーム誘導培地を使用して Ramos を細胞密度 2.5×10^6 cells/ml に調製した。この培養液を上部チャンバに 200 μl 分注し、37 $^{\circ}\text{C}$ の 5 % CO_2 インキュベータでリポソーム生成の薬剤刺激を行った。薬剤刺激 25 時間後、上部チャンバと微小孔基板を外し、下部チャンバ底面を顕微鏡観察した。そして、生成したリポソームの直径を計測した。また、微小孔アレイ基板（微小孔径 3 μm ）についても同様の実験を行った。

3.5.3 微小孔アレイ基板（微小孔径 5 μm ）によるリポソーム生成分離

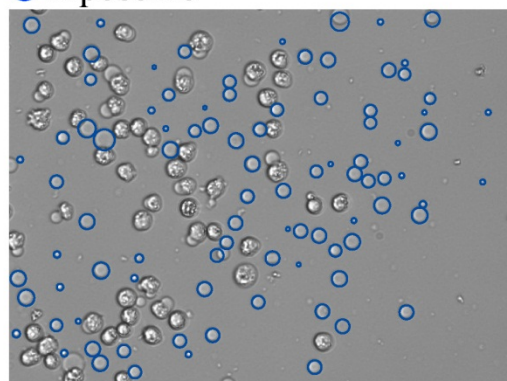
微小孔デバイスを用いてリポソーム生成分離実験を行った結果、表面処理の違いによってリポソーム生成量に変化が認められた。一方で、回収したリポソームは細胞と混在していた。

表面処理を行っていないデバイスを用いた場合の下部リザーバー内の顕微鏡写真を Fig.3.14 に示す。このとき、リポソーム分離効率（リポソーム数と侵入細胞数の合計に対するリポソーム数の割合）は 61 %となった。得られたリポソームは粒子径に二つのピークを有する分布が得られた。この大きい粒子径のピークに属するリポソームは下部チャンバに侵入した細胞から生成したものであると考えられる。また、混入細胞は、微小孔などによる損傷を受けておらず、正常な形状をしていたことから、何らかの理由により細胞が微小孔を通過可能になったと考えられる。

- Untreated

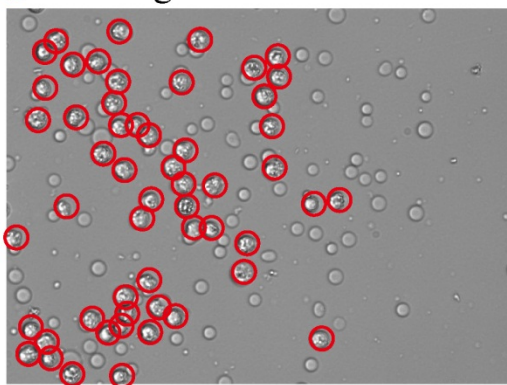


○ Liposome



n = 87

○ Invading cell



n = 54

- Size distribution

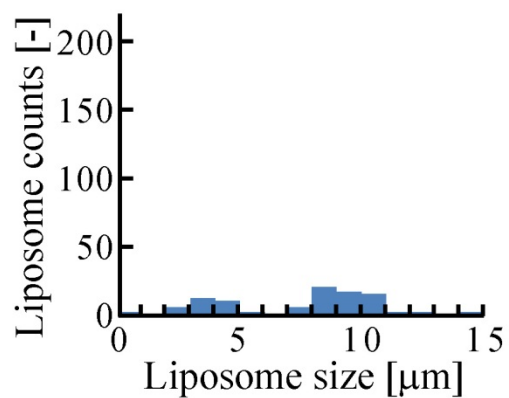
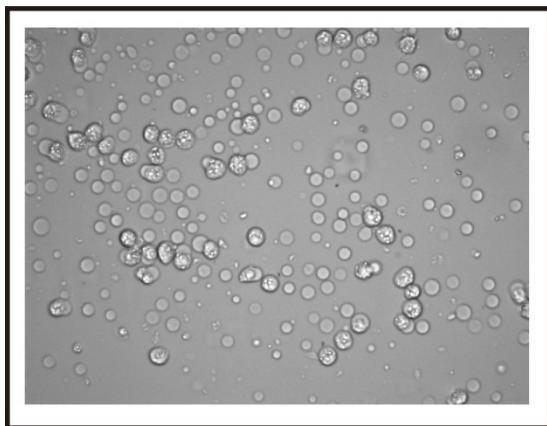


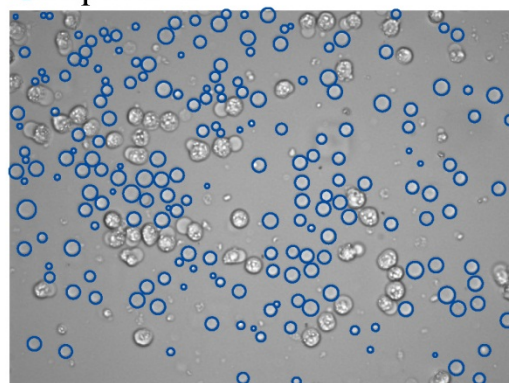
Fig.3.14 表面未処理のデバイスを用いて生成分離したリポソーム

PEG 修飾デバイスを用いた場合の下部リザーバー内の顕微鏡写真を Fig.3.15 に示す. リポソームの生成量は, 表面未処理デバイスの生成量の約 2 倍に増加した. 回収したリポソームは細胞が混在していたが, 混入細胞の数に変化は生じなかった. このとき, リポソーム分離効率は 80 %となった.

- PEG coated

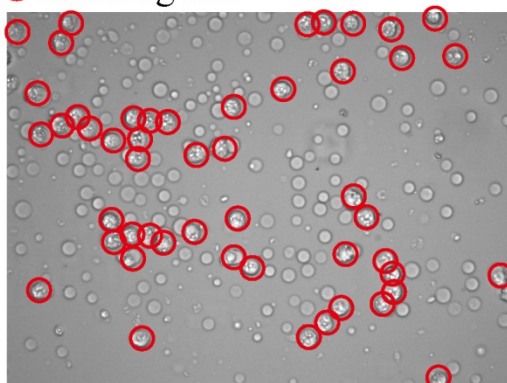


○ Liposome



n = 197

○ Invading cell



n = 50

- Size distribution

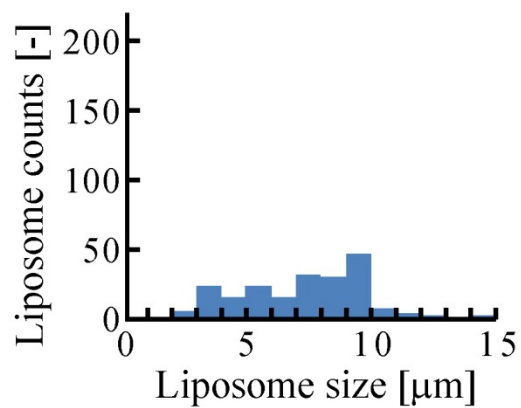
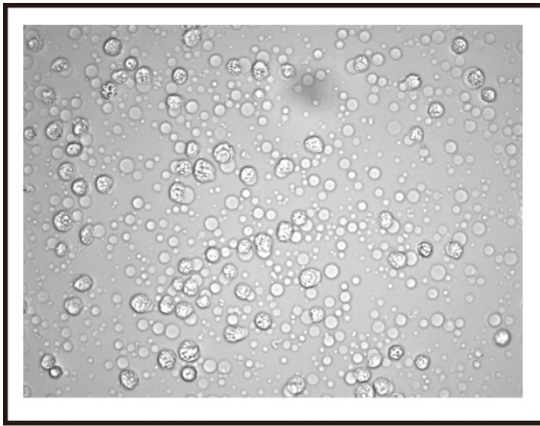


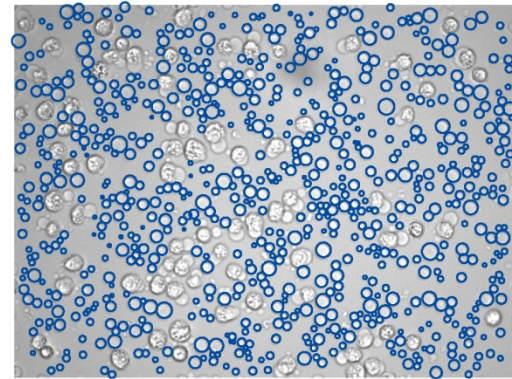
Fig.3.15 PEG 修飾したデバイスを用いて生成分離したリポソーム

細胞膜アンカー修飾デバイスを用いた場合の下部リザーバー内の顕微鏡写真を Fig.3.16 に示す. リポソームの生成量は, 表面未処理デバイスの生成量のおよそ 10 倍に増加し, リポソームサイズの微小化が生じた. このとき, リポソーム分離効率は 90 % となった.

- Cell anchored

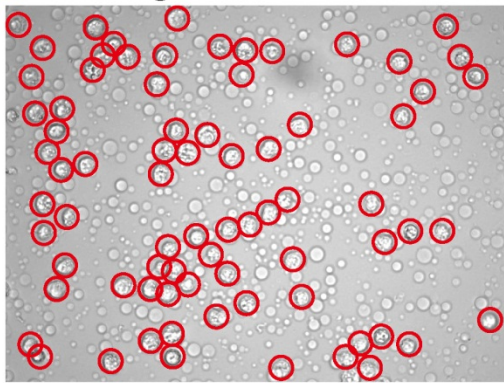


○ Liposome



n = 715

○ Invading cell



n = 76

- Size distribution

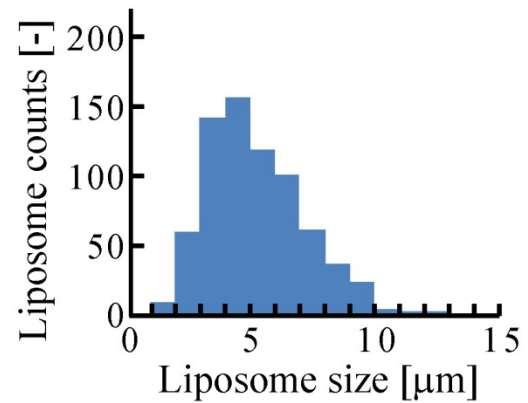


Fig.3.16 細胞膜アンカー修飾したデバイスを用いて生成分離したリポソーム

以上より、微小孔デバイスを用いることで、いずれの表面処理の場合もリポソームを得ることが出来た。また、細胞膜アンカーを微小孔表面に修飾することでリポソームの生成量の増加と微小化が生じた。一方で、一定量の細胞が微小孔を通過して下部チャンバに侵入することが認められた。

ここで、リポソームの粒子径は、画像上のリポソームをそれぞれ円で縁取りした画像を作成し、Rasbandらにより開発された画像解析プログラム Image J の粒子径計測機能により数値化した (Fig.3.17) [46].

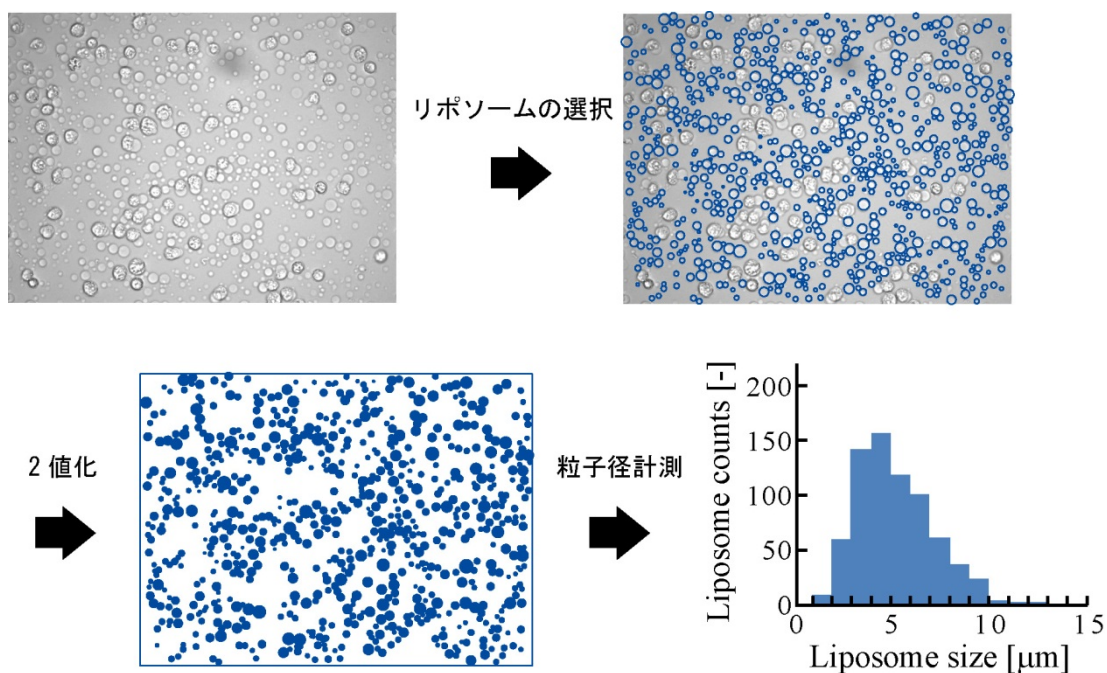


Fig.3.17 リポソームの粒子径の解析方法

3.5.4 微小孔アレイ基板（微小孔径 3 μm ）によるリポソーム生成分離

微小孔径 3 μm の場合についても同様に検討を行った．表面には細胞膜アンカーを修飾した．実験の結果，リポソームの形成が著しく減少し，細胞膜の断片とみられる破片が見られた (Fig.3.18)．これにより，孔径 3 μm の微小孔はリポソームの生成分離には適さないことが認められた．

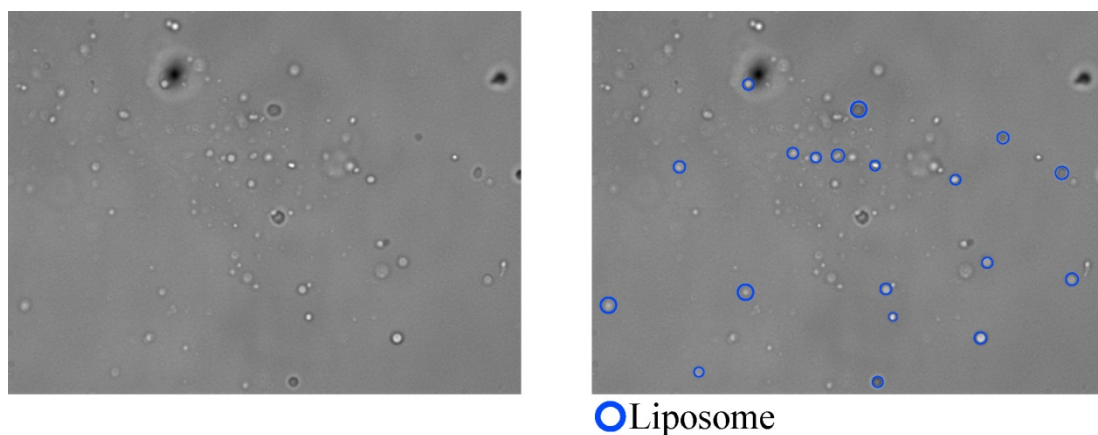


Fig.3.18 孔径 3 μm 微小孔を用いたリポソーム生成分離実験の観察像

3.5.5 結論

微小孔デバイスによりリポソームの生成分離を行った。その結果、細胞膜アンカーを修飾することでリポソーム生成量の増加とリポソームサイズの微小化が認められた。これは、微小孔上でオレイン酸が細胞膜に作用して生じたものであることが認められた。細胞膜アンカーは、細胞を補足するためだけに修飾したものであるが、微小孔に修飾することで新たな効果を示すことが見出された。また、すべての場合において、細胞が混入することが認められたが、侵入した細胞は正常な形状をしており損傷を受けていないことから、微小孔内に強制的に引き込まれたものではなく、細胞が自発的に微小孔を通過したと考えられる。これら細胞の侵入を抑制し、リポソームの分離効率を上昇させるためには、微小孔に対する細胞の挙動を評価する必要性が認められた。

微小孔によるリポソームの生成と微小化は、以下のような流れで生じたと考えられる。微小孔の周辺には細胞膜に貫入することで細胞保持効果を示す細胞膜アンカーが修飾されている。播種されたリンパ球細胞は、細胞膜アンカーにより微小孔上面に固定される (Fig.3.19(a))。次に、酪酸ナトリウムによる薬剤刺激を受けたリンパ球細胞より突出した細胞膜は、微小孔を通過しながらリポソームを形成する (Fig.3.19(b))。細胞が薬剤刺激を受け、細胞膜が突出すると、近傍の微小孔表面の細胞膜アンカーの貫入を受けて捕捉される (Fig.3.19(c))。細胞膜アンカーのオレイン酸は細胞膜の柔軟性を向上させる作用があり、細胞膜の変形を容易にする[45]。細胞膜アンカーの捕捉により細胞膜は微小孔に沿って伸展する。そして、折れ曲がり部位がくびれ形状となる。やがて、くびれ部位の細胞膜は内膜同士が結合し、細胞膜は細胞から分割されて、リポソームが形成される。生成したリポソームは下部チャンバ側微小孔に蓄積するが、やがてリポソームが飽和し、細胞膜アンカーが脱離して下部チャンバ底面に落下してくると考えられる (Fig.3.19(d))。細胞膜が自然に膨張してリポソームを形成する場合と比較して、細胞膜が積極的に細分化されることで生じるため、リポソームサイズの微小化が生じたと考えられる。一方で、細胞からは継続して細胞膜が突出する為、リポソームの生成と分離が繰り返し生じ、リポソーム生成量が増加したと考えられる。

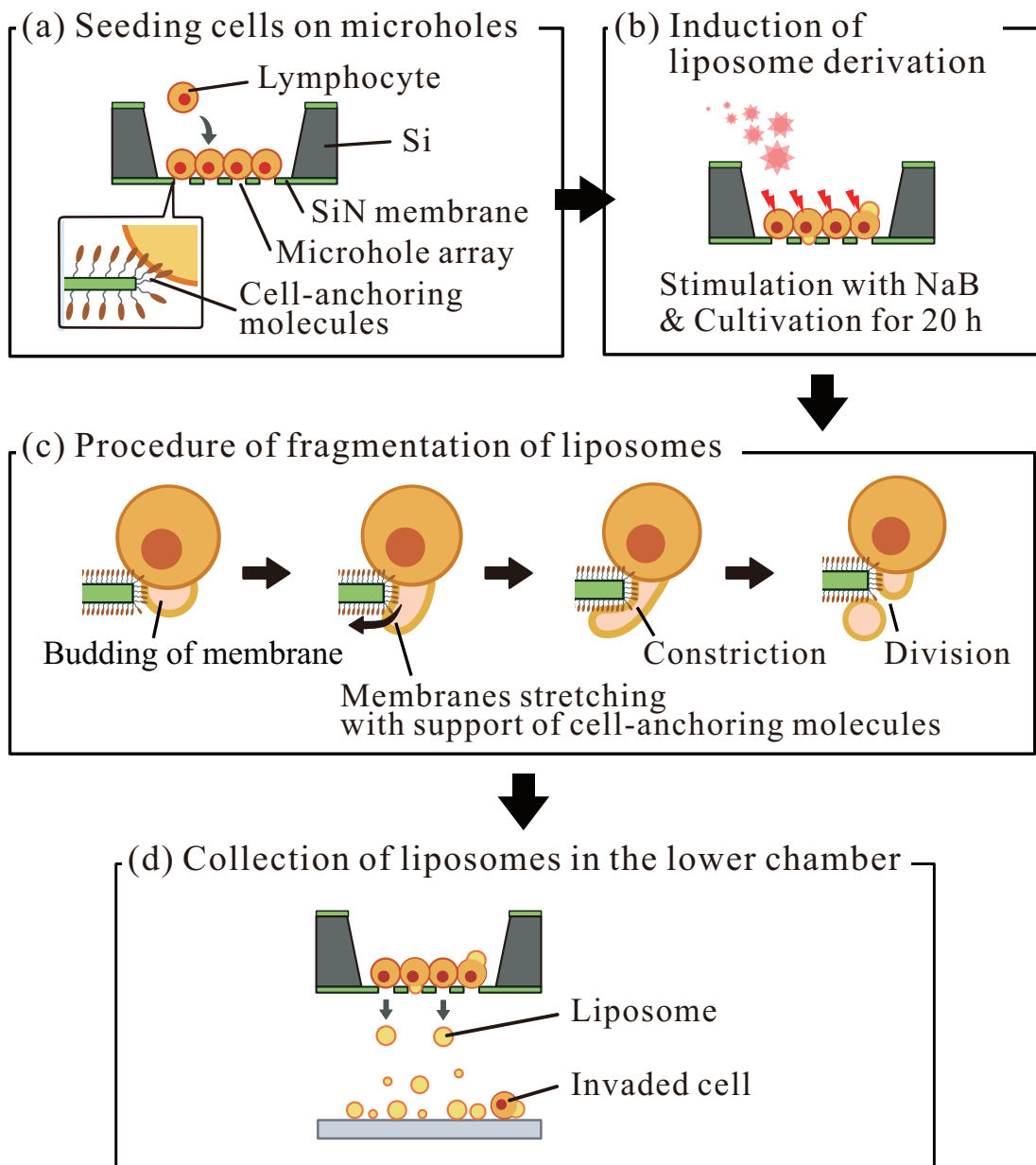


Fig.3.19 リポソーム生成デバイス下でのリポソーム生成原理

3.6 同調培養の検討

3.6.1 緒言

細胞の活動サイクルである細胞周期は、細胞の増殖や分化、物質生産や形態変化、各生合成反応の活性化に深くに関与している。そのため、細胞がどの周期に存在するかという情報は細胞活動を正しく評価する際に非常に重要となる。特に、細胞の微小孔侵入には細胞形態が深く関与していると考えられる。しかし、株化細胞は無限増殖する為に、細胞間の細胞周期の協調性が失われている。そのため、個々の細胞の細胞周期は無秩序な状態となり、様々な細胞状態が混在した状態となる。従って、株化細胞を用いて正確な細胞活動を評価するには、強制的な細胞周期の制御が必要となる。そこで、各細胞の状態を同調し、細胞周期を把握する為に、細胞周期制御技術の確立を行った。

3.6.2 細胞周期

動物細胞は、物質生産、遺伝子の複製、細胞分裂を繰り返すことにより増殖を行っている。また、同時に遺伝子の損傷状態の管理や修復を行っている。これらサイクルは細胞の活動に大きく関与する事から細胞周期と呼ばれる。細胞機能の変化が生じる分化もこの細胞周期により制御を受けている。細胞周期は、G1 期、S 期、G2 期、M 期で構成される (Fig.3.20)。通常、人間などの多細胞生物の個体を形成する細胞は、この細胞周期から退出した静止期 (G0) にある。細胞が増殖刺激を受けると G0 期から G1 期に移行し、細胞周期が開始される。G1 期では栄養状況などの外部環境の検知、及び、DNA 合成の準備、DNA 損傷の際の修復、及びアポトーシスの誘導などが行われる。次に S 期に移行し、ゲノムの複製が行われ、2 倍体であった細胞は 4 倍体となる。続いて、G2 期では DNA 複製の確認が行われ、最後に M 期で染色体の分配と細胞分裂が行われる。その後、細胞周期は再び G1 期に移行する。さらに G1、G2 期においては、DNA に損傷が生じた際に修復を行うための猶予時間を得るために、細胞周期の進行を停止する事が出来る。細胞は、遺伝情報を正しく次の世代に継承させるために、細胞周期上にチェックポイントと呼ばれる細胞周期停止点が存在する。細胞周期の制御はこのチェックポイントを利用して行われる。

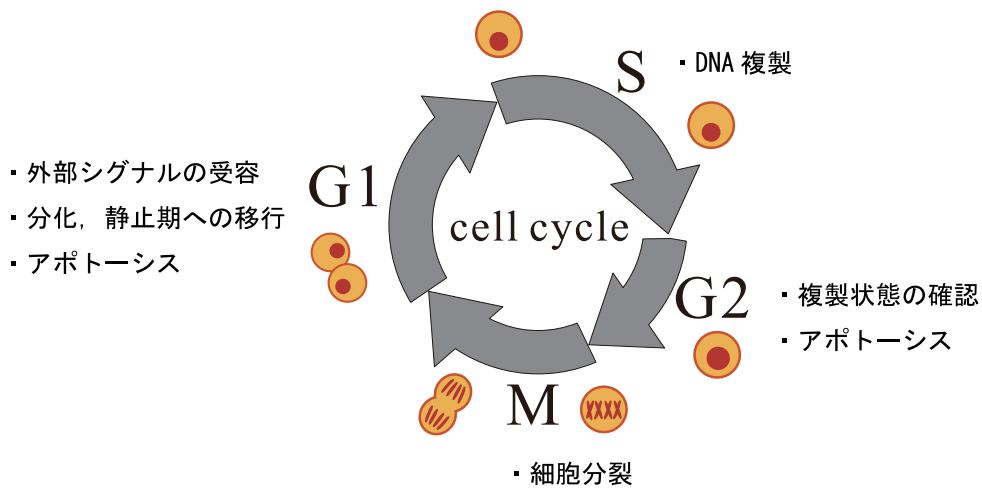


Fig.3.20 細胞周期

3.6.3 細胞周期分布の測定

細胞が細胞周期のどの期にあるかは、その細胞核の DNA 量から推測される。そこで、測定にはフローサイトメータ (FACS VantageSE, BD) を用いた。フローサイトメータは、試料粒子 (細胞等) の個々の大きさ, 内部構造複雑度, 蛍光強度を高速・高感度に解析を行う細胞分析装置であり, 医療分野において細胞診断に利用されている (Fig.3.21)。この装置を用いることにより, DNA 量測定における細胞周期の解析, 蛍光抗体法を用いた細胞分布の測定, また, 任意の細胞のみの分取などが可能となる[47]。この装置を用いて各細胞核の蛍光強度の測定を行った。そして得られた DNA 量分布より細胞周期分布の解析を行った。

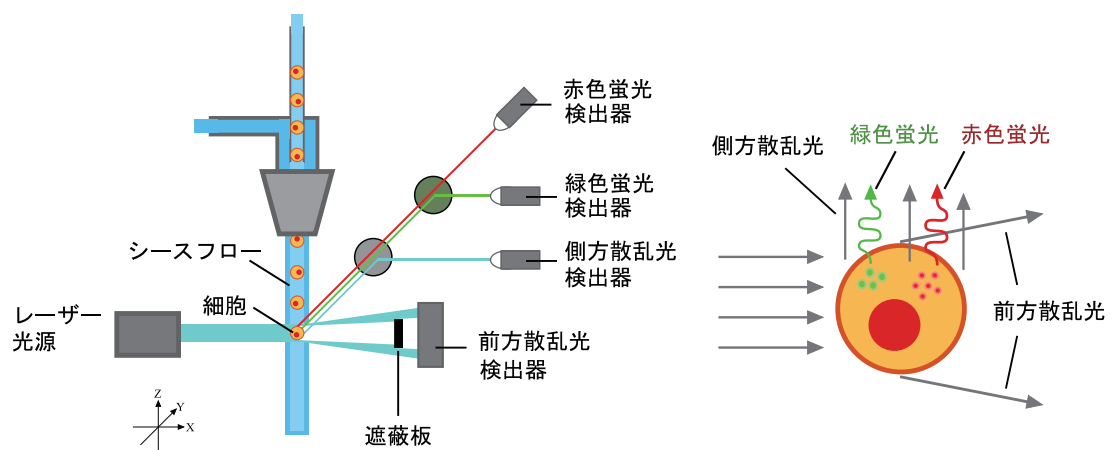


Fig.3.21 フローサイトメータと計測原理

DNA 量測定において、蛍光色素が DNA 量に相関した蛍光量を発することが重要となる。ここで、核染色を行う蛍光色素として Propidium Iodide を用いた。この色素は、DNA の二重鎖に架橋的に結合する事によって強い蛍光を発する。また、DNA 量に対する蛍光強度の相関性が高く、励起光に対する安定性も高い。しかし、この色素は生細胞の細胞膜を通過することが出来ないため、界面活性剤による細胞膜の除去処理を施す必要がある。蛍光色素溶液に添加した界面活性剤の作用により細胞膜は溶解し、核が露出する。露出した核は Propidium Iodide と容易に結合し蛍光染色される。計測方法として、まず、通常培養を行った Ramos を回収し、細胞懸濁液を 400 x g で 5 分間遠心した後、上清を除去して細胞のみを取得した。次に取得した細胞に細胞核染色液 (0.5 mM Propidium Iodide (Sigma) - 0.2% Nonidet P40 (Sigma) 水溶液) を 1 ml 加えて懸濁を行い、細胞膜の破壊と細胞核の蛍光染色を行った。その状態で 4 °C、10 分静置して、計測サンプルとした。このサンプルをフローサイトメトリーにて細胞 10^5 個の核の蛍光強度を計測した。細胞周期制御により生じた細胞周期の変化は、通常培養時における細胞周期の分布と比較することで識別することが可能となる。測定の結果、Fig.3.22 に示す DNA 分布図を取得した。ここで縦軸はサンプル粒子の個数、横軸が蛍光強度、すなわち核の倍体数を示す。細胞周期において G1 期、及び G2 期では DNA 量は変化しないため、ピークが生じる。これより、第一のピークは 2 倍体となる G1 期、第二のピークは 4 倍体となる G2 期、また、2 倍体から 4 倍体の間にかけて存在する細胞集団が S 期にあることがわかる。M 期の細胞は、分裂途中で細胞核が染色体に分離された状態となっているため、界面活性剤処理により完全に分解され、計測されない。

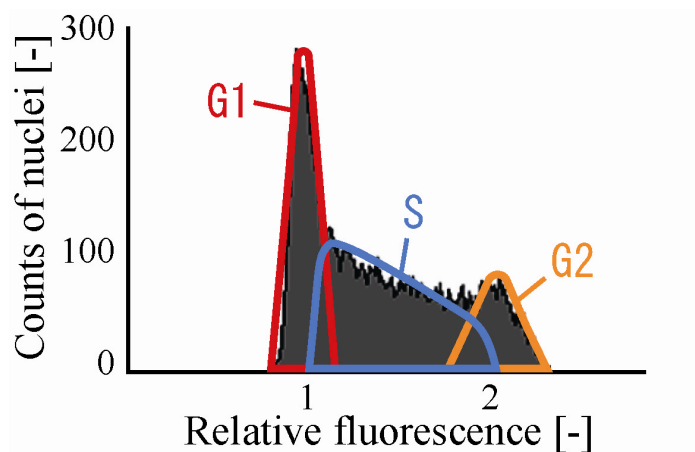


Fig.3.22 蛍光強度分布より予測される細胞周期分布

3.6.4 同調培養法

個々の細胞の細胞周期は同調しておらず、様々な状態の細胞が混在している。細胞周期を利用して細胞活動の細胞周期依存性を分析する為には、培養細胞のすべてが同調している事が必要とされる。正常細胞の場合、細胞増殖制御・ガン抑制機構が正常に働いている為、薬剤刺激や培養環境の変化より容易に細胞周期が停止する。例えば、正常繊維芽細胞は、培地中の血清を低濃度にすることで増殖が停止する（栄養飢餓法）。一方、株化細胞（無限増殖能を取得している細胞）は、ガン抑制機構や細胞周期制御機構の働きは低下しており、細胞周期制御は困難となる。そこで、薬剤を用いて強制的に細胞周期を制御する方法が用いられる。

・M期における接着性低下を利用した分離手法

細胞株が接着性細胞である場合は、M期にて生じる接着性の低下が、M期の細胞の分取に利用できる。接着性細胞においても、細胞分裂時は接着性が低下し、浮遊性細胞に類似した球形細胞となる。この時、器壁に振動を加えることで細胞は容易に器壁から剥離し、ピペッティングにより回収することが可能となる。また、この手法は、分離効率を向上させるためにM期制御薬剤のコルセミドが併用される。しかし、回収可能な細胞は少なく、M期以外の周期においても器壁との接着性が弱い浮遊性細胞ではこの手法は適用できない。

・長期薬剤阻害による同調培養

浮遊性細胞株に適用可能な細胞周期制御技術として、培地に細胞周期停止作用を有する薬剤を使用する方法がある。これは、培地に薬剤を添加して細胞周期を同一の期間で停止させ、各細胞が同一の周期に達した時点で物質を除去し同時に細胞周期を再開させる方法であり、大量の細胞の細胞周期を同調することが可能となる。細胞周期制御物質として細胞増殖に必須な物質生産を阻害して細胞周期チェックポイントを発動させる作用や細胞周期の停止を司る酵素の働きを直接活性化する作用を持つものが使用される。細胞周期制御に用いる薬剤には、その後の実験に影響が少ないように、以下の性質を有することが求められる。

・高い周期選択的制御性と低い細胞毒性

細胞周期を同調するためには、特定の周期のみに作用し、確実に周期を停止させる効果を有する薬剤が求められる。一方で、細胞周期の同調培養は実験系の前処理にあたるため、その後の系に影響が生じないように細胞分化やシグナル伝達、細胞

活性への影響が小さいものが求められる。

・細胞からの薬剤の除去が容易

同調培養を解除するにあたり、阻害作用が可逆的であり、蓄積性が弱く、細胞内から薬剤が迅速に除去される事が求められる。これは、各細胞において同時に細胞周期抑制が解除されなければ、同調培養として使用できないためである。細胞周期進行阻害剤として阻害効果の高い薬剤は多数存在するが、同時に除去が容易な薬剤は少ない。

以上より、細胞周期制御薬剤としても実績がある Hydroxyurea を使用した[48][49]。Hydroxyurea は、DNA の複製に必要なリボヌクレオチドをデオキシヌクレオチドに変換するリボヌクレオチド還元酵素の阻害剤である。この薬剤は慢性骨髄性白血病や真性多血症など慢性骨髄増殖疾患の化学療法に用いられている。

本検討では、薬剤を用いて DNA 複製を抑制し、S 期における細胞周期停止を誘導することで同調培養を行った。細胞に Hydroxyurea を用いて薬剤刺激を行うと、DNA 複製阻害が生じる。細胞は DNA 複製機構に異常が生じたことを認識して細胞周期の進行を停止する。この細胞周期の停止は DNA を複製する期間である S 期にのみ有効であるため、他の周期の G1, G2, M の細胞は細胞周期を進行し、最終的に S 期に統一される。その後、制御薬剤を除去すると、各細胞の細胞周期は S 期に同調された状態で細胞増殖を開始する。以上により、細胞分裂直前の細胞を一時的に除去することが可能となる。

3.6.5 細胞周期の S 期制御による同調培養

・細胞活性の維持

細胞周期制御を検討する為には、細胞の耐性が最も高く、細胞の増殖速度や生存率が安定する対数増殖期である必要がある。Ramos 細胞株を 10 %FBS 含有 ERDF 培地にて 2, 3 日ごとに継代培養した。また、この通常培養状態での細胞周期の分布を測定した。

・S 期制御培養

S 期制御培養は、制御薬剤を用いて細胞周期を同一の期で静止させることで行う (Fig.3.23)。通常培養状態の Ramos の培養液を Hydroxyurea (Shigma) を 1 mM に調製した 10 %FBS-ERDF 培地に交換し、細胞密度 5×10^5 cells/ml に調製した後、24 日

セル培養プレートに 1 ml/well で播種し、37 °Cの 5 %CO₂インキュベータで培養を行った。Hydroxyurea 添加後の細胞周期の変化を調べるために、添加後 15, 20, 25 時間後に細胞を取得した。次に、DNA 量分布の測定を行い、各経過時間における細胞周期の変化、及び細胞数と生存率の変化の測定を行った。細胞周期制御後、培地を 10 %FBS-ERDF 培地に交換して回復培養を行い、同様に細胞周期の変化、及び細胞数と生存率の変化を測定した。それらの結果より、Hydroxyurea の細胞周期に対する影響を検討した。

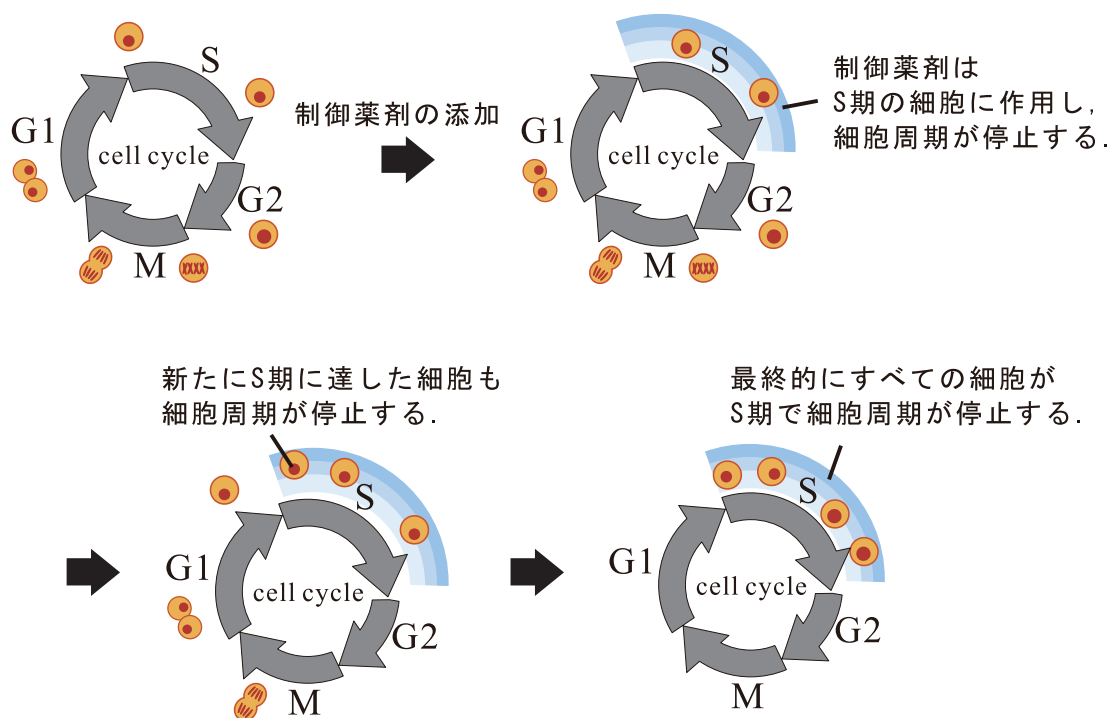


Fig.3.23 S 期細胞周期制御

測定の結果、Fig.3.24 に示す DNA 分布が取得できた。著しい分布の変化は見られなかった。これは、G1 期直後に S 期制御が開始された細胞は DNA 量が G1 期と同じになるためである。しかし、時間の経過とともに、G2 期の細胞が減少したため、G1 期にあった細胞も S 期に移行したと考えられる。そして、増殖に要する 20 時間以上の制御時間で処理すれば、十分な S 期制御がなされると考えられる。また、25 時間以上経過したものにおいても生存率の減少も穏やかであった。以上より、S 期制御時間は 25 時間を最適な条件とした。

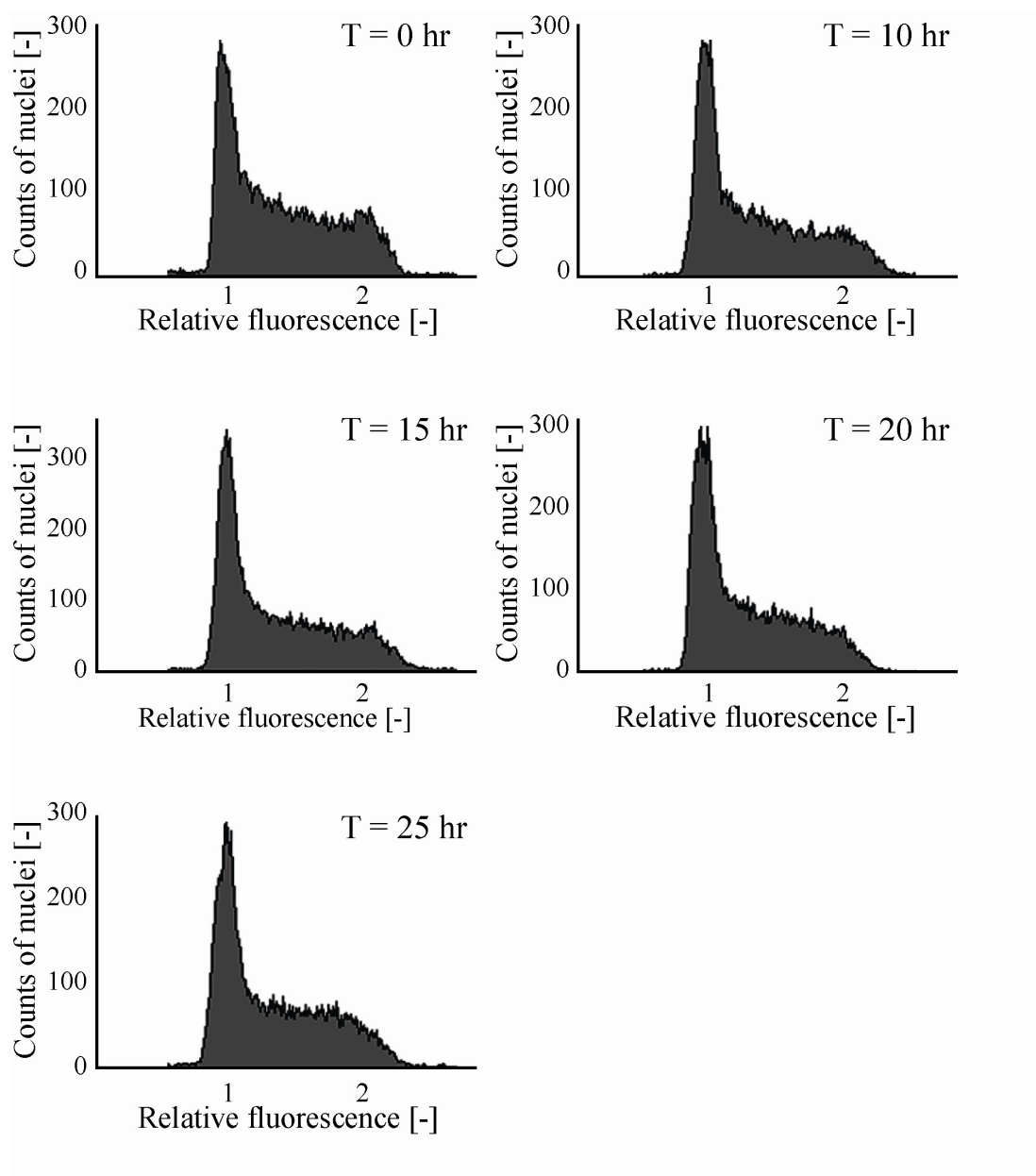


Fig.3.24 S 期制御培養時の細胞周期分布の推移

3.6.6 同調細胞の細胞周期進行

S 期制御培養後，制御薬剤を除くことで，細胞は同調状態を維持したまま細胞周期の進行を再開する (Fig.3.25)．細胞周期分布の推移は以下の方法で計測した．まず，通常培養状態の Ramos を，Hydroxyurea を 1 mM に調製した 10 %FBS-ERDF 培地を用いて S 期制御培養を行った．分裂時間を超える 25 時間が経過した時点で，すべての細胞が S 期に移行して同調状態が確立したとし，その後，培地より薬剤を除去し，経過時間ごとに一部の細胞を回収して計測サンプルとし，細胞周期分布を解析した．

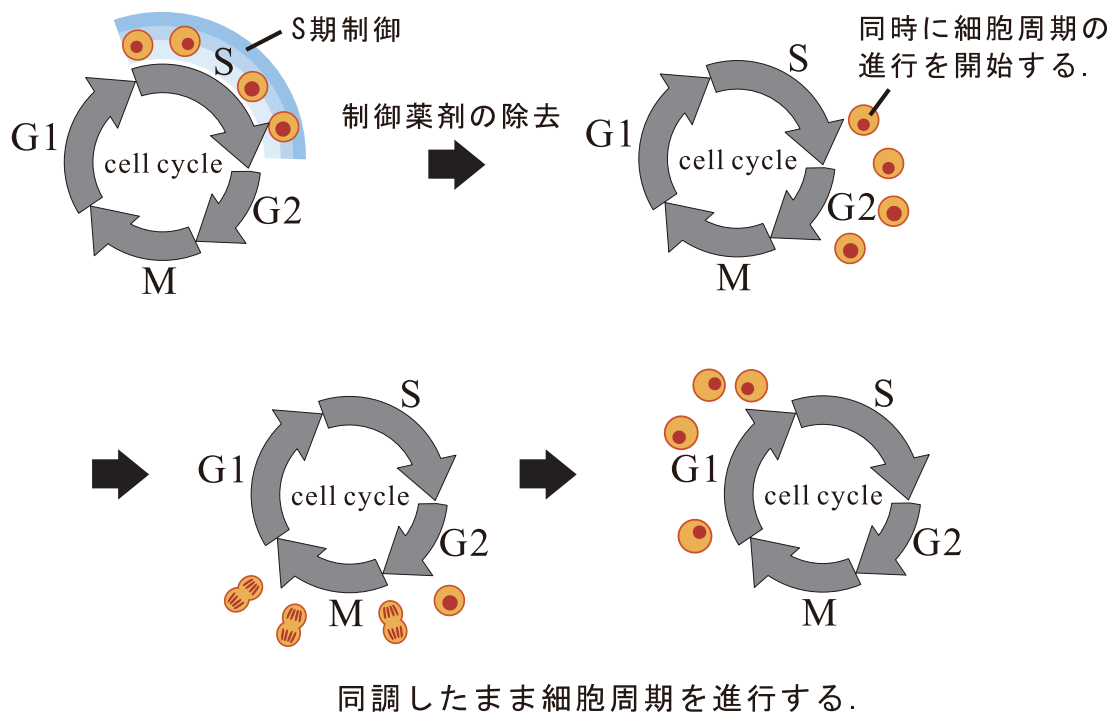


Fig.3.25 同調培養

測定の結果, S 期に同調された細胞群は同調状態を維持したまま細胞周期の進行が再開することが認められた (Fig.3.26). また, 薬剤除去より 10 時間後には G1 期にピークの発生が認められ, 細胞分裂が生じ始めていることが認められた. さらに, G2 期で細胞周期が停止し増殖が抑制された細胞が認められた. これにより, 薬剤による細胞周期制御により構築した同調状態は, 短時間で失われることが認められた.

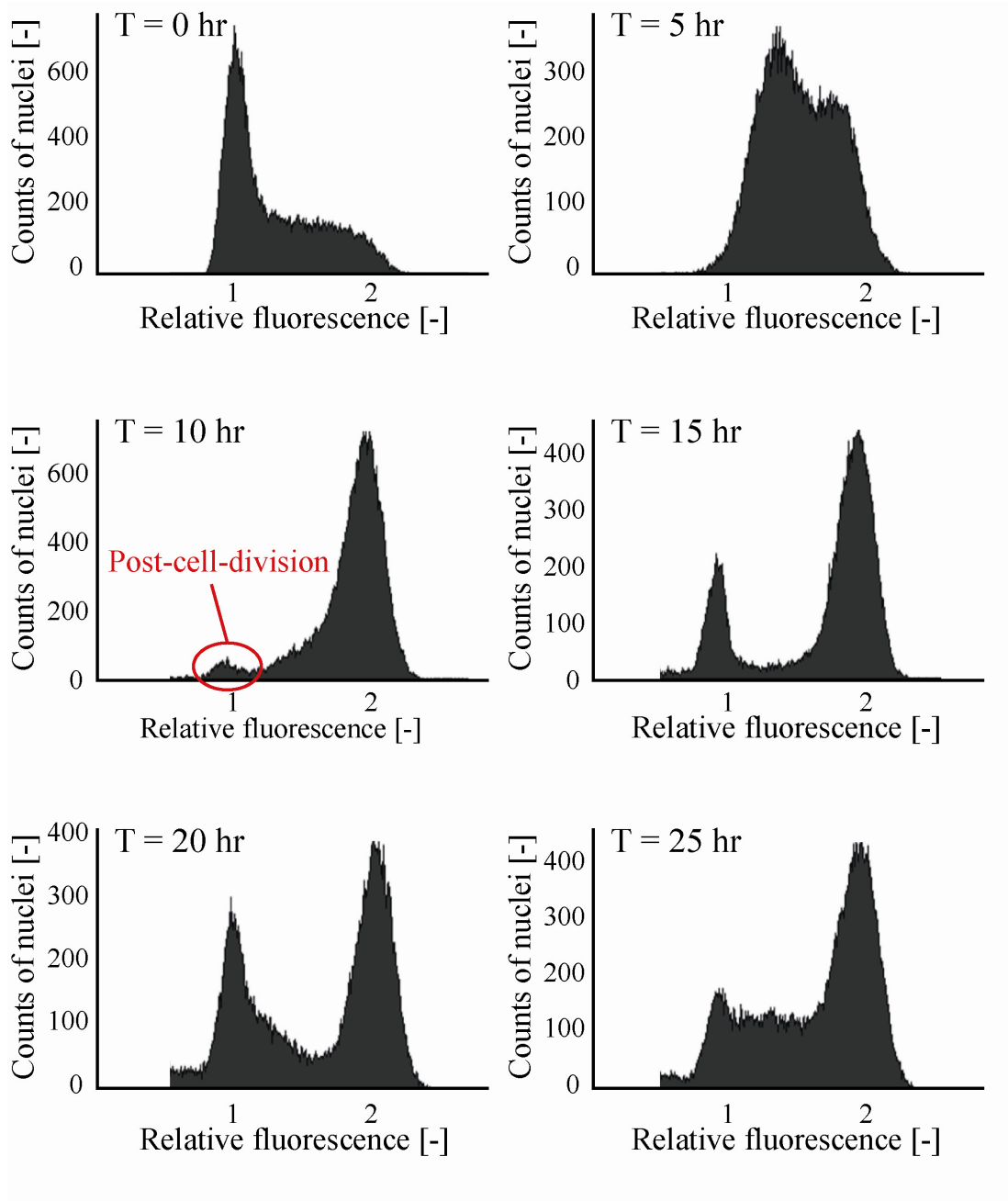


Fig.3.26 同調培養時の細胞周期分布の推移

3.6.7 結論

薬剤を用いた細胞周期制御により、リポソーム生成分離デバイスに使用するのに十分な量の細胞を同調培養することが出来た。この細胞を使用した場合、微小孔を通過しないようにするためには、細胞分裂が生じない期間であるS期同調培養後10時間以内にリポソーム生成誘導の薬剤刺激を行うことが必要であると考えられる。また、リポソーム生成の誘導にも時間を要することから、S期同調培養直後にリポソーム生成の薬剤刺激を行うのが最適であると考えられる。

3.7 同調培養による細胞侵入の抑制

3.7.1 緒言

細胞の直径は10~15 μm 程度であるのに対し、製作したデバイスの微小孔の孔径は5 μm である。細胞より微小孔は十分小さく、通常であれば細胞は通過できない。微小孔を細胞が通過する原因の一つとして、細胞分裂に伴う核の不定型化があげられる。細胞は細胞分裂の際に、核を保護する核膜の消失と染色体の形成が生じる。そして、細胞は柔軟性が増した状態となり、細胞の微小孔の通過が可能になると考えられる。そこで、細胞の微小孔侵入が、細胞分裂によるものであることの検証を行うために、微小孔に細胞が侵入する頻度に対する細胞分裂の抑制が与える影響の評価を行った。細胞の微小孔通過が細胞分裂によるものであることの判断は、同調培養を用いて分裂細胞を除去した細胞を微小孔上に播種し、通過した細胞を計測することにより可能となる。

3.7.2 実験手順

通常培養状態の細胞と同調培養を行った細胞をそれぞれ制作したデバイスに播種した。その後、微小孔を通過して下部チャンバに侵入した細胞の数を計測した。微小孔下部をリアルタイム培養細胞観察システムを用いて15分毎撮影した。得られた画像より、微小孔を通過して落下してきた細胞を計測した。微小孔を通過した細胞は撮影視野中央付近に落下し、周辺部には落下しないので、各経過時間の撮影画像を比較して新たに通過してきた細胞を計測した (Fig.3.27)。

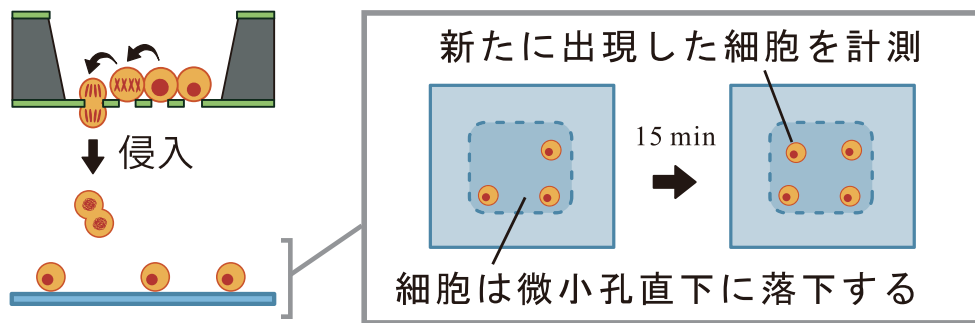


Fig.3.27 微小孔侵入細胞の計測方法

3.7.3 結果

実験の結果を Fig.3.28 に示す. 通常培養状態の細胞を用いると, 時間経過とともに常に一定量の細胞が微小孔を通過した. 一方, 細胞周期制御を行って細胞分裂を抑制した細胞を用いると, 微小孔を通過した細胞は約 90%減少した. よって, 細胞が微小孔を通過するのは細胞分裂が原因であることが示され, これを抑制することでリポソーム分離効率が向上することが期待できる.

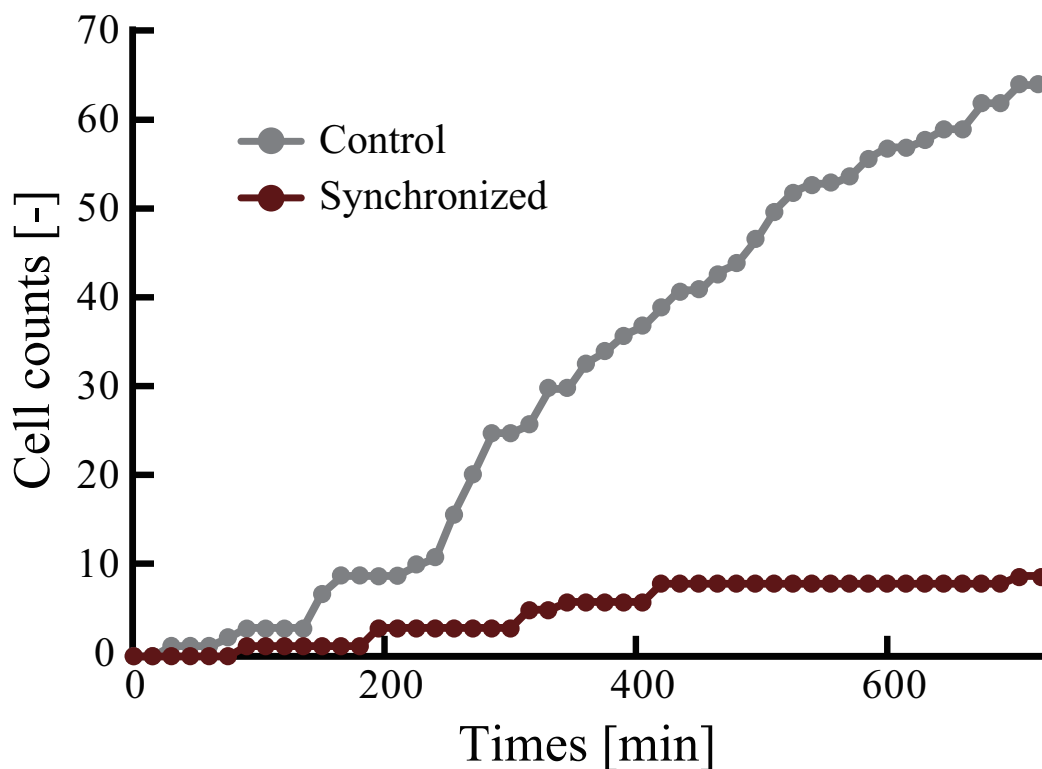


Fig.3.28 同調培養適用による微小孔侵入細胞量の変化

3.7.4 結論

微小孔の孔径は細胞より十分小さい。しかし、細胞分裂時には、核膜が消失するため、細胞自体の柔軟性が向上し、微小孔に侵入できるようになることが細胞周期制御を用いた評価により明らかとなった (Fig.3.29)。また、Ramos の分裂周期は 20 時間と短い、細胞分裂が生じる M 期の長さは細胞株の種類にかかわらずおよそ 1 時間と一定の長さとなる。そのため、分裂周期が短い細胞株では、全細胞集団内に存在する分裂細胞の割合は高くなる。よって、通常培養状態の細胞をリポソーム生成分離デバイスに用いた場合、大量の細胞が微小孔を通過すると考えられる。これは、細胞とリポソームの分離効率を低下させる主たる原因と考えられる。従って、リポソーム分離効率を向上させるには、細胞が微小孔を通過するのを抑制する為に、前処理として細胞に同調培養を適用することが有効であると考えられる。

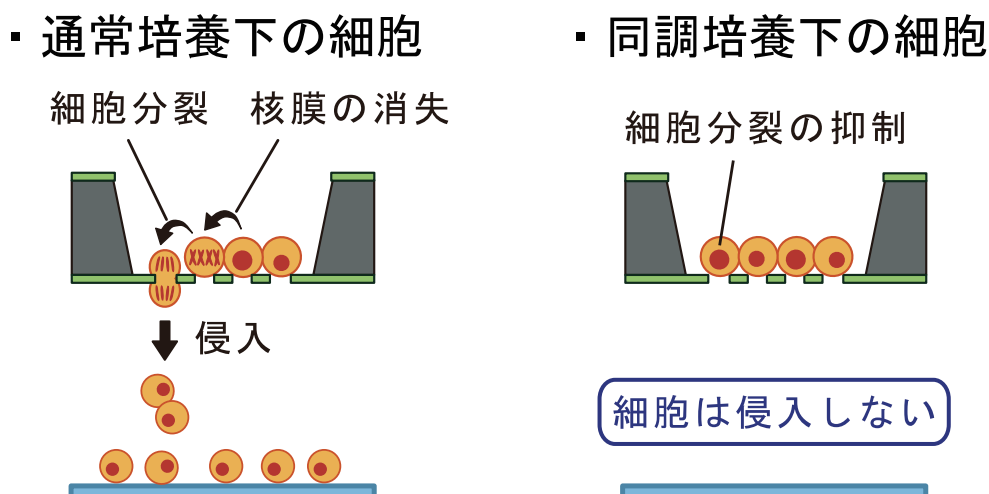


Fig.3.29 細胞の微小孔侵入の原理と抑制

3.8 同調培養を利用したリポソーム生成分離実験

3.8.1 緒言

同調培養を施して分裂細胞を除去した細胞を、製作したデバイスに播種して細胞由来リポソームの生成分離実験を行った。すでに、微小孔に細胞が侵入するときには細胞分裂が伴うことが明らかとなったため、細胞の混入によるリポソーム分離効率の低下も、同調培養による分裂細胞の除去により改善されると考えられる。

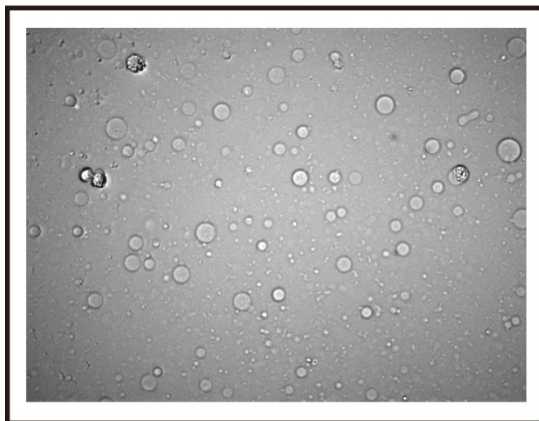
3.8.2 実験手順

Ramos を事前に S 期同調培養を行った。次に、3.5 と同様にして細胞をデバイスに播種してリポソーム生成の薬剤刺激を行った。薬剤刺激 25 時間後、上部チャンバと微小孔基板を外し、下部チャンバ底面を顕微鏡を用いて観察した。そして、生成したリポソームの直径を計測した。

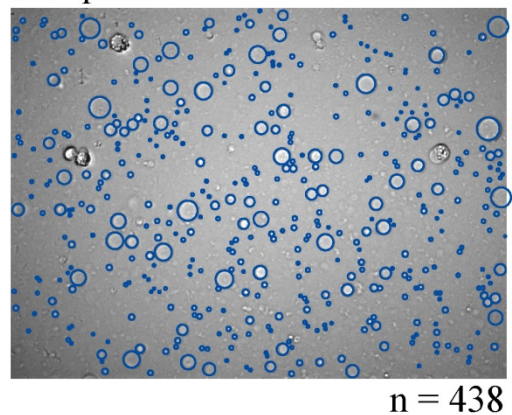
3.8.3 結果

同調培養と細胞膜アンカー修飾デバイスを用いた場合の下部リザーバー内の顕微鏡写真を Fig.3.30 に示す。同調培養を用いることで、細胞の混入が減少した、この時のリポソーム分離効率はおおよそ 99 % となった。また、粒子径の分布は 5 μm 以上のリポソームが減少し、約 3 μm に高いピークを示した。

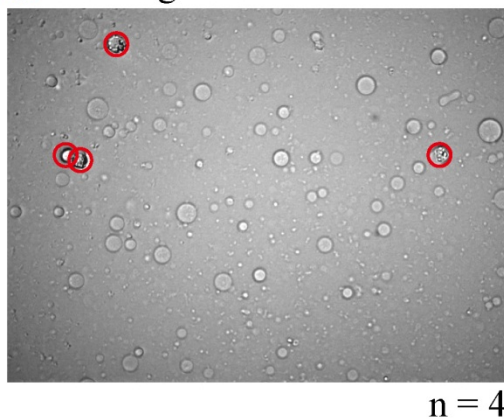
- Anchored and synchronized



○ Liposome



○ Invading cell



- Size distribution

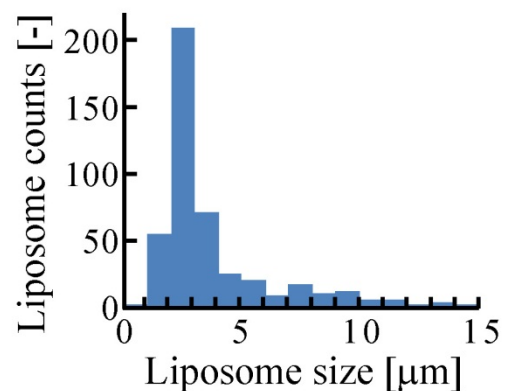


Fig.3.30 同調培養を適用したリポソーム生成分離

3.8.4 結論

同調培養と微小孔デバイスにより高効率なリポソームの生成分離を行った。このとき、 $5\ \mu\text{m}$ 以上のリポソームが減少したことから、同調培養未適用の場合に得られた $5\ \mu\text{m}$ 以上のリポソームは、微小孔に侵入して下部チャンバに混入した細胞から生成されたものであったと考えられる。

3.9 結論

細胞由来リポソームの生成分離を目的として、微細加工技術を用いた細胞由来リポソーム生成分離デバイスの構築を行った。このデバイスを用いることで、細胞由来リポソームの生成量が大幅に上昇した。しかしながら、微小孔に細胞が侵入し、回収したリポソームに混入する問題が生じた。そこで、細胞の活動サイクルである細胞周期に着目し、薬剤を用いた同調培養をもちいることで、細胞の微小孔への侵入が、細胞分裂に伴う柔軟性の増加によるものであることを明らかとした。そして、同調培養を併用することで、細胞由来リポソームの生成分離を行い、分離効率を 99 % と大幅に改善させることに成功した。さらに分離効率を改善するには、同調培養の改善により同調率を改善する方法が考えられる。また、分裂した細胞が混入しないように、微小孔アレイを有する底面を二重にするなどの方法も考えられる。

第4章 ヒト細胞由来リポソームの

応用技術

4.1 緒言

ヒト細胞より膜タンパク質を生体に近い状態で回収することが可能となれば、それら膜タンパク質の特性を用いた医薬や創薬スクリーニング技術が構築できるようになると考えられる。そこで、得られた膜タンパク質の医療診断や新薬開発などへの応用技術の検証として、細胞由来リポソーム上の膜タンパク質を用いた DDS や、膜タンパク質に結合する生体分子のバイオセンサの構築を試み、評価を行った。

細胞由来リポソームを DDS に使用することで、生体内に存在する機能が既知の膜タンパク質をそのまま医薬として使用できると、生体内の生理作用と同等の高い効果を期待できる。また、薬理効果の立証が容易となる。また、リポソームは細胞構成成分と同じくタンパク質とリン脂質で構成されるため、肝臓や腎臓などの臓器に分解や排出の負担をかけない医薬が期待できる。一方、リポソームを膜タンパク質の運搬体として利用することで、取り扱いが容易となり、創薬スクリーニングに使用する評価系の構築が容易になると考えられる。目的の膜タンパク質の機能を阻害する薬剤を開発する場合には、膜タンパク質に高い親和性と選択性を有する物質を高い処理効率を有するスクリーニング系により探索することが最も効率が良い方法となる（ハイスループットスクリーニング）。その方法として、膜タンパク質を修飾したセンサを複数個設置し、様々な物質の結合を分析する方法が挙げられる。そこで、まずは既知の物質を計測することを目的として、センサ表面に細胞由来リポソームを固定することで、膜タンパク質に結合する分子のセンサの構築を試みた。

4.2 細胞由来リポソームを用いた薬剤輸送システムの構築

4.2.1 緒言

近年の DDS 研究において、ガン選択的薬剤輸送能（アクティブターゲティング）を付与したリポソームを用いたがん治療法が注目されている[50][51]。これは薬剤を内包した人工リポソームの表面に PEG などを介して抗ガン抗原抗体を表面修飾することで、抗原抗体反応によりがん近傍に抗がん剤などの薬剤を輸送する技術である。しかし、抗体修飾リポソームを調製するには、多くの工程が必要となり、処理液の頻繁な置換が必要となるため、収率が悪くなる。また、リポソームの表面に抗体を修飾する反応は PEG 鎖を介した NHS によるカップリング反応を用いて行われるが、抗体分子との反応部位は制御できず、抗体の反応性の消失が生じる恐れがある。また、抗体は非常に高価であることや、不安定な物質（核酸、酵素、膜タンパク質、ペプチドなど）は担持させることが出来ないことが、これらを用いた DDS 開発の課題となっている。そこで、従来のリポソーム調製法とは全く異なった手法でされる、細胞由来リポソームを用いて DDS について検討を行った。細胞由来リポソーム表面には、由来となった細胞の膜タンパク質が担持されることが認められている。そこで、膜タンパク質を用いた細胞刺激のモデルとして、リポソーム表面の抗体を利用した DDS について検証を行った。

4.2.2 ハイブリドーマ由来リポソームによるイムノリポソーム

ヒト-ヒトハイブリドーマ AE6 は肺腺ガン抗原に対する IgM 抗体を生産するハイブリドーマである。細胞の酪酸ナトリウム処理により得られた細胞由来リポソームは、元となった細胞の発現していた膜タンパク質を有しており、それらは機能性を保持していると考えられる。そこで、AE6 より取得した抗肺がん抗体を有する細胞由来リポソームによる、肺腺ガン細胞株 A549 を標的とした蛍光物質輸送能を評価した。この細胞より得られたリポソームは、表面に膜型の肺腺ガン抗体を担持している。この AE6 由来リポソームは、一般的な抗体修飾リポソームと形態は異なるものの、表面に抗体を有しており、DDS としての可能性が示唆される (Fig.4.1)。また、表面に担持された抗体はヒト型タンパク質であることから、免疫担当細胞により自己組織として認識され、排除されにくくなると期待できる。

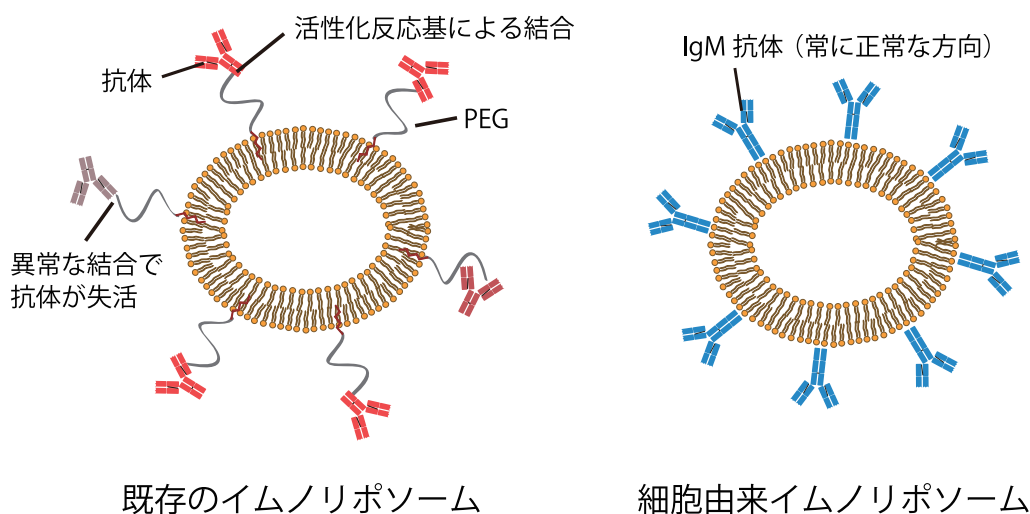


Fig.4.1 イムノリポソームの構造

4.2.3 肺腺ガン細胞株 A549 に対する薬剤輸送実験

肺腺がん由来細胞株 A549 は、AE6 の抗体が結合する肺ガン抗原を有している。そこで、AE6 より得たリポソームを用いて A549 に対する薬剤輸送実験をおこなった。初めに、細胞由来リポソームに担持させた蛍光物質が対象細胞へ輸送されるか評価を行った。次に、細胞由来リポソームに細胞傷害性を付加する為に、抗がん剤を内包させる処理を行った。こうして得られたリポソームを用いて抗がん剤輸送実験を行った。

・ A549 を標的とした DiI の輸送

蛍光染色を行ったリポソームが細胞表面に結合し、内部に取り込まれると、細胞内部に蛍光物質が移行する (Fig.4.2)。蛍光染色された細胞由来リポソームは下記の工程にて取得した、まず、AE6 を蛍光色素で染色を行った。蛍光物質には細胞膜に結合する蛍光物質である DiI (Invitrogen, CA, USA)を使用した。AE6 を、5 $\mu\text{g/ml}$ の DiI を含む ERDF に懸濁して 15 min 処理することで、細胞膜を蛍光染色した。次に、DiI 染色後の AE6 を Cell-Tak を用いて培養用シャーレ底面に固定し、酪酸ナトリウム 10 mM によりリポソーム生成を誘導した。最後に、リポソーム生成後、リポソームを含むシャーレ上部の培地を回収し、遠心分離により PBS に置換を行った。次に、蛍光染色されたリポソームを、A549 を予め培養した培養シャーレへ播種した。播種の 2 時間後、A549 に取り込まれた蛍光物質を、蛍光顕微鏡を用いて観察を行った。

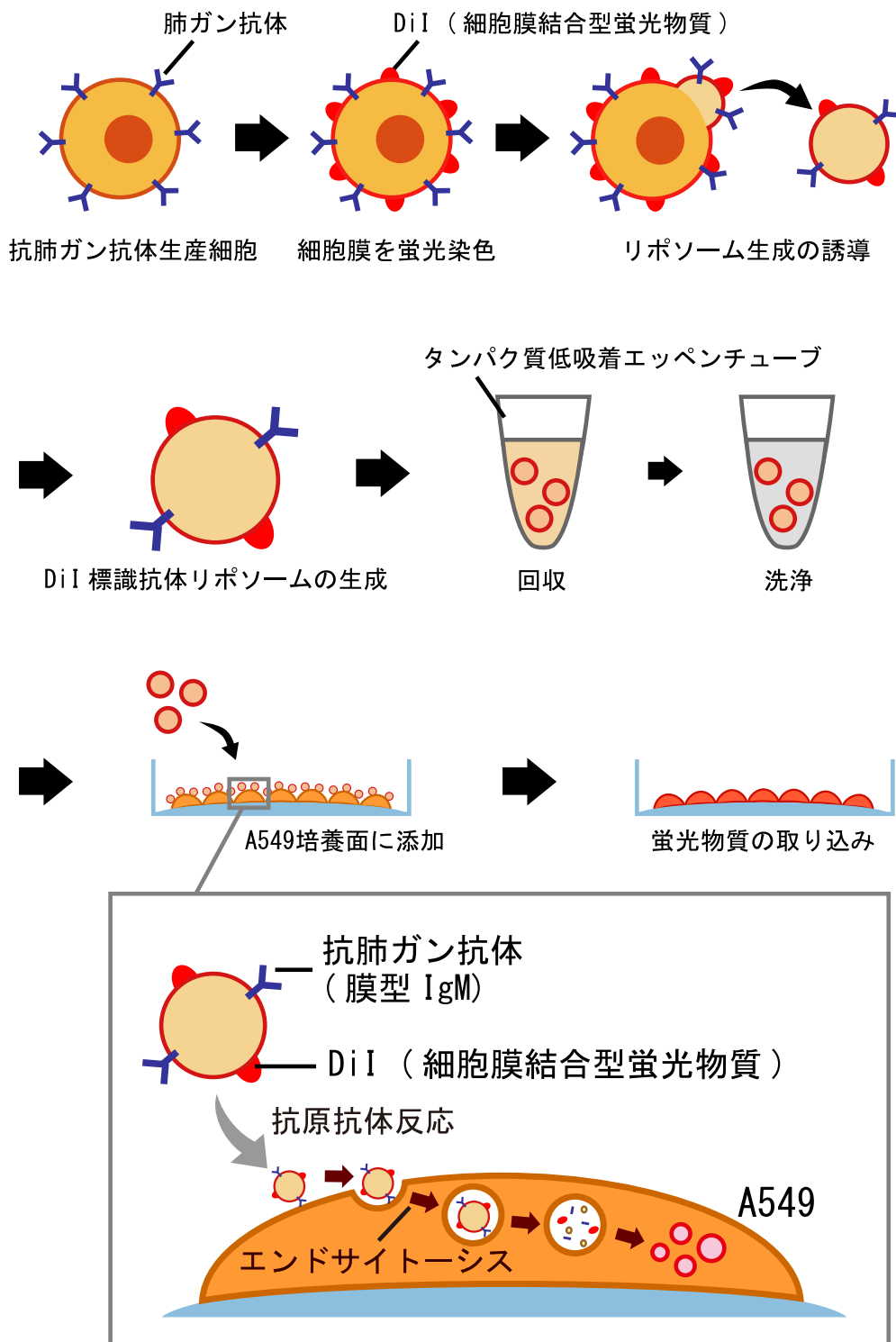


Fig.4.2 A549 細胞への膜結合蛍光物質の輸送

・ A549 に取り込まれた DiI の観察

蛍光顕微鏡を用いた観察により、DiI 染色されたリポソームが A549 細胞内に取り込まれていることが確認できた (Fig.4.3). また、取り込まれた蛍光色素が細胞内部の輸送機構により移動しているのが明確に確認できた。これによりリポソームに担持した薬剤が、標的細胞内部に輸送されることが認められた。

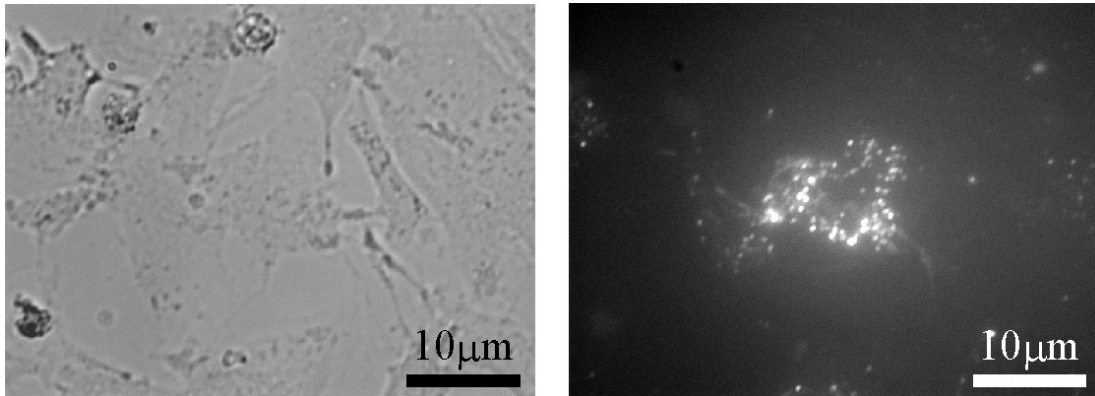


Fig.4.3 蛍光物質を取り込んだ A549 の蛍光観察像

4.2.4 A549 を標的とした抗生物質の輸送

細胞由来リポソームに抗生物質を担持することで、細胞への抗生物質輸送を試みた (Fig.4.4). A549 は 1 $\mu\text{g/ml}$ の ActinomycinD (ActD) で 24 時間を処理すると死滅することが知られている[52]. そこで、AE6 より得た細胞由来リポソームを 2 $\mu\text{g/ml}$ の ActD を含む PBS に 30 分間浸漬することで薬剤の内包処理を行った。ActD は、細胞膜を透過して細胞質に蓄積する性質を有するので、リポソーム内部に容易に内包することができると考えられる。このリポソームが A549 に結合すると、ActD が輸送されて A549 の活性低下が生じると考えられる。まず、ActD 処理を行った細胞由来リポソームを回収し、遠心分離により分散液を、ActD を含まない PBS に置換を行った。次に、このリポソームを、A549 を予め培養した培養シャーレに播種した。播種の 24 時間後、A549 の細胞活性を CCK-8 (同仁化学) を用いた。細胞活性に応じて活性が変化するミトコンドリアによる還元反応により生成した有色のホルマザンを、ホルマザンの吸収波長 450 nm で吸光度計測した。比較として、標準の通常培養を行った細胞と、微量の ActD が残留したと仮定した場合の細胞活性への影響を確認する為に ActD のみを 2 ng/ml になるように培地に添加した場合、および、薬剤未処理 AE6 由来リポソーム、薬剤未処理 Ramos 由来リポソーム、ActD 処理 Ramos 由来リポソームをそれぞれ添加した場合についても同様に計測を行った。

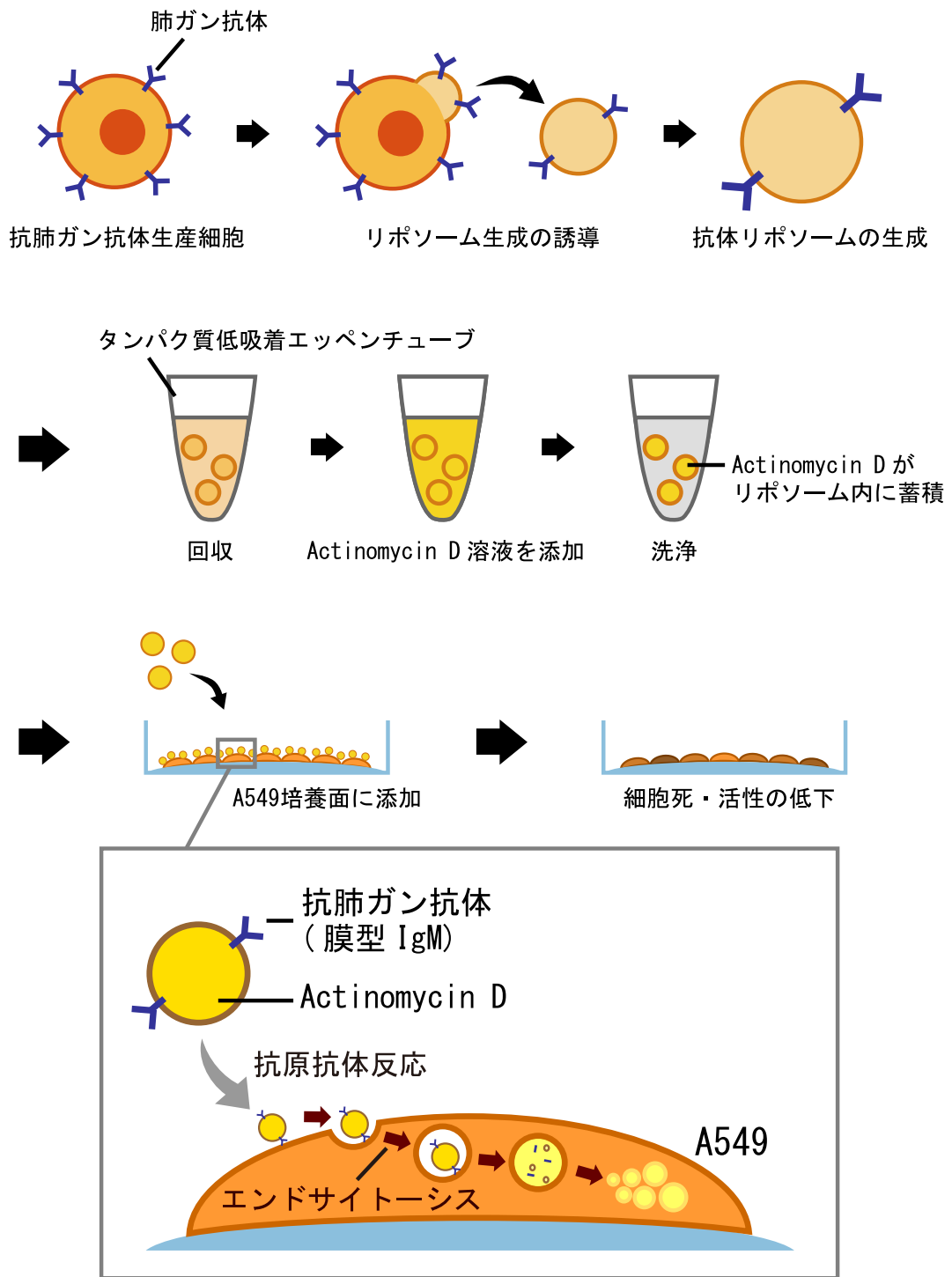


Fig.4.4 A549 細胞への抗生物質の輸送

・抗生物質を内包したリポソームによる A549 細胞活性抑制効果

ActD で処理した AE6 由来リポソームを添加した場合において、コントロールと比較して 50 %以上の細胞活性の低下が認められた (Fig.4.5)。一方, ActD のみを 2 ng/ml で添加した場合と, 薬剤で処理していない細胞由来リポソームのみを添加した場合には細胞活性には影響しなかった。これは, 細胞由来リポソーム内に蓄積された ActD が細胞へと輸送されたと考えられる。ActD 処理した AE6 由来リポソームで細胞活性の低下が認められたのは, 細胞表面の抗体が A549 と結合して輸送が生じたと考えられる。また, ActD 処理した Ramos 由来リポソームでも細胞活性の低下が認められた。これは, Ramos 表面に存在する何らかのタンパク質が A549 の表面に結合したことで生じたと考えられる。一方, ActD を 2 ng/ml 添加した場合には細胞活性の低下は生じないことから, これよりも微量と考えられるリポソーム洗浄の残留 ActD による影響は生じないことが認められた。

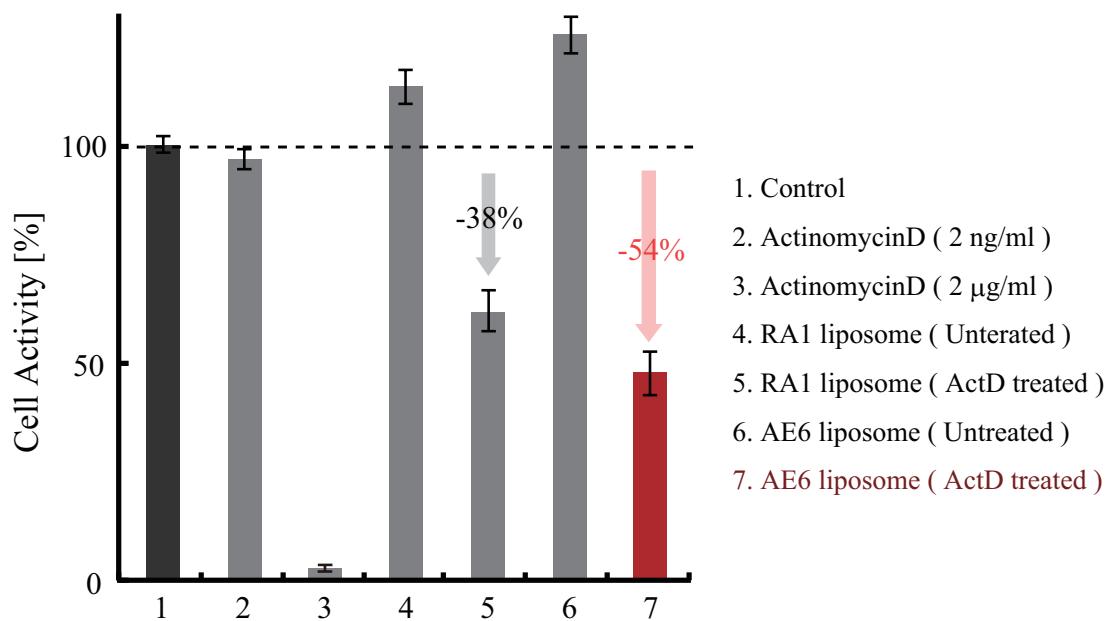


Fig.4.5 抗生物質含有細胞由来リポソームの A549 細胞活性抑制効果

4.2.5 結論

抗肺ガン抗体生産ハイブリドーマから生成された抗体を表面に有する細胞由来リポソームは, 抗生物質を内包させることで, 抗肺がん細胞特性を示した。その結果より, 細胞由来リポソームは DDS としての可能性を有することが認められた。一方, Ramos より得られたリポソームも同様の効果を示した。これは, Ramos 表面の抗体による非特異的反応が生じたためと考えられる。

4.3 膜タンパク質を利用したバイオセンサの構築

4.3.1 緒言

バイオマーカーの検出法は、酵素抗体法に代表される測定対象物質に色素・酵素・電気化学マーカーなどの標識物質を結合させる手法と、QCM（水晶発振子マイクロバランス）や SPR（表面プラズモン共鳴）に代表されるセンサ表面で生じた質量変化を電気特性や光学特性の変化として検出する方法が挙げられる。前者は感度が高いが、測定までの行程に時間を要する。後者は、測定感度は前者より劣るものの、測定までの行程が少なく、反応中の変化の連続した計測が可能になる。また、結合・乖離速度の情報からカイネティクス解析が可能になる。本検討では、迅速な計測が可能で、計測システムの小型化が容易な QCM によるバイオマーカーセンサの構築を試みた。QCM は、水晶振動子に設けられた金電極上の質量変化を水晶振動子の共振周波数の変化として定量化することが出来る。周波数変化あたりの質量変化は、Sauerbrey の式 (4.1) より求められる[53].

$$\Delta M = \frac{S\sqrt{\rho\mu}}{2NF^2}(-\Delta F) \quad (4.1)$$

ΔF : 反応後の周波数変化 [Hz]

ΔM : 質量変化 [g]

S : 電極面積 [cm^2]

ρ : 水晶の密度 [2.65 g/cm^3]

μ : 水晶のせん断応力 [$2.95 \times 10^{11} \text{ g/cm sec}^2$]

F : 水晶の基本周波数 [Hz]

N : オーバートーン次数

QCM はセンサ表面に測定対象と結合する物質を担持することでバイオセンサとして機能する。本検討では、細胞由来リポソームを担持することで、膜タンパク質に結合するバイオマーカーのセンシング技術の構築を試みた。

Ramos より得られたリポソームは、IgM 分子が表面に存在する。バイオセンサのモデルとして、Ramos 由来リポソームを担持した QCM センサを構築した。このセンサに抗 IgM 抗体を作用させることでセンシング評価を行った。

4.3.2 細胞由来リポソームを固定した QCM センサ

・QCM 装置

QCM 装置は、日本電波工業（株）製 QCM 装置（NAPiCOS, PSA10A）を使用した。この装置が使用する QCM ツインセンサは、同一水晶基板上に、反应用センサと

参照用センサとなる2基の QCM センサ素子を有する. 参照用センサ素子を予めブロッキング処理することで, 流体の振動や溶液の粘性変化などにより生じた周波数変化を検出する. そして, 反応用センサ素子より得られた周波数変化をより, これを差分することで結合反応による周波数変化のみを算出する (Fig.4.6). また, センサに作用させる試料は, 流路内に注入した後, シリンジポンプにより送液して供給する.

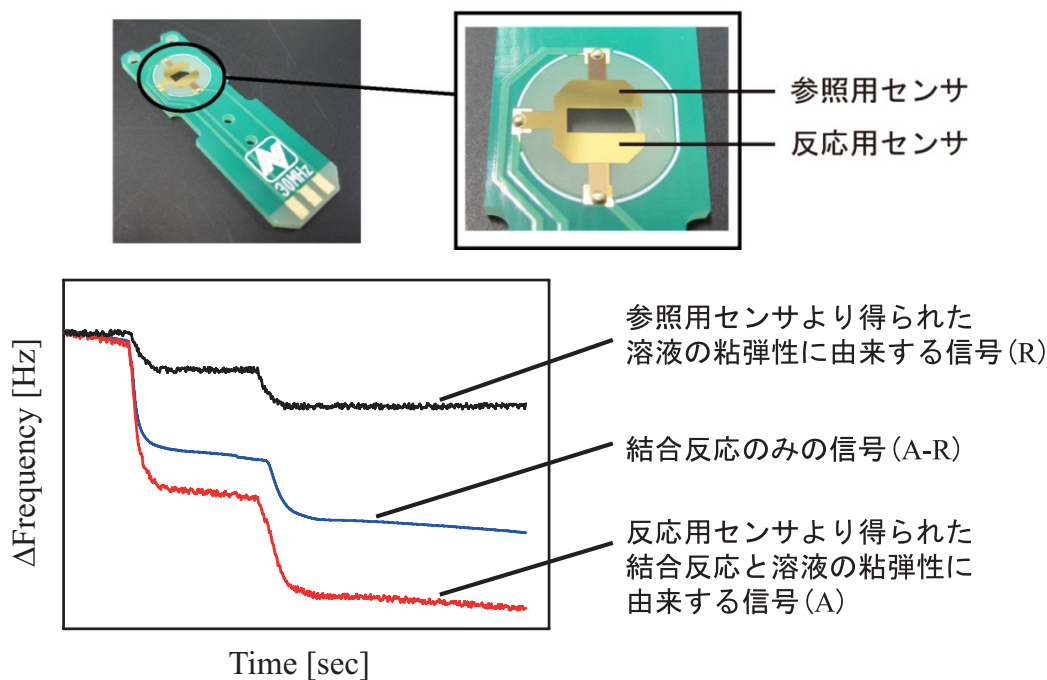


Fig.4.6 QCM ツインセンサによる差分計測

・ Ramos が生産する IgM に対する抗 IgM 抗体の結合能評価

生体分子モデルとして使用する抗 IgM 抗体が, Ramos が生産する IgM に対して結合能を有することを確認する為に, Ramos 培養上清中の IgM に対する結合反応の検出を行った. まず, QCM センサの参照用センサのみを 0.1% BSA/PBS によるブロッキング処理を行った. 次に, QCM センサ基板を装置に取り付け, 送液系を接続した. 測定開始後, 抗 IgM 抗体 100 μ g/ml, 0.1%BSA/PBS, Ramos 培養上清の順に供給した. 評価の結果, 抗 IgM 抗体は Ramos の生産する IgM に対して結合能を有することが認められた (Fig.4.7). また, 培養上清を注入した際に, 参照用センサにおいても大きな応答が得られた. これは, 培養上清が高濃度のタンパク質を含んでおり高粘度であることや, 脂質などの疎水性分子の非特異的吸着により生じたと考えられる. この結果より, 生体由来試料の計測には非結合性応答を検出する参照用センサによる補正が有効であることが認められた.

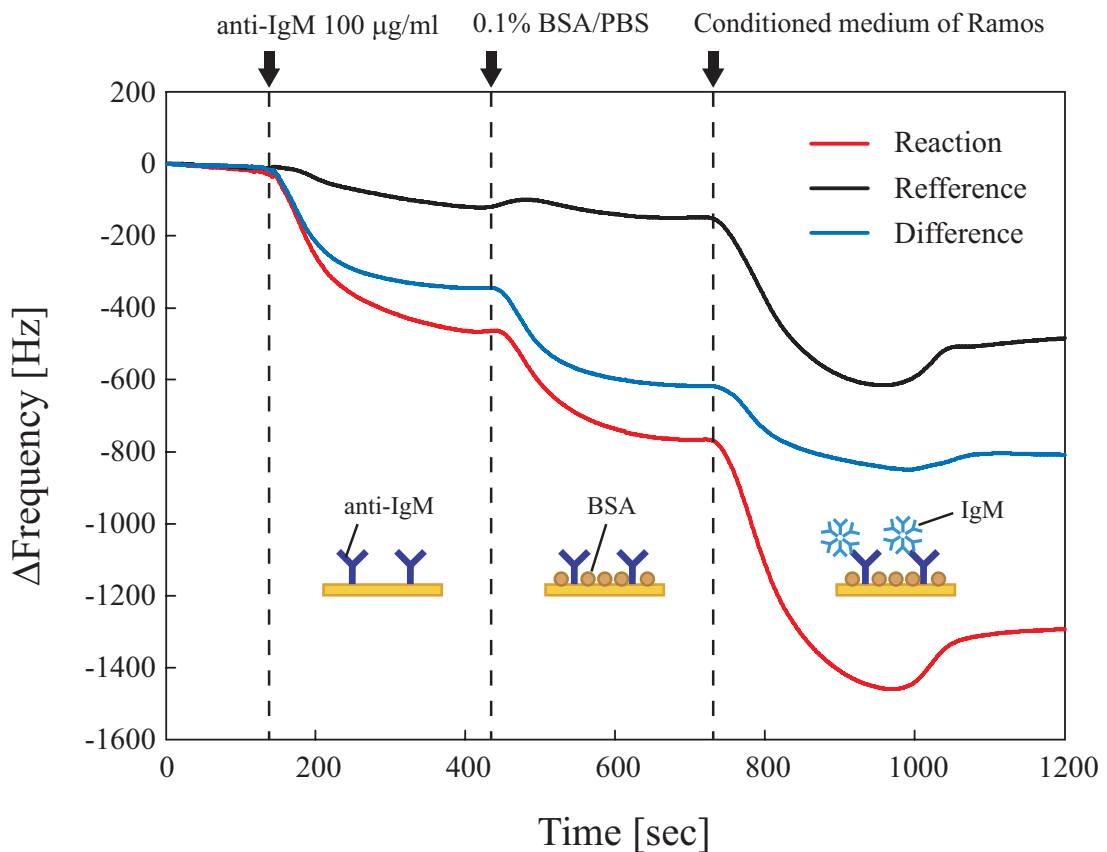


Fig.4.7 QCM を用いた抗 IgM 抗体結合反応の計測

・QCM 電極表面への細胞膜アンカーの修飾

QCM センサにリポソームを保持する機能を付加するために電極上に、細胞膜アンカーを修飾した (Fig.4.8). QCM センサ電極表面上には、Au 薄膜が成膜されている。細胞膜アンカーの修飾は以下の方法で行った[54][55]。まず、アミノ基を有するシステアミンの自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer : SAM) を Au 電極上に形成する為に、Au 電極上にシステアミン (Sigma) 20 mM を含む 0.2 %酢酸水溶液を滴下し、室温で 30 分間静置した。次に、細胞アンカー分子をシステアミン SAM 上のアミノ基に結合させるために、細胞膜アンカーを 0.01, 0.1, 1, 10 mM に調製した水溶液に浸漬し、室温で 1 時間静置した。そして、電極を超純水で洗浄し、細胞膜アンカー修飾 QCM 電極を得た。

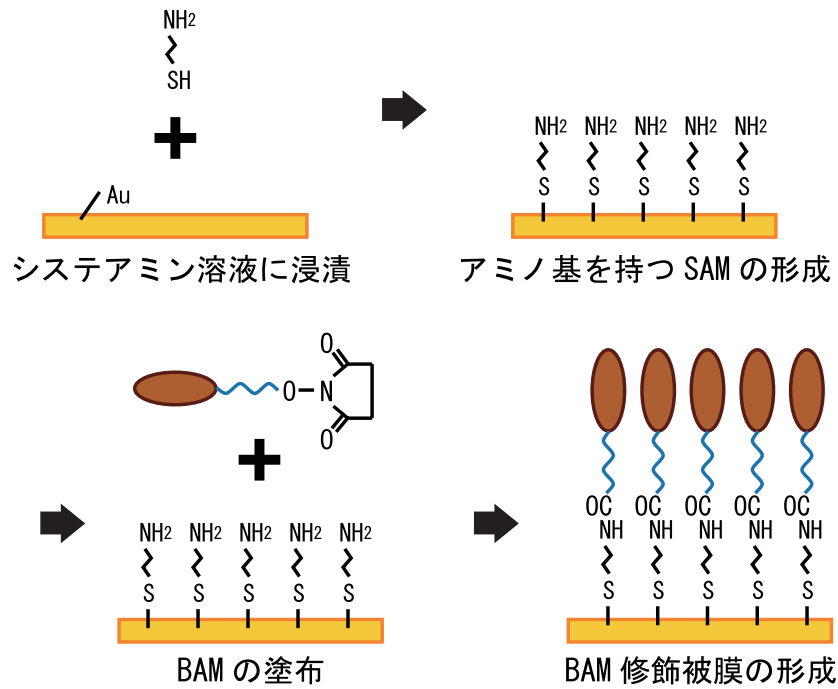


Fig.4.8 システアミン SAM を用いた細胞膜アンカーの表面修飾

細胞膜アンカーを修飾した Au 薄膜上に, Ramos を 2×10^4 cells/ml の密度で播種した. 10 分静置後, 電極を PBS で洗浄し, 顕微鏡で観察を行った. 実験の結果, 細胞膜アンカー濃度が 1 mM 以上の場合において, 細胞が Au 電極上に固定されることが認められた (Fig.4.9). また, アミノ基が修飾されていない SiO₂ への細胞の付着は認められなかった. 以上より, 細胞やリポソームは細胞膜アンカーにより Au 電極表面上に担持できることが認められた. 一方で, 細胞の大部分が溶液中に浮遊したままであり, 電極上に密に固定されないことが認められた.

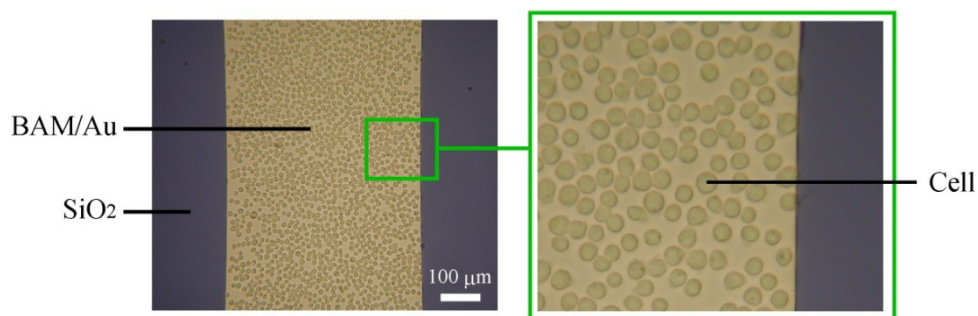


Fig.4.9 細胞アンカー修飾金電極上への細胞の固定

・細胞固定に求められる細胞膜アンカーの修飾量

細胞を基板上に固定する為に必要な細胞膜アンカー分子の修飾量を求めた。QCM センサ電極表面にシステアミン、および細胞膜アンカーを修飾した際に生じた周波数変化より、修飾量を計測した。各修飾反応は完全に反応が収束するまでに時間を要するため、各修飾行程後に QCM センサ表面を乾燥し、計測した。その結果、センサ表面へのシステアミンの修飾により平均 50 Hz の発振周波数の減少が生じた。これから、センサ表面にシステアミンが 4.8 ng 結合したと算出できる。また、システアミンに対する細胞膜アンカーの修飾により、さらに平均 170 Hz の発振周波数の減少が生じた。これから、細胞膜アンカーが 16.2 ng 結合したと算出できる。よって、細胞膜アンカー分子量 (4238) とセンサ表面の見かけの表面積 $2.0 \times 10^{-5} \text{ m}^2$ より、細胞を固定するために必要な細胞膜アンカー修飾密度は $1.9 \times 10^{-13} \text{ mol/mm}^2$ と算出できる。さらに、細胞 (直径 $10 \mu\text{m}$) の接着面積を $7.9 \times 10^{-5} \text{ mm}^2$ とすると、細胞 1 個あたりの細胞膜アンカーの量は $1.5 \times 10^{-17} \text{ mol/cell}$ と算出できる。

・遠心分離によるリポソーム固定

細胞膜アンカーの長さは PEG 鎖長より 100~300 nm 程度と予想されるため[56], 細胞が極近傍に接近しないと細胞膜にオレイン酸が挿入されず固定が生じない。そのため、比重の低い細胞やリポソームは溶液中に浮遊して短時間では沈降しないため固定されない。そこで、センサ素子上にリポソームを播種した後に遠心分離を行い、Au 電極表面へリポソームを強制的に固定した (Fig.4.10, Fig.4.11)。

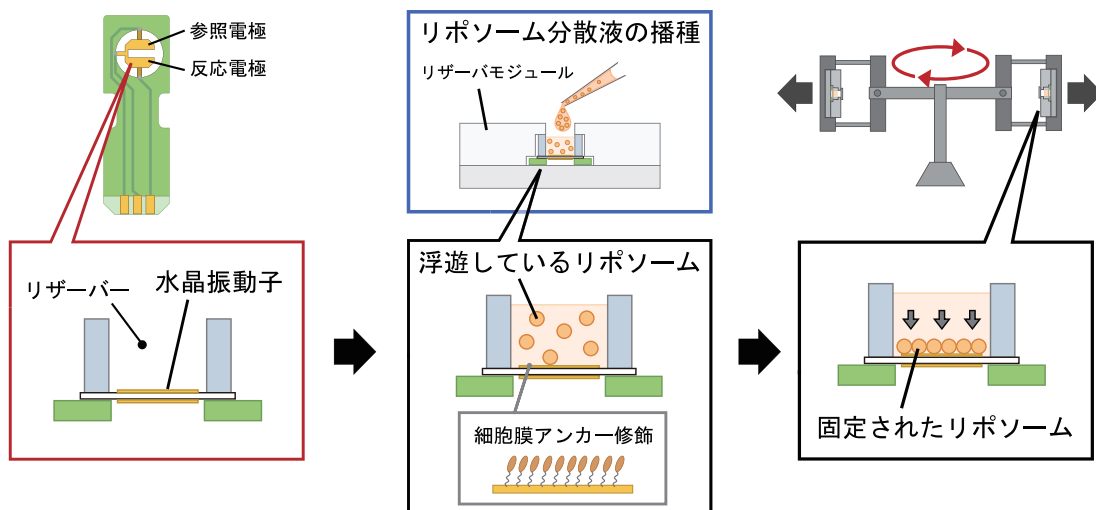
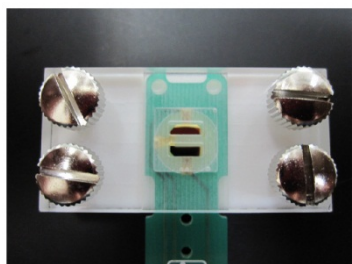
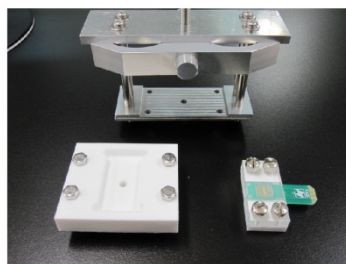


Fig.4.10 遠心分離による浮遊リポソームの固定

センサホルダ



遠心用ホルダ



設置状態

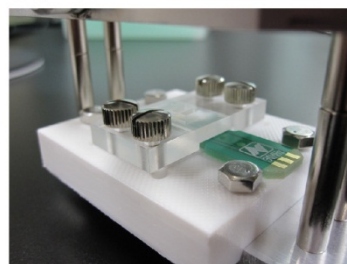


Fig.4.11 製作した QCM センサ用遠心ホルダ

蛍光による固定量の評価

リポソームのモデルとして細胞を用いて固定化実験を行った。細胞膜アンカー修飾 QCM センサにリザーバーとホルダを取り付け、DiI を用いて蛍光染色を行った細胞の細胞密度 2×10^5 cells/ml の懸濁液をリザーバー内に $40 \mu\text{l}$ 注入した。その後、遠心用ホルダに取り付け、センサを構成する水晶振動子が破損しない遠心強度 $200 \times g$ で遠心分離操作を行った。その後、リザーバー内を PBS で洗浄し、実体蛍光顕微鏡を用いて蛍光観察を行った。その結果、遠心分離を繰り返すことで、細胞の固定量を大幅に増加させることに成功した (Fig.4.12, Fig.4.13)。

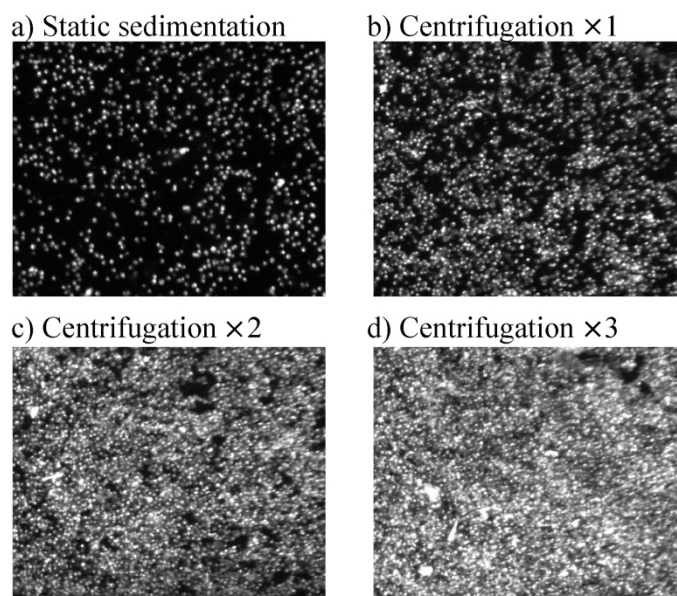


Fig.4.12 QCM 電極上に固定された細胞

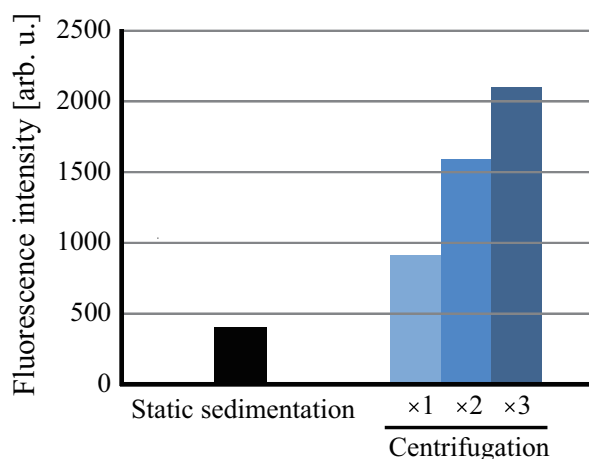


Fig.4.13 蛍光強度による固定細胞量の比較

4.3.3 膜タンパク質固定センサによるバイオマーカーの検出

リポソームを修飾した QCM センサを評価するために、バイオマーカーのモデルとして、細胞由来リポソーム表面の IgM に結合する抗 IgM 抗体の計測を試みた (Fig.4.14). 試験の結果、発振周波数が安定せず、バイオマーカーの結合により生じた信号を有意に分離することができなかった. これは、リポソームの形状が細胞サイズであることから高い粘弾性を示し、振動の減衰が生じることでリポソーム上の質量変化による応答を感知できなかったと考えられる. また、リポソームが μm オーダーの粒子径を持つため、流路内の流体力を受けることでリポソームに生じた異常な振動が、センサに伝播することで水晶振動子の発振を不安定化させたと考えられる.

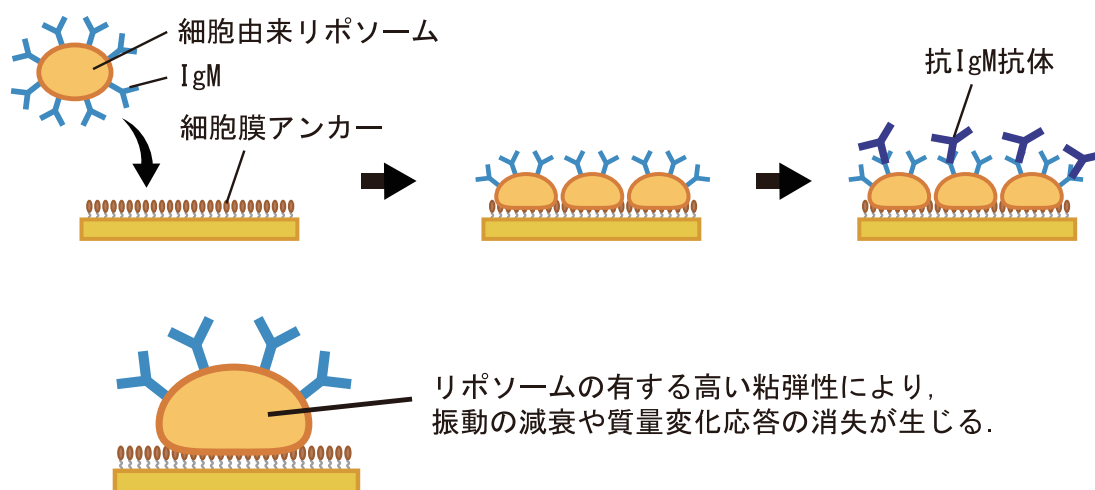


Fig.4.14 リポソームを固定した QCM センサによる抗 IgM 抗体の計測

4.3.4 結論

QCM ツインセンサを用いて生体試料の計測を試みた。QCM センサ上に抗 IgM 抗体を結合し、Ramos 培養上清中の IgM の検出を行った。その結果、生体試料中の分子の計測には非結合性反応を補正するための参照用センサの使用が有効であることが認められた。また、細胞由来リポソームを QCM センサ上に固定することでバイオマーカーセンサの構築を試みた。しかし、リポソームの粘弾性による振動の減衰が生じ、計測を行うことは出来なかった。これを実現するためには、リポソーム固定方法を改良する必要があると考えられる。例えば、リポソームを SiO₂ などの親水性表面上に展開してリン脂質膜を平面状に成膜することが考えられる (Fig.4.15) [57][58][59]。これにより、リポソームの膜が QCM センサに強固に固定され、粘弾性による振動の減衰が生じなくなると考えられる。

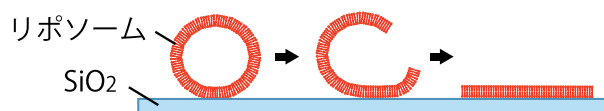


Fig.4.15 親水性の SiO₂ 表面によるリポソームの展開

4.4 結論

細胞由来リポソームの応用技術として、DDS とバイオマーカーセンサの構築を試みた。DDS 技術への応用として、抗肺ガン抗体生産ハイブリドーマより取得した細胞由来リポソームを用いて肺がん細胞株への抗生物質の輸送を試みた。細胞由来リポソームは抗肺ガン抗体により細胞に結合し、抗生物質の作用により細胞の活性を 50 %以上減少させることが認められた。バイオマーカーセンサへの応用として、細胞由来リポソームを QCM センサ表面に修飾することで、QCM センサの構築を試みた。そこで、QCM 電極表面に細胞膜アンカーを修飾し、遠心分離によりセンサ上にリポソームを沈降させ、濃縮することで、高密度にリポソームを修飾できることを確認した。しかし、リポソームの粘弾性の影響でセンシングを行うことは出来なかった。これは、リポソームを展開するなどにより QCM センサ表面に強固に結合することで解決可能であると考えられる。いずれの検討も、今後の検討により、非常に有用な細胞膜リポソームの応用技術になると考えられる。

第5章 結論

5.1 結論

本論文は、正常な膜タンパク質を有する細胞由来リポソームをヒト細胞から簡便かつ大量に取得を目的とし、細胞の薬剤刺激と微小孔アレイデバイスを用いた新規の細胞由来リポソーム生成分離技術を構築したものである。本論文では、得られた成果を 5 章としてまとめた。

第 1 章では、正常な膜タンパク質の取得手法の重要性と細胞由来リポソームの可能性について述べた。さらに本論文で構築する細胞リポソーム生成技術の目的と意義について述べた。また、従来のリポソーム生成方法と最近の報告例について概説した。

第 2 章では、細胞表面の膜タンパク質の自発的な架橋による細胞由来リポソーム形成の原理を仮定した。そして、IgM 高生産株である Ramos にリポソーム形成誘導処理として高濃度の酪酸ナトリウムによる薬剤刺激を行い、細胞サイズの細胞由来リポソームが形成することを見出した。また、必要な酪酸ナトリウム濃度が 5 mM 以上であることを示した。さらに、由来の異なる細胞株においてもリポソーム形成誘導処理を行い、同様に IgM 抗体生産株において細胞由来リポソームが形成することを見出した。細胞由来リポソームを形成する細胞株は、IgM 生産バーキットリンパ腫由来細胞株、IgM 生産ハイブリドーマ、および、IgM 生産末梢血リンパ球変異誘導細胞株であった。さらに、こうして得られた細胞由来リポソームに対して膜タンパク質の蛍光抗体染色を行った。そして細胞由来膜タンパク質の IgM が提示されていることを確認した。また、遺伝子導入により発現させた膜タンパク質の Glut5 も、細胞由来リポソームに担持されることを確認した。これにより、任意の膜タンパク質のリポソームへの担持が可能であることが示唆された。

第 3 章では、細胞由来リポソームの分離精製を目的として、微細加工技術を用いた細胞由来リポソーム生成分離デバイスの構築を行った。デバイスはシリコン製の培養ウェル・アレイを有し、各ウェル底面は窒化シリコン製の自立薄膜により成る。

ウェル底面には、細胞が自由に通過しない孔径 $5\ \mu\text{m}$ の微小孔をアレイ状に配置し、細胞膜アンカーを表面修飾することで、細胞保持、細胞分離、リポソーム形成促進の機能性を付加した。このデバイスを用いることで、細胞由来リポソームの生成量が大幅に上昇した。しかし、細胞が微小孔を通過し、回収したリポソームに細胞が混入する問題が生じた。そこで、細胞の活動サイクルである細胞周期に着目し、薬剤を用いた同調培養を行うことで、細胞の微小孔通過が、細胞分裂に伴う柔軟性向上により生じたことを明らかとした。そして、同調培養を併用することで、細胞由来リポソームの生成分離を行い、リポソーム分離効率を 99% と大幅に改善させた。こうして得られたリポソームの粒子径分布は $3\ \mu\text{m}$ に高いピークを有することが認められた。

第4章では、細胞由来リポソームの応用技術として、DDS とバイオマーカーセンサの構築を試みた。まず、抗肺ガン抗体生産ハイブリドーマより取得した細胞由来リポソームを用いて肺がん細胞株への抗生物質の輸送を試みた。細胞由来リポソームは抗肺ガン抗体により細胞に結合し、抗生物質を細胞内に輸送することで細胞の活性を 50% 以上減少させることが認められた。次に、細胞由来リポソームを QCM センサ表面に固定することで、膜タンパク質に結合する生体分子を検出するセンサの構築を試みた。そして、目標分子を検出するには、リポソーム膜の粘弾性や流体力の影響を受けない状態でリポソームを固定する方法について検討が必要であるとの知見を得た。

5.2 今後の課題と展望

本研究で確立した技術により、ヒトリンパ球から細胞由来リポソームの大量かつ高効率の生産が可能となった。得られた細胞由来リポソームは、正常な膜タンパク質の構造や機能を維持していると考えられるため、膜タンパク質を対象とした研究に容易に利用できる。また、微小孔デバイスを用いることで、複雑な手作業に依存することなく、容易に純度の高い細胞由来リポソームを得ることが可能となった。今後の課題として、生成分離技術の更なる改良や、応用技術の検証が必要である。しかし、この研究は膜タンパク質を対象とした創薬研究や膜タンパク質を利用したバイオセンシング技術の開発に大きく貢献すると考えられる。

・リポソーム生成分離デバイスの改善

開発した手法においても、細胞播種作業や同調培養操作は手作業による操作を必要とする。そこで、これらも自動化が出来れば、完全自動による細胞由来リポソーム生産システムも構築できると考えられる。これにより、所望の膜タンパク質を有

するリポソームを確実に獲得することができ、膜タンパク質を利用した創薬研究やバイオセンシング技術などへの多大な貢献が期待できる。

・創薬への応用

生体内に存在する膜タンパク質を利用することで、創薬・医療分野への応用が考えられる。たとえば、免疫シグナルの研究が挙げられる。動物の体には免疫と呼ばれる自己防衛システムが存在する。このシステムは、主に白血球とよばれる免疫担当細胞により構成され、自己・非自己の認識、外敵に対する情報の認識、情報の伝達、攻撃物質の合成、情報の記憶、及びこれらを担当する細胞の教育などの複雑なシステムが構築されている。膜タンパク質を対象とした研究が推進し、これら免疫システムを効率よく制御できるようになれば、従来では治療が困難であるような自己免疫疾患の治療が可能になる。例えば、主に免疫担当細胞の分化や活性化に関連する膜タンパク質グループのことを CD 抗原（白血球分化抗原）と呼ぶが、これらの膜タンパク質を刺激することで人為的な免疫の活性化や不活性化が可能になる。また、HLA はヒト白血球型抗原と呼ばれる免疫細胞間の抗原の授受に使用される膜タンパク質であり、抗原認識の媒介を行う。また、すべての細胞は共通して HLA を発現しており、自己と非自己や異常化細胞を区別している。特に、ガン細胞や胎児性細胞には非自己細胞排除を担うキラーT細胞を不活性化する HLA-G を発現しており、傷害を免れている[60][61]。このような膜タンパク質を利用することで、免疫疾患や移植片対宿主病の治療法の開発に寄与すると考えられる。

・DDS への応用

細胞由来リポソームを直接用いて DDS として使用することも、今後のさらなる検討が求められる。細胞由来リポソームを DDS に用いることは、抗体をリポソーム表面に修飾する処理が不要になることや、既に樹立したハイブリドーマ株を DDS 開発に利用することが可能になることから、非常に有益であると考えられる。例えば、抗原提示細胞に対する抗体を生産するハイブリドーマからリポソームが得られれば、遺伝子導入などにより付加した抗原タンパク質を抗原提示細胞に効率よく輸送することが可能になり、新規ワクチンやガン免疫療法としての応用が示唆される[62]。また、膜タンパク質による対象細胞の刺激も可能になると考えられる。例えば、FasL は細胞死誘導レセプタ（Fas）のリガンド膜タンパク質であり、Fas に結合することで細胞にアポトーシスを誘導する[63]。キラーT細胞がガン細胞やウイルス感染細胞を排除する際に使用される。この膜タンパク質を利用することが出来れば、副作用の原因となる抗生物質や化学合成薬品を必要としない、生体が本来有する抗腫瘍機構を模した抗がん剤や、ウイルス感染細胞の除去技術の開発が可能になると考えら

れる。しかし、現時点で得られた考察では、人体に対する安全性は不明である。通常、薬剤の評価には動物実験により評価を行うが、作成した薬剤が完全にヒト細胞由来物質である場合、実験動物内では異物として認識されやすくなると考えられる。この課題の解決方法は、今後も検討する必要がある。また、細胞由来リポソームを構成している成分は未知であり、予期しない効果をもたらす恐れがある。よって、安全を担保するためにも、構成物質の解析は今後の課題となる。

・バイオセンサの構築

血液に代表される体液の中には、様々な生体分子が含まれている。特に、膜タンパク質と結合する分子は細胞間シグナルに関わる可能性が高い。膜タンパク質を用いたセンサを構築することで、従来法では検出が容易ではなかった因子を疾患マーカーの候補として検討することが可能になる。同時に、構築したセンサは早期診断に利用可能であると考えられる。また、近年、強毒性の感染症の大規模発生が懸念されている。これらの感染症に起因する免疫細胞の応答などをいち早く検出することで、感染症拡大による被害を最小限に抑制することが可能になると考えられる。

参考文献

- [1] S. J. Singer and Garth L. Nicolson, The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes, *Science*, 175, 4023, 720-731, 1972.
- [2] Jinhai Wang and Michael Norcross, Dimerization of chemokine receptors in living cells- key to receptor function and novel targets for therapy, *Drug Discovery Today*, Vol. 13, pp. 625-632, 2008.
- [3] David L. Simmons, What makes a good anti-inflammatory drug target?, *Drug Discovery Today*, 11, 210-219, 2006.
- [4] 軒原清史, 三原久和, 蛋白質検出のための次世代分析手法 プロテインチップの基礎, *蛋白質核酸酵素*, 47, 5, 626-632, 2002.
- [5] Cleveland DW, Fischer SG, Kirschner MW, Laemmli UK, Peptide Mapping by Limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis, *Journal Of Biological Chemistry*, 252, 3, 1102-1106, 1971.
- [6] Flavio Santos Damos, Renata Kelly Mendes, and Lauro Tatsuo Kubota, Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (bio)sensors, *Quim. Nova*, 27, 6, 970-979, 2004.
- [7] JL Rigaud, D. Levy, Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Method Enzymol*, 372, 65-86, 2003.
- [8] A. M. Seddon, P. Curnow, P. J. Booth, Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1666, 105-117, 2004.
- [9] J. Knol, K. Sjollema, B. Poolman, Detergent-mediated reconstitution of membrane proteins, *Biochemistry*, 37, 16410-16415, 1998.
- [10] C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dotsch and F. Bernhard, Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system, *FEBS Journal*, 272, 6024-6038, 2005.
- [11] D. Drew, L. Froderberg, L. Baars, J. W. L. de Gier, Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*., *Biochim Biophys Acta*, 1610, 3-10, 2003.
- [12] K. Funakoshi, H Suzuki and Shoji Takeuchi, Formation of giant lipid vesicle-like compartments from a planar lipid membrane by a pulsed jet flow, *Journal of the American Chemical Society*, 129, 12608-12609, 2007.
- [13] P. Taylor, C. Xu, P. D. I. Fletcher and V. N. Paunov, Fabrication of 2D Arrays of Giant Liposomes on Solid substrates by Microcontact Printing, *Physical Chemistry*

- Chemical Physics, 5, 4918- 4922, 2003.
- [14] P. Girard, J. Pecreaux, G. Lenoir, P. Falson, J. L. Rigaud and P. Bassereau, A New Method for the Reconstitution of Membrane Proteins into Giant Unilamellar Vesicles, *Biophysical Journal*, 87, 419-429, 2004.
- [15] V. Noireaux and A. Libchaber, A vesicle bioreactor as a step toward an artificial cell assembly, *PNAS*, 101, 17669 -17674, 2004.
- [16] K. Funakoshi, H. Suzuki and S. Takeuchi, Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane. Protein Analysis, *Anal. Chem.*, 78, 8169-8174, 2006.
- [17] T. Osaki, H. Suzuki, B. Le Pioufle, S. Takeuchi, Multichannel simultaneous measurements of single-molecule translocation in alpha-hemolysin nanopore array., *Anal Chem.*, 81, 24, 9866-9870, 2009.
- [18] H. Suzuki and S. Takeuchi, Microtechnologies for membrane protein studies, *Anal Bioanal Chem*, 391, 2695–2702, 2008.
- [19] Kazumi Shimono, Mie Goto, Takashi Kikukawa, Seiji Miyauchi, Mikako Shirouzu, Naoki Kamo, and Shigeyuki Yokoyama, Production of functional bacteriorhodopsin by an Escherichia coli cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid, *Protein Science*, 18, 2160-2171, 2009.
- [20] M. Kaneda, S. M. S Nomura, S. Ichinose, S. Kondo, K. Nakahama, K. Akiyoshi, I. Morita, Direct formation of proteo-liposomes by in vitro synthesis and cellular cytosolic delivery with connexin-expressing liposomes, *Biomaterials*, 30, 3971-3977, 2009.
- [21] T. Baumgart, A. T. Hammond, P. Sengupta, S. T. Hess, D. A. Holowka, B. A. Baird and W. W. Webb, Large-scale fluid/fluid phase separation of proteins and lipids in giant plasma membrane vesicles, *PNAS*, 104, 3165-3170, 2007.
- [22] H. Pick, E. L. Schmid, A. P. Tairi, E. Ilegems, R. Hovius and H. Vogel , Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles., *J. Am. Chem. Soc.*, 127, 2908-2912, 2005
- [23] L. Garnier, M. Ravallec, P. Blanchard, H. Chaabihi, J. P. Bossy, G. Devauchelle, A. Jestin, and M. Cerutti, Incorporation of Pseudorabies Virus gD into Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Particles Produced in Baculovirus-Infected Cells, *J. Virol.*, 69(7): 4060–4068, 1995.
- [24] Richard G. W. Anderson and Ken Jacobson , A Role for Lipid Shells in Targeting Proteins to Caveolae, Rafts, and Other Lipid Domains, *Science*, 296, 5574, 1821 – 1825, 2002.

- [25] S. Munro, Lipid Rafts: Elusive or Illusive?, *Cell*, 115, 377-388, 2003.
- [26] C. Dietrich, L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K. Jacobson and E. Gratton, Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophys, Biophysical Journal*, 80, 1417-1428, 2001.
- [27] Niles MJ, Matsuuchi L, Koshland ME, Polymer IgM assembly and secretion in lymphoid and nonlymphoid cell lines: Evidence that J chain is required for pentamer IgM synthesis, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92 7, 2884-2888, 1995.
- [28] J. Rogersb, P. Earlya, C. Carterb, K. Calamea, M. Bonda, L. Hooda and R. Wallb, Two mRNAs with different 3' ends encode membrane-bound and secreted forms of immunoglobulin mu chain, *Cell*, 20, 2, 303-312, 1980.
- [29] D Benjamin, IT Magrath, R Maguire, C Janus, HD Todd and RG Parsons, Immunoglobulin secretion by cell lines derived from African and American undifferentiated lymphomas of Burkitt's and non-Burkitt's type, *Journal of Immunology*, 129, 3 1336-1342, 1982.
- [30] M. Okano, High susceptibility of an Epstein-Barr virus-converted Burkitt's lymphoma cell line to cytotoxic drugs, *Leukemia Research*, 21, 469-471, 1997.
- [31] G Vidali, LC Boffa, EM Bradbury, VG Allfrey, Butyrate suppression of histone deacetylation leads to accumulation of multiacetylated forms of histones H3 and H4 and increased DNase I sensitivity of the associated DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 2239–2243, 1978.
- [32] Jiang Z, Sharfstein ST, Sodium butyrate stimulates monoclonal antibody over-expression in CHO cells by improving gene accessibility. *Biotechnol Bioeng*, 100, 189–194, 2008.
- [33] B. Schwartz, C. Avivi-Green, S. Polak-Charcon, Sodium butyrate induces retinoblastoma protein dephosphorylation, p16 expression and growth arrest of colon cancer cells. *Mol Cell Biochem*, 188, 21–30, 1998.
- [34] H. Murakami, S. Hashizume, H. Ohashi, K. Shinohara, K. Yasumoto, K. Nomoto, H. Omura, Human-human hybridomas secreting antibodies specific to human lung carcinoma. *In Vitro Cell Dev Biol*, 21, 593–596, 1985.
- [35] Tokujiro Yano, Kosei Yasumoto, Akira Nagashima, Hiroki Murakami, Shuichi Hashizume, Kikuo Nomoto, Immunohistological characterization of human monoclonal antibody against lung cancer, *Journal of Surgical Oncology*, 39, 2, 108–113, 1988.
- [36] H. Kawahara, S. Shirahata, H. Tachibana, H. Murakami, In vitro immunization of human lymphocytes with human lung cancer cell line A549, *Hum Antibodies*

- Hybridomas, 3, 8–13, 1992.
- [37] M. Shoji, S. Kawamoto, S. Sato, M. Kamei, M. Kato, S. Hashizume, K. Seki, K. Yasumoto, A. Nagashima, H. Nakahashi, T. Suzuki, T. Imai, K. Nomoto, H. Murakami, Specific reactivity of human monoclonal antibody AE6F4 against cancer cells in tissues and sputa from lung cancer patients., *Hum Antibodies Hybridoma*, 5, 116–122, 1994.
- [38] Y. Tsukamoto, S. Nakamura, A. Inoue, N. Nishino, Y. Inoue, H. Kawahara, Development of protein high expression system by using fructose metabolism., In: Kamihira M et al (eds) *JAAC2008: power of cells. The 21st annual and international meeting of the Japanese association for animal cell technology*, Fukuoka, November 2008. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 16, Springer, Dordrecht, Netherlands, 115-119, 2010.
- [39] Y. Inoue, Y. Tsukamoto, M. Yamanaka, S. Nakamura, A. Inoue, N. Nishino, H. Kawahara, Efficient production of recombinant IgG by metabolic control and co-expression with GLUT5 in a fructose-based medium, *Cytotechnology*, 62, 4, 301–306, 2010.
- [40] P. Buttgereit, S. Weineck, G. Röpke, A. Märten, K. Brand, T. Heinicke, WH Caselmann, D Huhn, IGF Schmidt-Wolf, Efficient gene transfer into lymphoma cells using adenoviral vectors combined with lipofection. *Cancer Gene Ther*, 7, 1145–1155, 2000.
- [41] Y. Nakashima, N. Mimarū, T. Tsujihashi, T. Tamura, K. Yahiro and T. Yasuda, Chemical Stimulation of Neurospheres through Microholes Opened in Microwell Bottoms, *Proc. μTAS 2009*, 1174-1176, 2009.
- [42] 三丸真輝, 薬剤導入用微小孔アレイを有する細胞培養ウェルの構築, 九州工業大学大学院生命体工学研究科修士論文, 2009.
- [43] 辻橋辰彦, ニューロスフェアアレイへの個別薬剤刺激が可能なマイクロ流体デバイス, 九州工業大学大学院生命体工学研究科修士論文, 2010.
- [44] K. Kato, K. Umezawa, D. P. Funeriu, M. Miyake, J. Miyake and T. Nagamune, Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface., *BioTechniques*, 35, 1014-1018 and 1020-1021, 2003.
- [45] P. Peterlin, V. Arrigler, K. Kogej, S. Svetina and P. Walde, Growth and shape transformations of giant phospholipid vesicles upon interaction with an aqueous oleic acid suspension, *Chem Phys Lipids*, 159, 67-76, 2009.
- [46] Tony J. Collins, ImageJ for microscopy, *BioTechniques*, 43, S25-S30, 2007.
- [47] M. Holm, M. Thomsen, M. Hoyer and P. Hokland, Optimization of a flow cytometric

- method for the simultaneous measurement of cell surface antigen, DNA content, and in vitro BrdUrd incorporation into normal and malignant hematopoietic cells., *Cytometry*, 32, 28-36, 1998.
- [48] M. H. Fox, R. A. Read, and J. S. Bedford, Comparison of synchronized Chinese hamster ovary cells obtained by mitotic shake-off, hydroxyurea, aphidicolin, or methotrexate., *Cytometry*, 8, 315-320, 1987.
- [49] A. Kurose, T. Tanaka, X. Huang, F. Traganos and Z. Darzynkiewicz, Synchronization in the cell cycle by inhibitors of DNA replication induces histone H2AX phosphorylation: an indication of DNA damage, *Cell Proliferation*, 39, 231-240, 2006.
- [50] JW Park, CC Benz, FJ Martin, Future directions of liposome- and immunoliposome-based cancer therapeutics. *Semin Oncol*, 31, 196–205, 2004.
- [51] ML Immordino, F. Dosio, L. Cattel, Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential., *Int J Nanomed*, 1, 297–315, 2006.
- [52] N. Watanabe, DA Dickinson, DM Krzywanski, KE Iles, H. Zhang, CJ Venglarik, HJ Forman, A549 subclones demonstrate heterogeneity in toxicological sensitivity and antioxidant profile. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 283, L726–L736, 2002.
- [53] G.Z. Sauerbrey, The use of oscillators for weighting thin layers and for microweighting. *Z. Phys.* 155, 209–212, 1959.
- [54] Yuhki Yanase, Hidenori Suzuki, Tomoko Tsutsui, Ichiro Uechi, Takaaki Hiragun, Shoji Mihara, Michihiro Hide, Living cell positioning on the surface of gold film for SPR analysis, *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 562–567, 2007.
- [55] Yung-Chuan Liu, Chih-Ming Wang, and Kuang-Pin Hsiung, Comparison of Different Protein Immobilization Methods on Quartz Crystal Microbalance Surface in Flow Injection Immunoassay, *Analytical Biochemistry*, 299, 130–135, 2001.
- [56] Yasuyuki Sadzuka, Akiko Nakade, Rieko Hirama, Atsuo Miyagishima, Yasuo Nozawa, Sadao Hirota, and Takashi Sonobe, Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome, *International Journal of Pharmaceutics*, 238, 171–180, 2002.
- [57] C. A. Keller and B. Kasemo, Surface Specific Kinetics of Lipid Vesicle Adsorption Measured with a Quartz Crystal Microbalance, *Biophysical Journal*, 75, 1397–1402, 1998.
- [58] Chiho Hamai, Paul S. Cremer and Siegfried M. Musser, Single Giant Vesicle Rupture Events Reveal Multiple Mechanisms of Glass-Supported Bilayer Formation, *Biophysical Journal*, 92, 6, 1988-1999, 2007.

- [59] Supported lipid bilayer formation by the giant vesicle fusion induced by vesicle–surface electrostatic attractive interaction, *Chemical Physics Letters*, 420, 569–573, 2006.
- [60] Joan S. Hunt, Margaret G. Petroff, Ramsey H. McIntire, and Carole Ober, HLA-G and immune tolerance in pregnancy, *The FASEB Journal*, 19, 681-693, 2005.
- [61] Kimiko Kuroki, Katsumi Maenaka, Immune modulation of HLA-G dimer in maternal-fetal interface, *Eur. J. Immunol.*, 37, 1727–1729, 2007.
- [62] 鈴木 亮, 小田 雄介, 宇都口 直樹, 門脇 則光, 丸山 一雄, リポソーム技術を駆使した樹状細胞への抗原デリバリー法の構築とそのがん免疫療法への応用, *Drug Delivery System*, 23, 2, 123-129, 2008.
- [63] Lorraine A. O’ Reilly, Lin Tai, Lily Lee, Elizabeth A. Kruse, Stephanie Grabow, W. Douglas Fairlie, Nicole M. Haynes, David M. Tarlinton, Jian-Guo Zhang, Gabrielle T. Belz, Mark J. Smyth, Philippe Bouillet, Lorraine Robb & Andreas Strasser, Membrane-bound Fas ligand only is essential for Fas-induced apoptosis, *Nature*, 461, 659-663, 2009.

研究業績

A: 学術論文

1. Makoto Yamanaka, Shigeki Nakamura, Aiko Inoue, Takashi Yasuda, Yuichi Inoue, and Hiroharu Kawahara, Induction of Cell Size Vesicles from Human Lymphoma Cell Lines and their Application to Drug Carriers, *Cytotechnology*, Vol. 62, No. 4, 287–291, 2010.

B: 国際学会

1. Makoto Yamanaka, Shigeki Nakamura, Aiko Inoue, Takashi Yasuda, Yuichi Inoue, and Hiroharu Kawahara, Characterization of Cell-Sized Vesicles Induced from Human Lymphoid Cell Lines, *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, Vol. 16, pp. 51-55, 2010 (Springer) (Proceedings of the 21st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT), Fukuoka, Japan, November 24-27, 2008).
2. Makoto Yamanaka, Hiroharu Kawahara, and Takashi Yasuda, Liposome Derivation from Human Lymphocytes in a Microchannel, *Proceedings of the 13th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2009)*, pp. 1213-1215, Jeju, Korea, November 1-5, 2009. (査読あり 採択率 65 %)
3. Makoto Yamanaka, Hiroharu Kawahara, and Takashi Yasuda, Liposome Derivation from Human Lymphocytes in a Microchannel, *Kyutech-KETI Workshop to Enhance Partnership: Development of Novel Intelligent Nano Materials*, pp. 27, Kitakyushu, October 15, 2009.
4. Makoto Yamanaka, Hiroharu Kawahara, and Takashi Yasuda, Microfluidic Device for

Derivation and Separation of Liposomes from Human Lymphocytes, The Second Japan-Korea Joint Symposium on Bio-microsensing Technology (2nd JKBT), pp. 33, Kitakyushu, November 13, 2009.

5. Makoto Yamanaka and Takashi Yasuda, Microhole Device for Derivation and Separation of Liposomes from Human Lymphocytes with Synchronized Culture, Proceedings of the 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2010), pp. 1562-1564, Groningen, Netherlands, October 3-7, 2010. (査読あり 採択率 64 %)

C: 国内学会

1. 山中誠, 中村繁樹, 井上愛子, 安田隆, 井上祐一, 川原浩治, ヒト細胞株における抗体高発現細胞周期の解析, 日本農芸化学会 2008 年度大会 大会講演要旨集, pp. 218, Nagoya, March 26-29, 2009.
2. 山中誠, 中村繁樹, 井上愛子, 安田隆, 井上祐一, 川原浩治, ヒトリンパ球細胞株より誘導された膜タンパク質発現ベシクルの DDS への応用, 日本農芸化学会 2009 年度大会 大会講演要旨集, pp. 302, Fukuoka, March 27-29, 2009.
3. 山中誠, 安田隆, 井上祐一, 川原浩治, ヒトリンパ球細胞株より生成された膜タンパク質発現リポソームのターゲティングキャリアへの応用, 第 25 回日本 DDS 学会学術集会 プログラム予稿集(Drug Delivery System, Vol. 24, No. 3), p. 361, Tokyo, July 3-4, 2009.
4. 山中誠, 川原浩治, 安田隆, 微小孔アレイデバイスを用いたヒトリンパ球細胞からのリポソーム生成分離, 電気学会 センサ・マイクロマシン部門 (E 部門) 平成 22 年度総合研究会, 電気学会研究会試料, pp. 85-88, Tokyo, June 17-18, 2010.

5. 山中誠, 川原浩治, 安田隆, Microhole Array Device for Derivation and Separation of Liposomes from Human Lymphocytes, 第 49 回日本生体医工学会大会第 48 卷特別号, pp. 128, Osaka, June 25-27, 2010.
6. Makoto Yamanaka and Takashi Yasuda, PDMS Hydrophilization Using Water-Insoluble Surfactant for Cell Culturing Devices, Proceedings of The 27th Sensor Symposium 2004, pp. 486-489, Shimane, October 14-15, 2010.

謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました指導教員の九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻 安田隆 准教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究に挑戦する貴重な場を与えてくださいましたこと、さらに研究成果を発表する多くの機会を与えてくださいましたことに深く感謝致します。

細胞研究の実施にあたり、ご指導をいただいた北九州工業高専門学校細胞工学センター 川原浩治 教授，井上祐一 准教授に厚く御礼申し上げます。

本論文の作成にあたり、貴重なご助言を賜りました，九州工業大学大学院生命体工学研究科生体機能専攻 早瀬修二 教授，加藤珠樹 准教授，九州工業大学工学研究院 竹中繁織 教授に厚く御礼申し上げます。

研究の遂行にあたっての助言と，様々な議論と相談にお付き合いくださいました安田研究室の先輩である山口大学大学院理工学研究科機械工学専攻 中島雄太 助教に御礼申し上げます。

九州工業大学大学院生命体工学研究科 安田研究室の三丸真輝 氏，辻橋辰彦 氏が確立した微小孔アレイを有する SiN 自立膜の構築技術は，本研究の遂行において非常に重要な技術となりました。また，九州工業大学大学院生命体工学研究科 西野研究室の塚本祐理子 氏が構築した Glut5 プラスミドベクターにより，研究の意義において非常に重要な知見を得ることが出来ました。これらの皆様に心より感謝致します。

最後に，ご協力いただいた安田研究室の皆様，ならびに北九州工業高等専門学校細胞工学センターの皆様に感謝致します。