

研究 成 果 報 告 書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	Span80 ベシクルによる細胞膜傷害 －小胞を伴った非アポトーシス様細胞死を誘導－				
研究テーマ (欧文) AZ	The plasma membrane is disrupted by Span 80 vesicle － non apoptotic cell death with blebs －				
研究氏 代 表 名 者	カタカナ CC	姓) ハヤシ	名) ケイタ	研究期間 B	2013 ～ 2015 年
	漢字 CB	林	啓太	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	Hayashi	Keita	研究機関名	奈良工業高等専門学校
研究代表者 CD 所属機関・職名	林 啓太 奈良工業高等専門学校 物質化学工学科・助教				
<p>概要 EA (600 字～800 字程度にまとめてください。)</p> <p>化学療法では薬剤を細胞内部へ送達する必要があるが、水溶性薬剤は細胞膜を突破することが困難であり、十分な治療効果が得られないという問題がある。この問題を解決する方法として、界面活性剤ベシクルや界面活性ペプチドの薬剤キャリアとしての応用が検討されている。一方で、これらの界面活性物質の添加は細胞膜傷害を伴うため、安全性が問題となる。そこで本研究では、これまで薬剤キャリアとして有用性を報告している Span 80 ベシクルを用いて細胞傷害メカニズムを明らかにすることで、より安全な薬剤送達システムの創成にアプローチすることを目的とする。Span 80 ベシクルを種々の細胞(マウス骨肉腫細胞(LM8 細胞)、マウス結腸腺癌細胞(Colon 26 細胞)、ヒト肝癌細胞(HepG2 細胞))に添加した場合、全ての細胞において小胞の形成が観察された。特にLM8 細胞において小胞の形成が頻繁に観察されるとともに、ベシクルが高い毒性を示した。この毒性メカニズムを検討するため、LM8 細胞における Caspase-3, -8, -9, -2 活性, DNA 断片化, クロマチン凝集に関する評価を行ったところ、全ての結果においてネクローシスであることが示された。また、蛍光プローブ(CoroNa Green, Flou-4)を用いた細胞内イオン濃度の測定からも、細胞膜破壊が原因と考えられる急激な細胞内イオン濃度の上昇が観察されたことから、アポトーシスのようなプログラム細胞死ではなく、細胞膜傷害によるネクローシスであることが明らかとなった。一方で、細胞膜においてアポトーシスのようなホスファチジルセリンの露出が観察されたが、これは Span 80 ベシクルが細胞膜と融合することによる細胞膜攪乱に起因すると考えられことから、小胞の形成がアポトーシスによるものではなく、細胞膜傷害に応答した結果である可能性が示唆された。この小胞に関して、顕微ラマンによる観察を行ったところ、小胞のみにおいて 2851 cm^{-1} にピークが観察されたことから小胞に Span 80 ベシクルが凝集していると考えられる。これは膜タンパク質による細胞膜傷害を抑制する働きであると考えられ、この働きをコントロールすることが薬剤キャリアの毒性を抑制する方法の1つである可能性が示唆された。</p>					
キーワード FA	細胞死	細胞膜	ドラッグ・デリバリー・システム		

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA									
研究機関番号 AC					シート番号									

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	～	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要^{EZ}

It is important for chemotherapy to deliver drugs efficiently into the cytosol. However a plasma membrane prevents drugs from entering the cytosol, resulting in reduce to the pharmacological effect. Therefore, effective drug delivery has been investigated by using drug carriers, such as surfactant vesicles and amphiphilic peptides. On the other hands, it has been repotted that these drug carriers shows cytotoxicity by the disruption of a plasma membrane. In this study, the mechanism of cytotoxicity by surfactant vesicle was investigated. Span 80 vesicle, was composed of non-ionic surfactant Span 80, was added to three kinds of cells, murine osteosarcoma cells (LM8 cells), murine rectal cancer cell (Colon 26 cells) and human hepatocellular carcinoma cells (HepG2 cells). Span 80 vesicle induced formation of blebs, especially LM8 cells. In order to clarify about cell death mechanism of LM8 cells, the activity of Caspase-3, -8, -9, -2, DNA fragmentation and chromatin aggregation were evaluated. These results show a necrotic cell death. Moreover, rapid increase of intracellular ion concentration was observed by treated with Span 80 vesicle. It is due to the disruption of a plasma membrane by Span 80 vesicle. Thus, the cell death by Span 80 vesicle was not program cell death like apoptosis, but necrosis. Phosphatidylserine exposure was observed like apoptosis, but it is due to lipid mixture between phospholipids and Span 80 by the plasma membrane fusion with Span 80 vesicle. These results also suggest being not apoptotic blebs, but necrotic blebs by treated with Span 80 vesicle. These blebs were evaluated by micro-Raman spectroscopy. A peak at 2851 cm^{-1} was observed at the bleb. It seems to assemble Span 80 vesicle in the part of plasma membrane by membrane proteins. It is important to clarify about the identification and function of membrane proteins, resulting in allowing developing to low-cytotoxic drug carriers.