



Title	Studies on responses induced by phospholipid nanoparticles in mammalian cells
Author(s)	藤田, 和代
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76394
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 藤 田 和 代 ）

論文題名

Studies on responses induced by phospholipid nanoparticles in mammalian cells
(リン脂質ナノ粒子によって誘導される哺乳動物細胞の応答に関する研究)

論文内容の要旨

リン脂質は水溶液中で脂質二重膜構造の小粒子を形成する性質を持っているが、これを利用して人工的に調製したリン脂質ナノ粒子（phospholipid nanoparticles : PNP）がリポソームである。また、生体内で細胞から放出されるエクソソームもPNPsの一種であるが、細胞間の情報伝達に関与していることが明らかになっている。しかしPNPs自体が細胞にどのような影響を及ぼすのかについては未だに不明な点が多い。そのためPNPsが細胞に及ぼす影響について、その作用機序も含めて明らかにすることを目的として本研究を開始した。PNPsがマクロファージに取り込まれると脂肪滴（lipid droplets : LDs）の形成が誘導される。LDsはエネルギー貯蔵の小器官と考えられてきたが、他にも多様な機能を有していることが明らかになっている。しかし、マクロファージ以外の細胞でLDsが誘導されるのかどうかについてはわかっていなかった。そこでPNPsによる非マクロファージ系細胞でのLDsの誘導について検討した。ヒト胎児腎細胞由来のHEK293T細胞株をはじめとする様々な哺乳動物細胞株にPNPsを加えて培養を行ったところマクロファージと同様にLDsが誘導された。このLDsの誘導活性はリポソームの脂質の組成によって異なっていた。さらにエクソソームでもLDsの誘導は確認された。これらの結果から、PNPsによるLDsの誘導は、幅広い哺乳動物細胞に共通して見られる現象であることが明らかになった。次にHEK293Tへのリポソームの取り込み量を調べたところ、特定のリン脂質を含有するリポソーム（LP）の取り込みが非常に高いことがわかった。HEK293TにはLPの取り込みを促進する受容体が高発現していることが推定されたため、その受容体を特定するために網羅的遺伝子発現解析をおこなった。解析により見出された高発現している4つの遺伝子を候補としてsiRNAを用いてリポソームの取り込みを調べたところ、特定の膜タンパク質（MP）に対するsiRNAで最も強く取り込みが抑制された。MPを過剰発現させたHEK293Tでは、LPの取り込みが顕著に増加し、抗MP抗体はLPの取り込みを阻害した。またMPのノックダウンによってLPによるLDsの誘導が抑制された。これらの結果からMPはLPの受容体として機能し、endocytosisとLDsの誘導に関与していることが明らかになった。さらにPNPsによるLDsの誘導実験の過程で、栄養欠乏状態のL929細胞にリポソームを作用させると生存延長作用を示すこともわかった。以上の研究結果から哺乳動物細胞はPNPsに対する共通する応答としてLDsを形成し、LPについてはMPを介してendocytosisとLDの形成を誘導し、形成されたLDは栄養飢餓時に細胞の生存の促進に働いている可能性が示唆された。本研究により、哺乳動物細胞にはこのようなPNPsに対する一連の応答機構が存在することを初めて明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (藤 田 和 代)			
論文審査担当者	(職) 氏 名		
	主 査	教授	黒田 俊一
	副 査	教授	高木 淳一
	副 査	准教授	三間 譲治
論文審査の結果の要旨 本論文では、ヒト胎児腎細胞由来の HEK293T 細胞株や様々な哺乳動物細胞株に人工のリン脂質ナノ粒子 (PNPs) であるリボソームを加えて培養すると、マクロファージと同様にマクロファージ以外の細胞でも細胞内に脂肪滴 (Lipid droplet : LDs) が誘導されることを明らかにした。さらにウシミルクから精製したエクソソームでも LDs の誘導作用が認められた。これまでに PNPs がマクロファージに取り込まれると LDs の形成が誘導されることが報告されている。しかし、マクロファージ以外の哺乳動物細胞で PNPs により LDs が誘導されるのかどうかについてはわかっていなかった。本論文は PNPs による LDs の誘導現象は、幅広い哺乳動物細胞に共通して見られる応答現象であることを初めて明らかにした。 また、HEK293T へのリボソームの取り込み量について調べたところ、phosphatidylethanolamine (PE) 含有リボソームの取り込みが高かったことから、HEK293T 細胞は PE 受容体が高発現していることが推定された。そこで PE 受容体を特定するため、HEK293T の網羅的遺伝子発現解析をおこない、高発現している受容体候補遺伝子を得られた。HEK293T 細胞をこれらの候補遺伝子に対する siRNA で処理し、リボソームの取り込みを調べたところ、high density lipoprotein (HDL) の受容体として知られている scavenger receptor class B type 1 (SR-B1) に対する siRNA で最も強く取り込みが抑制された。また、SR-B1 発現プラスミドを導入して SR-B1 を過剰発現させた HEK293T では、PE 含有リボソームの取り込みが顕著に増加した。これらの結果から SR-B1 が PE 受容体であることが強く示唆された。さらに抗 SR-B1 抗体は HEK293T での PE 含有リボソームの取り込みを阻害した。細胞内に取り込まれた PE 含有リボソームは、endosomes/lysosomes および SR-B1 と共局在していることが確認できた。さらに PE 含有リボソームによる LDs の誘導は SR-B1 siRNA で阻害された。これらの結果から、SR-B1 は PE 受容体として PE 含有リボソームの endocytosis を誘導し、リボソームは SR-B1 と共に endosomes/lysosomes に取り込まれて LDs の形成を促進することが初めて明らかになった。 PNPs による LDs の誘導実験を行う過程で、細胞に PE 含有リボソーム等を作用させると LDs が誘導されるだけでなく、グルコース欠乏条件で培養した L929 細胞に対して生存延長作用を有することがわかった。PNPs による LDs の誘導は栄養欠乏状態での細胞の生存に影響を与えることが示唆された。 本論文は、哺乳動物細胞の PNPs に対する共通する応答として LDs を形成することを明らかにした。しかし細胞への取り込み機構は PNPs のリン脂質組成によって異なっていた。PNPs の中では、PE 含有リボソームが HEK293T 細胞への取り込みが特に高かったので、PE 含有リボソームの endocytosis の機構を詳細に調べた結果、PE 含有リボソームは SR-B1 を介して受容体依存的に endocytosis により取り込まれることが分かった。SR-B1 は PE 含有リボソームの SR-B1 への結合と endocytosis は細胞内の LD の形成を誘導し、形成された LD は栄養飢餓時に細胞の生存の促進に働いていることが示唆された。本論文は、哺乳動物細胞にはこのような PNPs に対する一連の応答機構が存在することを初めて明らかにした。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分価値あるものと認める。			