

# 細胞生存促進効果を有する糖内包化リポソームの アンチエイジング化粧品への応用

千里金蘭大学生活科学部食物栄養学科

日 沼 州 司

In this study, we examined the effect of maltose-encapsulated liposomes (ML) on cell survival of mouse fibroblast cell line L929 sub-clone (L929-S) in culture with glucose-deficient media. Under our experimental conditions, almost all of cells died within two days in culture without the addition of glucose, when cell viability was determined by trypan blue dye exclusion test. Even in the presence of 50 µg/ml glucose or empty liposomes, almost all of cells died within a similar range of time. Intriguingly, the combination of 50 µg/ml glucose and empty liposomes (G + L) prolonged the cell survival one day or so, suggesting that low concentration of glucose and liposomes synergistically act on cells to promote the survival. However, ML promoted the cell survival evidently more than G + L. In assays using WST-8, ML showed greater formazan formation in cells than the others including G + L. Therefore, the action mechanism of ML on the cell survival was considered to differ from that of G + L. To elucidate the mechanism of ML for promoting the cell survival, we examined by WST-8 assays whether ML separated by a dialysis membrane (ML/cup) could influence on the cell survival. ML/cup promoted the survival than maltose by the same treatment, suggesting that maltose consistently released from ML promoted the cell survival. However, the cell survival-promoting activity of ML/cup was apparently less than that of ML administered directly to cells, suggesting that ML acted on cells by not only the sustained release of maltose but also direct incorporation of liposomes into cells. Consequently, our results suggest that saccharide-encapsulated liposomes would be applicable for developing one of ingredients useful for cosmetics to activate skin cells whose metabolism lowered by such as aging.

## 1. 緒 言

リポソームは、細胞膜や生体膜の構成成分であるリン脂質を利用して人工的に作成するナノメートルサイズの粒子である。リン脂質は、両親媒性分子のため、水中では親水基同士と疎水基同士がそれぞれ集合する性質があり、二重膜構造を持つ粒子を形成する<sup>1,2)</sup>。リポソームは内部に薬物やタンパク質などを内包化することができるため、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の搬送体として利用が期待されている。細胞膜は基本的にタンパク質や遺伝子は透過できないが、リポソームは細胞にエンドサイトーシスによって取り込まれる性質を持つので、タンパク質や遺伝子などの目的とする物質をリポソームに内包化して細胞内に搬送することが可能である<sup>3)</sup>。また物質を内包化したリポソームは徐々に分解されて、内容物を放出することから、目的物質の長期間の徐放の手段としても有用である。研究代表者らは、リポソームの機能調節に食品成分の内包化が有用であることを見出している<sup>4,5)</sup>。

しかし、これまでリポソームについては、糖の細胞への送達にリポソームを利用した報告はあまり見当たらない。グルコースはグルコーストランスポーターを介して細胞に

取り込まれ、代謝されてATPの産生などに働くことが知られている。糖をリポソームに内包化して、細胞に投与し、通常の糖の培地への添加と比較すれば、糖の投与形態の違いによる細胞への影響の違いを明らかにすることができるのではないかと着想し、実験によりそれを確認することにした。そこで本研究ではマルトースを内包化した直径約100 nmのリポソームを作製し、培養したL929-S細胞に加えた場合に、細胞の生存にどのような影響を及ぼすのかを検討した。その結果、糖を枯渇した培地で培養すると、MLは、同等量の糖や空のリポソームを単独で加えた場合よりも細胞を長期に生存させることができることを見出した。老化によって糖の利用の効率は低下することが知られている<sup>6)</sup>。本研究で作製したMLは、アンチエイジング化粧品の開発に利用できる可能性があると考えられる。

## 2. 試料および実験方法

### 2. 1. リポソームの作製

リポソーム作製のための脂質としては、1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC; NOFCo)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC; NOFCo)、1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DOPE; NOFCo) を用いた。MLは次のように作製した。DOPC (6 mg) と DOPE (6 mg) の計12 mgのDOPC/DOPEを4 mLのクロロホルムに溶解し、500 mLのナス型フラスコに入れて、エバポレーター (N1000; EYELA) を使って有機溶媒を蒸発させて、5~10分フラスコを回転させながら脂質フィルムを形成させた。次にマルトース (和光) あるいはスクロース (2 g) を溶解したTAPSバッファー (4 mL) を加えて、



Application of saccharide-encapsulated liposomes providing activities to promote cell survival for anti-aging cosmetics

Shuji Hinuma

Senri Kinran University, Faculty of Human Life Science, Department of Food and Nutrition

ボルテックス処理し、さらにスターラーで45℃、1時間攪拌した。空のリポソームを作製する場合は、リン酸緩衝液 (PBS) を加えて、同様の処理をした。攪拌後、リポソーム懸濁液をガラス試験管に入れて、超音波水槽 (Ultrasonic Cleaner VS-100III; ASONE) で28、45、100Hzのサイクルで超音波処理を3時間行った。超音波処理後、100nmのフィルターを装着したエクストルーダー (Avanti polar Lipids) による処理を行い、直径約100nmのリポソームを得た。その後、リポソーム懸濁液を透析膜チューブ (排除分子量1,000,000; Millipore) に入れてPBSで、4~5日間透析処理を行った。透析終了後、0.22 μm (Millipore) のフィルター処理をして滅菌し、実験に使用した。調整後のリポソームの粒子サイズとゼータ電位はZetasizer nano ZSP (Malvern) を使って測定した。

## 2. 2. リポソーム懸濁液の脂質の定量

作製したDOPC/DOPEリポソーム懸濁液の脂質量は、sulfo-phospho-vanillin法(7)で定量した。リポソーム懸濁液からの脂質の抽出は、リポソーム懸濁液75 μLをマイクロチューブにとり、等量のクロロホルム75 μLを加えてボルテックスで2分攪拌した。攪拌後、遠心機 (Hitachi) で4000 rpm、5分遠心した。クロロホルム層をマイクロピペットで別のマイクロチューブに移した。その後、得られたクロロホルム溶液を小型スピッツガラス試験管に10 μLとり、遠心エバポレーター (CVE-200; EYELA) で40℃、10分処理し、有機溶媒を除去した。標準検体としてはエタノールに溶解したDOPC/DOPE溶液を使用した。リポソームの脂質の定量は、次のように行った。試料に200 μLの硫酸を加えて、ボルテックスで攪拌し、100℃で10分処理後、冷水中で5分冷却した。1mLのPhospho-vanillin reagentを加えて、ボルテックスで攪拌し、37℃で15分処理した後、分光光度計 (U5110; Hitachi) を使用して波長530 nmの吸光度を測定した。標準検体の検量線から検体中の脂質量を決定した。

## 2. 3. リポソーム懸濁液の糖の定量

リポソーム懸濁液の糖含量はアンスロン法により行った(8)。リポソーム懸濁液50 μLをマイクロチューブに入れ、クロロホルム100 μLを加えてボルテックス処理した後、蒸留水300 μLを加え、さらにボルテックスで攪拌した。攪拌後、遠心機 (himac CT 13R; Hitachi) で4℃、10,000 rpm、5分間遠心し、水層を検体として使用した。リポソームに内包されていない糖量は、リポソーム懸濁液を限外濾過フィルター付チューブ (分子量300,000カット; Sartorius) で、4℃、4,000 rpm、30分遠心し (2700; Kubota)、濾液の糖量から求めた。検体とアンスロン試薬との反応は、検体250 μLを、小型スピッツガラス試験管に入れた冷却した

アンスロン試薬1mLに重層した。重層後、ボルテックスにより混和し、100℃、10分処理した後、直ちに冷却した。糖によるアンスロン試薬の発色は、分光光度計により620 nmの吸光度を測定した。既知濃度の糖水溶液を標準検体にして検量線を作成し、検体中の糖濃度を決定した。

## 2. 4. L929-S細胞の培養

リポソームの影響を調べるための細胞としては、マウス線維芽細胞株のL929 (JCB細胞バンク) を当研究室で長期培養し、糖飢餓に感受性が高くなったL929-S細胞を使用した。L929-S細胞は、グルタミンとHEPES含有RPMI1640培地 (Gibco) に非働化した10%ウシ胎児血清 (FCS; Biowest) にペニシリンとストレプトマイシン (Gibco) を加えた培地で、組織培養用フラスコ (Corning) を使って継代したものを使用した。リポソーム添加実験のときは、0.25% Trypsin-EDTA (Gibco) を用いてL929-S細胞を剥離し、PBS (Wako) で2回遠心洗浄して、glucose-free RPMI1640培地 (Gibco) に非働化した10% dialyzed FCS (Gibco) とペニシリンとストレプトマイシンを加えた培地で、 $4 \times 10^5$ /mLに浮遊し、等量のリポソーム液 (PBSで希釈) と1:1で混合した。必要な場合には、PBSに溶解した糖を加えた。組織培養用マイクロプレート (Corning) に加えて、炭酸ガス培養器で5% CO<sub>2</sub>、37℃で培養した。

半透膜で仕切った状態でのMLの投与には、底面に半透膜が張られた微量透析装置 (EasyStep; Tomy) にリポソーム懸濁液 (100 μL) を加え、24穴マイクロプレート (Corning) で培養した細胞の培養液 (400 μL) に半透膜が接するように微量透析装置を設置して培養を行った。

## 2. 5. トリパンブルー色素排除試験

培養細胞の生存を確認するためにトリパンブルー色素排除試験を行った。培養液を除去し、細胞培養液量の1/25の0.4%トリパンブルー溶液 (Sigma-Aldrich) を加えた後、倒立顕微鏡 (CKX41; Olympus) で画像をCCDカメラ (Visualix-Pro2; Visualix) で撮影した。画像からトリパンブルーで染色されていない細胞の割合を、画像解析ソフト (画像内カウントツール4; Nihon system developer Co.) により解析し、細胞生存率として求めた。細胞数としては1画像当たり100個以上になるようにカウントした。

## 2. 6. フォルマザン生成試験

細胞の生存を示す活性の指標として、WST-8 (Cell counting kit-8; Dojindo) を利用したフォルマザン生成試験を行った<sup>4)</sup>。L929-S細胞を前述の培養条件で96穴マイクロプレート (Corning) を使って、100 μL/wellで培養した。24穴マイクロプレートで培養する場合には500 μL/wellで培養した。WST-8による発色反応は、細胞培養液の

1/10量のWST-8液を加えて、4時間培養後、発色反応を450 nmの吸光度で、マイクロプレートリーダー(Maltiskan Ascent plate reader ; Labsystems)を使って測定した。

### 3. 結果

#### 3.1. 調製したリポソームの性状

調製したリポソームについて性状解析した結果を表1に示した。空のDOPC/DOPEリポソームとMLのいずれも約100 nmのリポソームが得られた(図1)。Z-potentialはマイナスの値を示したことから調製したリポソームはマイナスの電荷を持っていることがわかった。1回のリポソームの調製で、約2.4 mL程度の懸濁液を得ることができた。したがって、脂質の回収率は約90%と推定された。一方、リポソーム内包化のために投入したマルトースの回収率は約50%と推定された。ML懸濁液については、リポソームに内包化されているマルトースの量は90%以上と推定された。

本研究では、リポソームに内包化する糖として、グルコースではなくマルトースを利用したが、グルコースは脂質二重膜の透過性が高く、グルコースを内包化したリポソームの作製が困難であった。そのため糖内包化リポソームを作製するための糖としてマルトースを使った。MLは4℃では安定であったが(未発表データ)、図2に示すように37℃ではマルトースが経日的に徐々に放出されることがわかった。したがってMLは、細胞培養液中でマルトースの徐放効果を発揮していることが示唆された。

#### 3.2. グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞の生存に対するMLの影響

MLの細胞の生存への影響を調べる目的で、グルコースを含有しない基礎培地でL929-S細胞を培養し、MLを添加したときの影響を調べた。MLを添加すると培養3~4日目でも細胞の生存率は90%以上であった(図3、ML)。一方、何も添加しなかった場合には、3~4日間の培養で、生存率は10%以下に低下した(図3、None)。興味深いことにMLと同等量のマルトースを添加した場合(図2、M)やグルコースを添加した場合(図3、G)では、3日目ではまだ生細胞はある程度認められたが、4日目では生存率は10%以下に低下した。同じ培養条件で、L929-S細胞は、グルコース1,000 µg/mLの添加では、1週間以上、細胞の生存率の顕著な低下は認められなかった(未発表データ)。したがって、低濃度(50 µg/mL)のマルトースやグルコースではL929-S細胞は3~4日でほぼ死滅することがわかった。MLと同等量の脂質量の空のリポソームを加えた場合には、顕著な細胞の生存促進効果は認められなかった(図3、L)。しかし低濃度のグルコースに空リポソームを加えた場合(図3、G+L)には、糖や空リポソームを単独で加えた場合と比較して、3日目で明らかに生存を促進している傾向が認められた。L929-S細胞は、生存と増殖に十分量のグルコースが存在することが必須であるが、マルトースでもグルコースよりも若干効率は低下するが、代替できることがわかっている(未発表データ)、L929-S細胞はマルトースを分解して、グルコースとして利用できると考えられる。低濃度のグルコースに空リポソームの組

表1 調製したリポソームの性状

リポソーム	直径(nm)	Z-potential	脂質濃度(mg/mL)	マルトース濃度(µg/mL)	n
DOPC/DOPE	107.1 ± 11.6	-12.7 ± 7.4	4.6 ± 0.9	0	16
ML	99.9 ± 27.6	-16.7 ± 3.9	4.2 ± 1.8	450.4 ± 244.5	8

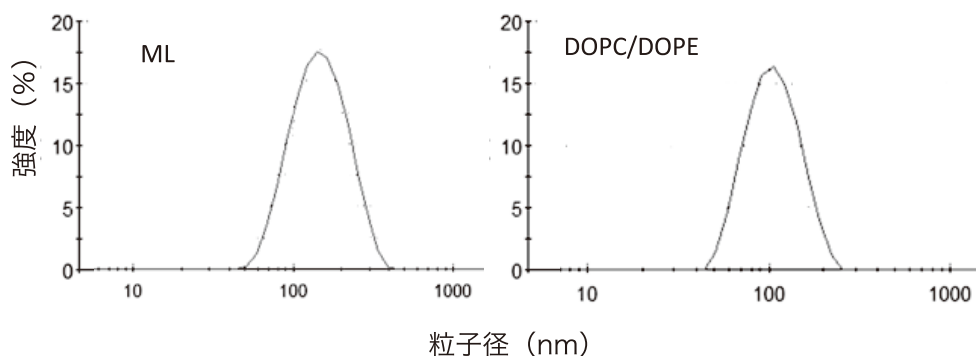


図1 調製したリポソームの粒子径の分布

MLおよび空のDOPC/DOPEリポソームの粒子径を測定した結果の代表例を示した。

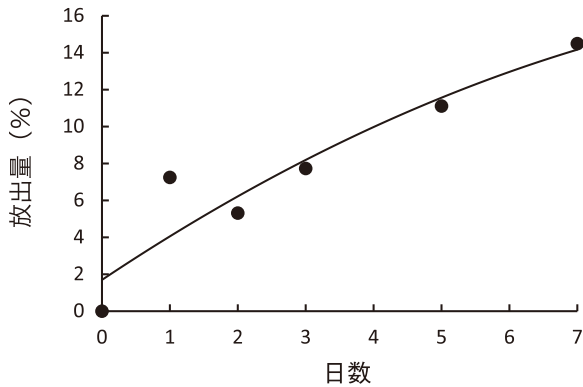


図2 MLからのマルトースの徐放

ML (マルトースとして1mg/mL)をPBS (1mL)に懸濁してエッペンドルフチューブに、37°Cで処理後、リボソームの外に放出されたマルトース量を限外濾過処理により測定した。放出量 (%)は37°C処理する前のマルトース濃度を100%として求めた。

み合わせがそれぞれ単独で添加した場合に比較して、細胞の生存を延長する傾向が見られたことは、両者がL929-S細胞に対して生存延長に相乗的な働きをしていることが示唆された。しかしMLは糖と空リボソームの組み合わせよりもはるかに強い細胞生存促進作用を示した。これらの結果は、MLは空リボソームの組み合わせとは異なる作用機序でL929-S細胞の生存を延長させていることを示しているものと考えられた。

### 3. 3. グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞のフォルマザン生成活性に対するMLの影響

WST-8は細胞内脱水素酵素により還元されて、フォルマザンを形成して発色することが知られているが、生細胞の指標として、一般的に使われている。そこでグルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞のフォルマザン生成活性に対するMLの影響を調べた。複数回実験を行ったが、その結果の代表例を図4に示す。MLは培養1日目までフォルマザン生成活性が最大に達し、培養4日目まで、徐々に活性は低下していったが、4日目でもフォルマザン生成活性が認められた(図4, ML)。無添加(図4, None)と空リボソームのみの添加(図4, L)では、培養開始時点(培養0日目)でもほとんど検出されなかったことより、フォルマザン生成は糖の代謝と密接に関連していることが示唆された。低濃度(50 µg/mL)のマルトース(図4, M)やグルコース(図4, G)では培養1日目までは明確なフォルマザン生成活性が認められたが、2日目ではほとんど検出されなくなった。低濃度の糖と空リボソームの組み合わせ(図4, M+L, G+L)では、糖単独よりは0日目と1日目より強いフォルマザン生成活性を示したが、2~4日目ではほとんどフォルマザン生成活性は認められなかった。しかし低濃度の糖と空リボソームの組み合わせは、ML処理

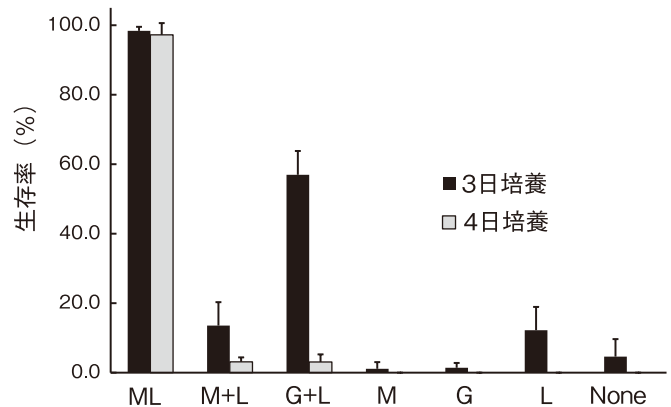


図3 グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞に対するMLの生存促進作用

ML: マルトース (50µg/mL) 含有リボソーム (106µg/mL) 添加; M+L: マルトース (50µg/mL) と空リボソーム (106µg/mL) 添加; G+L: グルコース (50µg/mL) と空リボソーム (106µg/mL) 添加; M: マルトース (50µg/mL) 添加; G: グルコース (50µg/mL) 添加; L: 空リボソーム (106µg/mL) 添加; None: 無添加。

細胞の生存率はトリパンプルー試験により測定し、データは平均値とSDで示した(n=3)。

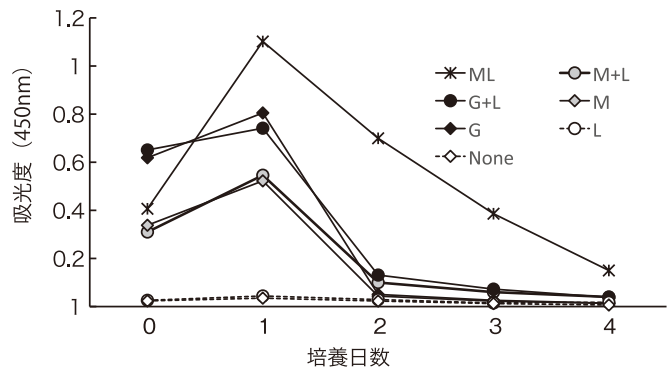


図4 グルコース枯渇培地で培養したL929-S細胞のフォルマザン生成に対するMLの効果

ML, M+L, G+L, M, G, Noneの表記は図3と同じ。フォルマザン生成試験はWST-8を用いて行った。データ(n=2)は培地のみ吸光度を測定値から引いた値の平均値を示した。誤差は平均値の10%以内であった。

した細胞のフォルマザン生成活性に比較すると1~4日目ではるかに低かった。フォルマザン形成活性として見ると、ML>M+L, G+L>M, Gの強さの順になっていたが、これらの結果は、トリパンプルー試験の結果とおおよそ一致していた。

### 3. 4. MLの作用機序の検討

MLのL929-S細胞に対する生存促進効果の作用機序を明らかにする目的で、MLを培地中に直接投与した場合(図5, ML)と、半透膜で仕切られたカップに入れて投与した場合(図4, ML/cup)の細胞のフォルマザン生成活性に与える影響を比較検討した。この実験では、MLを投与した

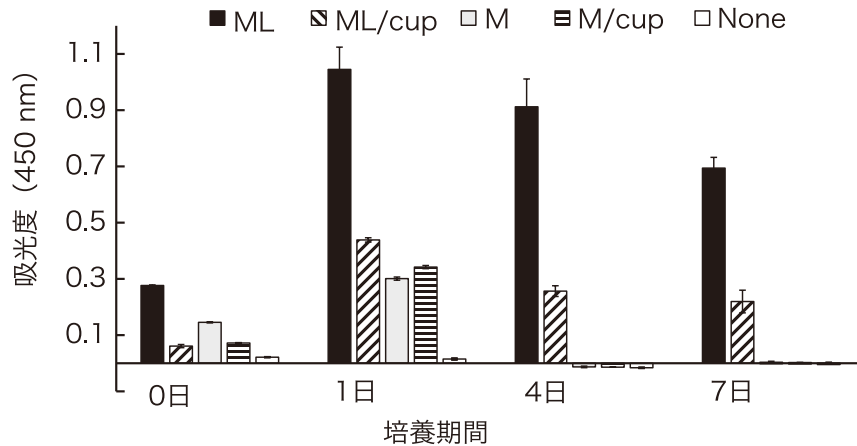


図5 MLを半透膜で仕切ってL929-S細胞に投与したときの効果

ML、M、Noneの表記は図2、3と同じ。ML/cupは半透膜で仕切ったカップに入れてMLを投与、M/cupはマルトースを半透膜で仕切ったカップに入れて投与したことを示す。フォルマザン生成試験はWST-8を用いて行った。データ (n=2) は培地のみの吸光度を測定値から引いた値の平均値で示した。誤差は縦線で示した。

場合には、7日後でも明確なフォルマザン生成活性が認められた (図5, ML)。半透膜で仕切られたMLを投与した場合 (図5, ML/cup) は、ML粒子は半透膜を透過できないので、MLは直接細胞に接触することはできないが、7日後でもフォルマザン形成活性が検出された。この結果は、半透膜を透過できるマルトースがMLから持続的に遊離し、半透膜と透過して作用したマルトースがL929-S細胞のフォルマザン形成活性の維持に働いていたことを示しているものと考えられた。しかしMLと比較するとML/cupのフォルマザン形成活性は半分から1/4程度であった。このことは、MLはマルトースの徐放以外に直接細胞に接触し、取り込まれることによって、細胞の生存延長効果を発揮している部分もあることを示唆しているものと考えられた。

#### 4. 考察および総括

本研究では、L929細胞株のsub-cloneであるL929-S株を実験に使用した。L929-Sは糖飢餓に対する感受性が高く、グルコース飢餓培養条件下では、約2日以内にほぼ死滅する性質を持つので、MLの細胞生存延長効果の判定がやり易いので使用した。親株のL929細胞は、グルコース飢餓条件下でも1週間近く生存が認められた (未発表データ)。リポソームに内包化する糖としてはマルトースを利用した (表1)。DOPC/DOPEリポソームに内包化すると4℃では数週間安定だが、37℃ではマルトースが徐々に放出されることがわかった (図2)。しかしグルコースを内包化したDOPC/DOPEリポソームは非常に不安定で37℃処理では、1日以内にほとんどが放出されてしまった (未発表データ)。グルコースは脂質二重層の膜を透過しやすいので、内包化するための糖としては、グルコースよりもマルトースの方が適当だと考えている。またスクロースを内

包化したリポソームも作製して、MLと同様の細胞生存延長試験を行って見たが、スクロース内包化リポソームにはグルコース欠乏培地で培養したL929-S細胞に対する細胞生存促進作用は全く認められなかった (未発表データ)。これはL929-S細胞にはマルトースを分解してグルコースとして利用するためのグリコシダーゼが存在するが、スクロースを分解して利用するサッカラーゼが存在しないためではないかと考えられた。どのような糖をリポソームに内包化するとより細胞生存延長効果に有効かについては、さらに検討する余地があると考えている。MLは、グルコース飢餓条件下で培養したL929-Sに対して、同等量のグルコースやマルトースを添加した場合や、同等量の空のリポソームを添加したよりも強力な細胞生存延長効果を示した (図3、4)。興味深いことに、低濃度の糖や空リポソームをそれぞれ単独で加えた場合よりも、低濃度の糖と空リポソームを組み合わせると投与した場合の方が、単独よりも若干生存を促進する効果が認められた (図3、4)。これらの結果は、空リポソームも糖の存在下で、細胞の生存に何らかの生存促進作用を有していることを示唆している。我々は、MLに蛍光物質のカルセインを取り込ませたものを作製し、細胞に投与すると、細胞に取り込まれることを確認している (未発表データ)。したがって、細胞培養系に投与したりポソームの少なくとも一部は、細胞内に取り込まれることによって、細胞生存の促進作用に関与しているものと考えている。リポソームは、リン脂質からできていて、それ自体が細胞の代謝によるエネルギー産生の原料となるとは考えにくいですが、糖の存在下で細胞に取り込まれたリン脂質が代謝されて脂質代謝による脂肪酸のβ酸化の系路の促進に働いている可能性が想像されるが、この点の検証については今後の課題である。

MLの細胞生存促進作用の機序を調べるためにリポソームが透過できない半透膜で仕切った状態で細胞に投与したところ、その状態でもある程度、細胞生存の延長効果を示した(図5)。この結果は、MLからマルトースが徐放され遊離した微量のマルトースが、細胞の長期的な生存維持に働いている重要な機序の一つであることを強く示唆している。この結果は、図2に示したように、MLが37℃において(おそらくリポソームの分解や膜構造の不安定化により)マルトースの徐放効果を示したという結果と一致しているように思われた。しかし半透膜で仕切られたMLのフォルマザン形成活性は、MLを直接細胞に投与した場合に比較して、明らかに低かった。この結果はMLが細胞に取り込まれることが、MLが十分な細胞生存促進効果を発揮するためには重要であること示唆している。上述したような、リン脂質の取り込みによる糖の存在下での脂質代謝を介したエネルギー産生系の亢進がMLの効果の発揮には必要なのではないかと考えている。これらの点の確認は今後さらに検討が必要である。

本研究では、糖内包化リポソームのMLを調製し、糖欠乏培地で培養した繊維芽細胞に対して、強力な細胞生存促進効果を示すことを見出し、その機序についても一部解明することができた。糖内包化リポソームは高齢化に伴い代謝が低下した化粧品成分として利用できる可能性があるのではないかと期待している。

#### 謝 辞

本研究にご協力、ご助言いただいた千里金蘭大学、藤田和代助教および大阪大学、黒田俊一教授に深謝いたします。

#### (引用文献)

- 1) Sessa G, Weissmann G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res.* 1968 May;9(3):310-8.
- 2) Alipour E, Halverson D, McWhirter S, Walker GC. Phospholipid bilayers: stability and encapsulation of nanoparticles. *Annu Rev Phys Chem.* 2017 May 5;68:261-283. Deciphering the Functional Composition of Fusogenic Liposomes. Kolašinac R, Kleusch C, Braun T, Merkel R, Csiszár A. *Int J Mol Sci.* 2018 Jan 24;19 (2).
- 3) Amano C, Minematsu H, Fujita K, Iwashita S, Adachi M, Igarashi K, Hinuma S. Nanoparticles containing curcumin useful for suppressing macrophages in vivo in mice. *PLoS One.* 2015 Sep 11;10(9) *J Clin Invest.* 1986 Jun;77(6):2034-41.
- 4) Fujita K, Hiramatsu Y, Minematsu H, Somiya M, Kuroda S, Seno M, and Hinuma S. Release of siRNA from liposomes induced by curcumin. *Journal of Nanotechnology Volume 2016 (2016), Article ID 7051523, 6 pages*
- 5) Fink RI, Wallace P, Olefsky JM. Effects of aging on glucose-mediated glucose disposal and glucose transport. *J Clin Invest.* 1986 Jun;77 (6):2034-41.
- 6) Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phosphovanillin method. *Clinical Chemistry vol. 18, No. 7, 1972*
- 7) Morris DL. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's Anthrone Reagent. *Science.* 1948 Mar 5;107 (2775):254-5.