

令和元年6月3日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06906

研究課題名(和文) 微弱電流による脳微小環境制御と白血球機能を利用した脳梗塞部位浸潤性DDSの開発

研究課題名(英文) Development of a novel DDS targeting ischemic stroke region by using leukocyte-like function and control of brain microenvironment via faint electricity

研究代表者

福田 達也 (FUKUTA, Tatsuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・助教

研究者番号：90805160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞部位にて生じる血液脳関門(BBB)の破綻を利用した、ナノサイズのリポソームによる薬物送達は脳梗塞治療に有効であるが、リポソームの脳実質への移行は再灌流後早期に限られる。そこで本研究では、膜タンパク質機能を利用して脳梗塞部位のBBBを突破する白血球に着目し、その膜タンパク質を搭載した白血球ミミックリポソーム(LM-Lipo)を構築し、機能性をin vitroにて評価した。LM-Lipoは、白血球膜タンパク質の機能を発揮することで炎症血管内皮へ高い親和性を示し、細胞間接着を変化させることで、炎症血管内皮細胞層を透過できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義として、本研究成果がさらに発展し、白血球が有する生体機能を模倣したリポソームを構築することで、ナノ粒子を用いた脳梗塞治療が抱える課題を解決し、脳への薬物送達の最大の障壁である血液脳関門を突破可能な新規薬物送達システム(DDS)の開発に繋がり得る点が挙げられる。社会的意義として、脳梗塞に対する新たな治療薬の開発に貢献でき、患者QOLの向上と、超高齢社会で問題とされる要介護人口の減少と医療経済の改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We previously demonstrated that drug delivery with nano-sized liposomes is available for the treatment of ischemic stroke via passage through the disintegrated blood-brain barrier (BBB) after a stroke. However, liposomal entry into the brain parenchyma was limited at an early phase following ischemia/reperfusion. As leukocytes can pass through the BBB regardless of such conditions via utilizing the functions of their membrane proteins, we hypothesized that incorporation of leukocyte membrane proteins onto liposomal membranes may impart leukocyte-mimicking functions to liposomes. In this research, we developed leukocyte-mimetic liposomes (LM-Lipo) by leukocyte membrane protein transfer and evaluated their function in vitro. The results suggested that transfer of leukocyte membrane proteins onto liposomes could allow for association of the liposomes with inflamed endothelial cells, and subsequent passage through the inflamed endothelial cell layer via change of intercellular junctions.

研究分野：薬物送達学

キーワード：脳梗塞 血液脳関門 リポソーム 白血球 膜タンパク質 脂質膜間移行 炎症血管内皮 微弱電流

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脳梗塞は我が国において死因別死亡率、および要介護原因疾患の上位である脳血管疾患の約6割を占め、克服が望まれている。脳梗塞巣周辺における特徴的な病態として、脳への物質移行を厳密に制御している血液脳関門 (Blood-brain barrier: BBB) の破綻が生じ、脳血管透過性が亢進する。これまでに研究代表者は、本現象により生じた BBB の間隙を介して、虚血/再灌流後早期に静脈内投与したリポソーム(約 100 nm 径)が患部へ蓄積することを明らかとし、病態モデルラットを用いた検討において、リポソームによる脳保護薬送達が生じた脳梗塞治療に有用であることを報告してきた (FASEB J. (2017)他)。しかし、BBB 間隙を介したリポソームの脳実質への移行は、虚血/再灌流後に生じる脳微小循環不全により再灌流後早期(6時間程度)までに限られ、リポソームによる薬物送達効率を向上させるためにはこの時間的制限を克服し、BBB を能動的に突破可能な技術が求められる。研究代表者は、リポソームが脳梗塞部位の BBB を越えて脳実質へ移行できない条件下においても、血液中を循環する白血球が膜タンパク質機能を利用して BBB を突破することに着目し、リポソーム膜へ白血球膜タンパク質を移行させることで、白血球のように能動的に脳梗塞部位 BBB を突破可能なリポソームを構築できると着想した。また、研究代表者の現所属研究室では、皮内薬物送達技術であるイオントフォレシスに用いられる微弱電流処理(0.3-0.5 mA/cm<sup>2</sup>)が、組織細胞間隙の開裂を誘起するとともに、ナノ粒子や核酸の組織内への浸透・細胞内移行を促進することを見出している(Hama S., et al. J. Biol. Chem. (2014)他)。一方で近年、頭蓋を介した脳への微弱電流処理が神経細胞やアストロサイトの活性化を引き起こすことで、脳梗塞障害等の改善につながる事が報告されている。これら知見に基づき、研究代表者は、脳への微弱電流処理によって非侵襲的に脳の微小環境を変化させることで、微小循環不全を改善し、BBB の開口を誘起することで、リポソームの脳実質への移行を促進できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

上記の研究背景に基づき、本研究では「(1)白血球膜タンパク質をリポソーム膜へ移行させ、白血球のように炎症血管を突破可能なリポソーム、白血球ミミックリポソーム (Leukocyte-mimetic liposomes; LM-Lipo) の構築とその機能評価」、そして「(2)微弱電流処理による血管透過性亢進の誘起の検証」を目的とした。(1)において、リポソーム膜への白血球膜タンパク質の再構成法として、リポソームが細胞と接触し、双方の脂質膜同士が一過的に部分融合した際に、細胞膜タンパク質がリポソーム膜へ移行する現象、すなわち脂質膜間移行法を利用した。本方法は、細胞とリポソームを混合するだけで生じ、煩雑な工程を必要とせず、また移行した膜タンパク質はその配向性と活性を保持していることが報告されている。(2)においては、微弱電流処理により血管の組織生理が変化し、それにより高分子物質の血管外への移行が促進されるかどうかを検討することを目的とした。これらの研究を実施することで、脳梗塞部位の BBB の能動的な突破を可能とする DDS の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 脂質膜間移行法による白血球膜タンパク質搭載リポソーム (LM-Lipo) の構築：

本研究では、白血球モデル細胞として、ヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 細胞を用いた。白血球が炎症血管を突破するメカニズムの一つとして、膜タンパク質 CD11a と CD11b が、炎症部位で高発現する接着因子 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) へ結合することで、血管内皮細胞の細胞内シグナルが活性化され、細胞間接着が開口することで浸潤することが知られる。HL-60 は CD11a を恒常的に発現しており、またレチノイン酸 (All-trans-retinoid acid: ATRA) 存在下で培養することで好中球様細胞に分化し、CD11b の発現を誘導できることから、白血球膜タンパク質のドナー細胞として用いた。ATRA 処理による HL-60 の分化の有無はフローサイトメトリーにて評価した。リポソーム膜への白血球膜タンパク質の移行は、未分化または分化 HL-60 細胞を培養、洗浄した後、リポソームを添加し、37 °C で 90 分間振盪インキュベートすることで行った。遠心分離にて細胞を除去し、得られた上清を LM-Lipo とした。BCA アッセイによるタンパク質量と、Western blotting による白血球タンパク質移行の観察を行う際には、得られたリポソーム懸濁液を超遠心に供することで濃縮したサンプルを使用した。リポソームは、不飽和脂質を含有する Egg-yolk phosphatidylcholine (EPC)、または飽和脂質である Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) に Dicetylphosphate (DCP) を加えた組成をベースとして、Dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) を含有あるいは含有させていない 4 種の組成を用いた。

#### (2) LM-Lipo の炎症血管内皮細胞に対する親和性・透過性の評価：

(1) で構築した LM-Lipo の機能性を評価するにあたり、炎症血管モデルとして、Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) で処理し、ICAM-1 の発現を誘導したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用いた。1,1'-Diocetyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine (DiIC<sub>18</sub>) で蛍光標識した LM-Lipo を、TNF- $\alpha$  で処理した HUVEC に添加し、蛍光顕微鏡によりリポソームの接着・取り込みを観察した。また、細胞を溶解し、プレートリーダーにてリポソームの蛍光を測

定することで、親和性の定量を行った。LM-Lipo の炎症血管内皮の透過性は、トランズウェルプレート (8  $\mu\text{m}$  pore) 上に HUVEC を播種し、細胞層を形成させた後に TNF- $\alpha$  処理を行い、蛍光標識 LM-Lipo を上層へ添加一定時間後、下層メディアム中のリポソーム蛍光を測定することで評価した。

(3) LM-Lipo の炎症血管内皮細胞の細胞骨格・細胞間接着への影響：

(2) と同様に TNF- $\alpha$  処理 HUVEC に対して LM-Lipo を添加し、一定時間インキュベートした。そして、細胞骨格タンパク質である重合化アクチン (F-actin) と、細胞間接着タンパク質である Vascular-Endothelial cadherin (VE-cadherin) に対する蛍光免疫染色を行い、LM-Lipo によるそれらの変化を、共焦点顕微鏡にて観察した。

(4) 微弱電流処理による血管透過性亢進の評価：

微弱電流処理の血管透過性への影響を評価するにあたり、実験動物の代替として期待され、抗がん剤や抗酸化剤の活性評価などに用いられている発育鶏卵を用いた。発育鶏卵にモデル高分子物質として分子量 10,000 の FITC 標識デキストランを静脈内投与し、微弱電流処理 (0.34  $\text{mA}/\text{cm}^2$ ) を 30 または 60 分間施した。その 24 時間後、発育鶏卵の漿尿液を回収し、その蛍光強度を測定することで、高分子の血管外への移行を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 脂質膜間移行法による LM-Lipo の構築とその機能性評価：

白血球モデル細胞として用いた HL-60 を ATRA 存在下で培養したところ、96 時間後にその分化率が一定に達することがフローサイトメトリーにて明らかとなったため、ATRA 処理 96 時間後の細胞を好中球様分化 HL-60 細胞として用いた。未分化あるいは分化 HL-60 とリポソームを混合し、リポソーム膜への膜タンパク質の移行を評価したところ、HL-60 の分化の有無に関わらず、用いた 4 種のリポソームいずれにおいても CD11a の移行は観察された一方で、CD11b の移行は分化 HL-60 と混合した場合にのみ認められた。また、その移行性は不飽和脂質である DOPE を含有するリポソームにおいて向上していた。脂質膜間移行現象による膜タンパク質の移行は、受け手側の膜流動性が高いほど向上するという過去の知見から、DOPE を含有することでリポソームの膜流動性が高まったためであると考察している。得られた LM-Lipo を HUVEC に添加したところ、HL-60 細胞の分化の有無によらず、白血球膜タンパク質を移行させた LM-Lipo 添加群では通常リポソーム添加群と比較して高い蛍光が観察され、特に TNF- $\alpha$  処理により ICAM-1 を発現させた HUVEC に対して有意に高い親和性を示した (図 1)。

本結果から、脂質膜間移行法によりリポソーム膜上へ移行した白血球膜タンパク質がその機能を発揮し、炎症血管内皮細胞への接着能を獲得したことが示唆された。また、DMPC リポソームと比較して、EPC リポソームがより高い親和性を示したことから、以降の検討では EPC リポソームを用いた。トランズウェルを用いた検討から、分化 HL-60 と混合することで CD11a、CD11b をともに移行させた LM-Lipo が、TNF- $\alpha$  処理 HUVEC に対して高い透過性を示すことが明らかとなった。その際の細胞骨格を観察したところ、未処理の HUVEC と比較し、LM-Lipo 添加群においてアクチン骨格に顕著な変化が生じ、よりシャープな形状をしている様子が観察された。

さらに、細胞間接着タンパク質である VE-cadherin の発現変化を観察したところ、未処理の HUVEC、また TNF- $\alpha$  処理し通常リポソームを添加した群では鮮明な細胞間接着が認められた一方で、LM-Lipo 添加群では、細胞間接着に乱れが生じるとともに、Image J による定量から、その発現量が有意に減少していた (図 2)。以上より、リポソーム上の白血球膜タンパク質の機能により、炎症血管の細胞骨格および細胞間接着に変化が生じ、それにより LM-Lipo が炎症血管内皮細胞層を突破したことが示唆された。今後、LM-Lipo の炎症血管への接着・透過に関する膜タンパク質とそのメカニズムを明らかにするとともに、脳血管内皮細胞やラット脳梗塞モデルを用いた検討を進めることで、さらなる有用性を実証したいと考えている。

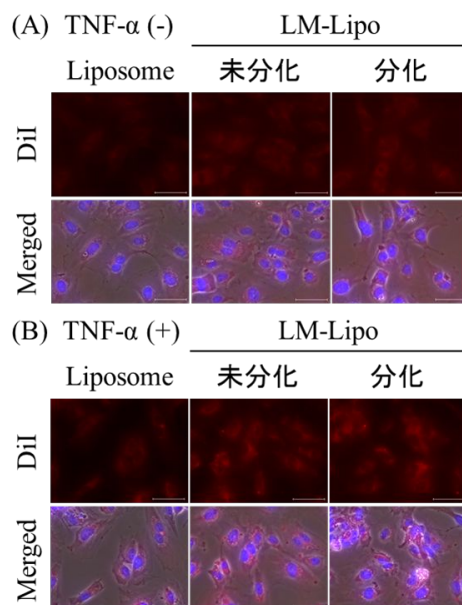


図 1. LM-Lipo の TNF- $\alpha$  処理 HUVEC への親和性 (Int. J. Pharm., 563, 314-323 (2019), 一部改変); TNF- $\alpha$  未処理 (A) TNF- $\alpha$  で 16 時間処理した HUVEC (B) に対し、蛍光 (DiI; 赤) 標識 LM-Lipo を添加した。その 3 時間後に細胞核 (DAPI; 青) を染色後、顕微鏡観察を行った。

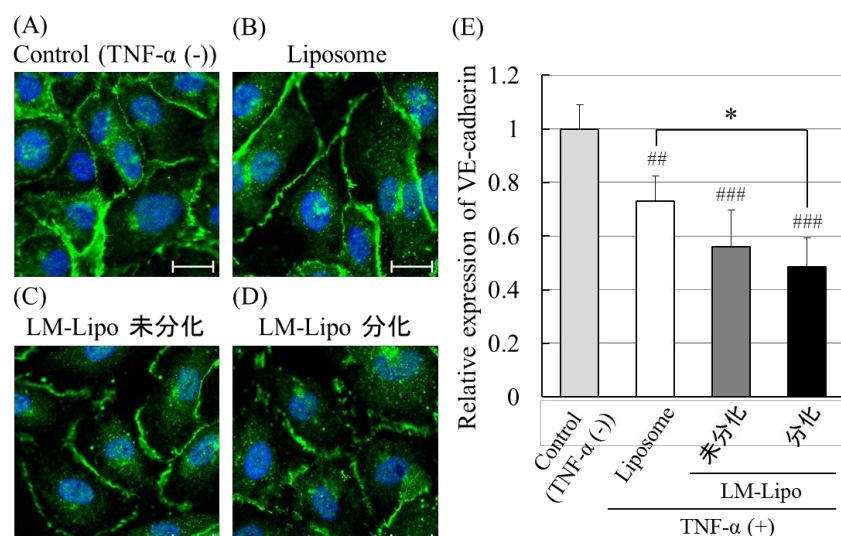


図 2. 炎症血管内皮の細胞間接着タンパク質 (VE-cadherin) 発現への LM-Lipo の影響 (Int. J. Pharm., 563, 314-323 (2019). 一部改変): TNF- $\alpha$  未処理 (A) TNF- $\alpha$  で 16 時間処理した HUVEC (B-D) に対し、それぞれのリポソームを添加した。その 3 時間後に VE-cadherin に対する免疫染色 (Alexa488; 緑) と細胞核染色 (DAPI; 青) を行った後、共焦点顕微鏡にて観察した。(E) 共焦点画像から VE-cadherin の蛍光を Image J にて定量し、Control における VE-cadherin 発現を 1 とした時の相対値を示した。(\*  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  vs. Control)

## (2) 微弱電流処理による血管透過性亢進の誘起の検証:

モデル高分子として FITC 標識デキストラン (平均分子量 10,000) を発育鶏卵に静脈内投与後、30 分または 60 分間微弱電流処理 (0.34 mA/cm<sup>2</sup>) を施し、その 24 時間後の FITC 標識デキストランの血管外への移行を評価した。その結果、微弱電流処理時間に依存して蛍光値の増大が認められ、60 分行った際には微弱電流処理なしと比較して約 2 倍の蛍光値が得られた。このことから、微弱電流処理によって血管の組織生理が変化し、血管透過性の亢進を誘起できることが示唆された。微弱電流を利用した血管開口のシステムをラット脳梗塞モデルへ適用することで、脳微小循環制御、BBB 開口によるリポソーム送達に関する検討を今後進めていきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Fukuta T, Yoshimi S, Tanaka T, Kogure K. Leukocyte-mimetic liposomes possessing leukocyte membrane proteins pass through inflamed endothelial cell layer by regulating intercellular junctions., *Int. J. Pharm.*, 563, 314-323 (2019). DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.027. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1) 福田達也, 吉見真太郎, 小暮健太郎. 炎症血管バリアの突破を目指した白血球模倣リポソームの構築. 日本薬学会第 34 年会, 2019 年 5 月 (富山)
- 2) 福田達也, 小暮健太郎. 脳梗塞部位の血液脳関門突破を目指した白血球模倣ナノ粒子の開発. 日本膜学会第 41 年会, 2019 年 5 月 (東京) (招待講演, 生体膜シンポジウム)
- 3) 福田達也, 小暮健太郎. 脳梗塞部位の血液脳関門の能動的突破を目指した DDS 開発. 日本薬学会第 139 年会, 2019 年 3 月 (千葉) (招待講演, 一般シンポジウム S21)
- 4) 福田達也, 虎尾 祐, 三村美夕紀, 大島康史, 中谷奈津, 田中 保, 小暮健太郎. 微弱電流による特殊なエンドサイトーシスを利用した高分子送達の機構解析. 第 18 回遺伝子・デリバリー研究会第 18 回夏期セミナー, 2018 年 7 月 (小倉)
- 5) Fukuta T, Yoshimi S, Tanaka T, Kogure K. Development of leukocyte-mimetic liposomes by intermembrane protein transfer to overcome inflamed endothelial barrier. 遺伝子・デリバリー研究会第 19 回シンポジウム, 2018 年 7 月 (小倉)
- 6) 福田達也, 田中 保, 小暮健太郎. 脂質膜間移行現象を利用したリポソームへの白血球様機能の付与. 日本膜学会第 40 年会, 2018 年 5 月 (東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。