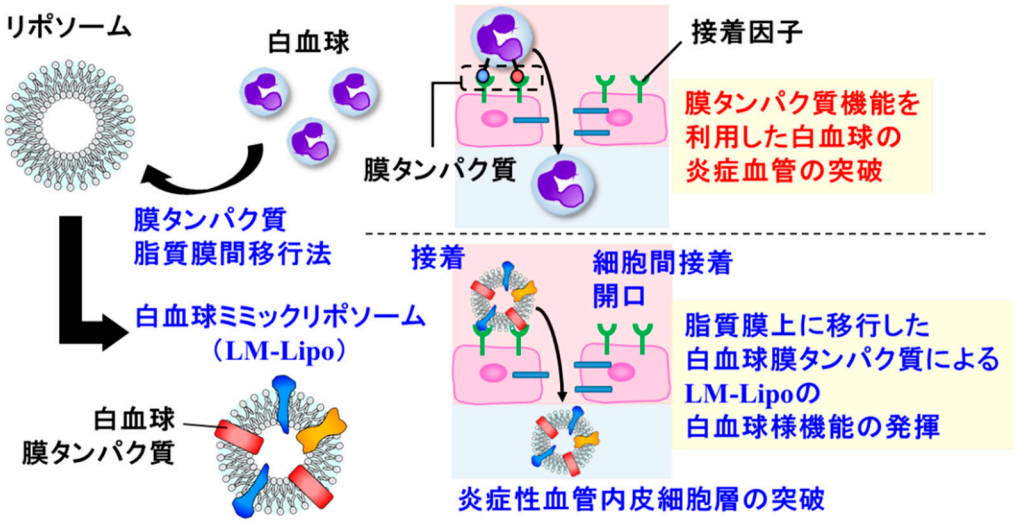
200　脳血管へ接着し脳実質へ浸潤する白血球模倣ナノDDS	福田　達也

【目的】我々はこれまでに、脳梗塞部位にて生じる血液脳関門（BBB）の透過性亢進を利用することで、ナノサイズのリポソームを用いた脳実質への受動的な薬物送達が、脳梗塞からの血流再開後に生じる二次的な障害、脳虚血／再灌流障害の治療に有効であることを報告してきた。しかしリポソームの、BBB に生じた血管間隙突破と脳実質への移行には時間的制限が存在し、患部への薬物送達効率を向上させるためには、脳梗塞部位の BBB を能動的に突破可能な技術が求められる。ところが血液中を循環する白血球は、リポソームが脳実質へ移行できない条件下においても、膜タンパク質機能を利用して炎症性の BBB へ接着し透過することができる。そこで本研究では、リポソーム膜へ白血球膜タンパク質を搭載することで、白血球のように炎症血管、さらには脳梗塞部位の BBB を能動的に突破可能な白血球ミミックリポソーム（Leukocyte-mimetic liposome：LM-Lipo）を構築することを目的とした。
【方法】リポソームへの白血球膜タンパク質の再構成法として、リポソームと細胞膜が一過的に部分融合した際に生じる脂質膜間移行法を用いた。白血球モデル細胞として好中球様に分化させた前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用い、リポソームへの膜タンパク質の移行をウエスタンブロッティングにて確認した。また、腫瘍壊死因子（TNF-α）で炎症処理したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用い、LM-Lipo の炎症血管内皮細胞に対する親和性を評価するとともに、トランズウェル上に形成した細胞層に対する透過性をそれぞれ評価した。また、LM-Lipo で処理した際の HUVEC 細胞骨格、および細胞間接着タンパク質に対する影響を、免疫蛍光染色および共焦点顕微鏡観察にて評価した。
【結果】リポソームと好中球様分化 HL-60 細胞を混合することにより、炎症血管に高発現する接着因子 ICAM-1 への結合性を有する白血球膜タンパク質 CD11a、CD11b のリポソーム膜への移行が確認された。また、TNF-α処理により ICAM-1 発現を誘導した HUVEC へ LM-Lipo を添加したところ、通常のリポソームと比較して有意に高い親和性を示した。さらに、トランズウェル上に形成した炎症血管内皮層に対して蛍光標識 LM-Lipo を添加したところ、対照群と比較して高い透過性を示した。メカニズム解析の結果、LM-Lipo により HUVEC のアクチン骨格の変化と、細胞間接着タンパク質である VE カドヘリンの有意な発現減少が認められた。以上より、リポソーム膜上の白血球膜タンパク質の機能により細胞間接着が変化し、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。

白血球ミミックリポソームによる白血球機能の模倣と炎症血管内皮細胞層の突破



200. 脳血管へ接着し脳実質へ浸潤する白血球模倣ナノ DDS

福田　達也

徳島大学 大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野

Key words：リポソーム，白血球，膜タンパク質脂質膜間移行，炎症血管内皮細胞，細胞間接着

緒　言

脳梗塞は、死因別死亡率、および要介護に至る原因疾患の上位である脳血管障害の約 6 割を占め、世界的にも克服が望まれているものの、有効な治療法が乏しい。脳への薬物送達においては、物質移行を厳密に制御している血液脳関門（Blood-brain barrier：BBB）が最大の障壁となる。我々はこれまでに、脳梗塞時の特徴的な病態である BBB の透過性亢進を利用することで、ナノサイズのリポソームによる薬物送達が可能であること、そして脳梗塞からの血流再開後に生じる脳虚血／再灌流障害の治療に有効であることを報告してきた［1］。しかし、リポソームの、BBB に生じた血管間隙突破と脳実質への移行は、虚血/再灌流後 6 時間程度の早期に限られるという時間的制限が存在する［2］。そのため、患部への薬物送達効率を向上させるためには、脳梗塞部位の BBB を能動的に突破可能な技術が求められる。一方で、血液中を循環し炎症部位への浸潤能を有する白血球は、リポソームが脳実質へ移行できない条件下においても、膜タンパク質機能を利用して脳梗塞部位の BBB へ接着し、透過することができる。そこで、リポソーム膜へ白血球膜タンパク質を搭載することで、白血球機能を模倣し、炎症血管、さらには脳梗塞部位の BBB を能動的に突破可能な白血球ミミックリポソーム（Leukocyte-mimetic liposome：LM-Lipo）を構築できるのではないかと考えた。本研究では、リポソーム膜へ細胞膜タンパク質を活性・配向性を保持したまま簡便に再構成可能な脂質膜間移行法［3］を利用することで LM-Lipo を構築し、LM-Lipo の機能性を炎症血管、また *in vitro* BBB モデルを用いた培養細胞系において評価したため、報告する［4，5］。

方　法

1.　脂質膜間移行法によるリポソームへの膜タンパク質移行の評価

白血球モデルとして、All-trans retinoic acid（ATRA）にて好中球様細胞に分化させたヒト前骨髄性白血病細胞 HL-60 を用いた。リポソームの構成脂質としては、卵黄ホスファチジルコリン（EPC）、ジセチルリン酸（DCP）、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、ジミリストイルホスファチジルコリン（DMPC）を使用し、EPC／DCP（モル比 7／3）、EPC／DCP／DOPE（モル比 3.5／3／3.5）、DMPC／DCP（モル比 7／3）、DMPC／DCP／DOPE（モル比 3.5／3／3.5）でそれぞれ構成されたリポソームを単純水和法にて調製した。脂質膜間移行法により膜タンパク質をリポソームへ移行させるため、各リポソームを HL-60 細胞と 90 分間 37℃で振盪インキュベートした。回収したリポソームを遠心分離（2,000 g、1 min）し、この操作を 5 回繰り返した。リポソームを濃縮するために、超遠心分離（112,500 g、60 min、4℃）を行い、得られたリポソームサンプルへの膜タンパク質の移行を Western Blotting にて観察した。

2.　炎症血管内皮細胞への白血球ミミックリポソーム（LM-Lipo）の親和性・透過性評価

炎症血管内皮細胞モデルとして、腫瘍壊死因子（TNF-α）で処理したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用いた。$DiIC_{18}$で蛍光標識を施した LM-Lipo（EPC／DCP／DOPE = 3.5／3／3.5 モル比）を TNF-α（10 ng/mL）で 16 時間処理し、接着因子 ICAM-1 の発現させた HUVEC に添加し、3 時間インキュベートした。細胞を洗浄し、DAPI による核染色を行った後、共焦点顕微鏡観察により LM-Lipo の炎症処理 HUVEC への取り込みを評価した。蛍光を定量する場合には、界面活性剤にて細胞を溶解し、溶解液の蛍光をマイクロプレートリーダーにて測定することで行った。

炎症血管内皮細胞層に対する LM-Lipo の透過性を評価する際には、HUVEC をトランズウェルプレート上に播種し 48 時間インキュベートすることで細胞層を形成させた。そして、TNF-α（10 ng/mL、16 h）処理後に、上層に蛍光標識 LM-Lipo を添加し、その 3 時間後の下層メディウム中の蛍光を測定することで、リポソームの透過性を評価した。

3. 細胞骨格、および細胞間接着に対する LM-Lipo 処理の影響評価

HUVEC（35-mm glass-bottom dish）に対して、LM-Lipo を 3 時間処理した後に細胞を固定し、アクチン骨格、および細胞間接着タンパク質である Vascular-endothelial（VE）カドヘリンに対する蛍光免疫染色を行い、共焦点顕微鏡観察を行った。

結果および考察

1. 脂質膜間移行法によるリポソームへの白血球膜タンパク質の移行

各リポソームと好中球様分化 HL-60 を振盪インキュベートすることにより、炎症血管に高発現する接着因子 ICAM-1 への結合性を有する白血球膜タンパク質 CD11a、CD11b のリポソーム膜への移行が確認された。またその移行性は、リポソーム膜へ相分離を生じさせる DCP、および膜融合性脂質として汎用される DOPE を含有するリポソームにおいて高い傾向にあった。DCP を構成脂質とすることでリポソーム膜に相分離が生じ、脂質膜間移行法による膜タンパク質の移行は相分離状態にあるリポソームにおいて効率が良いことが報告されている［6］。DOPE によりタンパク質の移行性が向上することについて、詳細は明らかにできていないが、膜タンパク質の受け手側であるリポソームの膜物性が DOPE を含有させることで細胞からのタンパク質移行に有利な状態となったと考察している。

2. 炎症血管内皮細胞への LM-Lipo の親和性・透過性

LM-Lipo を炎症処理 HUVEC に対し添加し、3 時間インキュベート後に共焦点顕微鏡観察を行ったところ、未処理のリポソームと比較して LM-Lipo 添加群において高い蛍光が観察された（図 1A、B）。また、DMPC で構成されたリポソームと比較して、EPC で構成された LM-Lipo においてより高い蛍光が観察されたことから、以降の検討では EPC で構成された LM-Lipo を用いた。次に、LM-Lipo 添加 3 時間後の細胞を溶解し、蛍光を定量した結果、LM-Lipo 添加群は未処理 HUVEC と比較し、TNF-α処理 HUVEC に対して有意に高い親和性を発揮した（図 1C）。

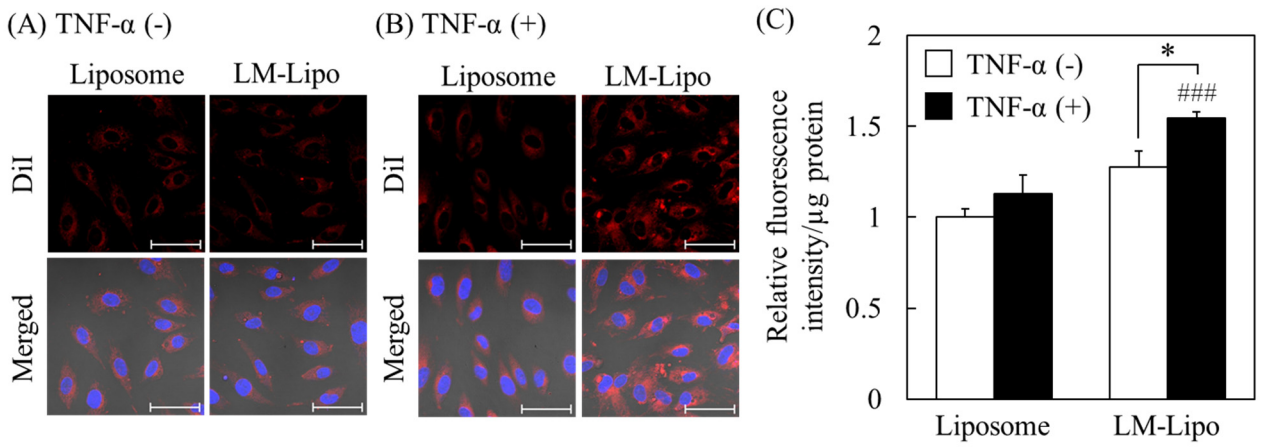


図 1. LM-Lipo の炎症性血管内皮細胞に対する取り込み・親和性評価

A, B) TNF-α未処理（A）および処理（B）HUVEC に対して、LM-Lipo を添加した 3 時間後の細胞内取り込みの共焦点顕微鏡画像。DiI（リポソーム）、および重ね合わせ画像（赤：リポソーム、青：細胞核、および明視野）。スケールバー：50μm。

C) LM-Lipo 添加 3 時間後における HUVEC に対する親和性評価。$^{*}P < 0.05$、$^{\#\#\#}P < 0.001$ vs. Liposome（TNF-α（−））。ANOVA with the Tukey post-hoc test。

さらに、トランズウェル上に炎症処理 HUVEC 層を形成させ、LM-Lipo の炎症血管透過性を評価したところ、分化 HL-60 と脂質膜間移行処理させた LM-Lipo は対照群と比較して高い透過性を示した。このことから、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、リポソームが炎症血管内皮細胞に対する接着性・透過性を示したことが示唆された。また、*in vitro* BBB モデルとして広く用いられているヒト脳血管内皮細胞株 hCMEC/D3 に対して同様に TNF-α による炎症刺激を加え、LM-Lipo の接着、および細胞内取り込みを評価したところ、通常のリポソームと比較して有意に高い親和性、および細胞内移行性を示すという結果を得ている（未発表データ）。今後更なる検討が必要であるが、LM-Lipo が炎症性 BBB に対しても高い透過性を示す可能性が期待される。

3. LM-Lipo による炎症性血管内皮細胞の細胞間接着への影響

白血球が炎症血管に接着し透過する際には、細胞骨格の変形および細胞間接着の開口が誘起されることが報告されている［7］。本知見に基づき、TNF-α処理 HUVEC に対して LM-Lipo を添加した際の細胞骨格と細胞間接着への影響について評価した。その結果、未処理 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、より鋭い形状をしている様子が観察された。さらに、VE カドヘリンの発現変化を観察したところ、未処理の HUVEC、また TNF-α処理し通常のリポソームを添加した群では VE カドヘリンによる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、画像解析による定量からその発現量が有意に減少した（図 2）。以上の結果から、リポソーム膜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 が白血球のように炎症血管内皮細胞層を突破したことが示唆された。

今後、脳血管内皮細胞や脳梗塞モデルを用いた検討を進めることで、白血球ミミックリポソーム LM-Lipo の更なる機能性を実証し、最終的な目標である脳梗塞部位の BBB を能動的に突破可能な DDS の開発を達成したい。

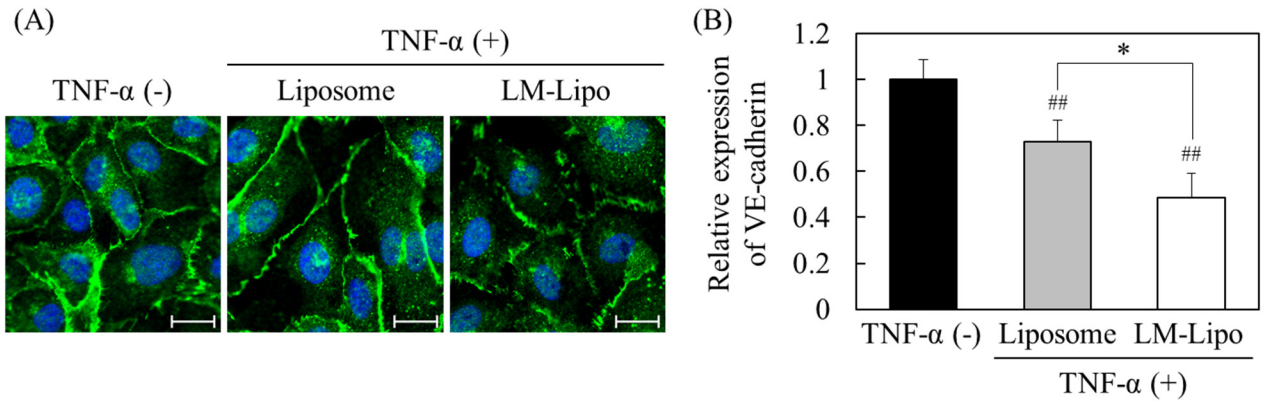


図 2. LM-Lipo による炎症血管内皮細胞の細胞間接着タンパク質発現への影響

A) TNF-α未処理（左）および TNF-α処理 HUVEC に対して、リポソーム（中央）および LM-Lipo（右）を添加した 3 時間後の VE カドヘリンタンパク質発現の共焦点顕微鏡画像。緑：VE カドヘリン（Alexa488）、青：細胞核（DAPI）。スケールバー：20 μm。

B) 画像解析ソフト ImageJ による VE カドヘリンの発現量の定量解析。* P ＜0.05、## P ＜0.001 vs. TNF-α（−）。ANOVA with the Tukey post-hoc test。

謝　辞

本研究は、徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）衛生薬学分野にて行われたものである。

文　献

1) Fukuta T, Ishii T, Asai T, Oku N. Applications of liposomal drug delivery systems to develop neuroprotective agents for the treatment of ischemic stroke. Biol Pharm Bull. 2019;42(3):319-326. PMID: 30828062 DOI: 10.1248/bpb.b18-00683.

2) Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N. Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. J Control Release. 2012 May 30;160(1):81-87. PMID: 22342472 DOI: 10.1016/j.jconrel.2012.02.004

3) Huestis WH, Newton AC. Intermembrane protein transfer, band 3, the erythrocyte anion transporter, transfers in native orientation from human red blood cells into the bilayer of phospholipid vesicles. J Biol Chem. 1986 Dec 5;261(34):16274-16278. PMID: 3782118

4) 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. 2019 May 30;563:314-323. Epub 2019 Apr 10. PMID: 30978483 DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.027

5) Fukuta T, Kogure K. Development of leukocyte-mimetic nanoparticles to overcome the blood-brain barrier in the region of ischemic stroke. MEMBRANE. 2019;44(5):217-221 DOI: https://doi.org/10.5360/membrane.44.217

6) Kogure K, Okuda O, Nakamura C, Hayashi K, Ueno M. Effects of incorporation of various amphililes into recipient liposome membranes on inter-membrane protein transfer. Chem Pharm Bull. 1999 Aug;47(8):1117-1120. PMID: 10478466 DOI: 10.1248/cpb.47.1117

7) Vestweber D. How leukocyte cross the vascular endothelium. Nat Rev Immunol. 2015 Nov;15(11):692-704. PMID: 26471775 DOI: 10.1038/nri3908