

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：脳梗塞に対する幹細胞治療を代替する機能性リポソーム製剤の研究開発
Development of liposomal drug that substitutes stem cell therapy for stroke

研究開発実施期間：令和3年10月20日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：神谷 厚輝
Koki Kamiya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人群馬大学 大学院理工学府分子科学部門 助教
Division of Molecular Science, Graduate School of Science and Technology,
Gunma University, Assistant Professor

II 研究開発の概要

幹細胞を使った再生医療では、その臨床的治療効果が続々と報告されている。研究開発分担者(田口)は、重症脳梗塞患者に対して自己造血幹細胞移植の臨床試験を行ない、その治療効果を示すとともに(田口ら Stem Cells Dev. 2015)、造血幹細胞による再生医療の作用機序が、幹細胞投与直後の膜タンパク質間のシンプルなシステムで生じ、移植後の長期生存や分化が不要であることを、世界に先駆けて報告した(田口ら Stroke 2020)。そこで細胞を用いなくて、脳梗塞に対する幹細胞治療を代替できる機能性リポソーム製剤の構築を目指した。

研究開発代表者の神谷が機能性リポソームを作製するにあたって、リポソームのサイズ、膜タンパク質の量、細胞標的物質の有無、リポソームの内水相に封入する物質及び濃度といったパラメータを振り、脳梗塞に対する幹細胞治療を代替できる機能性リポソーム製剤の最適条件を導きだすことを目的とした。そして、神谷が作製した機能性リポソームの *in vitro* での生理活性評価と *in vivo* での治療効果を研究開発分担者の田口が実施する。そして、得られた結果を神谷にフィードバックし、より機能化する機能性リポソームの作製を目指した。

リン脂質組成の違いによる無細胞タンパク質発現系で発現させた膜タンパク質のリポソーム再構成量の違い

リポソーム共存下で無細胞タンパク質発現系で膜タンパク質を発現させると、膜タンパク質がリポソーム膜内へ再構成される。この現象を利用し、目的の膜タンパク質をリポソームに再構成を検討した。リポソーム再構成されていない膜タンパク質を除去するために、ショ糖密度勾配遠心を行い、リポソームを回収して SDS-

PAGE によって膜タンパク質の存在を確認した。リン脂質の電荷の違いから生じるリポソームの表面電位の違いで、リポソームに再構成される膜タンパク質の量が異なることを明らかにした。さらに、いくつかの形状の異なる膜タンパク質で同様の実験を行ったところ、ターゲットにしている膜タンパク質と同様にリポソームの表面電位の違いで、リポソームに再構成される膜タンパク質の量が異なった。したがって、リポソームのリン脂質組成を変化させることで、膜タンパク質をリポソーム上に濃縮できることを明らかにした。膜タンパク質は、シグナル伝達、物質輸送、エネルギー変換等に重要な役割を果たしている。したがって、様々な膜タンパク質をリポソームに再構成できれば、新規ドラッグデリバリーシステムやセンサ等に役立つ。また、細胞接着を促進する物質をリポソーム表面に導入することにも成功している。

さらに、ナノサイズリポソームとマイクロサイズリポソームにおける細胞への物質輸送能の差異を確認するため、マイクロサイズリポソームに安定的に無細胞タンパク質発現溶液と小分子を封入できる方法を確立した。37℃でインキュベートしても、マイクロサイズリポソームは形状を保っていた。これによって、血管内皮細胞への蛍光色素等の輸送実験に活用できる。マイクロサイズリポソームは、近年、細胞模倣モデル(人工細胞モデル)のテンプレートとして活用されている。したがって、今回確立した無細胞タンパク質発現溶液を封入したマイクロサイズリポソームによって、複雑な生命現象の再現や、細胞を凌駕するような人工細胞モデルの構築が期待される。

作製した機能性リポソームの *in vitro* での生理活性評価と *in vivo* における動態

血管内皮細胞の細胞質内に輸送されたカルセイン量を FACS で定量した。用意したリポソームは、カルセインが封入されたナノサイズリポソームとマイクロサイズリポソームで、膜タンパク質の有無である。ナノサイズリポソームでは、膜タンパク質の有無に関わらず、細胞質内にカルセインが輸送された。一方、マイクロサイズリポソームでは、膜タンパク質が存在する場合のみに細胞質内にカルセインの蛍光が観察された。以上の結果より、ナノサイズリポソームはエンドサイトーシスがメインで、細胞質内にカルセインが導入された。一方、マイクロサイズリポソームは、リポソーム上に存在する膜タンパク質が作用して、細胞質内にカルセインが導入されたと推測される。マイクロサイズリポソームの細胞播種濃度は、ナノサイズリポソームの細胞播種濃度に比べ低濃度にも関わらず、マイクロサイズリポソームの方が膜タンパク質の有無による細胞質へのカルセイン量の比が大きかった。したがって、マイクロサイズリポソームを高濃度に細胞へ播種することで、ナノサイズリポソームに匹敵する量の細胞内のカルセインが導入できる可能性が示唆された。しかし、現在のところ、マイクロサイズリポソームをナノサイズリポソームのような高濃度で作製するには、高濃度なマイクロサイズリポソームを作製できる新たな作製法の開発が必要である。また、負電荷リン脂質や正電荷リン脂質を含んだリポソームにターゲット膜タンパク質を無細胞タンパク質発現系でナノサイズリポソームへ発現させ、血管内皮細胞の細胞質内に輸送されたカルセイン量を定量した。さらに、細胞接着を促進する物質をリポソーム表面に導入したナノサイズリポソームにおける血管内皮細胞の細胞質内に輸送させたカルセイン量を定量した。その結果、細胞接着を促進する物質の有り無しで、血管内皮細胞内のカルセイン量に変化はなかった。したがって、リポソーム表面に導入する細胞接着を促進する物質の濃度を増加させる必要がある。

同時に血管新生を促すタンパク質の取込み挙動促進の観察を行った。内容物の濃度や膜タンパク質の有り無しによって、血管新生を促すタンパク質の取込みが変化した。したがって、内容物の濃度等を詳細に検討することで、目指す機能性リポソームが完成すると考える。さらに、機能性リポソームを脳梗塞モデルマウスに播種し、脳梗塞領域と非梗塞領域におけるリポソーム由来の血管内皮細胞への蛍光物質の輸送も観察した。

In regenerative medicine using stem cells, their clinical therapeutic effects have been reported. Taguchi conducted a clinical trial of autologous hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe cerebral infarction and demonstrated its therapeutic effect (Taguchi et al. Stem Cells Dev. 2015) and reported that the mechanism of action of regenerative medicine using hematopoietic stem cells occurs in a simple system between membrane proteins immediately after stem cell administration and does not require long-term survival or differentiation after transplantation (Taguchi et al. Stroke 2020). Therefore, we aimed to construct a functional liposome preparation that can replace stem cell therapy for stroke without using cells.

In the preparation of functional liposomes, Kamiya, the Principal Investigator of the project, set parameters such as liposome size, amount of membrane proteins, presence of cell-targeting substances, and substances and concentrations in the inner aqueous phase of liposomes, to derive optimal conditions for a functional liposome formulation that can replace stem cell therapy for cerebral infarction. The objective of the study was to determine the optimal conditions for a functional liposome formulation that could replace stem cell therapy for stroke. Then, Taguchi, who is in charge of research and development, will evaluate the *in vitro* bioactivity and *in vivo* therapeutic effects of the functional liposomes prepared by Kamiya. The obtained results were then fed back to Kamiya to create more functionalized functional liposomes.

Differences in Liposome Reconstitution of Membrane Proteins Expressed in a Cell-Free Protein Expression System Due to Differences in Phospholipid Composition

When membrane proteins are expressed in a cell-free protein expression system in the presence of liposomes, they are reconstituted into liposome membranes. Using this phenomenon, we investigated the reconstitution of target membrane proteins into liposomes. To remove membrane proteins that were not reconstituted into liposomes, sucrose density gradient centrifugation was performed, liposomes were collected, and the presence of membrane proteins was confirmed by SDS-PAGE. We found that the amount of membrane proteins reconstituted into liposomes varied with the surface potential of the liposomes resulting from differences in the charge of the phospholipids. Furthermore, we performed similar experiments with several membrane proteins of different shapes and found that the amount of membrane proteins reconstituted into liposomes differed depending on the surface potential of the liposomes as well as the targeted membrane proteins. Thus, we found that membrane proteins can be enriched on liposomes by changing the phospholipid composition of the liposomes.

Evaluation of *in vitro* bioactivity and *in vivo* kinetics of functional liposomes

The amount of calcein transported into the cytoplasm of vascular endothelial cells was quantified by FACS. The liposomes prepared were calcein-encapsulated nano-sized liposomes and micro-sized liposomes with or without membrane proteins. In the nano-sized liposomes, calcein was transported into the cytoplasm with or without membrane proteins. In contrast, in micro-sized liposomes, calcein fluorescence was observed in the cytoplasm only when membrane proteins were present. These results indicate that endocytosis was the main process for nanosized liposomes, and calcein was introduced into the cytoplasm. On the other hand, the micro-sized liposomes are assumed to have introduced calcein into the cytoplasm by the action of membrane proteins on the liposomes. Target membrane proteins were expressed into nano-sized liposomes by a cell-free protein expression system in liposomes containing negatively or positively charged phospholipids, and the amount of calcein transported into the cytoplasm of vascular endothelial cells was quantified. In addition, the amount of calcein transported into the cytoplasm of vascular endothelial cells was quantified in nano-sized liposomes in which a substance that promotes cell adhesion was introduced onto the liposome surface. The amount of calcein transported into the cytoplasm of

vascular endothelial cells was not affected by the presence or absence of the cell adhesion-promoting substance. Therefore, it is necessary to increase the concentration of substances that promote cell adhesion introduced into the liposome surface.

We conducted observations to promote the uptake behavior of proteins that induce angiogenesis. The uptake of these angiogenic proteins varied depending on the concentration of the contents and the presence or absence of membrane proteins. Therefore, we believe that by examining the concentration of the contents in detail, we can complete the functional liposomes we aim for. Furthermore, we seeded functional liposomes in a mouse model of cerebral infarction and observed the transport of fluorescent substances from the liposomes to the vascular endothelial cells in both the infarcted and non-infarcted regions