

エンドソーム環境での DDS 構築を目的とした
pH 応答性脂質膜カプセルの設計及び特性評価

日大生産工 (院)

○橋本 純一

日大生産工

柏田 歩・松田 清美

1. 緒言

近年、薬物送達システム (DDS) 開発に関する研究において標的細胞選択的な薬物キャリアーの設計が盛んに行われている。中でもリン脂質二分子膜小胞であるリポソームは、他のキャリアーよりも高い生体適合性を有しており¹⁾、内水相に封入する物質を選ばないことから DDS キャリアーとしての汎用性は非常に高い¹⁾。しかし、リポソームを構成する二分子膜構造は比較的安定であるため標的選択的な DDS を構築するためには、標的細胞周囲で膜を不安定化させ、封入物質の溶出を制御する必要がある。

一方で西洋ミツバチ毒由来の膜貫通ペプチド Mellitin は、疎水性 α -ヘリックスを形成しながら細胞膜に侵入し、細胞膜の局所的な不安定化に大きく寄与している²⁾。Mellitin による細胞膜への侵入には疎水性 α -ヘリックス領域に加えて膜界面と相互作用を示す正電荷領域が重要な役割を果たしている。Killian らは、Mellitin モデルとしての人工ペプチド WALP を設計合成し、脂質膜との相互作用について検討を行った結果、Mellitin と同様に α -ヘリックスを形成しながら膜内に侵入することを示している³⁾。

そこで本研究では、キャリアーとしてのリポソームに膜貫通ペプチドの特性を付与することにより、標的細胞周囲で二分子膜構造を不安定化し、内包した薬物を放出できるような新規 DDS の構築を目的とする。はじめに、Mellitin および WALP の配列を基に疎水性 α -ヘリックス領域と、正電荷を持つ Litic Polypeptide (LP) の設計および合成を行った。また、細胞内エンドソーム環境での弱酸性条件における選択的な膜

貫通を目的として、8, 10, 12 残基目のロイシン (L) をグルタミン酸 (E) に置換した、pH 応答性 LP (LPE) も設計、合成した (Table 1)。本報告では、基礎研究として、LP とリポソームとの相互作用について検討するため、血中 pH と同様の pH 7.4 において、薬物と見立てた蛍光物質であるカルセイン封入りポソームに LP を混合した際のカルセイン溶出挙動により評価したので報告する。

Table 1 Amino acid sequences of mellitin and membrane litic polypeptides designed in this study

Mellitin	H ₂ N-GIGAVLKVLT ¹⁰ TGLPALISWI ²⁰ KRKROQ-CONH ₂
LP	H ₂ N-GWWLALALAL ¹⁰ ALALALASWI ²⁰ KRKROQ-CONH ₂
LPE	H ₂ N-GWWLALAEAE ¹⁰ AELALALASWI ²⁰ KRKROQ-CONH ₂

— Hydrophobic α -helical Segment

2. 実験操作

2-1 Litic Polypeptide の (LP・LPE) の合成
固相合成用樹脂として link-amide resin を用い、Fmoc 固相合成法によって行った。なお、ペプチド結合の形成を促進するため HOBt・HBTU 活性化法を用いて C 末端側より合成を行い、目的のペプチドを伸長した。

2-2 リポソームの合成

卵黄 phosphatidylcholine (Egg PC) を、0.06 M のカルセイン溶液 (0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4)) に溶解し、バンガム法により多重層リポソームを形成した後、凍結融解法により単層リポソームを得た。さらに、エクストルーダーを用いてリポソームサイズを 100 nm に均一化し、ゲルろ過クロマトグラフィーによってカルセイン封入りポソームを分画した。

Design and characterization of pH-responsive lipid membrane capsule

for constructing at DDS at endosomal environment.

Junichi HASHIMOTO, Ayumi KASHIWADA, and Kiyomi MATSUDA

2-3 カルセイン漏出実験

HITACHI F-2500 分光蛍光光度計を用いた蛍光スペクトル測定により、カルセイン漏出実験を行った。分画したカルセイン封入リポソーム溶液と 0.1 M Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に溶解した所定濃度の LP を混合し、30 秒ごとに励起波長 490 nm におけるカルセインの蛍光波長 520 nm の蛍光強度変化を追跡した。なお Fig. 1 には LP 添加によるリポソーム内包カルセイン漏出の実験の模式図を示す。

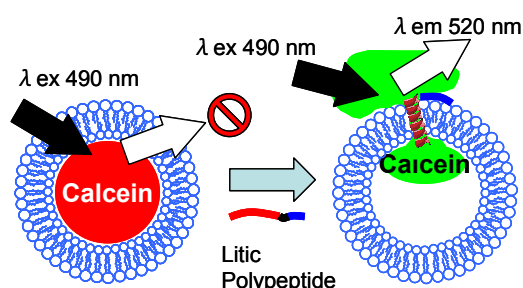


Fig. 1 Schematic illustration of the membrane lysis system by the use of designed litic polypeptides.

3. 結果と考察

Fig. 2 には pH 7.4 におけるカルセイン封入リポソームに対し、所定濃度の LP を添加した際のカルセイン漏出挙動を示している。LP 添加前にカルセイン漏出による蛍光強度の変化がないことを確認し、LP を添加後、蛍光強度の変化を追跡した。また、界面活性剤である Triton X-100 を用いてリポソームを完全に破壊し、漏出したカルセインの最大蛍光強度を測定することで相対蛍光強度比を算出した。

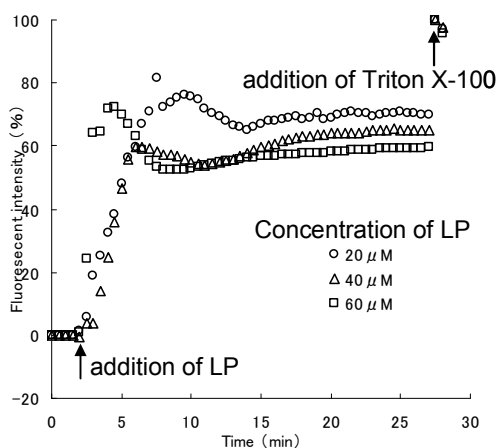


Fig. 2 Kinetic of peptide induced calcein leakage.

測定した各濃度において、LP を添加した直後から蛍光強度が増大する事が確認された。したがって LP は設計通りリポソームに侵入して内容物であるカルセインを漏出していることが示唆された。Triton X-100 を加えた際に、リポソームが完全に破壊したことで蛍光強度がさらに増大したことから、LP の相互作用は膜を破壊するものではなく、膜に細孔を形成したか、膜構造を揺らがすものであると考えられる。

4. 結言

今回設計および合成を行った LP は当初の目的通り、リポソームの脂質二分子膜と相互作用を示し、封入したカルセインを漏出させることが確認された。今後は、添加する LP の最適濃度の検討を行う。また、LP および LPE の反応特性を評価するため、pH 7.4 および pH 5.0 付近で同様のカルセイン漏出実験を行い、LP および LPE の比較検討を行う。また今回得た結果からは、LP およびリポソームとの相互作用は明確にできないため、CD スペクトル測定を用いた LP の二次構造解析や、光散乱法を用いたリポソームの形状やサイズ変化、粒子間相互作用の評価、および走査型プローブ顕微鏡を用いた観察が必要であると考えられる。さらに、設計および合成を行った LPE がキャリアーとなるリポソームにのみ反応を示すように、アミノ酸配列を再度改変する必要がある。

5. 参考文献

- 1) 「リポソーム応用の新展開」 p5-10
- 2) D, K, Hinch. ; J, H, Crowe. *Biochimica et biophysica Acta*, (1996), 1284, 162-170.
- 3) J, A, Killian. ; I, Salemin. ; M, R, G, dePlanque. ; Lindblom ; R, E, Koeppe II. ; D, V, Greathouse. *Biochemistry*, (1996), 35,1037-1045