

生体内模倣環境としての分子夾雑条件下における 標的選択型リポソーム膜融合挙動の評価

日大生産工(院) ○石井 陽 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

近年, 必要な場所に必要な量の薬物を必要な時間オーダーで送達する概念から構築された Drug Delivery System(DDS)に関する研究が盛んに行われている。代表的な DDS 担体であるリポソームはリン脂質により構成された脂質二重膜構造のベシクルである。そして, リポソームの内水相に親水性の薬物などを封入することができる。

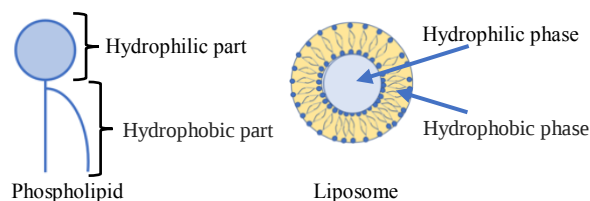


Fig. 1 Structural diagram of phospholipid and liposome.

DDS における細胞レベルでの薬物送達手段として, 担体であるリポソームを標的細胞に直接膜融合させる方法が考えられる。膜融合を利用することにより, 細胞膜の透過が困難な薬物や遺伝物質の送達が可能である。

われわれは, 腫瘍細胞に対して, 選択的に膜融合を誘発させる系の構築を目指し, 腫瘍細胞表面に高確率で発現する TF 抗原と同じ二糖構造 (Gal- β -1,3-GalNAc) を有する GM₁ Ganglioside (Brain, Ovine-Sodium Salt) (以下 GM₁) を導入した標的リポソームに対し, 二糖を選択的に認識するレセプター¹⁾を導入し

た担体リポソームとの間の選択的な膜融合挙動の評価を行ってきた。しかし, これまでの検討は *in vitro* 系であったことから, 本系を細胞レベルでの DDS へ展開させるためには, *in vivo* 系へ移行させる必要がある。*in vivo* 系では pH, 体積や粘度といった様々な要因が複雑に混在した環境であるため, *in vitro* 系で得られていた結果と異なる挙動を示すことが考えられる。そこで, *in vitro* 系に狙った生体内環境を模倣することができる分子を導入した分子夾雑系で膜融合系の評価を行うことを考えた。

本研究では, 第 1 の夾雑分子として, 血中などに依存する糖が合成レセプターの誤認識を引き起こすことを懸念し, グルコースを選択した。次に第 2 の夾雑分子として, 腫瘍細胞内に 10 mM で存在するグルタチオンが膜融合の際にその浸透圧によりリポソーム膜を崩壊することを懸念し, グルタチオンを選択した。さらに第 3 の夾雑分子として, 細胞内の粘性が膜融合の際に阻害因子となることを懸念し, 系の粘性を表現するために Polyethylene glycol(PEG)を選択した。

2. 実験

リポソーム調製のための 0.1 M Tris-HCl 緩衝液(pH 7.0)は 1 M Tris-HCl 緩衝溶液(pH 8.0)と 1 M 塩酸を用いて調製した。そして, 標的リポソームを得るために EggPC(L- α -phosphatidylcholine) を基本脂質として

Characterization of Target-selective Liposomal Membrane Fusion Behavior under Molecular Crowding Condition as in Biomimetic Environment

Akira ISHII, Ayumi KASHIWADA

EggPC に対して 5 mol% 相当の GM1 を共存させた混合脂質を用いて調製した。なお、膜融合の評価のために 1 mol% 相当の 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (以下 NBD) と 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (以下 Rh) も共存させた。(5 mM グルコース, 10 mM グルタチオン, 20 wt% PEG200) を含む緩衝液(pH 7.0) 中で水和後, 粒径 100 nm のサイズに調整されたリポソームを得た。一方, 担体リポソームは, EggPC を基本脂質として 5 mol% 相当のレセプターを共存させ, 標的リポソームと同様に調製した。そして, 得られた担体リポソームと標的リポソームを 1:1 で混合し, 蛍光測定装置 Fluorescence Spectrophotometer F-2500 を用いて, 標的リポソームと担体リポソームの構成脂質間の混合挙動を評価した。

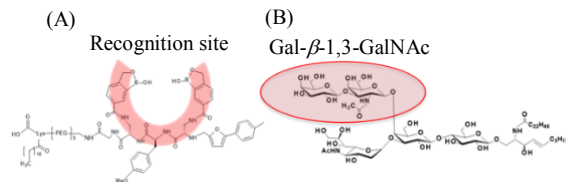


Fig. 2 Structure of synthetic receptor for TF antigen(A) and GM1(B).

3. 結果および考察

夾雑分子を含んだ系と夾雑分子を含まない系に関して, 標的に見立てた GM1 修飾リポソームと担体側に見立てたレセプター修飾リポソームの構成脂質間の混合挙動を NBD と Rh における蛍光エネルギー移動 (FRET) により評価した結果について Fig. 3 に示した。

血液中とほぼ同様の 5 mM のグルコース存在下において担体リポソームと標的リポソームを混合させたところ, グルコースの存在にもかかわらず, 膜融合に起因する脂質混

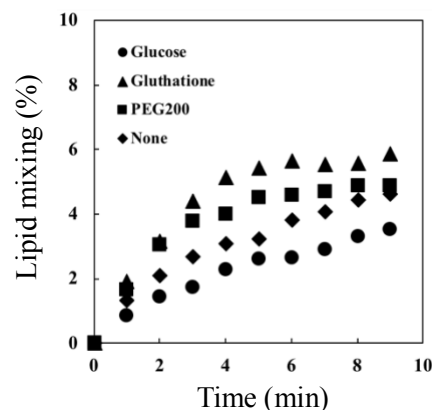


Fig. 3 Time courses of lipid mixing of carrier liposome and target liposome in the presence of molecular crowding agents (pH7.0).

合が確認された。また, 腫瘍細胞に相当する 10 mM のグルタチオン存在下および粘性の増加を考慮した 20 wt% の PEG200 存在下における系においても膜融合に起因する脂質混合が確認された。以上の結果より, 本研究において想定した夾雑分子が共存する系, すなわち, 血中に相当する糖濃度, 細胞内に高濃度で存在し, 浸透圧の変化, さらに系の粘性の増大, いずれの条件においても膜融合挙動が観測された。したがって, われわれの研究対象である標的選択型膜融合系は細胞レベルでも実現可能となると考えられ, さらなる検討を行うことにより, DDS への展開が期待される。

4. 参考文献

- 1) A. Pal, M. Berube, D. G. Hall *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 1492-1495.