

Fe₃O₄ ナノ粒子送達のためのリポソーム膜融合系の設計

日大生産工(院) ○長江 優樹 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

リポソームは疎水部と親水部とを併せ持つリン脂質からなる脂質二重膜により形成される小胞であり、膜を構成する疎水部だけではなく、膜内部に内水相が存在するため、その内水相を利用して水溶性の薬物や機能分子を封入することが可能である。(Fig. 1)

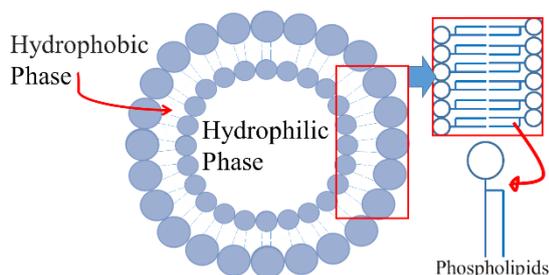


Fig. 1 Structural diagram of phospholipid and liposome.

さらに、リン脂質脚部との疎水性相互作用や表面での静電相互作用などを利用して、機能発現に寄与する分子を表層に導入することも可能である。

リポソームに人為的な操作を加えることにより、リポソーム間または細胞膜との間で膜融合を引き起こすことが可能であることから、膜融合を利用して、標的となる細胞への物質の送達や情報の伝達、交換などの機能付与が期待できる。

現在、医療分野において金属ナノ粒子を用いた診断や治療が注目されている。金属ナノ粒子を診断のためのバイオセンサーとして使用したり、金の持つ光熱変換を利用した温熱療法のように、金属の種類によって異なる特性を利用した治療法も存在する。そのなかでも、酸化鉄ナノ粒子を用いた研究が現在、盛んに行われている。酸化鉄ナノ粒子の持つ生体適合性と超常磁性が、医療目的の診断や治療に適しているためである。

酸化鉄ナノ粒子による診断や治療には核磁気共鳴画像法(MRI)の造影剤としての利用や、温熱療法、ナノ粒子に薬物を直接担持させて患部に送達する治療法などが存在する。

そこで、金属ナノ粒子をリポソームに担持させることによって、金属特性を有するリポソームの調製が可能であり、金属ナノ粒子担持リポソームを用いることにより、金属ナノ粒子単体で生体内に投与した場合に比べて、金属ナノ粒子の拡散を防ぐことができる。

本研究では金属ナノ粒子である Fe₃O₄ ナノ粒子を内封または吸着させた新規リポソームの設計および合成を行うとともに、標的細胞への効率的な送達を目的として、金属ナノ粒子を担持したリポソームに標的細胞認識機能を付与し、標的細胞膜成分への選択的認識および接触が可能となる系の設計を行った。

2. 実験

リポソームの調製のための 0.1 M Tris-塩酸緩衝液(pH 7.0)は 1 M Tris-塩酸緩衝液(pH 8.0)と 1 M 塩酸を用いて調製した。

L- α -phosphatidylcholine (以下 EggPC)を基本脂質とした直径約 100 nm のリポソームを調製した。一方のリポソームには蛍光色素である 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) で標識したうえ、がん細胞マーカーである TF 抗原特有の二糖と同様の Gal- β -1,3-GalNAc 構造を有する GM₁ Ganglioside (Brain, Ovine-Sodium Salt)(以下 GM1)(Fig. 2)を脂質全体の 5 mol% になるように共存させ、標的と見立てた。も

Design of Liposomal Membrane Fusion System for Fe₃O₄ Nanoparticles Delivery

Yuuki Nagae, Ayumi Kashiwada

う一方のリポソームには、D. G. Hall らが合成した、TF 抗原に対するレセプター分子¹⁾(Fig. 2)脂質全体の 5 mol% になるように共存させ、さらに平均粒径 10 nm の Fe₃O₄ ナノ粒子を封入あるいは吸着させ、担体とした。

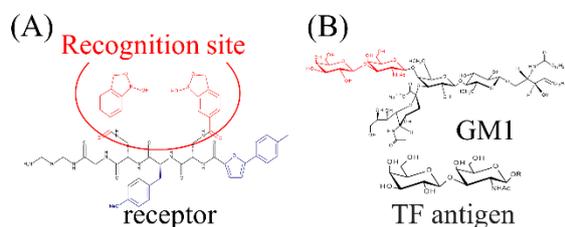


Fig. 2 Structures of synthetic receptor for TF antigen(A),GM1 and TF antigen(B).

そして、蛍光分析を用いた担体および標的リポソームの膜融合現象の確認を通して、Fe₃O₄ ナノ粒子の送達挙動を評価した。

3. 結果および考察

Fe₃O₄ ナノ粒子を担持した担体および標的リポソームとの界面での分子認識による膜融合挙動を FRET 挙動により評価した(Fig. 3)。

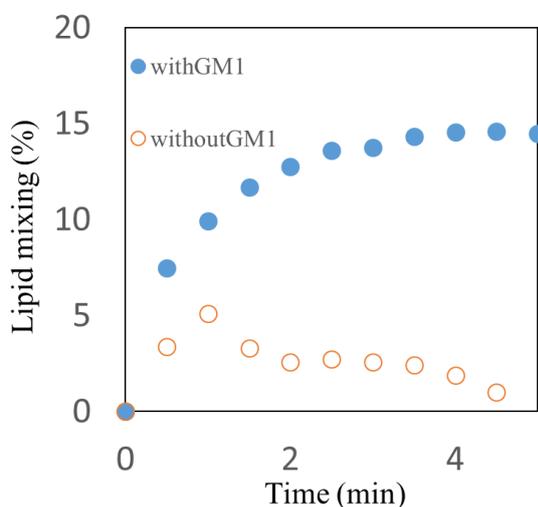


Fig. 3 GM1 selective membrane fusion behavior detected by FRET measurements.

FRET とは 2 種の蛍光色素の距離が近接した際に起こるエネルギー移動のことであり、膜融合を起こすと 2 種の蛍光色素の距離が離れ、エネルギー移動効率が変わることから、膜融合の評価に用いられる。

標的としての GM1 を含むリポソームとレセプターを含むリポソームを混合後、蛍光測定を行うことにより、融合挙動を確認し、さらに、GM1 を含まないリポソームとレセプターを含むリポソームとを混合した際の蛍光測定を比較実験として行った。

その結果、GM1 を含む系において、膜融合に伴う脂質混合を示す FRET 挙動の変化が顕著に確認できた。

さらに、磁場に応答した成分について蛍光スペクトルを測定したところ、NBD と Rh 由来のピークが顕著に認められた(Fig. 4)。

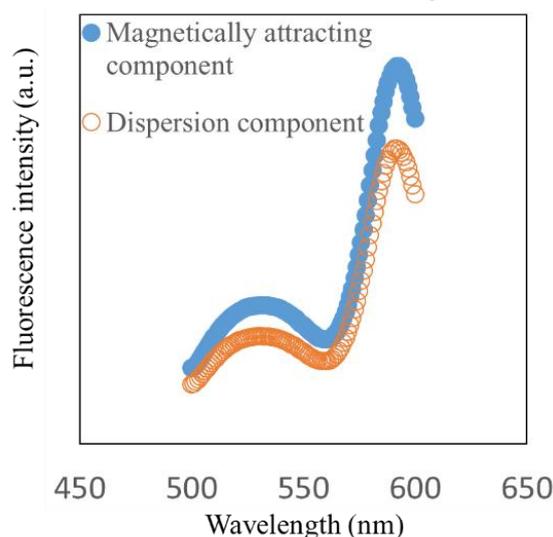


Fig. 4 Fluorescence spectra of magnetic containing liposomes after fusion with fluorophore-labeled liposomes.

本研究における結果は、担体リポソーム中に存在していた Fe₃O₄ ナノ粒子と標的リポソーム中に存在していた蛍光色素が共存していることを示しており、設計通り、担体リポソームと標的リポソームとの膜融合により、標的リポソームへの Fe₃O₄ ナノ粒子を送達が実現できたことを示している。本研究における結果は、診断や治療に有用な金属ナノ粒子を標的細胞へ送達する方法論を提供するにあたり、有用であると考えられる。

4. 参考文献

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