

リポソーム膜融合を利用した金属ナノ粒子送達系の設計

日大生産工(院) ○長江 優樹 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、内水相が存在するため、水溶性の薬物や機能分子を封入することが可能であり、疎水性の脂質二重膜やリポソーム表面の電荷を利用して、機能発現に寄与する分子をリポソーム膜内や表層に導入することも可能である。(Fig. 1)

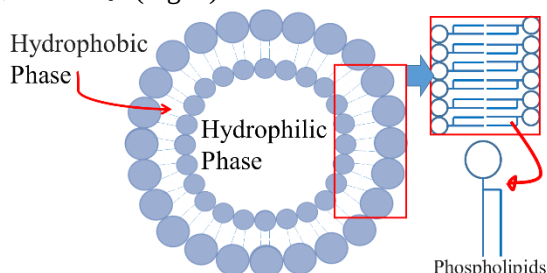


Fig. 1 Structural diagram of phospholipid and liposome.

リポソームに人為的な操作を加え、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、 Fe_3O_4 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ことから Fe_3O_4 ナノ粒子を用いた研究が現在、盛んに行われている。

Fe_3O_4 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、金属の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て生体内に送達することにより、金属ナノ粒子を生体内に直接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 Fe_3O_4 ナノ粒子を内封または吸着させた新規な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、 Fe_3O_4 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

リポソーム調製に用いた 0.1 M Tris-塩酸緩衝液(pH 7.0)は 1 M Tris-塩酸緩衝溶液(pH 8.0)と 1 M 塩酸を用いて調製した。

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DOPC), L- α -phosphatidylcholine(PC), L- α -phosphatidylglycerol(PG) 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine(DSPC) の 4 種のリン脂質を基本脂質とした直径約 100 nm の標的認識リポソームを調製した。標的認識リポソームには、TF 抗原に対するレセプター分子¹⁾ (Fig. 2) が構成脂質にに対し 5 mol% になるように共存させ、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。

標的リポソームには PC および腫瘍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、直径約 100 nm に調製し、標的と見立てた。

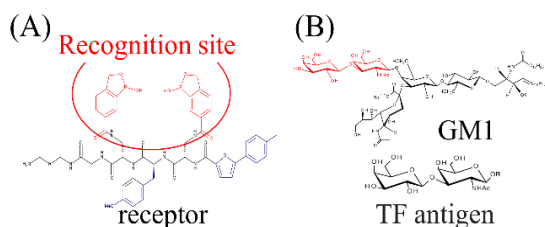


Fig. 2 Structures of synthetic receptor for TF antigen(A), GM1 and TF antigen(B).

調製した標的認識リポソームと標的リポソームを用いて、構成脂質の違いによる。膜融合挙動の違いを蛍光分析を用いて観察した。

次に DOPC または PC を基本脂質とした直径約 100 nm のリポソームを調製した。DOPC リポソームは TF 抗原に対するレセプター分子を脂質全体の 5 mol% になるように共存させ、さらに平均粒径 10 nm の Fe_3O_4 ナノ粒子を封入あるいは調製後のリポソームに Fe_3O_4 ナノ粒子を添加して吸着させ、担体リポソームとした。もう一方、PC リポソームには、蛍光色素である NBD と Rh で標識したうえ GM1 を脂質全体の 5 mol% になるように共存させ、標的リポソームと見立てた。

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や動的光散乱法(DLS)による粒径測定によって、 Fe_3O_4 ナノ粒子の送達挙動を評価した。

3. 結果および考察

リポソームを構成する基本脂質の違いによる膜融合挙動の変化を標的リポソーム中の NBD と Rh 間の蛍光エネルギー移動により評価した。

その結果、担体リポソームの基本脂質に DOPC と PC を用いた系では膜融合挙動が認められたが、PG と DSPC を用いた系では膜融合挙動が認められなかった。

次に Fe_3O_4 ナノ粒子を担持した担体リポソームを用いた際の膜融合挙動を評価した。

その結果、GM1 を含む標的リポソームに対して、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、融合後に磁場に応答した成分について DLS 測定を行った結果、調製時の 100 nm よりも大きな粒径、すなわち膜融合後のリポソームに相当する粒径が観測されたことから、 Fe_3O_4 ナノ粒子担持リポソームが標的認識を行い、膜融合を引き起したことが確認できた。(Fig. 3)

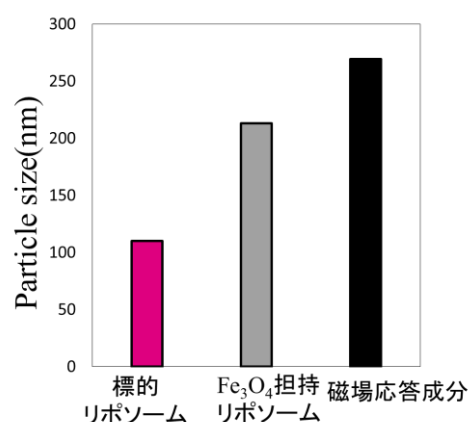


Fig. 3 Particle sizes of various liposomes.

以上の蛍光測定による結果から、 Fe_3O_4 ナノ粒子担持リポソームと標的リポソームが分子認識を駆動力とした膜融合を行っていることを確認し、DLS による結果から、磁場応答成分つまり、 Fe_3O_4 ナノ粒子担持リポソームが標的認識を行い、膜融合を行ったことが確認できた。これらの結果から設計通り、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 Fe_3O_4 ナノ粒子を送達が可能であることを示している。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.