

腫瘍細胞環境におけるリポソーム担体からの薬物放出制御を目的とした グルタチオン応答性膜透過ペプチドの設計

日大生産工(院) ○小野 元揮 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

薬物を目的の細胞や組織に対し、選択的に送達するための手段である Drug Delivery System (DDS)ではリポソームに代表される薬物担体が用いられている。リポソームは内水相に水溶性薬物を安定に担持可能であるが、リポソーム自体に薬物放出能がないことから、外部刺激に応答した薬物放出系の構築が期待される。本研究ではリポソームに内封された薬物の放出手段としてアルギニンに富む膜透過ペプチドの利用を考えた。

アルギニンに富む膜透過ペプチドは、様々な生理活性分子と複合体形成することにより、細胞内への送達を可能とする¹⁾²⁾。しかし、膜透過ペプチドの膜透過活性は、細胞レベルでの選択性に欠けるため、薬物担体と組み合わせての利用においては、副作用につながるものが懸念される。そこで、本研究では標的として腫瘍細胞に着目し、腫瘍細胞周囲に比較的高濃度(1-10 mM)で存在するグルタチオンに応答して、膜透過ペプチドが活性を示す系の設計を試みた。

本研究において、基本となる膜透過ペプチドは8残基のアルギニンからなるR8とし、リポソーム膜に対するR8の膜透過活性を評価した。さらに、グルタチオンに応答しR8が機能する系として、ジスルフィド結合を介して樹脂上に固定化されたR8を設計した。そして、グルタチオン存在下において系中に放出されたR8が、DDS担体と見立てたリポソームに対する相互作用を引き起こす可能性について評価する。

2 実験操作

2-1 ペプチドの合成

R8はFmoc-NH-SAL-MBHA Resinを使用したFmoc固相合成法によって合成した。またジスルフィド結合を介して樹脂上に固定化されたR8(Resin-G-SS-R8W)はBoc-Gly-PAM Resinを使

用したBoc固相合成法でBoc-Cystamine-Suc-OHを導入した後、Fmoc固相合成法でアルギニン(R)を伸長させた。また吸光度による定量的評価を行うためにトリプトファン(W)を末端に結合させた。

2-2 カルセイン内封リポソームの調製

卵黄由来のL- α -phosphatidylcholine (EggPC)の薄膜を60 mMカルセイン溶液(0.1 M Tris-HCl緩衝液(pH7.4)または、酢酸/酢酸ナトリウム緩衝液(pH5.0))で水和させ、多層リポソームを形成させた後、凍結融解法により単層リポソームを調製した。さらにエクストルーダーにより100 nmに均一化した。

2-3 蛍光強度変化によるカルセインの漏出挙動評価

リポソーム内封カルセインの漏出挙動を蛍光強度の経時変化により評価した。一定時間経過後、Triton X-100を加えリポソームを破壊した。リポソームからのカルセインの蛍光漏出率はTriton X-100を添加した際の蛍光強度に対する各測定時間の蛍光強度の百分率で算出した。

2-4 グルタチオン存在下における Resin-G-SS-R8W からの R8 の脱離

Resin-G-SS-R8W が分散した溶液に対し、10 μ M または 10 mM になるようにグルタチオン溶液を添加した際の R8 の脱離挙動をトリプトファンの吸光度測定により評価した。一定時間経過後、グルタチオンより強力な還元剤である TCEP(Tris (2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride)溶液を加え、吸光度測定を行った。

3 結果および考察

3-1 R8添加によるリポソーム内封カルセイン漏出挙動評価

カルセイン内封リポソームに対してR8を添加した際のカルセインの漏出挙動を Fig. 1 に示す。

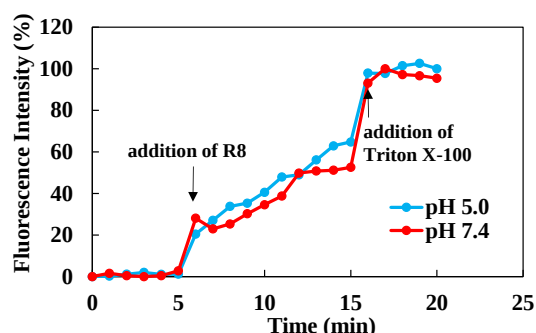


Fig. 1 Calcein leakage from 2 mM of Egg-PC liposomes after addition of 20 μ M of R8 (peptides : lipid = 1 : 100 (mole ratio)) at pH 7.4 and pH 5.0.

その結果、pH7.4 と pH5.0 いずれの条件においても、時間経過とともにカルセイン由来の蛍光の増大が認められた。このことは pH に依存することなしに R8 がリポソーム膜内へ侵入することにより脂質二重層が揺らぎ、内水相に封入されたカルセインの漏出をもたらしたことを示している。

3-2 グルタチオン存在下における Resin-G-SS-R8W からの R8 の脱離の挙動評価

腫瘍細胞周囲に高濃度で存在するグルタチオンにより、Resin-G-SS-R8W のジスルフィド結合の切断による R8 の脱離挙動を評価するために、Resin-G-SS-R8W を腫瘍細胞周囲に匹敵する 10 mM または正常細胞周囲に匹敵する 10 μ M グルタチオン溶液に浸漬した際の、R8 の標識としてのトリプトファン由来の吸光度の経時変化をそれぞれ Fig. 2 と Fig. 3 に示す。

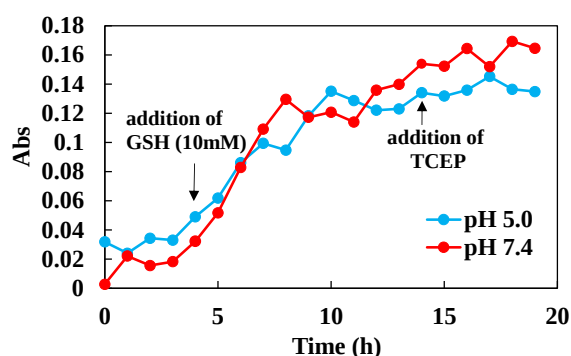


Fig. 2 Time course change in absorption of tryptophan from Resin-G-SS-R8W in the presence of 10 mM GSH at pH7.4 and pH5.0.

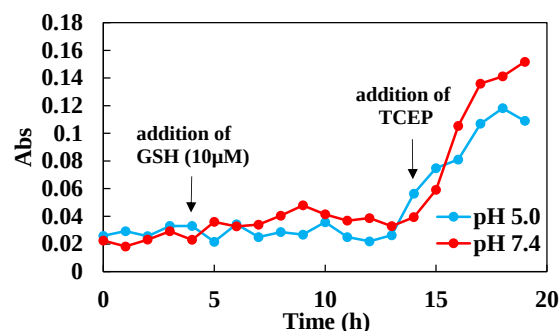


Fig. 3 Time course change in absorption of tryptophan from Resin-G-SS-R8W in the presence of 10 μ M GSH at pH7.4 and pH5.0.

その結果、高濃度(10 mM)グルタチオン存在下では、Fig. 2 に示したとおり、pH に依存することなく R8 の脱離を示すトリプトファンの吸光度の増加が顕著に認められた。

一方、Fig. 3 に示した低濃度(10 μ M)のグルタチオン存在下では、Resin-G-SS-R8W の R8 の脱離を示すトリプトファンの吸光度の経時的な増大は観測されなかった。これらの結果は、高濃度のグルタチオン存在下において選択的に Resin-G-SS-R8W のジスルフィド結合が切断することによる R8 の樹脂からの脱離を示している。

4 まとめ

本研究では、人工的に合成した膜透過ペプチド R8 のリポソーム膜透過活性を確認することができた。また、高濃度のグルタチオン存在下で Resin-G-SS-R8W からの R8 の脱離を実現できた。

今後は、グルタチオン存在下で Resin-G-SS-R8W から脱離した R8 による膜透過活性を評価する。

また、さらに選択性能を高めるために、pH7.4 から pH 酸性への変化に応答する系の構築について検討を行う。

参考文献

- 1) Stanzl, E. G.; Trantow, B. M.; Vargas, J. R.; Wender, P. A. *Acc. Chem. Res.* **2013**, *46*, 2944-2954.
- 2) Yan, X. X.; Li, S. R.; Qu, Y. C.; Wang, W. L.; Chen, B. G.; Liu, S. R.; Ma, X. J.; Yu, X. F. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 463-473.