

## 刺激応答性リポソームの膜融合活性を利用した薬物送達系の設計

日大生産工(院) ○渡辺 侯也 日大生産工 柏田 歩

## 1. 緒言

がんなどの疾病の治療には、薬物療法が広く用いられる。しかし、薬物療法では患部以外にも薬物が作用することによる副作用が懸念される。そこで、必要な薬物を目的の細胞や組織に対して選択的に送達し、副作用の低減を目指すための方法として薬物送達系 (Drug Delivery System : DDS) が注目されている。

DDSにおける代表的な送達担体として、リポソームが知られている。リポソームはリン脂質二重層で覆われた小胞であり、膜融合を用いた細胞内封物の細胞質に対する直接的な送達が可能となる。さらに、膜融合に生体内刺激応答性を付与することで、特定の細胞や組織に対し選択的に薬物を送達させることも可能である。実際に、リポソーム膜にpHに応答して正電荷を帯びるペプチドを混合させ、リポソーム外層表面の電荷を変化させ、静電相互作用を利用しリポソーム膜融合を誘発させる系<sup>1)</sup>が報告されている。

本研究において、膜融合を誘発するための脂質膜同士の接近要因として静電相互作用に注目した。カチオン性リポソームを調製し、細胞膜を想定したアニオン性リポソームに対して膜融合を誘発させることで、人工的な細胞への送達系を構築した。また、生体内刺激として、血中における pH条件とエンドソーム内における弱酸性 pH条件との違いを利用しエンドソーム膜に対して膜融合を誘発する系を想定して研究を行った。膜融合挙動は、リポソーム膜に励起波長の異なる2種類の蛍光色素を混合し、色素間のエネルギー移動現象である Förster/fluorescence resonance energy transfer (FRET)の変化により評価した。

## 2. 実験操作

## 2-1 カチオン性リポソームの調製

中性脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (以下 DOPC) とカチオン性脂質である 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt) (以下 EPC) を90 : 10 mol %で混合し薄膜を作成した。リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) とフタル酸カリウム緩衝溶液 (pH 5.0) でそれぞれ水和させ、多層リポソーム

を形成した後、凍結融解法により各pHの緩衝溶液を内封した単層リポソームを調製した。さらに、エクストルージョン法によりサイズを 100 nmに均一化した。

## 2-2 負電荷リポソームの調製

中性脂質である DOPC とアニオン性脂質である 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-*sn*-1-glycerol sodium salt, L- $\alpha$ -phosphatidyl-glycerol (Egg, Chicken) (sodium salt) (以下 EggPG) を90 : 10 mol %で混合し、そこに蛍光色素である 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) を0.25 mol %の割合で混合し薄膜を作成した。リン酸緩衝溶液 (pH 7.4) とフタル酸カリウム緩衝溶液 (pH 5.0) でそれぞれ水和させ、多層リポソームを形成した後、凍結融解法により各pHの緩衝溶液を内封した単層リポソームを調製した。さらに、エクストルージョン法によりサイズを100 nmに均一化した。

## 2-3 FRET蛍光測定を用いたNBD蛍光強度変化による融合率測定

異なる励起波長を有した2つの蛍光色素 (NBDとRh) を用いて、NBDの蛍光強度の経時変化によりFRET挙動を評価した。一定時間経過後、Triton X-100 を加え、リポソームを破壊した。リポソームの融合率は、Triton X-100 を添加した際のNBD蛍光強度から測定開始直後のNBD蛍光強度を引いた差分に対する各測定時間の蛍光強度から測定開始直後のNBD蛍光強度を引いた差分の百分率で算出した。

## 3. 結果および考察

## 3-1 FRET蛍光測定による蛍光強度の変化

アニオン性リポソームに混合した蛍光色素の測定開始直後 (融合率 0 %)の蛍光スペクトルと Triton X-100 を添加後 (融合率 100 %)の蛍光スペクトルの変化をFig. 1に示す。

Design of drug delivery system using membrane fusion activity of stimuli-responsive liposomes.

Matoya WATANABE and Ayumi KASHIWADA

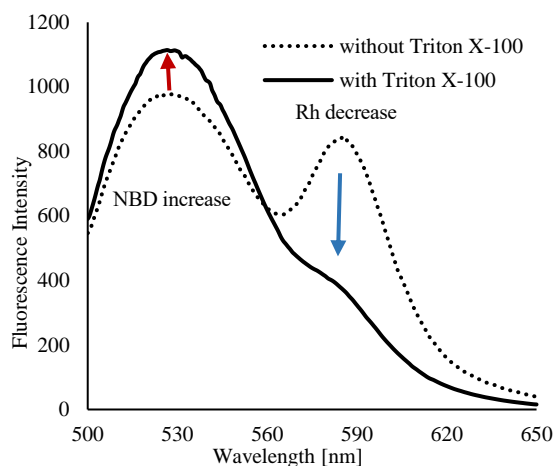


Fig. 1 Fluorescence emission spectra of NBD (ex 470 nm / em 520 nm) and Rh (ex 550 nm / em 590 nm) (excitation wavelength 470 nm.)

Triton X-100添加前の蛍光スペクトルと Triton X-100添加後の蛍光スペクトルでは、NBDの蛍光波長は増加し、Rhの蛍光強度は減少した。この結果から、Triton X-100添加によるリポソームの崩壊によりNBDとRhの間のFRETが解消されたことが分かる。また、FRETの成立はアニオン性リポソーム構成膜に混合していた色素間の距離が離れたことを示しており、調製したリポソーム間で膜融合が生じたと考えられる。

### 3-2 pH変化におけるNBD蛍光強度の増加量による膜融合に伴う脂質混合率の評価

異なるpH条件下 (血中条件下のpH 7.4と、エンドソーム内条件下のpH 5.0) での、膜融合に伴う脂質混合率の経時変化についてFig. 2に示す。その結果、pH 5.0における脂質混合率の増加を確認した。このことから、脂質膜に混合したカチオン性脂質にはpHの変化によるカチオン性の増大が示された。

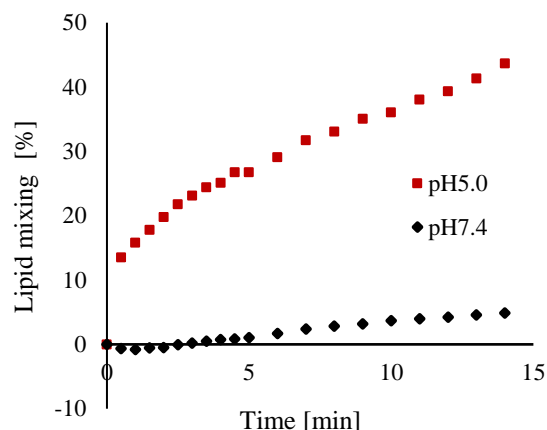


Fig. 2 Change over time in membrane fusion rate between cationic and anionic liposomes at pH 7.4 and 5.0.

実際に、カチオン性脂質であるEPCの構造 (Fig. 3)から、脂質混合率の増大について考察した。

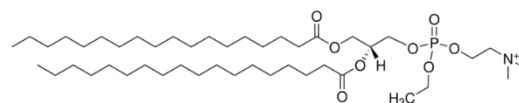


Fig. 3 Structure of 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine (EPC)

構造式から、EPCの末端アミンがリポソームのカチオン性に関連していると考えられる。末端アミノの酸解離定数 (pKa) は、構造の似ているトリメチルアミンのpKaを参考にすると、 $pKa \approx 9$ 程度と考えられる。今回の実験系で用いたpHはこのpKa値よりも低いことから、EPCは常にカチオン性であったと考えられる。このことから、酸性側であるpH 5.0条件下では、末端アミンがpH 7.4の条件下よりもカチオン性に偏ることが確認できた。膜融合において、末端アミンのカチオン性の増大は、脂質混合率の増大に寄与することを示した。

### 4. まとめと今後の展望

今回、静電相互作用による膜融合系の設計を行った。結果から、静電相互作用は、膜融合を誘発し脂質混合率の増大に寄与することが確認できた。しかし、今回の系では、リポソーム構成脂質を工夫したため、膜融合の際にリポソーム単体となっている。報告されている膜融合研究では、リポソーム表面にPEGなどを導入して、血中滞留時間なども考慮した研究が盛んに行われている。そこで、今後の展望として、リポソーム外層表面にpH変化に応答して電荷の変化する物質を導入し、導入物質を介した膜融合による内封薬物による治療と導入物質による治療も行える双方向性の膜融合DDSの構築について検討を行う。

### 参考文献

- 1) Hofmann, M.; Poschner, B.; Hauser, S.; Langosch, D. "pH-Activated Fusogenic Transmembrane LV-Peptides." *Biochemistry* **2007**, *46*, 4204-4209.
- 2) Pornpattananankul, D.; Olson, S.; Aryal, S.; Sartor, M.; Vecchio, K.; Zhang, L. "Stimuli-Responsive Liposome Fusion Mediated by Gold Nanoparticles." *ACS Nano* **2010**, *4*, 4, 1935-1942.