

標的細胞選択的な高分子薬物送達を目的としたリポソーム膜融合系の設計

日大生産工(院) ○石塚 美宇 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

近年、薬物を目的の細胞や組織に対し、選択的に送達する手段としてDrug Delivery System (DDS)に着目した研究・開発が盛んに行われている。この実現にはナノサイズの薬物輸送体の開発が重要である。腫瘍細胞の新生血管は不完全であり、血管内皮細胞に隙間が存在するため、正常の血管内皮を透過しない100 nm程度に調製された担体が、血管壁を抜けて組織や細胞に到達できる特性がある(EPR効果)。

DDSに用いられる代表的な担体として、リポソームがある。リポソームは細胞膜構成成分であるリン脂質から形成され、人為的に粒径の調整が可能な小胞であり、その内部に様々な分子を封入できる。そのため薬物担体としてEPR効果を利用可能な薬物担体として、リポソームを100 nm程度に調製することを考えた。

さらに、リポソームの表面を適切に修飾することにより、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となる。そこで、EPR効果を利用して標的細胞付近に到達させたリポソームと細胞膜との間の膜融合を利用して治療物質を細胞質内に送達し、化学療法の副作用低減と治療有効性の改善を実現できると考えた。

また、がん治療に用いられる製剤の一つにバイオ医薬品がある。バイオ医薬品とは、生物の持っている機能を応用したタンパク質を有効成分とした高分子の医薬品のことを指し、医薬品の分子量を指標に低分子医薬、中分子医薬、高分子医薬と分類される。その中でも高分子医薬品は、一般的に分子量数1000以上の分子群を指し、主にタンパク質、核酸、多糖やそれらの複合体、混合物からなる。高分子医薬品は従来の低分子医薬品では困難な標的への高い結合能や選択性を発揮するものが多く、温熱療法や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、医薬品候補としての高分子をリポソームに担持させることによって、単独で生体内に投与した場合に比べ、高分子薬の拡散を防ぐことが期待できる。

本研究では高分子を担持させた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いる。まず、リポ

ソームを標的細胞付近へ選択的に届けるために、初段階として静電相互作用を駆動力とした膜融合挙動の評価を行った。

2. 実験および測定方法

リポソーム調製のための緩衝液は、PBS緩衝溶液(pH 7.4)もしくはフタル酸水素カリウム緩衝溶液(pH 5.0)を用いた。それぞれの混合脂質は緩衝液で水和させ、多層リポソームを形成させた。その後、凍結融解により単層リポソームを調製し、エクストルーダーにより粒径100 nmのサイズに調整した。

2-1. カチオン性リポソームの調製

基本脂質にDOPC(1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine)を用いて、カチオン性脂質であるEPC(1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt))を12.9 mol%混合し、調製した。

2-2. アニオン性リポソームの調製

基本脂質DOPCに、14.3mol%のアニオン性脂質PG(L- α -phosphatidyl-dl-Glycerol (egg, chicken) (sodium salt))を混合し、上述のとおり調製した。なお膜融合の評価のために、0.25mol%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-phosphoethanol-amine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl (ammonium salt)) (以下Rh)も共存させた。

2-3. 蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定

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現象であり、リポソーム中に導入した2種の蛍光色素の距離が離れるとエネルギー移動効率が変化することから、膜融合の評価に用いられる。

3. 結果および考察**3-1. リポソーム混合における蛍光スペクトル変化**

カチオン性リポソームとアニオン性リポソームの脂質間の融合挙動を評価するにあたり、pH 7.4においてカチオン性リポソームとアニオン性リポソームを混合した直後と15分後の

Design of liposomal membrane fusion systems
for target cell-selective macromolecular drug delivery

Miu ISHITSUKA and Ayumi KASHIWADA

NBDとRhの蛍光強度を評価した結果をFig. 1に示す。なお、Fig. 1はアニオン性リポソームに導入した蛍光色素であるNBDの励起波長475 nmで励起時の蛍光スペクトルを示している。

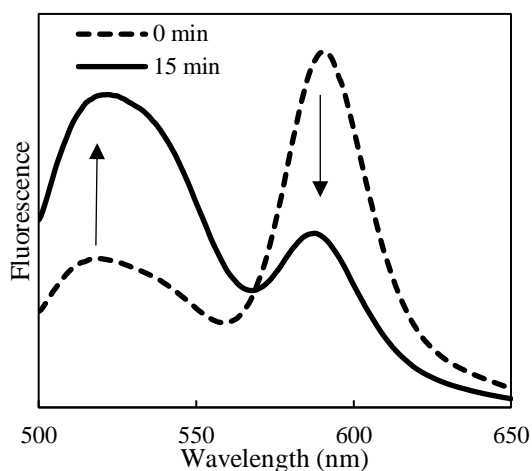


Fig. 1 Fluorescence spectra of an equal population mixture of the anionic liposomes and the cationic liposomes.

結果として、FRETの解消による520 nm付近のNBD蛍光強度の増大と590 nm付近でのRh蛍光強度の低下を確認した。この結果から、2種類のリポソームの脂質が混合した後に膜融合が生じていると考えられる。

3-2. 静電相互作用による膜融合

pH 7.4における、FRET測定結果に基づくリポソーム膜融合に伴う脂質混合率変化をFig. 2に示す。ここでは、アニオン性リポソームとカチオン性リポソームを1:1で混合した系と、カチオン性脂質2倍に調製したカチオン性リポソームを用いた系を比較した。

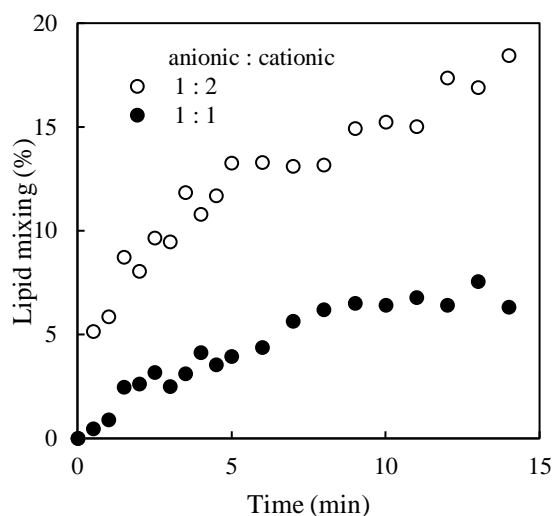


Fig. 2 Time course of changes in addition of lipid mixing the anionic liposomes and the cationic liposomes.

アニオン性リポソームとカチオン性リポソームを1:1で混合した系における融合率が4~6%であったが、カチオン性脂質を2倍にしたリポソームを用いた際の融合率が18%となった。この結果から、静電相互作用を駆動力とした融合が起きていると判断した。

3-3. pH変化における膜融合

標的細胞の環境下(pH 5.0)でリポソームに担持させた物質の放出を制御する目的で、pH 5.0とpH 7.4のそれぞれの条件下でのリポソーム膜融合に伴う脂質混合率変化についてFig. 3に示す。

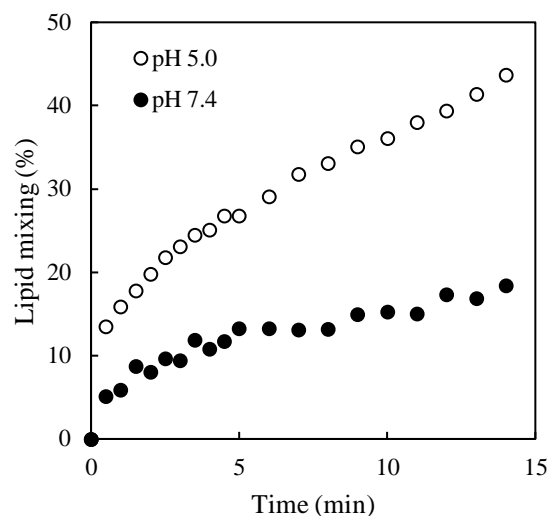


Fig. 3 Time course of changes in lipid mixing in addition of an equal population mixture of the anionic liposomes and the cationic liposomes at different pHs.

その結果、pH 5.0においてより顕著な脂質混合率の増大が認められた。これにより、pHに応答した膜融合挙動が示唆された。

4. 結言

本研究では、静電相互作用を駆動力としたリポソームの膜融合を確認することができた。また、調製したリポソームはpH変化に応答した融合率を示した。

今後は、標的細胞に対し治療効果のある高分子を担持させたリポソームの設計および合成とその評価に取り組む予定である。

参考文献

- 1) Pornpattananangkul, D.; Olson, S.; Aryal, S.; Sartor, M.; Huang, C.M.; Vecchio, K.; Zhang, L. "Stimuli-Responsive Liposome Fusion Mediated by Gold Nanoparticles" *ACS Nano* (2010) 4, 4, pp.1935–1942.