

薬物送達を目的とした弱酸性 pH 応答型リポソーム膜融合系の構築

日大生産工(院) ○渡辺 侯也 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

がん治療には、主に薬物療法が用いられるが、腫瘍細胞以外にも薬物が作用することによる副作用が問題となる。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。リポソームは細胞膜と同様のリン脂質二重層で覆われた小胞であり、細胞膜との膜融合により、リポソーム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、膜融合の条件として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する選択的な薬物送達が可能となる。実際に、リポソーム膜中にヒスチジン含有ペプチド (LVペプチド) を導入し、弱酸性pHによるヒスチジンのプロトン化に伴うリポソーム外層表面の電荷を変化による、静電相互作用を利用したリポソーム膜融合誘発系が報告されている。¹⁾

本研究においても、細胞膜とリポソーム膜間における膜融合を誘発する要因として静電相互作用に注目した。正電荷リポソームを調製し、細胞膜を想定した負電荷リポソームに対して膜融合を誘発させることで、膜融合を誘発する系の構築を行った。また、ヒスチジン含有ペプチドをリポソーム膜表面に導入するために、前段階として、リポソーム膜にヒスチジン含有ペプチドを固定化させることを想定した脂肪酸を導入リポソーム膜融合系の構築も行った。その際に、生体内刺激として血中における pH条件 (pH 7.4) とエンドソーム内における弱酸性 pH条件 (pH 5.0) との違いを利用しエンドソーム膜に対してのみ膜融合を誘発する系を想定した研究を行った。

2. 実験操作

2-1 正電荷リポソームの調製

正電荷リポソームは、中性脂質である 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (以下 DOPC) と正電荷を帯びる 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt) (以下 EPC) を 90 : 10 mol % で混合した薄膜を作成した。各薄膜はリン酸緩衝溶液 (以下 PBS) (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

負電荷リポソームは、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- α -phosphatidyl- glycerol (Egg, Chicken) (sodium salt) (以下 Egg PG) を 90 : 10 mol % で混合した薄膜と DOPC と負電荷を帯びる脂肪酸であるステアリン酸を 99.75 : 0.25 mol %²⁾ で混合した二種類の薄膜に、さらに、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phospho-ethanolamine-*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 % の割合で混合して二種類の薄膜を作成した。各薄膜を PBS (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現象を利用したNBD蛍光強度変化による脂質混合挙動の変化

異なる励起波長を有した2種類の蛍光色素 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。脂質混合率は、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 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の百分率で算出した。

2-4 sulfo rhodamine B 内封リポソームの調製

正電荷リポソームを作成する際の薄膜を、蛍光消光濃度以上 (20 mM) の sulfo rhodamine B 水溶液 (pH 7.4 及び pH 5.0) で水和させ、多層リポソームを形成した後、凍結融解法により各

pHのsulfo rhodamine B水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。

2-5 膜融合に伴う蛍光強度変化による内水相混合挙動の評価

リポソーム内水相混合率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。内水相混合率は、1日経過した際の蛍光強度から測定開始直後の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蛍光強度を引いた差分の百分率で算出した。また、内封水溶液の漏出に対する評価も行い、内水相の漏出率はTriton X-100を添加した際の蛍光強度から測定開始直後の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 異なるpHにおける膜融合に伴う脂質混合挙動の評価

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. 1に示す。

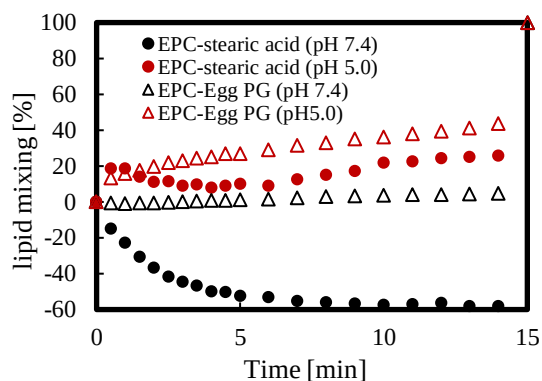


Fig. 1 Time course of membrane fusion in the presence of an equal amount of cationic and anionic liposomes at pH 7.4 and 5.0.

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、脂質膜に混合した正電荷脂質のpHの変化によるカチオン性の増大を確認した。また、ステアリン酸混合リポソーム膜においても同様の結果が得られたことから、ステアリン酸の膜内への導入とリポソーム構成脂質膜混合を確認した。

3-2 異なるpHにおける膜融合に伴う内水相混合挙動の評価

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、膜融合に伴う内水相混合率の経時変化についてFig. 2に示す。

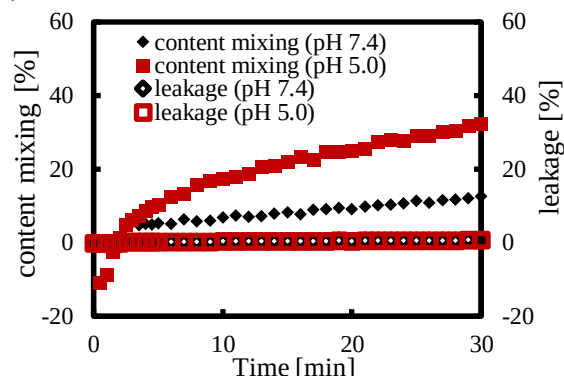


Fig. 2 Time course of content mixing in the presence of an equal amount of cationic and anionic liposomes at pH 7.4 and 5.0.

その結果、静電相互作用によって生じた膜融合に伴う内水相の混合を確認した。また、ない水槽の混合に関しても、pHの変化による正電荷脂質の正電荷の増大を確認した。膜融合による内水相水溶液の漏れに関しては確認されなかった。

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と内水相混合率の増大に寄与することが確認できた。また、脂肪酸導入リポソームにおいても、静電相互作用によるリポソーム間の接近と接触を確認することが出来た。今後の展望として、リポソーム外層表面に弱酸性pHに応答してプロトン化するヒスチジン含有ペプチドの合成と導入を検討している。膜融合による選択的な内封薬物の送達を行える膜融合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. *Biochemistry* **2007**, *46*, 4204-4209.
- 2) Versluis, F.; Voskuhl, J.; Kolck, B.; Zope, H.; Bremmer, M.; Albregtse, T.; Kros, A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 8057-8062.
- 3) Chen, W.; Huang, L. *Molecular Pharmaceutics* **2008**, *5*, 464-471.