

ヒスチジン誘導体を用いた弱酸性条件下におけるリポソームからの薬物放出挙動の制御

日大生産工(院) ○石塚 由依 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

日本人の死因の1位はがんであり、一生のうちのがんと診断される確率は男性女性ともに2人に1人と言われている。がんの主な治療方法として抗がん剤治療が知られているが抗がん剤はがん細胞（異常細胞）だけでなく正常細胞にも効果を及ぼし、強い副作用の原因となる。また、治療において抗がん剤を何度も投薬する必要があり、患者への大きな負担が問題となる。そこで、これらの問題を解決するために細胞レベルで選択的かつ効果的に薬物を送達する薬物送達系（Drug Delivery System：DDS）に関する研究が進められている。

DDS担体として用いられるリポソームはリン脂質二重層から構成される閉鎖小胞構造を有し、内水相に水溶性薬物を封入することが可能である。しかし、内封薬物を放出する能力を有さないことから、われわれは標的細胞に到達した後のpH変化により内封薬物が放出される系の設計を考えた¹⁾。

血中に投与した薬物封入リポソームは異常細胞に到達後、エンドサイトーシスを利用して、異物として認識され取り込まれる。そして、リポソームを取り込んだ異常細胞内で形成されたエンドソーム内のpHが5.0まで低下する。この条件でリポソームに封入した薬物を放出させるためにリポソームの脂質二重膜中にヒスチジン誘導体を導入することが有効であると考えた。ヒスチジンの側鎖のイミダゾール基のpKaは6.04であり、血中ではヒスチジンがプロトン化されずリポソーム膜中で安定に存在しているため内封している薬物は放出されない。一方、エンドソーム内の弱酸性条件下においてヒスチジンはプロトン化し、リポソーム膜を不安定化させ内封している薬物を異常細胞内に放出する。

本研究では、リポソームの脂質二重膜にヒスチジン誘導体を導入することを考えた。ヒスチジンは極性アミノ酸であり、炭素鎖を結合した誘導体を合成することにより脂質二重膜に導入することが可能となる。脂質二重膜の厚さを考慮し、ヒスチジン誘導体の炭素鎖長を8または12と決定し、ペプチド固相合成によってヒスチジンにオクタン酸またはラウリン酸を結合

した誘導体を得て、それぞれリポソームの脂質二重膜に導入し内封物の放出挙動の評価を行った。

2. 実験操作

2-1 pH 応答性ヒスチジン誘導体 (HisC8 と HisC12) の合成

本研究で用いた全ての誘導体は、Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin を用いた Fmoc 固相合成によりヒスチジンとオクタン酸またはラウリン酸を樹脂上で結合させ合成した。

2-2 カルボキシフルレセイン封入リポソームの調製

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) により形成した薄膜を 40 mM カルボキシフルオレセイン溶液 (pH13) で水和させ、多重層リポソームを形成させた後、凍結融解法によって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ってリポソームのサイズを 100 nm に均一化した。

2-3 リポソーム内水相に封入したカルボキシフルオレセインの放出挙動

リポソームの内水相に内封したカルボキシフルオレセインの外水相への放出挙動を分光光度計により評価した。各 pH (5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0) の緩衝液にリポソーム溶液を添加し、3 分までは 30 秒ごと、4 分からは 1 分ごとにカルボキシフルオレセインの励起波長 465 nm の蛍光強度を測定し、10 分経過後、Triton X-100 を加えリポソームの完全破壊を行った。カルボキシフルオレセインの放出率は Triton X-100 を添加した際の蛍光強度に対する各時間の蛍光強度を百分率で算出することにより決定した。

3. 結果および考察

3-1 pH 応答性ヒスチジン誘導体の設計

弱酸性条件下でリポソーム内封薬物の放出を実現するためにヒスチジンに注目した。そして、脂質二重膜中に導入するために、炭素鎖を

Design of liposome-encapsulated drug release system using weakly acidic pH-responsive histidine-modified agents derivatives

Yui ISHITSUKA and Ayumi KASHIWADA

結合した誘導体を合成した。ヒスチジン誘導体を導入した脂質二重膜は弱酸性条件下においてヒスチジンのプロトン化に伴う不安定化に繋がり、リポソーム内封物の放出が促進されたと考えた。

ペプチド固相合成により得た炭素鎖長 8 の誘導体を HisC8、炭素鎖長 12 の誘導体を HisC12 とし、ヒスチジン誘導体の炭素鎖長の違いによる放出率に対する影響を評価した。

3-2 pH 応答性ヒスチジン誘導体を導入したリポソームの放出率評価

血中における pH 条件下 (pH7.5) と異常細胞のエンドソーム内における弱酸性の pH 条件下 (pH5.5) において、ヒスチジン誘導体 (HisC8) を導入したカルボキシフルオレsein内封リポソームの経時変化のカルボキシフルオレseinの放出挙動を Fig. 1 に示す。

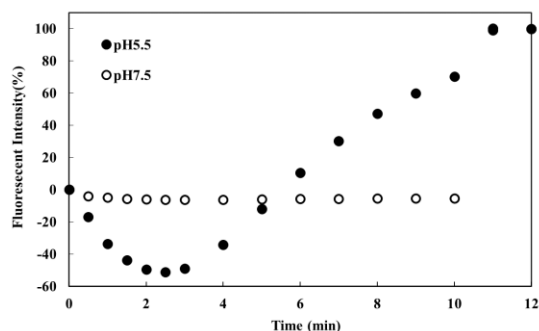


Fig. 1 Time course of Carboxyfluorescein release from HisC8 incorporated liposome at pHs 7.5 and 5.5.

リポソームに内封したカルボキシフルオレseinは pH5.5 において外水相への放出を経時的に示し、10 分経過時で約 70%の放出が確認できた。一方、血中内を想定した pH7.5 では 10 分経過時でも放出が確認できなかった。したがって、ヒスチジン誘導体のヒスチジンが弱酸性条件下でプロトン化されたことにより脂質二重膜が揺らぎ、内水相に内封されたカルボキシフルオレseinが外水相へ放出したことを示している。

また、ヒスチジン誘導体を HisC12 としてリポソームの脂質二重膜に導入した際のカルボキシフルオレseinの放出挙動を Fig. 2 に示す。

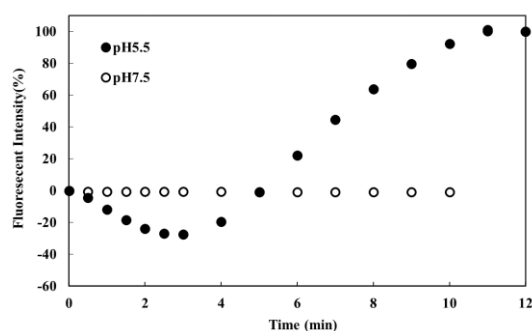


Fig. 2 Time course of Carboxyfluorescein release from HisC12 incorporated liposome at pHs 7.5 and 5.5.

リポソームに内封したカルボキシフルオレseinは pH5.5 において HisC8 導入リポソームと同様に蛍光強度の増大が認められたが 10 分経過時で約 92%の放出が確認でき、より顕著であった。

これら HisC8 と HisC12 を導入したリポソームにおいて弱酸性条件下でカルボキシフルオレseinの放出が確認でき、中性条件下では放出が確認できなかった。結果は、予想した pH 応答性を示していた、HisC12 において放出率が高い結果を得られ、リポソーム膜内に導入したヒスチジン誘導体の炭素鎖長の違いでプロトン化された際の膜の揺らぎの大きさに違いが出たと考えられる。

4. 結言

本研究では、リポソーム膜にヒスチジン誘導体を導入することによって pH 応答性を付与し、内封薬物を放出することを目的としていた。pH 応答性を付与するためにペプチド固相合成によりヒスチジン誘導体を得た。設計したどちらの誘導体においても pH 変化における膜透過活性の制御を確認することができた。そのため今後は、ヒスチジン誘導体の構造を変化させより良い pH 応答性ヒスチジン誘導体の設計を目指す。

参考文献

- 1) Hegh, D.Y.; Mackay, S.M.; Tan, E.W. *RSC Adv.* **2016**, *6*, 56859.