

弱酸性条件に応答するヒスチジン誘導体導入リポソームの設計と内封薬物放出挙動の評価

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、生涯のうちに約2人に1人ががんと診断されている。がんの治療法には手術療法、放射線療法、薬物療法などがあるが、その中でも抗がん剤を使用する薬物療法は多くの患者に適用される。しかし、細胞レベルでの治療において抗がん剤はがん細胞（異常細胞）のみならず正常細胞にも作用するため、重篤な副作用を引き起こすことが知られている。また、腫瘍の再発や進行に応じてがん細胞の増殖を抑えるために繰り返し投薬が必要となり、患者の生活の質（QOL）を著しく低下させる要因となっている。こうした問題を克服するために、抗がん剤などの薬物を標的組織や標的細胞にのみ効率的かつ選択的に送達することを可能にする薬物送達系（Drug Delivery System：DDS）に関する研究が進められている。DDSの利用により、投薬回数や投薬量を減少できるとともに、正常細胞に効果を与えないので副作用を抑えることが可能となる。

DDSには薬物を担持させるための担体を用いられる。その中で広く研究されている担体であるリポソームは、細胞膜と同様のリン脂質二重膜（リポソーム膜）から形成される閉鎖小胞であり、内水相に水溶性薬物を封入することが可能である。また、生体適合性や膜組成の自由度の高さなどの利点から、多くの基礎研究や臨床応用が進められている。特にがん化が進んだ腫瘍組織では血管透過性が高くリンパ排出が乏しいという特性（EPR効果：Enhanced Permeability and Retention effect）を利用することで、適切にサイズ調整したリポソームを用いた薬物送達において腫瘍組織への選択的集積が期待できる。一方、リポソームは標的部位に到達した後の薬物放出を能動的に制御する機能を有していないことから、がん細胞内環境に応答して薬物を放出できるスマートDDSキャリアの開発が求められている¹⁾。

血中に投与した薬物封入リポソームはEPR効果により腫瘍組織に集積し、がん細胞付近に到達後、エンドサイトーシスを利用して、異物として細胞内に取り込まれる。その後、リポソームがエンドソーム膜に覆われ、その内部のpHは5.0まで低下する。そこで、このpH変化に

応答してリポソーム担持薬物を放出させるためにリポソーム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付近で、中性条件下（血中環境）ではリポソーム膜中に安定に存在し、薬物放出を引き起こさないことが予想される。一方、弱酸性条件下（エンドソーム内環境）ではイミダゾール基がプロトン化し、ヒスチジン誘導体がリポソーム膜を不安定化させることで、内封薬物を放出させることができると考えられる。

本研究では、リポソーム膜に導入可能なヒスチジン誘導体を設計し、薬物モデルとしてリポソームに内封した蛍光色素の放出挙動を評価した。ヒスチジンをリポソーム膜に導入するために炭素鎖8（オクタン酸）および12（ラウリン酸）を結合させたヒスチジン誘導体をペプチド固相合成により得た。そして、リポソーム膜に導入し弱酸性条件下における内封物の放出挙動を評価し、炭素鎖長の違いがpH応答性に与える影響について検討した。

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

Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin を用いた Fmoc 固相合成によりヒスチジンと炭素鎖 8 のオクタン酸（C8）または炭素鎖 12 のラウリン酸（C12）を樹脂上で結合させ、誘導体を合成した（HisC8 および HisC12）。

2-2 カルボキシフルレセイン封入リポソームの調製

本実験では薬物モデルとしてカルボキシフルオレセイン（ナトリウム塩）を用いた。実験操作 2-1 で合成したヒスチジン誘導体と 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DOPC) をクロロホルム中で混合し、溶媒留去により形成した薄膜に 40 mM カルボキシフルオレセイン溶液（pH9.0 リン酸緩衝液）を加え、水和させて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

Design of weakly acidic pH sensitive histidine derivatives including liposomes and characterization of liposomal contents release behavior

Yui ISHITSUKA and Ayumi KASHIWADA

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、励起波長 465 nm におけるカルボキシフルオレセインの蛍光強度を経時的に測定し、15 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、リポソーム膜中に導入するために、ヒスチジンに疎水性の炭素鎖を結合した誘導体を設計・合成した。炭素鎖長は、膜への固定性と pH 応答性のバランスを考慮し、中程度の疎水性を有する炭素数 8 (オクタン酸) および膜に対してより高い親和性を示す炭素数 12 (ラウリン酸) を選定した。

ヒスチジン誘導体を導入したリポソーム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ると考えた。

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、それぞれリポソーム膜に導入してヒスチジン誘導体の炭素鎖長の違いによる内封物の放出挙動を評価した。

3-2 pH 応答性ヒスチジン誘導体 (HisC8 および HisC12) を導入したリポソームの放出率評価

血中を想定した中性条件下 (pH7.5) およびエンドソーム内を想定した弱酸性条件下 (pH5.5) において、ヒスチジン誘導体を導入したリポソームからのカルボキシフルオレセイン放出に伴う経時的な蛍光強度変化から、内封物放出挙動の pH 依存性を評価した。

HisC8 または HisC12 のヒスチジン誘導体導入リポソームにカルボキシフルオレセインを

内封し、血中を想定した pH7.5 およびエンドソーム内を想定した pH5.5 で放出挙動を評価した。その結果、pH5.5 において蛍光強度の経時的な上昇が確認され、カルボキシフルオレセインが外水相へ放出が確認できた。一方、pH7.5 では蛍光強度に大きな変化は認められず、内封物の放出は抑制されていた。したがって、弱酸性条件下でヒスチジン誘導体のイミダゾール基がプロトン化され、リポソーム膜の揺らぎを誘発したことにより、内水相に封入されたカルボキシフルオレセインが放出されたことを示唆している。これらの結果より、pH 変化にตอบสนองして薬物を放出するという本研究の設計概念と一致しており、ヒスチジン誘導体導入によるリポソームへの pH 応答性付与が実現できた。

HisC8 または HisC12 を導入したリポソームにおける放出実験の結果、いずれの試料においても弱酸性条件下 (pH5.5) でカルボキシフルオレセインの放出が確認され、中性条件下 (pH7.5) では放出が認められなかった。また、炭素鎖長の異なる誘導体の比較により、HisC12 を導入したリポソームの方が高い放出率を示した。これは、炭素鎖が長いことで膜内に導入したヒスチジン誘導体の揺らぎがより伝わりやすいためであると考えられる。予想した pH 応答性を示していた、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、内封薬物の放出を制御することを目的とした。ヒスチジン誘導体を固相法により合成し、リポソーム膜への導入を行った。その結果、設計したいずれの誘導体においても、pH 変化にตอบสนองした膜透過活性の制御を確認された。以上のことから、ヒスチジン誘導体の導入により pH 応答性リポソームを設計できることが示唆された。そのため今後は、ヒスチジン誘導体の導入比率を変化させ、膜安定性を損なわずに最適な pH 応答性を示す条件を検討する予定である。

参考文献

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