

pH 応答性ペプチドを用いたリポソーム膜融合挙動の制御

日大生産工(院) ○山岸 和弥 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

がん治療に広く用いられている薬物療法の問題点として、頻回投与が必要なことや、腫瘍細胞以外の正常な細胞にまで影響を及ぼし、強い副作用の原因となることなどが挙げられる。そこで、薬物を患部に対して選択的に作用させ、最小の副作用で最大の薬理効果を得るための薬物送達系 (Drug Delivery System : DDS) の利用が有効である。近年のDDS研究では、正常細胞と腫瘍細胞周辺の血管の孔の大きさが異なることを利用し、100 nm程度に調製された担体が腫瘍細胞に集積する生体現象 (EPR効果) の利用が注目されている。EPR効果を経て、腫瘍細胞周辺に集積した担体は、細胞膜との直接的な膜融合またはエンドサイトーシスを利用し、細胞質内に取り込ませることが可能となる。

EPR効果を利用した効果的な治療に期待される代表的な担体として、サイズ調整が容易なリポソームが挙げられる。リポソームは細胞膜と同様のリン脂質からなる脂質二重膜構造で構成された小胞であり、細胞膜とリポソーム間の膜融合により、リポソーム担持薬物の細胞質内への直接送達の展開が期待できる。しかし、細胞膜との直接的な膜融合は、EPR効果により、リポソームが腫瘍細胞周辺に集積される前に他の細胞に対して非特異的に膜融合を引き起こす可能性がある。そのため、EPR効果を経て、リポソーム担持薬物を確実に腫瘍細胞内に送達するためには、エンドサイトーシスの利用は効果的である。生体内では、血中 (pH 7.4) から、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた後に、形成されるエンドソーム内pHが5.0程度まで大きく低下する環境変化が見られる。このpHの違いに着目し、膜融合にpH応答性を付与することで、弱酸性条件下であるエンドソーム内でエンドソーム膜に対して膜融合能を発揮させることで、細胞質内へのリポソーム担持薬物の直接送達が可能となると考えた。しかし、細胞膜またはリポソーム膜を形成するリン脂質二重膜間には水和などによるエネルギー障壁があり、人工的に膜融合を促進させるためには駆動力が必要となる。

本研究では、リポソームが細胞膜に対して接近要因となるような駆動力を介した膜融合により、担持薬物を細胞質内へ直接送達する膜融

合系である。駆動力として、水溶液中で自発的に会合して二量体コイルドコイル構造を形成するpH応答性正電荷ペプチドを設計することで、細胞膜を模した負電荷表面を有するリポソームとの静電相互作用を介して接近、融合できると考えた。コイルドコイルペプチドの膜融合に対する駆動力としての有効性ととともに、弱酸性pHに応答して膜融合能を制御することで、腫瘍細胞に対するより選択的な膜融合系の構築が期待できる。膜融合挙動はリポソーム膜に導入した2種類の蛍光色素間における蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象の経時変化から評価した。

2. 実験操作

2-1 ペプチドの合成

本研究で用いたペプチドは、Fmoc 固相合成法によって合成した。活性化試薬として HBTU、HOBT・H₂O、DIEA を用い、Fmoc-NH-SAL-MBHA Resin 上で目的のアミノ酸配列を有するペプチドの合成を行った。

2-2 正電荷リポソームの調製

中性脂質である DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) を用いて、正電荷脂質である EPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-ethylphosphocholine (chloride salt)) を 5 mol%混合させ薄膜を作成した。薄膜はPBS緩衝液 (pH 7.4) もしくはフタル酸水素カリウム緩衝液 (pH 5.0) で水和させ、多層リポソームを形成後、溶結融解により単層リポソームを調製した。さらに、エクストルーダーにより約 100 nm の未標識リポソームを調製した。

2-3 負電荷リポソームの調製

中性脂質である DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) を用いて、負電荷脂質である PG (L- α -phosphatidyl-dl-glycerol (Egg, chicken) (sodium salt)) を 5 mol%混合させた。さらに膜融合評価のため、1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (ammonium salt) (NBD-PE) と

1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (RhB-PE) をそれぞれ 0.25 mol% 混合させ、薄膜を作成した。薄膜は PBS 緩衝液 (pH 7.4) もしくはフタル酸水素カリウム緩衝液 (pH 5.0) で水和させ、多層リポソームを形成後、溶結融解により単層リポソームを調製した。さらに、エクストルーダーにより約 100 nm の標識リポソームを調製した。

2-4 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) 現象による膜融合挙動評価

異なる励起波長を有した 2 種類の蛍光色素 NBD-PE と RhB-PE を用いて、NBD の蛍光強度の経時変化により、膜融合挙動を評価した。ドナー (NBD-PE) とアクセプター (RhB-PE) のエネルギー移動 (FRET) 現象は、リポソーム膜に導入した 2 種類の蛍光色素間におけるエネルギー移動効率が変化することにより、膜融合の評価に用いられる。膜融合率は、Triton X-100 を添加後の NBD 蛍光強度を最大値、測定開始直後の NBD 蛍光強度を最小値として、各時間の NBD 蛍光強度を百分率で算出した。

3. 結果および考察

3-1 FRET現象による蛍光スペクトル評価

リポソーム間の膜融合挙動の評価するにあたり、pH 5.0において標識リポソームと未標識リポソームの膜融合実験においての蛍光スペクトル変化をFig. 1に示す。

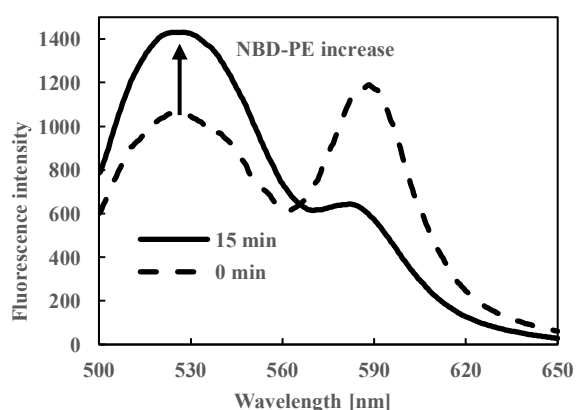


Fig. 1 Fluorescence spectra for evaluation liposomal membrane fusion by using FRET phenomena.

測定開始直後の蛍光スペクトルと15分経過時のTriton X-100添加後の蛍光スペクトルでは、520 nm付近のNBD-PEの蛍光強度の増大と590nm付近でRhB-PEの蛍光強度の低下が認め

られた。この結果から、標識化させた負電荷リポソーム表面でNBD-PEからRhB-PEへのFRET現象により、膜融合が生じていると考えられる。

3-2 ペプチドの設計

膜融合の駆動力として機能する二量体コイルドコイル構造を得るために設計、合成したペプチドとともに、pH応答性が期待されるペプチドを設計した。コイルドコイルは、疎水面と親水面が出現することにより、2本のらせんが自発的に会合し、その周りに電荷を有するアミノ酸を配置することで静電相互作用により会合を安定化させている。設計にあたり、二量体コイルドコイル構造形成モデルのアミノ酸配列を参考にして¹⁾、コイルドコイル形成時に疎水性コアを形成するLeu (L) を配置するとともに、リポソーム間の融合の際に、膜との接着面となる正電荷のArg (R) をコイルドコイル外面に配置した。また、pH応答性正電荷ペプチドについては、弱酸性条件下で融合を促進するために、膜との接着面にHis (H) を配置した。Arg (R) の側鎖pKaが約12.5に比べ、His (H) の側鎖pKaは約6.04であることから、His (H) を外面に配置することで、弱酸性条件下でのみコイルドコイルを引き金とする融合の促進が期待できる。実際に、コイルドコイル構造の形成は、pHの変化などの環境要因によって誘発され、ウイルスが細胞に侵入する際のエンドソーム内は弱酸性 (pH 5.0) に保たれており、このpHの低下が引き金となってウイルスの膜融合が起こることが知られている。²⁾

今後は、CDスペクトル測定によるペプチドの二次構造の確認を行う。また、2種類の設計および合成を行った正電荷ペプチドを、未標識負電荷リポソームと標識負電荷リポソーム間に添加した際の膜融合挙動をFRET現象により評価する予定である。

参考文献

- 1) Vagt, T.; Zschörnig, O.; Huster, D.; Koks, B. "Membrane Binding and Structure of De Novo Designed α -Helical Cationic Coiled-Coil-Forming Peptides." *ChemPhysChem* **2006**, 7, 1361-1371.
- 2) Wilson, I. A.; Skehel, J. J.; Wiley, D. C. "Structure of the influenza haemagglutinin complexed with a neutralizing antibody." *Nature* **1981**, 289, 366-373.