培養細胞増殖に対するリポソームの影響

吉岡史郎^{*1)}, 岡野幸雄・Fu Tao^{*2)}, 水上勇三^{*1)}, 野沢義則^{*2)}*Effects of liposomes on cultured cell growth*

We examined the effects of liposomal size, charge and cholesterol content on growth of NIH3T3 cells. Large doses of liposomes were found to inhibit the cell growth. Among the liposomes containing the charged compounds, stearylamine-containing liposomes completely inhibited cell growth at 100 μ M and were more potent in inhibition of cell growth than those with negative charged compounds. The cholesterol-rich and small unilamellar vesicles were more inhibitory for cell growth compared to the cholesterol-poor and multilamellar ones. The binding assay of liposomes with cells showed a good correlation with the degree of cell growth inhibition.

These results indicate that the direct effect of liposomes should be considered for analysis of the effectiveness of the drug-containing liposomes.

Shiro Yoshioka^{*1)}, Yukio Okano・Fu Tao^{*2)},Yuzo Mizukami^{*1)}, Yoshinori Nozawa^{*2)}

key words : liposomes, fibroblast, cell growth

リポソームの概念は、Bangham¹⁾らが脂質を水に分散することにより、脂質二重層の閉鎖小胞を形成することにはじまる。

リポソームを薬物担体として用いる方法は、Gregoriadis と Ryman²⁾により提唱されて以来、薬物封入リポソームの疾患治療を目的とした研究が多数報告されている³⁾。さらには、特定の組織・細胞に選択的に到達させるために、リポソーム表面を修飾したりリポソームの調製も検討されている^{4,5)}。

一方、リポソームそれ自体が、脂質組成によっては、細胞に変化を与えることが知られている⁶⁾。

表 1 probable net charge of liposomes

Egg PC : Chol : X (7 : 2 : 1 or 4 : 5 : 1)

X	abbreviation	net charge
dimyrstoyl phosphatidylglycerol	DMPG	—
phosphatidic acid	PA	—
cardiolipin	CL	—
phosphatidylserine	PS	—
stearylamine	SA	+
dicetyl phosphate	DCP	—

図 1 measurement of growth inhibitory effects of liposomes

そこで、本研究においては、脂質組成を異にするリポソームを用いて培養細胞の増殖に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

(1) 材料

細胞として継代培養線維芽細胞(NIH3T3)⁷⁾を用いた。主要リン脂質として卵黄ホスファチジルコリン(EggPC, Sigma 社)を用い、リポソーム膜安定化のためコレステロール(Chol, 半井化学)を加えた。荷電物質の種類を変えることにより、種々

^{*1)} Department of Hospital Pharmacy, Gifu University School of Medicine. 岐阜大学医学部附属病院薬剤部

^{*2)} Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine. 岐阜大学医学部生化学教室

図2 growth inhibitory effects of liposomes on NIH3T3 cells
final concentration of liposomal lipids in contact with cells vs. percentage of stained cells

Each point represents the mean of five experiments.

a : SUV. Egg PC : Chol : X (7 : 2 : 1, molar ratio)

b : SUV. Egg CP : Chol : X (4 : 5 : 1, molar ratio)

△ : DCP. ▲ : PA. × : PG. □ : SA. ■ : CL. ○ : Egg PC : Chol (a. 7 : 2, b. 4 : 5, molar ratio). ● : PS.

c : MLV. Egg PC : Chol : SA (□ : 4 : 5 : 1, ▨ : 7 : 2 : 1, molar ratio)

Egg PC : Chol : CL (■ : 4 : 5 : 1, ▩ : 7 : 2 : 1, molar ratio)

のリポソームを調製した。

荷電物質として、ジミリストイルホスファチジルグリセロール、ホスファチジン酸、ホスファチジルセリン、カルジオリピン、ステアリルアミン、ジセチルホスフェイト(すべて Sigma 社)の6種類を用いた。

(2) リポソームの調製

リポソームは、EggPC, Chol および荷電物質を、それぞれ7:2:1あるいは4:5:1のモル比で作製した。総脂質量10 μmolとし、生理食塩液1 mlを加え、超音波法でリポソームを調製した。small unilamellar vesicle(SUV)の調製には、2時間の超音波処理を行い、0.2 μm(メッシュサイズ, Millipore 社)のフィルターで濾過した。multilamellar vesicle(MLV)の調製は、超音波処理10分後に0.4 μm(メッシュサイズ, Millipore 社)のフィルターで3回濾過した。表1にリポソームの荷電を示した。

(3) NIH3T3 細胞の増殖阻害の測定

NIH3T3 細胞をダルベッコ変法イーグル培地(ニッスイ)に7.5%仔ウシ血清アルブミンを添加したもので培養した。3 × 10⁵細胞を96穴マイクロタイタープレートに植え、1晩、細胞をプレートに固着させた後、各種組成のリポソームを添加し5日間培養した。細胞増殖の測定は、図1の方法で行い、リポソーム無添加細胞の吸光度を100%として、リポソーム添加細胞の吸光度比であらわした。

(4) 細胞に対するリポソームの結合能の測定

NIH3T3 細胞(5 × 10⁴ cells/well)に、EggPC : Chol : 荷電物質 : [¹⁴C] トリパルミチン(7 : 2 : 1 : 0.5, モル比)の SUV リポソーム 100 μM を添加し、4°C 2時間インキュベートした。培養液と細胞を遠心分離した後、それぞれの放射活性を測定し、投与量に対する細胞結合性放射活性の割合を求めた。

結 果

(1) リポソームの粒径分布

リポソームの大きさは、電顕写真と光散乱光度計で測定した。SUV リポソームは、いずれの組成のリポソームにおいても粒径 80~100 nm であり、MLV リポソームでは粒径 200~400 nm の範囲を示した。

(2) 細胞増殖に対する影響

リポソームの NIH3T3 培養細胞に対する影響を検討した。細胞との相互作用として、70 μ M 以上の SUV リポソーム添加により、増殖阻害が観察された。図 2 a において、荷電物質のうちで、SA 含有リポソームがもっとも細胞増殖阻害効果が強く、100 μ M で 100%阻害を呈した。ついで負荷電物質のうちで、PS, DCP, および CL 含有リポソームは、300 μ M 以上で増殖抑制効果を示し、EggPC:Chol リポソーム、DMPG, PA 含有リポソームの抑制効果は弱く、1000 μ M 以上を必要とした。この増殖阻害効果は、Chol 含量に依存して増大した(図 2 b)。さらに、リポソームのサイズに関しては、MLV リポソームのほうが、SUV リポソームよりも増殖阻害効果が小さかった(図 2 c)。

(3) リポソームの細胞に対する結合能

各種組成のリポソームの細胞に対する結合能を検討した(表 2)。[14 C] トリパルミチン標識リポソームを用い、放射活性の変化を測定した結果、SA 含有リポソームは他のリポソームに比して、

表 2 binding of liposomes with NIH3T3 cells
Egg PC : Chol : X (7 : 2 : 1, molar ratio)

X	supernatant (%)	cells (%)
SA	94.95 $\pm$ 0.48*	5.05 $\pm$ 0.48*
PS	96.34 $\pm$ 0.36	3.66 $\pm$ 0.36
CL	96.45 $\pm$ 0.28	3.55 $\pm$ 0.28
DCP	96.99 $\pm$ 0.22	3.01 $\pm$ 0.22

Liposomes were composed of Egg PC : Chol : X : [14 C] tripalmitin (7 : 2 : 1 : 0.5, molar ratio). The cells were incubated with [14 C] tripalmitin-labeled liposomes for 2hrs at 4°C. Then the incubation mixtures were separated into supernatant and cell-associated fractions and the radioactivity of each fraction was determined. Values are the mean $\pm$ S. D. of three different experiments. *Statistical significance from PS, CL and DCP at $p < 0.05$.

細胞への高い結合能が観察された。

(4) リポソーム組成中の各成分の細胞増殖に及ぼす影響

リポソーム構成成分の単独について、細胞増殖に対する影響を検討した。EggPC, Chol は、単独では細胞増殖に対する阻害効果はみられなかった。これに対して、荷電物質添加では、増殖抑制効果はみられたが、100%増殖阻害は認められなかった(表 3)。

考 察

リポソームが細胞と相互作用することによって、細胞増殖などの変化をもたらすことが知られ

表 3 growth inhibitory effects of liposomal components alone on NIH3T3 cells (%)

component	3 μ M	10 μ M	concentration 30 μ M	100 μ M	300 μ M
SA	92.98 $\pm$ 2.96	88.76 $\pm$ 2.64	91.03 $\pm$ 7.61	85.93 $\pm$ 4.47	78.14 $\pm$ 1.24
DCP	95.85 $\pm$ 3.58	94.20 $\pm$ 5.06	96.42 $\pm$ 3.19	97.34 $\pm$ 2.09	90.01 $\pm$ 6.61
PS	95.11 $\pm$ 1.78	94.06 $\pm$ 5.02	95.88 $\pm$ 3.71	92.14 $\pm$ 5.32	89.97 $\pm$ 4.41
CL	98.11 $\pm$ 1.23	99.42 $\pm$ 5.84	94.6 $\pm$ 5.30	77.26 $\pm$ 6.35	70.04 $\pm$ 4.27
	21 μ M	70 μ M	210 μ M	700 μ M	2,100 μ M
Egg PC	98.55 $\pm$ 1.26	99.29 $\pm$ 0.23	100	95.07 $\pm$ 1.67	98.08 $\pm$ 0.91
	15 μ M	50 μ M	150 μ M	500 μ M	1,500 μ M
Chol	100	100	100	99.9 $\pm$ 0.1	97.81 $\pm$ 1.47

Individual liposomal components were incubated alone with cells at different concentrations under the same condition in Fig. 1. Values are expressed as the percentage vs. control cells. Each value represents the mean $\pm$ S. D. of five experiments.

ているが、その詳細な検討はなされていない。そこで、サイズ、脂質組成、荷電状態の異なる各種リポソームについて、細胞増殖に及ぼす影響を検討した。NIH3T3の増殖に対する影響として、70 μM 以上の SUV リポソーム添加により、細胞増殖に対する抑制作用が観察され、さらに添加した荷電物質の種類により阻害の程度が異なっている。リポソーム間の凝集・融合を防ぐ目的で、種々の荷電物質を加えるが、正荷電を呈する SA 含有リポソームがもっとも増殖阻害作用が強く、ついで DCP, PS および CL を含むリポソームでその作用が強く、EggPC:Chol リポソームおよび DMPG, PA 含有リポソームの阻害作用は弱い。

Chol 含量が多いほど、また MLV よりも SUV のほうが阻害作用は大きい。SA 含有リポソームでは、SA 30 μM で 100%増殖阻害が観察されるが、SA 単独では 10 倍量の 300 μM においても、100%増殖阻害には至らなかった。

この細胞増殖抑制の作用機序は、明らかではないが、荷電物質によるリポソームの細胞への結合の程度と細胞増殖の阻害作用の程度がよく一致することから、細胞膜の膜流動性の障害による直接作用が考えられる。なお、植物由来のホスファチジルイノシトール(PI)を含むリポソームは、動物由来 PI 含有リポソームにくらべて、増殖阻害作用が強いことが報告されており⁸⁾、リン脂質の *sn*-2 位の脂肪酸組成が細胞増殖に関与することを示唆している。また、遊離脂肪酸に増殖抑制作用が知られており⁹⁾、増殖阻害の一要因として、EggPC がホスホオリパーゼにより分解されて生じた脂肪酸($\text{C}_{20:4}$, 4%, $\text{C}_{18:2}$, 17%)が考えられる。

以上の結果より、培養細胞とリポソームの相互

作用を細胞増殖阻害を指標とすると、リポソームの大きさ、Chol 含量および荷電が増殖阻害に関与していることが推測された。

文 献

- 1) Bangham, A. D., Horne, R. W.: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 8: 660-668, 1964.
- 2) Gregoriadis, G., Ryman, B. E.: Liposomes as carriers of enzymes or drugs: a new approach to the treatment of storage diseases. *Biochem. J.* 124: 58-59, 1971.
- 3) 吉岡史郎, 森田達也, 水上勇三, 野沢義則: アムホテリシン B 封入リポソームの実験的カンジダ感染マウスへの応用. 真菌誌, (印刷中).
- 4) Banno, Y., Ohki, K., Nozawa, Y.: Targeting of asialofetuin sugar chain-bearing liposomes to liver lysosomes. *Biochem. Int.* 7: 455-461, 1983.
- 5) Banno, Y., Ohki, K., Morita, T., Yoshioka, S., Nozawa, Y.: Involvement of the membrane fluidity of lactosylceramide-targeted liposomes in their intrahepatic uptake. *Biochem. Int.* 12: 865-871, 1986.
- 6) Grunze, M., Deuticke, B.: Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mammalian erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 356: 125-130, 1974.
- 7) Noda, T., Satake, M., Robins, T., Ito, Y.: Isolation and characterization of NIH3T3 cells expressing polyomavirus small T antigen. *J. Virol.* 60: 105-113, 1986.
- 8) Jett, M., Alving, C. R.: Selective cytotoxicity of tumor cells induced by liposomes containing plant phosphatidylinositol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114: 863-871, 1983.
- 9) Kigoshi, S., Ito, R.: High levels of free fatty acids in lymphoid cells, with special reference to their cytotoxicity. *Experientia (Basel)* 29: 1408-1410, 1973.