レクチンの認識機能を有するハイブリッド型 リポソームの調製

通阪栄一¹⁾・吉永武史¹⁾・後藤雅宏^{*1)}・上岡龍一²⁾・古崎新太郎²⁾

1) 九州大学大学院工学研究院 〒812-8581 福岡県福岡市東区箱崎6-10-1

2) 崇城大学工学部 〒860-0082 熊本県熊本市池田4-22-1

Preparation of Hybrid Liposomes Recognizing a Lectine

Eiichi Toorisaka ¹⁾, Takeshi Yoshinaga ¹⁾, Masahiro Goto ^{*1)}, Ryuichi Ueoka ²⁾
and Shintaro Furusaki ²⁾

1) Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan

2) Department of Applied Life Science, Faculty of Engineering, Sojo University, Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

Hybrid liposomes that have a targeting effect were prepared by introducing a sugar type surfactant. The hybrid liposomes consist of dimyristoylphosphatidylcholine, polyoxyethylene glycol surfactant, and a long-chain alkyl sugar ester. The targeting effect was evaluated on the basis of the binding behavior between the hybrid liposomes and a lectine. When the hybrid liposomes were prepared with a glucose type of surfactant, aggregation was observed by the addition of concanavalin A (ConA) to the liposome solution. The result indicates that bridging should occur between the sugar moiety on the surface of liposomes and the recognition site of lectine. The aggregation behavior was also confirmed by the AFM photograph. The interaction between the hybrid liposomes and lectine was found to be reversible because the aggregates disappeared by the addition of excess glucose. Hybrid liposomes containing a galactose type of surfactant exhibited a high affinity toward the peanut lectine (PNA). The alkyl-chain length of sugar surfactants also affected the aggregation behavior. It was suggested that longer alkyl chain surfactants show a higher recognition effect.

Key words: hybrid liposome / targeting / sugar surfactant / lectine / DDS

1. 緒 言

リポソームは、リン脂質を基本とする脂質二重膜からなる閉鎖型小胞体である。このリポソームは、生体膜機能モデルとして利用されるが、一方で毒性のない薬剤カプセルとしてドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用も数多く研究されている¹⁾。リポソームの利点として、水溶性の薬物を内水相に、油性の薬物を二分子膜中に封入することができる。また、細胞表面と相互作用する糖、抗体などのリガンドで修飾することで、目標

とする臓器にターゲティングが可能となるなどの利点が挙げられる²⁾。

従来、リポソームの調製は有機溶媒に脂質を分散させ、有機溶媒を除去し、水中で超音波照射により形成させる逆相法が一般的に用いられてきた³⁾。この手法は調製が煩雑であり、また有機溶媒の混入の危険性があるため、生体への適用はしばしば困難とされてきた。さらに薬物を封入する場合、封入効率が低い点も指摘されている。脂質の単一成分で構成される従来型のリポソームに対し、上岡らが開発したハイブリッド型リポソームは、リ

Fig. 1 Molecular structure and abbreviation of surfactants used in this study

ン脂質とミセル形成界面活性剤を緩衝液中で超音波照射するだけで得られる安定な混合リポソームである。また、素材および組成比の選択で形態、サイズ、相転移温度の制御が可能であり、従来のリポソームよりも長期に渡って安定であることが報告されている⁴⁾。

近年、PEG系界面活性剤から成るハイブリッド型リポソームを用いると、細胞内皮系への取り込みが回避でき、リポソームそのものが*in vitro*及び*in vivo*で顕著な制ガン効果を発現することが報告されている^{5,6)}。さらに正常ラットでの毒性検査から、ハイブリッド型リポソームは無毒性で副作用もないことも報告されている⁷⁾。一方、従来からリポソームに糖分子を組み込むことにより、ターゲティング能を付与する研究が数多く報告されている⁸⁻¹⁰⁾。しかしながら、安定性の向上したハ

イブリッド型リポソームに対する同様の研究は、限られている。

そこで本研究では、このハイブリッド型リポソームにガン細胞表面と特異的に相互作用するリガンドを修飾することでターゲティング機能を付与することを試みた。すでに上岡らは、糖質界面活性剤を修飾したハイブリッド型リポソームがガン細胞に集積し、増殖抑制効果を示すことを報告している^{11, 12)}。そこで本研究では、臓器選択的なターゲティングの可能性を化学的立場から検証することを目的とした。具体的には、細胞表面に存在する特異的に糖を認識するレセプターに注目し、そのレセプターに選択的に相互作用する糖型界面活性剤をハイブリッド型リポソームに組み込んだ。リポソームとレセプターの相互作用は、肝実質細胞¹³⁾と同様な認識部位を有するピーナツレクチン(PNA)と肺ガン細胞¹⁴⁾と同様な糖認識部位を有するコンカナバリンA(ConA)を細胞モデルとして評価した。本研究では、特にガラクトース系界面活性剤を組み込んだハイブリッド型リポソームによるこれら2種のレクチン認識特異性を検討した。

2. 実験

2.1 試薬

L- α -ジミリスチルホスファチジルコリン(DMPC)は日本油脂(株)から、Tween20は東京化成(株)からそれぞれ購入した。また、ポリオキシエチレン-10-ラウリルエーテル(PEO10)はSigma社から購入した。糖質界面活性剤は、まずラクトビオン酸から脱水反応によりラクトノラクトンを調製し、これにアルキルアミンを反応させる手法で合成した¹²⁾。Fig.1に用いた試薬の分子構造を示す。

2.2 実験操作

2.2.1 糖質界面活性剤含有ハイブリッド型リポソームの調製

ハイブリッド型リポソームはDMPCとTween20をHEPES緩衝液中(pH7.4, [MnCl₂]=0.1mM,

Fig. 2 Schematic illustration of hybrid liposome containing sugar surfactant

[CaCl₂]=0.1mM)で5分間超音波照射することで調製した。その溶液に糖質界面活性剤LacC_n($n=12, 14, 16, 18$ (oleyl))を加え、さらに5分間超音波照射することで糖質界面活性剤を含む3成分系のハイブリッド型リポソーム(1.0mM DMPC/10mol% Tween20/30mol%LacC_n)を調製した(Fig.2)。以下、すべてのハイブリッド型リポソームは、同様の組成で調製した。また、ミセル形成界面活性剤としてポリオキシエチレン-10-ラウリルエーテル(以下PEO10と略記)を加えた場合も同様な手法にて調製した。

2.2.2 レクチン認識能の評価

1.0mlの糖含有ハイブリッド型リポソーム溶液中に0.1mlピーナツレクチン溶液(2.0mg/ml)を添加し、溶液の360nmの吸収の経時変化をUVスペクトルを用いて測定することで、粒子凝集(懸濁)の様子を観察した。また比較としてコンカナバリンAを用いた。Fig.3に粒子凝集実験の模式図を示す。

2.2.3 示差走査型熱量(DSC)測定

2成分系ハイブリッド型リポソーム(DMPC/PEO10)と3成分系ハイブリッド型リポソーム(DMPC/PEO10/LacC₁₆)のDSC測定を行った。走査範囲5~35℃、走査速度5.0℃/minで各サンプルについて5回ずつ測定を行った。

2.2.4 走査型プローブ顕微鏡(AFM)の撮影

緩衝液で調製した3成分系ハイブリッド型リポ

Fig. 3 Illustration of aggregation by the interaction between liposome and lectine

ソーム(DMPC/Tween20/LacC₁₆)をマイカ上に滴下した。その試料を1分間静置後、余分な水分を除去した。減圧乾燥後、ノンコンタクトモードによってAFM観察を行った。

3. 結果と考察

3.1 ハイブリッド型リポソームとレクチンとの相互作用

2成分系ハイブリッド型リポソームはDMPCとTween20を緩衝液中で超音波照射するだけで調製できた。我々はこのリポソームに糖質界面活性剤を添加し、さらに超音波照射することで糖をリポソーム表面に修飾した3成分系ハイブリッド型リポソームを得た(Fig.2)。

糖質界面活性剤がリポソームに組み込まれたことを確認するために、2成分系リポソームと3成分系リポソームの示差走査熱量計(DSC)による相転移温度の測定を行った。それぞれのDSCピークをFig.4に示す。どちらもシャープな吸熱ピークが得られ、糖質界面活性剤を含む3成分系リポソームは2成分系リポソームに比べ1.6℃ほど高温に相転移温度がシフトした。3成分系リポソームにおいても1本の明確な吸熱ピークが得られたことにより、2種のリポソームが混在せず糖質界面活性剤が完全にハイブリッド型リポソームに組み込まれていることが確認できた。しかしながら、相転移温度測定結果のみから、添加した糖質界面活性

Fig. 4 DSC curve of hybrid liposomes
(a): DMPC/ Tween20,
(b): DMPC/ Tween20/ LacC₁₆

剤が均一に分散しているのか、あるいはまとまったドメインを形成しているかの判断はできなかった。

続いて、動的光散乱法により2成分系リポソームと3成分系リポソームの粒径測定を行った。それぞれの粒径分布をFig.5に示す。結果として、2成分系リポソームに比べ、3成分系リポソームの粒径は10nm程度上昇し、粒径分布幅が明らかに狭くなった。さらに3成分系リポソームの粒径経時変化を測定したところ、30日間ほぼ変化がないことが確認された(Fig.6)。これらのことより、糖質界面活性剤を組み込んだ3成分系のハイブリッド型リポソームは、従来のハイブリッド型リポソーム同様、安定な集合体を形成していることがわかった。また、糖質界面活性剤のミセルは数ナノ程度の粒径であることが確認されているが、3成分系ハイブリッド型リポソーム溶液にはミセルの粒度分布は現れなかった。この結果からも、糖質

Fig. 5 Size distribution of hybrid liposomes
(a): DMPC/ Tween20,
(b): DMPC/ Tween20/ LacC₁₈

Fig. 6 Time courses of diameter change of hybrid liposomes

界面活性剤がハイブリッド型リポソームに組み込まれていることが確認された。

3.2 糖を組み込んだハイブリッド型リポソームのレクチン認識能
肝実質細胞表面には β -ガラクトース基を特異

Fig. 7 Binding test of liposome with lectine (PNA), HL: hybrid liposome alone

的に認識するレセプターが多数存在することが知られている¹³⁾。そのため、 β -ガラクトースを修飾したハイブリッド型リポソームを投与した場合、肝臓細胞に集積することが期待される。タンパク質であるピーナッツレクチン(PNA)は肝実質細胞と同様に β -ガラクトースを特異的に認識するサイトを有している。また、このPNAの分子量はpHによって異なり、中性付近では4量体(分子量100kD)として存在し、この4つのサブユニットは糖認識サイトをそれぞれ1つずつ有することが知られている。リポソームは複数の糖質界面活性剤で修飾されているので、PNAとハイブリッド型リポソームとの間で相互作用があれば、凝集現象として観察される。一方、コンカナバリンA(ConA)は肺ガン細胞表面に存在しているサイト¹⁴⁾と同様な α -グルコース認識サイトをもつレクチンである。

そこで、糖質界面活性剤をハイブリッド型リポソームに組み込むことによるターゲティング機能について検討した。糖質界面活性剤を含まないDMPC/Tween20の2成分系ハイブリッド型リポソームとDMPC/Tween20/LacC₁₈の3成分系ハイブリッド型リポソームによる凝集実験の結果をFig.7に示す。糖質界面活性剤を含まない2成分系リポソームはPNAを加えてもほとんど変化がないが、

Fig. 8 Reversible binding of liposome with lectine (PNA)

LacC₁₈が加わった3成分系リポソームは時間とともに凝集が進行していることが分かる。さらに、凝集が起きている溶液に、単糖の β -ガラクトースを過剰に添加した場合の濁度変化をFig.8に示す。リポソームとレクチン(PNA)との結合は可逆的であるため、過剰のガラクトースを加えると単糖とPNAとの結合が優先して起こり、凝集が緩和されていると考えられる。これらのことから、ハイブリッド型リポソーム表面に修飾された糖がレクチンのもつ認識サイトと結合し、凝集している可能性が確認できた。

また、PNA溶液をリポソーム溶液に添加する前後でのリポソームの様子を走査型プローブ顕微鏡(AFM)を用い、凝集の様子を視覚的に観察した。Fig.9にAFM像を示す。PNAが存在しないリポソームはそれぞれ分散して存在していることが分かる。PNAを添加後は数個のリポソームが凝集し会合体を形成していることがはっきりと確認できた。また、観察された粒子の粒径は前述したDLS測定値とほぼ一致した。

3.3 ハイブリッド型リポソームの選択的ターゲティング機能

LacC₁₈を組み込んだハイブリッド型リポソームの選択的ターゲティング能力を検討する目的で、レクチンとしてPNAとConAを用いて凝集実験を

Fig. 9 AFM image of hybrid liposomes, (a): hybrid liposome alone, (b): hybrid liposome + lectine (PNA)

Fig.10 Effect of sugar surfactant combined in liposome on the recognition of lectine

行った。Fig.10に示されるように、PNAを添加したリポソーム溶液は凝集したが、ConAを添加したリポソーム溶液はほとんど凝集しなかった。LacC₁₈はガラクトースを親水部にもつ界面活性剤である。つまりハイブリッド型リポソームにガラクトース残基を有する糖質界面活性剤を組み込むことで、選択的にガラクトース認識サイトに結合させることが可能であることが示唆された。この結果、LacC₁₈を組み込んだハイブリッド型リポソ

Fig. 11 Effect of alkyl-chain length of sugar surfactants

ームは肝臓細胞等、ガラクトース基の特異的レセプターを表面にもつ細胞に選択的に集積する可能性が示唆される。

3.4 糖質界面活性剤のアルキル鎖長の影響

ハイブリッド型リポソームに組み込む糖質界面活性剤のアルキル鎖長の違いがレクチン、PNAとの相互作用に及ぼす影響を検討した。Fig.11にアルキル鎖がオレイル(C₁₈)、ヘキサデシル(C₁₆)、テトラデシル(C₁₄)、ドデシル(C₁₂)の糖質界面活性剤

を含むハイブリッド型リポソームによる凝集実験の結果を示す。アルキル鎖長が長いほどPNAと強く相互作用し、強く凝集していることが分かる。これは、PNAのリガンドである糖部分が、アルキル鎖長が長いほどリポソーム表面に突き出るために、より特異的結合部位に認識されやすくなったためと推察される。

4. 結 言

ハイブリッド型リポソームに糖質系界面活性剤を組み込むことで、糖認識レセプターへの特異的認識機能を付与することが可能となった。ハイブリッド型リポソームはそれ自身でガン細胞増殖抑制効果を示すリポソームである。つまり糖修飾ハイブリッド型リポソームは従来のハイブリッド型リポソームに比べて、臓器特異的に送達される抗ガン剤としての可能性を秘めており、今後の応用が期待される。

謝 辞

本研究は文部科学省科学研究費(特定領域研究：標的分子デザイン)10145102によって行ったものである。

文 献

1) Lasic DD: *J. Control. Release*, **48** 203-157 (1997)

- 2) Hussain N: *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **43** 95-100 (2000)
 - 3) Szoka F, Papahadjopoulos D: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **75** 4194-4198 (1978)
 - 4) Ueoka R, Matsumoto Y, Mos RA, Swarup S, Sugii A, Harada K, Kikuchi J, Murakami Y: *J. Am. Chem. Soc.*, **110** 1588-1595 (1988)
 - 5) Matsumoto Y, Kato T, Iseki S, Suzuki H, Nakano K, Ihara M, Ueoka R: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9** 1937-1940 (1999)
 - 6) Kanno A, Tsuzaki K, Miyagi M, Matsumoto Y, Ueoka R: *Biol. Pharm. Bull.*, **22** 1013-1014 (1999)
 - 7) 今村主税, 金納明宏, 光岡ちほみ, 北島俊一, 井上秀顕, 岩原正宣, 松本陽子, 上岡龍一: 薬学雑誌, **16** 942-956 (1996)
 - 8) Kawakami S, Wong J, Sato A, Hattori Y, Yamashita F, Hashida M: *Biochim. Biophys. Acta.*, **1524** 258-265 (2000)
 - 9) Yamauchi H, Kikuchi H, Sawada M, Tomikawa M, Hirota S: *J. Microencapsulation*, **11** (3) 287-296 (1994)
 - 10) Yamauchi H, Kikuchi H, Sawada M, Tomikawa M, Hirota S: *J. Microencapsulation*, **11** (2) 179-188 (1994)
 - 11) Matsumoto Y, Kato T, Suzuki H, Hirose S, Naiki Y, Hirashima M, Ueoka R: *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10** 2617-2619 (2000)
 - 12) Ueoka R, Matsumoto Y, Hirose S, Goto K, Goto M, Furusaki S: *Chem. Pharm. Bull.*, **50** 563-565 (2002)
 - 13) Ashwell G, Harford J: *Annu. Rev. Biochem.*, **51** 531-534 (1982)
 - 14) Kieda C, Monsigny M: *Invasion Metastasis*, **6** 347-366 (1986)
- (受付 2002年2月5日 修正稿受付5月24日
掲載決定 5月28日)