論文要旨

総合論文 医薬品製剤としてのリピッドベシクル

竹内 洋文

岐阜薬科大学 製剤学教室 (〒502-8585 岐阜市三田洞東 5-6-1)

生体適合性に優れたリン脂質は医薬品製剤の素材として注目されている。特にリン脂質を構成成分とするリピッドベシクルはドラッグデリバリーシステム (DDS) において有用な薬物キャリアーとして期待されている。制癌剤を封入したリポソーム、脂溶性薬物を封入したリピッドエマルジョンなど一部はすでに実用化されている。本論文では、より高機能化されたリピッドベシクルの開発を目的として研究されている表面修飾リピッドベシクルについて紹介する。これらの研究は、ペプチドの経口投与製剤、血中長期滞留性キャリアーなどの開発に寄与すると考えられる。

(連絡者：竹内洋文) Vol.2, No.4, 181 (2002)

総合論文 リポソーム膜の機能性を生かした DDS 展開

笠岡 敏・丸山 一雄

帝京大学薬学部 生物薬剤学教室 (〒199-0195 神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1)

リポソームは、構成脂質やサイズのコントロールによって、膜の電荷・温度感受性・pH感受性・融合能など、様々な性質を付加することが容易である。このような膜の性質はDDSキャリアーとしての特徴、つまりキャリアー自身の生体内挙動に加え、薬物の保持性、放出性を決定づける一因となっている。生体内挙動は血漿蛋白質などのオプソナイズに大きく左右され、膜の流動性の変化やPEG修飾により、コントロール可能である。薬物の保持性や放出性に関しても、膜の流動性に左右され、温度感受性リポソームなどの放出制御に利用されている。さらに、リポソームはアンチセンスやプラスミドのベクターとしても広く用いられているが、細胞への導入効率にも膜の性質が大きく関わっている。膜表面に正の電荷を持ったカチオニックリポソームは、DNAのパッキング、細胞膜への付着性を高め、遺伝子導入の効率化が行うことができる。リポソーム膜に機能性を付加したpH感受性リポソームや膜融合リポソームも導入効率の低さを改良する重要なベクターである。今後、生体膜研究の進展とともに、より最適化されたリポソームの開発が行われていくものと思われる。

(連絡者：丸山一雄) Vol.2, No.4, 189 (2002)

リポソーム膜の機能性を生かした DDS 展開

Application of Functionalized Liposomal Membrane to DDS Development

笠岡 敏

帝京大学薬学部生物薬剤学教室
〒199-0195
神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1

Satoshi KASAOKA
Department of Biopharmaceutics,
School of Pharmaceutical Sciences,
Teikyo University
Sagamiko, Tsukui-gun,
Kanagawa 199-0195

丸山一雄

帝京大学薬学部生物薬剤学教室
〒199-0195
神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1

Kazuo MARUYAMA
Department of Biopharmaceutics,
School of Pharmaceutical Sciences,
Teikyo University
Sagamiko, Tsukui-gun,
Kanagawa 199-0195

Abstract: Liposomes represent various properties of electric charge, thermo-sensitivity, pH-sensitivity and fusion by regulation of lipid composition and size. Properties of membrane control biological behavior, drug-trapping efficiency and drug-releasing property as DDS carrier. Liposomal biodistribution depends on opsonization of plasma protein which can be controlled by membrane fluidity and PEG-coating. Drug-trapping efficiency and drug-releasing property also depend on fluidity of membrane. This character is useful for thermo-sensitive liposomes. Liposomes are also used as vector of antisense DNA and plasmid DNA, because these properties of liposomal membrane can introduce genes into cells. Cationic liposomes enhance the ability of DNA-packing and attachment to cells, this property increase the transfection. Functional pH-sensitive liposomes and fusogenic liposomes can improve the transfection of pDNA. Optimal liposomes with progress of biological membrane will be developed.

Key words: Liposomes, Lipid Membrane, Drug Delivery System

1 はじめに

リポソームは、1965年に Bangham によって発見されて以来、膜モデルや DDS キャリヤーとして、多くの分野から脚光を浴びている。このリポソームは脂質二分子膜からなる閉鎖小胞で、生体の構成成分であるリン脂質を主成分としているため、毒性（マウスでの LD₅₀ は 5g 脂質/kg 体重あるいはそれ以上）や抗原性が低いという特徴を持っている。また、構成脂質を任意にコントロールすることが容易で、結果として膜の電荷・自由度・温度感受性・pH 感受性・融合能・吸着能などを、さらに小胞のサイズの変化を加えることによって、様々な物理化学的な性質を付加することができる。このことは多くの生体膜研究において非常に重要な意味を持ち、盛んに研究されるゆえである。

また、このような膜の性質は DDS キャリヤーとしての特徴、つまりキャリヤー自身の挙動に加え、薬物の保

持性、放出性を決定づける要因となっている。さらに、リポソームはカチオン性リポソーム-遺伝子複合体をはじめとして、アンチセンスやプラスミドのベクターとしても広く用いられている。非ウイルス性であるが故に安全で毒性も少ないが、導入効率及び発現効率が低く実用化に至るには問題点も多く、この導入効率にも膜の性質が大きく関わっている。

本レビューでは、リポソーム膜の特性が DDS キャリヤー、遺伝子ベクターとしての性質に、どのように関連

略 語 : DDS, drug delivery system; CH, cholesterol; DMPC, dimyristoylphosphatidylcholine; DPPC, dipalmitoylphosphatidylcholine; DSPC, distearoylphosphatidylcholine; DSPE, distearoylphosphatidyl ethanolamine; MPS, monocyte phagocyte system; PC, egg phosphatidyl-choline; PEG, polyethylene glycol; PG, phosphatidylglycerol; RES, reticuloendothelial system; DC-Chol, 3β[N-(N,N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl] cholesterol; DOPS, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-[phospho-L-serine]; SucPG, succinylated polyglycidol; APC, antigen presenting cell; MHC, Major histocompatibility complex; TAP, transporter associated with antigen processing; EEA1, early endosome antigen 1.

連絡者 : 丸山 一雄
E-mail : maruyama@pharm.teikyo-u.ac.jp

しているのか概説する。

2 リポソーム膜が生体内挙動に及ぼす影響

リポソームは発見後、将来の有力なカプセル型キャリアーとして期待されていたが、35年を経ても、臨床応用されているものは数少ないことは事実である。実用化の課題として、生体内における不安定性と静脈内投与では肝臓、脾臓などの細網内皮系 (RES) に取り込まれやすいということが挙げられる。この RES への取り込みはリポソーム膜の性質が重要な因子となっているが、生体内に投与されたリポソームは、どのような機構によって、RES に捕捉されるのだろうか？

生体内に投与されたリポソームは、血液成分との相互作用ののち、単核食細胞系 (MPS) によって認識され、循環血中から除去される。そのためこれらの細胞が多く存在する肝臓、脾臓などの RES にリポソームは捕捉されることになる。血液成分との相互作用を調べるための、*in vitro* 実験系で、リポソームと血清の処理によって、種々の蛋白が速やかにリポソーム膜表面に吸着することが示されている¹⁾。この中で、補体、IgG、フィブロネクチンなどの精製蛋白をリポソーム表面上に付与すると、培養マクロファージへの取込みが上昇することが示されている²⁻⁴⁾。一方で、Chonn ら⁵⁾ が開発したスピнкаラム法を用い、リポソームに吸着している血清蛋白と未吸着の血清蛋白を分離することで、リポソームの血中からの消失における血清蛋白の役割を *in vivo* で確かめることが可能となった。この研究から、リポソームに対する蛋白の吸着量が多いものほど、血中からの消失が速いことが示された。Kiwada らは、ラット肝環流モデル実験を用いて、血清蛋白がリポソームの肝臓マクロファージによる取り込みに必要であることを示した^{6,7)}。

リポソームの血中からの消失には、補体系が特に重要な役割を持っていると考えられる。Chonn ら⁸⁾ は負荷電リポソームは、 Ca^{2+} 依存の補体活性を認めたことから、古典経路によるリポソームの崩壊が起こり、一方で、正荷電のリポソームは Mg^{2+} 依存の第二経路による崩壊が起こると報告している。さらに、負荷電リポソームを血清処理後、イムノブロットング法により分析した結果、補体 C3b および C9 が検出された。同様に Funato ら⁹⁾ はリポソームの崩壊が、非働化血漿および C3 除去血漿中では全く認められず、抗 C3 抗血清の添加によりほぼ完全に抑制されること、また、 Mg^{2+} 要求性かつ Ca^{2+} 非要求性であり、さらに血漿処理後のリポソーム膜上に C3 フラグメントが検出されたことから、補体第二経路の活性化により起こると推察している。いずれの結果から、リポソームの血中からの消失には、

補体系が重要な役割を担っており、特に補体 C3 がリポソーム表面に付着することで活性化され、MPS の認識能が高まると予想される。このように、マクロファージによるリポソームの取込みは、オプソニンレセプターを介するものと考えられるが¹⁰⁾、マウスまたはラット腹腔マクロファージによるリポソームの取込み実験から、スカベンジャーレセプターの関与も報告されている¹¹⁾。

以上のことから、リポソームと血中蛋白、RES との関係がその生体内挙動に重要であることがわかるが、リポソーム膜自身の性質はどのような影響を及ぼしているのだろうか？リポソームを血液中に投与した場合の血中半減期は、硬い膜を持ったリポソームは柔らかい膜を持ったリポソームよりも長いことが知られている。リポソームの血中安定性についても硬い膜のリポソームの方が優れており、そのためにコレステロールの添加や、飽和脂質またはスフィンゴミエリンを用いたリポソームの調製が行われている¹²⁻¹⁵⁾。この原因としては、リポソームと補体系との相互作用が重要であると考えられる。eggPC や DMPC といった“柔らかい脂質”つまり流動性が高い脂質からなるリポソームほど血漿蛋白が膜表面に接触した際に、膜に組み込みやすいので、オプソナイズされやすい。一方、これにコレステロールを加えると流動性が低下することによって、オプソナイズされにくいことが知られている。また、前述したようにリポソーム表面の荷電も補体の活性化に大きな影響を与える¹⁶⁾。さらに、原島ら¹⁷⁾ の研究によれば、リポソームと補体系との相互作用にはサイズ依存性があり、小さいサイズのリポソームはオプソナイズされにくく、結果 MPS 細胞への取り込みも低下する。

血中での安定化と RES 取込みを回避させるには、リポソームの粒子径 (100 nm 以下)、脂質組成 (相転移温度の高い合成脂質またはスフィンゴミエリンの利用)、表面荷電 (中性荷電脂質の利用) の最適化が必要である¹⁸⁾。しかしながら、このように最適化されたリポソームにおいても、後に述べる RES 回避形リポソームに比べると、比較的速やかに血流中から消失し RES に捕捉されてしまう¹⁹⁾。

Bally と Mayer のグループ²⁰⁾ は、最適化したスフィンゴミエリン／コレステロールリポソーム (小さくて硬いリポソーム) にビンクリスチンを封入し担癌マウスに尾静注したところ、血中での安定性と滞留性が増し、ビンクリスチンの高い癌組織中濃度と治療効果が得られたことを報告している。

3 RES 回避形リポソーム

膜の性質がリポソームの体内動態に及ぼす影響を考え

ると、RES 回避形リポソームは革命的な存在であり、厳密には膜自身の性質によるものではないが、概説する必要がある。RES 回避形リポソームの中で PEG で表面修飾された PEG-リポソームは、最も重要であると考えられる。PEG-リポソームのアイデアは、RES 取込みに関与していると考えられるマクロファージが、自己よりも疎水性の高い表面をもっている粒子をよく取り込むことから、リポソーム膜表面に PEG を付与し親水性を増加させれば、マクロファージからの攻撃を回避できるのではないかと考えたことと、リポソーム膜表面を PEG で覆うことにより、親水性が増すとともに水和層が形成されるので、補体系蛋白や MPS 細胞との相互作用を立体障害的に阻害できるのではないかと考えたことである。実際、C3 オプソニン分子の吸着が阻害されているのが著者ら²¹⁾の研究で確かめられているし、分子量 2000 の PEG-リポソームの場合、リポソーム表面に 50 Å 程度まで張り出した水和層バリアーが形成されていることが X 線解析から求められている²²⁾。また、水和層の形成が血清蛋白の吸着を阻害していることを、Senior ら²³⁾は two-phase partition system という手法を用いて明らかにしている。Torchilin²⁴⁾は、リポソーム膜表面に結合した PEG の 1 分子が覆う水和層の領域を“cloud”とし、PEG の分子量とリポソーム表面を全部覆うのに必要な PEG の分子数について計算している。それによると、100 nm のサイズをもつリポソームでは、分子量 2,000 の PEG を 891 分子必要とし、脂質に対して 2 mol%

の添加量で理論的にはリポソーム表面の全部を雲のように覆うことが出来るという。

PEG 脂質誘導体は、PEG の分子量、脂肪酸鎖長、あるいは脂質と PEG を結ぶアンカー部分の構造により物性が異なる (Fig. 1)。PEG リポソームの調製に用いられている PEG の分子量は一般に 1,000~5,000 (2,000 が一番多い)であり、PEG の鎖長が長すぎるとリポソーム膜に組み込まれにくくなる。また、脂肪酸鎖長が短いほどリポソームから抜けやすく、アンカー部分の構造により PEG 鎖のリポソームからの離脱性が異なる。これは、PEG 修飾リポソームの血中滞留性に加えて、標的部位へのリポソームの集積性に影響を与える因子である。従って、PEG リポソームを調製する際には、目的に応じた PEG 脂質誘導体を選択することが大切である。

さらに、PEG 脂質誘導体の分子量および添加量の違いは、PEG のリポソーム膜上におけるコンフォメーションの違い (パンケーキ型、マッシュルーム型、ブラシ型)^{25, 26)}、PEG により形成される水和層の厚さ、しいては PEG リポソームの血中滞留性に影響する (Fig. 2)。特に、薬物の封入率の減少や膜透過性の増加は、PEG のコンフォメーションが、マッシュルーム型からブラシ型に変化する際に顕著である (例えば、DSPE-PEG 2000 では、全脂質量の 4 mol%, DSPE-PEG 5000 では、全脂質量の 2 mol%の添加量に相当する)^{27, 28)}。

PEG 修飾リポソームは、水和相によって血清蛋白の付着やマクロファージからの貪食を回避できるため、

eggPC	egg phosphatidylcholine	柔らかいリポソーム
HSPC	hydrogenated soy bean phosphatidylcholine	硬いリポソーム
DMPC	dimiristoylphosphatidylcholine	柔らかいリポソーム
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine	硬いリポソーム
DSPC	distearoylphosphatidylcholine	硬いリポソーム
DOPE	dioleoylphosphatidylethanolamine	膜融合性をもつリポソーム

PEG脂質誘導体	構造式	特徴 (R=C ₁₇ H ₃₅ CO-の場合)
m PEG-C-PE carbamate linkage		in vitro, in vivo で安定
m PEG-A-PE propionate linkage		in vitro, in vivo で安定
m PEG-S-PE succinate linkage		in vitro で経時的にPEGが脱離 in vivo では比較的安定
m PEG-G-PE glutamate linkage		in vitro で経時的にPEGが脱離 in vivo では比較的安定
m PEG-DTP-PE dithiopropionate linkage		血漿中でS-S結合が開裂し、PEG が脱離しやすいアンカー構造

Fig. 1 主な脂質および PEG 脂質誘導体の構造

Fig. 2 リポソーム中の PEG のコンフォメーション

bare リポソームで認められる肝臓や脾臓への取り込みが減少し、リポソームの長時間血中滞留化が可能となる。PEG 修飾リポソームを用いたパッシブターゲティングは、薬物を PEG 修飾リポソームに封入して血中薬物濃度を増加させることで、標的組織での薬物濃度を増加させるのがねらいである。例えば、Colon 26 を移植し固形癌とした担癌マウスにドキソルビシン封入 PEG リポソーム（平均粒子径 130 nm）を投与すると、癌組織中のドキソルビシン濃度は徐々に高くなり、癌の退縮と延命効果が認められる²⁹⁾。特に癌組織における薬物の集積は、PEG 修飾による長時間血中滞留化に加えて、リポソームのような微粒子担体が血中から癌組織に漏出しやすい性質、EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果³⁰⁾ を反映した結果である。

PEG 修飾リポソームを用いたパッシブターゲティングは、腫瘍組織の抗癌剤集積を目的とした癌化学療法のほか、ポリフィリン化合物による光化学療法、ボロン化合物による中性子捕捉療法への応用が進められている。

4 リポソームへの薬物の封入

リポソームは、内部の水相に親水性薬物、膜内に疎水性の薬物と両薬物の封入が可能である反面、封入量が少ないのが欠点である。一般に水溶性薬物はリポソームの内水相に封入されるため、水溶性薬物の封入性は、リポソームを調製する際の薬物溶液濃度と調製したリポソームの内水相容積に依存する。従って、粒子径の小さいリポソームでは封入率が低くなる（数%）。また、疎水性薬物はリポソームの膜中に封入されるが、膜中に組み込まれる薬物量は脂質に対して数 mol% にすぎず、分子量の大きい薬物に至ってはほとんど封入されないのが現状である。一方、一部の弱酸性および弱塩基性薬物は、pH 勾配法や硫酸アンモニウム法といったリモートローディング法を用いることで、薬物を効率よくリポソームに封入することが可能である。この方法は、リポソーム膜が分子型薬物を通しやすく、イオン型薬物を通しにくい性質を利用して、水素イオンや塩濃度の勾配によっ

て、内相への薬物の封入率を飛躍的に高める方法である。リモートローディング法で封入が可能な薬物の例を Table 1 に示した^{31, 32)}。また、これら薬物以外でも、薬物の構造にアミノ基を導入することでリモートローディングが可能になる薬物があるといえる。

Table 1 pH 勾配法によりリポソームへの封入が可能な薬物の例

Doxorubicin	抗腫瘍薬	Quinidine	不整脈治療薬
Daunorubicin	抗腫瘍薬	Dopamine	強心・昇圧薬
Vincristine	抗腫瘍薬	Imipramine	抗うつ薬
Vinblastine	抗腫瘍薬	Diphenhydramine	抗ヒスタミン薬
Mitoxantrone	抗腫瘍薬	Quinine	抗マラリア薬
Dibucaine	局所麻酔薬	Chloroquine	抗マラリア薬
Propranolol	β 遮断薬	Diclofenac	抗炎症薬

リモートローディング法は PEG 修飾リポソームにも応用されており、ドキソルビシンを封入した PEG リポソーム製剤 (Doxil) もその 1 つである。さらに、脂質や PEG 脂質誘導体との相互作用を利用して疎水性薬物の封入率を上げる試みもなされている。例えば、ポリエーテル系抗生物質のアンホテリシン B は、PEG 脂質誘導体、DSPE-PEG との複合体形成により、リポソームの膜中あるいは膜表面部分に相互作用した状態で封入が可能である^{33, 34)}。この封入法は、アンホテリシン B を容易かつ多量に PEG 修飾リポソームへ封入できることが特徴で、ナイスタチンなど他のポリエーテル系薬物を封入した PEG 修飾リポソームの調製にも適用できる³⁵⁾。

5 リポソームからの薬物放出

膜の性質は薬物キャリアーとして重要な放出特性にも大きく関わってくる。この場合、薬物を内水相に封入したリポソームとして、話を進めていきたい。リポソームから薬物が放出されるパターンは、キャリアーの破壊及びキャリアーからの漏出に大きく大別される。キャリアーの破壊は前述の MPS による取り込みや補体によるもの、漏出に関しては、血漿蛋白質、物理的影響及び膜を隔てた受動拡散が重要と考えられる。これらの三要素

に、いずれも膜の流動性「硬さ」が重要である。つまり、血漿蛋白質は膜が硬い状態では前述の通り取り込まれにくく、血流などによる物理的影響にもその硬さゆえに耐性があると言える。一般に脂質のみからなる膜に比べて、生体膜や再構成膜の方が flip-flop は速く、おそらく血漿蛋白質のまわりに様々な形の欠損が生じていると思われる。このために、血漿蛋白質が膜に組み込まれることによって、薬物の放出性が高まることになる。Flip-flop の速度が遅い固いリポソームでは、この欠損が生じる率も少なくなり、放出速度が遅くなるといえる。物理的影響に関してはサイズも重要で、極率の関係から一般に 100 nm を下回る小さなリポソームは、薬物が漏れやすいことが知られている³⁶⁾。膜を介した受動拡散については、硬いリポソームの場合、薬物側の影響は非常に大きく、脂溶性が高ければ膜を容易に通過できる。逆に、イオン性の物質であるとほとんど漏れにくいと言える。一般に、透過性の順序は水、 H^+ 、 OH^- ≫ 中性低分子化合物 ≫ アニオン > カチオンとなっている³⁷⁾。よって、イオン性物質を封入することが多い現状を考えれば、リポソームを体内に投与した場合を想定すると、膜を介した受動拡散よりも、膜が破壊されたり、不安定化されることによる放出の影響が大きいと言える。しかし、柔らかいリポソームでは、パッキング密度が疎になり、膜のバリアー能が大きく低下するため、非常に放出しやすくなる。

6 温度感受性リポソーム

「硬さ」は脂質固有の相転移温度 (Liquid-crystalline phase transition temperature : T_c) に依存しており、リポソーム構成脂質の相転移温度を下回る温度条件では、リポソームはゲル相となり、流動性が低い「硬い」リポソームとなり、相転移温度以上では液晶相の「柔らかい」リポソームとなる。このゲル状態から液晶状態に相転移するとき、内包する薬物を放出する特性を利用した温度感受性リポソームが多方面で研究されている³⁸⁻⁴⁰⁾。これは脂質構成を DPPC (T_c 41℃) と DSPC (T_c 55℃) 及びコレステロールとし、これらの構成比を変化させることにより、42℃付近で相転移温度になるように調製したリポソームである。抗癌剤などを封入した温度感受性リポソームとハイパーサーミアと組み合わせることにより、ハイパーサーミアを施している標的部位で選択的に、抗癌剤を放出させて、抗腫瘍効果を増強させる研究が行われている。筆者らの研究で、担癌マウスにドキソルビシン封入温度感受性 PEG-リポソームを尾静脈投与し、固形癌部位を局所的に 20 分間ハイパーサーミアすると、高いドキソルビシンの腫瘍組織内濃度

が得られ、著しいサバイバル効果が示された (Fig. 3)。水溶性薬物であるシスプラチンや 5-FU などを封入した温度感受性 PEG-リポソームとハイパーサーミアとの組み合わせは、臨床応用が期待される。

Fig. 3 ドキソルビシン封入温度感受性リポソームを Colon 26 担癌マウス投与 (5mg/kg) し、3 時間後に癌部位を 20 分加温した場合の癌組織中濃度 (非加温時との比較)

7 リポソームを用いた遺伝子導入

1990 年にアメリカで最初の遺伝子治療が行われて以来、世界中で遺伝子治療は試みられている。その 80.5% がアメリカで実施されている。日本での遺伝子治療の応用は大きく遅れていたが、1995 年の北海道大学における ADA 欠損症への施行例以降、ようやく臨床研究が進みつつあり、日本を含めたアジアで 1.5% を占めている。しかし、いずれも場合も、遺伝子を運ぶベクターに一長一短あり、有効な臨床成果を上げていないのが現状である。

ここで、遺伝子治療に用いられているベクターはウイルスベクターと非ウイルスベクターの二つに大別される。前者はレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなど、後者にはリポソームや高分子などが挙げられる。本稿では、非ウイルスベクターであるリポソームの膜特性がどのように遺伝子導入に関わっていくか、概説したい。

現在行われている遺伝子治療臨床試験プロトコールの中でリポソームベクターはレトロウイルス (35.8%)、アデノウイルス (27.7%) に次ぐ、13.0% を示している (Gene Therapy Clinical Trials ホームページより引用

<http://213.80.3.170:80/trials/>)。リボソームを遺伝子治療に用いる場合、遺伝子のリボソームへの封入とリボソーム-DNA 複合体の形成の二種類が考えられる。しかし、リボソームを用いた遺伝子治療の開発当初、その遺伝子導入効率は極めて低く、遺伝子治療に応用するには有効なベクターといえなかった。そこで、DNA が負電荷を持つことを利用して、構成脂質に正電荷を有するリボソームを用いることで、リボソーム-DNA 複合体を形成したり、リボソーム内への DNA 巨大分子の封入を効率化させた。さらに、DNA-リボソーム複合体の正電荷を利用して負電荷を持つ細胞に導入するリポフェクション法も開発され、低い発現効率の改良が試みられている⁴¹⁾。さらに DOPE などの、いわゆるヘルパーリピッドと呼ばれる電氣的に中性な脂質も遺伝子導入の最適化を目指して、研究が行われている。しかし、リポフェクションによって、細胞への遺伝子導入効率が上がる一方で、細胞毒性も増し、血清存在下では遺伝子導入阻害も起こる。Lee Huang ら⁴²⁾ は細胞毒性を軽減するために、三級アミン、カルバミル基とアミノ基間に 3 原子のスペースが存在する DC-Chol を調製し、DOPE と組み合わせたリボソームは、既に、遺伝子治療に臨床利用されている。このことから、逆にカチオン性脂質から DOPS などのアニオン性脂質を用い、正の電荷を帯びたポリエチレンジアミンを添加したウイルス様のリボソームベクターも研究されており、血清存在下で導入効率の低下が起こらないなどの、有利な特性を示している⁴³⁾。また、膜融合リボソームや後述の pH 感受性リボソームなども、今後、遺伝子治療において重要な位置を占めるのではないと思われる。

このようにリボソーム膜の電荷、脂質構成などを変化させることにより、ウイルスベクターには及ばないものの遺伝子導入効率を上昇させることに成功し、ウイルスベクターより安全性が高いことと調製が容易なことから、現在、幅広く研究が行われている。

8 pH 感受性リボソーム

リボソームがエンドサイトーシスされリゾソームに運ばれる過程で、内部環境が弱酸性（早期エンドソーム：pH 5.8, 後期エンドソーム：pH 5.5, リサイクリングエンドソーム：pH 6.2）のエンドソームを経ることが知られている。エンドソームは最終的にライソソームに移行し、リボソームは消化酵素により分解されてしまい、発現効率が大きく低下する。そこで、弱酸性下で膜の不安定化が起こりエンドソーム膜と融合性を示すような pH 感受性リボソームを用いれば、遺伝子を細胞質内に送達することが可能となる。pH 感受性リボソームは、オレ

イン酸やコレステロールホモサクシネートのように、pH の低下にしたがい水和や荷電状態が変わる両親媒性分子とコーン型リン脂質である PE により作成することができる。低 pH 下では、両親媒性分子のプロトン化によって極性基間の反発がなくなり、PE はヘキサゴナル構造をとるため融合が誘発される。PE-オレイン酸よりなるリボソームを生体に投与した場合、オレイン酸が血清アルブミンによって引き抜かれるため、リボソームの安定性が悪い。そこで、血中でも安定で pH 融合性を失わないリボソームを調製するために、オレイン酸に代わる安定な両親媒性分子も開発されている。

DOPE, コレステロールヘミサクシネート, PEG 誘導体から PEG-リボソームを調製し、葉酸を付与したペンダント型 pH 感受性リボソームは、KB 細胞や HeLa 細胞に遺伝子を効率よく導入し、ウイルスに代わる人工ベクターとして働くことが示されている⁴⁴⁾。また、河野ら^{45, 46)} は、低い pH で膜融合を引き起こす PEG 誘導体 (sucPG) を開発した。SucPG をリボソーム表面にコーティングした蛍光色素封入 SucPG-リボソームを CV-1 細胞にエンドサイトーシスで取込ませたところ、細胞全体が蛍光色素で染まるのに対し、クロロキンの存在では染まらず、pH 応答性を示した。SucPG は PEG 誘導体の一種なので工夫を加えれば、ステルス性やリガンドのための反応基を付けることが可能と考えられる。また、pH 感受性脂質ではなく、GALA⁴⁷⁾ や JTS-1⁴⁸⁾ などのような pH 感受性膜融合ペプチドによっても、同様にエンドソーム膜に揺らぎを生じることが報告されており、これらの pH 感受性膜融合高分子は細胞質への DNA の放出を容易とし、今後のリボソームを用いた遺伝子治療において重要な位置を占めるとと思われる。

以上のような種々の非ウイルスベクターのみならずウイルスベクターにおいても、臨床研究において期待された効果が得られていない。この結果は理論上、遺伝子治療は極めて有効であると考えられるが、既存の遺伝子導入技術がそれに追いついていないために、治療において有効な発現量とその持続的発現が得られていないためであることが明らかとなってきた。今後の遺伝子治療においては、発現効率のさらなる向上、標的細胞へのターゲティング能を併せ持ったベクターの開発が必要であると思われる。その候補として、筆者らのグループが研究しているリボソーム表面に抗体を付加した、いわゆる immunoliposome や標的細胞に発現しているレセプターに対するリガンドを付加したリボソームによる遺伝子導入が考えられる。

本レビューではリポソーム膜と DDS への応用について概説したが、今後の展開としては、生体膜とリポソーム膜との相互作用について、さらなる研究が求められていくものと思われる。その結果として、毒性が限りなく低下した状態で、送達物質を効率よく細胞質に送達する技術が確立されていくだろう。特に、エンドサイトーシス経路を用いた DDS を目的として、前期エンドソーム、後期エンドソーム、リサイクルリングエンドソーム、リソソームといった形質膜とは異なった固有の脂質ドメイン⁴⁹⁾ (リゾピスホスファチジン酸など) や脂質依存的な特異的蛋白質⁵⁰⁾ (EEA 1 など) の解析、前述のエンドソームの pH 勾配及びリガンドを考慮した最適ナリポソームの開発が行われていくと思われる。

文 献

- 1) Bonte, F., *et al.*, (1986) *Chem. Phys. Lipids*, 40, 359.
- 2) Derksen, J.T.P., *et al.*, (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 971, 12.
- 3) Hsu, M.J., *et al.*, (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, 720, 411.
- 4) Roerdink, F., *et al.*, (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, 734, 33.
- 5) Chonn, A., *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1070, 215.
- 6) Kiwada, H., *et al.*, (1986) *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1249.
- 7) Kiwada, H., *et al.*, (1987) *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 1189.
- 8) Chonn, A., *et al.*, (1991) *J. Immunol.*, 146, 4234.
- 9) Funato, K., *et al.*, (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, 1103, 198.
- 10) Chonn, A., *et al.*, (1991) *J. Immunol.*, 146, 4234.
- 11) Nishikawa, K., *et al.*, (1990) *J. Biol. Chem.*, 265, 5226.
- 12) Kirby, C., *et al.*, (1983) *Biochem. Pharma.*, 32, 609.
- 13) Gotfredsen, C.F., *et al.*, (1983) *Biochem. Pharma.*, 32, 3381.
- 14) Hwang, K.J., *et al.*, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4030.
- 15) Senior, J., *et al.*, (1982) *Life Sciences*, 30, 2123.
- 16) Juliano, R.L., *et al.*, (1975) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 63, 651.
- 17) Harashima, H., *et al.*, (1994) *Pharm. Res.*, 11, 402.
- 18) Gregoriadis, G., *et al.*, (1983) *Biol. Cell*, 47, 11.
- 19) Scherphof G, G., *et al.*, (1983) *Biol. Cell.*, 47, 47.
- 20) Webb, M.S., *et al.*, (1995) *Br. J. Cancer*, 72, 896.
- 21) Yuda, T., *et al.*, (1999) *J. Pharm. Sci. Jpn.*, 59, 32.
- 22) Needham, D., *et al.*, (1992) *Biochim Biophys Acta*, 1108, 40.
- 23) Senior, J., *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1062, 77.
- 24) Torchilin, V.P., *et al.*, (1994) *J. Liposome Res.*, 4, 725.
- 25) Uster, P.S., *et al.*, (1996) *FEBS Lett.*, 386, 243.
- 26) Baekmark, T.R., *et al.*, (1995) *Langmuir*, 11, 3975.
- 27) Kenworthy, A.K., *et al.*, (1995) *Biophys J.* 68, 1903.
- 28) Nicholas, A.R., *et al.*, (2000) *Biochim Biophys Acta*, 1463, 167.
- 29) Unezaki, S., *et al.*, (1995) *Int. J. Pharm.*, 126, 41.
- 30) Matsumura, Y., *et al.*, (1986) *Cancer Res.*, 46, 6387.
- 31) Cullis, P.R., *et al.*, (1997) *Biochim Biophys Acta*, 1331, 187.
- 32) Hwang, S.H., *et al.*, (1999) *Int. J. Pharm.*, 179, 85.
- 33) Moribe, K., *et al.*, (1998) *Pharm. Res.*, 15, 1737.
- 34) Moribe, K., *et al.*, (1999) *Int. J. Pharm.*, 193, 97.
- 35) Moribe, K., *et al.*, (1999) *Int. J. Pharm.*, 188, 193.
- 36) Crank, J., (1975) *Clarendon Press, Oxford*, 137.
- 37) Szoka, F., *et al.*, (1980) *Ann Rev. Biophys. Bioeng.*, 9, 467.
- 38) Shimose, S., *et al.*, (2001) *Int. J. Oncol.*, 19, 585.
- 39) Kong, G., *et al.*, (2000) *Cancer Res.*, 60, 6950.
- 40) Ishida, O., *et al.*, (2000) *Jpn J. Cancer Res.*, 91, 118.
- 41) Felgner, P.L., *et al.*, (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413.
- 42) Goyal, K., (1995) *J. Liposome Res.*, 5, 49.
- 43) Nahde, T., *et al.*, (2001) *J. Gene Med.* 3, 353.
- 44) Lee, R.J., *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 8481.
- 45) Kono, K., *et al.*, (1994) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1193, 1.
- 46) Kono, K., *et al.*, (1997) *Biochim. Biophys. Acta.*, 1325, 143.
- 47) Simoes, S., *et al.*, (1999) *Gene Ther.*, 6, 1798.
- 48) Jaaskelainen, I., *et al.*, (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.*, 10, 187.
- 49) Linke, T., *et al.*, (2001) *J. Biol. Chem.*, 276, 5760.
- 50) Gaullier, J.M., *et al.*, (1998) *Nature*, 394, 432.