

称号及び氏名 博士（工学） 弓場 英司

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 31 日

論文名 「Design of Biofunctional Liposomes for Delivery of Bioactive Molecules

(生理活性分子送達のための
生体機能性リポソームの設計)」

論文審査委員 主査 河野 健司

副査 白井 正充

副査 長岡 勉

論文要旨

近年の分子生物学の目覚ましい発展は、細胞内の特定の部位に作用したり、あるいは特定の分子を標的とする新しい作用機序の医薬品の開発を可能にしている。またバイオテクノロジーの進展により細胞自体を医薬品とみなす、新規な概念に基づく治療法も創出されている。分子標的治療・遺伝子治療・細胞治療・再生医療に代表される先進医療は、従来の医療技術では治療が困難であった先天性疾患や難治性疾患を効果的に治療する新しい治療法として研究が進められている。これら先進医療を確立・発展させるためには、生理活性分子を組織レベル・細胞レベル・細胞内部のオルガネラレベルの高い精度で送り届ける技術が必要不可欠である。しかし、そのような生理活性分子の送達技術が未発達であることがこれらの先進医療の実用化にとって大きな障害になっている。

たとえば、二本鎖リボ核酸 (RNA) によってその配列特異的にメッセンジャー RNA が分解され、遺伝子発現が抑制される RNA 干渉を利用して、標的タンパク質の発現を抑制する siRNA は、細胞内のサイトゾルにおいてその機能を発現する。また、がん免疫治療では細胞性免疫を誘導することが重要であるが、そのためには、抗原を免疫担当細胞に運搬し、さらにそのサイトゾル内に導入することが必要となる。さらに、分化した細胞を人工的に初期化することで誘導される人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) は、再生医療において胚性幹細胞 (ES 細胞) の持つ倫理的問題を解消し、新しい医療技術の基盤になるものと期待されているが、iPS 細胞の作製には、特定の遺伝子を細胞に適切な量導入し、適切な期間発現させることが必要である。しかし、このような先進医療において重要な役割を担う siRNA・遺伝子・タンパク質といった生理活性分子は、その作用部位が存在する細胞の内部に到達することができない。したがって、それらの生理活性分子の機能を発現させるためには、それらの分子を細胞の内部に導入する運搬体 (キャリア) を用いることが必須となる。

これまで、生理活性分子を運搬するための様々なキャリアシステムの開発が試みられてきた。それらの中でも、リポソームは多くの研究が行われ、その有用性が明らかにされている。リポソームは細胞膜と同じ

構成成分であるリン脂質から成る閉鎖小胞であり、その膜中および内水相にそれぞれ疎水性分子および水溶性分子を保持することができ、しかも生体適合性に優れているため、生理活性分子のキャリアとして極めて優れた特性を有している。

一般にリポソームは、細胞の食作用であるエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソームに輸送され、その後リソソームにおいて分解される。したがって、リポソームを生理活性分子のキャリアとして用いる場合、リポソームはこのような細胞内の分解経路を回避して内包する生理活性分子を細胞内部に効率良く導入する機能を持つことが必要である。

これまでに様々な機能を付与したリポソームが構築されてきた。代表的な例として、温度や光等の外部刺激に応答するリポソームや pH 変化に応答するリポソームが挙げられる。リポソームを機能化するための方法の一つは、外部刺激に応答した脂質自体の性質変化を利用するものである。たとえば 42°C においてゲル-液晶相転移を引き起こすジパルミトイルホスファチジルコリンを含有するリポソームは温度応答性を示し、相転移温度付近において内封した薬物を放出する。またジオレオイルホスファチジエタノールアミンとカルボキシル基を有する両親媒性分子から成るリポソームは pH 応答性を示し、酸性環境において膜融合活性を発現する。

一方、リポソームを機能化するためのもう一つの重要なアプローチは、刺激に応答する分子・素子をリポソームに複合化する方法である。たとえば温度に応答して親水性から疎水性に変化する温度応答性高分子をリポソームに複合化すると、温度に応答して内封物を放出する温度応答性リポソームが得られる。また、pH に依存して荷電状態を変化させる pH 応答性高分子をリポソームに複合化すると、pH に応答して内封物を放出したり、膜融合する pH 応答性リポソームが得られる。このようなアプローチでは、安定性の高いリポソームと様々な機能性分子・素子を組み合わせることで、高い安定性と高い性能を併せ持つ、多様な機能を有するリポソームを構築できるという利点がある。

本論文は、先進医療実現のための基盤となる、生理活性分子を細胞内部にまで効果的に送り届けるためのキャリアシステムの構築を目的とする。生理活性分子送達のための細胞内外の障壁をクリアするために、外部刺激に応答する機能性分子・素子をリポソームに複合化することによって様々な機能を発現する機能性リポソームの構築を試みた。ここでは pH に応答して脂質膜との相互作用を制御できる高分子を用いて、細胞内部のエンドソームとの膜融合を介して標的細胞のサイトゾルにタンパク質や遺伝子を効率良く導入したり、あるいは薬物を放出する pH 応答性リポソーム、および光に応答して発熱する金属ナノ粒子を複合化した光応答性リポソームの構築について研究を行った。

第 1 章では、本論文の緒言として、研究の背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章では、pH 応答性高分子で修飾したリポソームの抗原タンパク質キャリアとしての機能について検討した。弱酸性環境で膜融合活性を発現するサクシニル化ポリグリシドール (SucPG) や 3-メチルグルタル化ポリグリシドール (MGluPG) で修飾したリポソームを作製し、内水相にモデル抗原タンパク質としてオボアルブミン (OVA) を内封した。これらのリポソームを用いてマウス樹状細胞由来 DC2.4 細胞への抗原タンパク質導入について調べ、高い膜融合性を持つ MGluPG で修飾したリポソームは非常に効率良くサイトゾル中に OVA を導入することがわかった。C57BL/6 マウスへこのリポソームを投与したところ、膜融合性の高いリポソームほど、効果的な細胞性免疫を誘導した。このように膜融合性の高いリポソームほど、免疫担当細胞のサイトゾルへの抗原タンパク質運搬能力が高く、効果的に細胞性免疫を誘導することを明らかにした。

第 3 章では、pH 応答性高分子の膜融合性能に及ぼす高分子主鎖骨格の影響について検討した。線状の主鎖骨格を持つ MGluPG と、多分岐型的主鎖骨格を有し、種々の重合度を持つ MGlu-HPG を合成した。MGlu-HPG はその重合度の増加とともに疎水性が増大し、脂質膜とより強く相互作用した。また、MGlu-HPG で修飾したリポソームは線状構造を有する MGluPG よりも高い pH 応答性を示した。これらのリポソームを用いて DC2.4 細胞に抗原タンパク質を導入したところ、MGlu-HPG 修飾リポソームは MGluPG に比べてより効率良く細胞内で融合し、サイトゾルに OVA を運搬できることが分かった。このように、pH 応答性高分子の主鎖骨格が高分子の膜融合活性に影響を与え、多分岐構造を有する MGlu-HPG を用いることで、細胞内に効率良く抗原タンパク質を導入できる pH 応答性膜融合リポソームを構築することに成功した。

第4章では、pH 応答性高分子修飾リポソームを DNA とカチオン性脂質との複合体(リポプレックス)と複合化することで得られるハイブリッド複合体を用いた樹状細胞への遺伝子導入について検討した。樹状細胞によるハイブリッド複合体の取り込みを促進するためにトランスフェリンおよびマンナンを結合したハイブリッド複合体を調製した。これらのリガンドを結合した複合体は、リガンドを結合していない複合体と同様に DC2.4 細胞によって取り込まれることを見出し、樹状細胞はその表面のスクヤベンジャーレセプターを介してハイブリッド複合体を効率良く取り込むことを明らかにした。ハイブリッド複合体による遺伝子発現効率を調べ、膜融合性の高い MGluPG を用いたハイブリッド複合体は効率良く遺伝子発現を導くことを示した。膜融合性の高いハイブリッド複合体は細胞内のエンドソームで膜融合することにより、DNA をサイトゾルに効率良く放出し、効果的に遺伝子発現を導いたものと考えられた。

第5章では、両性イオン構造を持つ pH 応答性高分子を合成し、この高分子を複合化したリポソームの内包物質放出挙動について検討した。2-ジメチルアミノエチルメタクリレートユニットおよびアクリル酸ユニットを種々の割合で含有する高分子を合成し、酸-塩基滴定によって高分子の荷電状態が pH に依存して変化することを示した。また、これらの高分子で修飾したリポソームからの水溶性蛍光色素ピラニンの放出を調べ、このリポソームが pH に応答してピラニンを放出することを明らかにした。pH に依存した高分子の荷電状態の変化によってリポソームのピラニン放出が制御されたものと考えられた。

第6章では、光応答性を有するリポソームを構築することを目的として、金ナノ粒子とリポソームとの複合化について検討した。リポソーム分散液と金ナノ粒子の分散液を種々の比で混合し、インキュベートすることによって、金ナノ粒子とリポソームが複合化することを見出した。また、動的光散乱や透過型電子顕微鏡を用いた解析によって、得られた複合体が、金ナノ粒子がリポソーム表面に結合した構造を持つことを明らかにした。

第7章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

審査結果の要旨

本論文では、生理活性分子の高効率な細胞内送達を実現するキャリアシステムを開発することを目的として、リン脂質ベシクルであるリポソームに様々な機能性分子・素子を組み込むことによる機能性リポソームの構築と機能評価に関する研究成果をまとめたもので、次のような成果を得ている。

- (1) 膜融合性を有する pH 応答性高分子をリポソームに複合化することで、高い膜融合性と安定性を併せもつ pH 感受性膜融合リポソームを構築し、このリポソームを用いて樹状細胞の内部に抗原タンパク質を運搬することにより、効率よく細胞性免疫を誘導できることを示した。そして pH 応答性膜融合リポソームが、細胞性免疫を誘導するための優れた抗原タンパク質デリバリーシステムとして有用であることを明らかにした。
- (2) 多分岐高分子を用いることで、高い膜融合活性を有する pH 応答性高分子を合成した。また、この高分子をリポソームに複合化することで、優れた性能を有する、pH 応答性膜融合リポソームを構築できることを示した。作製されたリポソームは樹状細胞の内部にタンパク質を高効率に導入することを明らかにした。
- (3) pH 応答性膜融合リポソームをカチオン性脂質-DNA 複合体(リポプレックス)と複合化させることでハイブリッド複合体を作製し、このハイブリッド複合体を用いることによって、樹状細胞に効率よく遺伝子発現を誘起できることを明らかにした。また、ハイブリッド複合体による樹状細胞への遺伝子導入機構を明らかにした。
- (4) pH に依存して荷電状態を変化させる、種々の組成の両性電解質共重合体を合成し、この共重合体で修飾したリポソームを調製した。このリポソームの内包物質の放出挙動は共重合

体の組成に依存し、共重合体の組成を調節することによって、望む pH 領域で内包物質を放出する pH 応答性リポソームを調製できることを明らかにした。

- (5) リポソームと金ナノ粒子との複合体を調製した。また、この複合体の構造を動的光散乱や透過型電子顕微鏡を用いて明らかにした。金ナノ粒子複合化リポソームは、光温熱療法と薬物治療を複合化した新しい治療デバイスとしての有用性を示唆した。

以上の諸成果は、生理活性分子をその作用部位に送達させるためのキャリア構築法を開拓するものであり、先進医療技術の向上に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。

