

## 脂質・遺伝子ナノ複合体の溶液中における生成機構 Mechanism of formation of lipid / gene nanocomplex in solution

米持悦生<sup>1,\*</sup>, 古石誉之<sup>1</sup>, 福澤薫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>星薬科大学薬品物理化学研究室, 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

Etsuo Yonemochi<sup>1,\*</sup>, Takayuki Furuishi<sup>1</sup> and Kaori Fukuzawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Physical Chemistry, Hoshi University,

2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8501, Japan

### 1 はじめに

わが国における死亡原因の第1位の疾患は「がん」である。このがんに対する治療薬である既存の抗がん剤は、通常全身投与となるため副作用の発現が強く、がん化学療法継続に大きな支障をきたしてきた。抗がん剤のDDS (Drug Delivery System: 薬物送達システム) 製剤化により、薬物量や投与回数さらに副作用も軽減することが可能となる。現在、DDS 製剤の一つとしてナノテクノロジーを利用したリポソーム製剤の開発が盛んに行われている。リポソームは脂質二重膜で構成されたナノカプセルで、疎水領域と親水領域を保有することから、様々な薬物を封入することができ、また、粒子径を調整できる特徴を持つ。粒子径を 100~200nm に調整することで、がん組織や炎症部位の血管内皮細胞間にある 200nm 程度の広い隙間から効果的かつ安定に目的部位に集積することができる。リポソームの構成成分である脂質を正電荷脂質とする正電荷リポソームは、負電荷をもつ核酸分子と静電的に結合し、細胞内に核酸分子を導入する能力を有するため短鎖二本鎖 RNA (siRNA) 導入用ベクターとしても用いられている。

siRNA は 21-23 塩基対から成る短鎖二本鎖 RNA で、メッセンジャーRNA の破壊によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制する RNA 干渉を行うため、リポソームに含有されることで抗がん剤としての利用が期待されている。また、リポソームを用いる利点としては毒性や抗原性が低いことのほか、用いるリン脂質が生体成分であるために生体内で代謝されることが挙げられる。これまでの研究では様々な組み合わせの製剤を網羅的に調整し in vivo での検討を行うことが多く、その物理化学的な物性評価はされてこなかった。

本研究では、がん治療を目的としたリポプレックスの構造を最適化し、有効性の高い製剤の開発を行うため、ITC (Isothermal Titration Calorimetry: 等温滴定型熱量測定)、SAXS (Small Angle X-ray Scattering: 溶液 X 線小角散乱測定)、Cryo-TEM (Transmission Electron Microscopy: 透過型電子顕微鏡

測定) によりリポプレックスの分子構造およびその結合メカニズムについて検討した。

### 2 実験

#### リポソームの調製

正電荷脂質として、1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP), 1,2-Distearoyl-3-trimethylammonium-propane (TAP) を、中性脂質として 1,2-Dipalmitoyl-3-phosphocholine (DPPC), 1,2-Dipalmitoleoyl-3-phosphocholine (DPoPC) を用い、計 4 通りの組み合わせのリポソームを調製した。

#### リポプレックスの調製

調製したリポソーム溶液に siRNA を滴定した溶液を SAXS に用いるリポプレックスの試料とした。

#### 溶液 X 線小角散乱測定(SAXS)測定

測定は高エネルギー加速器研究機構の BL10C に行った。波長は 1.3 Å、カメラ長は 0.5m~3m で、2 mL チューブに入れた試料をペリスタポンプで 40 μL の平板セルに充填、実験ハッチ内のセルホルダーにセットし測定した。データ解析には ATSAS, SAnGler を用いた。

### 3 結果および考察

#### ITC 測定による熱力学パラメータの評価

ITC 測定の結果、滴定による熱挙動は、TAP/DPPC, DOTAP/DPPC は発熱反応で、DOTAP/DPoPC, TAP/DPoPC は吸熱反応であった。発熱反応は正電荷脂質と siRNA の負電荷による静電的な相互作用でエンタルピー変化、吸熱反応はリポソームの構造変化でエントロピー変化が関与していると考えられる。正電荷リポソームと siRNA との静電的相互作用の指標となる  $\Delta H$  の結果については TAP/DPPC, DOTAP/DPPC のリポソームでマイナスへの変化が認められ、TAP/DPoPC, DOTAP/DPoPC のリポソームでプラスへの変化が認められた。疎水性相互作用の指標となる  $\Delta S$  の結果に注目すると、TAP/DPoPC リポソームではプラスへの大きな変化が認められ、TAP/DPPC, DOTAP/DPPC リポソームではプラスへの比較的小さな変化が認められた。これらの結果から、siRNA の添加により、リポソームの膜上で脂質同士の結合に変化が生じていることが示唆された。ギブスエネルギー変化  $\Delta G$  はエンタルピー

一変化とエントロピー変化の影響を受けるが、TAP/DPPC、DOTAP/DPPC では静電的相互作用が優位であり、TAP/DPPoPC、DOTAP/DPPoPC では構造転移が優位であることが示唆された(図1)。

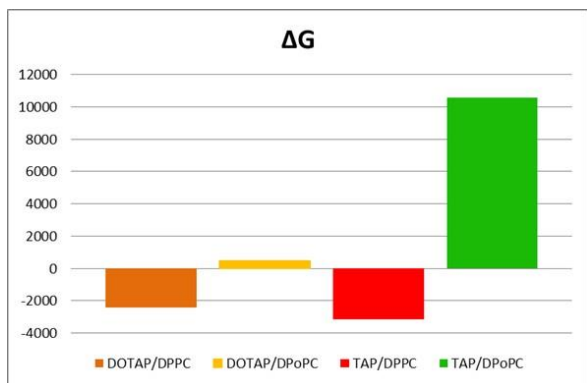


図1: 各リポソームと siRNA 複合体形成時の  $\Delta G$  (cal/mol)

ITC の結果より最も  $\Delta G$  に差のあった TAP/DPPC と TAP/DPPoPC の組成のリポソームおよびリポプレックスの構造を Cryo-TEM で確認した。リポソームでは両組成ともに球体の構造をしていることが確認された。siRNA の添加により、リポプレックスが形成された際、TAP/DPPC ではリポソーム時の球体を維持した状態で凝集体を形成していることが確認された。一方、TAP/DPPoPC ではマルチラメラ構造や球体を維持できていないものなど様々な構造を形成していることが確認された。(図2)。

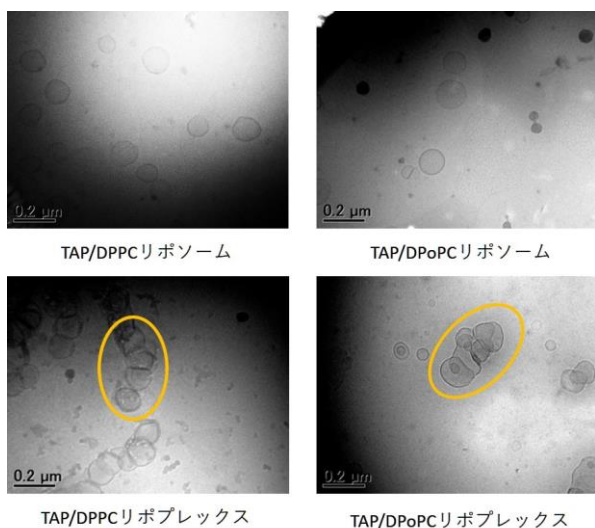


図2: 各リポソームと siRNA 複合体の Cryo-TEM 画像

### リポソーム及びリポプレックスの SAXS プロファイル

リポソームの散乱プロファイル(青, ピンク)では TAP/DPPC と TAP/DPPoPC 両組成ともに緩やかなカーブ(青, ピンク矢印)を描いた複数の山(フリンジ)

が確認された。(図3)フリンジは球体にみられる散乱パターンであるため、リポソームは球体(ベシクル)であることが示唆された。一方、リポプレックスの散乱プロファイル(赤, 緑)では、フリンジがみられず、ピーク(赤, 緑矢印)が確認された。リポプレックスは純粋な球体ではなく、リポプレックス形成に伴い繰り返し構造の生成が示唆された。

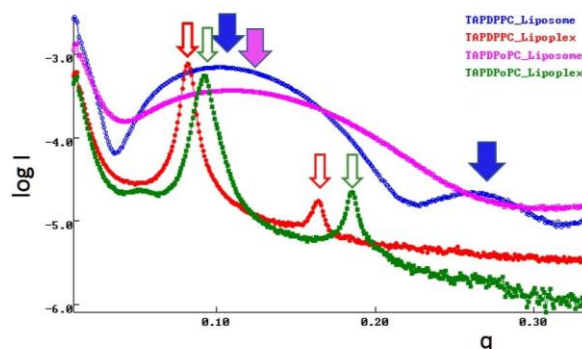


図3: 各リポソームと siRNA 複合体の SAXS プロファイル

リポプレックスのピーク位置から、存在する繰り返し構造の間隔を計算し Cryo-TEM 画像と比較した結果、 $q = 0.15 - 0.2$  のピークは、約  $30 \text{ \AA}$  の脂質二重膜に該当していることが確認された。

### 4 まとめ

ITC、SAXS、Cryo-TEM を用いた正電荷リポソーム/siRNA 複合体であるリポプレックスの形成メカニズムの検討の結果、TAP/DPPC、DOTAP/DPPC、DOTAP/DPPoPC、TAP/DPPoPC の順に構造変化が起きていることが示唆された。また、 $\Delta G$  最大の TAP/DPPC では球体の状態を維持した凝集体を形成しており、最小の TAP/DPPoPC ではマルチラメラ構造や球体を維持できていないものなど様々な構造が確認された。

今回の結果より、リポソーム表面に siRNA が付加し構造変化を起こす過程においては、正電荷リポソームの脂質二重膜内の密度、および二重膜の厚さが影響を与えており、それには正電荷リポソームと負電荷ポリマーのイオン結合や、リポソームの層を形成する脂質同士の疎水性相互作用が重要であることが示唆された。

### 謝辞

清水伸隆博士をはじめとする PF スタッフの皆様のご協力に深く感謝致します。

\* e-yonemochi@hoshi.ac.jp