

正電荷リポプレックスの膜安定性に与えるコレステロール誘導体の影響 Effects of cholesterol derivative on membrane stability of positively charged lipoplexes

米持悦生^{1*}, 古石誉之¹, 福澤薫¹

¹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^{1*}, Takayuki Furuishi¹ and Kaori Fukuzawa¹

¹Department of Physical Chemistry, Hoshi University,
2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo, 142-8501, Japan

1 はじめに

DDS 製剤の一つとしてナノテクノロジーを利用したベシクル製剤の開発が盛んに行われてきた。21-23塩基対から成る低分子二本鎖RNA (siRNA) はRNA干渉と呼ばれる現象に関与しており、mRNAの破壊によって配列特異的に遺伝子の発現を抑制する。このsiRNAは、負電荷をもつため、正電荷のリポソームを静電的に結合させることで、siRNAの分解を抑えつつ細胞内に核酸分子を導入することができることから、siRNAと正電荷ベシクルの複合体(リポプレックス)は、選択性の高いDDSとしての利用が期待されている。ところで、リポソームの膜中にコレステロール誘導体を添加すると膜安定性が向上し、内包物の放出を抑制することが知られている。しかし、コレステロール誘導体の脂質膜に対する影響およびメカニズムについては、十分には解明されていない。[1]

本研究では、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、新たに正電荷コレステロール誘導体を使用し、正電荷リポソーム/負電荷ポリマー複合体の脂質膜に与える影響を検討した。

2 実験

リポソームの調製

正電荷のコレステロール誘導体としてDC-Ch (3-[N-(N'-N-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol hydrochloride)及び、正電荷脂質としてTAP (1,2-distearoyl-3-trimethylammonium-propane)、さらに中性リン脂質であるDPPC (1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine)を使用し、種々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

リポプレックス形成のため、調製したリポソーム溶液に、負電荷ポリマーのsiRNAあるいはポリグルタミン酸ナトリウム(PGA)をを最大荷電比(-/+)1.5となる範囲で加えリポプレックス試料とした。

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にて行った。波長は1.3Å、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40μL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。

リポプレックスの物性評価

リポプレックスの凝集や相互作用は微量熱量測定(ITC)、構造変化の確認に透過型電子顕微鏡(Cryo-TEM)をそれぞれ用いた、さらに、動的光散乱測定(DLS)より粒子径およびゼータ電位を測定した。

3 結果および考察

図1にDC-Ch/DPPCおよびTAP/DPPCに、PGAを添加した際の熱挙動を示す。

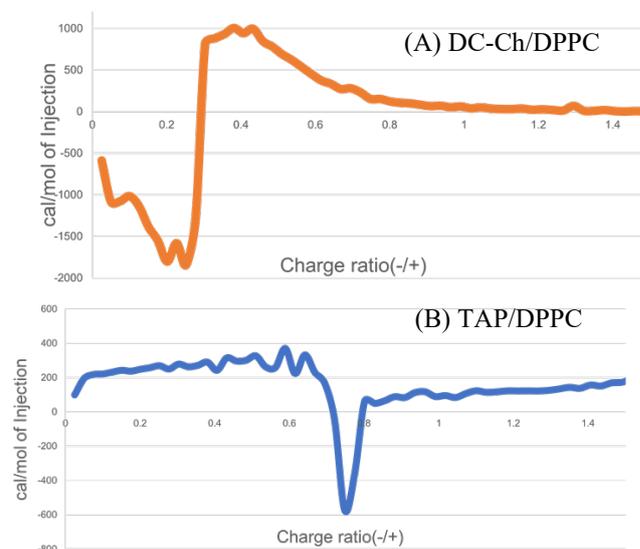


図1: DC-Ch/DPPC (A), TAP/DPPC (B)にPGAを添加した際の熱挙動 (ITC測定の結果)

その結果、DC-Ch/DPPCでは、負電荷ポリマーの添加により、荷電比0.3付近で急激に吸熱反応が観測された。これは、正電荷脂質とPGAによる静電的相互作用によるものと推察された。一方、TAP/DPPCでは荷電比0~0.7付近では吸熱反応を示し、0.7~0.8で発熱反応になり、以降では再び吸熱反応を示した。この結果から、荷電比を上げると、

リポプレックスの凝集や構造変化が生じていることが示唆された。

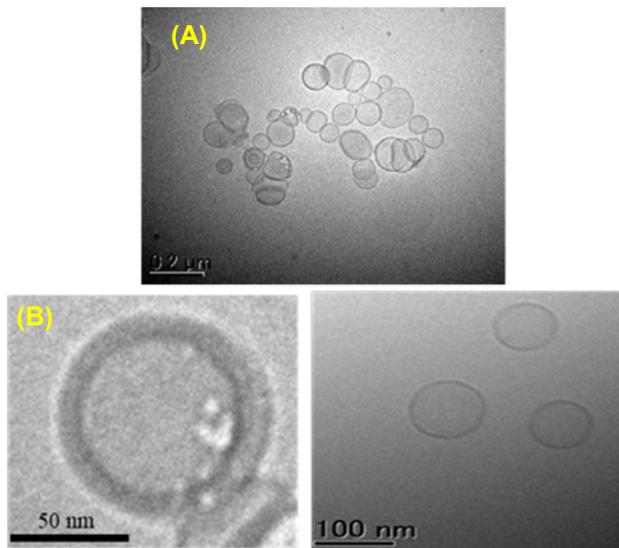


図 2：荷電比 0.3 における DC-Ch/DPPC リポプレックスの Cryo-TEM 画像

図 2 の Cryo-TEM 観察の結果、荷電比 0.3 における DC-Cho/DPPC では凝集体(A)およびマルチラメラ形成(B)が確認された。一方、荷電比 0.45 での TAP/DPPC では逆ミセルの集合体を確認できた。

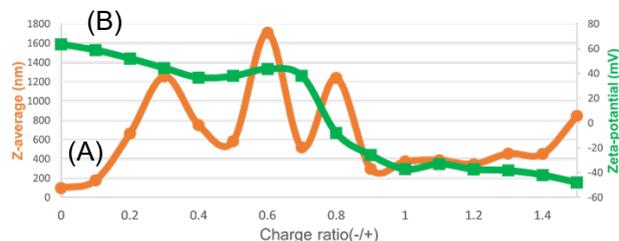


図 3：DC-Ch/DPPC に PGA を添加した際の粒子径 (A)とゼータ電位(B)

図 3 に DC-Ch/DPPC に PGA 添加した際の、DLS で測定した粒子径(A)とゼータ電位(B)の結果を示す。図 1 (A)で吸熱反応を示した荷電比 0.3 で、粒子径が急激に上昇した事実は、粒子が凝集し溶液中の脂質間の水分子の排除されたことによると示唆された。

TAP/DPPC と添加した PGA の SAXS で測定した小角側のピークを図 4 に示す。TAP/DPPC では荷電比が低いときは3つのピーク(A1, A2, A3)が認められた。荷電比 0.7 以上では上記の A1 と A3 がそれぞれ二つのピークに分かれたことによって5つのピーク(D1, D2, D3, D4, D5)となった。

さらに SAXS 測定より、TAP/DPPC は $q=1.5$ のピークが荷電比 0.8 から 1.2 間で消失したことから、膜構造が崩壊して逆ミセルになったことが示唆された。

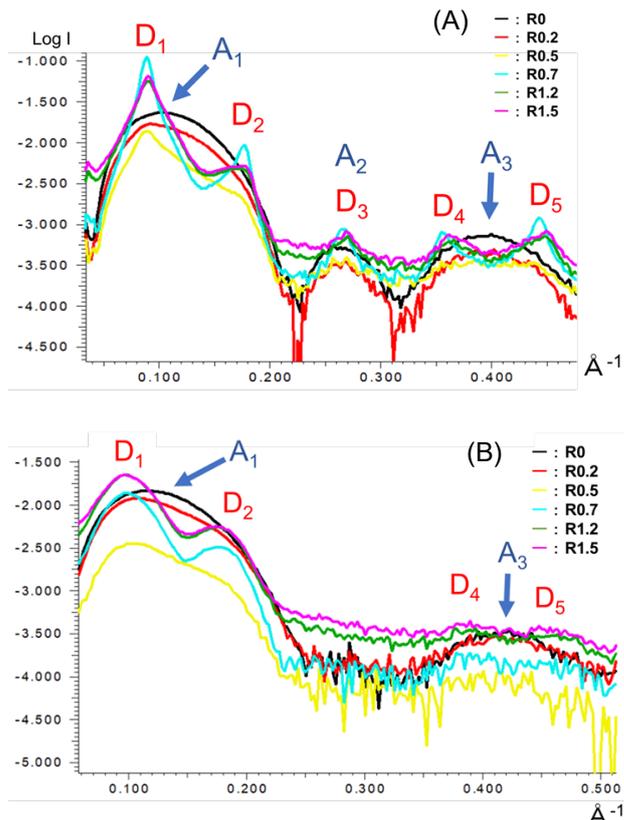


図 4：TAP/DPPC (A)と DC-Ch/DPPC (B)と PGA のリポプレックスの SAXS
R0, R0.2, R0.5, R0.7, R1.2, R1.5 は荷電比

一方、DC-Cho/DPPC は荷電比を 1.5 以下ではピークは消失せず、膜構造を維持していた。また、SAXS の広角側の結果からも DC-Ch/DPPC の方が TAP/DPPC のよりも極性基同士の距離が離れているため、脂質膜の流動性が高くなることが示唆された。これらの結果より、DC-Cho/DPPC を用いたリポプレックスはコレステロールとリン脂質との分子間相互作用が TAP/DPPC より強く、脂質二重層の膜物性に影響を与えることが示唆された。

4 まとめ

DC-Ch/DPPC のリポプレックスは、DC-Ch のコレステロール構造により、そのステロイド環が DPPC 脂質分子の密度が低下することが示唆された。この結果、脂質膜の流動性が向上し、リポソームの安定性が変化したことが示唆された。

参考文献

[1] Y. Hattori *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* **38**, 30 (2015).

* e-yonemochi@hoshi.ac.jp