

《若手研究者紹介》



古くて新しい魅惑のナノ粒子・リポソーム

八 木 信 宏 Nobuhiro Yagi

協和発酵工業株式会社 医薬研究センター

1. はじめに

私がリポソームと出会ったのが1996年のことであつたから、実に10年以上にわたってリポソームを愛し続けたことになる。リポソームの側からしてみれば、気まぐれかつ稚拙な発想でこねくり回されて迷惑していた(?)かもしれないな、としばしば申し訳なくも感じる。駆け出し研究者の私が本稿を担当させていただくのは非常に僣越であるが、魅惑のナノ粒子「リポソーム」の紹介にしばしお付き合いを頂きたい。

細胞膜の主構成成分であるリン脂質からなるリポソームは、生体適合性の観点から製剤基剤としての興味深い性質を備える。しかしながらリポソームそのものでは単なる「袋」に過ぎないため、製剤学的工夫なくしては医薬品として上市することは困難である。医薬品としてのリポソームの製剤設計に必要な技術領域は大きく2つに分けられると考えている。

一つはリポソーム膜そのものの処方設計や機能化である。ポリエチレングリコール修飾や、抗体修飾によるパッシブ/アクティブターゲティング型リポソームの研究、種々の脂質膜成分の組み合わせによる膜物性の調節がこれに相当する。本稿の前半では、筆者が大学及び工業技術院生命工学工業技術研

究所(現・産総研)において行なつた、化学的に合成したペプチド脂質によるリポソーム膜の機能化の試みについて紹介したい。

二つめに必要とされる技術要素は、活性成分である薬物原体の内包技術である。親水性低分子の薬効成分に使用されるpH勾配法は、リポソームへの薬物内包に革命的な技術的進展をもたらした。一方で、タンパクや核酸などの高分子薬剤の内包技術は十分に確立されていないのが現状である。逆相蒸発法に代表される高分子内包技術が存在するものの、その内包効率や疎水性有機溶媒の使用が課題であり医薬品製造には適さない。筆者の現職である協和発酵工業株式会社では、リポソームへの核酸の内包技術を新たに開発した。本稿の後半では、この技術によって調製した“Wrapped Liposome”を用いるsiRNAの静脈注射による遺伝子発現抑制について、東京大学医学部との共同研究内容を中心に紹介したい。

2. ペプチド脂質によるリポソーム膜の機能化

リポソームの医薬品への応用を考えた場合、その表面物性の適切な設計は体内動態や細胞内動態を制御する上で重要である。ドキソルビシン内包リポソームであるDoxil[®]は、PEG(ポリエチレングリコール)で表面修飾することによって長い血中半減期を達成し、EPR効果(Enhanced permeability and retention effect)に基づく強い腫瘍集積が観察される。また、抗体で表面修飾したりポソームは腫瘍のアクティブターゲティング製剤として数多くの臨床試験が行われている。さらにペプチドで表面修飾したりポソームは、遺伝子デリバリーや新生血管

筆者紹介：1996年東京理科大学理工学部工業化学科卒業、1998年同博士前期課程修了、2007年東邦大学大学院薬学研究科博士後期課程修了、博士(薬学)。1996～98年通商産業省生命工学工業技術研究所(現・産総研)、1998年～協和発酵工業株式会社医薬研究センター(現職)、2004年～05年東京大学大学院医学系研究科循環器内科研究員(兼任)。趣味は外で遊ぶこと。

特異的なりポソーム送達で効果を挙げている。

これら機能性リガンドによる表面修飾は、反応性官能基を含むリポソームをあらかじめ調製し、そこにタンパクやペプチドを水溶液中で反応させる方法で調製されることが多い。このとき、水溶液中のリポソームと基質間の反応性は、基質反応部位の電子密度や立体障害に大きく左右される。このため、表面修飾リポソームの調製には、①反応収率が数%程度であり修飾剤の利用率が低いこと、②反応するアミノ酸残基の選択性が不十分でありアミノ酸の配列が制限されること、③未反応の反応性官能基がリポソーム側に残存すること、などの問題点がある。さらに、医薬品としての開発を意図した場合、表面修飾された脂質の構造や純度確認など、品質の保証に解決すべき課題が残る。

上述の問題を根本的に解決するためには、ペプチドと脂質の複合体であるペプチド脂質をあらかじめ全合成し、これをリポソームに組み込むことが望ましい。そこで、ペプチド-脂質複合体の簡便な全合成に適した2種類の合成脂質アナログ¹⁻⁴⁾を設計し、その応用性を評価した。

2.1 ペプチド脂質の全合成と膜物性

2種類の脂質アナログの一般構造を図1に示した。ペプチド脂質 $\mathbf{1}$ は脂質部分を液相法によりあらかじめ合成した後、固相上で合成したペプチドと縮合した¹⁻³⁾。 $\mathbf{2}$ は固相上のペプチドのN末端に4ステップに分けて脂質分子の各部分を順次縮合する方法を用い、脂質部分も固相法で合成した⁴⁾。各構造は¹H-NMR, MALDI-TOFMSにより同定し、HPLCによりその純度を検証した。 $\mathbf{1}$ の脂質部分とオリゴペプチドの縮合収率は8~13%であり低値であった一方、 $\mathbf{2}$ の場合通算収率60%~80%の高収率で目的化合物が得られた。 $\mathbf{2}$ では脂質部分を4ステップ

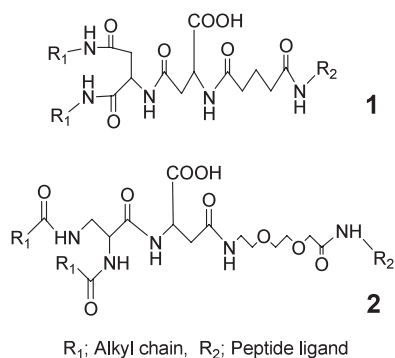


図1 ペプチド脂質の一般構造

に分けて基質の分子量を小さくしたため、固相上での立体障害が少なく良好な収率が得られたと考察された。簡便で高収率なペプチド-脂質複合分子の全合成ルートを確立することができた。

これらのペプチド脂質を用いてペプチド修飾リポソームを調製した。各ペプチド脂質をリポソームに組み込み整粒後、リポソームへの組み込み効率、粒子径、Zeta電位を評価し、漏出試験を行った。ペプチド脂質はミセルおよび単分子の溶解状態では存在せず、定量的にリポソーム膜に取り込まれていた。ペプチド脂質の修飾率は40 mol%を上限とし、高密度修飾が可能であった。また、リポソームは単分散で、ペプチド部分の電荷に由来すると思われる表面電荷を有していた。このリポソームは高分子量の蛍光物質を漏出させずに保持する性質が明らかとなった。

さらに、抗ペプチド抗体を用いてリポソームの免疫電子顕微鏡観察を行ったところ、金コロイドのリポソーム表面への分布が見られた。このことは修飾に用いたペプチドが、脂質膜中に埋没せず外水相に露出していることを示しており、ペプチド修飾リポソームが構築されているものと考えられた³⁾。

2.2 ペプチド修飾リポソームの細胞選択的な結合

上述のように構築したリポソームと培養細胞との結合実験を行った。ペプチド部分にインテグリンの認識部位であるRGD配列および黒色細胞刺激ホルモンである α -MSHを用いた。脂質アナログには $\mathbf{1}$ を用いてリポソームを調製した。リポソームには蛍光ラベルを施し、それぞれのペプチドのレセプターを発現する培養細胞(NIH3T3, B16メラノーマ)との結合および競合阻害をフローサイトメトリーで評価した。RGD配列を持つリポソームを作用させた細胞は、大きく蛍光強度が増加した。また、溶解型のRGDペプチドとRGD修飾リポソームを共存させたところ、競合阻害が観察された。このことは、リポソームがRGDレセプターを介して培養細胞と結合していることを強く示唆している^{1,3)}。また、B16メラノーマ細胞はRGD修飾リポソームと結合せず、 α -MSH修飾リポソーム選択的に結合活性を見せた。これらの事実は、本ペプチド修飾リポソームがレセプター介在性の細胞選択的な結合能力を有することを示している。ターゲティングDDSにお

いて重要な要素の一つである、細胞選択的な結合能を持つリポソームが構築できたと考察された。

2.3 細胞への取り込みと遺伝子発現の亢進

培養細胞への取り込み試験と遺伝子発現実験を行った。ペプチド部分に Protein transduction domain である HIV-TAT 配列および pH 依存的膜融合ペプチドである GALA 配列を用いた。脂質アナログには **2** を用いてペプチド脂質を合成し、リポソームを調製した。

HIV-TAT 配列による修飾は培養細胞への取り込みを亢進した⁴⁾。さらに、HIV-TAT に GALA 配列を共存させ二重修飾すると、細胞内に局在するリポソームが、細胞質全体に拡散して分布する現象が見られた。

さらに本リポソームの遺伝子導入能について、プラスミド DNA の発現効率で評価した。HIV-TAT 単独および GALA 単独では遺伝子発現が全く見られなかったのに対し、HIV-TAT と GALA を二重修飾した時のみ強い遺伝子の発現が認められた。また、この発現効率は Lipofectamine を上回る強力なものであった(図 2)。これらの結果は、HIV-TAT によりリポソームがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞内小器官の pH 低下により GALA による膜融合が生じてプラスミド DNA を細胞質に送達したことを示唆している。すなわち、リポソーム表面に配した複数のペプチドを同時に機能させたことで、効率的に遺伝子発現が得られたことを示している。

本方法では、任意の種類異なるペプチドを、高密度で修飾することが可能である。さらに、リン脂

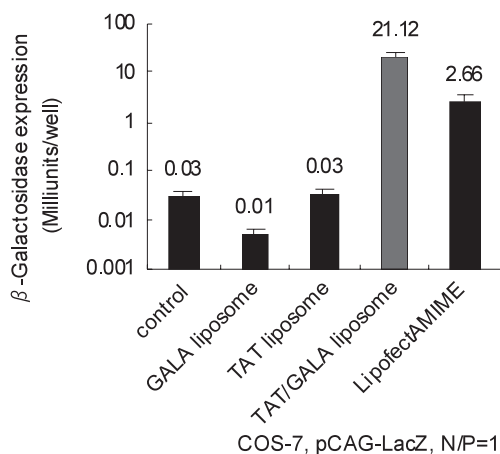


図 2 ペプチド修飾リポソームによる遺伝子発現の亢進

質類似の分子設計とすることで、高い物質保持効率を持つリポソームを構築することができた。本法により調製されたリポソームは、細胞認識、細胞内への取り込み、細胞質への移行などのペプチドに基づく異なる機能をリポソームに発現させることができた。複数の機能を同一のリポソームに付与できることは本法の大きな特長と考えられ、高度な機能制御が可能であると期待される。ターゲティング DDS のみならず、モレキュラーイメージングや分子生物学ツールとしての広範な利用が可能であると考えられる。

3. 静脈注射可能な核酸内包リポソーム技術； Wrapped Liposome

RNA 干渉は遺伝子発現を選択的かつ効果的に抑制できる新たな技術であり、既に培養細胞レベルおよび動物レベルで多くの知見が得られている。疾患治療への応用を考えても、siRNA は新たな薬効成分として有望である。特に転写因子や細胞内在抗原など、低分子薬物や抗体が狙いにくい標的に対する創薬が可能となることが大きな特徴である。既にいくつかの siRNA の臨床試験が試みられており、加齢黄斑変性を適応とした眼球への局所投与では有望な成績を挙げている。しかしながら、より広い適応疾患を得るためには、siRNA が静脈内投与された後に、体深部に存在する標的組織に効果的に送達されることが必要となる。すなわち、体内では容易に分解されてしまう siRNA を通常の注射剤と同等に全身投与でき、なおかつ高い認容性と安全性を持つ製剤技術の開発が必要となる。

3.1 Wrapped Liposome の性状と体内動態

siRNA の全身投与を可能とするため、弊社では新規のリポソーム技術である Wrapped Liposome (WL:図 3)を開発した⁵⁾。WL は脂質分子と siRNA から構成される。WL の粒子径は小さく均一に製し

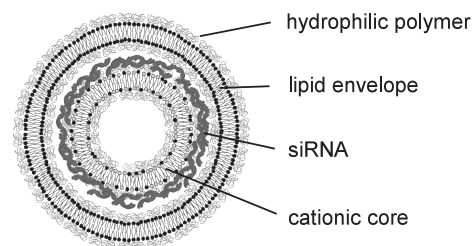


図 3 Wrapped Liposome の構造

てあり、siRNA は中性の脂質二重膜で完全に覆い込まれ、さらに粒子表面が親水性高分子によって保護されている。この構造は、WL に長い血中滞留性をもたらし、EPR 効果によって siRNA を血管透過性の亢進した腫瘍などの部位に集積させることを意図している。

WL は、カチオン性のコア粒子に siRNA を静電的に付着させ、その後有機溶媒中に分散させた中性脂質を添加し、さらにその有機溶媒濃度を水添加によって減じてゆくことで調製した。WL は溶液中で半透明かつ均一な状態で存在し、平均 100 nm 付近の単分散の粒子であった。静脈投与によるマウスでの血中半減期は約 18 時間と非常に長く、WL に内包された蛍光修飾 siRNA を体循環投与すると、siRNA は皮下に移植した固形腫瘍やレーザー障害網膜部位に顕著に集積することが明らかとなった。

3.2 Wrapped Liposome の抗腫瘍効果

Zinc finger 型転写因子である KLF5 は心血管系において組織リモデリングや血管新生⁶⁾、エネルギー代謝⁷⁾に重要な役割を果たす。KLF5 のヘテロ欠損マウスは腫瘍移植モデルにおける血管新生が顕著に抑制されており、この事実は KLF5siRNA によるノックダウンが血管新生を抑制する可能性を強く示唆する。そこで、KLF5siRNA/WL の血管新生抑制による抗腫瘍効果について検討した。

KLF5siRNA をヒト前立腺がん移植モデルおよびマウス肺癌移植モデルマウスに連日投与して抗腫瘍効果を評価した。対照群は、siRNA 水溶液および、ランダム配列の siRNA/WL 群とした。静脈投与した KLF5siRNA/WL は顕著な抗腫瘍効果を示し、対照群と比較した増殖抑制率は最大 70% に達した (図 4)。さらに、腫瘍組織中の mRNA およびタンパクの発現量を解析した。リアルタイム PCR および Western blot 法で解析したところ、コントロー

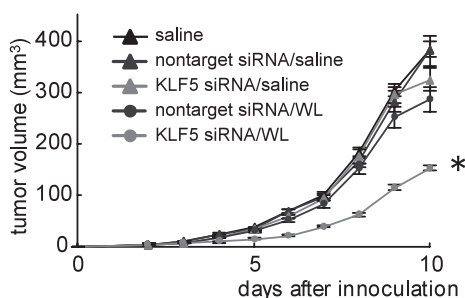


図 4 KLF5siRNA/WL の抗腫瘍効果

ル群を含む全ての投与群の中で KLF5siRNA/WL 群のみが KLF5 の発現を顕著に抑制した。さらに、投与 10 日後に腫瘍を摘出して CD31 免疫染色を行なったところ、腫瘍における血管新生が顕著に抑制されていた。一方、全投与群において体重減少は観察されず、腫瘍臓器に形態学的な変化は見られなかったことから、高い認容性を持つことが示唆された。

これらのデータは、静脈内投与した siRNA が、RNAi 効果を介して抗腫瘍効果を発現したことを示している。またこれらの結果から、KLF5 が腫瘍血管新生抑制に基づく抗腫瘍薬のターゲットとして有望であることも示された。

3.3 Wrapped Liposome の眼科学的応用

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は網膜及び脈絡膜の血管新生 (choroidal neovascularization; CNV) に重要な役割を果たす。現在、加齢黄斑変性を適応として VEGF カスケードを抑制する siRNA を硝子体内投与することによる CNV 抑制の臨床試験が行われている。静脈内投与は、硝子体内投与と比較して患者への侵襲性が低いメリットがあるため、WL を用いて siRNA を経静脈的に眼底へ送達し CNV を抑制する試みを行なった。

レーザー障害誘発マウス CNV モデルを作成し、蛍光修飾された siRNA/WL を投与したところ、脈絡膜血管新生部位に時間依存的に WL が集積することが確認された。また、送達された siRNA は 1 週間以上新生血管部位に残存することが明らかになった。眼科疾患への応用におけるターゲットとして、血管内皮細胞増殖因子受容体である Flt-1 を選択した。WL を用いて Flt-1siRNA を CNV モデルマウスに体循環投与したところ、網膜における血管新生を顕著に抑制することができた。

腫瘍および脈絡膜血管新生部位へ siRNA/WL が集積したことから、WL は血中に長時間滞留し、血管透過性の亢進した部位から漏出することで EPR 効果を発揮することが明らかになった。血管透過性の亢進した組織は、種々の固形腫瘍や炎症性疾患に見られる。すなわち、WL はこれらの疾患に対する有用な siRNA デリバリーシステムとなる可能性がある。siRNA は治療標的となる遺伝子を大きく拡げる可能性があるものの、有効なデリバリーシステムが存在しないことから、その治療応用は眼球等へ

の局所投与に限定されている。WLは静脈注射を経てsiRNAを送達し、疾患部位において治療的な遺伝子ノックダウンを起こす核酸ベクターであることが示された。

4. おわりに

筆者はこれまで、ペプチド脂質による脂質膜の機能化およびsiRNAのデリバリーシステムについて研究を行ってきた。製剤設計はなるべくシンプルになるよう心がけ、医薬品もしくは医薬品添加剤として臨床使用に耐えうる技術開発をコンセプトとしている。中長期的には、これらの技術がナノ診断およびイメージング分野、腫瘍の遺伝子治療分野、テーラーメイド医療への応用が可能であると考えている。筆者の専門分野は脂質を用いたナノバイオ研究である。これまで産・官・学の各機関で研究に携わった経験を生かし、トランスレーショナルリサーチを通じた国際競争力のあるナノバイオ産業の創出に微力ながら貢献したいと考えている。

末筆ながら、本研究を遂行するにあたりご指導を賜りました東邦大学薬学部（旧通産省生命研生体物質部長）・奥野洋明教授、東京大学医学部循環器内科・永井良三教授、眞鍋一郎講師、東京理科大学理工学部・小中原猛雄教授、産業技術総合研究所・小川昌克博士ならびに研究にご協力いただきました全ての方々に深く感謝申し上げます。また、これらの研究の一部は（独）医薬基盤研究所の資金援助を受けて行なわれたことを付記します。

引用文献

- 1) N. Yagi, Y. Ogawa, M. Kodaka, T. Okada, T. Tomohiro, T. Konakahara, H. Okuno, A surface-modified functional liposome capable of binding to cell membranes, *Chem. Commun.*, 1687–1688 (1999).
- 2) Y. Ogawa, H. Kawahara, N. Yagi, M. Kodaka, T. Tomohiro, T. Okada, T. Konakahara, H. Okuno, Synthesis of a novel lipopeptide with alpha-melanocyte-stimulating hormone peptide ligand and its effect on liposome stability, *Lipids*, **34**, 387–394 (1999).
- 3) N. Yagi, Y. Ogawa, M. Kodaka, T. Okada, T. Tomohiro, T. Konakahara, H. Okuno, Preparation of functional liposomes with peptide ligands and their binding to cell membranes, *Lipids*, **35**, 673–680 (2000).
- 4) N. Yagi, Y. Yano, K. Hatanaka, Y. Yokoyama, H. Okuno, Synthesis and evaluation of a novel lipid-peptide conjugate for functionalized liposome, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **17**, 2590–2593 (2007).
- 5) M. Yamauchi, H. Kusano, E. Saito, T. Iwata, M. Nakakura, Y. Kato, N. Aoki. Development of wrapped liposomes: Novel liposomes comprised of polyanion drug and cationic lipid complexes wrapped with neutral lipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1758**, 90–97 (2006).
- 6) T. Shindo, I. Manabe, Y. Fukushima, K. Tobe, K. Aizawa, S. Miyamoto, K. Kawai-Kowase, N. Moriyama, Y. Imai, H. Kawakami, H. Nishimatsu, T. Ishikawa, T. Suzuki, H. Morita, K. Maemura, M. Sata, Y. Hirata, M. Komukai, H. Kagechika, T. Kadowaki, M. Kurabayashi, R. Nagai. Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling, *Nat. Med.*, **8**, 856–863 (2002).
- 7) Y. Oishi, I. Manabe, K. Tobe, M. Ohsugi, T. Kubota, K. Fujiu, K. Maemura, N. Kubota, T. Kadowaki, R. Nagai, SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR- δ , *Nat. Med.*, **14**, 656–666 (2008).