

氏 名	いし わた ひで き 石 渡 英 樹
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 392 号
学位授与の日付	平成 9 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科製薬化学専攻
学位論文題目	Studies on Physicochemical Characteristics of Poly (ethylene glycol) Modified Liposomes and Uptake by Cultured Cells (ポリエチレングリコール修飾リボソームの物理化学的性質と培養細胞による取り込みに関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教授 宮嶋孝一郎 教授 中川照眞 教授 川寄敏祐

論 文 内 容 の 要 旨

リボソームは、リン脂質、コレステロールなどを主成分とした脂質二重層より成る閉鎖小胞である。このリボソームを薬物運搬体として用いた場合、薬物の徐放化や毒性の軽減化等の効果を示す。さらに、リボソームは、薬物の標的指向化を担う薬物運搬体として期待されている。通常のリボソームは生体内に静脈投与されると血液中から速やかに消失し、肝臓、脾臓に集積する。この体内挙動は、標的部位が肝臓や脾臓の場合は有利に働くが、それらの臓器以外が標的部位である場合には、解決すべき問題点となる。そこで、本研究において、肝臓、脾臓への集積を回避するリボソームの開発を目的とし、リボソーム表面をポリエチレングリコール (PEG) で修飾する方法を開発した。PEG 修飾に用いる素材として、コレステロールの3位の水酸基にPEG鎖をエーテル結合させた化合物 (PEG-Chol) を用い、その物性を明らかにした。また、PEG修飾リボソームを薬物運搬体として用いるために必要な物理化学的性質、体内動態について評価した。さらに、リボソームが細胞に取り込まれる過程に対しPEG修飾が与える影響とPEG-Cholの生理作用について、培養細胞を用いる基本的手順を確立し、幾つかの細胞生物学的新知見を得た。

第1章 PEG修飾リボソームの薬物運搬体としての性質

リボソームは、卵黄レシチン (EPC) を基本脂質として調製し、extrusion法により平均粒子径を200nm前後に揃えた。コントロールのリボソームには、コレステロール (Chol) を25mol%膜組成に加えたEPC/Cholリボソームを用いた。PEG修飾リボソームは、PEG-Chol及びCholを必要に応じて添加し調製した。PEG-Cholは、PEGの平均附加モル数が50, 100, 200のものを用いた。これらの化合物は、臨界ミセル濃度が数 μM 以下の両親媒性分子であった。PEG-Cholの添加量が、10mol%以下の場合、ほぼ全てのPEG-Chol分子が膜中に分配したリボソームが調製された。一方、添加量が10mol%を越え

ると、水相中にも PEG-Chol 分子が存在するリポソーム懸濁液が調製された。

粒径 200nm 前後のリポソームは、多重膜よりなる。PEG 修飾リポソームでは、粒子あたりの平均膜枚数が減少したことから、リポソーム膜間の相互作用に PEG 鎖による立体障害が作用することを見出した。

PEG 修飾リポソームは、コントロールと同程度の保持容積をもち、その内水相に十分な量の薬物を内封することができることを明らかにした。また、PEG 修飾リポソームを血清または血漿とインキュベートした場合、内封された高分子は安定に保持されていたが、低分子では血清との混合時に一過性の漏洩がみられた。これより、PEG 修飾リポソームの内封物保持機能は、内封物のサイズに依存することを見出した。

EPC/Chol リポソームをラットに静脈より投与したところ、血液中から速やかに消失し、主に肝臓に集積した。PEG 修飾リポソームでは、肝臓への集積が著しく減少し、血中滞留量が増加した。すなわち、PEG 修飾リポソームは、肝臓への集積性が著しく改善された薬物運搬体であり、肝臓以外への標的指向化に応用することが可能である。この変化は、PEG の鎖長が長いほど、また PEG-Chol の添加量が多いほど顕著であった。

第2章 培養細胞によるリポソームの取り込みに与える PEG 修飾の影響

肝細胞によるリポソームの取り込みは、一般的にマクロファージ (Kupffer 細胞) による場合が検討されてきた。しかし、実質細胞の関与する例も報告されており、マクロファージと実質細胞とを比較検討する必要がある。そこで、マクロファージ様細胞 J774、ヘパトーマ細胞 HepG2 を用い、リポソームとの相互作用に対する PEG 修飾の効果を検討した。EPC/Chol リポソームの集積は、食細胞ではない HepG2 細胞においても効率よく起こり、J774 細胞と同程度であった。しかし、J774 細胞では、アクチンに依存したリポソームの内化が観察されたが、HepG2 細胞では、大部分のリポソームが細胞表面に吸着したままであり、リポソームの集積には両細胞間に質的な違いがあることを見出した。PEG 修飾リポソームの集積は、EPC/Chol リポソームと比べ、J774 細胞、HepG2 細胞ともに減少した。また、細胞表面に吸着したリポソームの量も、両細胞において、PEG 修飾により減少した。さらに、4°C でインキュベートしたときのリポソームの集積でも PEG 修飾による減少がみられた。これらの結果から、PEG 修飾リポソームは、細胞表面への非特異的な吸着が少ないため、細胞への集積が減少することを明らかにした。

生体内では、血液中の蛋白質 (オプソニン) がリポソームの肝臓への集積を促進する。アポリボタンパク質 E (apoE) を単独で培地に添加した場合、EPC/Chol リポソームの両細胞による取り込みは増加した。しかし、PEG 修飾リポソームでは、両細胞による取り込みに変化はみられないことから、apoE が媒介する細胞への集積は起こらないことを見出した。

PEG 修飾リポソームを調製したとき、その水相中に PEG-Chol 分子が存在する場合があるため、PEG-Chol 分子が培養細胞に与える影響について検討した。PEG-Chol の蛍光標識誘導体を合成し、培地中の PEG-Chol 分子が細胞に分布することを明らかにした。リポソームの細胞への集積は、PEG-Chol が細胞に分布することにより J774 細胞、HepG2 細胞ともに減少した。この減少は、4°C でもみられた。しかし、細胞のエンドサイトーシス (30°C での液相の取り込み) は、J774 細胞では抑制され

たのに対し、HepG2 細胞では全く影響されなかった。これらの結果より、細胞に分布した PEG-Chol 分子は、リポソームが細胞に吸着する過程を妨害することを明らかにした。

第3章 培養細胞の物質の取り込みに与える PEG-Chol 分子の影響

PEG-Chol の蛍光標識誘導体が、線維肉腫細胞 HT-1080 の細胞膜に分布することを示し、定量した。PEG-Chol の分布は、その Chol 部位が細胞膜の疎水性部に差し込まれることが原因であり、血清中のリポタンパク質への分配が細胞膜への分布と競合することを明らかにした。また、PEG-Chol は、細胞のコロニー形成能には全く影響を与えず、細胞毒性を示さないことを明らかにした。

PEG-Chol は濃度依存的に、HT-1080 細胞の液相の取り込みを抑制した。しかし、液相の取り込み抑制が充分起こる PEG-Chol の濃度においても、上皮増殖因子 (EGF) や、トランスフェリン (Tfn) の受容体に対する抗体の取り込みは影響されなかった。しかし、Tfn の取り込み抑制が観察された。また、EGF が細胞内に入り、リソゾームで分解後、排出される過程にも影響はみられなかった。これらのことから、PEG-Chol は、細胞表面に分布し、その表面濃度が高まると、クラスリン非依存性のエンドサイトーシスを抑制するが、受容体のエンドサイトーシスそのものには影響を与えないこと、特定のリガンド-受容体相互作用が変化することを明らかにした。

以上、PEG-Chol を用い、肝臓による取り込みを回避するリポソームを開発した。また、リポソームが肝臓による取り込みを回避するためには、細胞表面への吸着が少ないことが必要であることを明らかにした。さらに PEG-Chol 自体が、細胞のエンドサイトーシスに影響を与えることを示した。これらの知見は、リポソームのみならず他の薬的運搬体においても有用な情報となると思われる。

論文審査の結果の要旨

リポソームは薬物運搬体として期待されているが静脈投与した場合、肝臓・脾臓に集積し、血中から速かに消失する。これらの臓器への移行を回避する目的でリポソームの表面をコレステロールの3位の水酸基にポリエチレングリコール (PEG) をエーテル結合させた化合物 (PEG-Chol) を用いて修飾したリポソームを作り、その物理化学的性質、体内動態、細胞に取り込まれる過程に及ぼす修飾の影響を明らかに、PEG-Chol 自身の生理作用についても培養細胞を開いて明らかにした。

リポソームは卵黄レシチン (EPC) を基本脂質とし、これにコレステロール (Chol) または PEG-Chol を加え粒径 200nm のリポソームとした。PEG-Chol の添加量が少いときは、PEG-Chol は全て膜中に分配されたが、多いときはリポソーム懸濁液中に PEG-Chol 分子が存在する。これらリポソームを静脈投与後肝臓への集積が著しく減少し血中滞留性が高上した。この変化は PEG 鎖長が長い程、PEG 添加量が多い程顕著であった。

この原因を明らかにするために、マクロファージ様細胞 J774、ヘパトーマ細胞 HepG2 を用いて、リポソームとの相互作用を検討した。EPC-Chol リポソームは両細胞に集積したが、アクチンに依存したリポソームの内在化は J774 細胞のみに見られ、集積の質的差が明らかになった。PEG 修飾リポソームはいず

れの温度 (4°C, 37°C), いずれの細胞についても集積量の減少が見られた。これらの結果から PEG 修飾リポソームは細胞表面への非特異的吸着が少ないため細胞への集積が減少することを明らかにした。

水相に存在する PEG-Chol 分子の影響を見るために PEG-Chol の蛍光誘導体を合成し培地中の PEG-Chol が細胞に分布することを明らかにした。リポソームの細胞への分布はいずれの温度, いずれの細胞でも PEG-Chol 分子の存在下で減少した。すなわち細胞に分布した PEG-Chol 分子はリポソームが細胞に吸着される過程を妨害することを明らかにした。PEG-Chol 分子が線維肉腫細胞 HT-1080 の細胞膜に分布することをその蛍光標識体を用いて明らかにした。また血清中のリポタン白質への分配が細胞膜への分布と競合すること, 細胞毒性を示さないことを明らかにした。

PEG-Chol は濃度依存的に HT-1080 細胞の液相取り込みを抑制したが, この濃度でも上皮細胞増殖因子 (EGF) やトランスフェリン (Tfn) の受容体に対する抗体の取り込みに影響を与えず, Tfn の取り込みを抑えた。また EGF が細胞に入りリソゾームで分解後, 排出される過程にも影響は見られなかった。これらの事から PEG-Chol は細胞表面に分布し, クラスリン非依存形のエンドサイトーシスを抑制し, 受容体のエンドサイトーシスには影響を与えないことがわかった。

以上 PEG-Chol を用い肝臓取り込みを回避するリポソームを開発し, その機構および PEG-Chol 自体の効果を明らかにした。これらの知見はリポソームのみならず他の薬物運搬体についても有用な情報を与えると考えられ, 博士 (薬学) として価値あるものと認める。更に平成 9 年 3 月 3 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。