

非2分子膜型新規脂質ナノ粒子の形成と

その医薬品製剤機能の解明

(1 2 4 7 0 4 8 8)

平成12年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(B)(2)）

研究成果報告書

平成16年5月

研究代表者 半田哲郎

（京都大学薬学研究科）

京都大学図書



1040940780

附属図書館

は し が き

本研究では、

- (1) まず、非2分子膜型脂質ナノ粒子である脂質エマルジョン（リン脂質単分子膜型ナノ粒子）の表面膜ならびにコア構造が血漿アポリポタンパクとの相互作用に及ぼす効果を調査し、動物体内の挙動の制御と医薬品製剤機能に関する基礎的性質を解明した。すなわち、単分子膜型のエマルジョンは2分子膜型のリポソームに比べ、表面のリン脂質分子がより広い間隙をもって配置されており、apoA-1 や apoE などの血漿アポリポタンパクは2分子膜型のリポソームに比べ、約10倍も多く結合した。これは、エマルジョン表面リン脂質であるレシチンとコア中性脂質であるトリグリセライドのアシル鎖が互いに指組状に相互作用し、アシル鎖の運動を抑制すると同時に表面のリン脂質極性基間スペースを広げるためであることを、時間分解蛍光異方性や NMR 測定などの生物物理化学的研究に基づき明らかにした。すなわち、血漿アポリポタンパクは両親媒性ヘリックスにより構成されているが、この両親媒性ヘリックスの疎水面がエマルジョン表面のレシチン分子の配置とよく適合することが示された。この結果、エマルジョンはリポソームに比べ、動物体内の代謝や肝細胞との相互作用がより昂進されることが明らかにされた。エマルジョン表面膜のレシチンの一部をスフィンゴミエリンあるいはコレステロールに、コアのトリオレインをコレステリルエステルや中鎖トリグリセライドに置換すると表面膜の構造が変化し、アポリポタンパクの結合や活性に影響し、細胞や動物体内組織との相互作用も著しく変化することも示された。
- (2) 次に、両連続性キュービック構造やヘキサゴナル構造を内部に持つ新規水中分散ナノ粒子、キューボソームとヘキサゾームの調製法とを確立、その構造を精査した。また、血漿タンパクとの相互作用を調査し、動物体内挙動の制御と医薬品製剤機能を解明した。すなわち、モノオレイン、ジオレイン、オレイン酸、レシチンの組成の組み合わせにより、種々の非2分子膜型液晶構造が生成することを X 線小角散乱法に基づき明らかにした。次に、プルロニック系ポリマー型界面活性剤（Pluronic F127）を用い、これらの液晶を水中に 100 - 200 nm の粒子として安定に分散

させることに成功した。分散粒子（キュボソーム、ヘキサソーム）の内部構造を X 線小角散乱、時間分解蛍光異方性や NMR 測定に基づき明らかにするとともに、動物血漿成分との相互作用も調査した。キュボソーム、ヘキサソームは、内部に両連続性キュビック液晶やヘキサゴナル液晶構造を持つナノ粒子であること、粒子コアには外の水溶液が浸透すること、脂質の分子運動がリポソームやエマルジョン中と異なり逆円錐型のダイナミック構造をもつこと、血漿中のアルブミンや HDL はキュボソームやヘキサソームと強く相互作用してその崩壊を促進することが明らかにされた。

これらの成果より、体内代謝や分布の制御された非 2 分子膜型粒子、脂質エマルジョン、脂質キュボソームおよび脂質ヘキサソームの製造と医薬品製剤としての応用に関する基礎的知見を得ることができた。

研究組織

研究代表者： 半田 哲郎 （京都大学薬学研究科）

研究分担者： 中野 実 （京都大学薬学研究科）

交付決定額（配当額）

（金額単位：千円）

	直接 経費	間接 経費	合計
平成12年度	6,800	0	6,800
平成13年度	2,300	0	2,300
平成14年度	2,300	0	2,300
平成15年度	2,500	0	2,500
総計	13,900	0	13,900

研究発表

(1) 学会誌等 (平成13年1月—平成16年4月)

S. Morita, K. Kawabe, A. Sakurai, A. V-Doi, M. Nakano, T. Handa, Ceramide in lipid particles enhances heparan sulfate proteoglycan and low density lipoprotein receptor-related protein-mediated uptake by macrophages. *J. Biol. Chem.* *in press* (2004).

W. Leesajakul, M. Nakano, A. Taniguchi, T. Handa, Interaction of cubosomes with plasma components resulting in the destabilization of cubosomes in plasma, *Colloid Surf. B-Biointerfaces* **34** (4), 253-258 (2004).

K. Okuhira, M. Tsujita, Y. Yamauchi, S. Abe-Dohmae, K. Kato, T. Handa, S. Yokoyama, Potential involvement of dissociated apoA-I in the ABCA1-dependent cellular lipid release by HDL, *J. Lipid Res.* **45** (4), 645-652 (2004).

S. Morita, K. Okuhira, N. Tsuchimoto, A. V-Doi, H. Saito, M. Nakano, T. Handa, Effects of sphingomyelin on apolipoprotein E- and lipoprotein lipase-mediated cell uptake of lipid particles, *Biochim. Biophys. Acta* **1631** (2), 169-176 (2003).

M. Nakano, Y. Nakatani, A. Sugita, T. Kamo, T. Natori, T. Handa, Interaction of hydrated α -galactosylceramide with nonionic surfactants and formation of dispersions including gel phases, *Langmuir* **19** (11), 4604-4608 (2003).

M. Yamamoto, S. Morita, M. Kumon, M. Kawabe, K. Nishitsuji, H. Saito, A. V-Doi, M. Nakano, T. Handa, Effects of plasma apolipoproteins on lipoprotein lipase-mediated lipolysis of small and large lipid emulsions, *Biochim. Biophys. Acta*, **1632** (1), 31-39 (2003).

M. Tanaka, H. Saito, I. Arimoto, M. Nakano, T. Handa, Evidence for interpenetration of core triglycerides into surface phospholipid monolayers in lipid emulsions, *Langmuir* **19** (13), 5192-5196 (2003).

S. Morita, M. Kawabe, M. Nakano, T. Handa, Pluronic L81 affects the lipid particle sizes and apolipoprotein B Conformation, *Chem. Phys. Lipids* **126** (1), 39-48 (2003).

T. Kamo, M. Nakano, W. Leesajakul, A. Sugita, H. Matsuoka, T. Handa, Nonlamellar liquid crystalline phases and their particle formation in the egg yolk phosphatidylcholine/diolein system, *Langmuir* **19** (22), 9191-9195 (2003).

G. Gorbenko, T. Handa, H. Saito, J. Molotkovsky, M. Tanaka, M. Egashira, M. Nakano, Effect of cholesterol on bilayer location of the class A peptide Ac-18A-NH₂ as revealed by fluorescence resonance energy transfer, *Eur. Biophys. J.* **32** (8), 703-709 (2003).

M. Nakano, T. Teshigawara, A. Sugita, W. Leesajakul, A. Taniguchi, T. Kamo, H. Matsuoka, T. Handa, Dispersions of liquid crystalline phases of the monoolein/oleic acid/pluronic F127 system, *Langmuir* **18** (24), 9283-9288 (2002).

M. Egashira, G. Gorbenko, M. Tanaka, H. Saito, J. Molotk, Cholesterol modulates Interaction between an amphipathic class A peptide, Ac-18A-NH₂, and phosphatidylcholine bilayers, *Biochemistry* **41** (12), 4165-4172 (2002).

E. Okamura, T. Kimura, M. Nakahara, M. Tanaka, T. Handa, H. Saito, ¹³C NMR method for the determination of peptide and protein binding sites in lipid bilayers and emulsions, *J. Phys. Chem. B* **105** (50), 12616-12621 (2001).

M. Nakano, A. Sugita, H. Matsuoka, T. Handa, Small-angle X-ray scattering and ¹³C NMR investigation on the internal structure of "Cubosomes", *Langmuir* **17** (13), 3917-3992 (2001).

T. Baba, H. Minamikawa, M. Hato, T. Handa, Hydration and molecular motions in synthetic phytanyl-chained glycolipid vesicle membranes, *Biophys. J.* **81**, 3377-3386 (2001).

G. Gorbenko, H. Saito, J. Molotkovsky, M. Tanaka, M. Egashira, M. Nakano, T. Handa, Resonance energy transfer study of peptide-lipid complexes, *Biophys. Chem.* **92**, 155-168 (2001).

T. Handa, Stability and Plasma Apolipoprotein binding of lipid emulsions, *Food Hydrocolloids* **15**, 277-283 (2001).

H. Saito, M. Tanaka, E. Okamura, T. Kimura, M. Nakahara, T. Handa, Interactions of phosphatidylcholine monolayers with triglyceride core and enhanced apoA-1 binding in lipid emulsions, *Langmuir* **17** (8), 2528-2532 (2001).

H. Saito, K. Okuhira, T. Tsuchimoto, A.S. V-Doi, C. Tsuchimoto, T. Tanimoto, S. Okada, T. Handa, Modulation of apolipoproteinE mediated plasma clearance and cell uptake of emulsion particles by cholesterol ester, *Lipids* **36**, 27-33 (2001).

(2) 口頭発表

国際学会

M. Nakano, A. Sugita, T. Teshigawara, T. Handa, Preparation and structural investigation of cubosomes and hexosomes - Lipid nanoparticles including liquid crystalline phases, 14th Surfactant In Solution Symposium, June 9-14, 2002 (Barcelona)

A. Sugita, M. Nakano, T. Teshigawara, T. Handa, Characterization of cubosomes and hexosomes by small angle X-ray scattering ¹³C NMR, and time-resolved fluorescence anisotropy, 14th Surfactant In Solution Symposium, June 9-14, 2002 (Barcelona)

T. Handa, A. V-Doi, Core lipid modulates plasma clearance and cell uptake of emulsion particles, 3rd world Congress On Emulsion, September 24-27, 2002 (Lyon)

M. Nakano, A. Sugita, T. Teshigawara, A. Taniguchi, T. Handa, Structural Investigation of Lipid Nanoparticles Including Liquid Crystalline Phases, Gordon Research Conference of Chemistry of Supramolecules and Assemblies, July 29- August 3, 2001 (New London, Connecticut)

国内学会

森田真也、河邊美砂、桜井敦司、中野実、半田哲郎、スフィンゴミエリナーゼ

によるマクロファージの脂質粒子取り込み亢進、第45回日本脂質生化学会、
2003年6月20-21日(仙台)

奥平桂一郎、半田哲郎、山内祥生、堂前純子、横山信治、Lipid-free, lipid-bound
apoA-1 と細胞との相互作用 —脂質搬出機構のメカニズム解析—、第44回
日本脂質生化学会、2002年6月14-15日(東京)

坂本淳、田中将史、森田真也、斎藤博幸、中野実、半田哲郎、アポリポ蛋白質
A-1 モデルペプチドが誘起するフォスファチジルコリンスフィンゴミエリン
混合2分子膜の構造変化、第25回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、
2003年11月13-14日(金沢)

西辻和親、森田真也、斎藤博幸、中野実、半田哲郎、リポ蛋白質リパーゼによ
る脂質単分子膜のリポリシスにおける脂質組成、表面圧の影響、第25回生体
膜と薬物の相互作用シンポジウム、2003年11月13-14日(金沢)

加茂倫有、Warunee Leesajakul, 中野実、半田哲郎、ジアシルグリセロールが誘起
する非2分子膜液晶の構造評価とその微粒子化、第25回生体膜と薬物の相互
作用シンポジウム、2003年11月13-14日(金沢)

他 27件(2000年11月—2004年3月)

(3) 出版物

T. Baba, H. Minamikawa, H. Hato and T. Handa, Permeation property and
intramembrane environments of synthetic phytanyl-chained glyceroglycolipid
membranes, in "Planar Lipid Bilayers And Their Applications" pp.604-631, Ed. H.T.
Tien, A. O-Leitmannova, Elsevier Science B.V. 2003

H. Saito, I. Arimoto, T. Handa, Lipid emulsions: Formation, stability, and metabolism,
in "Encyclopedia of Surface and Colloid Science" pp3087-3097, Marcel Dekker, Inc.
2002