

がん細胞で薬剤を放出する pH 応答性 i-motif 修飾脂質キャリアのデザイン

渡 邊 望 美*

Design of pH-responsive I-motif Coated Lipid Carrier for Cancer Treatment

Nozomi WATANABE*

Liposomes have been developed as carriers for drug delivery systems to efficiently deliver drugs to target cells with high safety due to their biocompatibility. Recently, modification of DNA on vesicles such as liposomes has been studied, and is expected to be applied to DDS since it facilitates cellular uptake. On the other hand, there remains a problem in controlled release in target cells. In this study, we developed liposomes that release drugs under acidic conditions around cancer cells. I-motif DNA was modified on the liposome surface using a chemical modification method based on Click Chemistry. I-motifs form a quadruplex structure in response to ambient pH. The formed quadruplex structure is assumed to change the packing density of the membrane, leading to the release of the drug. We investigated the pH-sensitivity of drug release in this novel liposome.

1. 緒言

リポソームは脂質分子が自己集合した脂質二重膜で形成されるベシクル小胞である。このリポソームは高い生体適合性を有しており、脂質二重膜の柔軟性や流動性から、バイオセンサー、薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) などへの応用が期待されている¹。DDS においては、目的の薬物送達のための脂質キャリアや抗がん剤を直接投与する場合と比較して、抗がん剤の拡散を防ぎ、正常細胞への副作用を軽減する可能性が期待されている²。また、抗がん剤をベシクル膜内に封入した方が、薬効が高くなるという研究結果が得られており^{3,4}、効率的かつ安全的に薬剤をがん細胞へと送達するキャリア分子としての期待が高まっている。一方で、標的の細胞・組織において選択的に薬剤を放出する能力には課題が残り、安全性の観点からも改善が求められている。

本研究では、がん細胞周辺の酸性条件下において薬剤を放出するリポソームの開発に取り組んだ。Click Chemistry による化学修飾法⁵を用いて i-motif DNA をリポソーム表面に修飾した(図 1)。i-motif は周囲の pH に応答して形成される四重鎖構造の核酸であり、形成された四重鎖構造が膜のパッキング密度を変化させ薬剤放出に繋がると予測される。修飾リポソームにおける薬剤放出の pH 応答性について検討した。

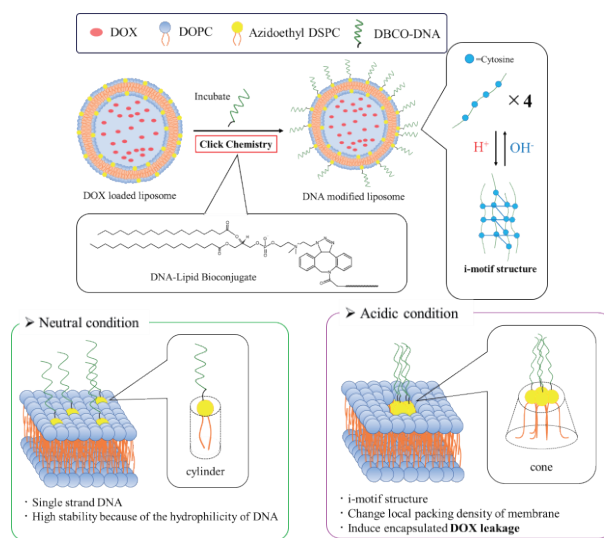


図 1 i-motif 修飾リポソームと pH 応答による膜の変化。

2. i-motif 核酸修飾リポソームの調製

最終のリポソーム溶液の脂質濃度が 5 mM となるように、Chloroform に溶解した DOPC と Azidoethyl DSPC を物質比 9:1 で混合し、エバポレーターで Chloroform を留去し、均一な脂質薄膜を形成させた。この脂質薄膜に 300 mM pH 7.4 ammonium sulfate 水溶液を所定量加え、凍結融解操作ののち、リポソーム溶液を孔径 100 nm のポリカーボネート膜を用いて粒子径を揃えた。超遠心により外水相を置換後、リモートローディングによって薬剤分子 (Doxorubicin, DOX) を内封した¹。内封後のサンプルを超遠心分離し、得られた上澄み液とローディングに用いた元々の DOX HCl 水溶液について蛍光スペクトルを測定し、内封効率を計算した結果、98.6-98.8% と高い内封効率を示した。図 2 に薬物を内封し超遠心後のリポソームの写真を示す。



図 2 i-motif 修飾リポソーム (オレンジは DOX の色)。

2023年2月22日 受理

* 豊田理研スカラー

大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻

薬物内封後のリポソームに Dibenzylcyclooctyne (DBCO)を修飾した DNA (Integrated DNA Technologies 製)を混合してインキュベートした。DBCO のアルキンと Azidoethyl DSPC のアジドが付加環化反応を起こし、トリアゾールを形成することにより、リポソーム表面上へと DNA が修飾される。この手法では、細胞毒性を有する銅触媒を使用しないため、生体適合性に優れている⁵。i-motif 形成能と薬物放出の挙動を評価するため、鎖長・配列の異なる 4 種類の核酸(C₁₀, C₂₅, C₄₀, C₅(T₂C₅)₃)を用いて評価した。また、核酸修飾後のζ電位を測定した結果、未修飾のものがζ電位の値が 0 付近であったのに対し、修飾後のリポソームは核酸に由来する負の値を示し、DNA 修飾を確認した。

3. i-motif 形成能と放出率の関係

Cytosine のみの塩基配列から構成される C₁₀, C₂₅, C₄₀ を修飾したリポソームにおいては、酸性条件下で DOX の放出率が増大したが、円偏光二色性(CD)スペクトルにおける 290 nm 付近の i-motif 構造特有のピークの pH 間で pH と CD ピークに対応が見られなかった。また、動的光散乱法 (DLS) を用いて粒子径を調べると、酸性条件下においてリポソームの凝集が確認された。従って、これらのサンプルでの DOX 放出は i-motif 構造の形成ではなく、リポソームの凝集により誘起されたと考えられる。i-motif 構造の四重鎖は異なる方向の Cytosine 鎖 2 本ずつから成るが、修飾された DNA は同一方向である。そのため、単一のリポソーム上ではなくリポソーム間で i-motif 構造を形成し凝集が促進されたと考えられる。

Cytosine の間に Thymine を含む C₅(T₂C₅)₃ の DNA を修飾したリポソームは、通常組織周辺での pH 7.4 において DOX は放出されず安定であった。一方で、がん細胞周辺での pH 5.4 において高い DOX 放出率を示した(図 3(上))。さらに、放出率の高い pH 5.4 において i-motif 構造に特有の CD スペクトルピーク(290 nm 付近)が確認された(図 3(下))。リポソームの凝集による粒子径の増大も確認されなかった。以上の結果より、C₅(T₂C₅)₃ を修飾したリポソームでは pH 応答性をもつ i-motif 構造の形成により、内封された DOX の放出が制御されたといえる。

研究計画では i-motif 構造をリポソームの粒子上で形成させ、それにより膜のパッキング密度の変化を誘起し、薬剤を放出させることを想定していた。しかし、i-motif 構造の形成には、3'→5'の DNA 鎖 2 本と 5'→3'の DNA 鎖 2 本が必要であり、今回の実験ではリポソーム表面に修飾した DNA 鎖の向きが揃っていたことから、リポソーム上での i-motif 構造が形成されにくい条件であった。3'側に DBCO 基が修飾された DNA 鎖と 5'側に DBCO 基が修飾された DNA 鎖を等量混合することによって、リポソーム上での i-motif 構造の形成と制御について、現在検討中である。また、本研究では、DNA 修飾の割合を一定にしているが、DNA 修飾の割合の変化はリポソームを構成する脂質分子の組成の変化となり、膜の流動性や薬物放出効率に影響すると予想されることから、今後 DNA 修飾の割合を変更することによる DOX 放出挙動への影響も調査したい。

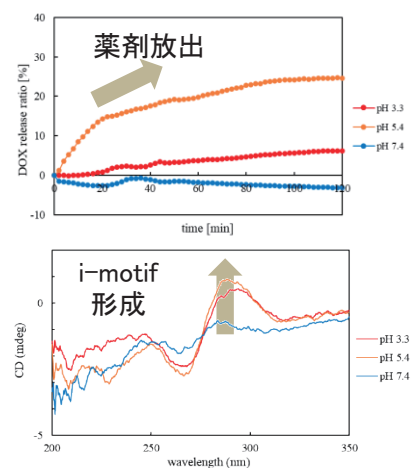


図 3 (上) 各 pH における薬剤放出能評価、(下) i-motif 核酸構造の確認。

4. 謝辞

本研究は公益財団法人豊田理化学研究所からのご支援のもとで遂行されたものであり、ここに深く感謝申し上げます。また、本研究の遂行にあたり、数々のご助言を賜りました大阪大学大学院基礎工学研究科物質創成専攻の馬越大先生、岡本行広先生、並びに実験を実施した大阪大学基礎工学部化学応用科学科渡邊和宏氏に厚く御礼申し上げます。

REFERENCES

- 1) A. Fritze, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.*, **1758**, **10**, 1633-1640.
- 2) S. Vrignaud, *et al.*, *Biomaterials*, **32**, **33**, 8593-8604.
- 3) D. H. Shin, *et al.*, *Macromol. Res.*, **22**, **3**, 344-355.
- 4) S. Fan, *et al.*, *New J. Chem.*, **46** (2022) 17696-17703.
- 5) B. Meckes, *et al.*, *Small*, **14**, **5**, 1702909.