

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07915

研究課題名(和文) リポタンパク質受容体を介したリポソームの細胞内動態の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism of intracellular uptake of liposomes mediated by lipoprotein receptors

研究代表者

加藤 くみ子 (Sakai-Kato, Kumiko)

国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・室長

研究者番号：10398901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、HepG2細胞を用い、PEG修飾リポソームとリポタンパク質受容体との相互作用に焦点を当て、PEG修飾リポソームの細胞内取り込みの分子メカニズムをより詳細に解析した。HepG2細胞に蛍光標識したPEG修飾リポソームを添加し、リポソームがエンドサイトーシスで取り込まれることが示唆された。リポタンパク質受容体の働きを阻害することにより、リポソームの取り込みが減少したことから、本研究で用いたリポソームのHepG2細胞への取り込みにリポタンパク質受容体の関与が示唆された。さらに、受容体によるリポソームの認識には、アポリポタンパク質が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the interaction of PEGylated liposomes carrying fluorescently labeled cholesterol with lipoprotein receptors and the subsequent intracellular uptake were evaluated using HepG2 cells, an in vitro model system for human hepatocytes. Blocking lipoprotein receptors resulted in the decrease in the intracellular uptake of the labeled liposomes, which indicates the involvement of lipoprotein receptors in the liposome internalization. Liposomes modified with apolipoproteins were internalized in HepG2 cells in FBS-depleted culture medium at the same levels as unmodified liposomes in FBS-containing culture medium, which indicates that apolipoproteins were the major serum components involved in liposomal binding to lipoprotein receptors.

研究分野：物理系薬学

キーワード：リポタンパク質受容体 アポリポタンパク質 リポソーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、製剤に機能を持たせ、生体内安定性、放出性、標的指向性、体内動態等を調節することにより、有効性、安全性を高める製剤技術の重要性が増している。リポソームの設計に当たっては、単に病変組織に集積し細胞外で有効成分を放出させるだけでなく、細胞内に取り込まれ細胞内で有効成分を放出することにより薬理作用を増強させ、より有効性、安全性の高い製剤設計が指向されている。このような細胞内への送達は、キャリア内水相に核酸や遺伝子を封入した製剤では、より不可欠な要素となる。一方、頻回投与と製剤ではキャリア成分の蓄積性が安全性を左右する因子となりうるため、有効成分はもちろんのことキャリア成分も含めた細胞内動態に関する知見が重要となる。

我々は、100nm のサイズを有するリポソームを複数種類作製し、その細胞内動態や関与する内因性タンパク質を明らかとしてきた。また、細胞内へのリポソームの取り込みは主としてクラスリン依存性エンドサイトーシスによることを明らかとした。クラスリン依存性エンドサイトーシスは受容体依存性エンドサイトーシスである。従って、何らかの受容体を介したリポソームの取り込み機構が想定された。我々は、ポリエチレングリコール(PEG)修飾リポソームの細胞内動態にコレステロール等の脂質を運搬する内因性タンパク質の関与を明らかとし、さらにその細胞内取り込みに低比重リポタンパク質 (LDL) 受容体の関与が示唆された。

ナノ粒子製剤への PEG 修飾は、主として血中タンパク質であるオプソニン (補体成分の C3b や免疫グロブリン G) の結合を減弱し、細網内皮系への補足とそれによるナノ粒子製剤の血中滞留性の低減を回避するために行われる。しかし、我々が得ている知見、及び既に報告されている研究は、リガンド (標的素子) を結合していない PEG 修飾ナノ粒子においても、アポリポタンパク質のナノ粒子表面への結合が維持されていることを示唆するものである。このように、オプソニン化を回避しつつ、アポリポタンパク質の結合を維持した適切なタンパク質層が形成されることが LDL 受容体をターゲットとしたナノ粒子製剤の開発において望まれる。一方、血中を循環する間にタンパク質コロナを形成したリポソームは、肝臓においてそのタンパク質コロナの特性により動態が大きく左右されることになるが、肝実質細胞における細胞内動態の詳細な機構は解明されていない。

## 2. 研究の目的

我々は、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームの細胞内動態にコレステロール等の脂質を運搬する内因性タンパク質の関与を明らかとし、さらにその細胞内取り込みに低比重リポタンパク質 (LDL) 受容体の関与が示唆された。生体内のリン脂質やコレステロールはアポリポタンパク質を含むリポタンパク質により運搬されることから、本知見は、リポタンパク質受容体を介する脂質代謝系がリポソームの体内動態・細胞内動態に関与している可能性を示すものである。そこで本研究では HepG2 細胞を用い、PEG 修飾リポソームへのアポリポタンパク質の結合、リポタンパク質受容体との相互作用、細胞内取り込みに焦点を当て、PEG 修飾リポソームの細胞内動態の分子メカニズムをより詳細に解析する。本研究で得られる知見は、リポタンパク質受容体を利用した効率的な治療法の構築に資するとともに、リポソームの主要な消失過程を担う肝実質細胞におけるリポソーム構成成分の蓄積や代謝など、安全性に関わる知見をもたらすと考えられる。

## 3. 研究の方法

### リポソームの作製

リポソームは脂質薄膜法により作製した[Bangham et al., J. Mol. Biol. 1965, 13, 238-252.]. 脂質には、Hydrogenated soy phosphatidylcholine (HSPC), *N*-(carbonyl-methoxyPEG 2000)-1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (PEG2000-DSPE), cholesterol, 25-[*N*-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)methyl]amino]-27-norcholesterol (NBD-Chol) を用い、各脂質組成は、HSPC/PEG2000-DSPE/Chol/NBD-Chol (56.3/5.3/37.4/1 mol %)とした。

### リポソーム細胞取り込み量

細胞には HepG2 細胞を用いた。リポソームの細胞内取り込み量は、蛍光分光光度計を用い、細胞内に取り込まれた脂質の蛍光強度を測定した。

### リポソームの細胞内取り込みへのリポタンパク質受容体関与の評価

HepG2 細胞を DMEM 培地で 48 時間培養した。その後、リポタンパク質受容体に対する抗体を添加し、4 で培養した。対照として、アイソタイプコントロールを用いた。その後、リポソームを添加し、一定時間 37 で培養後、細胞内に取り込まれたリポソーム由来の蛍光を蛍光分光光度計を用いて測定した。

一方、siRNA によるリポタンパク質受容体関与の評価では、リポタンパク質受容体に対する

siRNA として Stealth RNAi™( Thermo Fisher Scientific Inc. )を用い、 Lipofectamine™ RNAiMAX ( Thermo Fisher Scientific Inc. )によりトランスフェクションを行った。コントロール配列には Stealth RNAi siRNA Negative Control ( Thermo Fisher Scientific Inc. )を用いた。その後、リポソームを添加し、37℃で培養を行い細胞内に取り込まれたリポソーム由来の蛍光強度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### ( 1 ) HepG2 細胞への取り込みに及ぼす LDL 受容体の関与

HepG2 細胞を用い、PEG 修飾リポソームと LDL 受容体との相互作用、細胞内取り込みを解析するために、PEG 修飾脂質、コレステロール及び中性脂質から成るサイズ約 100nm のリポソームを調製し、サイズ・ゼータ電位等の物理的・化学的特性解析を行った。蛍光標識リポソームの平均粒子径は 115nm、polydispersity index は 0.12、また、ゼータ電位は -2.3mV であった ( n=3 )。本リポソームは、10%FBS 含有培地中で 3 時間インキュベーション後も、その大きさは変化しなかった。これは、本研究の実験条件下では、培地中でリポソームが安定であることを示している。

細胞には LDL 受容体が最も多く存在し、また肝実質細胞のモデルとして汎用されている HepG2 細胞を用いた。培養した細胞について LDL 受容体の発現を western blotting により確認した。HepG2 細胞に蛍光標識リポソームを添加し、一定時間後に共焦点顕微鏡で観察すると、図 1 に示すように、ドット状の染色が核の周辺に確認された一方、細胞膜上は染色されなかった。したがって、リポソームの非特異的な細胞への吸着は無視できると考えられた。

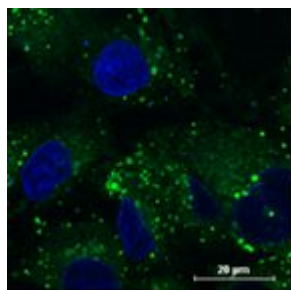


図 1 蛍光標識リポソームの共焦点顕微鏡写真  
緑：NBD-Chol、青：核を Hechst33342  
で染色、Scale Bar: 20μm

さらに、各種エンドサイトーシス阻害剤を用いた実験から本研究で作製した蛍光標識 PEG 修飾リポソームは、主としてクラスリン介在性エンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれることが示唆された。そこで、PEG 修飾リポソームの細胞内取り込みに及ぼす LDL 受容体の関与を調べるために、中和抗体として抗 LDL 受容体抗体を細胞に添加し、4 度で 1 時間インキュベーションした。同時にアイソタイプコントロール抗体の処理によるコントロール群を用意した。洗浄後、蛍光標識 PEG 修飾リポソームを加え、PEG 修飾リポソームの細胞内取り込み量を、脂質に標識した蛍光色素の強度により評価したところ、コントロール群と比較し、リポソームの取り込み量が抑えられていた。本結果は、本研究で用いた PEG 修飾リポソームの HepG2 細胞への取り込みに LDL 受容体が関与していることを示唆するものである。

PEG 修飾リポソームの HepG2 細胞への取り込みに LDL 受容体が関与することが示唆されたことから、LDL 受容体の関与について、より詳細な検討を進めた。LDL 受容体の発現を siRNA により阻害することにより、コントロール群に比べ、PEG 修飾リポソームの HepG2 細胞内取り込みが有意に抑制された。この結果より、中和抗体とは異なる特異的手法においても、PEG 修飾リポソームの HepG2 細胞内取り込みへの LDL 受容体の関与について示すことができた。また、培養液中に添加されているウシ胎児血清 (FBS) を取り除くと PEG 修飾リポソームの細胞内取り込みが大きく減弱することが確認され、FBS 中の成分が PEG 修飾リポソームの細胞内取り込みに関わっていることが示唆された。生体内に存在するリポタンパク質が細胞膜上の受容体へ結合する際は、リポタンパク質に結合したアポリポタンパク質が受容体に認識されることが報告されている。そこで、リポタンパク質を除去した血清を培地に用いた結果、

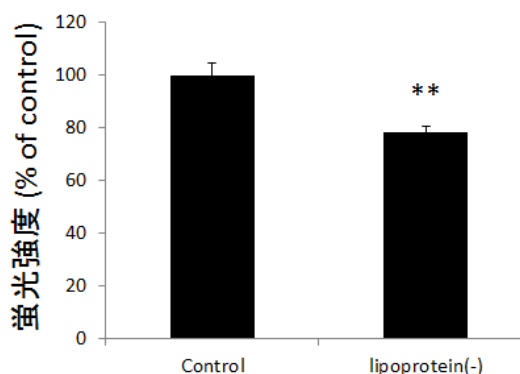


図 2 リポソームの細胞内取り込みに及ぼすリポタンパク質の影響

Control:10%FBS 添加培地、lipoprotein(-) :  
リポタンパク質を除去した FBS 添加培地

\*\*P<0.01

PEG 修飾リポソームの細胞内取り込みは有意に減小した(図2)。

## (2) HepG2 細胞への取り込みに及ぼすアポリタンパク質の関与

(1)の結果より、リポタンパク質中の成分が関わっていることが示唆されたため、さらに、リポソームの受容体を介した取り込みに、アポリタンパク質が関与するか調べた。FBS を取り除いた培地では減少したリポソームの取り込みが、アポリタンパク質 A-1 やアポリタンパク質 E とあらかじめインキュベーションしたリポソームでは、有意にその取り込みが増加することが明らかとなった。さらにリポソームをアポリタンパク質 A-1 と E の両方とあらかじめインキュベーションしておく、FBS 含有培地を用いた取り込み量 (control) と有意差は見られなかった。

以上より、本研究で用いた PEG 修飾リポソームの細胞への取り込みには LDL 受容体が関与し、受容体の認識にリポソームに結合したアポリタンパク質特異的な認識が関与していることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

### [雑誌論文](計 2 件)

Sakai-Kato K., Sakurai M., Takechi-Haraya Y, Nanjo K., Goda Y. Involvement of scavenger receptor class B type 1 and low-density lipoprotein receptor in the internalization of liposomes into HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1859, 2253-2258, 2017. DOI: 10.1016/j.bbame.2017.09.005.  
Takechi-Haraya Y, Goda Y. Sakai-Kato K. Control of Liposomal Penetration into Three-Dimensional Multicellular Tumor Spheroids by Modulating Liposomal Membrane Rigidity. *Mol. Pharm.*14, 2158-2165, 2017. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00051.

### [学会発表](計 3 件)

加藤くみ子、桜井真理、合田幸広. リポタンパク質受容体を介したリポソームの細胞内取り込みに関する研究. 日本薬学会第 136 年会 2016.3.27  
加藤くみ子. リポソーム製剤の開発と評価. 招待講演 第 24 回日本血液代替物学会年次大会 2017.12.7  
加藤くみ子. ナノテクノロジーを応用した先端的 DDS 製剤のレギュラトリーサイエンス. 招待講演 日本化学会 コロイドおよび界面化学部会 コロイド先端技術講座 2016.10.28

### [図書](計 0 件)

### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

### [その他]

ホームページ等

ナノ医薬品(ナノメディシン)に関する参考情報

[http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine\\_j/nano\\_j.html](http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_j/nano_j.html)  
NIHS Nanomedicine Regulatory Science Research  
[http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine\\_e/nano\\_e.html](http://www.nihs.go.jp/drug/section4/nanomedicine_e/nano_e.html)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

加藤 くみ子 ( SAKAI-KATO, Kumiko )  
国立医薬品食品衛生研究所・薬品部・室長  
研究者番号：10398901