

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07039

研究課題名(和文)薬物送達効率向上に向けたナノ粒子の多次元物性パラメータによる細胞との相互作用解析

研究課題名(英文) Analysis of interaction of nanoparticles with cells through the various physicochemical parameters for drug delivery efficiency improvement

研究代表者

加藤 くみ子 (Sakai-Kato, Kumiko)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：10398901

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、種々の脂質組成からなるpH応答性脂質ナノ粒子を用い、細胞内取り込み後のエンドソーム膜との融合、内包薬物放出の分子メカニズムを、エンドソーム膜の特性と脂質ナノ粒子の物性に着目して詳細に解析した。pHの低下に伴い、ナノ粒子の粒子径増大、正への荷電とともに、脂質膜流動性の上昇が生じたことから、pH応答性脂質間の静電的反発により膜流動性の増大が生じたと考えられる。したがって脂質ナノ粒子とエンドソーム膜との膜融合には、両者の静電的相互作用とともに脂質ナノ粒子の膜流動性も関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、脂質ナノ粒子を用いた薬物送達技術においてより効率的に薬物を細胞質内に送達させるための物性を精査し、脂質ナノ粒子の膜流動性の寄与が示唆された。近年、フクチンに利用されている核酸医薬等の薬物送達技術としてナノ粒子が注目されており、本研究の成果はより効率的に薬物を細胞内に送達させるナノ粒子製剤の設計に寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, the changes in the physicochemical properties of lipid nanoparticles containing ionizable cationic lipids that were induced by acidic pH, which reflects the conditions in the maturation of endosomes were investigated. The increase in the membrane fluidity and particle size, and the positive zeta potentials were observed with a decrease in pH value. It was indicated that electrostatic repulsion between lipid molecules at acidic pH decreased the packing density of the lipids in the nanoparticle membrane, which could be a trigger to form a non-bilayer structure and allow fusion of the nanoparticles with the membrane of maturing endosomes in an acidic environment.

研究分野：薬剤学

キーワード：リポソーム 物性 細胞外小胞 エクソソーム 膜流動性

1. 研究開始当初の背景

医療技術は年々目覚ましい進展を遂げているが、一方で、依然として難治性疾患の克服に結び付く治療法の開発が求められている。国民的疾患となっているがんの十年生存率は上昇しているが、すい臓がんでは 6.6% など、原発部位による特殊性が顕著である。また、我が国では高齢化社会の進行に伴う認知症の増加が見込まれるが、認知症薬の開発には血液脳関門 BBB が障壁となっている。生体は、生理的機能の発揮や外敵からの異物侵入防御のために、様々な解剖学的・生化学的な壁があるが、治療薬を患部へ届ける際も障壁となりうる。したがって、効き目の優れた薬物を適切に患部に送達する技術が求められている。

一方、生体に備わっている機能に着目すると、生体物質の内因性運搬体として粒子径 30 - 100 ナノメートル程度の脂質小胞であるエクソソームを含む細胞外小胞が注目を浴びている。その内部には、核酸やタンパク質が豊富に存在しており、遠く離れた異種または同種細胞にシグナル伝達や内包分子の伝達を担う新たなコミュニケーション因子としての機能が明らかとなりつつある。

このように、生体内は様々な膜で仕切られており、生化学的反応や情報のやり取りが行われ、恒常性が保たれている。一方、これらの生体膜は異物からのバリア機能も有する。申請者は、生体膜の有するこれらの機能に着目し、内因性の微小胞であるエクソソームがどのようにこの膜バリアを突破し情報のやり取りをしているか興味を持った。しかし、エクソソームの体内動態については未解明な点が多い。そこで人工脂質ナノ粒子を作製し、まずは脂質ナノ粒子の精密物性評価法を構築し、物理化学的観点からその解明に着手した。これまでに、脂質ナノ粒子の粒子径、膜の硬さなどの物性を精密に測定する手法を開発し、細胞内への脂質ナノ粒子の取り込み機構を規定する物性を精査した。創薬ターゲットとなりうるタンパク質の約 65% や核酸は細胞内に存在していることから、本研究課題で、細胞取り込み後の人工脂質ナノ粒子が、エンドソーム膜と融合し薬物放出するメカニズムを物理化学的に解析していくことは意義がある。

2. 研究の目的

エクソソームを含む細胞外小胞はエンドサイトーシスにより細胞内へ取り込まれた後、エンドソーム膜と融合し、内包する主要な核酸等をライソソームで分解される前に細胞質に届けることができる。しかし、細胞外小胞の物性は不均一であり、メカニズム研究には困難が伴う。そこで本研究では、これまでの研究成果をさらに発展させ、均質なモデル脂質ナノ粒子を作製し、細胞内取り込み後のエンドソーム膜との融合、内包薬物放出の分子メカニズムを、エンドソーム膜の特性と脂質ナノ粒子の物性に着目して詳細に解析する。さらに、エンドソーム内の環境変化に伴い、効率的な膜融合を規定する脂質ナノ粒子の物性を明らかにしていくことで、細胞質への効率的な薬物放出を可能とする脂質組成と物性の条件を探る。

3. 研究の方法

脂質ナノ粒子の作製

様々な組成の脂質ナノ粒子をエタノール希釈法により調製した。脂質は、DOPE (1,2-

dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine)、Cholesterol、DMG-PEG2000(1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxypolyethylene glycol-2000)を、pH 応答性脂質として DOBAQ (N-(4-carboxybenzyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis(oleoyloxy)propan-1-aminium) または Dlin-KC2-DMA(2-(2,2-bis[(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienyl]-1,3-dioxolan-4-yl)-N,N-dimethylethanolamine)を用いた。

脂質ナノ粒子の物理化学的手法

脂質ナノ粒子の物理化学的特性として、粒子径、ゼータ電位、粒子としての見かけの pKa (プロトンの受け取りやすさ) 及び粒子表面脂質膜の流動性について精査した。粒子径、ゼータ電位は動的光散乱計により測定した。pKa は、負電荷蛍光試薬である 6-p-Toluidino-2-naphthalenesulfonic (TNS) を用いて算出した。TNS は、弱酸性条件下において正に荷電した脂質膜と静電的に相互作用し強い蛍光を示すため、TNS の蛍光を異なる pH 条件で測定し脂質ナノ粒子表面の荷電状態を評価できる。50% 荷電率を示す pH を見かけの pKa とした。一方、脂質ナノ粒子膜の流動性評価法として、膜感受性色素ラウルダンを用いた。ラウルダンは脂質膜に入り込み、脂質膜の流動性増加により、蛍光スペクトルが長波長側にシフトするため、そのシフトの度合い (GP 値) を算出した。

脂質ナノ粒子の薬物放出評価

脂質ナノ粒子が細胞へ取り込まれ、siRNA を細胞質内に放出することを確認するため、 β -ガラクトシダーゼの発現を阻害する siRNA を封入した脂質ナノ粒子を、 β -ガラクトシダーゼを恒常的に発現する Flp-In 3T3 細胞に投与し、 β -ガラクトシダーゼ活性の抑制効果を評価した。

溶血実験

マウス赤血球と脂質ナノ粒子を各種緩衝液中で混合し、37 度で 30 分間インキュベーション後、遠心し、溶血により上清中に溶出したヘモグロビン由来の吸光度 (545 nm) を測定した。ポジティブコントロールには 0.5% w/v の TritonX-100 を用いた。

4. 研究成果

膜融合性を有するリン脂質、コレステロール、PEG 脂質、pH 応答性脂質を用い、脂質組成の異なる複数のリポソームを作製し、粒子径等の物理化学的特性を解析した。全脂質量に対する PEG 脂質の比率を増加させたところ、比率の増加により粒子径の分布幅が増加し、モル比 1% の比率が適当であると考えられた。pH 応答性脂質やコレステロール等の脂質組成を変えたところ、コレステロール一定条件下では pH 応答性脂質の比率が上昇すると平均粒子径、及びその分散が大きくなる傾向があり、リポソームが不安定化すると考えられた。また、多分散指数はコレステロール比率の上昇に伴って下がる傾向が見られた。

上記検討を参考に、膜融合性を有するリン脂質、コレステロール、PEG 脂質、pH 応答性脂質を用い、脂質ナノ粒子を調製した。異なる pH 応答性脂質を用いて、脂質ナノ粒子を調製したところ、pKa が中性付近のナノ粒子がより siRNA 内包率が多い結果となった。これまでの我々の研究成果から、脂質ナノ粒子膜の動的挙動が脂質ナノ粒子と生体膜との相互作用に重要な役割を担っていることが示されている。一方、pH 応答性脂質等を含む脂質ナノ粒子に関しては、エンドソーム内の環境変化に伴うナノ粒子膜の物理化学的特性変化については報告されていない。そこでラウルダンを用いた脂質の膜流動性変化に着目した。pH 応答性脂質含有比率の異なる複数の脂質ナノ粒子を調

製し pH 変化による膜流動性を精査した結果、いずれも pH の低下に伴い膜流動性が上昇し、その程度は pH 応答性脂質の比率が高くなるほど増加した。さらに、pH の低下に伴い、脂質ナノ粒子の粒子径増大が観察された。また、中性緩衝液中では負電荷を帯びていたナノ粒子が pH の低下に伴い正電荷に変化することをゼータ電位により確認した。これは、脂質ナノ粒子に含まれる pH 応答性脂質によるものと考えられる。一方、pH 低下に伴う膜流動性の増加は、緩衝液中の塩化ナトリウム濃度の低下により増大したため、正に荷電した脂質間で生じた静電的反発が膜流動性増加の一要因であることが支持された。脂質ナノ粒子をエンドソーム膜モデルのマウス赤血球と混合した際の溶血率は、pH 低下及び pH 応答性脂質量の増加に伴い増加したことから、本研究で作製した脂質ナノ粒子がエンドソーム膜との膜融合機能を有していることが示唆された。さらに、siRNA を含む脂質ナノ粒子を細胞に投与した結果、pH 応答性脂質含有比率の増加に伴い、siRNA による β -ガラクトシダーゼ活性の抑制効果が増加した。従って、エンドソーム内の pH 低下に伴い膜の流動性が上昇した脂質ナノ粒子の方が、より効率的にエンドソーム膜と膜融合し、siRNA を細胞質内に放出すると考えられた。pH 応答性脂質量を最適化した脂質ナノ粒子は、細胞毒性を認めず、かつ市販の siRNA 導入ナノ粒子と比較し、siRNA による β -ガラクトシダーゼ活性の抑制効果の増加が得られた。

以上により、脂質ナノ粒子とエンドソーム膜との膜融合には、両者の静電的相互作用とともに脂質ナノ粒子の膜流動性も関与していることが示唆され、これを達成すべき脂質組成を見出すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hirose Mio, Ueno Takayo, Nagumo Hiroki, Sato Yusui, Sakai-Kato Kumiko	4. 巻 19
2. 論文標題 Enhancing the Endocytosis of Phosphatidylserine-Containing Liposomes through Tim4 by Modulation of Membrane Fluidity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 91 ~ 99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00645	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yahata Shiho, Hirose Mio, Ueno Takayo, Nagumo Hiroki, Sakai-Kato Kumiko	4. 巻 69
2. 論文標題 Effect of Sample Concentration on Nanoparticle Tracking Analysis of Small Extracellular Vesicles and Liposomes Mimicking the Physicochemical Properties of Exosomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1045 ~ 1053
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00452	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koitabashi Kyoka, Nagumo Hiroki, Nakao Mizuka, Machida Tomoko, Yoshida Kohki, Sakai-Kato Kumiko	4. 巻 1863
2. 論文標題 Acidic pH-induced changes in lipid nanoparticle membrane packing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes	6. 最初と最後の頁 183627 ~ 183627
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamem.2021.183627	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sakai-Kato Kumiko, Yoshida Kohki, Takechi-Haraya Yuki, Izutsu Ken-ichi	4. 巻 36
2. 論文標題 Physicochemical Characterization of Liposomes That Mimic the Lipid Composition of Exosomes for Effective Intracellular Trafficking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 12735 ~ 12744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c02491	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takechi-Haraya Yuki、Matsuoka Masaki、Imai Hirota、Izutsu Kenichi、Sakai-Kato Kumiko	4. 巻 233
2. 論文標題 Detection of material-derived differences in the stiffness of egg yolk phosphatidylcholine-containing liposomes using atomic force microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry and Physics of Lipids	6. 最初と最後の頁 104992 ~ 104992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.chemphyslip.2020.104992	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takechi-Haraya Yuki、Goda Yukihiko、Izutsu Kenichi、Sakai-Kato Kumiko	4. 巻 91
2. 論文標題 Improved Atomic Force Microscopy Stiffness Measurements of Nanoscale Liposomes by Cantilever Tip Shape Evaluation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 10432 ~ 10440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.9b00250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 ナノ粒子の物性評価 治療薬・ワクチン開発への応用
3. 学会等名 日本薬学会東海支部主催 特別講演会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 ナノDDS製剤の物性測定と品質管理
3. 学会等名 小角散乱とナノ粒子製剤のCMC (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 ナノテクノロジー応用DDS製剤のレギュラトリーサイエンス
3. 学会等名 第9回PhysChemForum Japan (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡志穂,、南雲大暉,、加藤くみ子
2. 発表標題 ナノ粒子トラッキング解析法を用いたエクソソーム評価における測定条件の検討
3. 学会等名 第32回クロマトグラフィー科学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南雲大暉、小坂橋京華、中尾瑞佳、町田朋子、加藤くみ子
2. 発表標題 pH 応答性脂質ナノ粒子における脂質膜流動性の変化
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 町田朋子、南雲大暉、中尾瑞佳、加藤くみ子
2. 発表標題 pH応答性脂質ナノ粒子の物性解析
3. 学会等名 第33回バイオメディカル分析科学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 Analytical method development for innovative new drugs
3. 学会等名 PBA2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 ナノテク応用医薬品による治療と安全性
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤くみ子、小坂橋京華、原矢佑樹、伊豆津健一
2. 発表標題 エクソソームの物理化学的特性を模倣したリポソームの細胞内取り込み効率に寄与する因子
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 革新的ナノ医薬品・DDS基幹技術の評価研究
3. 学会等名 第16回 DIA 日本年会 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤くみ子
2. 発表標題 ナノ医薬品技術の進展とレギュラトリーサイエンス
3. 学会等名 メルクファーマシンポジウム2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小坂橋京華、吉田行希、加藤くみ子
2. 発表標題 リポソームの脂質組成と物理化学的特性との関連性に関する研究
3. 学会等名 第63回日本薬学会 関東支部大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脂質ナノ粒子の硬さ・変形のしづらさをより高精度に計測可能に https://www.kitasato.ac.jp/jp/news/20190808-03.html
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------