

## 高分子の表面修飾による機能性リポソームの設計

河野健司\*・弓場英司

大阪府立大学大学院 工学研究科  
〒599-8531 大阪府堺市中区学園町1-1

### Design of Functional Liposomes Based on Surface Modification with Polymers

Kenji Kono\* and Eiji Yuba

Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University  
1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai, Osaka 599-8531, Japan

For establishment of safe and effective therapy, carriers that achieve high-precision drug delivery are required. Liposomes are one of the most promising drug delivery systems. To increase usefulness of liposomes as drug delivery systems, we have attempted to provide various functions to liposomes via surface modification of liposomes with functional polymers. Functions of polymer-modified liposomes were based on their interactions. Therefore, surface-modification of liposomes with temperature-sensitive polymers can give temperature-responsive liposomes whose drug release is triggered by mild heating. Also, surface modification of liposomes with pH-sensitive polymers can generate pH-responsive liposomes whose destabilization is induced in weakly acidic environments. In addition, modification with several kinds of polymers with different functions can generate multifunctional liposomes. Here, we describe design, preparation and performance of functional liposomes based on the surface modification with functional polymers, such as temperature-sensitive, pH-sensitive, magnetic resonance-detectable polymers for the production of liposomes for high-precision site-specific delivery and/or intracellular delivery of bioactive molecules.

Key words : liposome / temperature-responsive / pH-responsive / surface modification / drug delivery / gene vector / dual-signal-responsive

#### 1. はじめに

薬物, 生理活性分子のキャリアは体内の標的組織に到達するまでそれらの物質を保持し, そこで放出することが必要である. また, 運搬する物質の特性や作用機構によっては, 細胞内部のオルガネラまでデリバリーすることも必要となる. このような精度の高いデリバリーを実現するための有効なアプロー

チとして, 様々な刺激や環境に応答性を示すキャリアの利用が挙げられる. これまでに様々な刺激や環境に応答するキャリアの構築が試みられてきたが, 代表的なものとして温度応答性キャリアやpH応答性キャリアを挙げることができる. 温度応答性キャリアは, 体外からの標的部位への局所加温によって体内における機能発現を制御できるため, 標的選択的なデリバリーが可能になる. また, pH応答性キャリアは, 細胞内部に存在するエンドソームなどの酸性環境を持つオルガネラで機能発現するため, 細胞内部へのデリバリーに有効である.

リポソームは, 脂質分子からなる小胞体であり,

\* Corresponding author  
Tel & Fax: 072-254-9330  
E-mail: kono@chem.osakafu-u.ac.jp

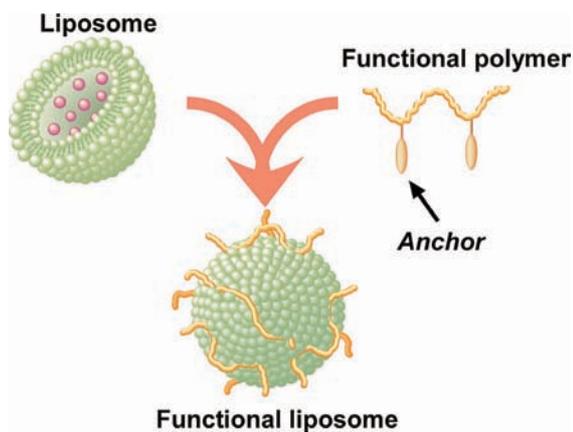


Fig. 1 Design of functional liposomes by surface modification with functional polymers.

様々な分子を内包することができる。しかも、生体由来の脂質を用いたリポソームでは生体適合性や生分解性にも優れることから薬物キャリアとしてその応用が研究されてきた。リポソームの薬物キャリアとしての有用性を高める上で、その機能化は重要であり、これまでに様々なアプローチから機能性リポソームの開発が行われてきた。代表的な機能性リポソームとして温度応答性リポソームやpH応答性リポソームが作製されている。

このような機能性リポソームを作製するための有効なアプローチの一つに、高分子によるリポソームの表面修飾をあげることができる (Fig. 1)。このようなリポソームでは、その機能発現は、高分子鎖とリポソーム膜の相互作用に基づく。したがって、多様な機能を持つ高分子と適切な安定性や生体適合性を有するリポソームを組み合わせることで、従来のリポソームにはない多様な機能性と高いパフォーマンスを実現することが可能である。さらに、複数の機能性高分子を組合せることで、リポソームに複数の機能性を与えることも可能である。ここでは、筆者らが進めている高分子の表面修飾の戦略による様々な刺激応答性リポソームの構築とキャリア機能について述べる。

## 2. 温度応答性高分子で表面修飾したリポソーム

温度に応答して水溶性を変化させる種々の高分子が知られている。中でもある特定の温度 (下限臨界溶液温度, LCST) において水溶性が低下して相分離する温度応答性高分子は、薬物キャリアや機能性ゲ

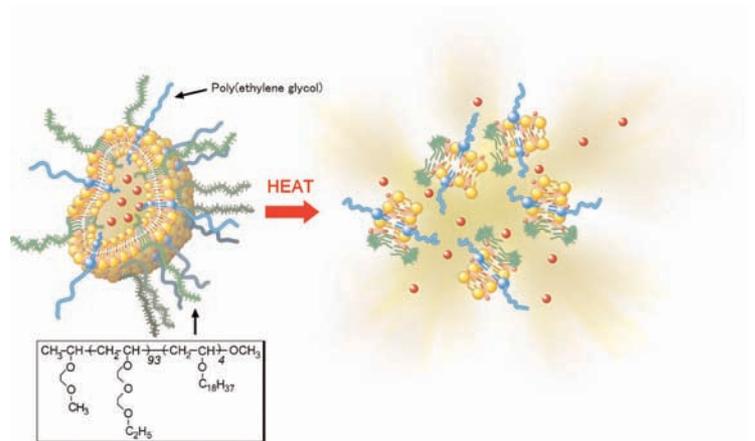


Fig. 2 Design of temperature-responsive liposomes that release anti-tumor drugs in response to mild heating by surface modification of liposomes with biocompatible poly (ethylene glycol) (PEG) and temperature-sensitive polymers.

ルなど様々なバイオ機能材料に用いられている。このような温度応答性高分子をリポソームに複合化することによって、それらの刺激に応答するリポソームを得ることができる。代表的な温度応答性高分子であるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) およびその共重合体をリポソーム表面に固定化すると、高分子のLCST以上において内包物質の放出が促進される。これは、LCST以上において高分子鎖が疎水性化するとりポソーム膜を不安定化するためである<sup>1)</sup>。

リポソームの温度応答機能は、用いる温度応答性高分子の特性やその固定化の仕方によって影響される。例えば、同じ転移温度をもつN-イソプロピルアクリルアミド共重合でも大きな転移エンタルピーを示すものほど、鋭敏な内包物質放出挙動をリポソームに与えることができる<sup>2)</sup>。また、高分子鎖のランダムな位置にアンカー部位 (長鎖アルキル基など) を導入してランダムな位置で高分子鎖をリポソームに固定化した場合に比べて、高分子鎖の末端部分でリポソーム膜に固定化した場合、リポソームはよりシャープな温度応答挙動を示す<sup>3)</sup>。

温度応答性高分子、ポリ ((2-エトキシ) エトキシエチルビニルエーテル) は40℃付近にLCSTを示し、生体適合性高分子であるポリエチレングリコールと共通構造を側鎖にもつ。この高分子は転移によって高い疎水性ドメインを形成するため、リポソームに固定化することによって鋭敏な温度応答性を与える<sup>4)</sup>。この温度応答性鎖とアンカー部位からなる(2-エトキシ) エトキシエチルビニルエーテル-オクタデシルビニルエーテルブロック共重合体をポリ (エチレングリコール) (PEG) 修飾リポソームに複合化することで鋭敏に温度応答して抗癌剤を放出す

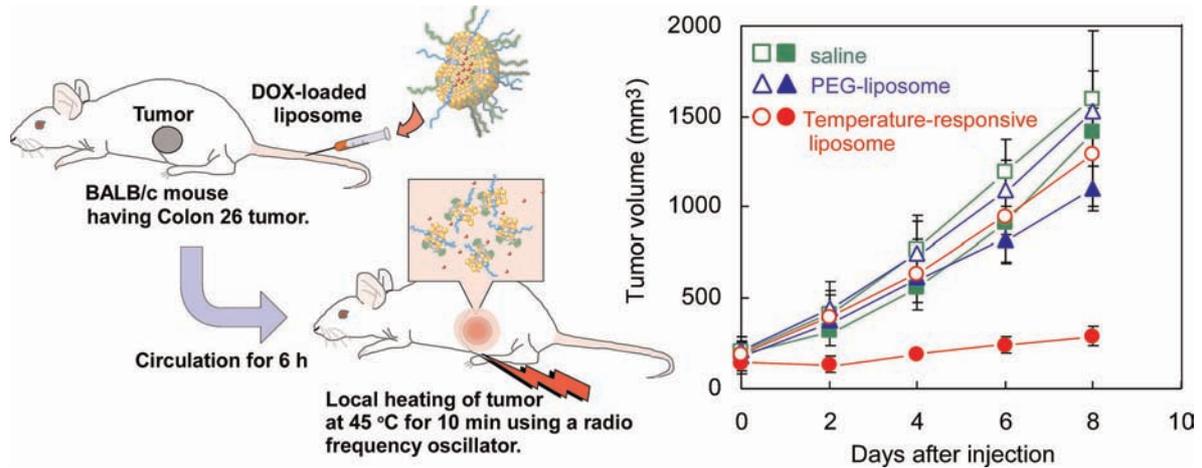


Fig. 3 Tumor growth suppression induced by administration of various liposomes loaded with doxorubicin or saline with (closed symbols) or without (open symbols) heating at 45 °C for 10 min at 6 h after the administration.

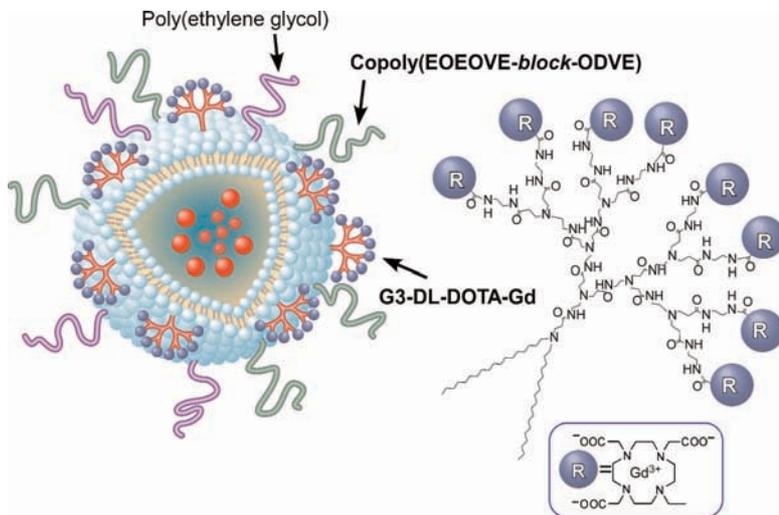


Fig. 4 Design of multifunctional liposome having temperature-controlled drug release and MR detection functions.

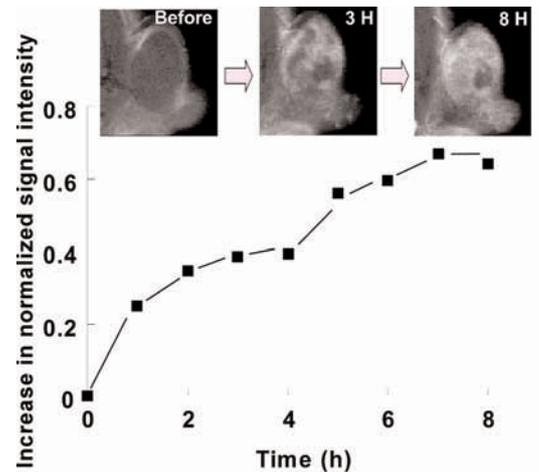


Fig. 5 Detection of tumor accumulation of the multifunctional liposomes using MRI.

るリポソームを開発した (Fig. 2)<sup>6)</sup>. このリポソームは、体温においては抗癌剤ドキシソルピシン (DOX) を内包したが、40 °C以上においてその放出が促進された。45 °Cにおいては瞬時に内包したDOXを放出し、リポソームは高い温度応答性を示した。このリポソームを側腹部に Colon26細胞腫瘍を移植した担癌マウスの尾静脈から投与し、6時間後に腫瘍病巣を45 °Cで10分間加温すると腫瘍成長が強く抑制された (Fig. 3)<sup>6)</sup>. しかし、同じリポソームを投与しても加温を行わない場合には、ほとんど腫瘍成長は抑制されなかった。腫瘍部位に集積したリポソームが加温によって抗がん剤を放出することで高い抗腫瘍効果が誘起されたものと考えられる。このことは、キャリアによって抗がん剤が腫瘍部位に到達するだけでなく、その病巣部位において薬物を放出することが

効果的な薬理効果を得るために必要であることを示している。

### 3. 温度応答・可視化・多重機能リポソーム

標的部位におけるリポソームの集積量は時間とともに変化する。したがって、温度応答性リポソームによって効率よく抗癌剤を標的腫瘍部位にデリバリーするためには、生体内におけるリポソームの挙動をモニターできることが有効であろう。生体内の現象を画像化する様々なイメージング技術が知られている。代表的な例として、核磁気共鳴イメージング (MRI)、X線断層法 (X線CT)、陽電子断層法 (PET)、超音波画像化法などを挙げることができる。なかでもMRIは高解像度の画像を得ることができ、

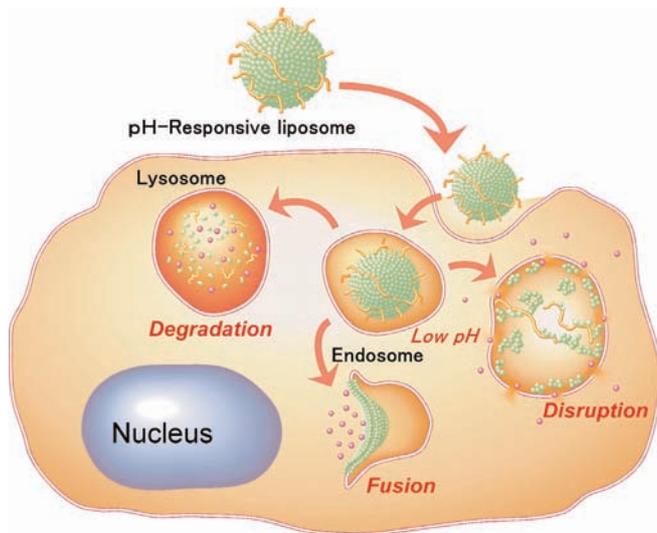


Fig. 6 Mechanism of cytoplasmic delivery mediated by pH-responsive liposome.

しかも長時間の追跡が可能であることから、キャリアの可視化のために適した画像化法といえる。

そこで、MRI造影剤であるガドリニウムキレート(DOTA)を結合したデンドロン脂質を合成し、温度応答性リポソームに組み込んだ (Fig. 4)<sup>7)</sup>。側腹部にColon26細胞腫瘍を移植した担癌マウスにこのリポソームを投与し、MRIによって腫瘍への集積過程を追跡したところ、腫瘍におけるMRシグナル強度が増加し、リポソームは時間とともに腫瘍部位に集積することが分かった。腫瘍におけるシグナル強度を時間に対してプロットすることで集積過程を定量的に評価したところ、8時間程度で集積が最大に達すること (Fig. 5)、また、リポソームの腫瘍への集積効率はリポソームの粒径に影響されることがわかった<sup>7)</sup>。また、Fig. 5に示されるように、リポソームは、腫瘍に均一に分布するわけではなく、腫瘍内にリポソームが集積していない領域もあることもわかる。さらに、サイズの異なる2つの腫瘍をもつ担癌マウスにこの可視化機能をもつリポソームを投与したところ、サイズの大きな腫瘍に対してより効率よく集積した<sup>7)</sup>。このことは、たとえ同じ個体内においても腫瘍の特性は異なることを示唆している。このような可視化機能をもつリポソームを用いることで、リポソームによる抗癌剤デリバリーの過程がリアルタイムで追跡できることから、腫瘍集積量が最大になる最適のタイミングで加温による抗癌剤放出を誘導することで抗癌剤の効果を最大限引き出すことができる。このような体内における情報を発信するキャリアは患者個人によって異なる病巣に対して的確に対応できるパーソナルな抗癌剤治療につながるものと期待

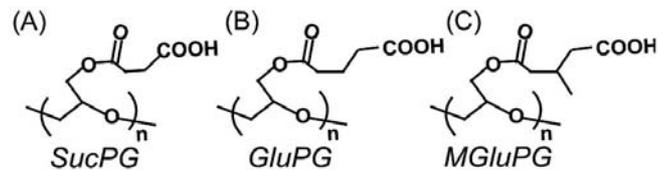


Fig. 7 Structures of pH-sensitive poly(glycidol) derivatives.

できる。

#### 4. pH感受性高分子で表面修飾したリポソーム

pH応答性リポソームは、弱酸性pH環境において不安定化して内包物質を放出したり、膜融合するリポソームである。このようなリポソームは、種々の生理活性分子を細胞内部に導入するために用いることができる。Fig. 6は、pH応答性リポソームによる細胞内デリバリーの機構を示す。リポソームは主にエンドサイトーシスによって細胞に取り込まれる。この経路で取り込まれた場合、リポソームはエンドソームを経てリソゾームで分解される。しかし、pH応答性リポソームは、弱酸性の内部環境をもつエンドソームにおいて不安定化し、細胞内部に内包物を導入する。したがって、pH応答性リポソームは細胞の内部に作用部位をもつタンパク質や核酸医薬、遺伝子のキャリアとして有用である。

筆者らは、ポリエチレングリコール類似の主鎖骨格と側鎖水酸基をもつポリグリシドールをベースとする種々のpH応答性高分子 (Fig. 7) で卵黄ホスファチジルコリンリポソームを表面修飾することによって弱酸性条件で膜融合するpH応答性リポソームを作製し、その細胞内デリバリー機能について検討してきた<sup>8~10)</sup>。これらのpH応答性ポリグリシドール誘導体を複合化したリポソームは中性では安定であったが、弱酸性で不安定化して膜融合能を発現した。また、リポソームの融合能は側鎖カルボキシル基と主鎖骨格をつなぐスペーサー部分の疎水性度に依存し、疎水性度の高い高分子を複合化したリポソームほど強い膜融合能を発現した。中でもMGluPGで修飾したリポソームは、最も優れたpH応答性膜融合能を発現した<sup>10)</sup>。これらのリポソームによるHeLa細胞への蛍光色素カルセインのデリバリーについて検討した。高分子で修飾していないコントロールリポソームとインキュベートした細胞を共焦点蛍光顕微鏡で観察すると、細胞からは輝点状の蛍光が観察された。しかし、pH応答性高分子で表面修飾したリ

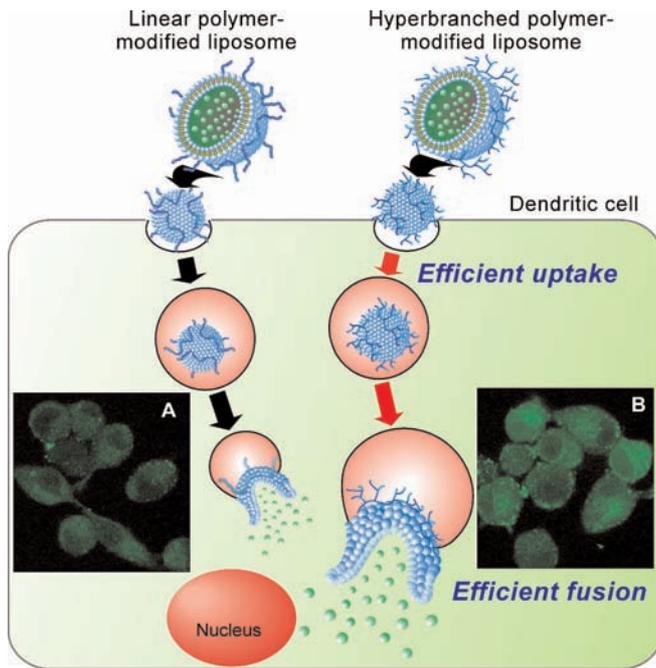


Fig. 8 Cytoplasmic delivery of FITC-labeled ovalbumin into DC2.4 cells mediated by egg lecithin liposomes modified with MGluPG of linear (A) or hyperbranched (B) structure.

ポソームを用いた場合、細胞全体から蛍光が観察された。また、疎水性度の高い側鎖スパーサー部位をもつ高分子で表面修飾したリポソームほど短時間で細胞内に内包物を導入することが観察された<sup>10)</sup>。疎水性度の高いpH応答性高分子ほど、微弱酸性においてエンドソームと強く相互作用して内包物を細胞質内に導入できることを示している。

さらに、リポソームのpH応答性に及ぼすポリグリシドールの分子鎖骨格の影響を調べるために、MGlu化した線状ポリグリシドール (MGluPG) とハイパーブランチポリグリシドール (MGluHPG) で修飾したリポソームを作製し、それらの性能を比較した<sup>11)</sup>。その結果、MGluHPG修飾リポソームはより高い融合能を示した。ハイパーブランチポリマーのコンパクトで立体的な分子構造と分子鎖末端のMGlu基が分子表面に配置されることが高い膜融合機能につながったものと思われる<sup>11)</sup>。これらのリポソームを用いて、FITCでラベル化したオボアルブミン (OVA) のマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞へのデリバリーを調べた。Fig. 8 に示すように、ハイパーブランチ型の MGluHPG で修飾したリポソームを用いた場合、より効率よく OVA が細胞内に導入された。MGluHPG 修飾リポソームはスキャベンジャーレセプターを介して効率よく樹状細胞に取り込まれ、また効率よくエンドソームと融合することで、OVA を効果的に細胞

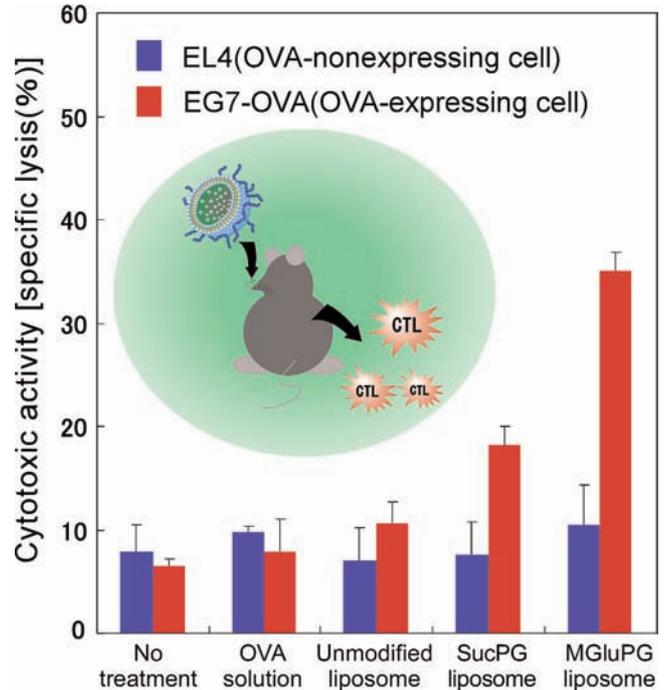


Fig. 9 Induction of OVA-specific cytotoxic T lymphocyte (CTL) by nasal administration of OVA solution and various kinds of OVA-loaded liposomes to mice.

内に導入したものと考えられる<sup>11)</sup>。

##### 5. pH 応答性リポソームによる生理活性分子の細胞内デリバリー

これらの pH 応答性リポソームは、エンドソームの不安定化・融合を介して様々な分子の細胞内への移行を促進できるため、細胞内に作用部位をもつ生理活性分子のデリバリーに応用できる。細胞内部で生理作用を発現する代表的な分子として siRNA 薬やプラスミド DNA などの核酸分子をあげることができる。これらの分子がその活性を発現するためには、リソゾーム内部における分解を逃れるために、いかに効率よくエンドソームからサイトゾルに移行するかが問題となる。カチオン性脂質は遺伝子と静電的に結合してリポプレックスとよばれる複合体を形成するため、遺伝子導入ベクターとして用いられる。筆者らは、正に帯電したリポプレックスに負に帯電した pH 応答性高分子修飾リポソームを静電的に結合させることによってハイブリッド複合体を作製した。この複合体は負に帯電したリポソームに覆われるため、細胞への非特異的な親和性が低下する。しかし、トランスフェリンをリガンドとしたハイブリッド複合体は、種々の腫瘍由来細胞<sup>12~15)</sup> や樹状細胞<sup>16)</sup> に対して高い遺伝子導入活性を示した。さらに、膜融

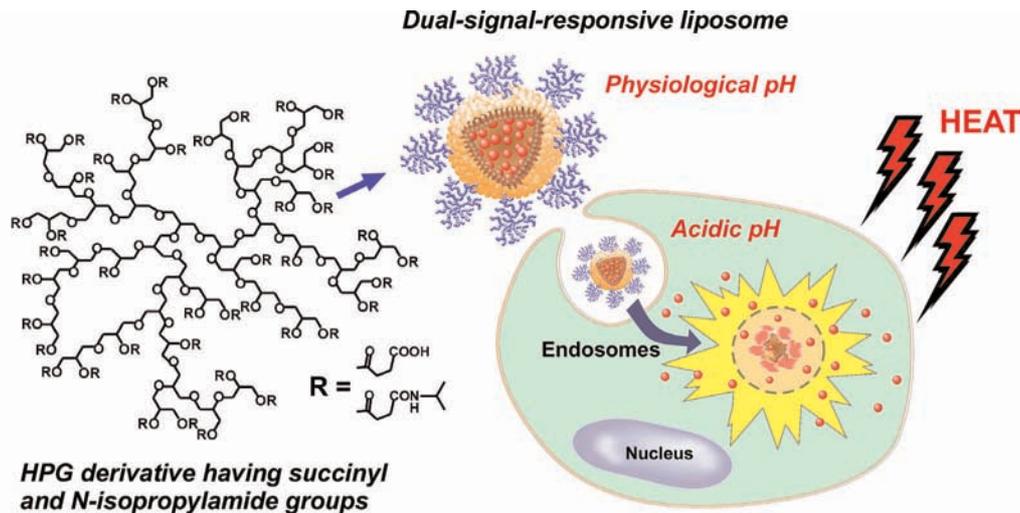


Fig. 10 Design of dual-signal-responsive liposome that releases contents in endosome of a cell in the heated tissues. Liposome was surface-modified temperature- and pH responsive HPG derivative.

合性の高い pH 応答性リポソームを用いたハイブリッド複合体ほど、より効率よく細胞の遺伝子発現を誘導した<sup>17)</sup>。このことはエンドソームからサイトゾルへの遺伝子の移行を効果的に行うことが遺伝子発現効率を高める上で重要であることを示している。

一方、細胞内部へのデリバリーは、癌免疫治療においても重要である。免疫の活性化においては、樹状細胞などの抗原提示細胞に効率よく抗原を導入することが必要であるが、特に癌免疫治療において重要な役割を果たす抗原特異的な細胞性免疫を活性化するためには、抗原提示細胞の細胞質中に抗原を導入することが必要となる。pH 応答性リポソームは樹状細胞への抗原デリバリーシステムとして用いることができる。実際、モデル抗原オボアルブミン (OVA) を封入し SucPG, MGluPG や MGluHPG で修飾したリポソームを用いることでマウス樹状細胞株 DC2.4 細胞の細胞質内に OVA を効率よく導入できた<sup>11,18)</sup>。

OVA を封入した SucPG 修飾リポソームや MGluPG 修飾リポソームをマウスに経鼻投与し、その細胞性免疫の誘導について調べ、OVA 内包未修飾リポソームや OVA 水溶液を投与した場合と比較した (Fig. 9)。OVA を封入した未修飾リポソームやフリーの OVA を投与した時にはマウスに OVA 特異的な細胞障害性 T 細胞 (CTL) はほとんど誘導されなかったが、pH 応答性高分子リポソームを投与すると抗原特異的な CTL が誘導されることがわかった。また、SucPG 修飾リポソームに比べて MGluPG 修飾リポソームはより効果的な細胞性免疫を誘導した<sup>18)</sup>。これらの結果は、細胞性免疫を誘導する際には、膜融合によって効率よく抗原提示細胞のサイトゾル中に抗原を導入

することが重要であることを示している。

## 6. デュアルシグナル応答性リポソーム

筆者らはこれまでに、温度と pH の 2 つのシグナルに対して応答性を示す分岐型ポリグリシドール誘導体を作製した<sup>19)</sup>。このようなポリマーでリポソームを表面修飾するとリポソームは pH と温度に応答性を示すため、これらの 2 つのシグナルによって機能発現を 2 重制御されるデュアルシグナル応答性リポソームが構築できる。この高分子はスクシニル基と N-イソプロピルアミド基をもち、それらの官能基の比率を調節することで、弱酸性 pH で加温されると疎水化するデュアルシグナル応答性高分子が得られる。この高分子でリポソームを表面修飾すると、弱酸性環境下、加温時に不安定化するデュアルシグナル応答性リポソームが得られる (Fig. 10)<sup>20)</sup>。このリポソームは、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれてエンドソーム内部にトラップされ、しかも加温されたときに不安定化して内包物を放出する。実際、蛍光色素ピラニンを内包したデュアルシグナル応答性リポソームを HeLa 細胞とインキュベートした場合、細胞内のエンドソーム内部でのみピラニンの蛍光が観察されたが、この細胞を短時間加温すると細胞全体からピラニンの蛍光が観察された。エンドソーム内部に保持されたりポソームが加温により不安定化してピラニンを放出し、また同時にエンドソーム膜が乱され、その結果、ピラニンがサイトゾル中に拡散したものと考えられる。デュアルシグナル応答性リポソームは、加温された標的部位の細胞内エンドソームに取り込まれると内包物をサイトゾル中に放出

するが、加温されていない部位、あるいは加温されても細胞外に存在する場合は、内包物を放出しない<sup>20)</sup>。したがって、このようなリポソームは、標的組織の細胞内に効率よく生理活性分子を導入する新しいインテリジェントキャリアとして利用できる。

## 7. おわりに

本稿では高分子の表面修飾のアプローチによる機能性リポソームの設計について述べた。高分子の合成法は著しく進歩し、分子量制御、分岐構造、ブロック構造、末端官能基の導入などの高分子構造制御がますます厳密に行えるようになってきている。また、合成法の発展は、高分子の機能設計の自由度を格段に広め、多様な機能をもつ高分子化合物の開発を可能にしている。この高分子の表面修飾のアプローチは多様で優れた機能性をもつリポソーム構築のための効果的なアプローチである。これからの医療の発展にとって、薬物・生理活性分子の精密デリバリー技術の重要性はますます大きくなる。効果的な薬物治療を行うためには、標的病巣において一気に薬物を放出して作用させたり、あるいは、細胞内部の作用部位に生理活性分子を送達してその薬理効果を十分発現させることが必要である。特に siRNA などの次世代医薬を活用するためには、標的病巣の細胞内部まで送り届ける、高度なデリバリー機能が不可欠である。また、このような標的細胞内部へ送達するキャリアは、細胞内分子を標的とする新しい薬物治療戦略の開拓にもつながる。さらに、イメージング機能を付加した生体内情報発信型キャリアは、個人対応型の化学治療の実現につながる。このような合目的な機能を高い次元で発現する高性能キャリアによって、新しい治療技術が開拓されていくことを期待する。

## 文 献

- 1) Kono K: *Adv. Drug Delivery Rev.*, **53**, 307 (2001)
- 2) Yoshino K, Kadowaki A, Takagishi T, Kono K: *Bioconjugate Chem.*, **15**, 1102 (2004)
- 3) Kono K, Nakai R, Morimoto K, Takagishi T: *Biochim. Biophys. Acta*, **1416**, 239 (1999)
- 4) Aoshima S, Oda H, Kobayashi E: *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **30**, 2407 (1992)
- 5) Kono K, Murakami T, Yoshida T, Haba Y, Kanaoka S, Takagishi T, Aoshima S: *Bioconjugate Chem.*, **16**, 1367 (2005)
- 6) Kono K, Ozawa T, Yoshida T, Ozaki F, Ishizaka Y, Maruyama K, Kojima C, Harada A, Aoshima S: *Biomaterials*, **31**, 7096 (2010)

- 7) Kono K, Nakashima S, Kokuryo D, Aoki I, Shimomoto H, Aoshima S, Maruyama K, Yuba E, Kojima C, Harada A, Ishizaka Y: *Biomaterials*, **32**, 1387 (2011)
- 8) Kono K, Zenitani K, Takagishi T: *Biochim. Biophys. Acta*, **1193**, 1 (1994)
- 9) Kono K, Igawa T, Takagishi T: *Biochim. Biophys. Acta*, **1325**, 143 (1997)
- 10) Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, Kono K: *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1040 (2008)
- 11) Yuba E, Harada A, Sakanishi Y, Kono K: *J. Control. Release*, **149**, 72 (2011)
- 12) Kono K, Torikoshi Y, Mitsutomi M, Itoh T, Emi N, Yanagie H, Takagishi T: *Gene Therapy*, **8**, 5 (2001)
- 13) Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, Koizumi K, Shimizu K, Emi N, Kono K: *Int. J. Pharm.*, **325**, 186 (2006)
- 14) Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, Koizumi K, Emi N, Kono K: *Bioconjugate Chem.*, **19**, 1588 (2008)
- 15) Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, Koizumi K, Shimizu K, Emi N, Kono K: *Biomaterials*, **29**, 1262 (2008)
- 16) Yuba E, Kojima C, Sakaguchi N, Harada A, Koizumi K, Kono K: *J. Control. Release*, **130**, 77 (2008)
- 17) Sakaguchi N, Kojima C, Harada A, Koizumi K, Kono K: *Biomaterials*, **29**, 4029 (2008)
- 18) Yuba E, Kojima C, Harada A, Tana, Watarai S, Kono K: *Biomaterials*, **31**, 943 (2010)
- 19) Kojima C, Yoshimura K, Harada A, Sakanishi Y, Kono K: *Bioconjugate Chem.*, **20**, 1054 (2009)
- 20) Kaiden T, Yuba E, Harada A, Sakanishi Y, Kono K: *Bioconjugate Chem.*, submitted.

(Received 16 June 2011;

Accepted 17 June 2011)

## 著者略歴

河野 健司 (こうの けんじ)

- 1984年3月 京都大学工学部高分子化学科卒業
- 1986年3月 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻修士課程卒業
- 1989年3月 京都大学大学院工学研究科高分子化学専攻博士後期課程研究指導認定退学
- 1989年4月 大阪府立大学工学部応用化学科 助手
- 1990年1月 工学博士 (京都大学)
- 1994年4月 大阪府立大学工学部機能物質科学科講師
- 1994年7月 大阪府立大学工学部機能物質科学科 助教授



1997年6月～1998年5月 カリフォルニア大学バークレイ校客員研究員, Frechet 研究室, デンドリマーの DDS への応用)

2002年4月 大阪府立大学大学院 工学研究科機能物質科学分野 教授

2005年4月 大阪府立大学大学院 工学研究科応用化学分野 教授

現在に至る.



**弓場 英司 (ゆば えいじ)**

2006年 3月 大阪府立大学 工学部 機能物質科学科 卒業

2009年 4月～2010年3月 日本学術振興会 特別研究員

2010年 3月 大阪府立大学大学院 工学研究科応用化学分野 博士後期課程 短期修了 (博士 (工学))

2010年 4月 大阪府立大学大学院 工学研究科応用化学分野 助教