

ナノ粒子の細胞質内導入法の確立 —次世代型ナノ治療システムをめざして—

真弓忠範（大阪大学大学院薬学研究科）

1. はじめに

2000年に、クリントン前大統領が“国家ナノテクノロジー戦略（National Nanotechnology Initiative）”に関する演説を行ったことが起爆剤となり、“ナノテクノロジー”は、21世紀の産業革命を引き起こす科学技術として大きな注目を浴びている。医療分野においてもリポソームや高分子マトリックスからなるナノ粒子は、生体適合性に優れており、また多くの物質をその内部に安定に保持することができることから薬物キャリアとして注目され、標的組織へのターゲティングや標的組織における最適濃度を維持するための徐放化等、個体レベルでの動態制御を行う上で様々な医薬品に適用されようとしている。

一方、近年、遺伝子の機能が明らかになるに従い、遺伝子を対象とした医薬品開発、即ち外来遺伝子や機能性核酸（アンチセンス核酸、リボザイム、DNA エンザイム、ダブルストランド RNA 等）を薬物として捉え、それらを細胞内に導入して各種疾病を治療しようとする 21 世紀医療の担い手としての次世代遺伝子療法が注目されている。しかし外来遺伝子や機能性核酸等は、細胞内の標的オルガネラに至り適量・最適時間送達されることで初めてその作用（薬効）を発揮するため、このような遺伝子医薬品を次世代遺伝子療法に適用していくためには、従来から行われてきた体内徐放や組織ターゲティングなどの個体レベルでの体内動態制御に加えて、それら薬物の細胞内における動態制御技術の開発が必須である。しかし、これまで細胞傷害を伴うことなく薬物の動態制御を行

うための機能性粒子を細胞質内に直接導入することが出来なかったため、その重要性が指摘されながらもこの分野の研究は殆どなされていない。

これまでに我々は、リポソームにセンダイウイルスの膜融合能を付与した膜融合リポソームがリポソームに内封した遺伝子や蛋白質等の水溶性高分子を効率よ

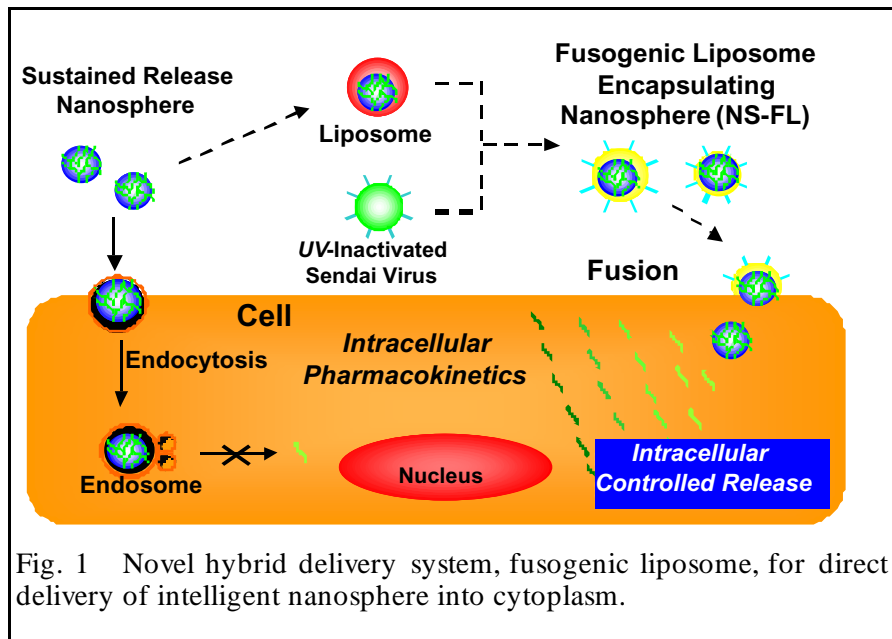
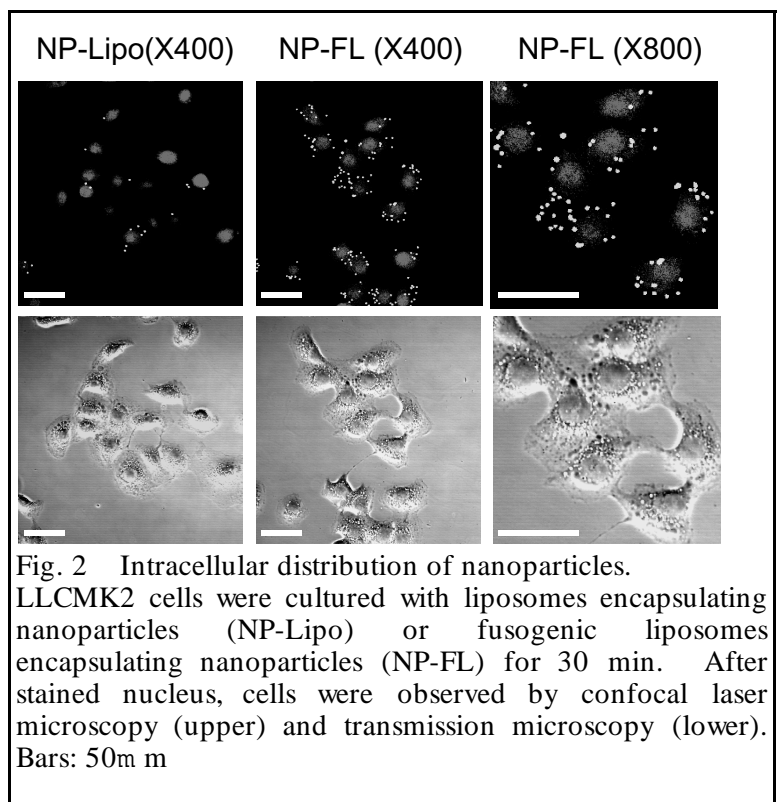


Fig. 1 Novel hybrid delivery system, fusogenic liposome, for direct delivery of intelligent nanosphere into cytoplasm.

く細胞質内へ導入できるキャリアであることを報告してきた¹⁻⁵⁾。さらに今回、分子だけでなく粒子をも膜融合リポソームに封入でき、細胞質内に直接導入可能であることを明らかにした。本シンポジウムでは、細胞内における薬物動態を制御する新しい DDS 研究として、膜融合リポソームを用いた機能性ナノ粒子の細胞質内導入と、本技術を用いた細胞内での薬物徐放化システムの開発について紹介する (Fig. 1)。

2. 膜融合リポソームによる細胞質内へのナノ粒子の導入

ナノパーティクル導入キャリアとしての膜融合リポソームの有用性を評価するため、モデルとして直径 500nm の緑色蛍光を有するナノパーティクルを用いた。ナノパーティクルを封入した膜融合リポソーム (NP-FL) を作用させた細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、ナノパーティクル由来の粒子状の緑色蛍光は、核が染色されたのと同断面内の細胞内に数多く観察された (Fig. 2)。一方、ナノパーティクル単独やナノパーティクルを封入した通常のリポソーム (NP-Lipo) を作用させた細胞においては、ナノパーティクルの取り込みはほとんど確認されなかった (Fig. 2)。また、細胞内への



ナノパーティクルの導入量を FACS 法により解析した結果、膜融合リポソーム作用群では、用いた 10^5 個の種々の細胞のうち少なくとも 90%以上の細胞でナノパーティクルの導入が細胞質内に認められた (Fig. 3)。さらに 1 細胞あたりに導入されたナノパーティクル数は平均約 10 個、さらに 26 個以上導入されている細胞群も約 5%以上存在した。以上の結果より、膜融合リポソームは内封したナノパーティクルを細胞内に効率よく導入できることが示された。そこで次に膜融合リポソームによるナノパーティクルの細胞内導入が、エンドサイトーシス経路を介するものでないことを確認するため、エンドサイトーシスを阻害した際のナノパーティクル導入を評価した。通常のリポソーム作用群では、各種エンドサイトーシス阻害剤処理によりナノパーティクルの導入が著しく抑制されたのに対して、膜融合リポソームを用いた群では全く抑制は認められなかった。また膜融合リポソームで導入されたナノパーティクルの細胞内での局在を透過型電子顕微鏡により観察した結果、

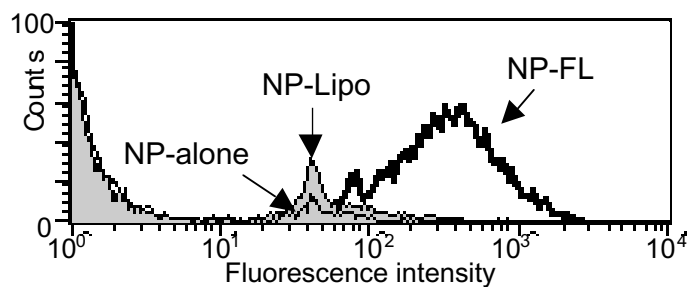
細胞内に複数のナノパーティクルの導入が確認され、それらナノパーティクルの周りにエンドソーム由来の膜状の構造は認められなかった (Fig. 4)。さらには、膜融合リポソームにより、粒子径 500 nm の粒子が細胞質内に導入されても、細胞傷害性は全く認められなかった。

以上の検討により、膜融合リポソームは、粒子径 500 nm という巨大な粒子状物質をも膜融合により細胞質内に直接導入できるキャリアであることが示された。

3. 細胞質内におけるナノ粒子からの薬物徐放

膜融合リポソームを用いた機能性ナノ粒子の細胞内導入技術を用い、細胞質内での薬物動態を制御する最初のアプローチとして、細胞質内における薬物徐放化システムの構築を試みた。モデル薬物として蛍光標識したオリゴヌクレオチドをポリビニルアミンナノスフェアに吸着させ、膜融合リポソームを用いて細胞質内に導入し、細胞質内でのオリゴヌクレオチドの徐放を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。導入直後のオリゴヌクレ

オチドに由来する蛍光は、細胞質内に点在しており、オリゴヌクレオチドがナノスフェアに吸着



| No. of NP cell | % of cells introduced NP | | |
|-------------------|--------------------------|----------|----------|
| | NP-alone | NP-Lipo | NP-FL |
| 0 | 97.8-0.7 | 85.8-0.9 | 5.8-0.4 |
| 1~5 | 2.1-0.1 | 13.7-0.8 | 29.9-2.8 |
| 6~10 | 0 | 0.5-0.1 | 31.2-1.2 |
| 11~25 | 0 | 0.1-0.0 | 28.9-2.0 |
| 26~ | 0 | 0 | 5.3-1.6 |

Fig. 3 Quantitative analysis for the introduction of nanoparticles into cytoplasm.

No. of introduced NP in each cell was analyzed as a result of fluorescence intensity. No. of NP defined as follows (fluorescence intensity), none (0~20), 1~5 particles (21~200), 6~10 particles (201~400), 11~25 particles (401~1000), 26~ particles (1001~). The result are expressed as percentage of cells counts in respective fraction -SEM of three independent experiment.

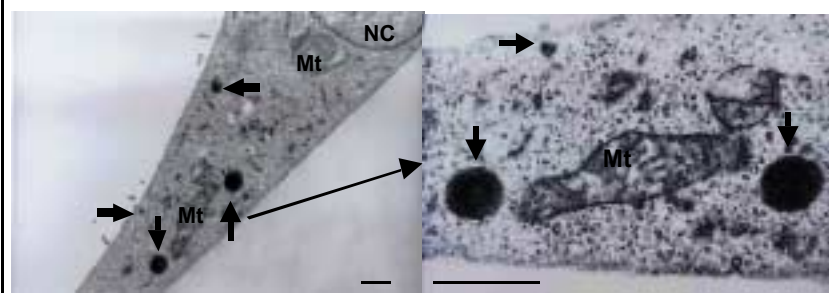


Fig. 4 Transmission electron micrographs of intracellular nanoparticle transfected with fusogenic liposome (Left: $\times 7000$, Right: $\times 20000$)

Arrows : 500 nm nanoparticle
NC: Nucleus Mt: Mitochondrion Bars: 1 μ m

した状態で導入されていることが示された。さらにこの細胞を培養した結果、ナノスフェアーから経日的にオリゴヌクレオチドが細胞質内へ徐々に放出されている蛍光像が観察された。

4. おわりに

今回紹介した細胞質内へのナノ粒子導入技術は、*in vitro*、*in vivo* を問わず、エンドサイトーシスを介することなく、膜融合リポソームと細胞膜との膜融合により、細胞傷害を伴うことなく、僅か数分という短時間でナノ粒子の細胞質内への直接導入を完了するものである。本技術は、分子細胞生物学領域における不可欠の基礎研究手段としてのみならず、将来ナノサイエンスに基づいて作製されてくるであろう機能性ナノ粒子の生体への適用研究において必須となる基盤技術である。今回紹介した技術を含めて、細胞内薬物徐放やオルガネラターゲティングといった、よりミクロな細胞内レベルでの動態制御を基礎としたナノ治療システムを開発することは、次世代の新らしい薬物治療法を提示することだけにとどまらず、従来になかった次元からの新たな薬物開発の世界を提供するものと考えらる。

参考文献

1. Mizuguchi H., Mayumi T. et al. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 234, 15 - 18 (1997)
2. Mizuguchi H., Mayumi T. et al. : Cancer Res., 58(24) , 5725-5730 (1998)
3. Hayashi A., Mayumi T. et al. : Biochem. Biophys. Res. Comm., 261(3), 824-828 (1999)
4. Nakanishi T., Mayumi T. et al. : Eur . J. Immunol., 30, 1740-1747 (2000)
5. Kunisawa J., Mayumi T. et al. : J. Immunol., 167, 1406-1412 (2001)