

# 光照射による分子集合体の構造変換及びその機能化に関する研究

大阪大学大学院工学研究科

水上 進

Controlled release systems induced by external stimulation have attracted great attention, because these systems enable spatiotemporal regulation of active drugs in target organs. Furthermore, the drug efficacy could be enhanced, and thus the dosage could be reduced. Until now, several strategies for controlled release have been proposed. As the external stimulation, temperature, pH, light, etc. have been used. Especially, controlled release by light is very promising, because light irradiation does not need complex instruments and can be concentrated on the small area. Additionally, laser devices are clinically used in photodynamic therapy. However, there are almost no practical photo-controlled drug release systems. Therefore, we started to develop a novel drug release system triggered by light irradiation. We focused on the membrane-damaging properties of antimicrobial peptides (AMPs) such as magainin. AMPs are attracting increased attention as novel types of antibiotics. Their target is the lipid bilayer of bacterial membrane, and they kill bacteria by disrupting their membranes. We synthesized an AMP mimic foldamer modified with (6-Bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl)methoxycarbonyl (Bhc) groups, which are photocleavable protective groups. The caged group is deprotected by irradiation UV light around 365 nm. When the caged molecule was treated, the AMP mimic foldamer was reproduced. Then, we applied the caged compound to the controlled drug release system. After several kinds of liposomes containing fluorescence dyes were treated with the caged compound. Only when the samples were treated with UV light, fluorescence dyes were released.

## 1. 緒言

ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System: DDS) は、薬物の投与を量的・時間的・空間的に制御する手法であり、副作用の低減や薬効の増強などを可能とするため、近年盛んに研究されており、実用化されているものも存在する。近年、外部刺激によってキャリアに内包された薬物の放出を制御する研究は大きな注目を集めている。これまでに行われた研究例において、用いられた外部刺激としては、温度変化、pH 変化、酵素活性、あるいは金属イオンなどが挙げられる<sup>1)</sup>が、近年では非侵襲的な刺激として光<sup>2)</sup>が大きな注目されている。消化管や血管内における内視鏡技術の発達により、体内の局所で光を照射することも不可能ではない。それゆえ、光によって薬物放出をコントロールすることができれば、多くの疾患において幅広い応用が期待できる。しかしながら、光照射によって薬物放出を引き起こす手法の中で、臨床で用いられているものはまだ無い。そこで、本研究において、新規メカニズムに基づく光誘導薬物放出システムの開発に取り組んだ。

## 2. 実験

### 2.1 光応答薬物放出システムの開発コンセプト

本研究では、薬物キャリアとしてはリポソームを選択し

た。リポソームは、脂質二分子膜が殻のようになった構造を持つ小胞である。内部に水を含み水中で安定に分散する。作成方法を変えることで大きさを制御でき、直径が 100 nm ~ 1  $\mu$ m のものを Large Unilamellar Vesicles (LUVs) と呼び、10  $\mu$ m 以上のものを Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) と呼ぶ。近年では、化学修飾などによって安定性が向上したため、様々な分野への応用が期待されている<sup>3)</sup>。

一方、薬物を放出させるスイッチについては、これまでの研究ではリポソームを構成するリン脂質に光応答性官能基を修飾するものがほとんどであった。今回我々は、リポソームを破壊して内包薬物を放出させる機能性分子を光応答性官能基で修飾し、その薬物放出活性を光によって制御するシステムを考案した。

まず、リポソームを破壊する機能性分子として、抗菌ペプチド<sup>4)</sup> (Antimicrobial Peptides: AMPs) に注目した。抗菌ペプチドは、1920 年代からグラム陰性菌などのバクテリアに対して原核生物が分泌するものとして研究されてきたが、1979 年に蛾のさなぎ由来の抗微生物作用たんぱく質セクロピンが、1987 年にはアフリカツメガエル *Xenopus laevis* の皮膚からマガイニン (図 1 (a)) が単離され、抗菌ペプチドの研究は一気に進展した。

抗菌ペプチドの性質は、1. ウイルスや微生物にのみ作用し、宿主生物には無害である (選択毒性)、2. 即効性がある、3. 広い抗菌スペクトルを持つ、の 3 つが挙げられる。特に 1. の選択毒性は抗菌ペプチドの医療への応用にとって重要である。選択毒性の理由として考えられているのが、原核生物と真核生物の細胞膜表面の構成リン脂質の違いである。微生物の細胞膜表面にはフォスファチジルグリセロール、フォスファチジルセリン、カルジオピリン等の酸性リン脂質が存在するのに対し、健康な動物細



Structural conversion and functionalization of self-assembled structures induced by photoirradiation

Shin Mizukami

Graduate School of Engineering, Osaka University

胞膜表面には酸性リン脂質は露出していない。また、微生物膜には存在しないコレステロールが豊富に存在し、その他の構成脂質もフォスファチジルコリンなどの中性脂質である。抗菌ペプチドは正電荷を多く持つので、負電荷を帯びた膜には静電相互作用によって吸着するが、電的に中性の膜には作用しない。そこで、薬物キャリアとなるリポソームを微生物の細胞表面を構成する酸性の脂質成分で作製することにより、抗菌ペプチドが真核細胞に影響を与えることなくリポソームのみを選択的に破壊できると考えられる。本研究では、マガイニン2の構造および機能アナログとして、Tewらによって報告されたPT<sup>5)</sup> (Pyrimidine Trimer; 図1 (b)) を用いることにした。このとき、PTの殺菌作用に重要なカチオン性官能基を光応答性保護基でブロックすることで、抗菌ペプチドのリポソーム破壊能を光制御できると考えた (図2)。

光応答性保護基は、生理学の分野ではケージド (Caged)

基と呼ばれ、これまでに多くの種類の保護基が報告されている。本研究においては、1999年に古田らによって開発され、その後の生理学研究において多くの応用例が見られるBhc ((6-bromo-7-hydroxycoumarin-4-yl) methyl) 基<sup>6)</sup>を選択した。Bhc基は光反応の量子収率、水溶性などの面で優れた性質を有しており、特にヌクレオチドやmRNAのケージに応用されており、ニューロン等の情報伝達分子の挙動を光制御するツールとしても幅広く利用されている<sup>7)</sup>。

## 2・2 光感受性膜傷害性分子BBhcPTの合成

抗菌ペプチドアナログPTおよび光感受性保護基MOM-Bhc-ONpをそれぞれ合成し、それらを縮合させた後、脱保護を行い、光応答性膜傷害性分子BBhcPTを合成した (図3)。合成した化合物はNMRスペクトルおよび質量分析により同定を行った。

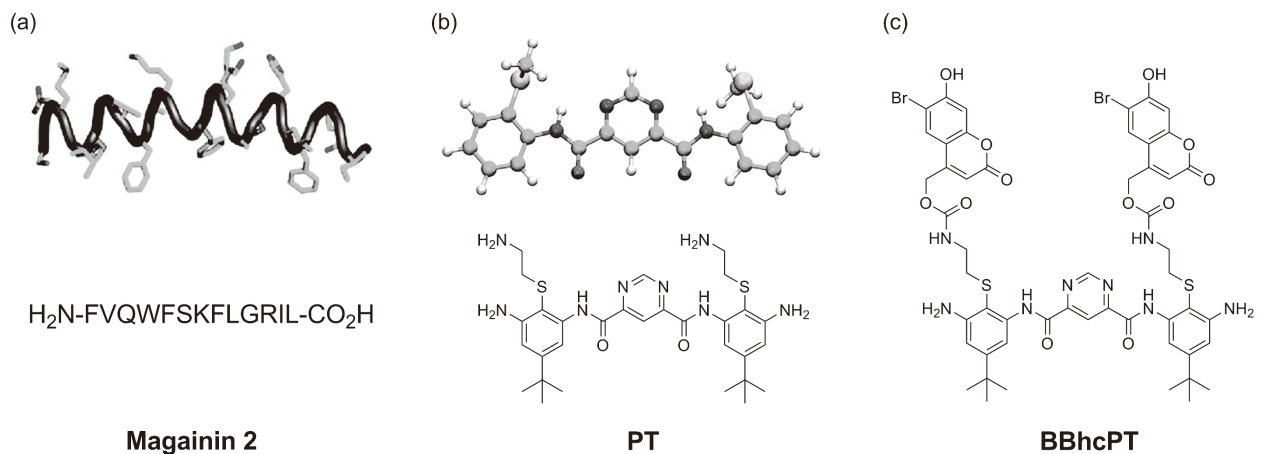


図1 (a) マガイニン2、(b) 膜傷害性分子PT、および (c) 光応答性膜傷害性分子BBhcPTの構造

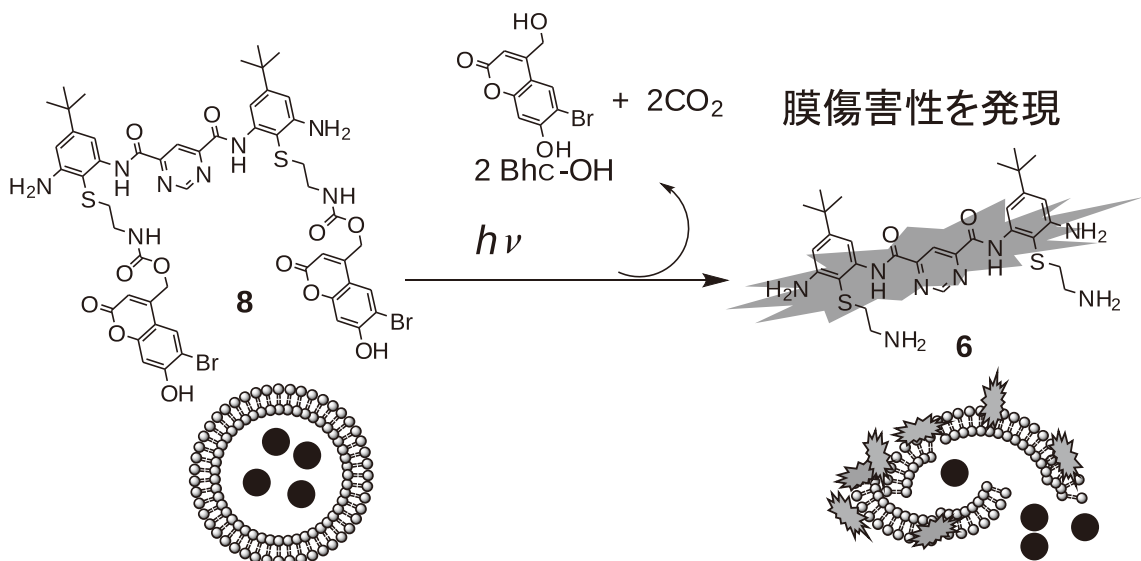


図2 光応答性薬物放出システムの概要

### 2・3 紫外光照射による BBhc-PT における Bhc 基脱離の確認

紫外光 (360 nm) を照射することで、化合物 BBhcPT から Bhc 基が脱離して PT が生成する過程を以下のプロトコルで確認した。まず、1 mM BBhcPT の DMSO 溶液を、10 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.1) により 100 倍希釈し、10 μM とした。続いて、この溶液 100 μl を石英セルに入れ、レオネット社製の光照射装置を用いて紫外光 (360 nm) を当てた。その後、各サンプルを逆相 HPLC により測定した。

### 2・4 リポソームの調製および光照射によるリポソーム破壊実験

水溶性蛍光物質カルセインを含むリポソーム (Giant Unilamellar Vesicles; GUVs) を作成した。調製したリポソームをポリリジンコートガラスボトムディッシュに移し、静電相互作用によりカバーガラスに沈着させた。蛍光顕微鏡下、カルセインの蛍光を観測することで、リポソームの形態変化を追跡した。ここに、BBhcPT を添加し、360 nm の UV 光を照射しながら、リポソームの形態変化を蛍光顕微鏡により観察した。

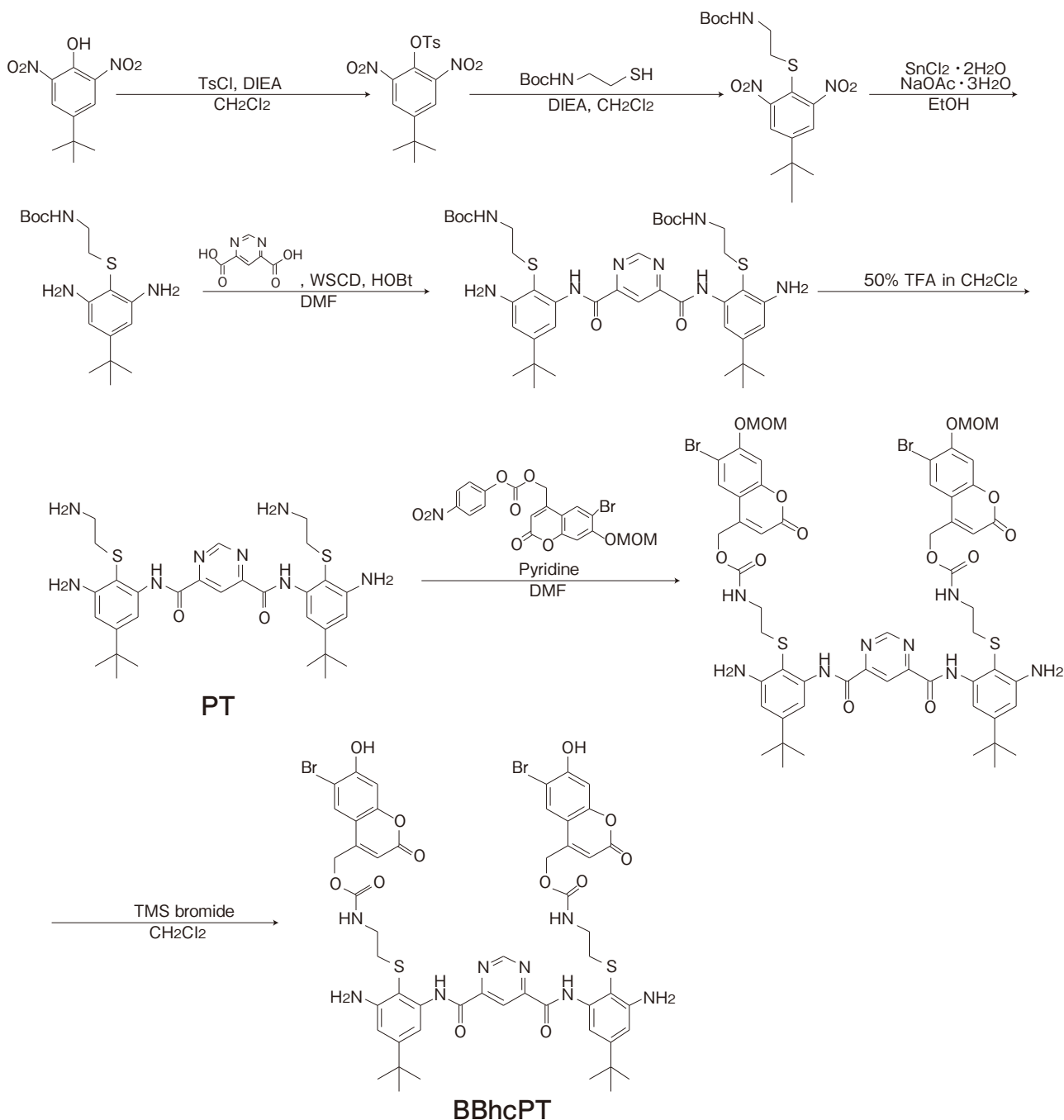


図3 BBhcPT の合成スキーム

### 3. 結果

図4に示すように、BBhcPTは360 nmの紫外光を照射したところ、経時的にHPLCピークが減少し、1800秒後には完全に消失した。この結果より、BBhcPTは紫外光照射によって、脱保護を受け、膜傷害活性を回復することが示唆された。

次に、蛍光物質カルセインを内包させたLUVsを用いて、BBhcPTを添加した後、紫外光を照射することで、カルセインの放出を定量的に測定した(図5)。照射時間に対するカルセインの流出とBBhcPTの残存率を比較することで、BBhcPTは光照射によってケージ解除されることで膜傷害能を発現し、リポソームを破壊することが示された。

最後に、光照射によるリポソームに内包された化合物の放出を蛍光顕微鏡によって観察した。蛍光物質カルセインを封入したGUVsを作製し、ポリリジンコートガラスボトムディッシュに沈着させた。その後、BBhcPTを添加して静置した後、蛍光顕微鏡を用いて紫外光を照射しながら、GUVsの挙動を観察した。

まずコントロールとして、GUVsが紫外光及びケージ解

除前のBBhcPTによって影響を受けないことを確認した。GUVsにDMSOを添加した後360nmの紫外光を照射した。また、BBhcPTを10mMの最終濃度で添加し、490nmの励起光で挙動の観察を行った。

最終濃度5 μMの光感受性抗菌ペプチドアナログ2をガラスボトムディッシュ上のリポソームに添加し、6分間静置した。蛍光顕微鏡システムによる488 nmの励起光照射ではリポソームの形態にほとんど影響を与えないことを確認した。次に、励起光の波長を350 nmに変更し、リポソームの観察を行った。紫外光による励起開始の数秒後からリポソーム膜の形態変化が観察され始め、2分半後には内部のカルセインが完全に流出するのが確認された(図6)。また、BBhcPTの濃度を増やすことによって、素早いカルセインの放出が起こることも明らかとなった。低濃度のBBhcPTの添加では、図6のようなダイナミックなリポソーム破壊は観測されず、リポソーム内の蛍光強度が徐々に消光していく傾向が見られた。この場合は、リポソーム上に細孔を形成し、カルセインが徐々に漏出したと思われる。

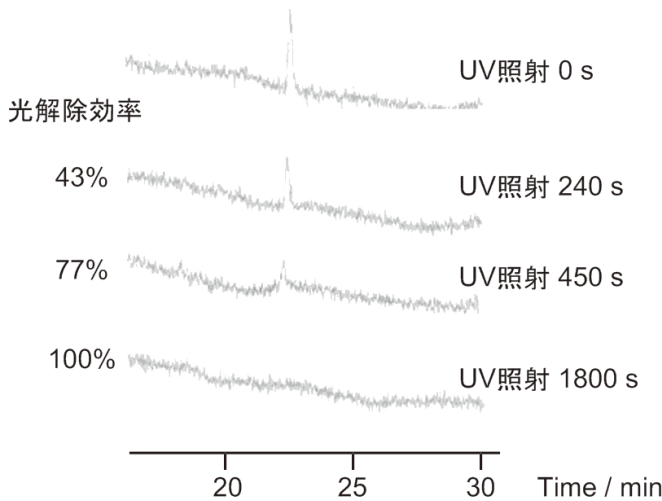


図4. 紫外光照射によるBBhcPTのHPLCチャートの時間変化

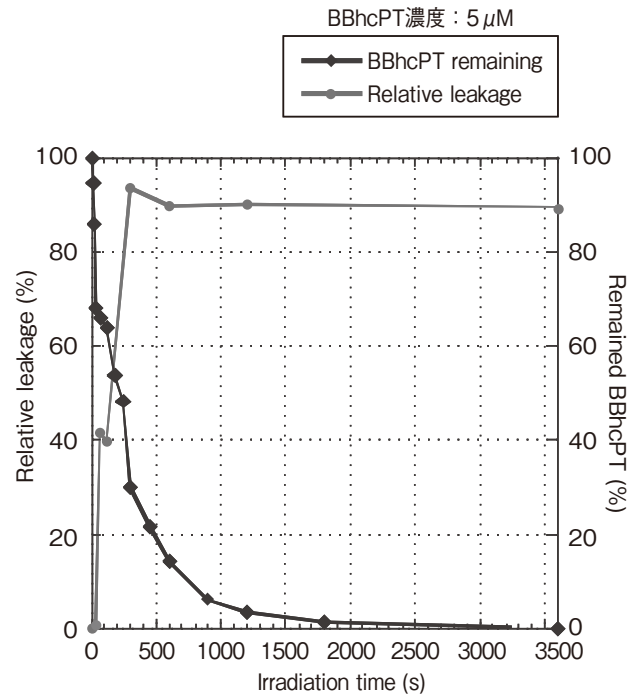


図5. BBhcPTの光解除効率(◆)、および流出したカルセインの割合(●)の経時変化

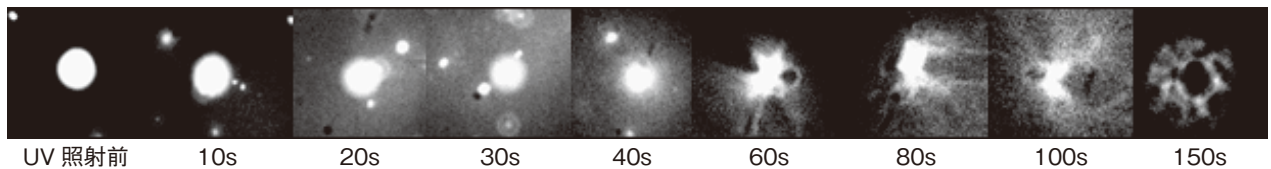


図6. 紫外光照射によって引き起こされた、リポソームに内包されたカルセインの放出

#### 4. 考 察

本研究において、抗菌ペプチドの細菌膜傷害活性に着目し、脂質集合体ドラッグキャリアであるリポソーム内に内包された薬物を光刺激によって放出させるシステムの構築に成功した。抗菌ペプチドアナログの膜傷害活性に重要な官能基を光感受性保護基で保護することで、紫外光照射のときのみ膜傷害活性を発現させることができた。また、リポソームの組成は最近の細胞膜に近い組成を選択することで、選択性を出すようにデザインされている。現段階は、まだシステムの基本原理を開発したところであるが、今後ドラッグキャリア内に光感受性分子を組み込み、より汎用性が高い光感受性ドラッグキャリアへと発展させる予定である。本研究で用いる薬物キャリアはリポソームであり、このような脂質からなる自己集合体は化粧品にも馴染みの深い成分である。すなわち本研究の応用例としては、医療応用のみならず、紫外線に暴露された場合の皮膚の保護能を有する機能性化粧品の開発などコスメトロジーへと発展する可能性を持つ。

#### (参考文献)

- 1) (a) A. Chilkoti, M. R. Dreher, D. E. Meyer, D. Raucher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 613-630. (b) D. Schmaljohann, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2008**, *58*, 1655-1670. (c) N. Rapoport, *Prog. Polym. Sci.* **2007**, *32*, 962-990.
- 2) P. Shum, J. -M. Kim, D. H. Thompson, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *53*, 273-284.
- 3) V. P. Torchilin, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2005**, *4*, 145-160.
- 4) M. Zasloff, *Nature* **2002**, *415*, 389-395.
- 5) G. N. Tew, D. Liu, B. Chen, R. J. Doerksen, J. Kaplan, P. J. Carrol, M. L. Klein, W. F. DeGrado, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 5110-5114.
- 6) T. Furuta, S. S. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 1193-1200.
- 7) H. Ando, T. Furuta, R. Y. Tsien, H. Okamoto, *Nat. Genet.* **2001**, *28*, 317-325.