

熱力学量測定によるハイブリッドリポソームの揺らぎ検出

(京大院理¹、崇城大生物生命²) 中曽根祐介¹、古水雄志²、松本陽子²、松下琢²、
上岡龍一²、寺嶋正秀¹

Thermodynamic measurement of the fluctuation of Hybrid Liposome

(Kyoto Univ.¹, Sojo Univ.²) Yusuke Nakasone¹, Yuji Komizu², Yoko Matsumoto², Taku

Matsumoto², Ryuichi Ueoka², Masahide Terazima¹

【序】ハイブリッドリポソーム (Hybrid liposome(HL)) はリン脂質などのベシクル分子とミセル界面活性剤をバッファー中で混合し超音波照射することで容易に得られる。そのサイズや物性は素材や組成比によってコントロールでき、発見当初はドラッグデリバリーシステムへの応用が期待されていた。その後、HL 自身に癌細胞の死滅をもたらす効果が発見され、副作用のない抗がん剤として現在多くの注目を集めている。たとえばリン脂質 DMPC と PEG 系界面活性剤を用いて作製した HL が *in vitro* および *in vivo* で癌細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが明らかにされている。アポトーシスを引き起こすメカニズムの全貌は明らかになっていないが、まず HL が癌細胞膜に融合し蓄積することがデスレセプターの活性化をもたらしアポトーシスを誘導すると考えられている。この効果は正常細胞では観測されないため、HL は癌細胞を何らかの方法で見分けている点が非常に興味深い。一般に癌細胞は膜の流動性が正常細胞に比べて高い。また蛍光偏光解消を用いた先行研究によると HL の組成を変えてその揺らぎを大きくするほど膜融合効率が高くなることが示されている。したがって、HL は揺らぎを利用して癌細胞膜に融合するという機構が提唱される。こうした細胞膜の揺らぎをターゲットとした創薬は過去に例のないものであり、その分子機構解明が求められている。本研究では HL 特有の揺らぎや物性を熱力学的観点から捉えることを目指した。

【実験】 熱力学量は様々な揺らぎを反映する有用な物理量である。右に示すように圧縮率は体積

$$\begin{aligned} \langle (V - \langle V \rangle)^2 \rangle &= k_B T V \beta_T & \beta_T: \text{等温圧縮率} \\ \langle (S - \langle S \rangle)^2 \rangle &= k_B C_P & C_P: \text{定圧熱容量} \\ \langle (SV - \langle S \rangle \langle V \rangle) \rangle &= k_B T V \alpha_{th} & \alpha_{th}: \text{熱膨張係数} \end{aligned}$$

揺らぎと関係づけられ、熱容量はエントロピーの揺らぎを表す。また熱膨張係数は体積揺らぎとエントロピー揺らぎの掛け合わせで表され、構造揺らぎの指標となる物理量である。したがってこれら熱力学量を HL について測定することで、揺らぎの実測が可能となる。本研究では熱容量測定には示差走査型熱量計(DSC)を、熱膨張係数測定には圧力摂動熱量計(PPC)を用いた。これら測定により相転移温度や転移に伴うエンタルピー変化や体積変化、疎水基・親水基の表面への露出度に関する情報も同時に得られる。並行して X 線小角散乱(SAXS)測定を行い、リポソームのサイズや形状の評価も行った。試料として癌細胞のアポトーシスを引き起こす DMPC-HL と細胞死に関与しない DPPC-HL を用いた (図 1)。同様の測定を単一成分リポソームについても行い、HL 特有の性質を検討した。

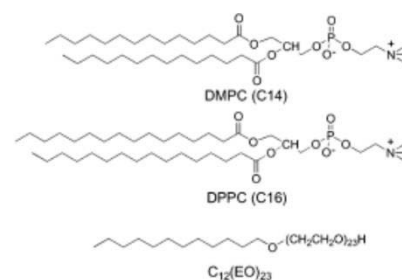


図1: 用いたベシクル分子とミセル界面活性剤

【結果】各 HL および単一成分リポソームを DSC 測定した結果を図 2 に示す。全ての試料でゲル相から液晶相へ相転移を起こす様子が熱容量の増大ピークとして観測された。相転移温度が組成によって大きく異なり、癌細胞のアポトーシス観測が行われた 37 度では、DMPC 系は液晶相である一方、DPPC 系はゲル相で存在する。DMPC は単一成分系でもわずかにアポトーシス誘導を引き起こすことが報告されているため、液晶相であることが膜融合に重要だと考えられる。

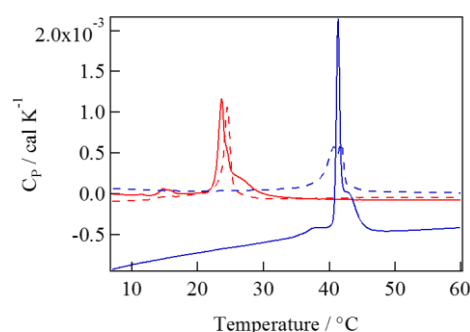


図2: 熱容量の温度依存性 (DMPC: 赤点線、DMPC-HL: 赤実線、DPPC: 青点線、DPPC-HL: 青実線)

一方、単一成分系とハイブリッド系の間では相転移温度の差は小さかった。しかしアポトーシス効果を有する DMPC 系を見ると、単一成分系の方がシャープな転移曲線が観測されており（赤点線）、転移の協奏性が高いことがわかった。また転移に伴うエンタルピー変化は HL の方が単一成分系より大きいことも見出した (DMPC : 6.1、DMPC-HL : 8.3、DPPC : 5.0、DPPC-HL : 12.8 単位 : kcal/mol)。これらは HL が単一成分リポソームに比べて不均一性が高いこと、また構造が緩んでいるためにアシル鎖の *trans-gauche* 転移が促進されたことを示している。また熱容量は表面における疎水性の露出度を表すパラメータであり、露出が増すほど大きくなる。したがって小さい熱容量を持つ DPPC-HL は表面に親水基が並んでいる一方、DMPC-HL は少し崩れた表面構造を持ち疎水基が露出していると考えられる。こうした表面構造の乱雑さやそれに伴う溶媒分子の揺らぎが膜融合に重要なかもしれない。

次に PPC 測定を行った結果を図 3 に示す。DSC 測定と同様の相転移が観測され、相転移に伴う体積変化量 ($\Delta V/V$) は DMPC : 2.9 %、DMPC-HL : 3.9 %、DPPC : 1.6 %、DPPC-HL : 5.0 % と見積もられた。単一成分系に比べ HL の方が大きい体積変化を示したことから、相転移する際の構造の緩みがより顕著だと考えられる。熱膨張係数の大きさは構造揺らぎの大きさと相関があるが、本測定ではアポトーシスを誘導しない DPPC-HL が最も大きいという結果になった。また DMPC-HL と DMPC 単一成分系ではほとんど揺らぎの大きさに差が観測されず、揺らぎを利用した膜融合システムの実証には至っていない。しかし表面構造や構造の柔らかさに違いが観測されたので、こうした観点から膜融合システムを議論したい。

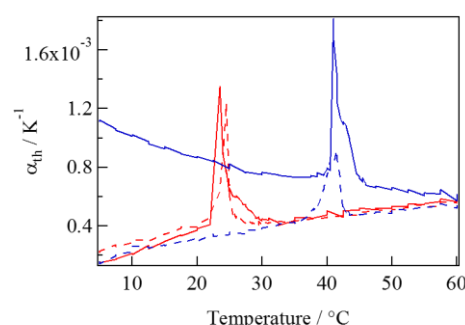


図3: 熱膨張係数の温度依存性 (DMPC: 赤点線、DMPC-HL: 赤実線、DPPC: 青点線、DPPC-HL: 青実線)

最後に SAXS を用いて相転移に伴う DMPC-HL の形状やサイズの変化を調べたところ、液晶相になることで形状の変化は観測されなかったが、慣性半径や D_{max} の増加 (3%程度) が観測された。

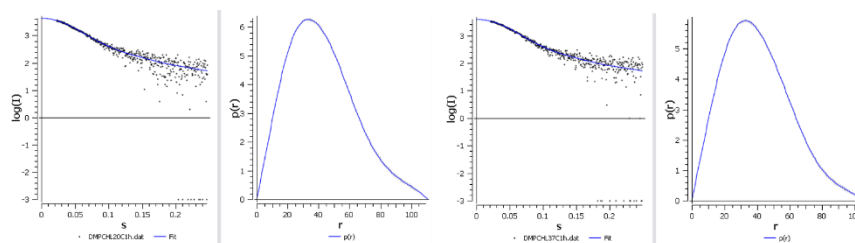


図4: 20度(左)および37度(右)でのDMPC-HLのSAXS測定結果(散乱プロファイルと動径分布関数)

この結果も液晶相での構造の緩みによるものと考えられ、現在他のリポソームでも同様の測定を行っている。これらの結果も含め、HL 特有の性質および癌細胞への融合システムを考察する。