



Title	Characterizing Topology of Surface Ligands on Liposomes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	李, 尚軒
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11852号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59253
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	ShangHsuan_Lee_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学）

氏名 ShangHsuan LEE（李 尚軒）

学位論文題目

Characterizing Topology of Surface Ligands on Liposomes (リポソーム表面に標識されたりガンドのトポロジーに関する評価)

ナノ粒子による選択的な薬物送達を達成するには、細網内皮系による非特異的な認識および排除を避ける性質（ステルス性）と、目的の細胞種に特異的に結合する性質（標的化能）の両方が必須である。ポリエチレングリコール（PEG）は、ナノ粒子にステルス性を付与する際に頻用される水溶性高分子である。また、ナノ粒子に標的化能を付与する核酸、ペプチドまたは抗体を含むタンパク質は、PEG スペーサーを介してナノ粒子表面に修飾される。一般に、リガンド修飾ナノ粒子の製造は、リガンド非修飾ナノ粒子のそれを比較して工程数が多く複雑である場合が多い。それゆえ、ナノ粒子表面への最適なりガンド修飾条件や修飾されたりガンドの密度は精密に評価される必要がある。

リガンド修飾ナノ粒子の標的親和性や薬物動態等の様々な性質は、ナノ粒子表面のトポロジーと深く関わっている。ここでのトポロジーは、ナノ粒子表面に存在する PEG やリガンド分子の密度と定義する。ナノ粒子表面のリガンド密度（incorporation ratio; IR）を正確に求めるためには、アンカーとしての PEG の修飾密度（surface anchor density; SAD）および、リガンド分子の反応効率（reaction yield; RY）という 2 種の独立したパラメータを正確に測定する必要がある。これは、PEG アンカーの修飾効率およびリガンドの反応効率が常に 100%ではないからである。しかしながら、これまでにリガンド修飾ナノ粒子に関する報告は多く存在するものの、正確なりガンド密度を求めている例はほぼ無く、多くは使用したりガンド全てがナノ粒子表面に修飾されたと仮定し、バイオアッセイの結果を考察しているという現状である。このような方法ではリガンド修飾ナノ粒子の正確な生物活性を評価することはできず、合理的な粒子デザインは困難であると考えられる。従って、本研究では、ナノ粒子表面のトポロジーを正確に評価する方法論を確立することを目的とした。筆者が所属する薬剤分子設計学研究室では中空脂質二重膜小胞であるリポソームに関する研究を行っており、また、リポソームは医薬品や化粧品分野等で実用化されている代表的なナノ粒子である。これらのことから、筆者はナノ粒子のモデルとしてリポソームを選定した。

PEG アンカーをリポソーム表面に修飾する方法として、リポソームと PEG 脂質ミセルを混合し、加温処理を施すという後修飾法が広く利用されている。まず、加温処理によってナノ粒子に修飾される PEG 脂質ミセルの量を測定するため、PEG 末端のマレイミド基に反応する蛍光分子 (FAM-SH) をプローブとして利用した。過剰量の FAM-SH で処理することで全てのマレイミド基を反応させた後、ゲル濾過カラムを用いてリポソームとミセルを分離した。リポソーム画分における総脂質量およびプローブ量を高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) あるいは吸光度測定によって定量した結果、用いた PEG 脂質ミセルの約 60% がリポソーム表面に修飾され、SAD は 2.82% であることが明らかとなった。続いて、PEG アンカー修飾リポソーム (SAD=2.82%) に 1.1 当量の FAM-SH を添加し、様々な温度で処理した後の FAM-SH 修飾量を測定した。その結果、高温条件下で不安定なタンパク質を修飾する際に頻用される 4℃ 条件下での RY は 45% 程度にとどまり、25℃ においても同等の結果となった。一方、37℃ 以上では 90% 前後の高い RY を示したことから、リポソーム表面上でのマイケル付加によるリガンド修飾反応においては、効率的な反応を達成するには 37℃ で十分であることが明らかとなった。また、得られた SAD に RY を乗することで IR を求めたところ、反応温度依存的に上昇した (1.26-2.78%)。さらに、上述のように、アンカーの修飾およびリガンドの反応の効率は共に 100% とならないことが実験的に確認された。従って、実際のリガンド修飾リポソーム製造においては、同等の IR・異なる SAD を有する複数のリポソームを得る場合があることが考えられる。SAD は PEG 修飾量の意味も有しており、この PEG 修飾量はリポソームの物理的安定性・体内動態等に顕著に影響する極めて重要なパラメーターである。また、IR それ自体は製造された最終サンプルに含まれるリガンドを定量することで求めることは可能であるが、アンカーである PEG 脂質は可視化・検出が困難であるため、SAD を求めることは難しい。今回、筆者が見出した方法は、あらかじめ SAD を求めているため、複雑なリポソーム表面のトポロジーを正確に表現することが可能であると考えられる。今後、ナノ粒子型医薬品市場はリガンド分子が修飾されたアクティブターゲティング型へと移行していくと考えられている。本研究の成果は、次世代のナノ粒子型医薬品開発の一助になるものと考えられる。