

# 新規リポソーム作製技術の開発と医療への応用

吉村 哲郎

## 1. 緒言

筆者は、平成18年3月三重大学を退職したが、引き続いて工学研究科にリポソームバイオ工学研究室の開設を許可され、今日に至っている。それだけでなく、退職直前にバイオベンチャー・株式会社リポソーム工学研究所を立ち上げ、受託研究開発等で収入を図っている。退職一年後に名産研研究部が立ち上げられ、開設時に上席研究員にいただいた。

平成20年度、独立行政法人科学技術振興機構が公募した地域イノベーション創出総合支援事業「地域ニーズ即応型」に、名産研を調整役機関として応募し、採択された。それが故に本巻頭論文の担当を依頼されたが、本稿では筆者のあらゆる研究費申請の主人公を担っている「リポソーム」を軸に、退職後開発した新規技術を紹介したい。

## 2. リポソーム

リポソームとは、細胞膜と類似の構造をもち、細胞膜の構成成分であるリン脂質より人工的につくられる脂質膜小胞である。1965年、**Bangham**らが、リン脂質を水中に分散させた時、細胞に類似した閉鎖小胞体が形成される現象を見出したことに始まる。それ以後、生体膜の性状研究にモデル膜として幅広く利用され、いろんな基礎的知見の取得に役立った。同時に応用研究にも利用され、**drug delivery system**におけるキャリアーとしての役割は、誰しも知るところである。細胞内遺伝子導入の武器としても多用され、リポソーム医薬品だけでなく、化粧品や食品にも利用価値が高まっている。

リポソームには、多重層リポソーム (MLV)、大きな一枚膜リポソーム (LUV)、小さな一枚膜リポソーム (SUV)、巨大な一枚膜リポソーム (GUV) 等があり、ボルテックス処理、超音波処理、エクストルーダー処理等によって調製可能である。また種々の機能性リポソーム調製法が開発され、細胞内遺伝子導入に向けたカチオニックリポソーム等の荷電性リポソーム、標的化向けに温度やpH等の変化に伴って性質が変化する感受性リポソーム、血中長期滞留性に向けてリポソームの表面をポリエチレングリコールで被覆あるいは糖鎖等で修飾した表面修飾リポソーム、細胞内遺伝子導入や標的化に向けたプロテオリポソーム、ビロゾーム及び膜融合性リポソーム等の再構成リポソーム等が常用されている。さらに、パッシブターゲットティング (例えば、固形癌等では新生血管がつくられるが、その血管の表皮細胞間は100nm程度の隙間が多く、それを狙って100nmサイズの例えば抗癌剤封入リポソームを用い、標的化させる術) 及びアクティブターゲットティング (細胞内に取り込まれ易い臓器特異的膜受容体に、例えば特異的リガンドを結合させた薬剤封入リポソームを標的化させる術) などによる標的化、ナノテクノロジーと融合してつくられたリポソームナノパーティクルによるsiRNAの組織細胞内特異的輸送とRNA干渉への試みが飛躍的に進歩した。現在、エイズ関連カボジ肉腫及び卵巣癌治療薬としてのドキシル (ドキソルビシン封入リポソーム)、真菌症治療薬としてのアムビゾーム (アムホテリシンB封入リポソーム)、加齢黄斑変性症治療薬としてのビスダイン (バルテポルフィン封入リポソーム) 等のリポソーム医薬品が治療薬として上市され、モイスチャーリポソームに代表されるように、保湿剤としてのリポソームが化粧品に多用されている。

### 3. 組換えプロテオリポソーム作製技術

現在、ガン、神経変性疾患、脳及び心臓血管疾患が増加の一途を辿り、自己免疫疾患、アレルギー性疾患も増えつつある。ただ、これらの疾患の重要なポイントは、生体作用物質、例えば、細菌毒素、ウイルス遺伝子発現タンパク質、ガン誘発物質、食品添加物、拮抗薬、遮断剤、アレルゲン等が、膜受容体を介したシグナル伝達系を通じて転写制御異常を誘発することにあることが判ってきた。膜受容体には、Gタンパク質共役型（GPCR）、イオンチャネル共役型、チロシンキナーゼ型があり、この内三量体Gタンパク質介在型受容体（GPCR）を介するシグナル伝達系は、我々の体内における生理作用及び薬理作用に極めて重要な役割を演じている。GPCRはヒトではおよそ700から1000種類存在するといわれ、現市販薬剤のうち約60%がGPCRをターゲットにしている。しかし、GPCRにはリガンドの不明な“オーファン受容体”が数多く、創薬の観点からも注目の的である。次に述べる甲状腺疾患における自己抗体がターゲットとする甲状腺刺激ホルモン受容体（TSHR）も、GPCRの一つである。また、イオンチャネル共役型受容体は、シグナル伝達機能だけでなく、全ての生物における恒常性維持及び神経及び筋肉等における電氣的興奮が伴う重要な機能に関与する。自己免疫疾患かつ難治特定疾患である重症筋無力症は、イオンチャネル共役型受容体であるアセチルコリン受容体（AChR）に対する自己抗体が産生する疾病である。前述の地域ニーズ即応型の対象とする多発性硬化症も、アクアポーリン4（AQP4）に対して自己抗体が産生する自己免疫疾患である。さらに、最近抗体医薬が疾病治療に利用され始めたが、膜タンパク質に対する抗体開発は極めて困難で、世界的課題となっている。このような背景の中で我々は、膜受容体等の膜タンパク質をリポソーム膜に搭載させる組換えプロテオリポソーム作製技術の開発に成功し、医療への応用を展開してきた。

プロテオリポソームとは、膜タンパク質が脂質二分子膜内に再構成されたりポソームのことである。プロテオリポソームは、膜タンパク質及びリン脂質を界面活性剤に可溶化した後、界面活性剤を透析などで除く界面活性剤除去法によって作製されてきた。しかし、界面活性剤の完全除去が困難であるため、生体に適用することが不可能である。また、膜タンパク質の膜内配向性がランダムで高次構造も完全に保持されず、生体内における配向性及び高次構造を再現することができない。そこで我々は、遺伝子組換え技術によって発現させた膜タンパク質をリポソーム膜に移行させる技術を開発した。即ち本技術は、バキュロウイルス遺伝子発現システムを用いて、目的とする膜タンパク質を、その膜タンパク質の遺伝子から出発して昆虫細胞膜に大量発現させ、それを保持した出芽ウイルスとリポソームを融合させることにより、目的とする膜タンパク質を生体内の膜内配向性及び高次構造を保持した形で再構成させ得る世界初の新規技術であり、つくられたプロテオリポソームを組換えプロテオリポソームと命名した（図1）（1,2）。関連論文は平成21年度日本生化学会JB論文賞を受賞した。

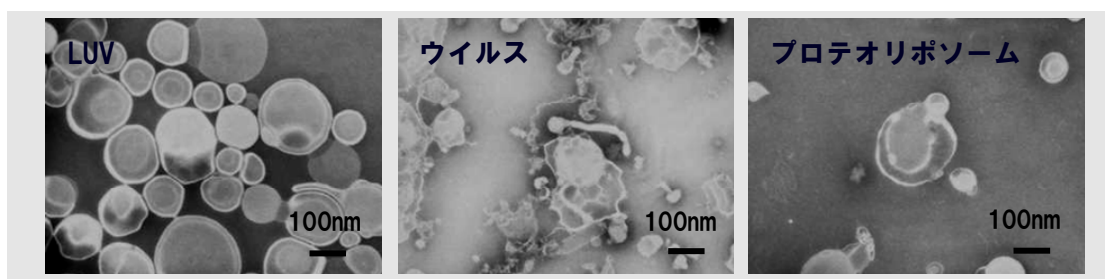


図1. 組換えプロテオリポソームの電子顕微鏡像

我々は引き続き、組換えプロテオリポソーム作製技術を用いて、膜受容体搭載リポソームを吸着固相化させたELISAプレートを開発し、膜受容体が関与する疾患の診断に用いた。前述のように、自己免疫疾患である甲状腺疾患（バセドウ病及び橋本病）と難治特定疾患でもある重症筋無力症は、TSHR及びAChR

に対する自己抗体が産生して異常をきたす疾病であるが、現在有効な直接的診断薬がない。そこで、組換えTSHR及びAChR搭載リポソーム固相化ELISAプレートを開発し、その有効性を確認した(3)。現在、2国内特許及び2国際特許を出願中である。AQP4搭載リポソームを活用する多発性硬化症診断薬の開発は、地域ニーズ即応型にノミネートされた。また、膜受容体に対する抗体開発も、独立行政法人科学技術振興機構研究成果最適展開支援事業(A-STEP)の支援の下、進展している。

#### 4. 超音波処理プロテオリポソーム作製技術

近年、トリインフルエンザ、コイヘルペス、SARS、エイズ等の新興ウイルス感染症が世界的に蔓延し、社会的・経済的大打撃を被っているだけでなく、パンデミック(世界的大流行)が懸念され、生物界全体の脅威となっている。特に、最近のメキシコの豚インフルエンザに端を発する新型インフルエンザは、全世界に蔓延、日本国内にも感染者が発生し、WHOによるパンデミック(フェーズ6)宣言がなされた。また、現在種々の感染症に対するワクチンが全世界の幼児に接種され、その摂取率は80%に達する。しかし、20%の幼児にはワクチンを届けることすらできない現状にあり、毎年200万人が死亡している。さらに、全世界の養殖漁場においては、薬剤及び水産用ワクチンの数が少なく、化学療法剤及び抗生物質が多用され、養殖魚類の“薬漬け”問題及び養殖漁場の環境汚染問題が浮上している。このような背景の中で我々は、不活化菌体及びウイルス粒子をリポソーム膜に混在させたリポソームワクチンの開発に取り組み、その作製技術の開発に成功した。

リポソームの大きさ(サイズ)は、原理的には、平衡状態において、水和水などを含んだ脂質分子の形態に基づく自発曲率に依存して決まると考えられるが、実際には、形成に至る過程(調製操作等)に強く影響される。通常、温和な条件の静置水和法ではGUVが、ボルテックス処理のような渦流下ではMLVが、高出力の超音波処理ではSUVが形成される。超音波処理によるエマルジョン形成原理を利用する逆相蒸発法は、LUVを形成する。我々は、この調製操作効力を念頭に置いて超音波処理プロテオリポソーム作製技術を考案し、超音波処理により、不活化菌体あるいはウイルス粒子とMLVから表面抗原提示リポソームを作製する世界初の技術を達成した(図2)。これまで我々は、養殖魚類の細菌(4種類)及びウイルス(3種類)感染症に対する経口リポソームワクチンの作製技術を開発し(4)、国内特許も最近登録された。特に、コイヘルペスウイルス病に対する世界初の経口リポソームワクチンの開発を達成(5)、ヒトインフルエンザに対するリポソームワクチンの開発にも成功し、国内及び国際(PCT)特許を出願した。また最近、養殖魚類の、不活化ワクチンでは効かない細菌感染症に対するリポソームワクチンの開発にも、成功している。

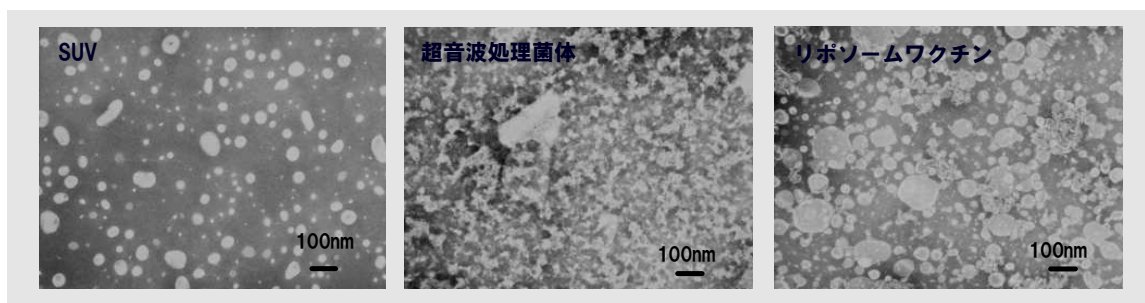


図2. リポソームワクチンの電子顕微鏡像

#### 5. 糖含有脂質薄膜を用いた巨大リポソーム作製技術

GUVの作製法である静置水和法とは、脂質薄膜に低塩濃度の水溶液を加え、泡のように脂質薄膜を浮かせてリポソームを形成させる方法である。極めて温和な手法故、巨大なリポソームが形成される。ただ、

簡便な方法であるが、欠点は収率が低いことである。この問題を解決するため、我々は、糖がメタノールに溶けることに着目した。例えば果糖は、1リットルのメタノールに0.3モルも溶ける。リポソームを作製する際、脂質をクロロホルムに溶かして脂質薄膜を形成させるが、糖のメタノール溶解性は、糖を含んだ脂質薄膜を形成できることを示す。その結果、糖を含んだ乾燥薄膜が水に浸され水和すると、脂質二分子膜間の糖溶液濃度がバルク水に対して極端に高くなるため、二分子膜間へ大量の水が引き込まれ、膜間の距離が増大し、単層の巨大リポソームが大量に形成されることが判明した(7)。我々は、この原理を利用して、GUVの簡便な大量作製技術を開発した(8)(図3)。GUVは細胞サイズである故、医療分野における特異的利用が可能となる。現在、厚生労働省のふるさと雇用再生特別基金事業による支援の下、癌の早期診断用リポソームを開発している。

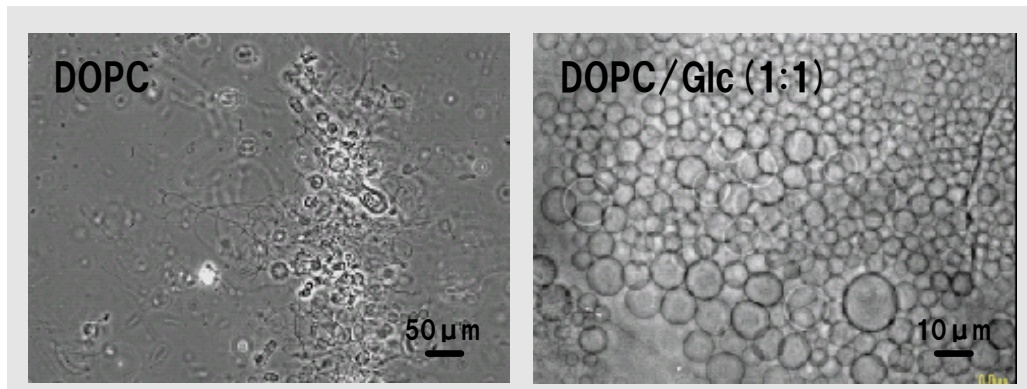


図3. 糖含有薄膜を用いて作製した巨大リポソームの位相差顕微鏡像

## 6. ボルテックス処理のみによるリポソーム作製技術

現在、MLV、LUV、SUV、GUVの作製には、幾種類もの装置を必要とし、手作業であるため専門的技術も必要である。そこで、これらの4種類のリポソームを、ボルテックス処理のみによって作製する技術を開発しようと試みた。MLVは元々ボルテックス処理によって作製できるリポソームであるが、SUVも特殊な有機溶媒に脂質を溶かせ、有機溶媒注入法を用いて作製できることが判った。特筆すべきことは、LUVも逆送蒸発法の原理を巧みに利用して作製できたことである。GUVも前節の技術を基につくることが可能である。作製したリポソームは、従来法によって作製したリポソームと、その性質がほとんど同じであった(図4)。

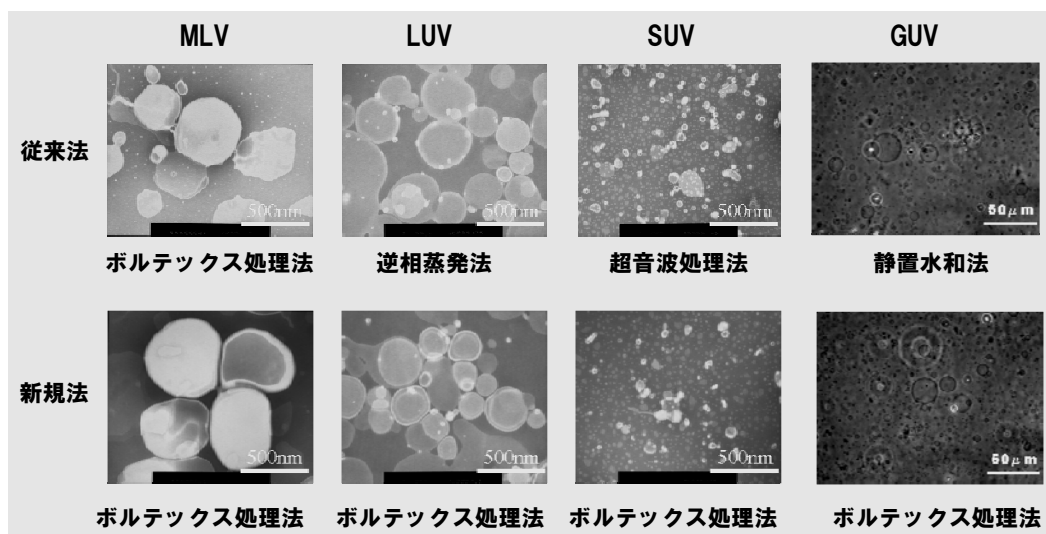


図4. ボルテックス処理法によって作製したリポソームの顕微鏡像

我々はさらに、ボルテックス処理と減圧処理による有機溶媒除去法を開発し、多機能リポソーム自動製造装置として結実している（図5）。本装置は、MLV、LUV、SUV、GUVだけでなく荷電性リポソーム、感受性リポソーム、表面修飾リポソーム、再構成リポソーム、リポソームワクチン等、あらゆるリポソームの作製にも有用であり、医療やリポソーム研究への寄与が期待される。フルオート故、素人でもワンタッチで操作でき、一晩で幾種類もの均質なりポソームをつくるのが可能である。プログラムを用いて自由自在に稼働でき、全駆動部の窒素置換及びアルコールによる洗浄も全自動で行うため、脱酸素及び殺菌が徹底される。最近、2国際特許を出願した。現在、経済産業省新連携認定事業の支援の下、全世界に向け製造・販売促進を図っている。



図5. 多機能リポソーム自動製造装置

## 7. おわりに

本稿においては、脂質二分子膜小胞リポソームを利用して開発した新規技術、即ち、組換えプロテオリポソーム及び超音波処理プロテオリポソーム等のプロテオリポソーム作製技術、糖含有脂質薄膜を用いたリポソーム作製技術、ボルテックス処理のみによるリポソーム作製技術と、それらの医療への応用について紹介した。実用化には程遠いものがあるが、一步一步着実に前進してゆきたい。特に組換えプロテオリポソームにおいては、GUVに、GPCR、Gタンパク質及びアデニル酸シクラーゼを共発現させたGPCRシグナル伝達システムの構築に手が届いている（2, 9-11）。それが達成できれば、創薬戦略にブレークスルーを生むことになるかと期待している。

それだけでなく、ヒトゲノムが解読されて以来、システム生命科学が大きな潮流を見せているが、その中で、生命システムの構築が挑戦的課題となっている。現在、リポソーム（GUV）を活用した「人工細胞モデルの構築」を目指し、実現を図っている（2, 8-10）。リポソームを駆使活用した代替細胞も夢ではない。

## 謝辞

本稿で纏めた種々の研究は、三重大学大学院工学研究科、株式会社リポソーム工学研究所で行ったものである。御指導御鞭撻をいただいた先生方、鋭意協力していただいた研究員・院生・企業役員及び研究員の方々に、深く感謝の意を表したい。

## 文献

- 1) H. Fukushima, M. Mizutani, K. Imamura, K. Morino, J. Kobayashi, K. Okumura, K. Tsumoto, and T. Yoshimura (2008) *J. Biochem.*, 144, 763-770.
- 2) K. Tsumoto, and T. Yoshimura (2009) *Methods Enzymol.*, 465, 95-109.
- 3) H. Fukushima, H. Matsuo, K. Imamura, K. Morino, K. Okumura, K. Tsumoto, and T. Yoshimura, T. (2009). *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 551-556.
- 4) S. Yasumoto, T. Yoshimura, and T. Miyazaki (2006) *Fish Pathol.*, 41, 45-49.
- 5) S. Yasumoto, Y. Kuzuya, M. Yasuda, T. Yoshimura, and T. Miyazaki (2006) *Fish Pathol.*, 41, 141-145.
- 6) N.L. Yamada, M. Hishida, H. Seto, K. Tsumoto, and T. Yoshimura (2007) *Europhys. Lett.*, 80, 48002-1-6.
- 7) K. Tsumoto, H. Matsuo, M. Tomita, and T. Yoshimura (2009) *Colloids Surf. B: Biointerf.*, 68, 98-105.
- 8) K. Tsumoto, K. Kamiya, and T. Yoshimura (2006) *IEEE Proceedings of the International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, MHS 2006 Micro-Nano COE* 7-12.
- 9) K. Tsumoto, K. Kamiya, and T. Yoshimura (2007) *IEEE Proceedings of the International Symposium on Micro- NanoMechatronics and Human Science, MHS 2007 Micro-Nano COE* 102-107.
- 10) K. Tsumoto, Y. Yamazaki, K. Kamiya, and T. Yoshimura (2008) *IEEE Proceedings of the International Symposium on Micro- NanoMechatronics and Human Science, MHS 2007 Micro-Nano COE* 145-150.
- 11) K. Tsumoto, K. Kamiya, S. Kitaoka, S. Ogata, M. Tomita, and T. Yoshimura (2009) *Proceedings of IEEE 2009 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, MHS 2009 Micro-Nano COE (2009)* , 202-207.