pH 摂動法による両親媒性リン脂質ポリマーの上皮透過評価

Evaluation of epithelial permeation of amphipathic phospholipid polymers by pH perturbation assay

東京医科歯科大院医歯総合 [1]，東京医科歯科大生材研 [2]，東洋大理工 [3] ○(DC) 波多野 豊晃 [1]
松元 亮 [1,2]，宮原 裕二 [1,2]，合田 達郎 [3]

Grad. Sch. Life Sci. Eng., TMDU [1], Inst. Biomater. Bioeng., TMDU. [2], Toyo Univ.[3] ○Hiroaki Hatano[1], Akira Matsumoto[2], Yuji Miyahara[2], Tatsuro Goda[3]

E-mail: hatano.bsr@tmd.ac.jp, goda@toyo.jp

緒言　上皮バリアは、上皮細胞とタイトジャンクション（TJ）により形成され、我々の身体の内外を隔てるように存在する。これにより、病原体の体内侵入の防止や、栄養素やイオンの適切な吸収・排出が可能となる。一方で、上皮バリアは薬剤の体内吸収を阻むことが知られており、薬剤送達や高効率吸収薬の開発の課題と位置付けられる。そのため、創薬分野の更なる発達には、上皮バリアによる薬剤の体内取込の障害を克服することができるキャリア分子の開発が期待される。細胞膜と同様のリン脂質極性基を有する親水性の 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine（MPC）と、疎水性の n-butyl methacrylate（BMA）からなる両親媒性リン脂質ポリマー（poly[MPC_{30}-*ran*-BMA_{70}]: PMB30W）は受動拡散により細胞内に取り込まれる。これは、BMA が細胞膜脂質コアと相互作用することで細胞膜に穴を開けることなく膜融合したためだと考えられる。これに対して、我々は独自の新規上皮分析法である pH 摂動法を用いて両親媒性リン脂質ポリマーのキャリア分子としての有用性を評価した。pH 応答性トランジスタ（ISFET）により、弱酸を細胞に作用させた際に生じる細胞膜イオンバリア性に起因した pH 摂動を捉えることにより、細胞膜の空孔形成を評価できる。これまでの研究より、同じくイオンバリア性を有する TJ 破綻では、高感度・高選択的に検出できることが確認された。本研究では、pH 摂動法を用いて、両親媒性リン脂質ポリマーの上皮バリアの透過を評価し、キャリア分子としての可能性を調査した。

結果・考察　PMB30W に蛍光分子（Rhodamine B、FITC）を付与した rhoPMB30W、fitcPMB30W、による上皮単層を透過試験により調べた。その結果、10 mg/mL rhoPMB30W と 1, 10 mg/mL fitcPMB30W とで上皮 MDCK 細胞単層の透過が確認された。ATP 枯渇処理や 4℃条件下の MDCK 細胞を用いた 1 時間の透過試験では、rhoPMB30W や fitcPMB30W は Rhodamine B と FITC を付与した poly[MPC_{100}](: PMPC)と比べて、有意な上皮透過が確認された。従って、両親媒性リン脂質ポリマーは、受動拡散より上皮単層を透過したことが考えられる。次に、pH 摂動法を用いて、両親媒性リン脂質ポリマーによる細胞膜の空孔形成や TJ 破綻を調べた（図 1）。その結果、PMB30W を作用させた際の ΔV に変動は確認されなかった。一方で、TJ 破綻を誘導する EGTA では、ΔV は増加し、細胞膜の空孔形成による TX-100 では ΔV が減少した。従って、細胞膜の空孔形成や TJ 破綻は確認されなかった。以上より、両親媒性リン脂質ポリマーは細胞膜の空孔形成や TJ 破綻なしで上皮バリアの透過するため、キャリア分子として期待できる。

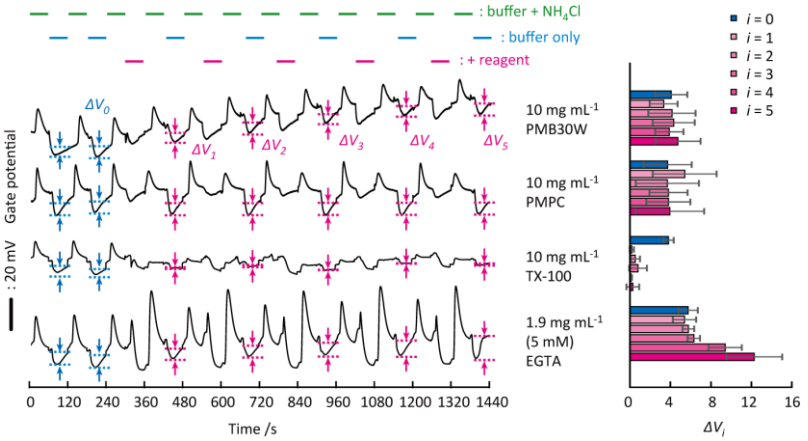

図 1. pH 摂動法による PMB30W の MDCK 単層への作用評価
Fig1. Evaluation of the effect of PMB30W on MDCK monolayer by pH perturbation assay

© 2020年 応用物理学会