

論文の内容の要旨

Study on self-assembled nanoparticles composed of block copolymers and DNA

-Synthesis and application as medical materials-

(ブロック共重合体と DNA からなる自己組織化粒子に関する研究

-合成と医療材料としての応用-)

氏名 柿 澤 資 訓

物質の構造をナノメートルスケールで制御することは、新しい機能を持つ材料を創り出すうえで重要である。特に、ナノサイズの粒子は、触媒、光学材料、電子材料、医療材料としての応用の可能性を秘めており、形状やサイズが制御されたナノ粒子の合成は、近年、基礎および応用科学の両面から注目を集めている。これまでに種々の粒子の合成方法が報告されているが、その中に高分子の自己組織化現象を利用したものがある。この方法で用いられるブロック共重合体は、選択溶媒中で自己集合し、粒径数十ナノメートルのコア-シェル型の構造を持った高分子ミセルを形成する。疎水性の内核を親水性のセグメント層が覆った高分子ミセルは、疎水性の物質を内包することができることから、抗ガン剤などの薬物の担体として利用されている。高分子ミセルの多くは、ブロック共重合体の二つのセグメントの溶媒に対する溶解性の違いが会合の駆動力になっているが、最近になって、静電相互作用や金属錯体形成を利用した新しいタイプの高分子ミセルが報告された。中でも内核が高分子電解質の複合体(ポリイオンコンプレックス,PIC)で形成されたものは、核酸などの生理活性物質をミセル内核に内包することができ、それらの運搬体としての利用が期待されている。

核酸分子を生体に投与し疾患の治療を行う方法としては、正常遺伝子を導入する

遺伝子治療や標的遺伝子の発現を抑制するアンチセンス法などがある。これらは遺伝性疾患や癌、エイズなどの難治性疾患を対象としているが、臨床的な使用にはまだ多くの問題が残されている。投与された核酸分子は、標的組織の細胞内に取り込まれ、最終的に遺伝子治療の場合は核内、アンチセンス法の場合は核内もしくは細胞質内まで到達しなければならない。しかしながら、核酸分子は生体内に存在する核酸分解酵素によって速やかに分解されてしまうし、ポリアニオン性であることから脂溶性の細胞膜の透過性も低い。そのため、核酸分子を安定な形で標的細胞内部に送り込むことができる送達システムを確立することが、これらの治療法の実現のために必要とされている。

本研究では、高分子ミセルに新たな機能を付加し、アンチセンス法の際に必要なとされるオリゴヌクレオチド (ODN)の運搬体として利用することを目指した。

カチオン性の高分子であるポリリジン(PLL)と水溶性のポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体 PEG-PLL は、核酸などのアニオン性の高分子と水溶液中で静電相互作用により自発的に会合し高分子ミセルを形成する。このポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルは、PEG の外殻が内核のポリイオンコンプレックスを覆うというコア-シェル型の構造を有しており、アンチセンス DNA を内包したものは粒径数十 nm であることが明らかとなっている。この PIC ミセルを DNA のキャリアーとして用いた場合、PEG の外殻によって、生体から異物として認識されるのを防いだり、内核に内包された DNA を核酸分解酵素の攻撃から守ることができると考えられる。また、腎臓での濾過や、細網内皮系による取り込みの回避も期待できる。

現在のところ、ODN のような鎖長の短い核酸を内包した PIC ミセルの安定性は十分でなく、投与後血中で解離してしまう。そのため、目的組織に到達するまで PIC ミセルが解離してしまわないように安定化する必要があるが、安定化により細胞内での解離も抑えられてしまえば、内包された DNA の薬理効果が発揮されない。そこで、この問題を解決するために、細胞内の環境に応答して PIC ミセルが解離するメカニズムが必要であると考え、SS 結合によるミセルの架橋に注目した。SS 結合の特徴は、この結合が細胞内の還元的環境で開裂するということである。このため、SS 結合で PIC ミセルの内核を架橋すれば、静脈注射後も血流中で解離が抑制されるうえ、細胞内に取り込まれた後には、SS 結合の開裂に伴い内包された DNA が放出されることが期待できると考えた。

NCA の開環重合により合成した PEG-PLL の PLL セグメントへチオール基を導入したものと ODN のモデル高分子として使用したポリアスパラギン酸は pH7.4 の緩衝溶液中でミセルを形成することが光散乱測定によって確かめられた。チオール基を SS 結合へと酸化し架橋した後、ミセル溶液を動的な光散乱測定(DLS)し、ヒストグラム法により解析をした結果、ミ

セルの粒径分布は比較的狭く、単峰性であることが示された。同じく DLS の結果をキュムラント法により解析したところ、多分散度は 0.08、ミセルの流体力学的半径は 16 nm と求められた。内核架橋によるミセルの安定性は、NaCl 濃度にたいするミセルの見かけの分子量の変化を静的光散乱法で測定することにより評価した(図 1)。チオール基を導入していない PEG-PLL からなる高分子ミセルでは、NaCl 濃度の増加にともないポリマー間の静電相互作用が遮蔽されるため、分子量の急激な減少がみられ、NaCl 濃度が 0.3M においてほぼ解離した状態

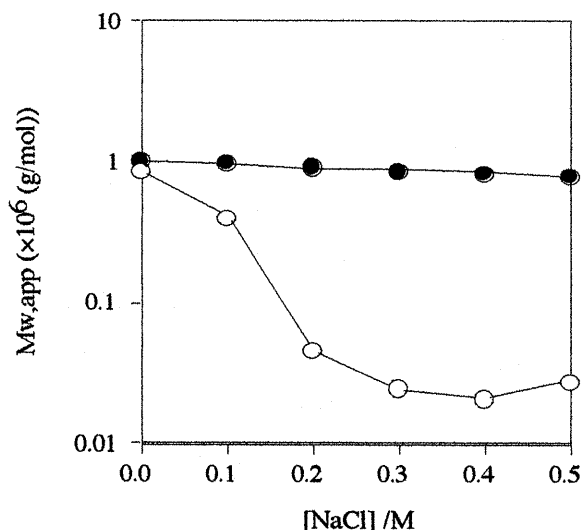


図 1. NaCl濃度に対するPICミセルの見かけの分子量変化 (●) 架橋ミセル, (○) 架橋していないミセル, (濃度 1mg/ml, 温度 25°C, 溶媒 10 mM PBS (pH 7.4))

であると考えられる。それに対し、架橋したミセルでは NaCl 濃度に対する見かけの分子量の変化は小さく、ミセルの安定化が起こっていることが確認された。また、NaCl 濃度 0.3 M の架橋ミセル溶液に、SS 結合の還元剤である DTT を添加したところ、ミセルの解離に伴う散乱光強度の減少が見られ、安定化が SS 結合の形成によるものであることが明らかとなった。

次に、同様の方法で調整した ODN を内包した架橋ミセルについて、物性評価、内包された ODN の分解酵素にたいする耐性、解離挙動を評価した。DLS によって求めた架橋ミセルの粒径は PEG-PLL のチオール導入率 0-26%の範囲で粒径約 40 - 41nm であった。また、DLS 測定の結果をヒストグラム解析した結果、粒径分布は単峰性で、均一なミセル粒子が形成されていることが確認された。酵素処理した DNA およびミセルの溶液をキャピラリー電気泳動測定した結果、フリーのアンチセンス DNA では、反応 1 時間後には 20mer の DNA のピークはほぼ消失したのに対し、ミセルに内包されたものでは分解が大幅に抑制された。架橋無しのみセルと架橋ミセルの反応 1 時間後のエレクトロフェログラムを比較すると、架橋したものでは分解物がほとんどみられず、架橋によって DNA の分解酵素に対する耐性が更に向上していることが確認された。生体由来の還元剤であるグルタチオン(GSH)処理した架橋ミセルを電気泳動し(図 2)、放出された DNA のバンドを画像処理装置によって定量したところ、10,26% のチオール基を導入した PEG-PLL を用いて調製した架橋ミセルそれぞれにおいて、GSH 濃度 1mM と比較して、100 μ M,10 μ M の場合は DNA 放出量が少なく、GSH 濃度依存的にミセルが解離し、内包された DNA が放出されることが示された。細胞内の GSH の濃度は数 mM、血流

中では 10 μ M であることが知られているため、以上の結果は、SS 結合による内核架橋ミセルが細胞内において選択的に解離することを示唆するものである。

また、本研究では、新しいタイプのミセル型 DNA キャリアーとして、内核が高分子と無機結晶の複合体からなる高分子ミセルを開発した。

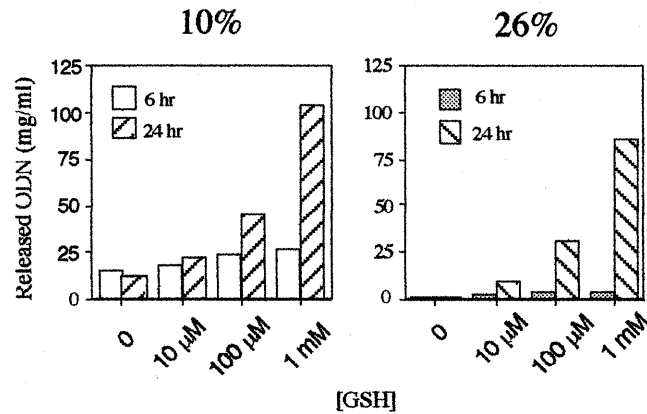


図 2. GSH処理後の架橋ミセルからのODNの放出

ここでは、リン酸カルシウム(CaP)と相互作用することが知られているポリアスパラギン酸(PAA)とポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体(PEG-PAA)を使用し、PAA セグメントと CaP の複合体を内核、PEG 層を外殻とした高分子ミセルを調製、DNA 内包能や細胞への取り込みなどを評価した。

PEG-PAA 共存下で、カルシウムイオン、リン酸イオン、ODN を混合すると、図 3 示したように、CaP は粒子を形成し、その粒径は、PEG-PAA 濃度 70-280 μ g/mL の範囲で粒径は、91-125nm であり、140 μ g/mL 付近で極小が見られた。一方、PAA ホモポリマー存在下では、沈殿形成が促進されることがわかった。この結果は、PEG-PAA の吸着による粒径の減少と、PAA による結晶成長の促進のバランスによって粒径が変化することを示唆していると考えられる。HPLC 測定で決定した CaP 粒子に内包された DNA の割合は、PEG-PAA 濃度が増加するに伴い、45%から 15%とへと減少し、DNA と PAA が競争的に CaP に結合していることが示唆された。また、細胞への取り込みをフローサイトメトリーで評価した結果、ODN 単独と比較して顕著な取り込みの増加が起こることが示された。

リン酸カルシウムとの共沈による核酸分子の細胞への導入方法は以前から知られているが、その導入効率は、結晶の大きさに関係していると考えており、その成長の制御を行うことは、効率的な DNA の導入を実現するために重要であると考えられる。ここで試みた、ブロック共重合体による CaP の結晶成長の制御とミセル化は、導入率向上だけでなく、PIC ミセルと同様の種々の利点も期待できると考えられる。

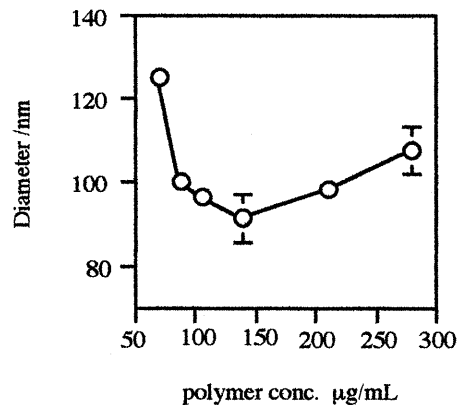


図 3. CaP粒子の高分子濃度に対する粒径変化 (n=3, \pm S.D.).