

論文の内容の要旨

論文題目 Development of Diagnostic and Therapeutic Biomaterials Based on Mercapto-Terminated Poly(ethylene glycol)

(末端にメルカプト基を有するポリエチレングリコールを利用した
診断および治療用バイオマテリアルの構築)

氏名 高江誓詞

ポリエチレングリコール(PEG)は毒性や免疫原性が低く、医薬品、化粧品、食品などに広く利用されており、生体適合性の高いバイオマテリアルとして幅広く研究されている。特に PEG を利用した表面ブラシ構造は、その立体反発効果からタンパク質などの生体分子の非特異的な吸着を著しく抑制することが可能である。本研究では末端にメルカプト基を有する PEG (PEG-SH)に注目し、新たなバイオマテリアルの構築を試みた。具体的には、(i) 金ナノ粒子表面を PEG ブラシで修飾した PEG 化金ナノ粒子、(ii) ポリプレックスミセル型遺伝子ベクターに大別される。

SH 基は金や銀、そしてカドミウムなどの金属と特異的に結合するため、PEG-SH を用いることでこれらの金属の表面に PEG ブラシを構築することが可能となる。本研究室ではこれまで PEG-SH の α 末端へのラクトース導入に成功しており、それを基に表層にラクトースを有する PEG 化金ナノ粒子を調製し、生理的条件下での高い分散安定性の獲得に成功した。さらに RCA₁₂₀ レクチンを介した特異的凝集とそれに伴う色調変化を実現し、簡便かつ高感度な診断材料としての応用が期待されている。

このような金ナノ粒子の凝集に基づいたセンシングにおいて、表層のリガンド密度は重要なファクターであったにもかかわらず、生理的条件下における非特異的な凝集を抑制できなかったために、これまで系統的な研究はなされていなかった。そこで第2章では、表層ラクトース密度を制御した PEG 化金ナノ粒子を調製し、そのラクトース密度がレクチンを介した凝集に与える影響について詳細に解析した。ラクトース密度を制御した金ナノ粒子を得るために、ラクトースを導入した PEG と非導入 PEG を種々の割合で混合し、金ナノ粒子への修飾を行った。次に粒子の物性評価として、熱質量分析(TGA)、走査型電子顕微鏡(SEM)から1粒子あたりの PEG の本数と PEG 層も含めた粒径を算出することに成功し、ラクトース密度を算出した。レクチンを介した凝集においては、ラクトース導入率が20%の粒子はどのレクチン濃度でも凝集しなかったことから、レクチン認識に対してラクトース密度の臨界値が20~40%に存在することが確認された。このような非線形的な応答が確認された理由としては、多価結合の効果が考えられる。すなわち、粒子同士が複数のレクチンを介して凝集するに十分なラクトース密度を有して初めて検出可能な凝集が起こるのではないかということである。この結果より、金ナノ粒子の凝集によるセンシングを正確に行うためには、リガンド密度をコントロールする

ことが極めて重要であることが示された。

上述のような PEG 化金ナノ粒子を利用して、第 3 章では表面プラズモン共鳴装置 (SPR)での低分子化合物の高感度定量試みた。SPR は生体分子間の相互作用をリアルタイムで計測する技術として注目を浴びているが、低分子化合物を直接計測することは非常に困難である。この欠点を克服するために次のような手法を開発した。すなわち、まず RCA₁₂₀ レクチンを固定化したセンサーチップに対してラクトースを有する PEG 化金ナノ粒子を結合させた後、すぐにフリーのガラクトース (低分子アナライトのモデル) をインジェクトすることにより、ガラクトース濃度に依存した粒子の溶出が起こるといふものである。実際に行った結果、0.1-50 ppm の濃度域でガラクトース濃度と線形的な関係で金ナノ粒子が溶出することが確認された。今後適切なりガンド固定化金ナノ粒子と SPR を組み合わせることにより、種々の低分子化合物の定量への応用が期待できる。この方法は Colloidal-Au replacement assay と命名した。

また、SH 基は $2R-SH \rightleftharpoons R-SS-R$ の反応により、酸化的環境下ではジスルフィド結合 (SS 結合) を介した 2 量体へ変化し、逆に還元的環境下では SH 基に戻るといふ酸化還元環境に応答して可逆的に変化する性質を有する。細胞内外の酸化還元環境に応答するバイオマテリアルとして、この SS 結合の性質を利用する試みがドラッグデリバリーなどの分野で活発になされている。血液中などは低いグルタチオン濃度 (約 $10 \mu\text{M}$) であり酸化的環境であるため、SS 結合は安定であるのに対して、細胞内では高いグルタチオン濃度 (約 10mM) であり還元的環境のため、SS 結合は開裂する。第 4 章では、PEG-SH とポリカチオンを SS 結合で繋ぐことにより、細胞内環境に応答する遺伝子キャリアの創製について報告する。PEG-ポリカチオンからなるブロック共重合体はポリアニオンであるプラスミド DNA (pDNA) と静電相互作用を駆動力として、ポリプレックスミセルを形成し、遺伝子キャリアとしての機能を有することがこれまでの本研究室の研究より報告されている。しかしながらウイルスベクターに比べると安全性の面では勝っているものの遺伝子発現効率に関しては改善の余地がある。そこで新たな遺伝子ベクター用の分子設計として、PEG-polyasparatamide ブロック共重合体の PEG と polyasparatamide セグメントの間に SS 結合を導入し、さらに asparatamide の側鎖にはエチレンジアミンユニットを有する (PEG-SS-P[Asp(DET)]) とした。SS 結合の効果により、細胞外では PEG がミセルの表層を覆うことにより、pDNA を安定に内包できる一方で、ポリプレックスミセルが細胞内に入った後、細胞内の還元環境により PEG が開裂することから、細胞内のポリアニオンと pDNA との置き換わりが促進され、遺伝子発現効率が増加することが期待される。またエチレンジアミンユニットの構造は 2 段階の pKa を有していることから、プロトンスポンジ効果によるエンドソームエスケープが促進されるという報告に基づくものである。

まず目的の SS 結合を有するブロック共重合体 PEG-SS-P[Asp(DET)]の合成を行った。またコントロールとして SS 結合のない PEG-P[Asp(DET)]、および PEG のないカチオン性ホモポリマーP[Asp(DET)]を用いた。PEG-SS-P[Asp(DET)]と pDNA のミセル形成を電気泳動とエチジウムブロマイドを用いた蛍光測定により確認したところ、N/P 比 2 以上

で明確なコンプレックスの形成が認められた。また、動的光散乱より粒径は 80-90 nm 程度となり、SS 結合のない PEG-P[Asp(DET)]から形成されるミセルと同程度のサイズとなった。さらに種々の N/P 比 (pDNA のリン酸基に対するポリマーのアミノ基の比) におけるポリプレックスのゼータ電位を測定したところ、PEG-SS-P[Asp(DET)]と PEG-P[Asp(DET)] からなるポリプレックスは高い N/P 比においても 0 に近いゼータ電位を示したが、PEG-SS-P[Asp(DET)]の系に還元剤であるジチオスレート(DTT)を添加したところ、カチオン性ホモポリマーP[Asp(DET)]のポリプレックスのゼータ電位に近づいたことから還元環境に応答して SS 結合が切断された結果、PEG が解離したことが示された。最後にこのポリマーを用いて *in vitro* での遺伝子発現効率を HeLa 細胞を用いて測定した。PEG-P[Asp(DET)]のミセルに比べて PEG-SS-P[Asp(DET)]は 1-3 桁高い遺伝子発現効率を示し、P[Asp(DET)]の系とほぼ同程度の値を示した。SS 結合の効果により還元環境に応答して PEG が解離するインテリジェントミセルは有用な遺伝子キャリアとして期待される。