

## 論文の内容の要旨

論文題目 Development and Functional Evaluation

of Nano-sized Polyion Complex Vesicles (Nano-PICsomes)

(ナノサイズのポリオンコンプレックス型中空粒子の創製とその機能評価)

氏名 安楽泰孝

昨今、ナノテクノロジー主導のバイオテクノロジー研究が盛んに行われている。これらの研究の目標の一つに、生体内で活躍できる『バイオナノデバイス』の創製がある。種々の生理活性物質、診断材料などを安全に生体に持ち込むためには、生体適合性材料でデザインされたナノカプセルの開発が必須である。中でも中空粒子はひとときわ有望であり、リポソーム・高分子ベシクルを利用した材料の開発が数多くなされてきた。しかしながら、こうした研究の大部分が疎水性相互作用を集合体形成の駆動力としており、その調製には有機溶剤を用いた製膜や超音波処理が必要など決して単純なものではなかった。これら既存のベシクルの弱点を補うべく、水系での単純な調製法を追及して考案されたものが当研究室において世界に先駆けて開発した『ポリオンコンプレックス型ポリマーソーム(PICsome)』である。PICsome は、生体適合性に優れるポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸由来の荷電性セグメントからなり、反対電荷を有するブロック共重合体同士の水中における静電相互作用による自己組織化を利用しており、有機溶媒の助けを全く借りず、純粋な水系での単純混合で調製できる点で、有機溶剤の利用や激しい超音波処理、加温などを調製の定法とする既存の疎水性相互作用型キャリア(リポソーム、ポリマーソーム)に比べて大きな利点を有している。さらに、機能性タンパク質の簡便な内包が可能である、PIC由来の半透過性能を有する、外部の消化酵素から内部のタンパク質を保護する機能を併せ持つことを世界で初めて見出している。このような簡便なタンパク質の封入は既存のキャリアでは難しく、PICsome は汎用性の高いデリバリーキャリアとして期待される。

しかしながらこれまでに報告された PICsome はいずれも  $\mu\text{m}$  サイズ (1-3  $\mu\text{m}$ ) であった。  $\mu\text{m}$  サイズの微粒子を静脈注射した場合、血中を滞留することなく細網内皮系組織によって貪食される為、キャリアとして至適なサイズとはいえない。一方、  $\text{nm}$  サイズの微粒子(直径 < 200  $\text{nm}$ ) の場合、EPR(enhanced permeability and retention)効果によって癌病巣・炎症部位へ蓄積する。よってデリバリーに適した  $\text{nm}$  サイズの PICsome を調製する必要がある。

そこで本研究では、これまでに得られた知見を基に、デリバリーキャリアに適した  $\text{nm}$  サイズの PICsome (Nano-PICsome) を調製し、物性、物質の内包、PIC膜由来の物質透過性、血中安定性などを詳細に検討し、最終的にリポソームやその改良型であるポリマーソームを超える新しいデリバリーツールの構築を試みた。

先行研究で、PEG含有率( $f_{\text{PEG}}$ )がPICの形態を決定し、13%程度以下になるとベシクル形成が有利になることを報告した。また荷電性高分子の物性より、溶液の塩濃度もPICの形態・サイズに

影響することが知られている。そこで本研究では、1. PIC を形成するコンポーネントの  $f_{\text{PEG}}$ 、2. 溶液の塩濃度の 2 点に注目し、PICsome の nm サイズ化を目指し、適切な調製条件を探索した。ポリアニオン PEG-poly( $\alpha,\beta$ -aspartic acid) (PEG-P(Asp) (45-75))、ポリカチオン Homo-poly([5-aminopentyl]- $\alpha,\beta$ -aspartamide) (Homo-P(Asp-AP) (82)) を合成し、pH 7.4 10 mM リン酸緩衝液 (0 mM NaCl) にそれぞれ溶解し、電荷比が等しくなるように混合すると一枚膜構造(膜厚; 10-15 nm)の Nano-PICsome を形成することが明らかとなった。また調製時に用いるポリマー溶液の濃度を変えることで(0.1-10 mg/mL)、容易に Nano-PICsome のサイズコントロールが可能であることも明らかとなった。このように自発的に nm サイズのベシクルを調製でき、さらに高分子溶液の濃度を変えることで容易にサイズをコントロールできる例は他に類を見ない。至適サイズも用途に応じて異なってくるデリバリーキャリアにおいて、これらを作り分ける技術は大きな利点と言える。

ベシクルをドラッグデリバリーキャリアとして用いる場合、その内水相に薬物を内包し、リリースする特性が必要不可欠である。本研究では、あらかじめ Fluorescein isothio cyanate-labeled dextran (FITC-Dex; M.W.=10000) を PEG-P(Asp) 溶液に溶かしておき Homo-P(Asp-AP) 溶液と混合することで、内水相に FITC-Dex を内包した Nano-PICsome (FITC-Dex-loaded Nano-PICsome) を調製可能であることを FCS 測定より確認した。また内包された FITC-Dex が PIC 膜を通過してリリースされる『PIC 膜の物質透過性』も同様の方法で確認した。

さらに得られた Nano-PICsome の動的挙動について検討を行った。Nano-PICsome のサイズの経時変化を観察したところ調製直後は 100 nm だが、単分散性を保ったまま約 24 時間かけて徐々に大きくなり、約 280 nm 辺りで一定になった。この成長挙動は、最終的にサイズが収束する、単分散性を維持したまま成長するといったこれまでに類をみない挙動である。そこで調製直後の Nano-PICsome 溶液に含まれる PIC の詳細な検討を行ったところ、主生成物である Nano-PICsome 以外に 1 対、または 2 対の小さな PIC が存在しており、これらは時間変化に伴い、Nano-PICsome に取り込まれることによりサイズ成長を助長していることが明らかとなった。また成長後の Nano-PICsome を再び Vortex にかけると、調製直後のサイズの Nano-PICsome を形成するといった大変興味深い機能を有していることも確認した。

この Nano-PICsome は低イオン強度の溶液中では安定であるが、生理条件下(150 mM NaCl 含)では、そのサイズ・形状を維持することができない。これはイオンコンプレックスの特徴である溶液のイオン強度に大変敏感であることに起因している。Nano-PICsome を生体内デリバリーキャリアとして展開していく上で、生理条件下での粒子の安定性は必須である。そこで水溶性の縮合剤である 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) を用いて -COOH と -NH<sub>2</sub> を縮合し、アミド結合を膜中に形成することで、生理条件下で安定な Cross-linked Nano-PICsome の調製に成功した。Cross-linked Nano-PICsome は、従来の Nano-PICsome が有していなかった「耐凍結乾燥」「耐遠心濃縮安定性」を有している。これらは粒子の粉末状での長期保存が可能となり、サンプルごとのバッチ間誤差を抑えることが可能、さらに粒子の濃度を容易に調製できるなど、デリバリーキャリアとして実用化する上で、大変重要な特性である。

最後に、これまでに得られた Nano-PICsome の特性を活かし、様々なサイズの蛍光ラベル化した Cross-linked Nano-PICsome を調製し、担がんマウスに尾静注し、その血中滞留性および臓器分布を評価した。その結果、100, 150 nm の Cross-linked Nano-PICsome は EPR 効果による癌組織への集積が見られた。また 150, 200 nm の場合は、半減期が 23.3, 19.7 時間と長期血中滞留性を示す粒子であることが明らかとなった。

このように本研究より、1. 一組のポリマーの組み合わせでサイズコントロールが可能、2. PIC 膜由来の物質透過性能を有し、その速度を架橋によりコントロール可能、3. 長期血中滞留性を有するなど、Nano-PICsome は、生体内デリバリーキャリアとして用いる上で大きな利点を有していることを明らかにした。