

(続紙 1)

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	太田 貴久
論文題目	ポリエチレングリコール修飾によるペプチド被覆カーボンナノチューブの分散安定化と得られた複合体のドラッグデリバリーシステムキャリアへの応用に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は、グラフェンシートが筒状に巻いた針状構造をしており、広い表面積を有している。分散したSWCNTは、細胞に直接貫入あるいはエンドサイトーシスによって取り込まれると報告され、本特性からSWCNTは、薬物・遺伝子などを対象とするドラッグデリバリーシステム (DDS) キャリアとしての応用が注目されている。さらにSWCNTは、近赤外線照射により発熱および活性酸素種を生成することが確認されているため、光線温熱療法 (PTT) ・光線力学療法 (PD T) への適用が研究されており、医療分野において非常に有用な材料となっている。しかし、SWCNTは疎水性が極めて高く、SWCNT単独では水に分散せず、界面活性剤を分散剤に利用した場合には細胞障害性が問題となる。そこで、本研究では生体適合性が高いと考えられるKWKG配列を7回繰り返した両親媒性ペプチド (KWKG)₇ とSWCNTとの複合体形成を基盤としたSWCNTの分散性向上とDDS応用について検討した。調製したSWCNT-(KWKG)₇ は水溶液中では安定に分散するが細胞培養培地中では凝集したため、さらにポリエチレングリコール (PEG) 修飾によるSWCNT-(KWKG)₇ の分散安定化を試み、得られたPEG修飾・ペプチド-SWCNT複合体の細胞による取り込みを蛍光顕微鏡観察で確認した。引き続き、複合体のDDSキャリアへの応用に向け、遺伝子デリバリーおよび薬物徐放化への適用の可能性を検討した。</p>			
第一章 ペプチド-カーボンナノチューブの PEG 修飾による分散安定化と細胞取り込みの評価			
<p>SWCNTは、重水中での超音波処理によってSWCNTのバンドル化が解消され、SWCNT表面と (KWKG)₇ のトリプトファン残基のインドール骨格との π-π 相互作用、並びに疎水性相互作用で複合体を形成して分散する [SWCNT-(KWKG)₇]。SWCNT-(KWKG)₇ は、表面のアミノ基による静電的反発により水溶液中では安定に分散するが、培地に添加後は次第に凝集した。そこで、SWCNT-(KWKG)₇ のアミノ基に対し、PEG化試薬Methyl-(PEG)₁₂-NHSを用いたPEG修飾を行った [SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂]。修飾率は、Methyl-(PEG)₁₂-NHSの代わりにFITC-(PEG)₁₂-NHSを用いて修飾後、FITCの吸光度から定量した。SWCNT-(KWKG)₇ の全アミノ基数に対して50%当量のFITC-(PEG)₁₂-NHS を反応させると約13.3%のアミノ基が修飾された。同一条件で修飾を行うことを前提に、FITC-(PEG)₁₂-NHSにより得たPEG修飾率をMethyl-(PEG)₁₂-NHSによる修飾率とみなし、PEG修飾率と分散安定性の関係を見ると、PEG修飾率の上昇とともに分散安定性が向上し、13.3%PEG修飾されたSWCNT-(KWKG)₇ では、培地中で24時間安定な分散が確認された。次に、システインを1残基導入したCWKG (KWKG)₆ と (KWKG)₇ の1:10混合ペ</p>			

プチドでSWCNTsを分散後、チオール基に対してBODIPY TMR-(PEG)₁₂-maleimideを反応させて修飾し、得られた蛍光標識SWCNT複合体の細胞取り込みを蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリー法(FACS)によって評価した結果、分散安定性の向上に伴って細胞取り込みは促進され、13.3%PEG修飾した場合の24時間後の取り込み量はPEG未修飾の場合と比較して約7倍であった。

第二章 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂を用いた遺伝子デリバリー

第一章で調製したSWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂は、表面においてアミノ基に由来するカチオン性を有し、プラスミドDNA (pDNA) と静電的相互作用に基づく複合体を形成して、培地中でPEG修飾したSWCNT-(KWKG)₇と同様の分散安定性を示した[SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂-pDNA]。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂と蛍光標識されたpDNAを用いたpDNAの細胞取り込みを蛍光顕微鏡観察及びFACSによって評価した結果、4時間後の取り込み量はトランスフェクション試薬であるFuGENEと同等であり、また蛍光タンパク質をコードしたpDNAの細胞導入により、タンパク質の発現も確認された。以上の検討から、PEG修飾によって分散安定化したSWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂をキャリアに用いることにより、細胞への遺伝子導入が可能なが判明した。

第三章 SWCNT-CWKG (KWKG)₆-(PEG)₁₂を用いた薬物の徐放化

薬品動態制御学分野では、抗がん剤マイトマイシンC (MMC) をデキストラン誘導体にリンカーを介して結合させた徐放性高分子化MMC誘導体が、pH依存的にMMCを徐放することを報告している。そこで、SWCNTをキャリアとして用い、リンカーを介してMMCを縮合した放出制御型DDSの調製を行った。CWKG (KWKG)₆を用いて分散したSWCNT複合体のアミノ基に対してPEG修飾、またチオール基に対してPEGリンカーを介したMMC修飾を行って、SWCNT-CWKG (KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMCを調製した。PEG修飾SWCNT-CWKG (KWKG)₆においても、バッファー中でのpH依存的なMMCの徐放が認められ、SWCNT-CWKG (KWKG)₆-(PEG)₁₂が徐放性薬物キャリアとして機能することが確認された。

以上、申請者は両親媒性ペプチドとSWCNTの複合体を基盤として、PEG修飾によるSWCNTの分散安定化とDDS応用への展開の可能性について検討した。PEG修飾したSWCNTでは分散安定性が顕著に向上するとともにPEG修飾率依存的に細胞取り込みが促進されることが確認され、さらにSWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂とpDNAが優れた分散安定性を示し、pDNAの細胞取り込みと遺伝子発現を与えることを確かめた。さらに、MMCを結合させたSWCNT-CWKG (KWKG)₆-(PEG)₁₂は、MMCの徐放性DDSとしての機能を有することが確認された。以上の知見は、SWCNTのDDSキャリアとしての応用、さらに今後の医療分野への幅広い展開の可能性を示唆するものである。

(論文審査の結果の要旨)

グラフェンシートが筒状に巻いた針状構造を持ち広い表面積を有する単層カーボンナノチューブ(SWCNT)は、薬物や遺伝子などを対象とするドラッグデリバリーシステム(DDS)キャリアとしての応用が注目されている。さらにSWCNTは、近赤外線照射により発熱および活性酸素種を生成することが確認されており、光線温熱療法(PTT)や光線力学療法(PDT)など、医療分野への応用も有望視されている。しかし、SWCNTは疎水性が極めて高く、SWCNT単独では水に分散せず、界面活性剤を分散剤に利用した場合には細胞障害性が問題となる。そこで、著者は生体適合性が高いと考えられるKWKG配列を7回繰り返した両親媒性ペプチド(KWKG)₇を用い、SWCNTとの複合体形成を基盤とした分散性向上とDDS応用の可能性について検討した。

SWCNTは、重水中での超音波処理によってバンドル化が解消され、SWCNT表面と(KWKG)₇のトリプトファン残基のインドール骨格との π - π 相互作用、並びに疎水性相互作用により複合体を形成して分散する[SWCNT-(KWKG)₇]。最初に、SWCNT-(KWKG)₇の水溶液中における安定性について検討した結果、表面のアミノ基による静電的反発により水中では安定に分散するが、生理的条件を模した細胞培養培地に添加した場合には凝集が起きた。そこで、SWCNT-(KWKG)₇のアミノ基に対し、PEG化試薬Methyl-(PEG)₁₂-NHSを用いたPEG修飾を行った[SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂]。修飾率をFITC-(PEG)₁₂-NHSを用いて測定した結果、SWCNT-(KWKG)₇の全アミノ基数に対して50%当量のFITC-(PEG)₁₂-NHSを反応させると約13.3%のアミノ基が修飾されることが確認されたので、以後同一条件で修飾を行うことを前提に、FITC-(PEG)₁₂-NHSにより得たPEG修飾率をMethyl-(PEG)₁₂-NHSによる修飾率とみなした。PEG修飾率と分散安定性の関係を見ると、PEG修飾率の上昇とともに分散安定性が向上し、13.3%PEG修飾されたSWCNT-(KWKG)₇では、培地中で24時間安定であった。またシステインを1残基導入したCWKG(KWKG)₆と(KWKG)₇の1:10混合ペプチドでSWCNTsを分散後、チオール基に対してBODIPY TMR-(PEG)₁₂-maleimideを反応させ得られた蛍光標識SWCNT複合体の細胞取り込みを蛍光顕微鏡観察及びフローサイトメトリー法(FACS)によって評価した結果、分散安定性の向上に伴って細胞取り込みは促進され、13.3%PEG修飾した場合の24時間後の取り込み量はPEG未修飾の場合と比較して約7倍であった。

次に、遺伝子デリバリーへの応用を目指して、表面にアミノ基に由来するカチオン性を有するSWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂とプラスミドDNA(pDNA)の間で静電的相互作用に基づく複合体を形成させ[SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂-pDNA]、培地中での安定性および細胞取り込みを評価した。検討の結果、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂と同様の分散安定性が得られ、蛍光標識したpDNAを用いたpDNAの細胞取り込みを蛍光顕微鏡観察及びFACSによって評価した結果、4時間後の取り込み量はトランスフェクション試薬であるFuGENEと同等であり、また蛍光タンパク質をコードしたpDNAの細胞導入により、タンパク質の発現も確認された。以上の検討から、PEG修飾によって分散安定化したSWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂をキャリアに用いることにより、細胞への遺伝子導入が可能であることが判明した。

さらに、抗がん剤マイトマイシンC (MMC) をデキストラン誘導体にリンカーを介して結合させた徐放性高分子化MMC誘導体がpH依存的にMMCを徐放することを報告されていることから、CWKG (KWKG)₆を用いて分散したSWCNT複合体のアミノ基に対してPEG修飾、またチオール基に対してPEGリンカーを介したMMC修飾を行って、SWCNT-CWKG (KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMCを調製した結果、緩衝液中でのpH依存的なMMCの徐放が認められ、SWCNT-CWKG (KWKG)₆-(PEG)₁₂が徐放性薬物キャリアとして機能することが確認された。

以上、著者はPEG修飾両親媒性ペプチドとSWCNTの複合体形成を基盤として、複合体の遺伝子デリバリーおよび薬物徐放化への適用の可能性を検討し、pDNAに対する細胞取り込みと遺伝子発現の促進効果、またMMCに対する徐放性DDSとしての機能を確認した。以上の知見は、SWCNTのDDSキャリアとしての応用、さらに今後の医療分野への幅広い展開の可能性を示唆するものである。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。また、平成28年2月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当分の間当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： _____ 年 _____ 月 _____ 日以降