

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

2015

太田 貴久

## 総論の部

### 緒言

単層カーボンナノチューブ (single walled carbon nanotube: SWCNTs)は、直径が数ナノメートル、長さが数百ナノメートルから数マイクロメートルのサイズのグラフェンシートが筒状に巻いた針状構造の物質で、広い表面積を有しているために機能性分子を表面に付加することで各種機能化が期待できる。また、水溶液中に分散した SWCNT は、細胞表面に直接貫入、あるいはエンドサイトーシスによって、細胞に良く取り込まれることが報告されている。このような特性から、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。他方、SWCNT は光エネルギーを熱エネルギーに変換する光学特性を有しており、近赤外線照射による発熱効果を利用してがん細胞死を誘導する光線温熱療法 (photothermal therapy: PTT)への展開が研究されている。また、近赤外線照射による活性酸素種の生成も報告されており、抗がん治療としての光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT)への適用も研究されるなど、SWCNT は医療分野において非常に有用なナノ材料となっている。

SWCNT は、このように有用な構造と特性を有するが、一方その疎水性のため水溶液中に安定に分散させることが極めて難しいことがライフサイエンス分野への応用における問題となっている。そこで筆者の属する薬品動態制御学分野では、分散安定性や生体適合性の向上、機能化を考えて、両親媒性ペプチドを分散剤として用い SWCNT 表面を被覆した複合体を開発してきた。SWCNT とペプチドとの複合体においては、ペプチドのアミノ酸配列をデザインすることにより、遺伝子と静電的相互作用に基づいて複合体を形成し送達する遺伝子キャリアや、薬物を官能基に結合させた薬物送達キャリアとしての応用が期待できる。そこで筆者は、両親媒性ペプチドとして KWKG 配列を 7 回繰り返す(KWKG)<sub>7</sub>ペプチドを用いて SWCNT を複合体化し、さらにこれをポリエチレングリコール (PEG)で修飾することにより、水溶液中や生理的条件下で安定に分散する複合体材料の開発を行った。検討の結果、優れた分散性を有する PEG 修飾 SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>複合体が調製できたことから、筆者は次に SWCNT を DDS キャリアとして応用するために必要な基盤技術の確立を目指して基礎的な検討を行った。研究の具体的成果としては、ポリカチオン性の SWCNT 複合体とプラスミド DNA が静電的相互作用で複合体化した遺伝子デリバリーシステム、および抗がん剤マイトマイシン C を複合体に結合させた薬物徐放化デリバリーシステムをプロトタイプとして開発した。

以下これらについて 3 章にわたり論述する。

## 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

SWCNT は疎水性が極めて高く、ファンデルワールス力などによってバンドル化しているため、単独で水溶液中や一般的な有機溶媒中に分散させることは難しい。そこで、SWCNT の効果的な分散化がライフサイエンス分野への応用に向けて必要である。SWCNT を水溶液中に分散する手法には大きく分けて 2 通りあり、強酸処理によって親水性官能基を導入することで化学的に SWCNT 表面を修飾する方法、ならびに各種分散剤を用いて物理的に修飾することで SWCNT 表面を被覆して複合体を調製して分散化する方法の両アプローチが開発されてきた。一般的な化学的修飾方法は、SWCNT を  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3 = 3/1$  (v/v) 条件下で超音波処理を行うことでカルボキシル基を導入する方法に代表される。この方法では、SWCNT 表面を直接酸化するために SWCNT を構成するグラフェンシートの炭素鎖の共有結合が切断され SWCNT 特有の構造や特性が失われる可能性があり、また親水性官能基の導入率の制御も困難と考えられる。一方、物理的修飾方法は、超音波処理によって SWCNT のバンドル化を解消すると同時に、分散剤が SWCNT 表面に吸着した複合体を形成することで分散化する方法であり、代表的な分散剤としては、両親媒性物質であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) などの界面活性剤やブロック共重合体などの高分子系分散剤が報告されている。しかし、高分子系分散剤は細胞障害性を示すものも多く、SWCNT との複合体においても生体に適用した際の細胞障害性が問題となることから、生体適合性を有する分散剤が求められる。他方、ポルフィリンのような芳香族化合物を分散剤として利用し SWCNT 表面と軌道相互作用である  $\pi$ - $\pi$  相互作用および疎水性相互作用することで複合体を形成して分散化する方法もあり、さらに、多環芳香族性分子を利用することで SWCNT 表面との相互作用点が多点になり相互作用がより強化されて安定な複合体が調製できることが報告されている。また、多環芳香族性分子として遺伝子を用いた SWCNT-DNA 複合体が高い分散安定性を示すことも報告されている。

筆者は、以上の知見を踏まえ、新たにデザインされた両親媒性ペプチドを用いて SWCNT の分散化を試みた。本ペプチドでは、SWCNT 表面との相互作用を強化することを目的として疎水性アミノ酸であるトリプトファン (W) を組み入れ、また SWCNT とペプチドの複合体の表面に電荷をもつ親水性官能基を導入することで静電的反発によって分散化することを目指して塩基性アミノ酸リジン (K) が導入されている。

以下、本ペプチドを用いて、SWCNT を DDS キャリアとして応用するために必要な基盤技術の確立と DDS キャリアとしての特性の評価を目的として検討を行った。

## 第一節 SWCNT-ペプチド複合体の調製

SWCNT はライフサイエンス分野の中でも特に DDS への適用が期待されている。DDS においては、特定臓器や細胞への薬物の選択的な送達が重要な課題であり、各種キャリア開発において標的指向能をどのように付加するかが大きな問題となっている。一般的にキャリアのサイズが数百ナノメートルの場合は、腫瘍組織に対して EPR (enhanced permeability and retention)効果などで集積することが知られており、特有の構造を有する SWCNT もキャリアとして利用すると腫瘍組織に蓄積する傾向があることが報告されている。また、選択的に認識するターゲティングリガンドを付加することで標的に能動的に送達することも可能で、RGD ペプチド、EGF、抗体などを標識することで効率的なデリバリーの可能性が示唆されている。また、低分子薬物だけでなく、遺伝子、siRNA、タンパク質などを対象とした DDS 開発も報告されている。しかしながら、これらを実現するためには、先ず SWCNT が水系で安定に分散することが前提条件となるので、本節では、SWCNT の分散剤としてペプチドをデザインし、続いてこれを用いて調製した SWCNT との複合体の特性を評価した。

### 1-c 考察

今回デザインした両親媒性ペプチドと SWCNT との複合体では、ペプチドが SWCNT 表面に対して約 2.5 倍量結合しているため、SWCNT 表面は安定に分散する程度にペプチドが覆っていると考えられる。

## 第二節 PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>複合体の調製

デザインしたペプチドと SWCNT の複合体は、水溶液中では 1 年以上安定に分散し、pH 依存的な分散安定性も合理的な結果を示したが、SWCNT 複合体を医療分野に適用するためには生理的条件下での分散安定性が極めて重要である。そこで、細胞培養培地中での分散安定性の評価を行った結果、短時間のうちに凝集が起こることが判明した。そこで、生理的条件下においても凝集を抑制して安定に分散化する方法として PEG 修飾を試みた。

### 2-e 考察

SWCNT-ペプチド複合体に対する PEG 修飾により、生理的条件下でも十分に安定に分散化できることが判明した。

### 第三節 PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体の細胞取り込み動態の評価

PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体の細胞取り込み動態を評価するため、複合体の蛍光標識を行った。各種 SWCNT 複合体に対して *in vitro* で細胞取り込み実験を行い、蛍光顕微鏡観察および FACS にて取り込み動態を評価した。

#### 3-e 考察

PEG 修飾した SWCNT 複合体の細胞取り込み量は PEG 修飾率に依存して上昇し、SWCNT 複合体を DDS キャリアとして応用するためには分散安定性の向上が重要であることが示唆された。

## 第二章 SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub> 複合体を用いた遺伝子デリバリー

一般に遺伝子、プラスミド DNA は *in vivo* で単独で細胞に添加してもほとんど細胞には導入されない。これは、細胞表面がアニオン性の細胞外マトリックスや脂質二重膜で覆われているため、そもそも負電荷を有する遺伝子が細胞と相互作用することが難しいためである。そこで、細胞に遺伝子を送達することができる DDS キャリアの開発が広く注目されている。遺伝子導入を実現するためには、細胞膜を通過させる必要があり、カチオン性リポソーム用いるリポフェクション法などの化学的方法、高電圧パルスを加えることで取り込ませるエレクトロポレーション法や大容量のプラスミド DNA 溶液を急速静注するハイドロダイナミクス法などの物理的方法、ウイルスベクターを用いる生物学的方法などが報告されている。遺伝子デリバリー技術を医療応用に向けて展開することを考えると、各種キャリアを利用して特定の臓器、細胞に送達することが有用であると考えられるが、一方、キャリアを用いた遺伝子導入では細胞に取り込まれた後に速やかにエンドソーム脱出が起これなければ遺伝子の分解が問題となる。そこで、各種キャリアを利用した遺伝子デリバリーにおいては、細胞への静電的な相互作用などによる取り込みと速やかなエンドソーム脱出を与えるキャリアの開発が求められている。一方で、ポリカチオン性のキャリアと遺伝子との複合体は、生理的条件下における凝集性が問題となることがあり、凝集物は細胞に取り込まれないと予想されるために安定に分散することが重要である。SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub> 複合体もポリカチオン性のキャリアであり生理的条件下での分散安定性が問題となるが、第一章の検討の結果 PEG 修飾を行うことによって分散安定性の大幅な改善が得られた。また、PEG 修飾により分散安定化した SWCNT 複合体の細胞への取り込みについても蛍光標識

SWCNT 複合体を用いて確認できた。したがって、本研究で開発した PEG 修飾を施した SWCNT-ペプチド複合体は、それ自身分散安定性に優れるとともに、細胞にもよく取り込まれるキャリアであることが判明した。

そこで、本章では PEG 修飾を施した SWCNT-ペプチド複合体に対してプラスミド DNA を静電的相互作用によって複合体化し、生理的条件下での分散安定性を検討した後、細胞取り込み動態、また蛍光タンパクをコードしたプラスミド DNA を用いた遺伝子導入によるタンパク発現を確認した。

## 第一節 SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub>/pDNA 複合体の物性評価

SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub> 複合体を遺伝子デリバリーのための DDS キャリアとして応用するためには、分散安定性と細胞取り込みを向上させることが重要である。そこで、第一章と同様に、SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub>/pDNA 複合体の生理的条件下における分散安定性と各種物性の評価を行った

### 1-e 考察

PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体を用いてプラスミド DNA との複合体を調製し、遺伝子デリバリーのキャリアとしての有用性を検討した。本複合体は、生理的条件下で極めて安定であることが確認され、ゼータ電位測定、アガロースゲル電気泳動、EtBr 溶液中の蛍光スペクトル測定により、PEG 修飾率や N/P 比が物性に与える影響が明らかになった。

## 第二節 SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub> 複合体をキャリアとした遺伝子デリバリー

前節で PEG 修飾を施した SWCNT 複合体とプラスミド DNA との複合体も PEG 修飾率依存的に分散安定性が向上することが判明した。そこで、複合体の細胞取り込み実験を行い、さらに蛍光タンパク質をコードするプラスミド DNA を用いてその細胞内発現を検討した。

### 2-d 考察

細胞取り込みにおいては PEG 修飾による分散安定化が重要であることが明らかとなった。このことは、PEG 修飾を施すことによって複合体が十分に形成されない可能性や細胞表面との静電的相互作用が抑制されることによるマイナスの効果よりも、凝集を抑制して

分散安定化することのプラス面がより重要な役割をしていることを示している。さらに、蛍光タンパク質をコードしたプラスミド DNA の発現が観察されたことから、複合体は細胞に取り込まれた後に、速やかに解離してプラスミド DNA が細胞質に供給されタンパク発現に至ると考えられる。

### 第三章 SWCNT-CWKG(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub> を用いた薬物の徐放化

第一章の検討から PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体は、細胞培養培地中で顕著な分散安定性を示すとともに、PEG 修飾率に依存して経時的に細胞取り込みが促進されることが確認できた。そこで、複合体に対して薬物を結合させることによって SWCNT 複合体を用いた薬物徐放化とデリバリーの可能性についての検討を試みることにした。薬品動態制御学分野ではキャリアとして水溶性高分子であるデキストラン誘導体、薬物として抗がん剤であるマイトマイシン C (MMC) を用い、リンカーを介して結合した徐放性高分子化 MMC 誘導体を開発し、高分子特性に基づく体内動態制御と pH 依存的な加水分解による MMC の放出制御について報告している。高分子化 MMC 誘導体から MMC は一次反応式に従う加水分解によって放出され、高 pH 領域ほど遊離が早い。そこで本章では、SWCNT 複合体の薬物徐放化キャリアとしての応用の可能性を検討するために、デキストラン誘導体に代えて SWCNT-ペプチド-(PEG)<sub>12</sub> 複合体をキャリアに用い、同様のシステムの開発を試みた。

#### 1-g 考察

複合体からの MMC の放出は、MMC-linker-dextran 誘導体の場合と同様に pH 依存的かつ一次反応式に従った。MMC-linker-dextran 誘導体の場合はキャリアであるデキストランの分子量、側鎖、リンカー長、リンカーの電荷によって MMC の放出が変化することが報告されているため、今後 SWCNT 複合体を利用した薬物の放出制御型 DDS の開発においてもペプチドやリンカーの最適化によって更なる制御が可能であると予想される。

また、MMC-linker-dextran 誘導体ではデキストランの水溶性高分子としての特性を利用して体内動態制御が検討されており、SWCNT 複合体をキャリアとした場合でもその知見は有用であると考えられる。SWCNT 自体の生体内の動態は詳細に判明していないが、適切な方法で分散した SWCNT は生体内の動態が検討されているため、本研究で PEG 修飾することで安定に分散することが判明した。本結果から、PEG 修飾によって分散安定化した複合体は、各種 DDS キャリアとしての有用な特性を有するとともに、細胞障害性が低く生

体適合性に優れ、幅広い DDS 製剤への応用が期待できるものと考えられる。



## 結論

以上、筆者は三章に渡り、SWCNT を DDS キャリアとして応用するために必要な基盤技術の確立と各種 DDS キャリアとしての応用を目指して基礎的な研究を行い以下の結論を得た。

### 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

SWCNT 表面を両親媒性ペプチドで被覆した複合体形成による SWCNT の分散化を行ったところ、透析でフリーのペプチドを除いた状態で、水溶液中では 1 年以上安定な分散が得られ高い分散安定性が認められた。これにより本ペプチドは SWCNT 表面と多点で相互作用することで安定な複合体を形成し分散することが判明した。一方、複合体の生理学的条件下での分散安定性は非常に低かったことから、さらに凝集を抑制して分散を安定化するために複合体のアミノ基に対して PEG 修飾を施した結果、PEG 修飾率に依存した分散安定性の向上が実現できた。さらに BODIPY TMR および PEG で修飾した SWCNT 複合体を調製し細胞取り込み動態を評価した結果、PEG 修飾率に依存的に経時的な細胞取り込み量の増加が観察され、SWCNT 複合体の細胞取り込みにおいては、PEG 修飾による分散安定性の向上が重要な役割を果たしていることが示唆された。

### 第二章 SWCNT-(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub> を用いた遺伝子デリバリー

第一章の検討を通じて調製した PEG 修飾を施した SWCNT-ペプチド複合体は、表面がアミノ基に由来するポリカチオン性を示し、プラスミド DNA と静電的相互作用に基づく複合体を形成する。調製したプラスミド DNA との複合体の細胞培養培地中での分散安定性は、第一章で検討したプラスミド DNA の無い複合体の分散安定性とほぼ同程度であった。蛍光標識したプラスミド DNA を用い、複合体の細胞取り込み動態を定量的に評価したところ、PEG 修飾率に依存して取り込み量が増加し、最適化条件ではトランスフェクション試薬と同程度の効果が示された。また、蛍光タンパク質をコードしたプラスミド DNA の本キャリアを用いた細胞導入によってタンパク質の発現も確認された。以上の結果より、PEG 修飾によって分散安定化した SWCNT-ペプチド複合体をキャリアとして利用することで細胞への遺伝子導入が可能となることが判明した。

### 第三章 SWCNT-CWKG(KWKG)<sub>7</sub>-(PEG)<sub>12</sub>を用いた薬物の徐放化

PEG 修飾 SWCNT-ペプチド複合体をキャリアとして用い、リンカーを介して抗がん剤 MMC をチオール基に結合させて放出制御型 DDS の開発を行った。結合体において、一次反応式に従った放出と低 pH 領域ほど加水分解による MMC の放出が遅くなる pH 依存的な徐放化が確認され、遊離した化合物が MMC であることも確認された。一方、キャリアである複合体自体の細胞障害性を検討した結果、PEG 修飾を施した複合体では PEG によって細胞との静電的な相互作用が抑制され分散安定性が向上したことで細胞障害性の大幅な低減が得られることが確認できた。また、複合体と MMC の結合体は、同濃度の MMC と比較して遅延性の高い細胞増殖抑制効果を示し、本 MMC 徐放化 SWCNT 複合体が、徐放効果に対応する抗がん活性を示すことが確かめられた。

以上、筆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 応用への展開に向けた研究に取り組んだ。PEG 修飾した複合体では、分散安定性が顕著に向上するとともに PEG 修飾率に依存して細胞取り込みが促進され、さらに PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体とプラスミド DNA との複合体は優れた分散安定性を示すとともに効率良い遺伝子導入とタンパク発現を与えることを確かめた。また、MMC を結合した SWCNT 複合体は 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に対する有用な情報を与えるものとする。