

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

目次

総論の部

緒言	3
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	4
第一節 SWCNT-ペプチド複合体の調製	5
1-a (KWKG) ₇ のデザインと SWCNT 複合体の調製	
1-b SWCNT-(KWKG) ₇ 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価	
1-c 考察	
第二節 PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の調製	9
2-a FITC-(PEG) ₁₂ -NHS の合成	
2-b SWCNT-(KWKG) ₇ 複合体に対する PEG 修飾量の定量	
2-c Biotin-(PEG) ₁₂ -NHS を用いた PEG 修飾率の測定	
2-d SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価	
2-e 考察	
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	17
3-a BODIPY TMR 標識したペプチドを用いた蛍光標識 SWCNT 複合体の調製	
3-b CWKG(KWKG) ₆ ペプチド含有 SWCNT-ペプチド複合体に対する BODIPY TMR-(PEG) _n -maleimide を用いた蛍光標識	
3-c PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体の細胞取り込みの評価	
3-d SWCNT-ペプチド-(PEG) ₁₂ -BODIPY TMR-PEG ₁₂ linker 複合体の取り込み量の定量	
3-e 考察	
第二章 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ を用いた遺伝子デリバリー	26
第一節 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の物性評価	27
1-a SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ /pDNA 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価	

1-b	SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ /pDNA 複合体のゼータ電位測定	
1-c	SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ /pDNA 複合体のアガロースゲル電気泳動	
1-d	SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ /pDNA 複合体の EtBr 溶液中での蛍光測定	
1-e	考察	
第二節	SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ 複合体をキャリアとした遺伝子デリバリー	37
2-a	SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ /pDNA 複合体の細胞取り込みの観察	
2-b	SWCNT-(KWKG) ₇ -(PEG) ₁₂ /pDNA 複合体の細胞取り込み量の FACS 測定による 定量	
2-c	蛍光タンパク質 mKO2 をコードしたプラスミド DNA の細胞内発現	
2-d	考察	
第三章	SWCNT-CWKG(KWKG) ₆ -(PEG) ₁₂ を用いた薬物の徐放化	47
1-a	MMC-EMCA-maleimide の合成	
1-b	MMC-EMCA-maleimide の濃度測定	
1-c	PEG および MMC 修飾した SWCNT-CWKG(KWKG) ₆ 複合体の修飾率の評価	
1-d	SWCNT-CWKG(KWKG) ₆ -(PEG) ₁₂ -MMC-linker 複合体からの MMC の放出	
1-e	PEG 修飾した SWCNT 複合体の細胞障害性の評価	
1-f	SWCNT-CWKG(KWKG) ₆ -(PEG) ₁₂ -MMC-linker 複合体による殺細胞効果	
1-g	考察	
結論		58
謝辞		61
実験の部		62
引用文献		72

総論の部

緒言

単層カーボンナノチューブ (single walled carbon nanotube: SWCNT)^{1,2}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³⁻⁵。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^{6,7}。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)^{8,9}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)¹⁰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^{8,11}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)₇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)₇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 (MMC)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^{12, 13}、ならびに物理的に各種分散剤を用いて SWCNT 表面を被覆し複合体を調製して分散化する方法¹⁴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¹⁵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^{16, 17}やブロック共重合体¹⁸⁻²⁰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²¹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 π - π 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²²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^{9, 23, 24}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(KWKG)₇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)を組み合わせ、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³⁻⁵。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必要な課題であり、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^{25, 26}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²⁷。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²⁸、epidermal growth factor (EGF)²⁹、抗体^{30, 31}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³²、siRNA^{33, 34}、タンパク質³⁵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、まず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-a (KWKG)₇のデザインとSWCNT複合体の調製

薬品動態制御学分野では、(EF)₁₄、(KF)₁₄、(EFEA)₇、(KFKA)₇などの両親媒性ペプチドをデザインしてSWCNTとの複合体を形成させることによるSWCNTの分散化手法を開発してきた^{8, 11}。これらのペプチドとSWCNTとは、フェニルアラニン (F)残基のベンゼン環とSWCNT表面が多点で相互作用することによって複合体を形成する。一方、これらのSWCNT複合体は水溶液中に分散するものの分散安定性は相対的に低く、透析によって複合体を形成していないフリーのペプチドを除いた状態では、最長でも1週間以内に凝集が起こった。

そこで筆者らは、両親媒性ペプチドを分散剤に用いるSWCNTの分散化というコンセプトはそのままに、SWCNT-ペプチド複合体のDDSキャリアへの応用を目指してより高い分散安定性を有するSWCNT複合体の調製に取り組んだ。まずペプチドのアミノ酸配列の再設計を行い、SWCNT表面との相互作用の強化、およびペプチドをフレキシブルにすることで相互作用しやすくすることを基本としてペプチドをデザインした。本研究では、(KFKA)₇ペプチドに対して、フェニルアラニン (F)残基をトリプトファン (W)残基に、アラニン (A)残基をグリシン (G)残基に変更したKWKG配列が7回繰り返す両親媒性(KWKG)₇ペプチドを分散剤としてSWCNTの分散化を試みた。SWCNT-(KWKG)₇複合体は非常に安定に分散し、透析によってフリーの(KWKG)₇ペプチドを除いた状態でも1年以上安定に分散した。

SWCNTと(KWKG)₇ペプチド (Fig. 1)との複合体は、重水中で超音波処理することで

SWCNT のバンドル化が瞬間的に解消されると同時に、SWCNT 表面と(KWKG)₇ペプチドのトリプトファン残基のインドール骨格が、多点で π - π 相互作用ならびに疎水性相互作用することによって複合体を形成する。また、SWCNT-(KWKG)₇複合体のリジン残基のアミノ基がプロトン化されることで水溶液中に安定に分散することができる。本研究では、2 mg の SWCNT、10 mg の(KWKG)₇ペプチドと重水 5 ml を加え、超音波を 1 時間照射することで SWCNT-(KWKG)₇複合体の分散液を調製した (Fig. 2)。

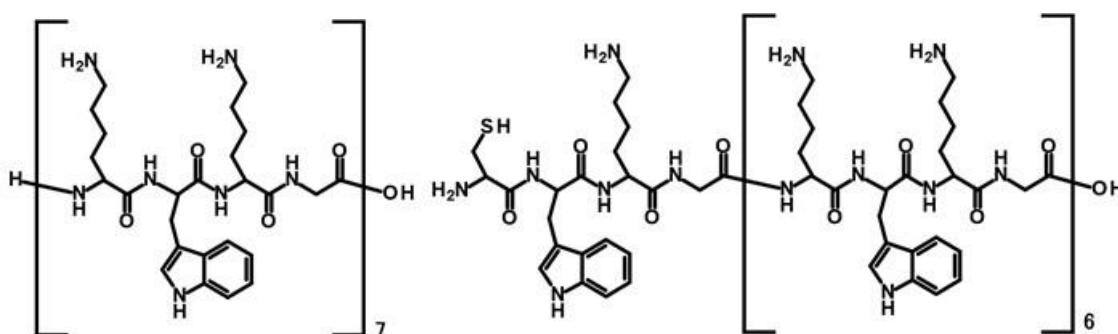


Fig. 1 Chemical structure of (KWKG)₇ and CWKG(KWKG)₆ peptide.

次に、得られた SWCNT 分散液中には不溶性 SWCNT 凝集物が混在していることから、超遠心処理を行って SWCNT 凝集物を沈殿させ、上清を分取して分散化した SWCNT-(KWKG)₇複合体を単離した。さらに、透析処理によって SWCNT 表面と相互作用しなかったフリーの(KWKG)₇ペプチドを除いた。透析後の SWCNT-(KWKG)₇複合体は水溶液中で 1 年以上分散状態を保つことが確認された。また、チオール基を導入した SWCNT-ペプチド複合体の調製は、10 mg の(KWKG)₇と 1 mg の CWKG(KWKG)₆の混合物を用いて SWCNT を分散化することで調製した。

SWCNT-(KWKG)₇複合体の分散安定性は pH に依存し、中性領域から pH 10 までは安定に分散し、pH 11 以上では凝集が起こった (Fig. 3)。これは、SWCNT-(KWKG)₇複合体のリジン残基の α -アミノ基の pKa が約 10.5 であるため³⁶、pH 10 までの水溶液中ではアミノ基がプロトン化されたポリカチオン複合体として安定に分散し、pH 11 以上では脱プロトン化されることで凝集すると考えられる。

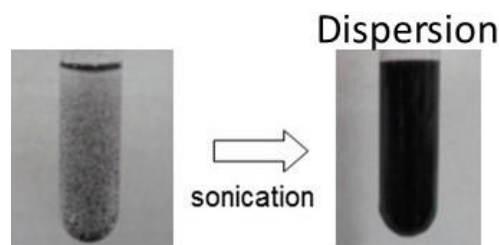


Fig. 2 Dispersion of SWCNT with amphiphilic (KWKG)₇ peptide by sonication.

SWCNT dispersion was prepared with (KWKG)₇ peptide in 5 ml D₂O solution by sonicating with 2 mg SWCNT and 10 mg (KWKG)₇ peptide in a glass tube for 1 hr with a UD-201 ultrasonic disruptor on ice.

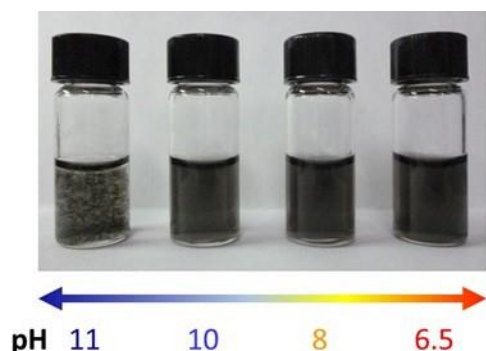


Fig. 3 pH-dependent dispersion stability of SWCNT-(KWKG)₇ complex.

SWCNT-(KWKG)₇ complex was added to pH 6.5 MES buffer, pH 8.0 HEPES buffer and pH 10.0 or pH 11.0 2-aminoethanol buffer of 50 mM.

本研究では、SWCNT および(KWKG)₇ペプチドの水溶液中濃度は、SWCNT-(KWKG)₇複合体の吸収スペクトルより求め、SWCNT濃度は808 nmにおけるSWCNTの吸光度とモル吸光係数⁴を用いて、(KWKG)₇ペプチドの濃度は280 nmにおけるトリプトファンの吸光度とモル吸光係数^{37,38}を用いて計算により得た。複合体中でSWCNTに対する(KWKG)₇ペプチドの重量は約2.5倍であり、SWCNT表面上を(KWKG)₇ペプチドが十分に覆っていることで安定に分散していると考えられる。

1-b SWCNT-(KWKG)₇複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価

生理的条件下での分散安定性を評価するため、細胞培養培地中に添加後の分散安定性の観察を行った。細胞を接着させた12-ウェルプレート内の細胞培養培地中にSWCNT-(KWKG)₇複合体を添加してインキュベート後に、目視にてSWCNT-(KWKG)₇複合体の分散安定性を確認した。右の写真のようにSWCNT-(KWKG)₇複合体は、培地に添加後、DMEM、Opti-MEM両メEDIUM中ともに短時間のうちに凝集が起こった (Fig. 4)。したがって、SWCNT-(KWKG)₇複合体は生理的条件下における分散安定性を改善する必要があると判明したことから、本研究ではSWCNT-(KWKG)₇複合体の表面のアミノ基に対してPEG修飾を行うことによって凝集を抑制して分散安定性を向上する手法を採用することとした。

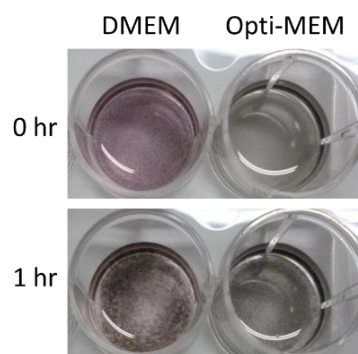


Fig. 4 Visual observation of the dispersion stability of the SWCNT-(KWKG)₇ complex without PEGylation in the cell culture medium.

1-c 考察

ポルフィリン²¹などの芳香族性化合物を分散剤として利用した SWCNT 複合体は、 π - π 相互作用および疎水性相互作用によって複合体を形成するが、 π - π 相互作用は疎水性相互作用と比べてより強いため、 π - π 相互作用を利用した複合体はより安定な複合体を形成すると期待される。 π - π 相互作用は DNA の二重らせんの高次構造の安定化や芳香族性化合物の自己集合化など立体配座や超分子構造の形成に影響を与える。また、アジド基に対して高い選択性と反応性を持つ三重結合化合物シクロオクチン (cyclooctyne) は、タンパク質などを修飾するためのクリック反応³⁹において幅広く利用されているが、本反応はシクロオクチンが π - π 相互作用した疎水性環境下では遷移状態が安定化して反応性が高まることが報告されている⁴⁰⁻⁴²。以上のように、SWCNT の表面被覆に π - π 相互作用を利用することは有用であり、さらに効果的な方法としては多環芳香族性分子²²を用いることが報告されている。多環芳香族性分子である DNA^{9, 23, 24} を分散剤として用いた複合体は、SWCNT 表面と多点で π - π 相互作用し、分散剤である DNA の交換も極めて遅く、非常に安定な SWCNT 複合体であることが報告されている。

今回デザインした両親媒性ペプチドは、SWCNT と複合体を調製した時に β シート構造¹¹を形成して SWCNT 表面を被覆することも期待して設計された。しかし、SWCNT-(KFKA)₇ 複合体の場合は、CD スペクトル測定を行ったところ β シート構造に特徴的なスペクトルは検出されなかった。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体については CD スペクトル測定を行っていないために直接的に構造を解析することはできないが、CWKG(KWKG)₆ ペプチドの SWCNT 複合体に対しリガンド修飾を試みた際、SWCNT-ペプチド複合体のペプチド濃度に対して 30%程度の濃度の EGF を添加した場合に短時間のうちに凝集が起こることが判明し、リガンド修飾は難しいことが確認された。SWCNT-ペプチド複合体のペプチドが β シート構造を形成していれば、その構造は主鎖のアミノ基とカルボキシル基が水素結合することで安定化され、リガンドとペプチドとの交換は抑制されると考えられる。以上より、本複合体ではペプチドが SWCNT 表面に対して β シート構造を形成せずに被覆している可能性が考えられるが、これについては更なる検討が必要である。調製した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体における (KWKG)₇ ペプチド濃度の SWCNT 濃度との比は約 2.5 倍であるため、ペプチドが特定の構造を形成していなくても 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)₇ 複合体の調製

SWCNT-(KWKG)₇ 複合体は、水溶液中では 1 年以上安定に分散し、合理的な pH 依存的分散安定性を示すなど非常に安定な分散状態を形成するが、一方、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、前節では SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の生理的条件下での安定性を評価するために、生理的 pH のもと各種アミノ酸、糖、牛胎児血清を含有する細胞培養培地中での分散安定性の評価を行い、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体を細胞が接着したプレートの細胞培養培地中に添加したところ、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 修飾を選び、PEG 鎖に基づく立体障害によって SWCNT-(KWKG)₇ 複合体間の相互作用を抑制することで分散安定化を試みた。

SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾は、(KWKG)₇ ペプチドのリジン残基のアミノ基に対して行った。両末端に NHS エステル基⁴³とメチル基を有し、重合度が 12 の PEG 鎖からなる PEG 化試薬 succinimidyl-[(N-methyl)-dodecaethyleneglycol] ester [Methyl-(PEG)₁₂-NHS ester, MS(PEG)₁₂] を使用し、中性付近でリジン残基のアミノ基と MS(PEG)₁₂ の NHS エステル基とを縮合させてアミド結合を形成することで PEG 修飾を行った。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のリジン残基の α -アミノ基の pKa は約 10.5 であるとともに³⁶、プロトン化と脱プロトン化は平衡反応であることから、中性付近の pH のバッファー中では大部分のアミノ基はプロトン化される方向に平衡は傾いている。その環境中において、一部の脱プロトン化されたアミノ基が MS(PEG)₁₂ の NHS エステル基と反応することで PEG 修飾が進行する。バッファーの pH が塩基性になるほど脱プロトン化されたアミノ基の割合が増加するため、PEG 修飾に対しては塩基性の方が反応速度は上昇すると考えられるが、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の分散安定性に対してはプロトン化されたアミノ基の割合が減少するために好ましくない。一方、pH が酸性になるほどプロトン化されたアミノ基の割合が上昇するために分散安定性は向上するが、PEG 修飾に対しては問題となる。この両者のバランスを考えて pH 8.0 のバッファー中にて PEG 修飾を行うことに決定した。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対して、pH 8.0、25 mM HEPES バッファー中で、2.5 mM の MS(PEG)₁₂ を SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のアミノ基に対して、10%から 50%当量添加して反応時間 2 時間にて PEG 修飾を行った (Fig. 5)。反応後、未反応の MS(PEG)₁₂ は遠心ろ過によるバッファー交換で除いた。

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体における PEG 修飾されたアミノ基の定量は、初めにニンヒドリン反応によって SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の遊離アミノ基の定量を行った。しかし、定量された結果は、反応溶液中の MS(PEG)₁₂ が 100%反応したと仮定した時の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の遊離アミノ基よりも少ない割合が定量される結果となったために、ニンヒドリン反応では定量的な結果を得ることができなかった。そこで、両末端に FITC⁴⁴ と NHS エステル基を有する FITC-(PEG)₁₂-NHS を合成し、MS(PEG)₁₂

の代わりに用いて、同一条件で修飾を行って FITC-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体を合成した後に吸収スペクトルから FITC の吸光度とモル吸光係数^{45, 46}を用いて PEG 修飾されたアミノ基の定量を行った。そして次に、PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の生理的条件下における分散安定性の評価を行った。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾の分散安定性に対する影響を評価するため、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を細胞が接着したプレートの培地中に添加し、37 °C でインキュベートして経時変化を観察することで評価した。

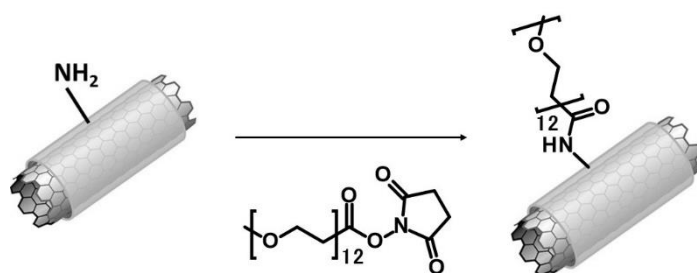


Fig. 5 Schematic illustration of the PEGylation of SWCNT-(KWKG)₇.

2-a FITC-(PEG)₁₂-NHS の合成

PEG 修飾率の測定に向け、FITC-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体合成の第一段階として、FITC-(PEG)₁₂-NHS の合成を行った。FITC-(PEG)₁₂-NHS の合成は 2 段階で行い、①両末端がアミノ基とカルボキシル基である PEG 試薬 Carboxyl-(dodecaethyleneglycol) ethylamine [Carboxyl-(PEG)₁₂-amine, CA(PEG)₁₂]を用い、FITC のイソチオシアネート基と CA(PEG)₁₂ のアミノ基を反応させることで末端に FITC を持つ FITC-(PEG)₁₂-COOH の合成を行った⁴⁷。その後、②FITC-(PEG)₁₂-COOH のカルボキシル基に対して NHS エステル化を行った (Fig. 6)。

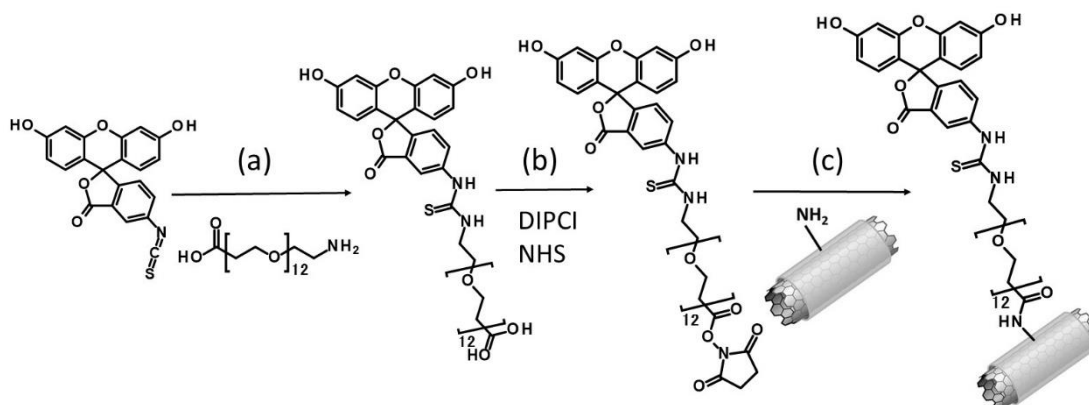


Fig. 6 Schematic illustration of the preparation of the FITC-(PEG)₁₂-modified SWCNT-(KWKG)₇ complex.

1段階目の反応は、3 mM の FITC と 6.5 mM の CA(PEG)₁₂ を pH 8.0、50 mM HEPES バッファー中で 12 時間反応させて合成した。その後、逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて、octadecyl silica (ODS) カラム (C18-AR II COSMOSIL、ナカライテスク社製)、0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) を含むアセトニトリル濃度が 30% - 70%、20 min の gradient mode の移動相条件にて精製を行った (Fig. 7)。目的の合成物は保持時間が約 13 分のフラクションから分取して MALDI 型質量分析計にて分子量の確認を行い、凍結乾燥後に N,N-dimethylformamide (DMF) 中に再溶解した。

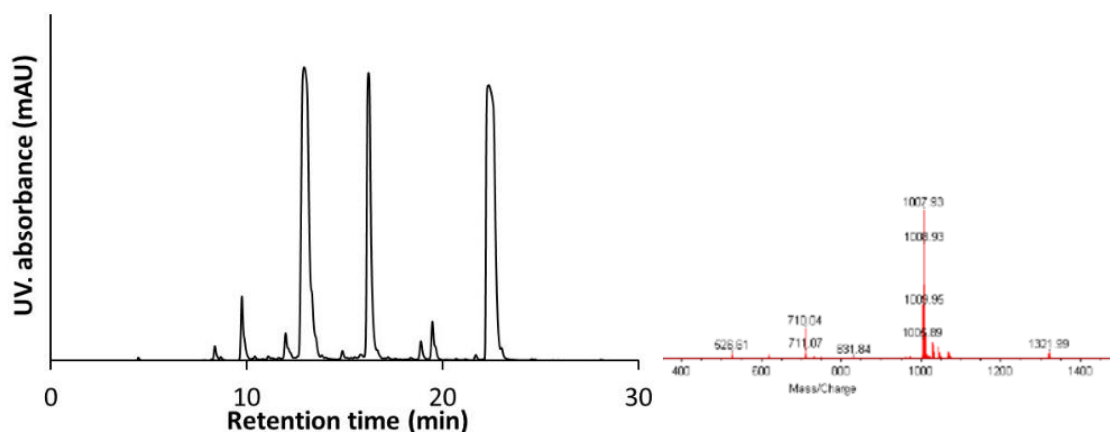


Fig. 7 HPLC purification and mass spectra of FITC-(PEG)₁₂-COOH.

FITC-(PEG)₁₂-COOH was purified with reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) with C18-AR II Column, eluted with water and acetonitrile mixture containing 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in a gradient mode from 30% to 70% in acetonitrile concentration percentage for 20 min.

Molecular weight of FITC-(PEG)₁₂-COOH was analyzed by MALDI-TOFMS (Matrix assisted laser desorption/ ionization- time of flight mass spectrometry).

2段階目の反応は、合成した FITC-(PEG)₁₂-COOH のカルボキシル基に対して、N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIPCI) と N-hydroxysuccinimide (NHS) を 5 当量加えて 1.5 時間反応させて NHS エステル化した。反応後、逆相 HPLC にて C18-AR II カラム、アセトニトリル濃度が 10% - 70%、25 min の gradient mode、その後 70%、5 min の isocratic mode の移動相条件にて精製を行った (Fig. 8)。目的とする生成物は保持時間が約 23.5 分のフラクションから分取して MALDI にて分子量を確認し、分取した FITC-(PEG)₁₂-NHS は凍結乾燥後に DMF 中に再溶解して SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾率の定量に使用した。

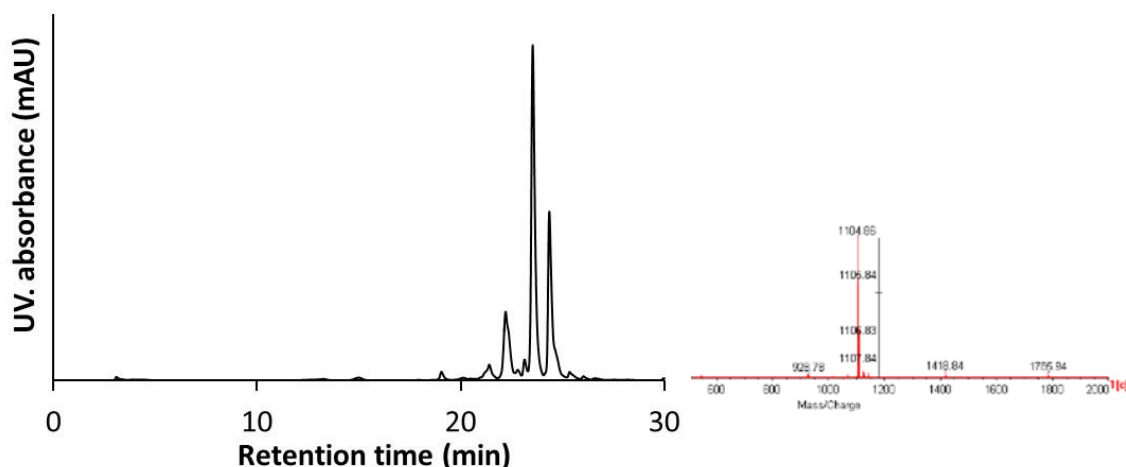


Fig. 8 HPLC purification and mass spectra of FITC-(PEG)₁₂-NHS.

FITC-(PEG)₁₂-NHS was purified with reverse-phase HPLC with C18-AR II Column, eluted with water and acetonitrile mixture containing 0.1% TFA in a gradient mode from 10% to 70% in acetonitrile concentration percentage for 25 min, and molecular weight of FITC-(PEG)₁₂-NHS was analyzed by MALDI-TOFMS.

2-b SWCNT-(KWKG)₇複合体に対する PEG 修飾率の定量

FITC-(PEG)₁₂-NHS を使用して MS(PEG)₁₂ を用いた PEG 修飾の場合と同一条件で修飾を行って FITC-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体を合成し、反応後の未反応の FITC-(PEG)₁₂-NHS を透析で除いた後に FITC の吸光度から定量した。得られた PEG 修飾率は、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のアミノ基の濃度に対して FITC-(PEG)₁₂-NHS を 10% - 50% 当量添加した時、それぞれ 4.1% - 13.3% のアミノ基が修飾された結果となった。1 つの (KWKG)₇ ペプチド分子に対しては、それぞれ 0.6~2.0 個の PEG が修飾された (Fig. 9)。また、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の一部のアミノ基が PEG 修飾されることによってプロトン化したアミノ基量が減少することから生じる SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の分散安定性に対する影響は見られなかった。以後の実験において、同一条件で修飾を行うことを前提に本実験での定量により得た FITC-(PEG)₁₂-NHS の修飾率を MS(PEG)₁₂ を用いて修飾した際の PEG 修飾率として用いることとした。また、本研究では、(KWKG)₇ と CWKG(KWKG)₆ ペプチドの混合物を用いた SWCNT-ペプチド複合体や SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体についても検討を行っているが、これら SWCNT 複合体に対する PEG 修飾率は、CWKG(KWKG)₆ が (KWKG)₇ と比較してアミノ基が 1 残基少ないだけであるため、PEG 修飾率や分散安定性への影響は無いと考えて、同一条件で修飾を行うことを前提に本実験で定量した PEG 修飾率を数値として用いた。

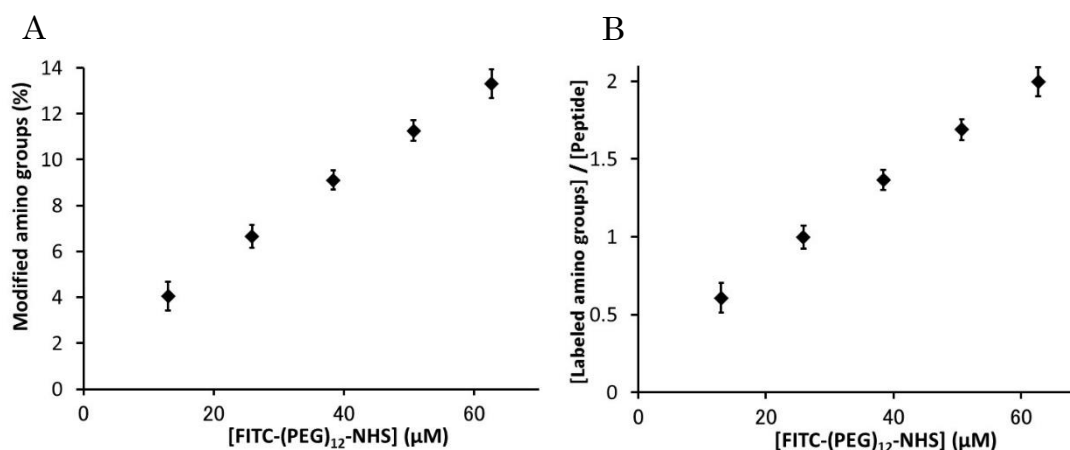


Fig. 9 Estimated extents of PEG modification against numbers of amino groups or one (KWKG)₇ peptide.

FITC-(PEG)₁₂-NHS was added to the SWCNT-(KWKG)₇ dispersion to set the molar ratio between 10% - 50% against the total amino groups of peptide. The result represents the PEG modification ratio against amino groups (A) or one (KWKG)₇ peptide of the SWCNT-(KWKG)₇ dispersion (B) with the mean ± SD (n = 4).

2-c Biotin-(PEG)₁₂-NHS を用いた PEG 修飾率の測定

FITC-(PEG)₁₂-NHS を用いて PEG 修飾率の測定を行った (2-b)の実験に対して、FITC の代わりに、末端に Biotin を有する PEG 化試薬 Biotin-(PEG)₁₂-NHS⁴⁸ を用いて SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対して修飾を行った後に、Biotin の定量を行うことで PEG 修飾率の定量を行う方法も併用した。PEG 修飾条件は (2-b)における FITC-(PEG)₁₂-NHS を用いた修飾や MS(PEG)₁₂ を用いた修飾と同一条件で Biotin-(PEG)₁₂-NHS を用いて SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対して PEG 修飾を行い、Sensolyte® Biotin 定量キット (コスモバイオ社製) にて Biotin 定量を行って PEG 修飾率の定量を試みた。

得られた PEG 修飾率は、反応溶液中の Biotin-(PEG)₁₂-NHS が SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のアミノ基に対して 10% - 50%当量添加した時、それぞれ 3.8% - 15.5%のアミノ基が修飾される結果となり、1分子の(KWKG)₇ペプチドに対しては、それぞれ 0.58 - 2.3 個の PEG が修飾されることが示された (Fig. 10)。以上のように、Biotin-(PEG)₁₂-NHS を用いた SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾率の検討でも、FITC-(PEG)₁₂-NHS を用いた PEG 修飾率の定量結果とほぼ同一の結果が得られた。

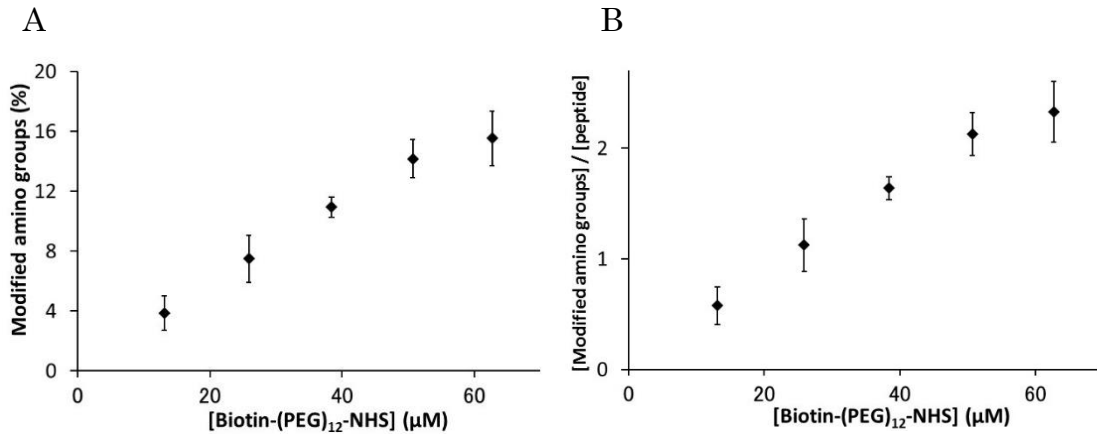


Fig. 10 Estimated extents of PEG modification against numbers of amino groups or one (KWKG)₇ peptide.

Biotin-(PEG)₁₂-NHS was added to the SWCNT-(KWKG)₇ dispersion to set the molar ratio between 10% - 50% against the total amino groups of peptide. The result represents the PEG modification ratio against amino groups (A) or one (KWKG)₇ peptide of the SWCNT-(KWKG)₇ dispersion (B) with the mean ± SD (n = 3).

2-d SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価

PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の生理的条件下での分散安定性を評価するため、細胞培養培地中に添加後の分散安定性の観察を行った。細胞を接着させた 12-ウェルプレートの細胞培養培地中に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を添加してインキュベート後、目視にて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の経時変化を確認した。

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を DMEM あるいは Opti-MEM をそれぞれ含んだ細胞が接着したプレートに添加したところ、PEG 修飾率が 0%、4.1%である SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体では添加後短時間のうちに凝集が起こった。以後 PEG 修飾率依存的に分散安定性は向上し、DMEM 中と比較すると Opti-MEM 中の方が分散安定性は良かった。インキュベート 4 時間後では、DMEM、Opti-MEM 中それぞれ PEG 修飾率が 9.1%、6.7%以上において分散状態が維持されていた。24 時間後においても、DMEM、Opti-MEM 中それぞれ PEG 修飾率が 13.3%、11.3%以上では凝集しないことが判明し、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾は生理的条件下における分散安定性を顕著に向上させることが明らかとなった (Fig. 11)。

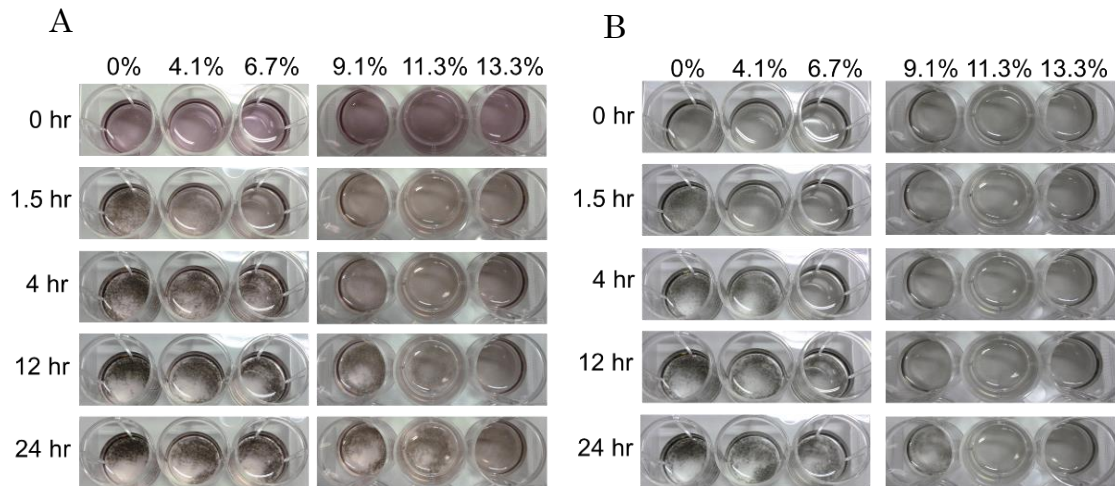


Fig. 11 Visual observation of the dispersion stability of the SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ complex with different extents of modification in DMEM (A) and Opti-MEM (B) of the cell culture medium.

The SWCNT-(KWKG)₇ dispersion with various modification ratios was incubated for 24 hr under 5% CO₂ at 37 °C and visually observed for 24 hr. The percentages at the top of the panels represent the extent of PEG modification on amino groups (%).

2-e 考察

SWCNT-(KWKG)₇複合体は、水溶液中での分散安定性は高いものの細胞培養培地中での分散安定性は非常に低かったことから、SWCNT とペプチドとの相互作用をさらに強め複合体を安定化しても生理的条件下での十分な分散安定性は得られないと推察された。SWCNT 表面上での(KWKG)₇ペプチドの交換は非常に遅いと考えられることから、凝集はSWCNT-(KWKG)₇複合体のペプチドが外れることで起こるのではなく、培地中の塩による塩析、SWCNT-(KWKG)₇複合体間の相互作用、SWCNT-(KWKG)₇複合体と牛胎児血清との相互作用など他の原因が複雑に関与して起こると考えられる。そこで、SWCNT-(KWKG)₇複合体に対するPEG修飾によって相互作用による凝集の抑制を試みた。

PEG修飾は、SWCNT-(KWKG)₇複合体のアミノ基に対してMS(PEG)₁₂を10%から50%当量添加して行った。これはPEG修飾することでSWCNT-(KWKG)₇複合体表面のアミノ基数が減ることから、分散に寄与するアミノ基量の減少に伴う凝集を防ぐために最大で50%当量と設定したものである。アミノ基に対して50%当量加えた時に13.3%のアミノ基がPEG修飾されたが、細胞培養培地中での分散安定性を評価したところ24時間安定に分散することが確認され、13.3%のアミノ基の修飾により十分に安定に分散化できることが判明した。

本研究では、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体と遺伝子とのコンプレックスの形成など諸条件を考えて、重合度が 12 の PEG 化試薬を用いた。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体のサイズは、SWCNT の直径を 1 nm と仮定すると SWCNT-(KWKG)₇ 複合体としての直径は約 3 nm となり、一方で MS(PEG)₁₂ は長さが約 4.5 nm であるため、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体は直径 3 nm、長さが約 200 nm の針状構造のキャリア表面に 4.5 nm の PEG が結合していると考えられる。したがって、例えば遺伝子とコンプレックスを形成した時は、遺伝子の方がサイズは大きいために遺伝子の表面に SWCNT 複合体が多数結合した構造をとると考えられ、スケールが異なるために長さが 4.5 nm の PEG の存在により大きな影響は無いと考えられる。

本節では、PEG 修飾されたアミノ基の定量は FITC-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体を調製して FITC の吸光度から行った。従って細胞取り込み実験など以後の実験における PEG 修飾もすべて FITC-(PEG)₁₂-NHS を用いて行うことも考えられたが、FITC-(PEG)₁₂-NHS の末端は FITC で疎水的であるため、FITC-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体と末端がメチル基の MS(PEG)₁₂ で修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体では各種物性特に分散安定性が変化していると考えられる。そこで、以後の検討では PEG 修飾は MS(PEG)₁₂ を用いて行い、蛍光標識は SWCNT 複合体の物性に対する影響を出来るだけ小さくするために CWKG(KWKG)₆ ペプチドを (KWKG)₇ ペプチドに加え、蛍光顕微鏡観察や FACS 測定に適した BODIPY TMR^{44, 49} を用いて標識を行った。

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について評価することを目的に 2 通りの方法で SWCNT 複合体を蛍光標識した。第一の方法は、蛍光物質 BODIPY TMR を標識^{44,49}したペプチドを合成した後、その BODIPY TMR 標識ペプチドと(KWKG)₇とのペプチド混合物を用いて SWCNT を分散することで BODIPY TMR 標識 SWCNT 複合体を調製する方法であり、第二の方法は(KWKG)₇、CWKG(KWKG)₆の両ペプチド混合物を用いて SWCNT-ペプチド複合体を先に調整し、続いて SWCNT-ペプチド複合体のシステイン残基のチオール基に対してリンカーを介して BODIPY TMR 標識する方法である。

後者の方法では、SWCNT-ペプチド-BODIPY TMR-PEG_n linker 複合体を 3 段階に分けて合成した。初めに BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide の合成を 2 段階で行った。① BODIPY TMR-C5-maleimide のマレイミド基に対して 2-mercaptoethylamine (システアミン)を反応させ、アミノ基を付加することでマレイミド基からアミノ基に官能基変換を行った。②合成した BODIPY TMR-NH₂に対して、両末端にマレイミド基と NHS エステル基を有する SM(PEG)_nを反応させて BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を合成した。③ CWKG(KWKG)₆含有 SWCNT-ペプチド複合体に BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を添加して SWCNT-ペプチド-BODIPY TMR-PEG_n linker 複合体を合成した。未反応の BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を透析で除いた後に、BODIPY TMR の吸光度とモル吸光係数⁵⁰を用いて標識量を定量した。加えて、SWCNT-ペプチド複合体の分散安定性を向上させるために(PEG)₁₂修飾を施した SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂複合体に対して、重合度が 12 の PEG 鎖のリンカーを介して BODIPY TMR-(PEG)₁₂-maleimide による蛍光標識を行って PEG 修飾による蛍光強度に対する影響の評価を行った。

蛍光スペクトル測定から、2 通りの BODIPY TMR 標識 SWCNT 複合体の調製で得た知見から標識条件の最適化を検討した。そこで、分散安定性を持たせるために(PEG)₁₂修飾したうえで定量的な結果が得られる条件で BODIPY TMR 標識した BODIPY TMR 標識 SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂複合体を合成し、細胞取り込み実験を行って蛍光顕微鏡観察とフローサイトメトリー法 (FACS)による定量的な評価を行った。

3-a BODIPY TMR 標識したペプチドを用いた蛍光標識 SWCNT 複合体の調製

BODIPY TMR 標識ペプチドの合成は、CWKG(KWKG)₆ ペプチドのチオール基に対してマレイミド基を有する BODIPY TMR C5-maleimide を用いて標識を行った (Fig. 12)。

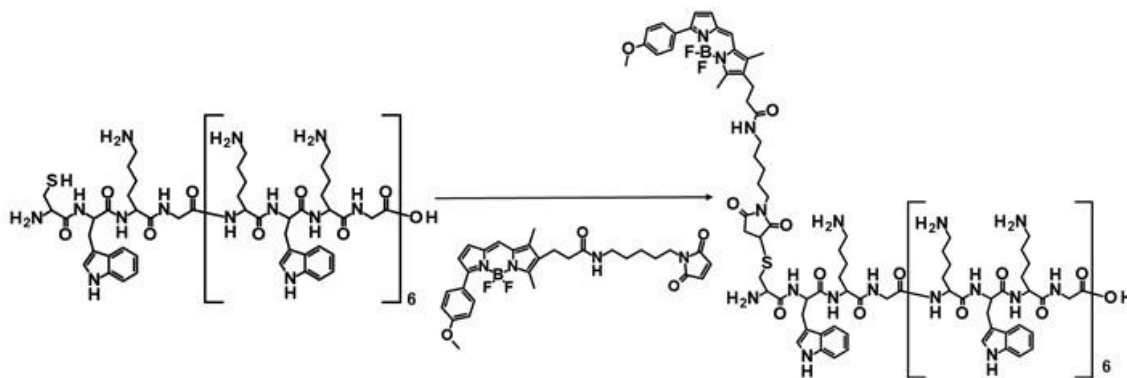


Fig. 12 Schematic illustration of the synthesis of BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ peptide.

0.02 mM の BODIPY TMR C5-maleimide と 0.17 mM の CWKG(KWKG)₆ ペプチドを pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で 12 時間反応させ、逆相 HPLC で C18-ARII カラム、アセトニトリル濃度が 15% - 70%、60 min の gradient mode の移動相条件で精製を行った (Fig. 13)。目的の BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ ペプチドは保持時間が約 26 分のフラクションから分取して MALDI にて分子量を確認した。

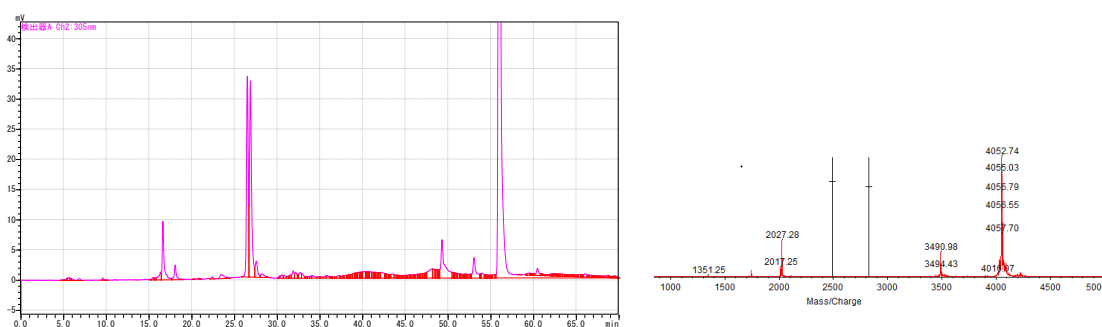


Fig. 13 HPLC purification and mass spectra of BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ peptide.

BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ peptide was purified with reverse-phase HPLC with C18-ARII Column, eluted with water and acetonitrile mixture containing 0.1% TFA in a gradient mode from 15% to 70% in acetonitrile concentration percentage for 60 min, and molecular weight of BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ peptide was analyzed by MALDI-TOFMS.

その後、BODIPY TMR 標識 SWCNT-ペプチド複合体の調製は、ペプチドの重量比で $(KWKG)_7$: BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ = 50 : 1、100 : 1 の混合ペプチドを用いて SWCNT を分散することで調製した。蛍光スペクトルは、SWCNT による散乱光などの影響を防止するために SWCNT 濃度を 1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈し、蛍光分光光度計 (FluoroMax-4、堀場製作所社製) で 544 nm の励起光で蛍光スペクトルを測定した。そして、フリーの同濃度の BODIPY TMR の蛍光強度を 1 として比較した。

結果は、 $(KWKG)_7$: BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ = 50 : 1 の混合ペプチドを用いて調製した SWCNT 複合体の場合は、相対蛍光強度は約 4.8 %、100 : 1 の場合は約 4.4 % であり、BODIPY TMR 標識ペプチドを用いた SWCNT の分散ではほぼ蛍光は観察されないことが判明した (Fig. 14)。SWCNT を分散する時、BODIPY TMR が SWCNT 表面に対して直接疎水性相互作用をする影響と考えられる。この相互作用により、BODIPY TMR に対する励起エネルギーの一部が SWCNT 側に移行することで励起が不十分となり、フリーの BODIPY TMR と比較して蛍光強度が顕著に減少する結果になったと考察される。また、SWCNT と蛍光物質が相互作用すると蛍光強度が低下するという報告もされている^{51, 52}ことから、SWCNT 複合体に対して蛍光標識した上で十分な蛍光強度を得るためには、蛍光物質と SWCNT 表面との相互作用を抑制して蛍光物質が水溶液中を動いているような環境を実現する必要がある。そこで次に、ペプチドと蛍光物質との間にリンカーを介して結合させることで、蛍光物質と SWCNT 表面との相互作用を抑制する標識手法を試みた。

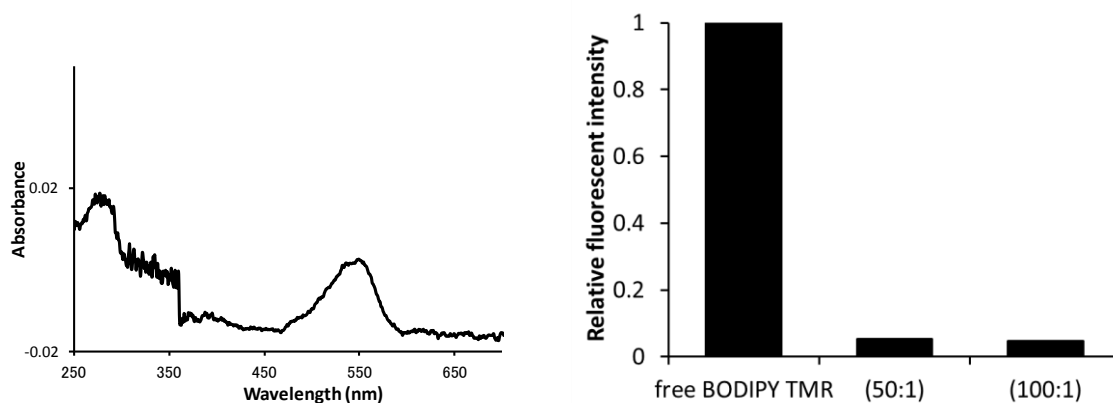


Fig. 14 Absorbance spectrum of BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ peptide and relative fluorescent intensity of BODIPY TMR conjugated to the SWCNT-CWKG(KWKG)₆ complex without PEG linker.

The relative fluorescent intensity of the SWCNT-peptide dispersion with $(KWKG)_7$ and CWKG(KWKG)₆-BODIPY TMR without PEG linker at a 50:1 or 100:1 weight ratio compared to that of free BODIPY TMR at the same concentration is shown.

3-b CWKG(KWKG)₆ ペプチド含有 SWCNT-ペプチド複合体に対する BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を用いた蛍光標識

SWCNT-ペプチド複合体をペプチドの重量比で(KWKG)₇:CWKG(KWKG)₆ = 10:1 のペプチド混合物を用いて調製し、SWCNT-ペプチド複合体のシステイン残基のチオール基に対して、PEG 鎖からなるリンカーを介して BODIPY TMR 標識を行った。BODIPY TMR-(PEG)_n-標識 SWCNT-ペプチド複合体の調製は 3 段階の合成により行った (Fig. 15)。

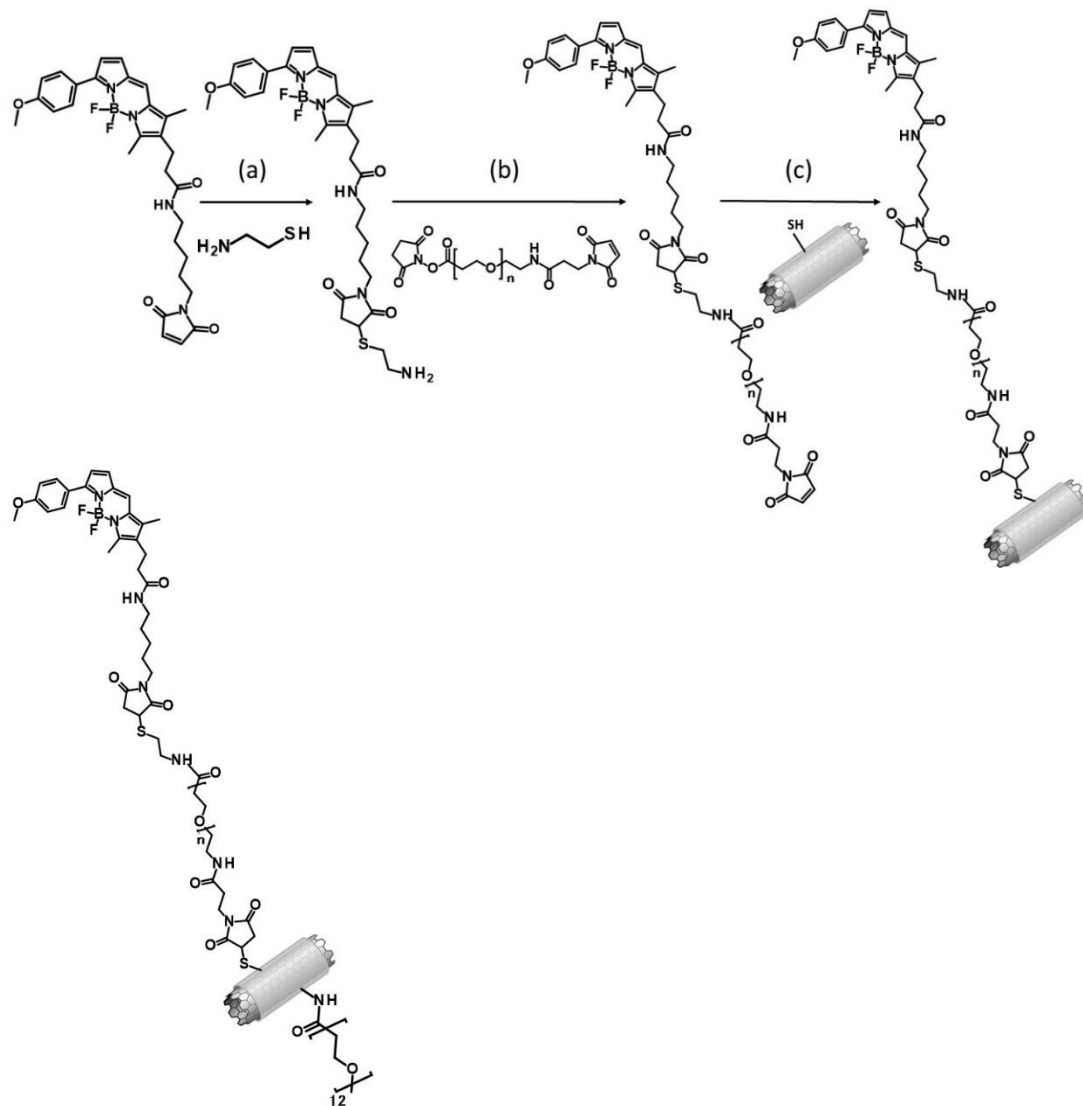


Fig. 15 Schematic illustration of the preparation of the BODIPY TMR-(PEG)_n- modified SWCNT-peptide and SWCNT-peptide-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG_n linker complexes.

1 段階目は BODIPY TMR C5-maleimide に対してシステアミンの付加を行った。0.14 mM の BODIPY TMR C5-maleimide と 1.4 mM のシステアミンを pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で 5 時間反応させ、逆相 HPLC で C18-AR II カラム、アセトニトリル濃度 30% - 70%、30 min の gradient mode の移動相条件で精製を行った (Fig. 16)。目的の合成物 BODIPY TMR-NH₂ は、保持時間約 19.5 分のフラクションから分取して MALDI にて分子量を確認し、凍結乾燥後に DMF 中に再溶解した。

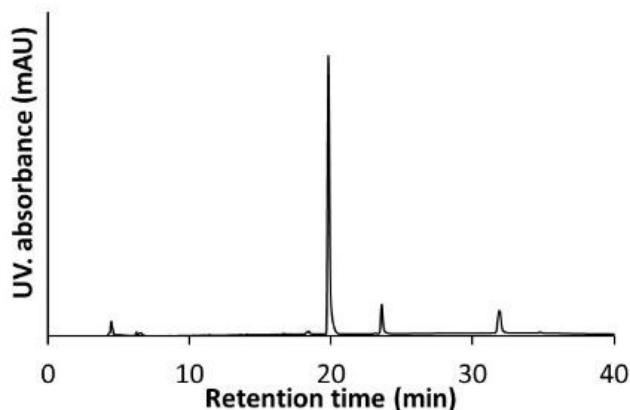


Fig. 16 HPLC purification of BODIPY TMR-NH₂. BODIPY TMR-NH₂ was purified with reverse-phase HPLC with C18-AR II Column, eluted with water and acetonitrile mixture containing 0.1% TFA in a gradient mode from 30% to 70% in acetonitrile concentration percentage for 30 min.

2 段階目は、BODIPY TMR-NH₂ に SM(PEG)_n (n = 2, 4, 6, 8, 12, 24) を結合させて BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を合成した。0.3 mM の BODIPY TMR-NH₂ に対して 0.3 mM の triethylamine (TEA) を加えて 30 分間反応させてプロトン化したアミノ基の脱プロトン化を行った。そこに、SM(PEG)_n を同等量加えて 24 時間反応させ、BODIPY TMR-NH₂ のアミノ基と SM(PEG)_n の NHS エステル基との間でアミド結合させることで BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide の合成を行った。反応後、pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で SWCNT-ペプチド複合体のチオール基に対して 3 当量の BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を添加して 5 時間反応させて BODIPY TMR-(PEG)_n-標識 SWCNT-ペプチド複合体を調製した。未反応の BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide は透析で除き、標識率は BODIPY TMR の 544 nm の吸光度とモル吸光係数⁵⁰ を用いて定量した。蛍光スペクトルは、SWCNT 濃度を 1 μg/ml に希釈して 544 nm の励起光で測定し、フリーの同濃度の BODIPY TMR の蛍光強度を 1 として比較した。

加えて、SWCNT-ペプチド複合体の分散安定性をより向上させるために PEG 修飾を施した SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 複合体に対しても BODIPY TMR 標識を行って同様の検討をした。この時、リンカー長はフリーと同程度の蛍光強度が得られる PEG 鎖とした。

BODIPY TMR-(PEG)_n-標識 SWCNT-ペプチド複合体は、リンカー長に関係なく SWCNT-ペプチド複合体のチオール基はほぼ 100% 標識されることが確認された。一方で、蛍光強度はリンカー長に応じて大幅に変化した。リンカーを介さずに直接チオール基に標識した control の蛍光強度は、フリーの同濃度の BODIPY TMR に対して約 20% であった。また、リンカー長依存的に蛍光強度は増加し、重合度が 12 以上の PEG 鎖によるリンカーの場合はフリーの BODIPY TMR と同程度の蛍光強度が得られた (Fig. 17)。BODIPY TMR-(PEG)_n-標識 SWCNT-ペプチド複合体の蛍光強度は、SWCNT 表面と疎水性相互作用

用した BODIPY TMR からの蛍光と水溶液中を動く BODIPY TMR からの蛍光の平均の値を示すため、リンカーを介することで SWCNT 表面との疎水性相互作用がリンカー長依存的に解消し、蛍光強度が増加していくものと考察される。

また、分散安定性を向上するために SWCNT-ペプチド複合体のアミノ基に対して先に (PEG)₁₂ 修飾し、その後に BODIPY TMR-(PEG)₁₂ 標識した SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体を合成した場合も、チオール基は分散安定化のための PEG 修飾率によらずにほぼ全てのチオール基が標識されることが確認された。蛍光強度も PEG 修飾率によらずにほぼ一定であり、(PEG)₁₂ 修飾しない場合とほぼ同程度だった (Fig. 17)。したがって、PEG 修飾は BODIPY TMR-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 複合体の蛍光強度に対して影響しないと考えられ、本複合体の細胞取り込み後の蛍光顕微鏡観察や FACS 測定で観察される蛍光は、SWCNT 複合体の細胞取り込み動態を定量的に表していると考えられる。そこで、以下 BODIPY TMR-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 複合体を用い、細胞取り込み実験を行った後に蛍光顕微鏡観察や FACS 測定を行って SWCNT 複合体の細胞取り込み動態を評価した。

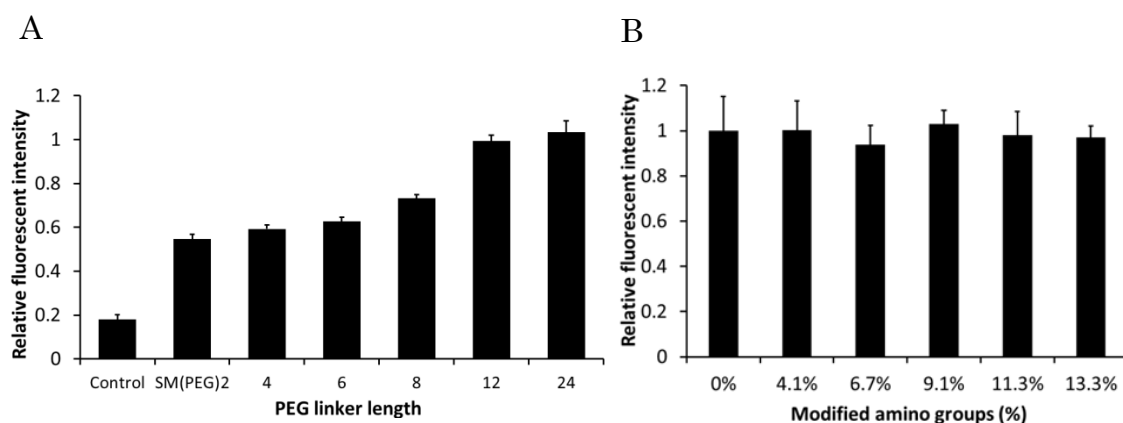


Fig. 17 Relative fluorescent intensity of BODIPY TMR conjugated to the SWCNT-CWKG(KWKG)₆ complex with PEG linkers of various lengths (A) and with the PEG₁₂ linker and simultaneous PEG modification at amino groups (B).

The relative fluorescent intensity of the SWCNT-peptide-BODIPY TMR-PEG_n linker complex compared to that of free BODIPY TMR at the same concentration is shown in (A). The control group shows fluorescent intensity of BODIPY TMR labeled directly to SWCNT dispersion without a linker. The relative fluorescent intensity of SWCNT-peptide-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker dispersion under various extents of PEG modification at the amino groups of (KWKG)₇ (B). Results are shown as the mean ± SD (n = 4).

3-c PEG 修飾した SWCNT-ペプチド複合体の細胞取り込みの評価

A549 細胞^{53,54}を播種した grass bottom dish (松浪硝子社製) に対し、15 $\mu\text{g/ml}$ SWCNT 濃度の SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体含有の培地と交換して 4、24 時間それぞれインキュベートした。そして蛍光顕微鏡 (Biozero Bz-8000、キーエンス社製) を使用し、Ex/Em = 540/605 nm (BODIPY TMR, red)にて蛍光顕微鏡観察した。

実験の結果、インキュベート時間ならびに PEG 修飾率依存的に取り込み量の増加が認められた (Fig. 18)。このことは、(2-d)で示した通り PEG 修飾した SWCNT 複合体は PEG 修飾率依存的に分散安定性が向上していることと関係し、SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体においても PEG 修飾率依存的に培地中での分散安定性が向上することで SWCNT 複合体の細胞取り込み量が上昇すると考察される。また、PEG 修飾はポリカチオン性の SWCNT-ペプチド複合体と細胞表面との静電的な相互作用を抑制する方向に働くと考えられるが、PEG 修飾した SWCNT 複合体の細胞取り込みに対しては、PEG 鎖による静電的な相互作用の抑制効果よりも分散安定性の向上の方がより重要であると示唆された。

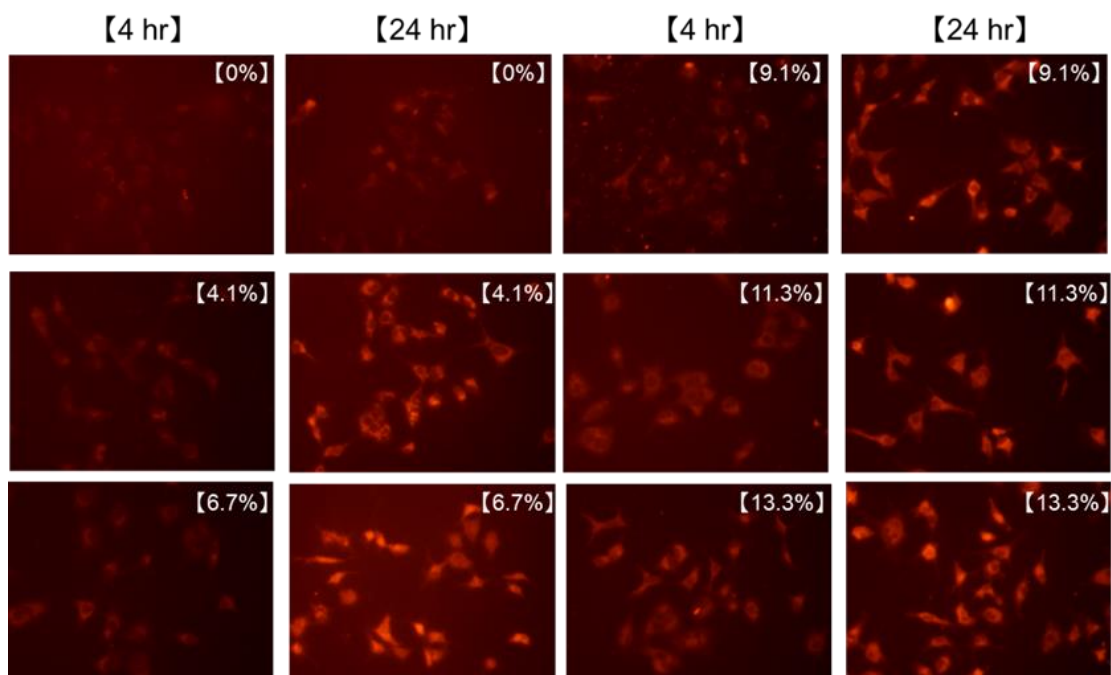


Fig. 18 In vitro cellular uptake of the SWCNT-peptide-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker dispersion.

A549 cells were treated with a SWCNT-peptide dispersion prepared with the PEGylated (KWKG)₇ and CWKG(KWKG)₆-BODIPY TMR-PEG₁₂ at a SWCNT concentration of 15 $\mu\text{g/ml}$ for 4 and 24 hr. The percentages in the figure represent the extent of PEG modification of amino groups obtained in Fig. 11. After the incubation, cells were washed with PBS and fixed with 4% PFA, and the cellular uptake was observed using a Biozero Bz-8000 fluorescence microscope with Ex/Em = 540/605 nm (BODIPY TMR, red).

3-d SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体の細胞取り込み量の定量

SWCNT 複合体の細胞取り込みを (3-c)と同様の条件で行い、4、12、24 時間インキュベートして、FACSCant II (BD biosciences 社製) を用いて FACS 測定を行った。

PEG 修飾率依存的に経時的に取り込み量は増加し、(2-d)の実験の結果の通りに SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 複合体の分散安定性と関係し、分散安定性が向上するにしたがって取り込み量は増加する結果が得られた。最も分散安定性が高く 24 時間安定に分散する 13.3%PEG 修飾した複合体が最もよく取り込まれた (Fig. 19)。SWCNT 複合体に対する PEG 修飾による分散安定性の向上は、PEG 鎖による細胞表面と相互作用の抑制効果よりもより重要な役割を果たしていることが定量的に示唆された。

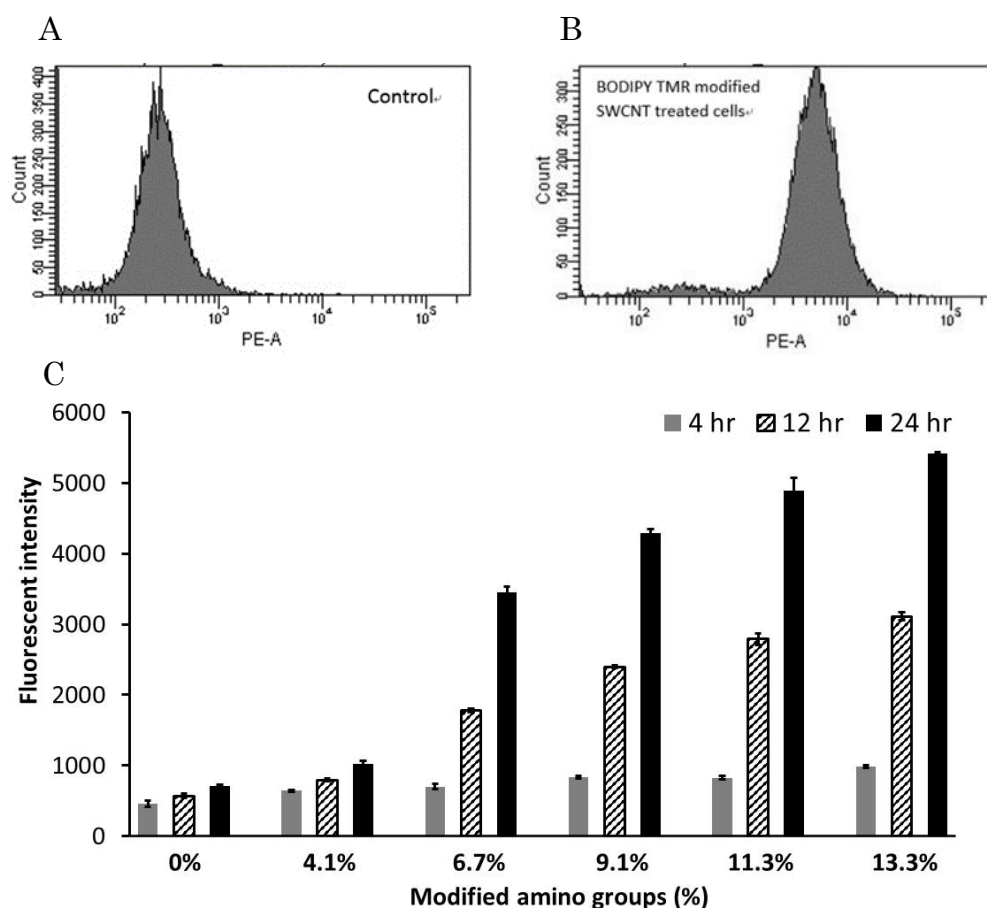


Fig. 19 FACS analysis of the cellular uptake of the SWCNT-peptide composite with (PEG)₁₂-(KWKG)₇ at various extents of PEG modification and CWKG(KWKG)₆-BODIPY TMR-PEG₁₂ in a 10:1 weight ratio.

In the upper figure, representative FACS histograms for cells treated with the BODIPY TMR labeled SWCNT-peptide without PEG modification (A) and those for cells treated with the BODIPY TMR labeled SWCNT-peptide with 13.3% PEG modification (B) after 24 hr incubation are shown. In figure (C), the fluorescent intensity of cell samples representing the mean intensity of each histogram after exclusion of that of control cells. The analysis was performed using a FACSCant II with Ex/Em = 488/585 nm. The fluorescent mean intensity is shown with the mean \pm SD (n = 3).

3-e 考察

第二節で調製した FITC-(PEG)₁₂-修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体は、疎水性分子である FITC が PEG 鎖と同量結合しているために物性や分散安定性に影響を与えることが考えられ、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の取り込み動態の解析には適さない。そこで、BODIPY TMR を用いた SWCNT-ペプチド複合体修飾法を新たに開発した。最初に BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ ペプチドを先に合成し、(KWKG)₇ と共に用いて SWCNT を分散させた場合、BODIPY TMR の蛍光強度が 5%未満に顕著に減少したことから、SWCNT 表面に直接疎水性相互作用する可能性のある標識方法では定量的な結果が得られないことが示唆された。そこで、10%の CWKG(KWKG)₆ 含有 SWCNT-ペプチド複合体のチオール基にリンカーを介して BODIPY TMR 標識することを試みた。CWKG(KWKG)₆ ペプチドが 10%であるため、ほぼ全てのチオール基が標識されても分散安定化に使われる (PEG)₁₂ 鎖の数に対しては大幅に少ないことから、SWCNT 複合体の分散安定性や細胞取り込みには蛍光標識は影響を与えないと考えられる。フリーの BODIPY TMR と同程度の蛍光強度が得られる条件は、重合度が 12 の PEG リンカーを介して標識した場合であることが明らかとなり、SWCNT 表面から約 5.3 nm 離れた位置に蛍光分子を配置する必要があることが判明した。このリンカー長は分散安定化に用いられている (PEG)₁₂ とほぼ同じ長さであるため、重合度が 12 の PEG 鎖長以上において凝集抑制機能や蛍光分子の SWCNT 表面との相互作用抑制が発揮される可能性が示唆される。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、インキュベート途中での凝集が確認された PEG 修飾率が 6.7%、9.1%の場合でも凝集の速度が遅いため細胞取り込み量は向上し、最も分散安定性が高い PEG 修飾率が 13.3%の場合には 24 時間凝集をせず取り込みも高かった。SWCNT 複合体の取り込み現象を継時的に解析すると、一般的には取り込みは 13.3% 修飾の場合のように時間に対して直線的に増えると考えられるが、本検討では修飾率が低い場合には取り込みに頭打ちが認められた。これは時間依存的に分散安定性の差の影響が現れ、修飾率の低い場合には凝集が起こって新たに細胞表面に結合する量が減少し取り込みが抑えられるためと考えられる。本結果からも、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る。

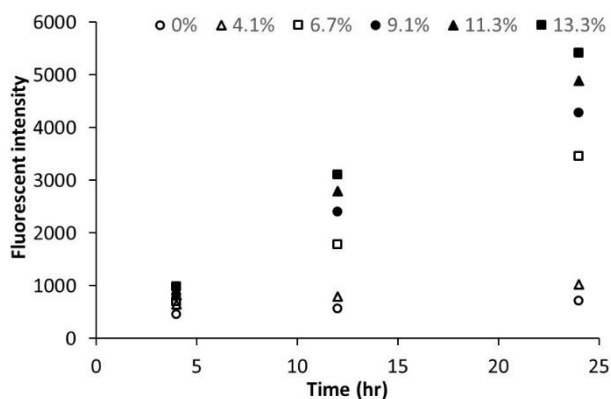


Fig. 20 Time courses of cellular uptake of SWCNT-peptide composite by FACS analysis. (Recalculated from the results shown in Fig. 19).

第二章 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂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⁵⁵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⁵⁶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⁵⁷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^{58, 59}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⁶⁰が起こら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^{61, 62}。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)₇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、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂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。

このような SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂複合体の特性から DDS キャリアとして薬物、遺伝子、タンパク質など機能性分子を SWCNT 複合体の表面に搭載することで細胞へのデリバリーが期待できる。そこで、第二章では SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂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た SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製し遺伝子デリバリーへの応用の可能性を検討した。検討は、先ず生理的条件下での分散安定性が重要な要素であることからその評価を行い、次に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体における各種構成要素の最適化と PEG 修飾の影響を検討するためにゼータ電位測定、アガロースゲル電気泳動、Ethidium bromide (EtBr)溶液中の複合体の蛍光スペクトル測定^{63, 64}によって物性評価を行った。さらに蛍光標識プラスミド DNA を用いて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込み動態を評価し、また蛍光タンパク質 mKO2 をコードした⁶⁵プラスミド DNA を用いて SWCNT-(KWKG)₇

(PEG)₁₂/pDNA 複合体によるタンパク発現を確認した。

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

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 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。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の分散安定性は、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の場合とはまた異なると考えられるが、本研究で用いた SWCNT 複合体は長さが数百ナノメートル、直径が数ナノメートルのスケール¹¹であり、1つのプラスミド DNA に対して複数の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が静電的相互作用して複合化している形状であると考えられる。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製する際に、N/P (amino group/phosphate group) 比を大きくよりカチオン性な方向に調製した場合には、結果として SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体全体の電荷はポリカチオン性となり、ポリアニオンであるプラスミド DNA の大分子の表面に、ポリカチオン性の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が多数静電的相互作用で結合している形状が考えられる。また、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体中では、プラスミド DNA 表面を一様に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が覆っているのではなく、プラスミド DNA 表面の一部は場合によっては水溶液中に露出しているものと考えられる。そこで、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の水溶液中での分散安定性は、露出したプラスミド DNA と SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体がさらに相互作用して SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体間で凝集が起こることにより低下するものと考えられる。そこで、第一章と同様に、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の生理的条件下における分散安定性を細胞が接着したプレートの培地中に添加して経時変化を観察することで評価した。また、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体における各種物性と構成要素の影響について評価を行った。ゼータ電位測定、アガロースゲル電気泳動による複合体の形成の確認、また SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の EtBr 溶液中での蛍光スペクトル測定の結果を以下に説明する。

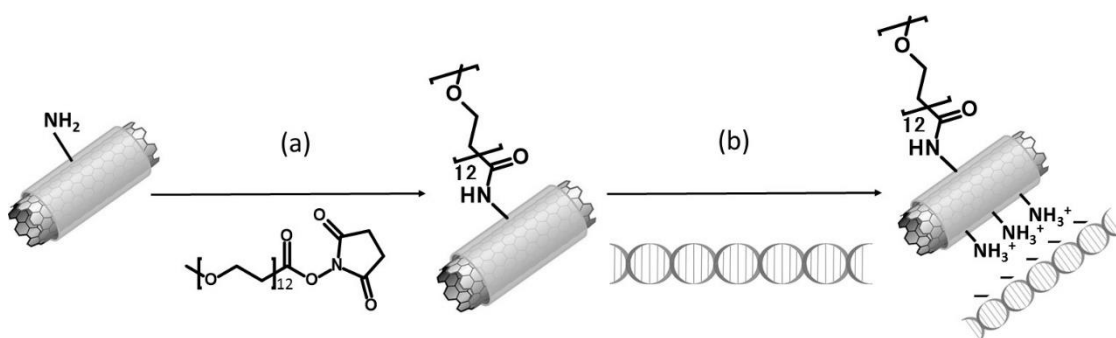


Fig. 21 Complex formation between plasmid DNA and Pegylated SWCNT-peptide complex.

1-a SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価

第一章において、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾による培地中での分散安定性と細胞への取り込みの向上を確認した。そこで SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA を静電的相互作用によって複合化させ、細胞培養培地中での分散安定性を評価した。プラスミド DNA 量を 1.5 μg に揃え各種 PEG 修飾率、N/P 比を有する SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製して DMEM 培地中に添加した。PEG の修飾条件は、MS(PEG)₁₂ を SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のアミノ基に対して 10%・50%当量反応させて調製し、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の量は反応させた PEG 試薬がすべてアミノ基と反応したと仮定して残りの遊離アミノ基とプラスミド DNA が静電的相互作用で複合体を形成した時に N/P = 20 となるように設定した。実際には、全ての MS(PEG)₁₂ が反応するわけではないため、PEG 修飾前に容量を揃えたことで SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の調製後の N/P 比は PEG 修飾率によって異なるがそのまま検討を行った。

PEG 修飾率が 0%、4.1%の場合は、培地に添加してインキュベート後短時間のうちに凝集が起こった。PEG 修飾率が 6.7%、9.1%の場合は 4 時間後、11.3%、13.3%の場合はそれぞれ培地に添加後 12 時間、24 時間で凝集が起こったことから PEG 修飾率に依存して分散安定性が向上することが判明した (Fig. 22)。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体を遺伝子デリバリーのキャリアとして応用するためには、生理的条件下において分散安定化する必要があるためにアミノ基に対する PEG 修飾率を上げて分散安定性を向上することが重要であると考えられる。

次に、DMEM の代わりに Opti-MEM を用いて同様の実験を行った。PEG 修飾率が 0%、4.1%の場合はインキュベート後短時間のうちに凝集が起こり、6.7%、9.1%の場合は 4 時間後に凝集が起こった。一方で 11.3%、13.3%の場合は 24 時間後においても分散状態を維持していた (Fig. 22)。したがって、DMEM と Opti-MEM の両メディアムへの対応を考えると、PEG 修飾率が 13.3%であれば分散安定性が良く遺伝子デリバリーのキャリアとしての応用が可能となることが示唆された。

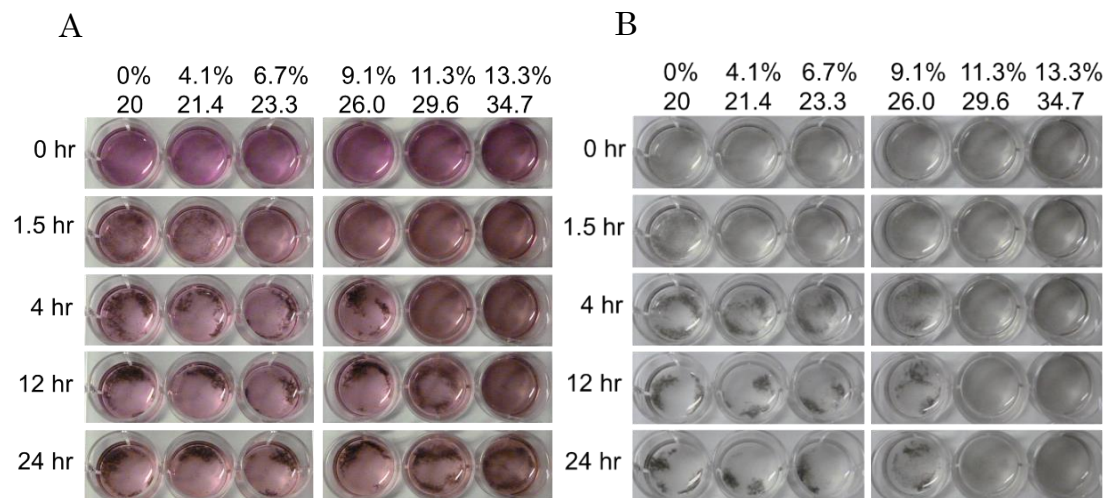


Fig. 22 Visual observation of the dispersion stability of the SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with different extents of modification and N/P ratio in DMEM (A) and Opti-MEM (B) of the cell culture medium.

The SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with various modification ratios was incubated for 24 hr under 5% CO₂ at 37 °C and visually observed for 24 hr. The percentages at the top of the panels represent the extent of PEG modification on amino groups (%) and N/P ratio.

次に、上記の実験ではPEG修飾率とN/P比が共に異なっているため、PEG修飾率の分散安定性に対する影響を比較するためにN/P = 20に固定して複合体を調製してOpti-MEM中で同様の実験を行った。

結果は、上記の実験のPEG修飾率とN/P比が共に異なる場合と同様であり、PEG修飾率が0%、4.1%の場合はインキュベーション開始後短時間で凝集が起こり、6.7%、9.1%の場合は4時間後に凝集が起こり、11.3%、13.3%の場合は24時間後においても分散状態を維持した (Fig. 23)。したがって、N/P比を固定してPEG修飾率の影響を比較した場合においてもPEG修飾率依存的に分散安定性が向上し、PEG修飾率が13.3%の場合は安定に分散した状態を維持できることが判明した。また、本研究

はN/P比が大きな値の領域でSWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA複合体を調製しているが、

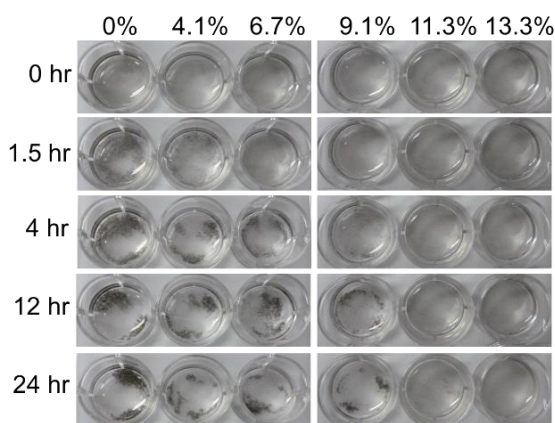


Fig. 23 Visual observation of the dispersion stability of the SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with different extents of modification and N/P of 20 in Opti-MEM.

The SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with various modification ratios was incubated for 24 hr under 5% CO₂ at 37 °C and visually observed for 24 hr. The percentages at the top of the panel represent the extent of PEG modification on amino groups (%).

分散安定性に対しては N/P 比の違いはあまり影響しないことが考えられ、遺伝子デリバリーのキャリアとして機能化するためには、N/P 比よりも PEG 修飾による分散安定化が重要であると考察される。

この点についてさらに、N/P 比の違いによる SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の分散安定性の変化を評価するため、PEG 修飾率が 0%と 13.3%の 2 通りの複合体を N/P = 15 - 35 で調製して同様に分散安定性を観察した。PEG 修飾を行わない場合は、インキュベート開始後 N/P 比によらずにまもなく凝集が起こった。一方、13.3%PEG 修飾を施した複合体では N/P 比によらずに 24 時間安定に分散した状態を維持した (Fig. 24)。したがって、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の分散安定性に対しては N/P 比よりも PEG 修飾による分散安定性の向上が重要であることが確認できた。また、13.3%の PEG 修飾では、N/P 比によらずに十分な分散安定化が得られ、一方で N/P 比が大きいほど細胞障害性が懸念されるために、遺伝子デリバリーシステムの構築においては PEG 修飾比を 13.3%に固定して、さらに適切な N/P 比を選択して機能化すればよいと考えられる。以上の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の分散安定性の評価から、分散安定性の向上には PEG 修飾率が重要で、13.3%PEG 修飾を行うことで N/P 比を最適化した非凝集性の遺伝子デリバリーキャリアとしての機能化が可能であると結論された。

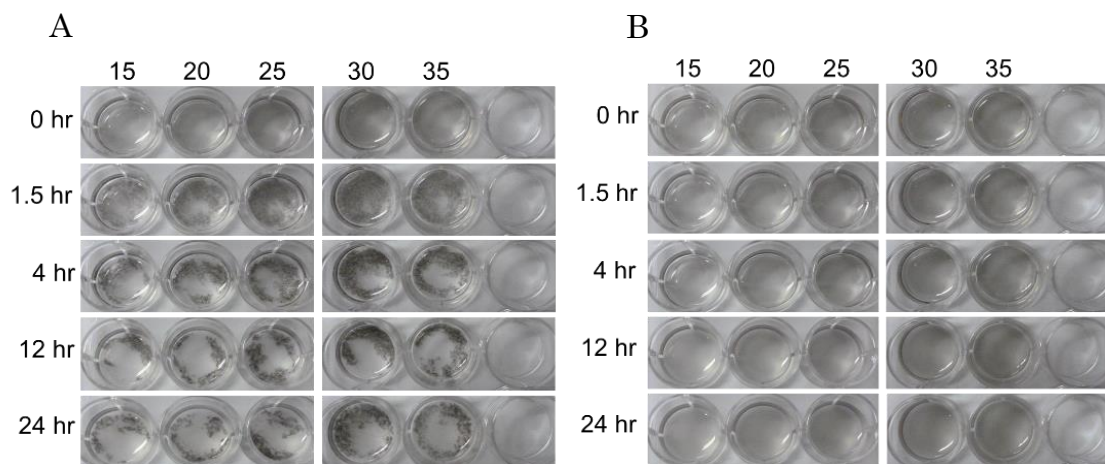


Fig. 24 Visual observation of the dispersion stability of the SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with 0% (A) and 13.3% (B) extents of modification and N/P ratio of 15 - 35 in Opti-MEM. The SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with 0% and 13.3% of modification ratios and N/P ratio of 15 - 35 was incubated for 24 hr under 5% CO₂ at 37 °C and visually observed for 24 hr. The percentages at the top of the panels represent N/P ratio.

1-b SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のゼータ電位測定

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のゼータ電位を PEG 修飾と N/P 比を変えて測定し、これらが SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用に与える影響を検討した。

プラスミド DNA 単独のゼータ電位は約-40 mV であり、一方プラスミド DNA と複合化していないキャリアである SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体のゼータ電位は約+33 mV だった。したがって、一定量 (0.5 μg) のプラスミド DNA に対して加える SWCNT 複合体量を増やし N/P 比を上昇させていく場合、SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体のゼータ電位はこの DNA と複合化していないキャリアの値をプラトー値として漸近していくものと考えられる。一方、PEG 修飾を施さない SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体では N/P 比が 20 以上の場合は約+30 mV 程度となり、プラスミド DNA と複合体を形成して水溶液中で非常に安定に分散していると考えられる。N/P 比が 15 以下の場合、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体量の減少に伴ってゼータ電位は低下し、N/P 比が 3 以下ではマイナスの値を示した。

これは SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体表面のプラスミド DNA のリン酸基の割合がアミノ基の割合よりも多いために負に帯電しているものと考えられる。そして、N/P = 5 が境界であるため、それ以下ではほぼ全ての SWCNT-(KWKG)₇ 複合体はプラスミド DNA と複合化し、一方 N/P 比が 10 以上ではプラスミド DNA 表面と複合化した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体以外の遊離した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体も存在する状態であると考えられる。そして、ゼータ電位がマイナスからプラスに転換する N/P 比が計算上約 5 であり、SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体に正電荷を持たせるためにはプラスミド DNA のリン酸基に対して過剰のアミノ基が必要とされることが判明した。

PEG 修飾を施した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体では、プラスのゼータ電位はより高い N/P 比で得られ、PEG 修飾率が 9.1%、13.3% の場合にそれぞれ N/P = 10、30 でプラスの値に転換した。また同じ N/P 比で比較した場合は PEG 修飾率依存的にゼータ電位の低下が認められた (Fig. 25)。これらの結果より、PEG 修飾によってプラスミド DNA と

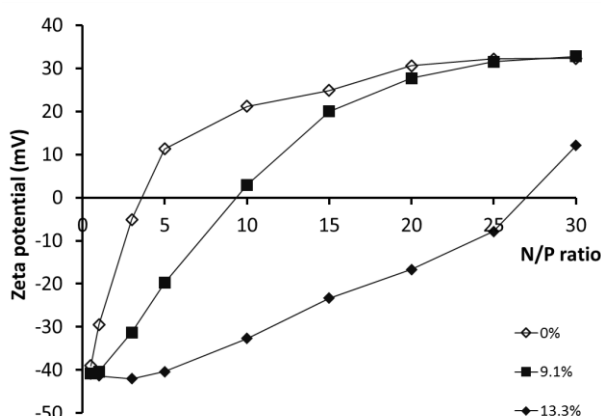


Fig. 25 Zeta potential of SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite at various PEG modification extents against amino groups and N/P ratio.

0% (white diamond), 9.1% (black square) and 13.3% (black diamond) represented PEG modification ratio of the composite. The composite was analyzed with a Malvern Nano-ZS instrument Zetasizer.

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の間の静電的相互作用が抑制され、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のゼータ電位がプラスになるためには、プラスミド DNA のリン酸基に対して過剰量の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を加える必要があることが示唆された。プラスミド DNA と SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体との静電的相互作用は平衡状態にあると考えられるが、PEG 修飾率依存的に静電的相互作用が抑制されることで解離方向に移行し、よりフリーの SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体量が増加することで、同じゼータ電位を示すのにより大きな N/P 比が必要となると推察される (Fig. 26)。これに対し、プラスミド DNA のリン酸基と SWCNT-

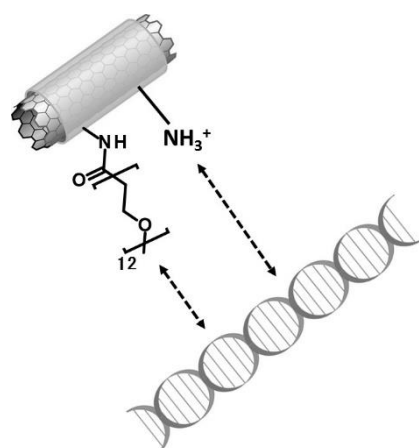


Fig. 26 Illustration of inhibition of electrostatic interaction between SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ complex and pDNA.

(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体のリジン残基のアミノ基間で、複合体全体のゼータ電位に及ぼす影響が異なることも考えられるが、これらの関係にはさらなる検討が必要である。そこで次に、アガロースゲル電気泳動によって PEG 修飾が SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の静電的相互作用に及ぼす影響を検討した。

1-c SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のアガロースゲル電気泳動

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体では、PEG 修飾率に依存して SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用が影響を受けて解離方向に平衡が動くことが示唆されたため、アガロースゲル電気泳動を行って相互作用を評価した。本電気泳動では、安定な複合体を形成してフリーのプラスミド DNA が存在しない場合にはバンドが検出されず、バンドが検出された場合は、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体と相互作用していないフリーのプラスミド DNA の存在を示すと考えられる。ここでは、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を PEG 修飾率が 0%、9.1%、13.3%および N/P = 0 - 20 で調製して泳動を行った。

最初に、PEG 修飾をしない SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体の電気泳動について、調製後まもなく各ウェルにアプライした場合と遠心ろ過後のろ液を電気泳動した場合で行った。両者を比較して違いは検出されず、N/P = 3 以上ではともにフリーのプラスミド DNA によるバンドは検出されなかった。したがって、PEG 修飾をしない SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体では SWCNT-(KWKG)₇ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用は非常に強く、N/P = 3 以上では安定な複合体を形成していることが示された (Fig. 27)。

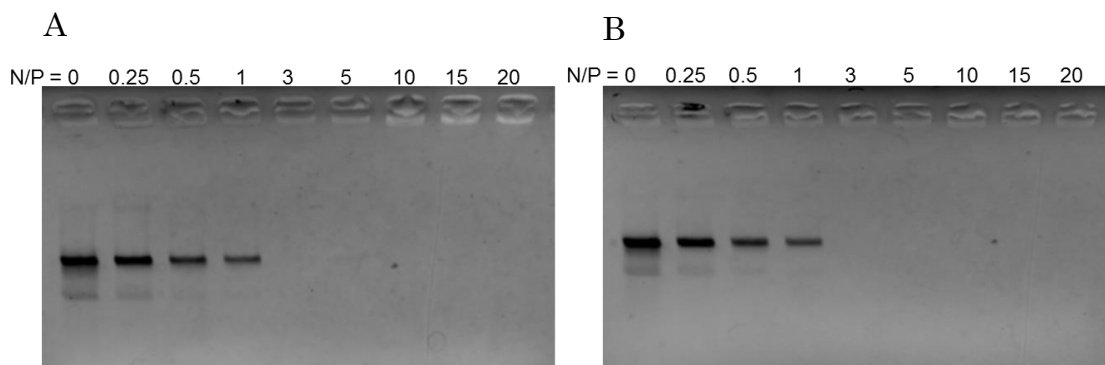


Fig. 27 Agarose gel electrophoresis of SWCNT-(KWKG)₇/pDNA composite without PEGylation. SWCNT-(KWKG)₇/pDNA composite (A) and the filtrate of the composite after centrifugal filtration (B) were electrophoresed at 70 V for 30 min.

これに対し、PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体を用いて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製し各ウェルにアプライして電気泳動を行った結果、9.1%PEG 修飾の場合は、N/P = 10 以下でフリーのプラスミド DNA のバンドが検出された (Fig. 28)。これは PEG 鎖によりプラスミド DNA との静電的相互作用が抑制され、相互作用の平衡が解離側に移行する結果、安定な複合体を調製するためにより多くの SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が必要になったためと考えられる。

また、PEG 修飾率の影響を評価するために 13.3%PEG 修飾を行った場合も同様に実験したところ N/P = 20 でもバンドが検出された (Fig. 28)。これは、PEG 修飾率が上昇するに従って安定な複合体形成のためにより多くの SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が必要となることを示し、本結果は、ゼータ電位測定の結果と対応していると考えられる。

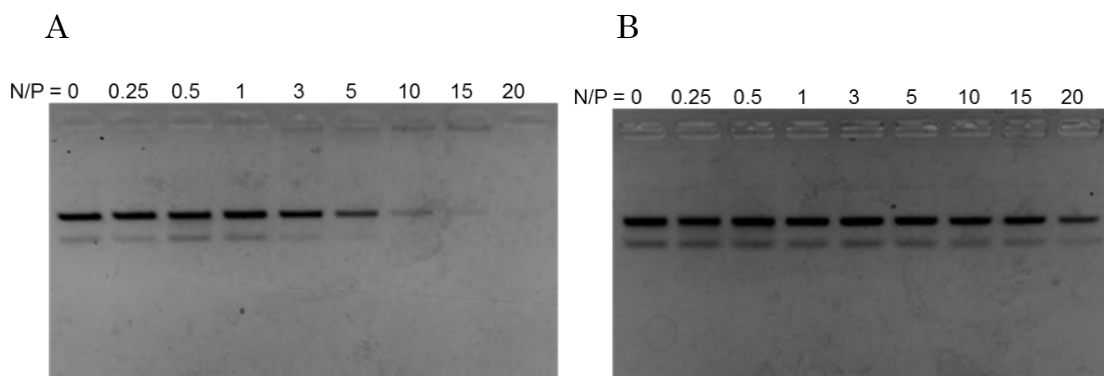


Fig. 28 Agarose gel electrophoresis of SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite. SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite including 9.1% (A) and 13.3% (B) PEG modified amino groups extents were electrophoresed at 70 V for 30 min.

1-d SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の EtBr 溶液中での蛍光測定

EtBr はプラスミド DNA に対してインターカレートすると蛍光強度が著しく増大することが知られており、例えばアガロースゲル電気泳動でのプラスミド DNA の検出は EtBr を用いて行われている。そこで、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を EtBr 溶液中に希釈して蛍光スペクトル測定を行い、複合体中におけるプラスミド DNA の存在状態とこれに及ぼす PEG の影響について検討した。

第一章において SWCNT-ペプチド複合体に対して BODIPY TMR 標識を直接行った場合に、BODIPY TMR が SWCNT 表面と疎水性相互作用すると励起エネルギーの一部が SWCNT 側に移行することで励起が不十分となり、フリーの BODIPY TMR に対して蛍光強度が大幅に減少することが観察された。したがって、同様に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のプラスミド DNA にインターカレートした EtBr が SWCNT 表面と相互作用すると蛍光強度が減少すると予想される。一方、PEG 修飾によって SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用が抑制されて蛍光強度が増大することも考えられる。そこで、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体における SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用や PEG 修飾の意味を別の観点から評価するために、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を EtBr 溶液中に希釈して EtBr のインターカレーションによる蛍光スペクトルの測定を行い PEG 修飾による静電的相互作用に対する影響を評価した。

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製後、0.4 μg/ml EtBr 濃度の TAE buffer で 2 ml に希釈して励起波長 510 nm で蛍光スペクトル測定を行った。各 PEG 修飾率と N/P 比を有する SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体における蛍光スペクトルの極大値に対して、フリーのプラスミド DNA が与える蛍光量の極大値を 1 として相対蛍光強度を N/P 比に対してプロットした。

結果は、プラスミド DNA が SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とコンプレックスを形成すると N/P 比の増加に伴って蛍光強度が大幅に減少し、プラスミド DNA にインターカレーションした EtBr と SWCNT 表面との疎水性相互作用による消光と思われる現象が観察された。また、同じ N/P 比で比較した場合は、PEG 修飾率依存的に蛍光強度は増加した (Fig. 29)。本結果は PEG 修飾により、インターカレーションした EtBr と SWCNT 表面との相互作用が抑制されることで蛍光強度が上昇したものと考えられるが、N/P 比の上昇に従って SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体量も増加するため、SWCNT 表面と EtBr の直接的な相互作用およびこれに対する PEG 修飾の影響を反映するとも考えられ、さらなる検討が必要である^{63, 64}。以上の結果は、ゼータ電位測定やアガロースゲル電気泳動の実験から得られた SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用の平衡が PEG 修飾率依存的に解離側に移動するという結果と対応し、PEG 修飾による立体障害により静電的相互作用が様々な影響を受けていることが示唆された。

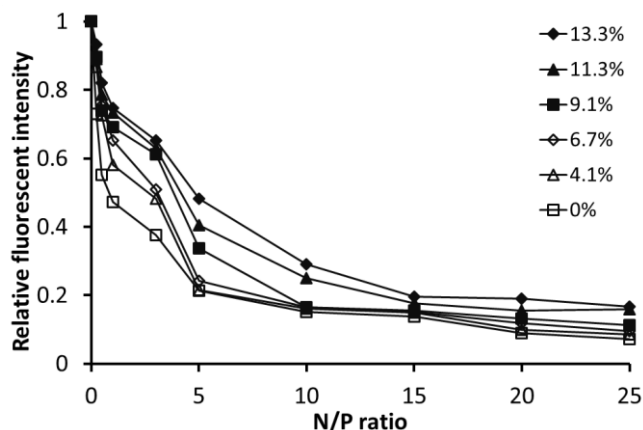


Fig. 29 Fluorescent measurement of EtBr in SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite.

This figure shows relative fluorescent intensity of EtBr in SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite with various PEG modification extents on amino groups of SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite. Relative fluorescent intensity was calculated with the maximum values of each fluorescent intensity of the complexes in comparison to that of free plasmid DNA of the same amount. The fluorescent spectrum was measured with a FluoroMax-4 fluoro-spectrometer at excitation wavelength of 510 nm. The fluorescent spectrum was observed around 610 nm.

1-e 考察

PEG 未修飾の SWCNT-(KWKG)₇ 複合体とプラスミド DNA とは静電的相互作用によってさらに複合化され、SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体が調製された。しかしながら、N/P 比 10 以下の条件で SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体を調製した場合は水溶液中で調製中に凝集が起こった。この凝集は、SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体間の相互作用によるものと考えられ、プラスミド DNA の露出したリン酸基と SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体表面のアミノ基がさらに静電的相互作用することにより、複合体間の凝集が起こると考えられる。これに対し、N/P = 15 以上では SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の結合量がプラスミド DNA 表面を覆うために十分であり、水溶液中にさらにフリーの SWCNT-(KWKG)₇ 複合体が存在する状態であるために凝集は起こらないと考えられる。

しかしながら、細胞培養培地中では N/P 比によらず SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体は短時間のうちに凝集した。これに対し、第一章の検討結果より PEG 修飾された SWCNT-(KWKG)₇ 複合体では培地中で PEG 鎖による立体障害、疎水性相互作用の抑制により凝集が抑制されて分散安定性が大幅に向上^{66, 67} できたことから、本章でも PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇ 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。SWCNT を利用した遺伝子デリバリーシステム

の開発においては、生理的条件下での分散安定性が最も重要であると考えられるが、検討の結果 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA の複合体において、PEG 修飾率に依存した分散安定性の向上が得られ、PEG 修飾により、複合体の凝集が抑制されて分散安定性を大幅に向上できることが判明した。

しかしながら、PEG 修飾によって凝集が抑制できる利点はあるが、他方 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体における SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体のアミノ基とプラスミド DNA との静電的相互作用も抑制されることが考えられる。そこで、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の物性について、構成条件の最適化、PEG 修飾の意味の整理、プラスミド DNA の存在状態について検討するためにゼータ電位測定、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の 3 通りの側面から評価を行った。ゼータ電位については、同一 N/P 比で比較したところ PEG 修飾率依存的に減少し、アガロースゲル電気泳動においても PEG 修飾率依存的により大きな N/P 比においてもフリーのプラスミド DNA のバンドが検出された。このことは、PEG 修飾によって SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA 間における複合体形成は相対的に弱くなる可能性が示唆された^{63,64}。また、EtBr 溶液中での蛍光スペクトル測定においても同じ N/P 比で比較した時に PEG 修飾率依存的にインターカレートした EtBr の蛍光強度が上昇したことから、PEG 修飾によって SWCNT 表面と EtBr との疎水性相互作用が抑制されることが判明し、この結果からも PEG 修飾によって十分にコンプレックスを形成していない可能性が考察される。一方、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用が弱いことは、別の観点からはプラスミド DNA 表面と相互作用する SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の交換が早い状態であるとも考えられる。これは分散安定性にマイナスに働くことも考えられるが、PEG の立体的効果による凝集の抑制効果の方が勝り SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は分散安定化するのではないかと考察され、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA の複合体調製においては、様々な因子の影響を総合的に考える必要があることが示唆された。

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

—

第一章において PEG 修飾率依存的な SWCNT 複合体の分散安定性の向上および SWCNT 複合体の PEG 修飾率依存的な細胞取り込みの増加が明らかとなり、さらに本章第一節で SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 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。一方、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の物性評価では、PEG 修飾率依存的に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的相互作用が解離方向に移行することも明らかとなったことから、本節では実際に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込み実験を行い、ポリカチオン性と分散安定性を具備した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を用いた遺伝子デリバリーの可能性について PEG 修飾率、N/P 比による影響を検討した。また、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を利用して蛍光タンパク質をコードするプラスミド DNA を細胞に導入し、その発現を検討した。

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込みは、Cy3 標識されたプラスミド DNA を用いて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製して蛍光顕微鏡観察および FACS による定量的評価により行った。本検討では、PEG 修飾率が低く分散安定性が低い複合体は N/P 比によらずに取り込まれず、PEG 修飾率が高く分散安定性が高い複合体は N/P 比によらずに取り込まれることが予想されたことから、N/P 比と PEG 修飾率が共に異なる条件で細胞取り込み実験を行って比較することとし、最も分散安定性が高い 13.3%PEG 修飾の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体では、PEG 修飾後に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の容量を調整して N/P 比を調整し、N/P 比が及ぼす影響の評価を行った。細胞取り込み実験は、A549 細胞を播種した grass bottom dish にプラスミド DNA の濃度が揃うように培地中に SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を分散させ、4 時間インキュベートすることで行い、Vectashield with DAPI (Vector Laboratories 社製) で封入後、Biozero Bz-8000 を使用して蛍光顕微鏡観察した。また、導入したプラスミド DNA の発現は、蛍光タンパク質 mKO2 をコードしたプラスミド DNA を用いて確認した。

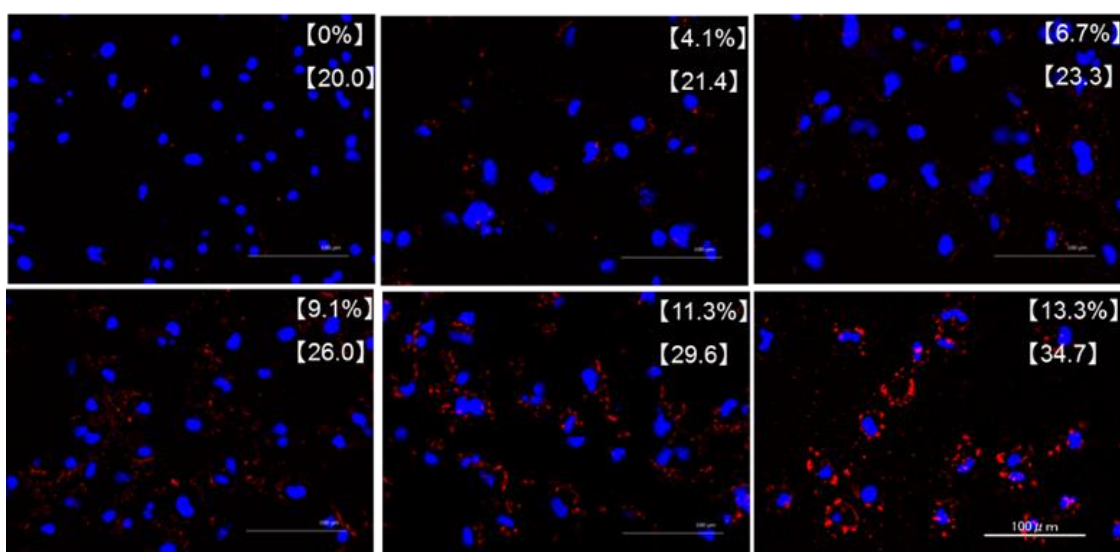
2-a SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込みの観察

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞への取り込みを評価するため、Cy3 ラベルされたコントロールプラスミド DNA を用いて複合体を調製し、A549 細胞による *in vitro* 取り込みを蛍光顕微鏡で観察した。ここでは取り込みが起こる条件と起こらない条件がともに検討できるように、最初に N/P 比と PEG 修飾率がそれぞれ異なる条件下で評価し、続いて分散安定性が最も良い 13.3%PEG 修飾を施した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を用いて、N/P = 15 ~ 35 の条件で細胞取り込み実験を行った。

初めに PEG 修飾率と N/P 比が様々な条件下も場合、PEG 修飾率依存的に分散安定性は向上し、PEG 修飾率が 11.3%、13.3% の場合の複合体は 4 時間のインキュベートで凝集は観察されなかった。細胞取り込みの観察においては、写真の赤色が取り込まれた SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を示すが、PEG 修飾率依存的に取り込み量が上昇することが明らかとなった (Fig. 30)。

次に、N/P 比が SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込みに対して及ぼす影響を評価するため、PEG 修飾率を 13.3% に固定して N/P = 15~35 の範囲で複合体を調製し、同様に 4 時間細胞をインキュベートして蛍光顕微鏡観察した。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は N/P 比の増加に従って SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体中のアミノ基の量が増加するが、4 時間のインキュベート中全て分散状態を維持しており、また取り込みに関しては N/P 比によらず顕微鏡観察で大きな差は観察されなかった (Fig. 30)。以上より、取り込みに対する影響については、PEG 修飾による分散安定性の向上が N/P 比よりも大きいと考えられた。

A



B

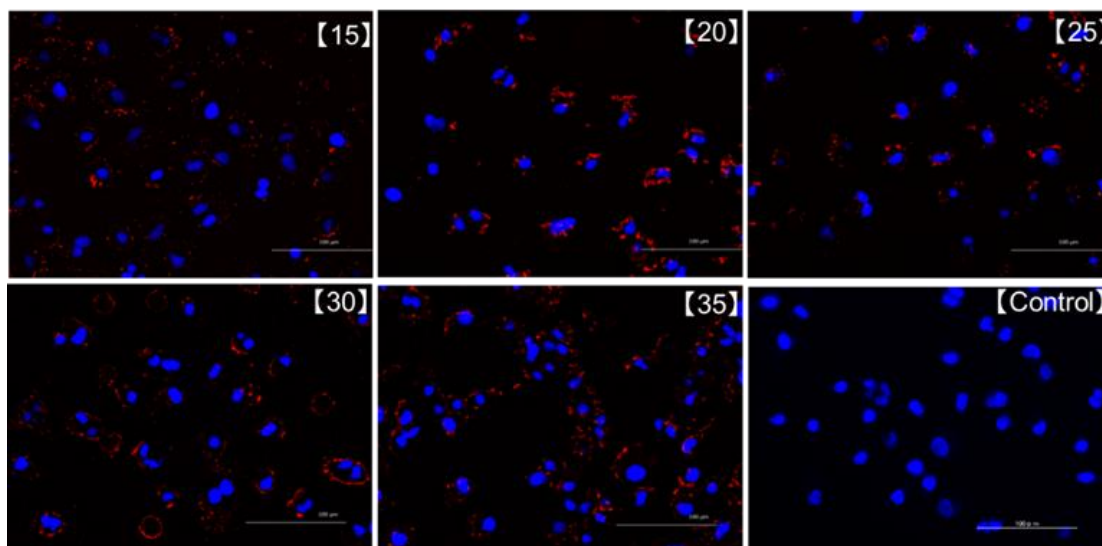


Fig. 30 Fluorescent microscopic observation after the cellular uptake of SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite.

The complex was prepared at various PEG modified extents of amino groups and N/P ratios (A) and at 13.3% PEG modified amino groups extent (B) for the transfection. The percentages in the figure show the PEG modification ratio and the numbers indicate N/P ratio. The transfection performed under 0.5 μ g pDNA for 4 hr. After the treatment, the cells were washed with PBS and fixed with 4% PFA, and then the cells were mounted in Vectashield with DAPI. The cellular uptake was observed using a Biozero Bz-8000 fluorescence microscope with Ex/Em = 360/460 nm (DAPI, blue) and 540/605 nm (Cy3, red).

2-b SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込み量の FACS 測定による定量

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込み動態を定量的に評価するために FACS 測定を行った。培地には DMEM、Opti-MEM の両メディアウムを用い、トランスフェクション時間はそれぞれ 4、12、24 時間とした。FACS の励起光が 488 nm であることから Cy3 の代わりに FITC で蛍光標識されたコントロールプラスミド DNA を用いて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製して同一条件で細胞取り込みを行った後に FACS 測定を行った。そして、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体未処置の細胞群のヒストグラムの平均蛍光強度を 1 として相対蛍光強度を比較した。

初めに、PEG 修飾率と N/P 比が共に異なる SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込みについて評価した。実験の結果、取り込み量はインキュベーション時間と共に増加し、また PEG 修飾率依存的に取り込み量が増加したことから、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の分散安定性の向上が取り込みに関与している可能性が示唆された。

分散安定性が最も高い 13.3%PEG 修飾の場合の取り込み量は、N/P 比によって違いはあるが、PEG 修飾しない場合と比較して 4 時間後に DMEM 中で約 20 倍、Opti-MEM 中で約 25 倍と大幅に増加した。培地については、Opti-MEM の方が取り込み量は増加し、DMEM 中では牛胎児血清との相互作用も生じることで牛胎児血清と SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体間のコンプレックスが形成され凝集性が高まるのが原因と考察された。そして、最も PEG 修飾率が高い 13.3%修飾の場合、Opti-MEM 中において 4、12、24 時間ともにトランスフェクション試薬である FuGENE⁶⁸ より取り込み量が高かった (Fig. 31)。以上の結果より、分散安定性が良い SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は非常に良く細胞に取り込まれることが判明し、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が遺伝子デリバリーのキャリアとして有用であることが示唆された。

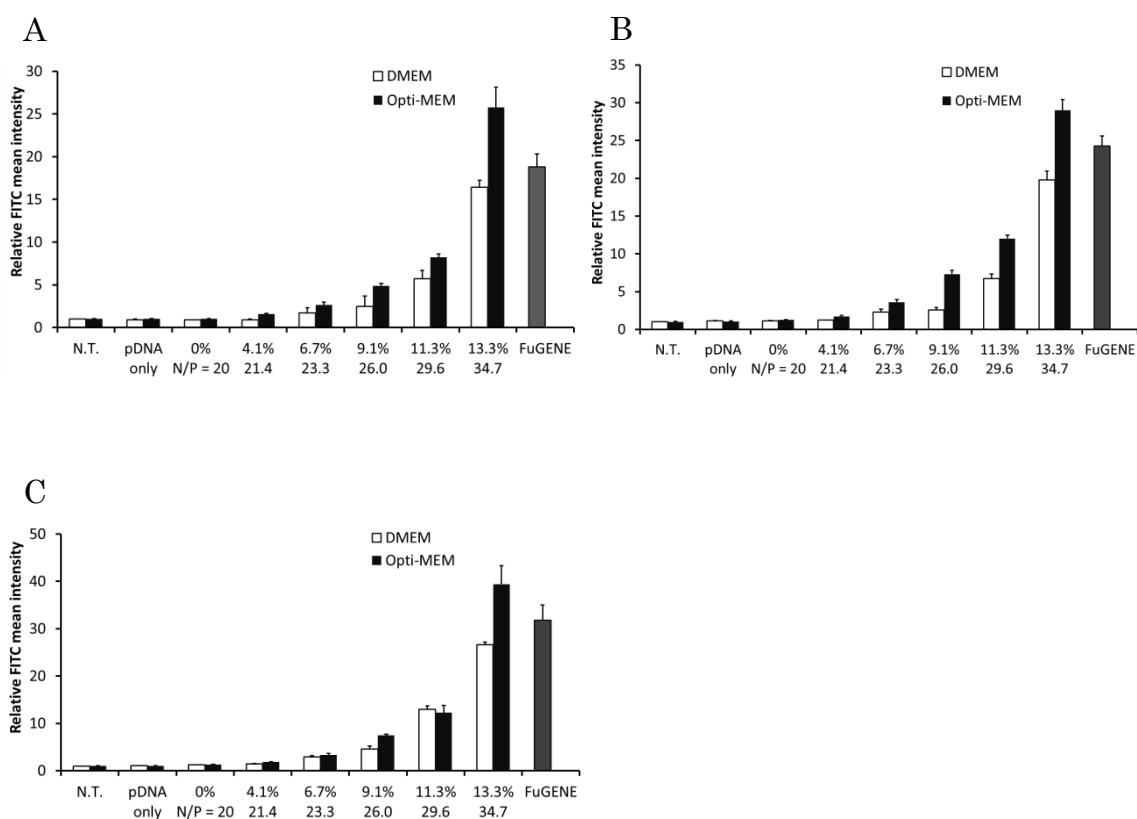


Fig. 31 FACS quantification of the cellular uptake efficiency using SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite.

The composite was prepared with containing various PEG modified amino groups extents and N/P ratios. Transfection periods were 4hr (A), 12 hr (B) and 24 hr (C). The transfection condition was the same as that of the microscopic observation experiment. N.T. represents the result of non-treated cells. Control plasmid DNA was labeled with FITC instead of Cy3 for the FACS quantification. The measurement was performed using a FACSCant II with Ex/Em = 488/530 nm, and treated cells were counted with 10000 events. The relative fluorescent mean intensity was calculated compared to that of N.T. data using FITC mean intensities with the relative mean intensity and SD (n = 3).

次に、PEG 修飾を施さない SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体と 13.3%PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体に対して、N/P 比を揃え細胞取り込みへの影響を評価した。PEG 修飾率を 0%と 13.3%とし N/P = 15 – 35 の範囲で調製した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を 4、12、24 時間のインキュベート後に FACS 測定で取り込み量を評価した。PEG 修飾しない SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体は、N/P 比によらずに培地中でまもなく凝集が起こることからほぼ取り込まれないことが判明し、DMEM、Opti-MEM の培地による差も観察されなかった (Fig. 32)。細胞に添加後、凝集する前に細胞表面に静電的に相互作用した SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体についてはインキュベート時間中に取り込まれる可能性もあると考えられるが、キャリア未処置細胞群と比較して大きな差は見られなかったことから、その量自体は微量で影響が無いと考えられる。この場合、N/P 比を増大させてカチオン性を増強することの影響も見られなかった。

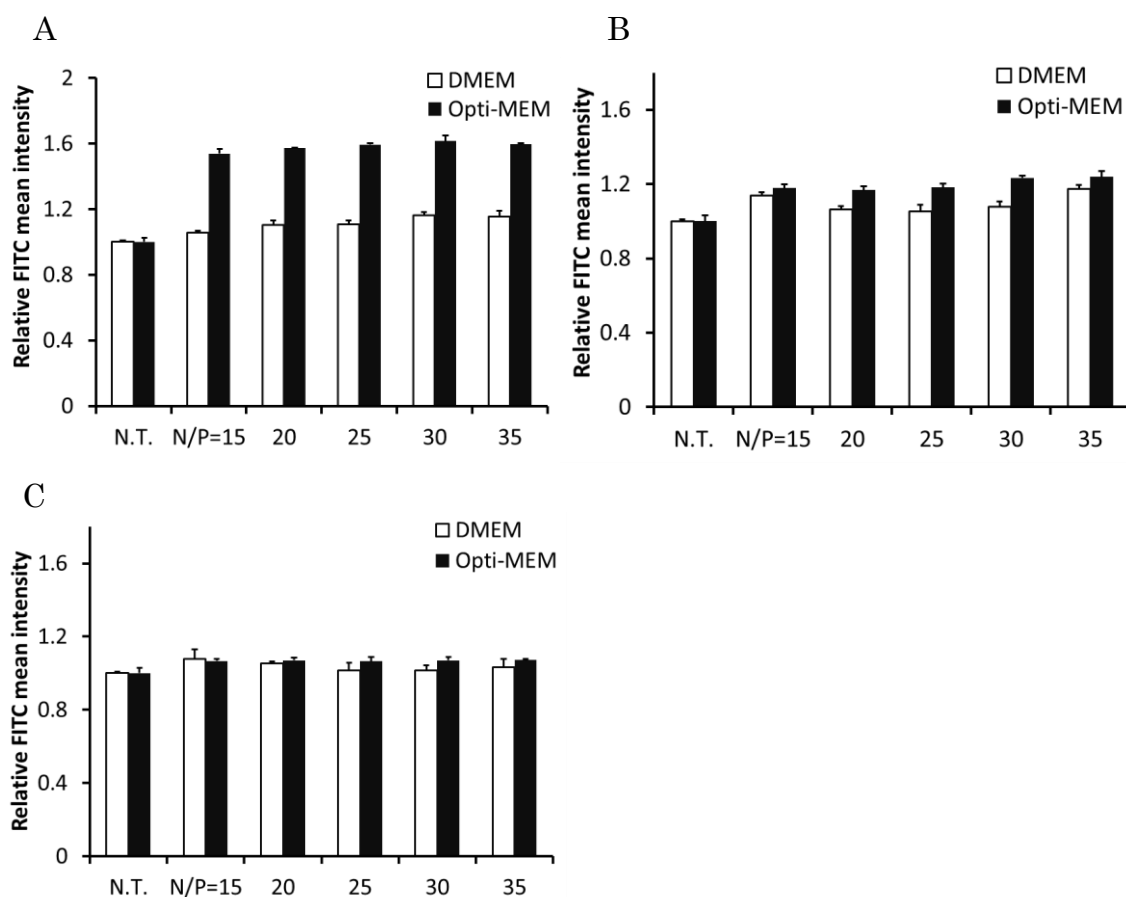


Fig. 32 FACS quantification of the cellular uptake efficiency using SWCNT-(KWKG)₇/pDNA composite.

The composite was prepared with N/P ratios of 15 – 35 without PEGylation. Transfection periods were 4hr (A), 12 hr (B) and 24 hr (C). The transfection condition was the same as that of the microscopic observation experiment. N.T. represents the result of non-treated cells. Control plasmid DNA was labeled with FITC instead of Cy3 for the FACS quantification. The measurement was performed using a FACSCant II with Ex/Em = 488/530 nm, and treated cells were counted with 10000 events. The relative fluorescent mean intensity was calculated compared to that of N.T. data using FITC mean intensities with the relative mean intensity and SD (n = 3).

次に、13.3%PEG 修飾を施した最も分散安定性の良い SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体について同様に 4、12、24 時間インキュベート後の FACS 測定を行った。この際 DMEM の場合は培地中で 24 時間後までに凝集したが、Opti-MEM の場合は 24 時間分散状態を維持していた。本実験では、DMEM、Opti-MEM の場合ともにインキュベート時間依存的に取り込み量が増加した。また、N/P 比の増加による影響は DMEM の場合は大きくは観察されなかったが、Opti-MEM の場合は N/P 比依存的に取り込み量が増加した (Fig. 33)。13.3%PEG 修飾した複合体では分散安定性が非常に良いことから、N/P 比の増加に伴って複合体中のアミノ基が増加し細胞表面との静電的な相互作用が増強されて取り込み量が増加すると考えられ、分散安定性が良い場合は加えて N/P 比も重要な役割を果たしていると考えられる。本結果と第二章の物性評価から、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体に対する PEG 修飾は、プラスミド DNA との静電的相互作用を抑制する方向に働くが、分散安定性がより重要であるために 13.3%PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は高い細胞取り込みを示すと結論され、さらに N/P 比に依存するカチオン性も寄与していると考えられる。

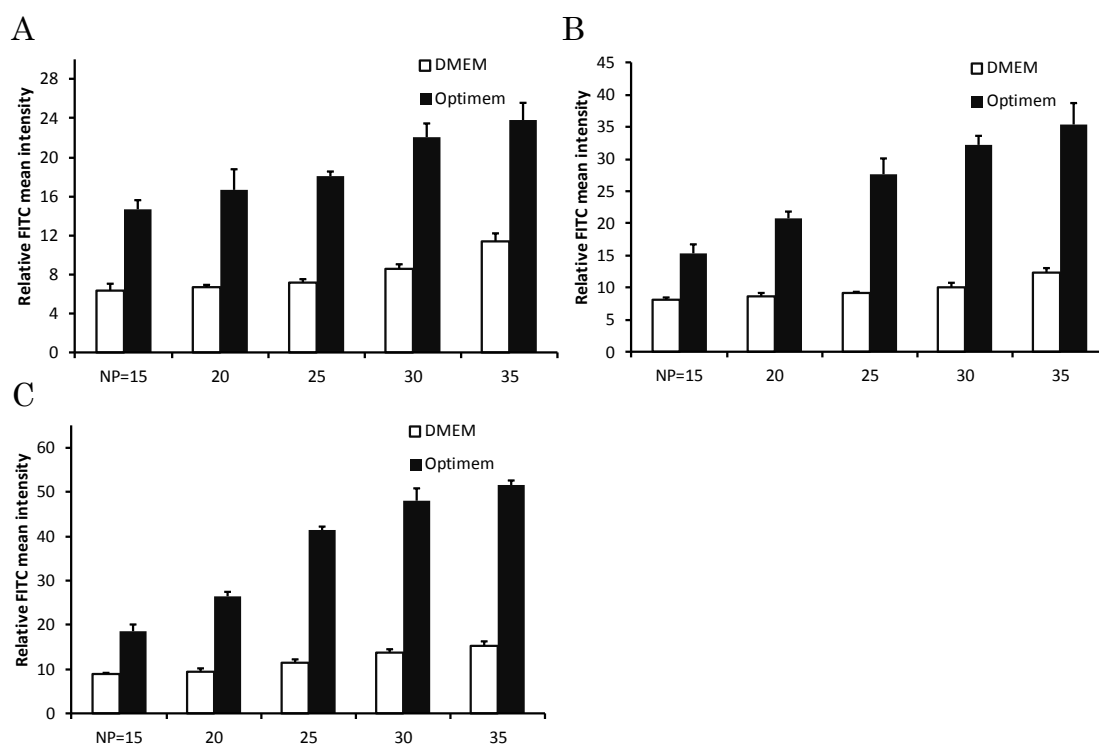


Fig. 33 FACS quantification of the cellular uptake efficiency using SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite.

The composite was prepared with SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ at 13.3% PEG modification extent of amino groups and N/P ratios of 15 - 35. Transfection periods were 4hr (A), 12 hr (B) and 24 hr (C). The transfection condition was the same as that of the microscopic observation experiment. N.T. represents the result of non-treated cells. Control plasmid DNA was labeled with FITC instead of Cy3 for the FACS quantification. The measurement was performed using a FACSCant II with Ex/Em = 488/530 nm, and treated cells were counted with 10000 events. The relative fluorescent mean intensity was calculated compared to that of N.T. data and shown with SD (n = 3).

2-c 蛍光タンパク質 mKO2 をコードしたプラスミド DNA の細胞内発現

前節で SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体が細胞に効率よく取り込まれることが明らかになったので、蛍光タンパク質である mKO2 をコードしたプラスミド DNA を用いて細胞にプラスミド DNA の導入を行いタンパク発現を観察した。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞への導入は、蛍光標識プラスミド DNA を用いた取り込み実験と同様の条件で行った。初めに PEG 修飾率と N/P 比が共に異なる SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体について、細胞導入を行い mKO2 の発現を観察した。次に、13.3%PEG 修飾 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を用いて N/P = 15~35 の範囲でプラスミド DNA との複合体を調製し細胞に取り込ませてタンパク発現を観察した。実験では、4 時間のインキュベーションにより複合体を取り込ませた後、培地を DMEM に交換し、32 時間再インキュベーションすることで蛍光タンパクを発現させて蛍光顕微鏡観察を行った。また、蛍光標識プラスミド DNA を用いた細胞取り込みの評価において、13.3%PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体が FuGENE と同程度の取り込み量を示したことから、培地中の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体量を 75%、50%、25%、10%と変化させた場合についても同様に発現実験を行って、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の導入および発現改善効率について検討を行った。

蛍光タンパク質 mKO2 は発現すると赤い蛍光が観察されるが、実際の結果、当初検討した様々な PEG 修飾率、N/P 比を有する複合体間で発現量にそれほど大きな差は観察されず、分散安定性が悪く凝集が起こる PEG 修飾率が 0%および 4.1%の複合体でもわずかではあるが mKO2 の発現が観察された (Fig. 34)。前節において、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の取り込み量自体には大きな差が観察されたことから、発現量の差が観察されないことは取り込まれたプラスミド DNA 量がタンパク発現に必要な量に対して飽和していることを示唆すると考えられる。そこで、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体量を減少させて同様の実験を行い、mKO2 の発現量の変化を確認した。

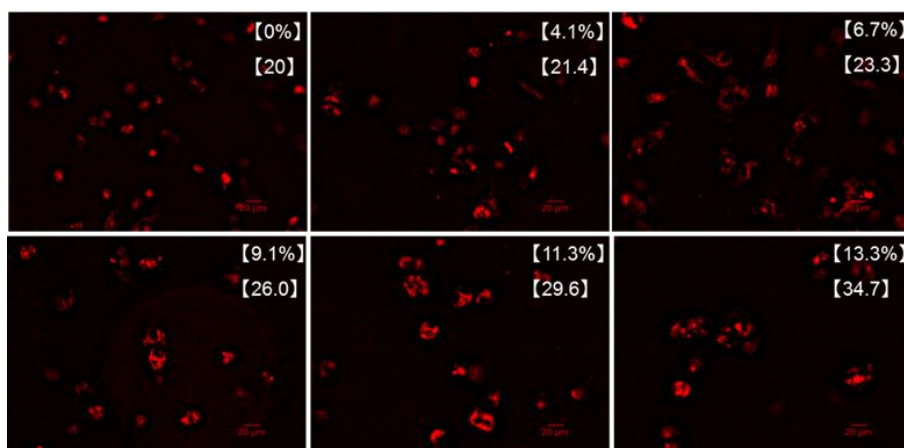


Fig. 34 Fluorescent microscopic observation for the expression of mKO2 fluorescent protein after the transfection using SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite.

The composite was prepared with SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ at various PEG modification extents of amino groups and N/P ratios. The percentages in the figure show the PEG modified amino groups ratio and the numbers indicate N/P ratio. The transfection was performed under the same condition as other experiment, and then treated cells were incubated with new medium for 32 hr. After that, the cells were washed and fixed, and the expression was observed using a Biozero Bz-8000 fluorescence microscope with Ex/Em = 540/605 nm (mKO2 protein, red).

PEG 修飾率が 13.3%である SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体で、N/P = 15 ~ 35 の範囲で SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製し同様の条件で複合体の導入を行った後に mKO2 の発現を観察した。結果は、各 N/P 比ともに大きな差は見られず (Fig. 35)、やはり各 N/P 比の条件下で複合体取り込み量自体が多いため、発現に必要なプラスミド DNA 量が飽和に達し、結果として発現量に大きな差が見られないと考えられた。

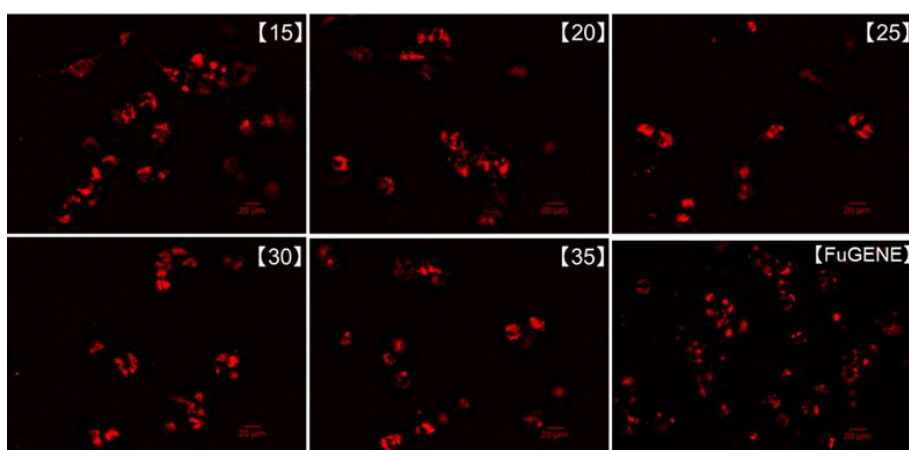


Fig. 35 Fluorescent microscopic observation for the expression of mKO2 fluorescent protein after the transfection using SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA composite.

The composite was prepared with 13.3% PEG modification extent of amino groups and N/P ratio of 15 - 35. The percentages in the figure show the numbers indicate N/P ratio. The transfection was performed under the same condition as other experiment, and then treated cells were incubated with new medium for 32 hr. After that, the cells were washed and fixed, and the expression was observed using a Biozero Bz-8000 fluorescence microscope with Ex/Em = 540/605 nm (mKO2 protein, red).

そこで、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体量を 75%、50%、25%、10%と変化させて同様の実験を行ったところ、本複合体量の減少に応じて発現量の減少が観察されたが、複合体量を 10%まで減少させた時ですえもわずかな発現は観察された (Fig. 36)。本結果からも、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体がプラスミド DNA の優れた遺伝子導入および発現効率を与えることが示唆された。

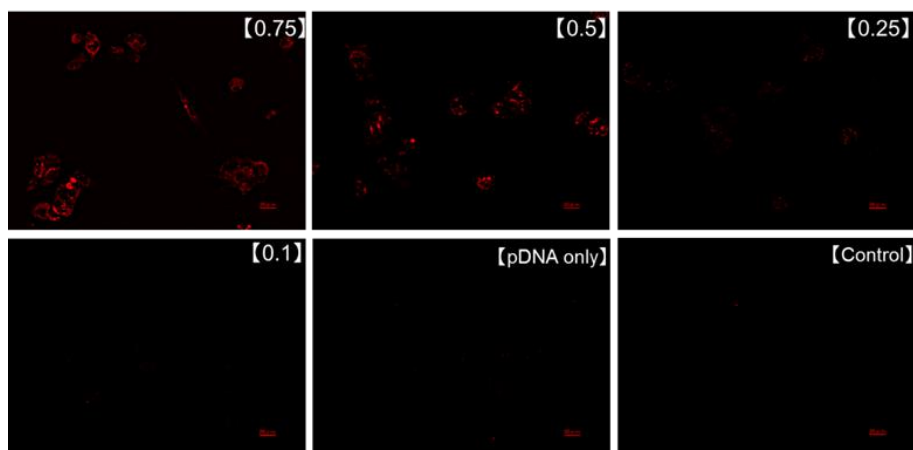


Fig. 36 Fluorescent microscopic observation for the expression of mKO2 fluorescent protein after the transfection using SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA complex.

The amounts of the complex (i.e. pDNA) were designed to 10 - 75% comparing with the other transfection experiment condition. SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ at the 13.3% PEG modification extent of amino groups was tested with N/P ratio of 35. The numbers in the figure show relative amounts of the complex compared to that of the original condition. The transfection was performed under the same condition as other experiment, and then treated cells were incubated with new medium for 32 hr. After that, the cells were washed and fixed, and the expression was observed using a Biozero Bz-8000 fluorescence microscope with Ex/Em = 540/605 nm (mKO2 protein, red).

2-d 考察

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込み量は PEG 修飾率に依存して上昇し、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。PEG 修飾しない SWCNT-(KWKG)₇/pDNA 複合体ではプラスミド DNA 表面と SWCNT-(KWKG)₇ 複合体が十分に複合体を形成すると考えられるが、凝集により細胞取り込みは抑制される。

一方、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体では複合体の形成は劣る可能性があるものの、分散状態で細胞表面と相互作用した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体がエンドサイトーシスによって取り込まれると考えられる。さらに、蛍光タンパク質 mKO2 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、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 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。したがって、PEG 修飾によって SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との相互作用は減弱してコンプレックスの形成が不十分となるが、同時にこのことは細胞取り込みやタンパク発現に対しては利点となると考えられるため、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を利用した遺伝子デリバリーにおいては複合体の特性を総合的に設計する必要があることが示された。条件を選べば、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を利用した遺伝子デリバリーは細胞導入効率とタンパク発現効率の両方に優れ、トランスフェクション試薬である FuGENE を用いた場合と同程度の効果が観察されたことから、今後の展開が大いに期待できるものと考えられる。

第三章 SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂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、SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 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⁶⁹⁻⁷¹と pH 依存的な加水分解による MMC の放出制御^{72, 73}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)₁₂ 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。

一般に、安定に分散した SWCNT は *in vitro* で針状構造とサイズに起因して細胞に良く取り込まれるとともに^{74, 75}、*in vivo* では静脈注射後腫瘍組織に EPR 効果で集積^{76, 77}することが報告されており、SWCNT 複合体に対して抗がん剤を複合化した徐放性キャリアはがん治療に対して有用であると考えられる。また、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体はポリカチオン性であるが、ポリカチオン性のキャリアは、静脈注射後速やかに細網内皮系にトラップされる^{78, 79}とともに糸球体の毛細血管壁の負電荷とも相互作用するために排泄が早い^{80, 81}と考えられる。SWCNT 自体の体内動態に関する情報は十分には得られていないが SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の場合でも血中循環を介したデリバリーは効率が悪いと予想されるので、治療応用を考える場合には、局所投与のキャリアとしての適用が先ず考えられる。この場合は、抗がん剤の全身投与における副作用を軽減でき、かつ投与された腫瘍組織に対して静電的に相互作用することで貯留し抗がん剤が徐放されることで持続的な薬効が得られると予想される。また、がんの転移を考えた時に、リンパ系に移行した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体もリンパ系の組織と相互作用して貯留することで転移に対しても効果を発揮する可能性も考えられる。

そこで本章では、CWKG(KWKG)₆ ペプチドを用いて SWCNT を分散した SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体を調製した後、PEG 修飾に続きシステイン残基のチオール基に対してリンカーを介して MMC を結合させ SWCNT-ペプチド複合体をキャリアとする MMC 複合体を調製した (Fig. 37)。調製した SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体からの MMC の放出を評価するとともに、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞障害性と SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の殺細胞効果を評価した。

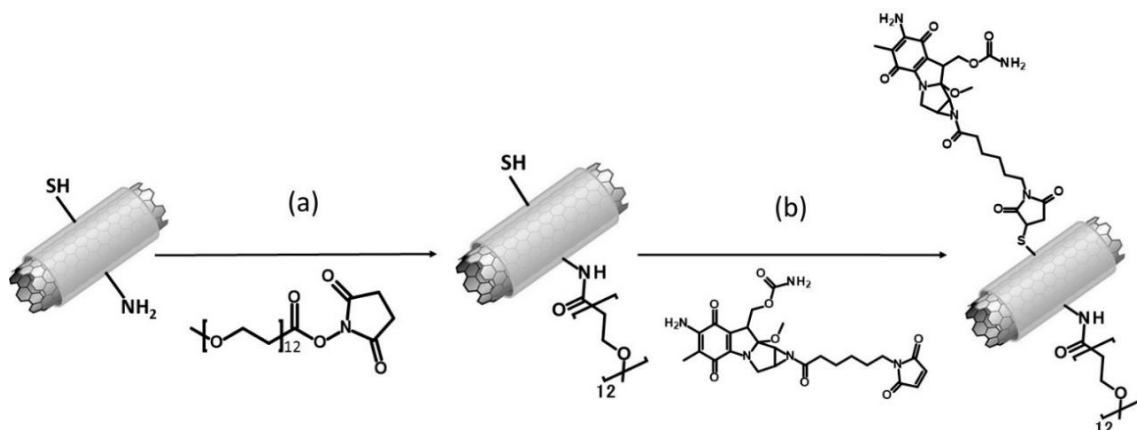


Fig. 37 Schematic illustration of the synthesis of SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker dispersion.

1-a MMC-EMCA-maleimide の合成

MMC を SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体に結合させるため、MMC の反応点であるアジリジン基 ⁷² をスペーサーを介してチオールと反応するマレイミド基に変換することを考え、マレイミド基とカルボキシル基を有する EMCA をリンカーとして MMC のアジリジン基と EMCA のカルボキシル基とを EDC⁸² を用いて縮合させて MMC-EMCA-maleimide を合成し MMC の官能基変換を行った (Fig. 38)。

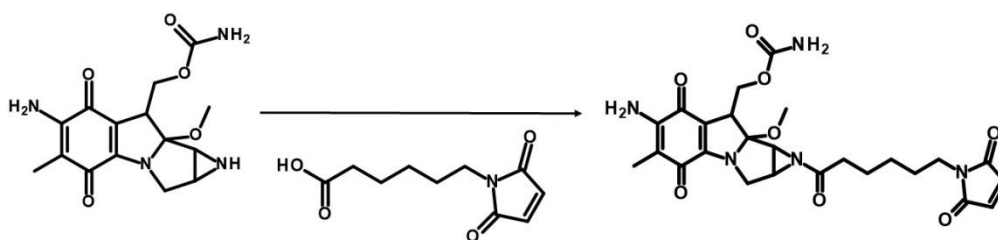


Fig. 38 Schematic illustration of the synthesis of MMC-EMCA-maleimide.

初めに 40 mM の EMCA と 120 mM の EDC を DMF 中で 30 分間反応させて EMCA のカルボキシル基を活性化した。その後、pH 5.5、25 mM MES バッファーを加え、その直後に MMC を反応溶液中に EMCA 濃度に対して 3 分の 1 の濃度になるように添加して 3 時

間反応させた。MMC のアジリジン基と EMCA のカルボキシル基の EDC を用いた縮合は pH 7.0 の中性付近のバッファー中では進行せず、pH 5.5 程度の酸性領域下^{72, 83}で進行することが報告されており、実際に両バッファー中で反応を行ったところ pH 5.5 のバッファー中でのみ反応が進行した。反応後は逆相 HPLC にて、C18-AR II カラム、移動相は 0.1% TFA を含むアセトニトリル濃度が 10% - 70%、20 min の gradient mode の各条件で精製を行った (Fig. 39)。目的の MMC-EMCA-maleimide は保持時間が約 17.5 min のフラクションから分取して MALDI にて分子量を確認後に DMF 中に再溶解した。

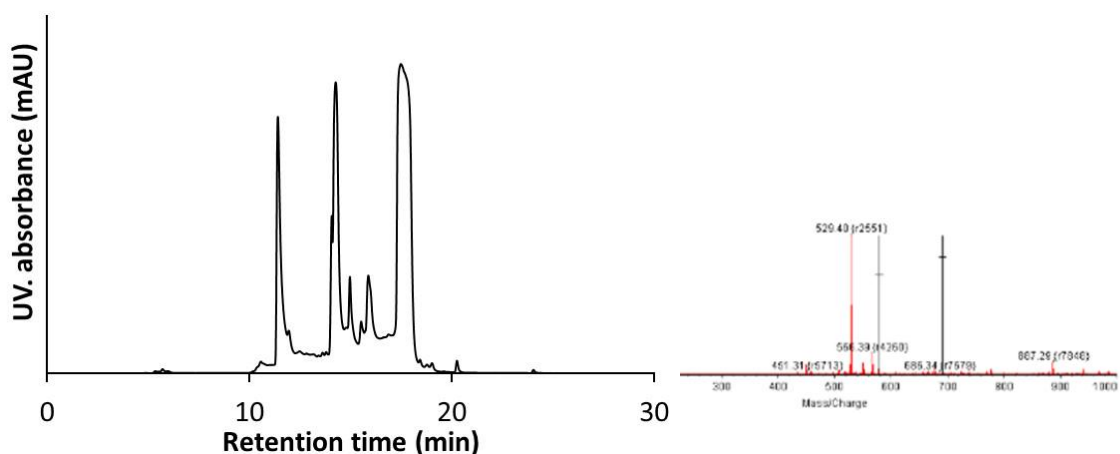


Fig. 39 HPLC purification and mass spectra of MMC-EMCA-maleimide.

MMC-EMCA-maleimide was purified with reverse-phase HPLC with C18-AR II Column, eluted with water and acetonitrile mixture containing 0.1% TFA in a gradient mode from 10% to 70% in acetonitrile concentration percentage for 20 min, and molecular weight of MMC-EMCA-maleimide was analyzed by MALDI-TOFMS.

1-b MMC-EMCA-maleimide の濃度測定

MMC-EMCA-maleimide の濃度測定は、MMC の吸光度とモル吸光係数を利用した測定と、4,4'-dithiodipyridine (4-PDS)を用いた定量法⁸⁴で MMC-EMCA-maleimide のマレイミド基側の定量から行い、結果を比較した。

一般的に、4-PDS はチオール基を有する化合物と反応して 4-Mercaptopyridine を生成する。そして、4-Mercaptopyridine は 324 nm に吸収を持つことから吸収スペクトルとモル吸光係数 $A_{324\text{nm}} = 19,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いてチオール基と反応した 4-PDS の濃度を定量することができる⁸⁴。MMC-EMCA-maleimide を過剰量のシステアミンと反応させた後、反応溶液中に 4-PDS を添加して MMC-EMCA-maleimide と反応しなかったシステアミンの濃度を定量し、MMC-EMCA-maleimide を未添加の場合の結果と比較して MMC-EMCA-maleimide を定量した (Fig. 40)。

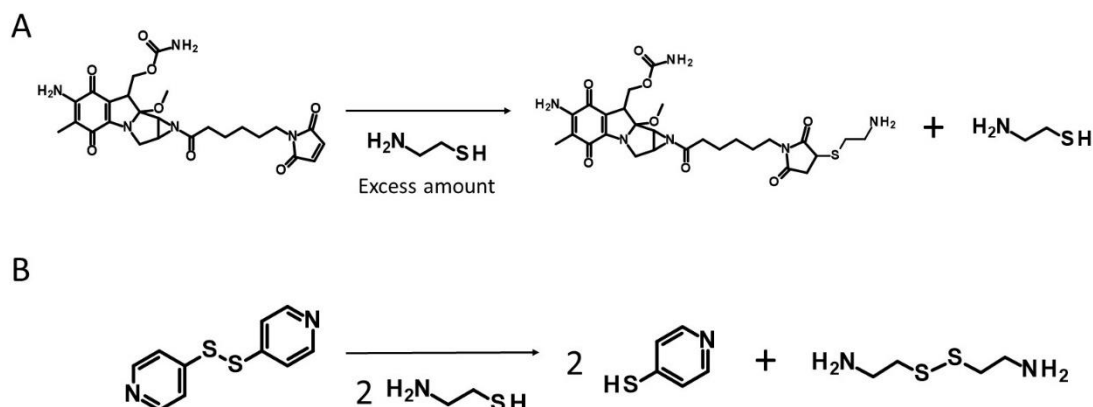


Fig. 40 Schematic illustration of the reaction of MMC-EMCA-maleimide with excess amount of cysteamine (A) and 4-PDS with unreacted residual cysteamine after the reaction between MMC-EMCA-maleimide and excess amount of cysteamine (B).

Concentration of MMC-EMCA-maleimide was determined with the differential of optical absorbance of 4-Mercaptopyridine at 324 nm after the reaction of (A) and following (B).

結果は、MMC の吸光度を利用して定量した濃度と、4-PDS を用い MMC-EMCA-maleimide を定量した結果の差は約 4.5% であり (Fig. 41)、MMC-EMCA-maleimide の 364 nm における MMC の吸収^{85, 86} に対するマレイミド基の吸収の重なりによる影響は無視できる程度に少ないことが明らかとなった。

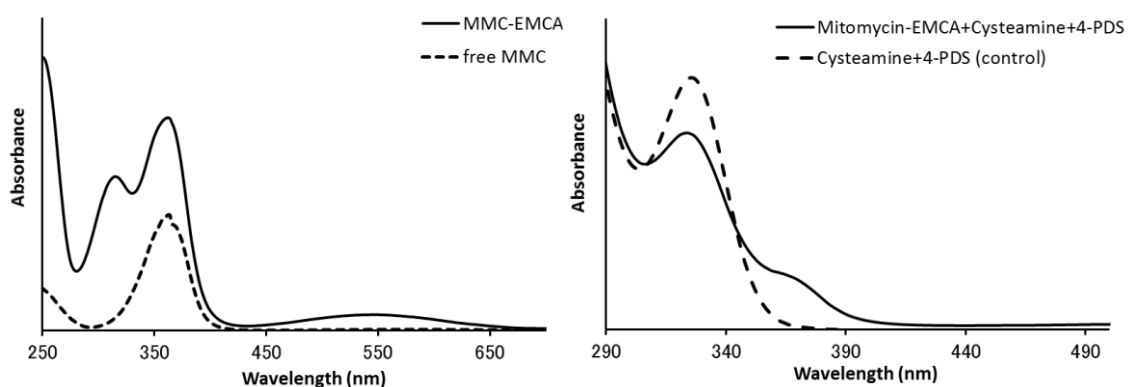


Fig. 41 Absorbance spectra of MMC-EMCA-maleimide and that of free MMC (A), and absorbance spectra of the solution after the reaction between 4-PDS and cysteamine under the presence and the absence of MMC-EMCA-maleimide (B).

In Fig. 46A, both peaks around at 315 nm and 364 nm mainly reflected maleimide group and MMC, respectively. In Fig. 46B, the absorbance around at 324 nm after the reaction between 4-PDS and cysteamine in presence MMC-EMCA-maleimide reduced compared to control solution. Concentration of MMC-EMCA-maleimide was determined with the difference of absorbance at 324 nm and molar extinction coefficient of 4-Mercaptopyridine as a product.

1-c PEG および MMC 修飾した SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体の修飾率の評価

CWKG(KWKG)₆ ペプチドは(KWKG)₇ペプチドと比較して 14 残基のリジンが 13 残基に 1 残基減少しているため、PEG 修飾の反応点であるアミノ基が 1 残基減少した影響を評価するために、第一章と同様に FITC-(PEG)₁₂-NHS を用いた PEG 修飾率の定量を試みた。

PEG 修飾率は、SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体のアミノ基に対して 10% - 50% の FITC-(PEG)₁₂-NHS を添加した時、それぞれ 5.6% - 13.6% のアミノ基が修飾された。また、1 つの CWKG(KWKG)₆ ペプチドに対してはそれぞれ 0.8 - 1.9 個の FITC-(PEG)₁₂ が修飾された (Fig. 42)。したがって、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体と SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体の PEG 修飾率はほぼ同程度であるため CWKG(KWKG)₆ ペプチドに変更したことによる影響は見られなかった。また、SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体の物性も同等であると考えられる。

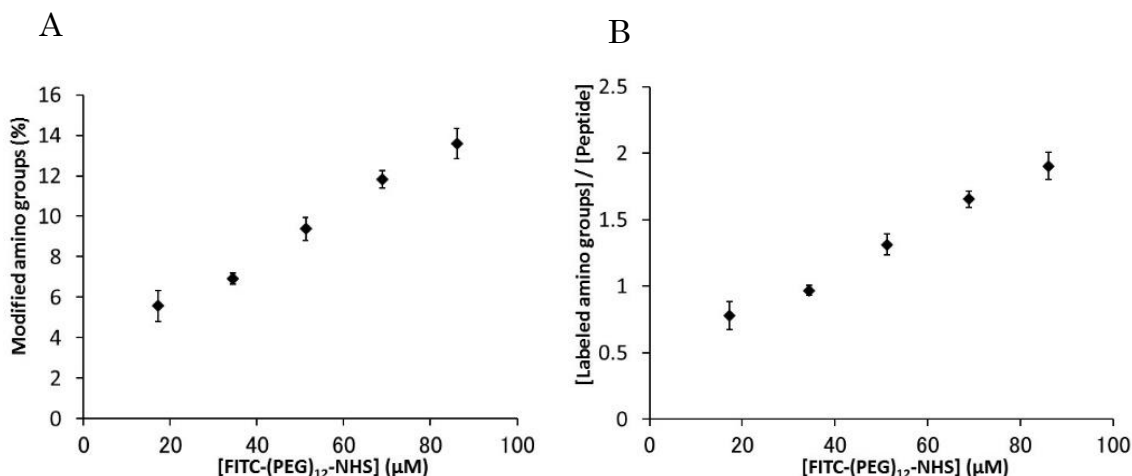


Fig. 42 This results reflect the experiment of determination of PEG modification ratio to SWCNT-CWKG(KWKG)₆.

This figure indicated the PEG modified amino groups extents against amino groups of SWCNT-CWKG(KWKG)₆ (A) and PEG modification ratio to one CWKG(KWKG)₆ peptide (B) with the mean and SD (n = 3).

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の調製は、1 段階目に PEG 修飾、2 段階目に MMC 修飾することで行った。1 段階目の PEG 修飾は第一章と同一条件で行い、遠心による限外ろ過で pH 6.5、25 mM MES バッファーに交換した。これは、チオール基とマレイミド基の反応は中性付近で行われるが、MMC-linker-dextran 誘導体における MMC の加水分解による放出が高 pH 領域で促進されると予想されることから、2 段階目の反応をできる限り酸性側で行うことを考えたものである。MMC-EMCA-maleimide を

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体のチオール基に対して 5 当量添加して 5 時間反応させ、反応後は再び遠心による限外ろ過で pH 5.5、25 mM MES バッファーに交換した。SWCNT 複合体からの MMC の遊離を考慮して pH 5.5 のバッファーで未反応の MMC-EMCA-maleimide を除いて SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の吸収スペクトル測定を行った。364 nm における吸光度より SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体に対する MMC の結合量を定量^{85,86}した結果、PEG 修飾率によらずに 90%以上のチオール基が修飾されたことから、ほぼ全てのチオール基に MMC が結合していると判断して問題ないと考えられる (Fig. 43)。

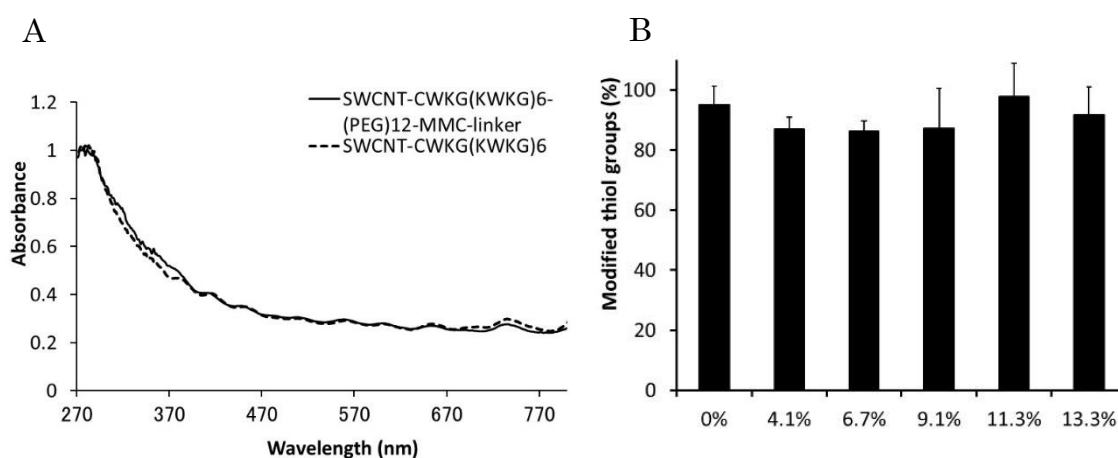


Fig. 43 Absorbance spectrum of SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker (A) and the MMC modified thiol groups ratios of the SWCNT complex with various PEG modification extents (B). The spectrum of SWCNT-CWKG(KWKG)₆ was fitted to that of SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker. MMC modification ratio was calculated with the absorbance at 364 nm and molar extinction coefficient of MMC, and displayed against thiol groups of SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker with the mean and SD (n = 3).

1-d SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体からの MMC の放出

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体からの MMC の遊離の測定は、pH 5.0 - 8.0 の等張バッファー溶液中 37 °C でインキュベートする条件下で行い、その後に SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 分散液を Durapore (PVDF) 0.22 μm membrane filter (ミリポア社製) を用いて遠心ろ過することで SWCNT 複合体を除いて、ろ液の吸収スペクトルから遊離した MMC 量を定量した (Fig. 44)。MMC の放出は一次速度式に従い、高 pH 領域ほど加水分解が速い pH 依存的な放出挙動が確認できた。また、放出の半減期についても MMC-linker-dextran 誘導体の場合と同程度の結果が得られた⁸⁷。

放出された化合物が MMC であることは HPLC 測定によって確認した。13.3%PEG 修飾した SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体を、MMC がすべて放出される条件である pH 8.0 の等張バッファー溶液中で 37 °C で 5 日間インキュベートした後、遠心ろ過で SWCNT 複合体を除き、ろ液について HPLC 測定を行った。MMC 修飾した SWCNT 複合体を調製直後のろ液にはピークが全く現れなかったのに対し、5 日間インキュベートした後のろ液ではフリーの MMC と同じ約 15 分の保持時間の所にピークが現れ放出された化合物が MMC であることが確認できた。また、約 20 分の保持時間の所のピークは放出された MMC が分解した分解物によるピークであると考えられる (Fig. 44)。

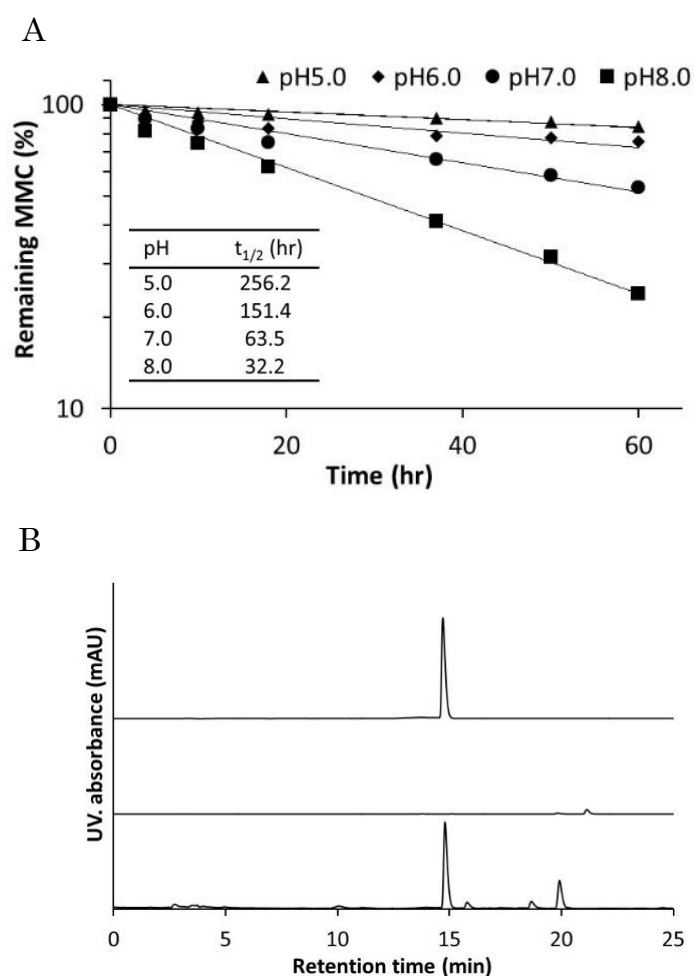


Fig. 44 Remaining MMC after hydrolysis of SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker in various pH condition (A) and HPLC measurement of released compound from the conjugate (B).

The amounts of released MMC were determined with the absorbance at 364 nm after centrifugal filtration in various isotonic buffer at 37 °C. Released compound was checked with reverse-phase HPLC with C18-AR II Column, eluted with water and acetonitrile mixture containing 0.1% TFA in a gradient mode from 10% to 70% in acetonitrile concentration percentage for 20 min.

1-e PEG 修飾した SWCNT 複合体の細胞障害性の評価

SWCNT 複合体を DDS キャリアとして応用するためには、それ自身の細胞障害性が低く生体適合性に富むことが条件となる。そこで、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体および SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞障害性について WST-1 アッセイ法で評価を行った。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体ではポリカチオン性のキャリアであるため、細胞表面との静電的相互作用に由来する細胞毒性や、分散安定性が悪いために生じる SWCNT の凝集物が細胞に対して物理的刺激を引き起こすことによる細胞毒性の発生が予想される^{88・90}。これに対し、PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体では分散安定性の向上などによる細胞毒性の低減が期待できる^{91,92}。そこで、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体と SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体、ならびに SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体の細胞毒性を WST-1 アッセイを用いて評価した。この際、100 µg/ml の非常に濃い SWCNT 濃度の SWCNT 分散液を調製したが、SWCNT 分散液にグルコース溶液を 40 mM となるように添加して凍結乾燥した後に DMEM で再分散させることでこの濃度の SWCNT 含有培地を調製し、培地交換を行うことでアッセイを行った。

PEG 修飾しない SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の細胞障害性は、12.5 µg/ml の低い SWCNT 濃度でも細胞毒性が認められ、高い細胞障害性を有することが明らかとなった (Fig. 45)。これは予想通りにポリカチオン性の SWCNT-(KWKG)₇ 複合体が細胞表面と静電的に相互作用することや凝集した SWCNT による細胞障害性に起因していると考えられる。一方、13.3%PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体は 50 µg/ml の高い SWCNT 濃度において 24 時間後でも顕著な細胞毒性は示さず、PEG 修飾に由来する細胞表面との静電的な相互作用の抑制や分散安定性の向上が細胞障害性の低下に寄与したものと考えられる (Fig. 50)。また、SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体についても、50 µg/ml では 24 時間以降で細胞毒性が見られるようになったが、SWCNT 濃度の減少に従って細胞毒性は低下して 25 µg/ml 以下では顕著な細胞障害性は示さないことが確認できた (Fig. 45)。これらの結果から、PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇ 複合体は、生理的条件下で分散安定性が向上し細胞に良く取り込まれるとともに、細胞障害性も大幅に低減されていることが確認でき、DDS キャリアとしての有用な特性を有していることが明らかとなった。

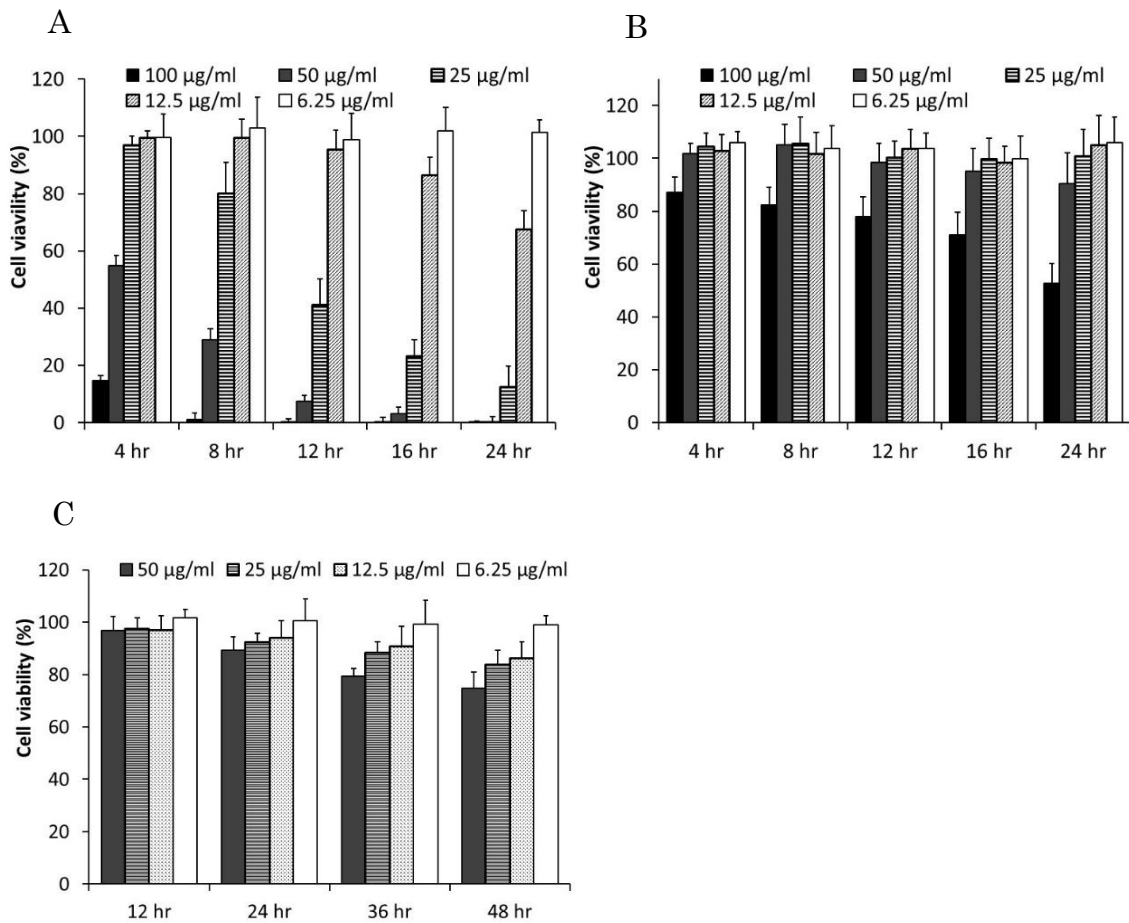


Fig. 45 Cell viability of A549 cells which were treated with SWCNT-(KWKG)₇ (A), SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ (B) and SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ (C), respectively.

The assay was performed with WST-1 assay and the times under each graphs indicate SWCNT treated incubation time. SWCNT concentration was designed at 6.25 – 50 μg/ml in medium.

1-f SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体による殺細胞効果

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の殺細胞効果について WST-1 アッセイ法で検討を行った。MMC⁹³ は free の MMC として放出された後酵素的に還元されて DNA 間に架橋を形成するとともに、好氣的環境下ではフリーラジカルを生成して DNA を切断することによって DNA の複製を阻害し抗がん活性を示す。したがって、複合体に結合した状態の MMC は活性を示さず、放出された MMC のみが活性を示すプロドラッグ⁷² であると考えられることから、本実験では同濃度のフリーの MMC の殺細胞効果と比較することで MMC の徐放特性を含めて SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の殺細胞効果が評価できると考えた。

結果は、同投与量の free の MMC が観察初期から高い殺細胞効果を示したのに対し、13.3%PEG 修飾した SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体では時間の経過に伴って遅れて殺細胞効果が認められ MMC の徐放が活性発現の面からも示唆された (Fig. 46)。本実験では、細胞障害性が低い 13.3%PEG 修飾した SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体を用い、50 µg/ml の SWCNT 濃度で評価したために観察された細胞死は放出された MMC によるものと考えられる。また、活性を示す経路として、SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体が細胞に取り込まれた後に MMC が遊離して活性を示す経路と、培地中で MMC が遊離してフリー体となった MMC が細胞に対して細胞増殖抑制活性を示す 2 つの場合が考えられるが、本実験の範囲では区別は難しい。

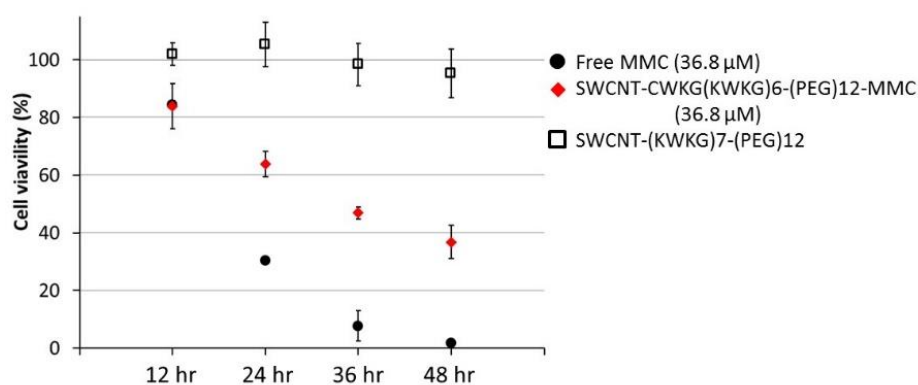


Fig. 46 Antitumor effect against A549 cells which were treated with SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker and free MMC as the same concentration.

The assay was performed with WST-1 assay and the times under the graph indicate SWCNT treated incubation time. The PEG modification extent was 13.3% and SWCNT concentration was designed at 50 µg/ml. The concentration of MMC labeled to SWCNT complex was 36.8 µM.

1-g 考察

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 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 誘導体ではリンカーの電荷によっても放出動態が変化し、カチオン性のリンカーの場合は加水分解が促進されることが報告されている^{72, 83}が、SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の場合は放出が遅く、EMCA は疎水性のリンカーであることを反映したものと考えられる。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^{72, 83}、側鎖⁹⁴、リンカー長⁹⁵、リンカーの電荷^{72, 83}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^{96, 97}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 SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 複合体も生体への適用および動態制御が可能であると考えられる。電荷は体内動態を決定する重要な因子であるため、ペプチドのアミノ酸配列によって投与経路が選択できると予想され、本研究で調製したポリカチオン性の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の場合は、全身投与の場合は細網内皮系にトラップされること^{78, 79}や糸球体血管壁に静電的に相互作用すること^{80, 81}が懸念されるために局所投与が適切であると考えられる。一方で、本研究で調製した SWCNT 複合体の SWCNT のサイズは、Hashida らの過去の報告から平均が約 200 nm 程度¹¹で他の DDS キャリアと同程度のサイズであり、腎排泄が起こる可能性は考えられる。これに対し、ポリアニオン性のペプチドを用いた場合には、臓器移行が遅いために血中滞留性が高まることも考えられる。

また、分散安定性が低い SWCNT や SWCNT の凝集物は細胞毒性を有し⁸⁸⁻⁹⁰、分散安定性に優れた SWCNT は低毒性であることが報告されており^{91, 92}、さらに、SWCNT はサイズが短くなるほど細胞毒性が低下することも報告されている⁹⁸ことから、本研究で調製した SWCNT 複合体は細胞毒性が低いという結果は合理的であると考えられる。この結果から、PEG 修飾によって分散安定化した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 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(KWKG)₇ 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(KWKG)₇ 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(KWKG)₇ ペプチドは SWCNT 表面と多点でトリプトファン残基と π - π 相互作用および疎水性相互作用することで安定な複合体を形成し、相互作用した(KWKG)₇ ペプチドの交換反応が極めて遅いため安定に分散することが判明した。一方、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の生理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 SWCNT-(KWKG)₇ 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。FITC-(PEG)₁₂-NHS を合成して PEG 化試薬の代わりに同一条件で修飾を行い PEG 修飾率を定量した結果、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の全アミノ基量に対して 50%当量の FITC-(PEG)₁₂-NHS を反応させた場合約 13.3%のアミノ基が修飾されることが判明し、本条件で得た PEG 修飾 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体は 24 時間細胞培養培地中で安定に分散することが判明した。次に、細胞取り込みの評価を目的に SWCNT 複合体の BODIPY TMR による蛍光標識を試み、CWKG(KWKG)₆ ペプチドに対する直接標識では SWCNT 表面との疎水性相互作用により励起が不十分となって蛍光が得られないのに対し、PEG 鎖を用いたリンカーを介した標識では PEG 鎖が 12 のリンカー長の場合にフリーの BODIPY TMR と同程度の蛍光強度が得られることが判明した。また、分散安定化のために導入した PEG 修飾は蛍光に影響しないことが確認された。そこで本条件下で、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)₇-(PEG)₁₂ 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 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 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 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 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 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の分散安定性とほぼ同程度であった。また、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の各種物性評価によって、PEG 修飾率に依存して SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体とプラスミド DNA との静電的な相互作用が抑制され、相互作用する SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の交換が早くなることで複合化が不十分になることが判明した。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体と蛍光標識したプラスミド DNA により調製した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 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、最も分散安定性が高い 13.3%PEG 修飾した場合は N/P 比に依存して取り込み量が増加し、N/P 比約 35 ではトランスフェクション試薬である FuGENE と同程度であることが明らかとなった。また、蛍光タンパク質 mKO2 をコードしたプラスミド DNA の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を利用し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-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 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)₆-(PEG)₁₂ を用いた薬物の徐放化

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 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 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体自体の細胞障害性を検討した結果、ポリカチオン性と凝集による高い細胞毒性が認められたが、PEG 修飾を施した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 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。これに対し、SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 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-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 結合体が、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 SWCNT-(KWKG)₇ 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-(KWKG)₇ 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。

謝辞

本研究の推進にあたり、終始多大な御指導、御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 橋田 充 教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御丁寧な助言を賜りました京都大学大学院薬学研究科 山下 富義 准教授、京都大学学際融合教育研究推進センター 樋口 ゆり子 講師に衷心より感謝致します。

さらに、本研究の遂行に向けて基礎から御指導、御助言を賜りました京都大学物質-細胞統合システム拠点 橋田 泰彦 博士 に深く感謝の意を表します。

本研究を行うに当たり、大変御世話になりました京都大学大学院薬学研究科 薬品動態制御学分野の卒業生ならびに在校生の皆様に深謝致します。

最後に、研究生生活を支えて下さった父 秀雄、母 理恵子に心より感謝致します。

実験の部

第一章 実験の部

【1】 試薬

SWCNT は Carbon Nanotechnologies 社から購入した。(KWKG)₇ ペプチドと CWKG(KWKG)₆ ペプチドは Invitrogen 社で合成したものを購入した。Carboxyl-(dodecaethyleneglycol) ethylamine [Carboxyl-(PEG)₁₂-amine, CA(PEG)₁₂], succinimidyl-[(N-methyl)-dodecaethyleneglycol] ester [Methyl-(PEG)₁₂-NHS ester, MS(PEG)₁₂], and succinimidyl-[(N-maleimidopropionamido)-n-ethyleneglycol] ester [Maleimide-(PEG)_n-NHS ester, SM(PEG)_n (n = 2, 4, 6, 8, 12, 24)], EZ-Link® NHS-PEG₁₂-Biotin は Thermo Fisher Scientific 社から購入した。Fluorescein isothiocyanate (FITC)および HPLC グレード品のアセトニトリルはナカライテスク社から購入した。BODIPY TMR C5-maleimide と Opti-MEM® は Invitrogen 社から購入した。Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)は日水製薬株式会社から購入した。牛胎児血清は MP Biochemicals 社から購入した。重水その他の試薬は和光純薬株式会社から購入した。

【2】 (KWKG)₇ペプチドを用いた SWCNT の分散化

ガラス試験管に SWCNT 2 mg を秤量後、(KWKG)₇ペプチド 10 mg と重水 5 ml を加え、超音波発生器 (UD-201 sonicator, Tomy 社製)で超音波を 1 時間照射し SWCNT 分散液を調製した。次に、2 本の遠心管に分け、それぞれに重水 12 ml を加え、超遠心機(Himac CP65 β, 日立社製)で 40000 rpm、150 min にて超遠心し、上清を回収した。上清を 100 kDa molecular cutoff の透析膜 (Spectrum Laboratories 社製)を用いて透析を行い、SWCNT 表面に吸着しなかったフリーの(KWKG)₇ペプチドを除いた。

【3】 SWCNT-(KWKG)₇複合体の SWCNT と(KWKG)₇ペプチド濃度の定量

調製した SWCNT-(KWKG)₇複合体を 5 倍希釈し、紫外可視吸光度計 (UV-1600, 島津製作所製)で 200 nm から 1100 nm までの吸収スペクトル測定を行った。SWCNT 濃度は、808 nm の吸光度とモル吸光係数 $A_{1\text{mg/ml}} = 40.3$ を用いて計算により得た。(KWKG)₇ペプチド濃度は、SWCNT-(KWKG)₇複合体の吸収スペクトルに対して SWCNT-(KFKA)₇複合体の吸収スペクトルを fitting した後に引き算するとともに、280 nm の吸光度とトリプトファンモル吸光係数 $A_{280\text{nm}} = 5,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて計算により得た。

【4】 細胞株

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 (A549)細胞は、European Collection of Cell Cultures 社から購入した。10%FBS、0.15%炭酸水素ナトリウム、100 μg/ml ストレプトマイシン、100

IU/ml ペニシリンを加えた DMEM 中で、37 °C、5%CO₂条件下で培養した。

【5】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価は、細胞が接着したプレートの培地中に添加した後に経時変化を観察することで評価した。12-well プレートに A549 細胞を 1×10^5 個播種して 24 時間培養した後、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を 1 ml の培地中に 15 µg/ml の SWCNT 濃度になるように添加し、37 °C、5% CO₂ 条件下で 24 時間インキュベートして経時変化を観察した。

【6】 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾

SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾はリジン残基のアミノ基に対して行った。両末端に NHS エステル基とメチル基を有し、重合度が 12 である PEG 化試薬 MS(PEG)₁₂ を使用し、pH 8.0、25 mM HEPES バッファー中で、2.5 mM の MS(PEG)₁₂ を全アミノ基量に対して 10%から 50%当量加えて 2 時間反応させ、SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のアミノ基と MS(PEG)₁₂ の NHS エステル基間でアミド結合を形成することで PEG 修飾を行った。反応後、未反応の MS(PEG)₁₂ は、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter 100 kD Devices 遠心式限外ろ過膜 (Merck Millipore 社製)を用いて、3 回バッファー交換を行うことで除いた。

【7】 SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾量の定量

SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾量は、末端に FITC を有する FITC-(PEG)₁₂-NHS を合成し、MS(PEG)₁₂ の代わりに同一条件で PEG 修飾を行って FITC の吸光度とモル吸光係数を用いて定量した。FITC-(PEG)₁₂-NHS の合成に向けて 1 段階目の合成として、両末端にアミノ基とカルボキシル基を有する CA(PEG)₁₂ と FITC を使用し、FITC のイソチオシアネート基と CA(PEG)₁₂ のアミノ基を結合させて FITC-(PEG)₁₂-COOH を合成した。3 mM の FITC と 6.5 mM の CA(PEG)₁₂ を pH 8.0、50 mM HEPES バッファー中で 12 時間反応後、逆相 HPLC にて精製した。HPLC の条件は、C18-AR II COSMOSIL Packed Column (ナカライテスク社製) のカラムを用い、0.1%トリフルオロ酢酸 (TFA)を含むアセトニトリル/水 = 30% - 70%、20 min の gradient mode の移動相条件で行った。目的の合成物は約 13 分のフラクションから分取して凍結乾燥後に N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)中に再溶解した。2 段階目の合成として FITC-(PEG)₁₂-COOH のカルボキシル基に対して NHS エステル化を行った。N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド (DIPCI)と N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS)をカルボキシル基の 5 当量加えて 1.5 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC にて C18-AR II カラム、0.1%TFA を含むアセトニトリル/水 = 10% - 70%、25 min の gradient mode、その後 70%、5 min の isocratic mode の移動相条件で行った。目的の合成物は isocratic mode 時の約 23.5 分のフラクションから分取して凍結乾燥後に

DMF 中に再溶解した。

SWCNT-(KWKG)₇ 複合体のアミノ基に対する FITC-(PEG)₁₂-NHS を用いた PEG 修飾は、MS(PEG)₁₂ を用いた修飾と同一条件で pH 8.0、25 mM HEPES バッファー中で全アミノ基量に対して 10% - 50% 当量加えて 2 時間反応させた。反応後、未反応の FITC-(PEG)₁₂-NHS は 100 kD Micro Float-A-Lyzer Dialysis Device (Spectrum Laboratories 社製) の透析用デバイスを用い、pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で 24 時間透析して除いた。PEG 修飾されたアミノ基の割合は、FITC-(PEG)₁₂ modified SWCNT-(KWKG)₇ 複合体の吸収スペクトルを測定し、FITC の吸光度とのモル吸光係数 $A_{494nm} = 68,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて定量した。

【8】 Biotin-(PEG)₁₂-NHS を用いた PEG 修飾率の測定

FITC の代わりに Biotin を有する PEG 化試薬 Biotin-(PEG)₁₂-NHS を用いて SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対して PEG 修飾を行い Biotin の定量から PEG 修飾率を測定した。PEG 修飾条件は【6】、【7】と同一条件で行った。反応後、未反応の Biotin-(PEG)₁₂-NHS は、【6】と同様に遠心による限外ろ過で除いた。Biotin-(PEG)₁₂ modified SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対して、Sensolyte® Biotin 定量キット (コスモバイオ社) を用いて Biotin を定量し PEG 修飾率を測定した。

【9】 CWKG(KWKG)₆ ペプチドに対する BODIPY TMR 標識

BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ ペプチドの合成は、システイン残基のチオール基に対してマレイミド基を有する BODIPY TMR C5-maleimide を用いて標識を行い、0.02 mM の BODIPY TMR C5-maleimide と 0.17 mM の CWKG(KWKG)₆ ペプチドを pH7.5、20 mM Tris バッファー中で 12 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC にて、C18-AR II カラム、0.1%TFA を含むアセトニトリル/水 = 15% - 70%、60 min の gradient mode の移動相条件で精製を行った。目的の BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ ペプチドは約 26 分のフラクションから分取して凍結乾燥後に -20 °C で保存した。

BODIPY TMR 標識 SWCNT 複合体の調製は、重量比で (KWKG)₇ : BODIPY TMR-CWKG(KWKG)₆ = 50 : 1, 100 : 1 のペプチド混合物で【2】と同一の方法で調製を行うことで得た。蛍光スペクトル測定は、SWCNT の散乱光等の影響を防止するため SWCNT 濃度を 1 µg/ml に希釈し、FluoroMax-4 spectrofluorometer (堀場製作所社製) で 544 nm の励起光で測定をした。そして、フリーの同濃度の BODIPY TMR の蛍光強度を 1 として比較した。

【10】 BODIPY TMR 標識した SWCNT-ペプチド複合体の調製

【9】では先に BODIPY TMR 標識したペプチドを合成した後にそのペプチドを用いて SWCNT を分散することで調製したが、一方で SWCNT-ペプチド複合体を先に調製した

後で BODIPY TMR 標識する方法も行った。SWCNT-ペプチド複合体は、重量比で (KWKG)₇:CWKG(KWKG)₆ = 10:1 のペプチド混合物で【2】と同一の方法で調製した。そして、チオール基に対して PEG 鎖によるリンカーを介して BODIPY TMR 標識を行った。BODIPY TMR-(PEG)_n 標識 SWCNT-ペプチド複合体の調製は 3 段階の合成により行った。リンカーは SM(PEG)_n (n = 2, 4, 6, 8, 12, 24) を用い、様々なリンカー長を有する BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を合成して SWCNT-ペプチド複合体に対して標識した。

1 段階目の反応は、BODIPY TMR C5-maleimide のマレイミド基に対して 2-mercaptoethylamine (システアミン) を付加してマレイミド基からアミノ基に官能基変換した。0.14 mM の BODIPY TMR C5-maleimide と 1.4 mM のシステアミンを pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で 5 時間反応させ BODIPY TMR-NH₂ を合成した。反応後、逆相 HPLC にて、C18-AR II カラム、0.1% TFA を含むアセトニトリル/水 = 30% - 70%、30 min の gradient mode の移動相条件で精製した。目的の BODIPY TMR-NH₂ は、約 19.5 分のフラクションから分取し凍結乾燥後に DMF 中に再溶解した。2 段階目の反応は、SM(PEG)_n を結合させ BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を合成した。0.3 mM の BODIPY TMR-NH₂ に対して triethylamine (TEA) を同等量加えて 30 分間反応させアミノ基を脱プロトン化した。そこに、両末端にマレイミド基と NHS エステル基を有する SM(PEG)_n をアミノ基に対して同等量加えて 24 時間反応させ、BODIPY TMR-NH₂ のアミノ基と SM(PEG)_n の NHS エステル基間で縮合させ BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を合成した。反応後、pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で SWCNT-ペプチド複合体のチオール基に対して 3 当量の BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide を添加して 5 時間反応させ BODIPY TMR-(PEG)_n 修飾 SWCNT-ペプチド複合体を調製した。調製後、未反応の BODIPY TMR-(PEG)_n-maleimide は、透析用デバイス 100 kD Micro Float-A-Lyzer Dialysis Device を用いて pH 7.5、20 mM Tris バッファー中で 24 時間透析して除いた。透析後、UV-1600 紫外可視吸光度計で BODIPY TMR-(PEG)_n 修飾 SWCNT-ペプチド複合体の吸収スペクトル測定を行い、修飾率は BODIPY TMR の吸光度とモル吸光係数 $A_{544nm} = 61,400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて定量した。また、蛍光スペクトルは測定、SWCNT 濃度を 1 $\mu\text{g/ml}$ に希釈して FluoroMax-4 spectrofluorometer で 544 nm の励起光で測定をした。そして、フリーの同濃度の BODIPY TMR の蛍光強度を 1 として比較した。

加えて、SWCNT-ペプチド複合体の分散安定性を向上させるために【6】と同一の方法で PEG 修飾を行うことで (PEG)₁₂ 修飾を施した SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂ 複合体に対しても BODIPY TMR 標識を行い同様の検討をした。リンカー長は PEG 鎖が 12 の SM(PEG)₁₂ を使用して SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体を調製した。蛍光強度は (PEG)₁₂ 修飾を行わない SWCNT-ペプチド-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体の蛍光強度を 1 として比較した。

【11】 SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体の細胞取り込みの観察

SWCNT 複合体の細胞取り込みは、【10】の方法で調製した SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体を細胞にインキュベートした後蛍光顕微鏡で観察した。A549 細胞を grass bottom dish (松浪硝子社製) に 5×10^4 個播種して 24 時間接着させた後、SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体を SWCNT 濃度が $15 \mu\text{g/ml}$ になるように Opti-MEM 中に分散させ、培地交換後に 4、24 時間それぞれインキュベートして取り込ませた。その後、細胞は PBS で 3 回 wash し、4%PFA で固定した。蛍光顕微鏡観察は、Biozero Bz-8000 (キーエンス社製) を使用し、Ex/Em = 540/605 nm (BODIPY TMR, red) にて観察した。

【12】 SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体の取り込み量の定量

細胞取り込み量は、A549 細胞を 24-well プレートに 1×10^5 個播種して 24 時間接着させ、SWCNT-ペプチド-(PEG)₁₂-BODIPY TMR-PEG₁₂ linker 複合体を SWCNT 濃度が $15 \mu\text{g/ml}$ になるように Opti-MEM に分散させ、培地交換後に 4、12、24 時間それぞれ細胞にインキュベートして取り込ませた。その後、細胞を PBS で 3 回 wash してトリプシン処理にて細胞を回収し、FACSCant II (BD biosciences 社製) を用いて FACS 測定を行った。検出は Ex/Em = 488/585 nm、10000 event で行い、それぞれのヒストグラムの平均蛍光強度は、SWCNT 未処理の細胞群の平均蛍光強度を引いた値で比較した。

第 2 章 実験の部

【1】 試薬

SWCNT、(KWKG)₇ ペプチド、MS(PEG)₁₂、その他細胞培養関連の試薬は第一章と同一のものを使用した。Label IT Plasmid Delivery Control は Mirusbio 社から購入した。FuGENE HD transfection reagent は Promega 社から購入した。Vectashield with DAPI は Vector Laboratories 社から購入した。その他の試薬は和光純薬株式会社およびナカライテスク株式会社から購入した。

【2】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の調製

SWCNT-(KWKG)₇ 複合体に対する PEG 修飾は第一章【6】と同一の方法で行い、容量は反応溶液中の MS(PEG)₁₂ が 100% アミノ基と反応すると仮定した上で $0.5 \mu\text{g}$ のプラスミド DNA と SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体を用いて複合化する際、N/P 比が 20 になる容量に設定した。この調製法では、反応溶液中の MS(PEG)₁₂ は 100% 反応しないため、実際

の N/P 比は 20 から上方にずれた値となる。N/P 比を揃えた複合体を調製する場合は、PEG 修飾後に N/P 比が 20 となるように SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 分散液の容量を調整することで形成した。

【3】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞培養培地中での分散安定性の評価

SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞培養培地中における分散安定性は、第一章【5】と同様、調製した複合体を細胞が接着したプレートの培地中に添加した後の経時変化を観察することで評価した。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は【2】の方法で 1.5 μg のプラスミド DNA を用いて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製した。培地で 1 ml に希釈後、細胞が接着した 12-well プレート中に培地交換しインキュベート後の経時変化を観察した。様々な PEG 修飾率と N/P 比を有する複合体、N/P = 20 で揃えた複合体、PEG 修飾率が 0%ならびに 13.3%の複合体をそれぞれ調製して分散安定性を評価した。

【4】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のゼータ電位測定

【2】の方法で調製した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を SWCNT 濃度が揃うように pH 7.0、20 mM HEPES バッファーで希釈し、Malvern Nano-ZS instrument (Malvern Instruments 社製)にてゼータ電位を測定した。

【5】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のアガロースゲル電気泳動

【2】の方法で調製した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体をプラスミド DNA のリン酸基の濃度が等しくなるように希釈した。18 μl の SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体と 2 μl の Takara 10× Loading Buffer とを混合し、1% w/v agarose and Tris-Acetic acid-EDTA (TAE) gel の各レーンに 20 μl アプライした。70 V で 30 分泳動後、0.2 μg/ml の EtBr 溶液に 30 分浸して Las 4000 imaging system (富士フィルム社製)で観察した。

【6】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の EtBr 溶液中での蛍光測定

【2】の方法で調製した 0.5 μg プラスミド DNA 含有 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を SWCNT による散乱光等の影響を除くため 0.4 μg/ml EtBr 溶液 2 ml 中に希釈し蛍光スペクトル測定した。測定は FluoroMax-4 spectrofluorometer を使用して 510 nm の励起光で行い、蛍光強度は 610 nm 付近の蛍光の極大値を用いて評価した。相対蛍光強度は 0.5 μg のフリーのプラスミド DNA における蛍光強度を 1 として比較した。各蛍光強度は、ブランクとしての EtBr 溶液の蛍光強度を引いた値を使用した。相対蛍光強度は以下の計算式に従って計算した。

$$\text{Relative fluorescent intensity} = (\text{Em}_{\text{complex}} - \text{Em}_{\text{blank}}) / (\text{Em}_{\text{pDNA}} - \text{Em}_{\text{blank}})$$

【7】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込みの観察

Cy3 ラベルされたコントロールプラスミド DNA 0.5 μ g を用い【2】の方法で SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製し、細胞にインキュベートした後に蛍光顕微鏡を行った。13.3%PEG 修飾した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂分散液の容量を調整して N/P = 15 – 35 で調製した。A549 細胞を grass bottom dish に 5×10^4 個播種して 24 時間接着させ、SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体のプラスミド DNA 濃度が揃うように Opti-MEM 中に分散し、培地交換して 4 時間インキュベートした。その後、細胞は PBS で 3 回 wash、4%PFA で固定し、Vectashield with DAPI (Vector Laboratories 社製)で封入した。蛍光顕微鏡観察は、Biozero Bz-8000 を使用し、Ex/Em = 470/535 nm (DAPI, blue)、Ex/Em = 540/605 nm (Cy3, red)にて観察した。

【8】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体の細胞取り込み量の FACS による定量

細胞取り込みは【7】と同一条件で 4、12、24 時間それぞれインキュベートし、その後細胞を PBS で 3 回 wash してトリプシン処理にて細胞を回収し、FACSCant II を使用して FACS 測定を行った。FITC 標識されたコントロールプラスミド DNA を用い、検出は Ex/Em = 488/530 nm、10000 event で行った。相対蛍光強度はそれぞれのヒストグラムの平均強度を使い、SWCNT 未処理の細胞群を 1 として比較した。

【9】 蛍光タンパク質 mKO2 をコードしたプラスミド DNA の細胞内発現

蛍光タンパク質 mKO2 をコードしたプラスミド DNA を用いて SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を調製し、【7】と同一条件で遺伝子導入を行って mKO2 の発現を蛍光顕微鏡で観察した。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体は様々な PEG 修飾率と N/P 比を有する複合体および 13.3%PEG 修飾し N/P = 15 – 35 で調製した複合体を調製して行った。また、13.3%PEG 修飾した複合体で、複合体量を 75%、50%、25%、10%にそれぞれ希釈した検討も行った。SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂/pDNA 複合体を細胞に 4 時間取り込ませた後、細胞を PBS で 3 回 wash し、DMEM に交換してさらに 32 時間インキュベートすることで取り込まれたプラスミド DNA を発現させた。そして、細胞を 4%PFA で固定し、Biozero Bz-8000 を使用して Ex/Em = 540/605 nm (mKO2 protein, red)にて観察した。

第 3 章 実験の部

【1】 試薬

SWCNT、(KWKG)₇ ペプチド、CWKG(KWKG)₆ ペプチド、CA(PEG)₁₂、MS(PEG)₁₂、FITC、その他細胞培養関連の試薬は第一章と同一のものを使用した。N-ε-Maleimidocaproic acid (EMCA)は Thermo Fisher Scientific 社から購入した。WST-1

reagent はタカラバイオ株式会社から購入した。Mitomycin C (MMC) と他の試薬は和光純薬株式会社から購入した。

【2】 SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体の調製

CWKG(KWKG)₆ ペプチド 10 mg を用いて第一章【2】 と同一の条件で SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体を調製した。

【3】 MMC-EMCA-maleimide の合成

MMC を SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体に修飾するため、両末端にマレイミド基とカルボキシル基を有する EMCA をリンカーとして結合した MMC-EMCA-maleimide を合成し、MMC のアジリジン基をマレイミド基に官能基変換した。合成は MMC のアジリジン基と EMCA のカルボキシル基とを 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, hydrochloride (EDC) で縮合させた。始めに、40 mM の EMCA と 120 mM の EDC を DMF 中で 30 分間反応させ EMCA のカルボキシル基を活性化した後、pH 5.5、25 mM MES バッファーを加えた。直後に MMC を EMCA に対して 30% 当量添加して 3 時間反応させた。反応後、逆相 HPLC にて、C18-AR II カラム、0.1% TFA を含むアセトニトリル/水 = 10% - 70%、20 min の gradient mode の移動相条件で精製した。目的の MMC-EMCA-maleimide は約 17.5 分のフラクションから分取し凍結乾燥後に DMF 中に再溶解した。

【4】 MMC-EMCA-maleimide の濃度測定

一般的に、4,4'-Dithiodipyridine (4-PDS) はチオール基を有する化合物と反応して 4-Mercaptopyridine を生成し、4-Mercaptopyridine の 324 nm における吸光度とモル吸光係数 $A_{324\text{nm}} = 19,800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いてチオール基の定量ができる。そこで、MMC-EMCA-maleimide の濃度測定に 4-PDS を使用したチオール基の定量法を応用した。MMC-EMCA-maleimide を過剰量のシステアミンと反応させた後、4-PDS を添加して未反応のシステアミンと反応させた場合、MMC-EMCA-maleimide 未含有の同濃度のシステアミンと 4-PDS のみのコントロール溶液と比較して MMC-EMCA-maleimide とシステアミンが反応する分だけチオール基が減少し 324 nm の吸光度は減少するため、その差から MMC-EMCA-maleimide の濃度を測定した。1 μl の MMC-EMCA-maleimide を pH 7.5、25 mM Tris バッファーで 1000 μl に希釈し、1.5 mM のシステアミン 100 μl を添加し 1 時間反応させた。その後、0.7 mM の 4-PDS を 1100 μl 添加しさらに 1 時間反応させた。そして、UV-1600 紫外可視吸光度計で吸収スペクトルを測定し、324 nm におけるコントロール溶液との吸光度の差と 4-Mercaptopyridine のモル吸光係数を用いて測定した。

【5】 SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体に対する PEG 修飾率の定量

SWCNT-CWKG(KWKG)₆ 複合体に対して第一章【6】、【7】 と同一条件で PEG 修飾およ

び修飾率の定量を行った。

【6】 SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の調製

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体は、1段階目に PEG 修飾、2段階目に MMC 修飾することで調製した。1段階目の PEG 修飾は第一章【6】と同一条件で行い、pH 6.5、25 mM MES バッファーに交換した。その後、MMC-EMCA-maleimide を SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体のチオール基に対して 5 当量添加して 5 時間反応させた。反応後、再び遠心による限外ろ過で pH 5.5、25 mM MES バッファーに交換した。そして、UV-1600 紫外可視吸光光度計で吸収スペクトルを測定し、364 nm における MMC の吸光度とモル吸光係数 $A_{364nm} = 22,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて MMC の修飾量を定量した。

【7】 SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体からの MMC の放出

SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体を【6】の方法で調製後、遠心による限外ろ過で各種塩化ナトリウムで等張にした pH 5.0 酢酸バッファー、pH 6.0 MES バッファー、pH 7.0 および pH 8.0 HEPES バッファーに交換した。その後、37 °C でインキュベート後に Durapore (PVDF) 0.22 μm membrane filter (ミリポア社製) で遠心ろ過を行い SWCNT 複合体を除き、UV-1600 紫外可視吸光光度計でろ液の吸収スペクトルを測定し MMC の吸光度とモル吸光係数を用いて MMC の放出量を定量した。また、放出された化合物は、SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体を pH 8.0 HEPES バッファー中で 5 日間インキュベート後、遠心ろ過によって SWCNT 複合体を除いたろ液を HPLC 測定することで評価した。逆相 HPLC にて、C18-AR II カラム、0.1%TFA を含むアセトニトリル/水 = 10% - 70%、20 min の gradient mode の移動相条件で測定を行い、free の MMC のピークと比較した。

【8】 SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞障害性の評価

キャリアである SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体の細胞障害性を WST-1 アッセイ法によって評価した。SWCNT-(KWKG)₇ 複合体と PEG 修飾を施した SWCNT-(KWKG)₇-(PEG)₁₂ 複合体、ならびに SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂ 複合体について評価した。A549 細胞を 96-well プレートに 3×10^3 個播種して 24 時間接着させた後、6.25 - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の SWCNT 濃度の SWCNT 複合体含有培地に交換し 12 - 48 時間インキュベートした後に WST-1 アッセイを行った。濃縮した SWCNT 複合体含有培地は、SWCNT 分散液にグルコース溶液を 40 mM となるように添加し、凍結乾燥後に培地で再分散させることで調製した。その後、細胞を PBS で 3 回 wash し、200 μl の DMEM と 20 μl の WST-1 アッセイ溶液を加えて再び 4 時間インキュベートし、96-well プレートを Eon Microplate Spectrophotometer (BioTek 社製) のプレートリーダーで 430 nm の吸光度を測定して細

胞生存率は以下の式によって計算した。

$$\text{Cell viability (\%)} = (\text{Abs}_{\text{sample}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) / (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{blank}}) \times 100$$

【9】 SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体の殺細胞効果

13.3%PEG 修飾した SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体を【6】の方法によって調製し、2段階目の MMC 修飾後は未反応の MMC-EMCA-maleimide を 100 kDa molecular cutoff の透析膜を用いて透析で除いた。そして、【8】の方法で濃縮した SWCNT-CWKG(KWKG)₆-(PEG)₁₂-MMC-linker 複合体含有培地を調製し、50 μg/ml の SWCNT 濃度で細胞にインキュベートした後、殺細胞効果は【8】と同一の方法で WST-1 アッセイで評価した。また、SWCNT 複合体に修飾された MMC と同濃度のフリーの MMC の殺細胞効果も同様に評価した。

引用文献

- [1] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354 (1991) 56-58.
- [2] S. Iijima, Carbon nanotubes: past, present, and future. *Physica. B* 323 (2002) 1-5.
- [3] Z. Liu, S. Tabakman, K. Welsher, and H. Dai, Carbon nanotubes in biology and medicine: in vitro and in vivo detection, imaging and drug delivery. *Nano Res.* 2 (2009) 85-120.
- [4] N.W.S. Kam, M. O'Connell, J.A. Wisdom, and H. Dai, Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 11600–11605.
- [5] K. Butes, K. Kostarelos, Carbon nanotubes as vectors for gene therapy: past achievement, present challenges and future goals. *Adv. Drug Delivery Rev.* 65 (2013) 2023-2033.
- [6] D. Pantarotto, J.P. Briand, M. Prato, A. Bianco, Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes. *Chem. Commun.* (2004) 16-17.
- [7] K. Kostarelos, L. Lacerda, G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Luangsivilay, S. Godefroy, D. Pantarotto, J.P. Briand, S. Muller, M. Prato, A. Bianco, Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type. *Nature Nanotech.* 2 (2007) 108-113.
- [8] Y. Hashida, H. Tanaka, S. Zhou, S. Kawakami, F. Yamashita, T. Murakami, T. Umeyama, H. Imahori, M. hashida, Photothermal ablation of tumor cells using a single-walled carbon nanotube-peptide composite. *J. Control. Release* 173 (2014) 59-66.
- [9] S. Zhou, Y. Hashida, S. Kawakami, J. Mihara, T. Umeyama, H. Imahori, T. Murakami, F. Yamashita, M. Hashida, Preparation of immunostimulatory single-walled carbon nanotube/CpG DNA complexes and evaluation of their potential in cancer immunotherapy. *Int. J. Pharm.* 471 (2014) 214-223.
- [10] T. Murakami, H. Nakatsuji, M. Inada, Y. Matoba, T. Umeyama, M. Tsujimoto, S. Isoda, M. Hashida, H. Imahori, Photodynamic and photothermal effects of semiconducting and metallic-enriched single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 134 (2012) 17862-17865.
- [11] Y. Hashida, T. Umeyama, J. Mihara, H. Imahori, M. Tsujimoto, S. Isoda, M. Takano, M. Hashida, Development of a novel composite material with carbon nanotubes assisted by self-assembled peptides designed in conjunction with β -sheet formation. *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3398-3412.

- [12] D. Tasis, N. Tagmatarchis, V. Georgakilas M. Prato, Soluble carbon nanotubes. *Chem. Eur. J.* 9 (2003) 4000-4008.
- [13] I. Kumar, S. Rana, J.W. Cho, Cycloaddition reactions: a controlled approach for carbon nanotube functionalization. *Chem. Eur. J.* 17 (2011) 11092-11101.
- [14] T. Fujigaya, N. Nakashima, Methodology for homogeneous dispersion of single-walled carbon nanotubes by physical modification. *Polymer J.* 40 (2008) 577-589.
- [15] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 3712-3718.
- [16] M.J. O'Connell, S.M. Bachilo, C.B. Huffman, V.C. Moore, M.S. Strano, E.H. Haroz, K.L. Rialon, P.J. Boul, W.H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, R.H. Hauge, R.B. Weisman, R.E. Smalley, Band gap fluorescence from individual single-walled carbon nanotubes. *Science* 297 (2002) 593-596.
- [17] V.C. Moore, M.S. Strano, E.H. Haroz, R.H. Hauge, R.E. Smalley, Individually suspended single-walled carbon nanotubes in various surfactants. *Nano Lett.* 3 (2003) 1379-1382.
- [18] Y. Kang, T.A. Taton, Micelle-encapsulated carbon nanotubes: a route to nanotube composites. *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 5650-5651.
- [19] R. Shvartzman-Cohen, Y. Levi-Kalisman, E. Nativ-Roth, R. Yerushalmi-Rozen, Generic approach for dispersing single-walled carbon nanotubes: the strength of a weak interaction. *Langmuir* 20 (2004) 6085-6088.
- [20] I. Cotiuga, F. Picchioni, U.S. Agarwal, D. Wouters, J. Loos, P.J. Lemstra, Block-copolymer-assisted solubilization of carbon nanotubes and exfoliation monitoring through viscosity. *Macromol. Rapid Commun.* 27 (2006) 1073-1078.
- [21] H. Murakami, T. Nomura, N. Nakashima, Noncovalent porphyrin-functionalized single-walled carbon nanotubes in solution and the formation of porphyrin-nanotube nanocomposites. *Chem. Phys. Lett.* 378 (2003) 481-485.
- [22] J.T. Yoo, H. Ozawa, T. Fujigaya, N. Nakashima, Evaluation of affinity of molecules for carbon nanotubes. *Nanoscale* 3 (2011) 2517-2522.
- [23] N. Nakashima, S. Okuzono, H. Murakami, T. Nakai, K. Yoshikawa, DNA dissolves single-walled carbon nanotubes in water. *Chem. Lett.* 32 (2003) 456-457.
- [24] M. Zheng, A. Jagota, E.D. Semke, B.A. Diner, R.S. McLean, S.R. Lustig, R.E. Richardson, N.G. Tassi, DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2 (2003) 338-342.
- [25] H. Maeda, T. Sawa, T. Konno, Mechanism of tumor-targeted delivery of macromolecular drugs including the EPR effect in solid tumor and clinical overview

- of the prototype polymeric drug SMANCS. *J. Control. Release* 74 (2001) 47-61.
- [26] H. Maeda, Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: background and future prospects. *Bioconjugate Chem.* 21 (2010) 797-802.
- [27] Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, H. Dai, Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. *Cancer Res.* 68 (2008) 6652-6660.
- [28] Z. Liu, W. Cai, L. He, N. Nakayama, K. Chen, X. Sun, X. Chen, H. Dai, In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nature Nanotech.* 2 (2007) 47-52.
- [29] A.A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A.A. Sousa, A. Masedunskas, R.D. Leapman, R. Weigert, J.S. Gutkind, J.F. Rusling, Targeted killing of cancer cells in vivo and in vitro with EGF-directed carbon nanotube-based drug delivery. *ACS Nano* 3 (2009) 307-316.
- [30] P. Chakravarty, R. Marches, N.S. Zimmerman, A.D.E. Swafford, P. Bajaj, I.H. Musselman, P. Pantano, R.K. Draper, E.S. Vitetta, Thermal ablation of tumor cells with antibody-functionalized single-walled carbon nanotubes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 8697-8702.
- [31] Z. Liu, X. Li, S.M. Tabakman, K. Jiang, S. Fan, H. Dai, Multiplexed multicolor Raman imaging of live cells with isotopically modified single walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 13540-13541.
- [32] L. Gao, L. Nie, T. Wang, Y. Qin, Z. Guo, D. Yang, X. Yan, Carbon nanotube delivery of the GFP gene into mammalian cells. *ChemBiochem* 7 (2006) 239-242.
- [33] Z. Zhang, X. Yang, Y. Zhang, B. Zeng, S. Wang, T. Zhu, R.B.S. Roden, Y. Chen, R. Yang, Delivery of telomerase reverse transcriptase small interfering RNA in complex with positively charged single-walled carbon nanotubes suppresses tumor growth. *Clin. Cancer Res.* 12 (2006) 4933-4939.
- [34] K.S. Siu, D. Chen, X. Zheng, X. Zhang, N. Johnston, Y. Liu, K. Yuan, J. Koropatnick, E.R. Gillies, W-P Min, Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma. *Biomaterials* 35 (2014) 3435-3442.
- [35] N. Wong, S. Kam, H. Dai, Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 6021-6026.
- [36] S. Tosatti, S.M.D. Paul, A. Askendal, S.V. Vondele, J.A. Hubbell, P. Tengvall, M. Textor, Peptide functionalized poly(L-lysine)-g-poly(ethylene glycol) on titanium: resistance to protein adsorption in full heparinized human blood plasma. *Biomaterials* 24 (2003) 4949-4958.
- [37] S.H. Yoo, M.S. Lewis, Dimerization and tetramerization properties of the C-terminal region of chromogranin A: A thermodynamic analysis. *Biochemistry* 32 (1993) 8816-

8822.

- [38] F-X. Schmid, *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. Encyclopedia Life Science 2001.
- [39] J.F. Lutz, Copper-free azide–alkyne cycloadditions: new insights and perspectives. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 2182-2184.
- [40] X. Ning, J. Guo, M.A. Wolfert, G.J. Boons, Visualizing metabolically labeled glycoconjugates of living cells by copper-free and fast Huisgen cycloadditions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 2253-2255.
- [41] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click chemistry: diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 2004-2021.
- [42] W. Benchouk, S.M. Mekelleche, B. Silvi, M.J. Aurell, L.R. Domingo, Understanding the kinetic solvent effects on the 1,3-dipolar cycloaddition of benzonitrile N-oxide: a DFT study. *J. Phys. Org. Chem.* 24 (2011) 611-618.
- [43] M. Brinkley, A brief survey of methods for preparing protein conjugates with dyes, haptens and crosslinking reagents. *Bioconjugate Chem.* 3 (1992) 2-13.
- [44] M.S.T. Goncalves, Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem. Rev.* 109 (2009) 190-212.
- [45] R. Gassmann, S.L. Kline, A. Carvalho, A. Desai, Analysis of kinetochore assembly and function in *Caenorhabditis elegans* embryos and human cells. *Methods* 41 (2007) 177-189.
- [46] R.P. Haugland, Antibody conjugates for cell biology. *Curr. Protoc. Cell Biol.* (2000).
- [47] H. Maeda, N. Ishida, H. Kawachi, K. Tujimura, Reaction of fluorescein–isothiocyanate with proteins and amino acids. *J. Biochem.* 65 (1969) 777-783.
- [48] J.G. Altin, E.B. Pagler, A one-step procedure for biotinylation and chemical cross-linking of lymphocyte surface and intracellular membrane-associated molecules. *Anal. Biochem.* 222 (1995) 382-387.
- [49] B.P. Duckworth, C.C. Aldrich, Development of a high-throughput fluorescence polarization assay for the discovery of phosphopantetheinyl transferase inhibitors. *Analyt. Biochem.* 403 (2010) 13-19.
- [50] L.D. Hughes, R.J. Rawle, S.G. Boxer, Choose your label wisely: water-soluble fluorophores often interact with lipid bilayers. *PLOS ONE* 2014.
- [51] C.F. Chiu, N. Dementev, E. Borguet, Fluorescence quenching of dyes covalently attached to single-walled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. A* 115 (2011) 9579-9584.
- [52] R. Yang, J. Jin, Y. Chen, N. Shao, H. Kang, Z. Xiao, Z. Tang, Y. Wu, Z. Zhu, W. Tan, Carbon nanotube-quenched fluorescent oligonucleotides: probes that fluoresce upon hybridization. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 8351-8358.

- [53] D.J. Giard, S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik, W.P. Parks, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer. Inst.* 51 (1973) 1417-1423.
- [54] M. Lieber, B. Smith, A. Szakal, W. Nelson-Rees, G.J. Todaro, A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. *Int. J. Cancer* 17 (1976) 62-70.
- [55] P.L. Felgner, T.R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H.W. Chan, M. Wenz, J.P. Northrop, G.M. Ringold, M. Danielsen, Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84 (1987) 7413-7417.
- [56] E. Neumann, M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, P.H. Hofschneider, Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 7 (1982) 841-845.
- [57] N. Kobayashi, T. Kuramoto, K. Yamaoka, M. Hashida, Y. Takakura, Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297 (2001) 853-860.
- [58] B.L. Davidson, E.D. Allen, K.F. Kozarsky, J.M. Wilson, B.J. Roessler, A model system for in vivo gene transfer into the central nervous system using an adenoviral vector. *Nat. Genet.* 3 (1993) 219-223.
- [59] F. Mingozzi, K.A. High, Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat. Rev. Genet.* 12 (2011) 341-355.
- [60] A.K. Varkouhi, M. Scholte, G. Storm, H.J. Haisma, Endosomal escape pathways for delivery of biologicals. *J. Control. Release* 151 (2011) 220-228.
- [61] L. Rajendran, H.J. Knölker, K. Simons, Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9 (2010) 29-42.
- [62] D.J. Glover, H.J. Lipps, D.A. Jans, Towards safe, non-viral therapeutic gene expression in humans. *6* (2005) 299-310.
- [63] M. Yamagata, T. Kawano, K. Shiba, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, Structural advantage of dendritic poly(l-lysine) for gene delivery into cells. *Bioorg. Med. Chem.* 15, 526-532 (2007).
- [64] B. Behnam, W.T. Shier, A.H. Nia, K. Abnous, M. Ramezani, Non-covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes with modified polyethyleneimines for efficient gene delivery. *Int. J. Pharm.* 454 (2013) 204-215.
- [65] A.S. Sawano, H. Kurokawa, T. Morimura, A. Hanyu, H. Hama, H. Osawa, S. Kashiwagi, K. Fukami, T. Miyata, H. Miyoshi, T. Imamura, M. Ogawa, H. Masai, A. Miyawaki, Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle

- progression. *Cell* 132 (2008) 487-498.
- [66] D. Needham, T.J. McLatosh, D.D. Lasic, Repulsive interactions and mechanical stability of polymer-grafted lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1108 (1992) 40-48.
- [67] M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, K. Kataoka, Transfection study using multicellular tumor spheroids for screening non-viral polymeric gene vectors with low cytotoxicity and high transfection efficiencies. *J. Control. Rel.* 121 (2007) 38-48.
- [68] L.B. Jacobsen, S.A. Calvin, K.E. Colvin, M. Wright, FuGENE 6 transfection reagent: the gentle power. *Methods* 33 (2004) 104-112.
- [69] Y. Takakura, R. Atsumi, M. Hashida, H. Sezaki, Development of a novel polymeric prodrug of mitomycin c, mitomycin c-dextran conjugate with anionic charge. II. Disposition and pharmacokinetics following intravenous and intramuscular administration. *Int. J. Pharm.* 37 (1987) 145-154.
- [70] R. Atsumi, K. Endo, T. Kakutani, Y. Takakura, M. Hashida, H. Sezaki, Disposition characteristics of mitomycin c-dextran conjugate in normal and tumor-bearing muscles of rabbits. *Cancer Res.* 47 (1987) 5546-5551.
- [71] A. Noguchi, T. Takahashi, T. Yamaguchi, K. Kitamura, Y. Takakura, M. Hashida, H. Sezaki, Tumor localization and in vivo antitumor activity of the immunoconjugate composed of anti-human colon cancer monoclonal antibody and mitomycin c-dextran conjugate. *Jpn. J. Cancer. Res.* 82 (1991) 219-226.
- [72] M. Hashida, Y. Takakura, S. Matsumoto, H. sasaki, A. Kato, T. Kojima, S. Muranishi, H. Sezaki, Regeneration characteristics of mitomycin c-dextran conjugate in relation to its activity. *Chem. Pharm. Bull.* 31 (1983) 2055-2063.
- [73] S. Matsumoto, A. Yamamoto, Y. Takakura, M. Hashida, N. Tanigawa, H. Sezaki, Cellular interaction and in vitro antitumor activity of mitomycin c-dextran conjugate. *Cancer. Res.* 46 (1986) 4463-4468.
- [74] B. Kang, S. Chang, Y. Dai, D. Yu, D. Chen, Cell response to carbon nanotubes: size-dependent intracellular uptake mechanism and subcellular fate. *Small* 21 (2010) 2362-2366.
- [75] Q. Mu, D.L. Broughton, B. Yan, Endosomal leakage and nuclear translocation of multiwalled carbon nanotubes: developing a model for cell uptake. *Nano Lett.* 9 (2009) 4370-4375.
- [76] K. Welsher, S.P. Sherlock, H. Dai, Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 108 (2011) 8943-8948.

- [77] K. Welsher, Z. Liu, S.P. Sherlock, J.T. Robinson, Z. Chen, D. Daranciang, H. Dai, A route to brightly fluorescent carbon nanotubes for near-infrared imaging in mice. *Nature Nanotech.* 4 (2009) 773-780.
- [78] I. Sugiyama, Y. Sadzuka, Change in the character of liposomes as a drug carrier by modifying various polyethyleneglycol-lipids. *Biol. Pharm. Bull.* 36 (2013) 900-906.
- [79] S-D Li, L. Huang, Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* 5 (2008) 496-504.
- [80] H.G. Rennke, Y. Patel, M.A. Venkatachalam, Glomerular filtration of proteins: Clearance of anionic, neutral, and cationic horseradish peroxidase in the rat. *Kid. Int.* 13 (1978) 278-288.
- [81] B.M. Brenner, T.H. Hostetter, H.D. Humes, Glomerular permselectivity: barrier function based on discrimination of molecular size and charge. *Am. J. Physiol.* 234 (1978) F455-F460.
- [82] H. Ozawa, Reaction of insulin with ethyl glycinate and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide. *Biochemistry* 9 (1970) 2158-2163.
- [83] A. Kato, Y. Takakura, M. Hashida, T. Kimura, H. Sezaki, Physico-chemical and antitumor characteristics of high molecular weight prodrugs of mitomycin c. *Chem. Pharm. Bull.* 30 (1982) 2951-2957.
- [84] D.R. Grassetti, J.F. Murray JR, Determination of sulfhydryl groups with 2, 2'- or 4, 4'-dithiodipyridine. *Arch. Biochem. Biophys.* 119 (1967) 41-49.
- [85] H. Soyeze, E. Schacht, A.D. Marre, Polymeric prodrugs of mitomycin c. *Macromol. Symp.* 103 (1996) 163-176.
- [86] M.M.L. Fiallo, E. Deydier, M. Bracci, A. Garnier-Suillerot, K. Halvorsen, Interaction of transition metal ions with mitomycin c. Solution structure and biological activity of a Pd²⁺-MMC complex. *J. Med. Chem.* 46 (2003) 1683-1689.
- [87] Y. Takakura, M. Kitajima, S. Matsumoto, M. Hashida, H. Sezaki, Development of a novel polymeric prodrug of mitomycin c, mitomycin c-dextran conjugate with anionic charge. I. Physicochemical characteristics and in vivo and in vitro antitumor activities. *Int. J. Pharm.* 37 (1987) 135-143.
- [88] D. Cui, F. Tian, C.S. Ozkan, M. Wang, H. Gao, Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 155 (2005) 73-85.
- [89] C.A. Poland, R. Duffin, I. Kinloch, A. Maynard, W.A.H. Wallace, A. Seaton, V. Stone, S. Brown, W. MacNee, K. Donaldson, Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 423-428.
- [90] Y. Bai, Y. Zhang, J. Zhang, Q. Mu, W. Zhang, E.R. Butch, S.E. Snyder, B. Yan,

- Repeated administrations of carbon nanotubes in male mice cause reversible testis damage without affecting fertility. *Nat. Nanotechnol.* 5 (2010) 683-689.
- [91] Z. Liu, C. Davis, W. Cai, L. He, X. Chen, H. Dai, Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 1410-1415.
- [92] M.L. Schipper, N. Nakayama-Ratchford, C.R. Davis, N.W.S. Kam, P. Chu, Z. Liu, X. Sun, H. Dai, S.S. Gambhir, A pilot toxicology study of single-walled carbon nanotubes in a small sample of mice. *Nat. Nanotechnol.* 3 (2008) 216-221.
- [93] W.T. Bradner, Mitomycin C: a clinical update. *Cancer Treat. Rev.* 27 (2001) 35-50.
- [94] C.F. Roos, S. Matsumoto, Y. Takakura, M. Hashida, H. Sezaki, Physicochemical and antitumor characteristics of some polyamino acid prodrugs of mitomycin c. 22 (1984) 75-87.
- [95] Y. Takakura, S. Matsumoto, M. Hashida, H. Sezaki, Physicochemical properties and antitumor activities of polymeric prodrugs of mitomycin c with different regeneration rates. *J. Control. Release* 10 (1989) 97-105.
- [96] C. Larsen, Dextran prodrugs - structure and stability in relation to therapeutic activity. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 3 (1989) 103-154.
- [97] R. Mehvar, Dextrans for targeted and sustained delivery of therapeutic and imaging agents. *J. Control. Release.* 69 (2001) 1-25.
- [98] H. Isobe, T. Tanaka, R. Maeda, E. Noiri, N. Solin, M. Yudasaka, S. Iijima, E. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Ed.* 37 (1987) 135-143.