

博士論文（要約）

Design of Functionalized Block Copolymers Based on
Poly(oxazoline) with a Lower Critical Solution Temperature
and Their Application to Nucleic Acids Delivery Systems

（下限臨界共溶温度を有するポリオキサゾリンを
基盤とした機能性ブロック共重合体の設計と
核酸送達システムへの展開）

大澤 重仁

様々な疾患の治療に適用可能なことから、遺伝子治療は次世代の医療として脚光を集めている。遺伝子治療は、治療用遺伝子をコードした核酸が疾患部位の細胞に取り込まれ、遺伝子発現を示すことで治療効果を得る。これを達成するためには、生体内で容易に分解されてしまう核酸を、疾患部位までの確に送り届ける運び手が必要である。近年の高分子化学・高分子合成技術の進歩は、核酸の運び手としてポリプレックスミセル(PMs)の構築を可能とした。PMsは分子量が精密に制御された親水性連鎖-カチオン性連鎖からなるブロック共重合体と、負電荷を持つ治療用核酸との自己会合によって形成され、内核に核酸とポリカチオンの会合体を持ち、親水性鎖が外殻として覆う構造をとる。PMsは、核酸単体と比べ、細胞に対する遺伝子発現性、また生体内での血中滞留性といった機能が格段に向上しているため、核酸の運び手として適切な形態であると考えられる。しかしながら、PMsの実用化のためには、遺伝子発現効率が未だ不十分であり、さらなる改良が必要である。生体内においてPMsの遺伝子発現効率をさらに向上させるためには、生体内環境におけるPMs構造のさらなる安定化をまず達成し、続いて疾患部位選択的に遺伝子発現性が向上する設計が必要となる。これらの課題を解決するためには、PMsを構築する高分子材料に更なる機能性を付与することが重要である。本研究では下限臨界共溶温度(LCST)を有するポリオキサゾリン(POx)をPMsの構築材料として着目し、上述の課題解決を試みた。

POxはオキサゾリン(Ox)のカチオン性開環重合で得られる高分子材料である。POxの物性はその側鎖構造によって制御することが可能である。例えば側鎖構造がメチルやエチルのものは親水性を示すことが知られており、また最近では、側鎖構造が*n*-プロピルやイソプロピルのPOxが生体温度付近にLCSTを持つことが見出されている。これら興味深い物性が発見されたことから、POxは生体材料として有用な高分子と認識され、POx合成法についても最適化が進められている。Parkらは低温重合法の発見により、分子量分布が1.01と、極めて精密なPOx分子量の制御を達成している。親水性、温度応答性といった機能が明らかとなったこと、また精密合成法が確立されたことから、POxはPMsの設計に用いる高分子としての必要性を満たしていると考えられ、新規機能性PMs構築の可能性を秘めている。

本研究では、第一に、POxのLCSTを利用してPMsの生体内での安定性向上を目指した。PMs構造は免疫系による認識を回避することが出来る一方で、生体内に豊富に存在する核酸分解酵素やポリアニオンに対する内核の安定性には課題が残されており、これらに対して耐性を高めることが必要とされている。

そこで、核酸分解酵素やポリアニオンの PMs 内核への侵入を阻む疎水性保護層を内核と外殻の間に装備した PMs を着想した。この PMs を調製するにあたり、外殻を形成する親水性連鎖と内核を形成するカチオン性連鎖との中間に疎水性連鎖を配置した三元型共重合体を用いればよいと考えられるが、この設計では疎水性連鎖間の自発的な凝集によって核酸との円滑なポリオン会合体形成が阻害されることが予期される。これを防ぐため内核と外殻の間には、PMs 形成時は親水性を示し、PMs 形成後に疎水性に変換可能な材料設計が必要となる。この条件を満たす高分子として、LCST を生体温度よりも低い 30 °C 程度にもつポリ n-プロピルオキサゾリン (PnPrOx) に着目した。温度応答性 PnPrOx を、生体適合性高分子として知られているポリエチルオキサゾリン (PEtOx)、また、核酸と会合するカチオン性連鎖であるポリリジン (PLys) と組み合わせた親水性連鎖—温度応答性連鎖—カチオン性連鎖からなる三元型共重合体を設計した。この三元型共重合体を用い、PnPrOx の LCST 以下で PMs を形成させ、その後生体内温度に静置することで PnPrOx 連鎖を疎水化させ、保護層として機能させる戦略である。

三元型共重合体は、まず二元型共重合体 PEtOx-*b*-PnPrOx と PLys を独立に合成し、双方を連結させることで得た。PEtOx、PnPrOx の分子量はそれぞれ 9470、8030 であり、PLys の重合度は 46 であった。得られた三元型共重合体と pDNA を 4 °C において電荷比 2 で混合したところ、動的光散乱 (DLS) 測定で 110 nm 程度の粒子の形成が観察された。また、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察においても、これまで開発してきた PMs に特徴的なロッド状構造が観察され、PMs の形成が確認できた。

PMs 中における PnPrOx の 37 °C での疎水化は、¹H-NMR による PnPrOx 由来ピークの温度変化の観察および、昇温することで DLS、TEM で観察された PMs 形態変化から確認出来た。この疎水性部形成による PMs の安定化効果を、核酸分解酵素である DNase I と、生体内に豊富に存在するポリアニオンであるコンドロイチン硫酸 (CS) に対して評価した。比較対照として疎水性部を持たない PMs を用いたところ、三元型共重合体は有意な安定性の向上を示し、当初の戦略通り、PnPrOx が形成した疎水性部による内核の pDNA の保護機能向上が実証された。安定性向上により、核酸送達システムとしての機能向上も見られた。培養細胞に対する実験においては、PMs の細胞取り込み量および遺伝子発現性の向上が確認された。おそらく細胞培地中や、細胞質中に含まれる核酸分解酵素や、細胞膜表面に存在する CS などに

対する高い安定性が有利に働いたためであろう。*in vivo*における機能としても、マウスに対する血中滞留性の向上が確認されている。

以上のように、中間層に LCST を有する PnPrOx を配置することで、PMs の生体内環境での安定性が向上し、核酸送達システムとしての機能向上が達成された。安定性達成に続いて重要視される課題は、標的特異的な遺伝子発現性の向上である。本研究では外殻に LCST 挙動を示す POx を配置して、この機能を PMs に付与することを試みた。

温度応答性高分子を用いた薬物送達システムは数多く報告されている。これらは、疾患部位に熱を加えることで薬剤の除法や細胞との親和性を向上させる設計である。しかしながらこれらの適用範囲は、外部から熱刺激を与えることが可能な部位に限定される。よって本研究では、外部刺激に頼ること無く、PMs の外殻が疾患部位で疎水化して細胞に対する親和性を向上させ、高い遺伝子発現を示す材料設計を指向する。特筆すべきこととして、温度応答性外殻を持つ高分子において外殻の LCST は末端構造が親水性分子か疎水性分子かによって変化することが見出されている。よって、外殻末端に温度以外の刺激に応答して親水性-疎水性が劇的に変化する分子を搭載した PMs を設計すれば、温度以外の刺激に応答して外殻の LCST が変化すると予想される。この現象が 37 °C 付近で利用できれば、温度刺激を加えずとも PMs 外殻の親水性-疎水性の変化を誘起することが可能である。

本研究ではモデルとして、pKa が 6.7 程度である 3,5-difluoro-4-carboxyphenylboronic acids (F₂PBA)を外殻末端に導入して、がん組織 pH6.7 に応答して外殻が疎水化する PMs を設計した。合成手順としては、第一に、アルキン末端およびアミン末端を有する EtOx と nPrOx の 1 対 1 ランダム共重合を合成した。ここで、このランダム共重合体 POx は 40 °C 程度に LCST を持つものである。続いて、POx アミン末端に縮合反応を用いて F₂PBA を導入し、最後にアルキン末端に PLys を Click Chemistry により連結させ、F₂PBA-POx-PLys を得た。POx の分子量は 8200 であり、PLys の重合度は 46 であった。これと pDNA を 4 °C において電荷比 1 で混合したところ、DLS 測定から 120 nm 程度の PMs の形成が確認された。続いてこの PMs の外殻の LCST を、昇温過程における散乱光強度測定により観察した。ここで、外殻が温度応答して疎水化するのであれば、PMs は粒子間凝集を起こすため、散乱光強度の上昇が見られるはずである。pH7.4 においては、38 °C、pH6.7 の環境では 34 °C 程度で

散乱光強度の上昇が観察され、pH 応答による外殻の LCST 変化が確認された。これは 37 °C の温度条件において、pH6.7 に応答して外殻が疎水化することで細胞膜との相互作用を向上させ、遺伝子発現を促進する PMs として期待される。実際に、ルシフェラーゼ遺伝子をコードした pDNA から PMs を調製し、培養細胞 B16F10 に対してトランスフェクションしたところ、pH6.7 の環境では pH7.4 に比べて有意に高い遺伝子発現を示した。当初の狙い通り、pH に応答して遺伝子発現が向上する設計を構築することが出来た。

以上、本研究では POx の LCST 挙動を利用することで、PMs の生体内環境での安定性向上、および pH に応答して遺伝子発現が向上する機能の付与を達成した。これら達成事項は、核酸送達による治療をより効率的に行うために PMs に必要な機能である。本研究により、POx の LCST 挙動を用いた材料設計は核酸送達システムの発展に有用であることが示された。