

論文の内容の要旨

論文題目

ペプチドリガンドを表層に有するポリオンコンプレックス型ベシクルの
調製と薬物送達用キャリアへの展開

Preparation of peptide-ligating polyion complex vesicles for drug
delivery carriers

氏 名 川村 渉

自己組織化に基づき形成される中空粒子・ベシクルは、その内部空間に水性媒体とともに様々な物質を内包することができるため、薬物送達システム (Drug delivery system; DDS) への応用が期待されている。中でも、最近開発されたポリオンコンプレックス (PIC) 型ベシクル (PICsome) は、反対荷電を有する荷電性ポリマー、特に、アニオン性ブロックコポリマーとカチオン性ホモポリマーを、それぞれ水溶液として単純混合するだけで簡便に得られることが特徴である。また、PICsome は、そのサイズが制御可能であり、同時に PIC 膜内を架橋し、その架橋度の調整が可能であることから、血中滞留性・体内動態・PIC 膜の物質透過性などのチューニングが可能なキャリアである。

PICsome は、その長期血中循環能を生かして、特に粒径が 100 nm 程度の場合に、血管漏出性亢進とリンパ系の未発達に基づく Enhanced permeability and retention effect (EPR 効果) によるがん組織 (C26 など) への集積が確認されている。これまで、MR 造影剤を PICsome の内部中空空間へ格納することにより、腫瘍への選択的集積に基づく MRI 診断が可能であることも示されている。一方で、EPR 効果の低い難治がん (脳腫瘍、すい臓がんなど) があることも知られており、EPR 効果を中心として有効性が示されてきたナノメディシンにおいても、これを克服してさらに標的指向性を高める必要性が高まってきている。そこで、本論文では、この問題を乗り越えて PICsome の活用範囲を拡大することを狙い、がん組織に特徴的な新生血管を標的とするためのリガンド導入、具体的には環状ペプチドリガンドである cRGD を PICsome 表面に導入し、血管ターゲティングを行うことを狙った。また、一般に小粒径物質では組織浸透性の向上が期待できるため、従来の PICsome の限界であった粒径の下限 (約 100 nm) を克服するためにさらなる小粒径化を推し進めた。

PICsome の材料特性の改良のうち、特に小粒径化は標的組織到達後の組織浸透性向上の点で重要性が高い。しかし、これまでの研究では粒径 100 nm 以下の PICsome の構築

は困難であった。本研究では、この粒径の限界克服にも取り組んだ。具体的には、PICsome 調製時の緩衝溶液の pH を調整することで高分子電解質の荷電数を制御し、それに対応させてポリマー混合比を変化させた。動的光散乱法 (DLS) 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察により、pH の低下に従って PICsome 粒径を縮小させることに成功し、特に pH5.8 ではそのサイズ下限を 50 nm 程度にまで縮小できた。

続いて、cRGD の導入量を積極的に調節し PICsome へ定量的に cRGD の導入手法を検討した。cRGD の定量的導入のため、はじめに所定の割合で cRGD 導入部位であるアセタール基を PEG の α 末端に持つアニオン性ブロックコポリマーを合成し、 α 末端がメトキシであるアニオン性ブロックコポリマーと混合することで、特に粒径約 100 nm の PICsome への cRGD 導入量制御を目指した。ここでは、cRGD 導入反応の際に凍結融解法を用いた。¹H NMR, DLS 及び TEM による詳細な分析の結果、アセタール基の仕込み量に対応した PICsome への定量的な cRGD 導入を確認した。

得られた種々の cRGD 導入率 (0, 25, 50, 100%; PEG 鎖末端総数基準) の PICsome を用いて、細胞内動態の評価を行った。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) 及びヒト脳腫瘍 (U87MG) を用い、cRGD 導入率と細胞取り込みの関係を分析した。その結果、cRGD の導入率の上昇に従って細胞取込み量が向上することが確認された。cRGD 取込みは各種阻害実験により、cRGD とインテグリンとの結合を介しており、クラスリン介在型エンドサイトーシスであると結論づけられた。

U87MG 皮下移植マウスを用いた動物実験では cRGD 導入率の変化に依存した体内動態の差を評価した。血中滞留性については、cRGD の導入率の上昇とともに血中滞留時間が短縮する傾向が見られた。一方、肝臓及び脾臓では、cRGD の導入率の上昇とともに取込みの上昇が確認された。しかし、がん組織においては、50%-cRGD-PICsome が 3 時間以内という最も早い腫瘍集積を示し、遅れて 25%-cRGD-PICsome の集積が進むことが明らかとなった。この結果を細胞実験における cRGD の導入率上昇に依存した細胞取込み量の上昇に対応させて考えると、cRGD 導入 PICsome それぞれの腫瘍組織への親和性と血中滞留性のバランスにより集積プロファイルが変化するものと考えられる。組織レベルでの観察を進めるために、50%-cRGD-PICsome と Ctrl-PICsome (cRGD 未導入) の体内動態を生体内リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡で確認した。その結果、Ctrl-PICsome は血中を凝集することなく長時間滞留するのに対し、50%-cRGD-PICsome は 6 時間後に血流から大半が消失し、腫瘍表面の新生血管にのみ集積している様子が観察された。この結果は、cRGD-PICsome による新生血管ターゲティングが可能であることを示している。

cRGD-PICsome を用いた新生血管ターゲティングの活用事例として、MRI 用造影剤酸化鉄ナノ粒子封入型 50%-cRGD-PICsome を構築し、機能評価を行った。U87MG をマウスに移植し、MRI 造影能を評価した。皮下移植及び同所 (脳) 移植にて、腫瘍の MR イメージングに成功した。特に同所移植モデルでは、血管新生が活発であると思われる部位

のイメージングに成功しており、MR イメージングにより腫瘍の形態のみならず、性質の評価に成功している可能性が示唆された。

以上、本論文では、PICsome の標的指向性を高める手法として、PICsome へのリガンド導入を狙い、その合成法の確立、及びその性質の評価を行い、特に cRGD 導入による新生血管ターゲティングの実現と MRI への応用、及びその有用性を実証した。また、粒径制御のための新しい手法を開発し、50 nm 程度までの PICsome が作製可能であることを証明した。この小粒径 PICsome は、リガンド導入と組み合わせての利用も可能であり、PICsome の体内動態制御に向けて新たな戦略を提供できるものと考えられる。これらの成果は、これまでの PICsome にはなかった機能・性質の付与に成功した点で意義が大きく、DDS キャリアとしての PICsome の有用性をさらに高める重要な成果である。