

学位論文題名

Studies of Nanoparticle Surface Design and their Permeation through Biological Barriers

(ナノ粒子の表面デザインと生体バリア透過に関する研究)

学位論文内容の要旨

近年、ドラッグデリバリーシステム(DDS)と呼ばれる研究が注目されており、薬剤徐放により薬剤を長寿命化したり、細胞内により積極的に薬剤を送り込み、薬剤を高効率化する研究が盛んに行われている。前者の研究は、例えば *Doxi*[®] に代表されるように、1990年代に既に完成しており、現在は後者に研究がシフトしている。細胞内への薬剤導入において重要となるのは、細胞膜をいかに突破するかということであり、更に、遺伝導入などの場合は核膜/核膜孔も突破しなければならない。このような生体の持つ防御機構は生体バリアと呼ばれ、これらをいかに突破していくかが、今後の DDS における重要課題となっている。

従来、細胞内への薬剤導入はエンドサイトーシス経路が使われてきた。しかし、エンドサイトーシスは細胞が外部から養分を取り込み、分解して再利用する経路であり、薬剤及び薬剤キャリアーの分解が問題となる。これに対し近年、ストライプ構造を持った金属ナノ粒子を使うことで、膜透過により細胞質に直接薬剤を導入する経路が報告された。この現象は現在、直径 2~3nm 以下の小さな粒子のみでしか確認されていないが、薬剤キャリアーの表面デザインがいかに重要であることを示唆し、DDS における表面化学の重要性を再認識させた。そこで本研究では、より大きな分子の生体バリア突破を目的として、薬剤キャリアーの表面デザインに注目した。キャリアーとしては、表面修飾が簡便で、生体イメージングに適した金属ナノ粒子を用いた (Figure 1)。

第 1 章では、近年までの DDS 研究の流れと先行研究の紹介、金属ナノ粒子を薬剤キャリアーとして使う魅力や、それらの表面修飾の多様性について言及した。

第 2 章では、細胞膜の透過を目的として、ナノ粒子の表面デザインについて検討した。デンドリマーで報告されている、親水/疎水環境における構造変化に注目し、ポリエチレングリコール(PEG)の片末端をアルキル基で修飾し、もう一方末端をアルカンチオールで修飾した両親媒性分子を合成した。これを金基板に提示して接触角測定をすると、その表面は疎水性を

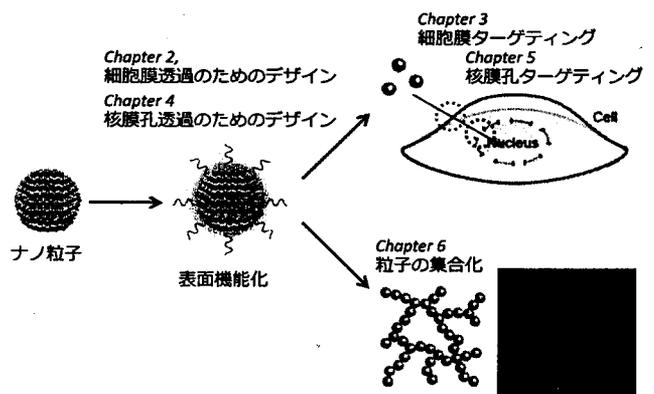


Figure 1. Concept of this study.

示したが($\theta \approx 85^\circ$)、オクタンチオールとの mixed SAM では親水化した($\theta \approx 65^\circ$)。これは SAM の密度が薄まり、PEG の柔軟性が発現して分子構造が変化したためと考えられる。この現象は金ナノ粒子上でも観測され、水、メタノール、クロロホルムなど全ての溶媒に可溶なナノ粒子を作製することができた。また、メタノール中とクロロホルム中で NMR 解析を行ったところ、メタノール中では中央の PEG のピークが、クロロホルム中では末端のアルキル基のピークが強く観測された。このことは、作製したナノ粒子が親水/疎水溶媒中で異なるコンホメーションを取っていることを示唆している。またこのナノ粒子は、液-液界面を透過し、水からクロロホルムへ相間移動することが分かった。

第 3 章では、この界面透過能をもつナノ粒子の細胞膜透過を検討した。末端のアルキル鎖を誘導体化し、単純なアルキル基に加え、フェニル基やブランチ構造を持つものも合成し、量子ドットに提示した。フローサイトメトリー解析により、 37°C における細胞導入量は末端アルキルの疎水性に比例して増加することがわかった。また、 4°C における取り込み量の解析を行うことで膜透過経路の取り込み量を検討したところ、ブランチ構造では、全取り込み量のうち約 30%が膜透過しており、膜透過が効率的であることが分かった。電子顕微鏡で細胞切片を観察すると、ミトコンドリアや核内などに粒子が局在しており、オルガネラのターゲティングにも有効であることが示唆された。

第 4 章では、細胞核ターゲティングについての分子デザインを検討した。マルトオリゴ糖が核移行を促進する報告に注目し、その誘導体を合成した。マルトオリゴ糖修飾したナノ粒子を、界面活性剤処理によって細胞膜透過性の上がった細胞に添加すると、細胞核への局在が観測された。またその効率は表面に提示されている糖鎖密度にしたがって上昇する、糖鎖特有のクラスター効果も観測された。

第 5 章では、マルトオリゴ糖によってなぜ核移行が促進するのか、そのメカニズムについて検討した。核膜孔とに注目し、核膜孔タンパク質(Nup62)とマルトオリゴ糖修飾ナノ粒子の結合を表面プラズモン共鳴(SPR)測定により解析した。これによってマルトオリゴ糖が核膜孔に対し、天然の核内輸送タンパク質(importin)と同程度の高い親和性($K_D \sim 10^{-9}\text{M}$)持つことが明らかとなった。このことは、マルトオリゴ糖の DDS における有用性を示すものとなる。

第 6 章では、ナノ粒子に対する分子の表面修飾量を変化させて疎水性をコントロールし、ナノ粒子のネットワーク構造を作製した。この構造体形成によりナノ粒子はゲル化し、水中で自立した。このような粒子構造体を使った DDS も近年では注目されており、ナノ医学分野での応用が期待される。

第 7 章では、第 2 章から第 6 章までの本学位論文における総括を行った。

以上により、薬剤キャリアーの表面デザインを通じて、様々な生体バリアを突破することが可能となった。本研究の成果は、今後の DDS における表面デザインの重要性を示すものとなる。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐田和己
副査	教授	居城邦治
副査	教授	石森浩一郎
副査	教授	覚知豊次
副査	准教授	新倉謙一

学位論文題名

Studies of Nanoparticle Surface Design and their Permeation through Biological Barriers

(ナノ粒子の表面デザインと生体バリア透過に関する研究)

細胞膜や核膜孔のような生体の持つ防御機構は生体バリアと呼ばれ、これらをいかに透過していくかが、今後のドラッグデリバリーシステム(DDS)における重要課題とされている。従来、細胞内への薬剤導入はエンドサイトーシス経路が使われてきた。しかし、これは細胞が外部から養分を取り込み、分解して再利用する経路であり、薬剤及び薬剤キャリアーの分解が問題となる。これに対し近年、表面のリガンドがストライプ構造になっている金属ナノ粒子を使うことで、膜透過により細胞質に直接薬剤を導入する経路が報告された。この現象は現在、直径2~3nm以下の小さな粒子のみでしか確認されていないが、薬剤キャリアーの表面デザインの重要性が認識された。本学位論文では、より大きな分子の生体バリア透過を目的として、薬剤キャリアーの表面デザインに注目している。キャリアーとしては、表面修飾が簡便で、生体イメージングに適した金属ナノ粒子を用いている。

第1章では、近年までのDDS研究の流れと先行研究の紹介、金属ナノ粒子を薬剤キャリアーとして使う魅力や、それらの表面修飾の多様性について言及している。

第2章では、細胞膜の透過を目的として、ナノ粒子の表面デザインについて検討している。ポリエチレングリコール(PEG)の片末端をアルキル基で修飾し、もう方末端をアルカンチオールで修飾した両親媒性分子を合成している。これを金基板に提示して接触角測定をすると、その表面は疎水性を示したが、オクタンチオールと混合したSAMでは親水化していた。これはSAMの密度が薄まり、PEGの柔軟性が発現して分子構造が変化したためと考察している。この現象は金ナノ粒子上でも観測され、水、メタノール、クロロホルムなど全ての溶媒に分散可能なナノ粒子を作製している。NMR解析により、作製したナノ粒子が親水/疎水溶媒中で異なるコンホメーションを取っていることが示唆されている。またこのナノ粒子は、液-液界面を透過し、水からクロロホルムへ相間移動していた。このような疎水性環境に親和性のある粒子は、細胞膜などの疎水性生体バリアの透過へ応用が可能となる。

第3章では、アルキル基を持つPEGで被覆したナノ粒子の細胞膜透過を検討している。末端のアルキル鎖を誘導体化し、単純なアルキル基に加え、フェニル基や枝分かれ構造をもつアルキル基(ブランチ構造)を持つものも合成し、量子ドットに提示している。フローサイトメト

リー解析により、37°Cにおける細胞導入量は末端アルキルの疎水性に比例して増加していた。また、4°Cにおける取り込み量の解析を行うことで膜透過経路の取り込み量を検討しており、ブランチ構造の膜透過が効率的であることが分かった。電子顕微鏡で細胞切片を観察すると、ミトコンドリアや核内などに粒子が局在しており、オルガネラのターゲティングにも有効であることが示唆された。

第4章では、細胞核ターゲティングについての分子デザインを検討していた。マルトオリゴ糖が核移行を促進する報告に注目し、その糖鎖の長さが異なるもの(1、3、5、7糖)を合成していた。マルトオリゴ糖修飾したナノ粒子を、界面活性剤処理によって細胞膜透過性の上昇した細胞に添加すると、3糖、5糖7糖で細胞核への局在が観測された。またその効率は表面に提示されている糖鎖密度にしたがって上昇する、糖鎖特有のクラスター効果も観測されていた。

第5章では、マルトオリゴ糖によってなぜ核移行が促進するのか、そのメカニズムについて検討していた。核膜孔とのに注目し、核膜孔タンパク質(Nup62)とマルトオリゴ糖修飾ナノ粒子の結合を表面プラズモン共鳴(SPR)測定により解析していた。これによってマルトオリゴ糖が核膜孔に対し、天然の核内輸送タンパク質(importin)と同程度の高い親和性($K_d \sim 10^{-9}$ M)を持つことが明らかにされた。これにより、マルトオリゴ糖の DDS における有用性が示された。

第6章では、ナノ粒子に対する分子の表面修飾量を変化させて疎水性をコントロールし、ナノ粒子のネットワーク構造を作製していた。この構造体形成によりナノ粒子はゲル化し、水中で自立していた。このような粒子構造体を使った DDS も近年では注目されており、ナノ医学分野での応用が可能となる。

第7章では、第2章から第6章までの本学位論文における総括となっている。

これを要するに、著者は極性の低い環境下での静電相互作用が、分子設計を行う上で重要な分子間相互作用の一つとなることを示したものであり、超分子化学や高分子化学に対して新たな設計指針を与えたという点でこれらの研究領域に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士(理学)の学位を授与される資格あるものと認める。