

ポリアルギニンとポリグルタミン酸との ポリイオンコンプレックス形成にもとづく高分子ミセルの評価

日大生産工(院) ○塩沢 周作 日大生産工 柏田 歩

1 緒言

従来のがん化学療法の問題点としての投与した薬物の副作用を克服する手法として, Drug Delivery System (DDS)が有効であることが知られている。そして, DDSに用いられる薬物担体としての利用を目指し, 正および負に帯電した高分子電解質により形成される高分子イオン複合体(Polyion complex; PIC)に関して研究が進められている。

DDSのキャリアとして広く知られている典型的な両親媒性の高分子ミセルは, 主に親水鎖と疎水鎖とを連結したブロック共重合体から形成されており, 水溶液中において疎水鎖を核として高分子が会合することで形成される。そして, 内核に疎水性薬物や生理活性物質を封入できる。一方でKataokaらによって提唱されたPICミセル¹⁾は, 高分子鎖上の正電荷を有する部位と別の高分子鎖上における負電荷を有する部位とが静電相互作用により疎水性の核を形成し, 安定にミセル化することが利点として挙げられる。さらに重要なのは, 側鎖官能基の特性を利用して温度やpH応答性など目的に応じた設計を施すことが出来る点である。実際に, ポリアニオンとしてのポリグルタミン酸(PGlu)およびポリカチオンとしてのポリリシン(PLys)からなる双性イオン型ランダム共重合体[P(Glu-co-Lys)]から, 腫瘍細胞外環境pHに応答して表面電荷が負から正へ反転することを期待したPICナノ粒子を作製し,

その徐放能力と細胞取り込み効率を評価した研究例が存在する²⁾。

本研究では膜透過活性を有するアルギニンに富むペプチド(R8)をエンドソーム内に送達するための手段としてアニオン性のポリグルタミン酸(PGlu)とポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体(mPEG-*b*-PGlu)とのPICミセル化を考えた。得られたPICミセルに対して動的光散乱(DLS)や円二色性(CD)分析などによる形状評価を行い, pHなどの外部環境に応答したPICミセルからのR8の放出機能に関する評価への足掛かりとした。

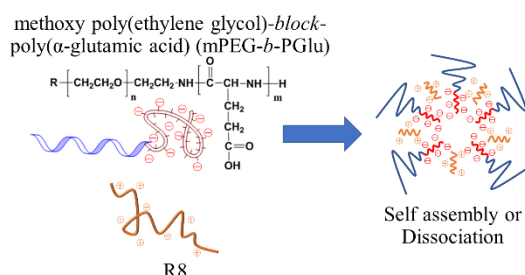


Fig. 1 Micellarization of mPEG-*b*-PGlu and R8.

2 実験方法

片末端にアミノ基を有するmPEG-NH₂に対してN-α-カルボキシ無水物であるBLG-NCA(5-benzyl-L-glutamate N-carboxyanhydride)を用いた開環重合を経て, 重合度40のmPEG-*b*-PGlu₄₀を合成した。一方, R8は固相合成法により合成した。得られたmPEG-*b*-PGlu₄₀ 1.0 mg/mLとR8 0.57 mg/mLを異なる電荷比(+/-)0.1-10.0の範囲で純水中において混合し, 2倍希釈した水溶液を調製した。それぞれの溶液についてDLSおよ

Characterization of Polymeric Micelles Based on Polyion Complex Formation
between Polyarginine and Polyglutamate
Shusaku SHIOZAWA, Ayumi KASHIWADA

びCDスペクトルにより水溶液中のPICミセル粒径および形状について評価した。

3 実験結果および考察

Table 1 Particle size and polydispersity index(PDI) of PIC micelles at different +/- ratios in deionized water.

	+/-			
	0.1	0.5	0.6	10.0
Particle size (nm)	-	71.6 ± 28.8	92.0 ± 4.7	3099.0 ± 707.4
PDI (-)	-	0.208 ± 2.66	0.162 ± 0.071	0.901 ± 0.464

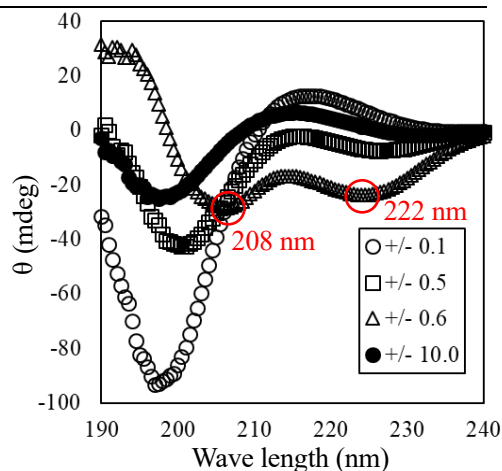


Fig. 2 CD spectra of mPEG-*b*-PGlu₄₀ and R8 assemblies at different +/- ratios in deionized water.

PICミセルをDDS担体として用いる際には、血液中で安定なミセルを形成し、かつ粒径が100 nm以下程度に制御されている必要がある。そこでpH 7.0の純水中でmPEG-*b*-Glu₄₀とR8の混合系について、異なる電荷比におけるミセル粒径とR8の形状についてDLSとCDスペクトルを用いて評価した。その結果をTable 1およびFig. 2に示す。電荷比0.1ではDLSによる粒径は観測されず、CDスペクトル測定の結果からR8はランダムコイル状で存在していることがわかった。このことから、アニオン性のPGlu鎖とカチオン性のR8との比率が不適切であるため、ミセルを形成していないことがわかった。一方、電荷比が0.6において最も安定なミセル形成が確認された。併せてR8のCDスペクトルにおいては、ヘリックス構造特有のシグナルが観測された。すなわち電荷比0.6において設計どおり

PGlu鎖とヘリックス構造を形成したR8との電荷相殺による安定なミセルを形成していると考えられる。以上の結果から、R8のような膜透過性ペプチドとPGluを用いたPICミセルの形成条件には、電荷比による制限を受けることがわかった。しかしながら、安定なPICミセル形成が確認されたことにより、われわれが目的としているpH応答性による薬物放出機能付与へつなげられることが期待される。

4 結言

本研究では、PEG/ポリアニオン共重合体である mPEG-*b*-PGluの合成法の確立およびアニオン鎖に理想的な重合度のPGluを導入できた。また、R8のような膜透過性ペプチドとmPEG-*b*-PGluを用いたPICミセルは、ある程度電荷比による制限を受けつつも、等電点付近においてミセルを形成することがわかり、mPEG-*b*-PGluがDDS担体としての利用できる可能性を見出した。

しかし、問題点として正確に+/- 1.0におけるミセルの安定性が示されていないことや、送達過程の安定性を示すための生体内により近い条件 (pH, 塩濃度など) におけるデータはまだ得られていないため今後の検討課題となる。

また、将来的には現行の系を加味し、標的細胞環境に応じたpH応答性を有する側鎖官能基を共重合体を導入し、目的の部位に送達するなど³⁾ PICの機能性を向上させるためのアプローチをはかっていく。

5 参考文献

- 1) A. Harada, K. Kataoka, *Macromolecules*, **1995**, 28, 5294-5299.
- 2) Y. Huang, Z. Tang, X. Zhang, H. Yu, H. Sun, X. Pang, X. Chen, *Biomacromolecules*, **2013**, 14, 2023-2032.
- 3) W. Cheng, H. Cheng, S. Wan, X. Zhang, M. Yin, *Chem. Mater.* **2017**, 29, 4218-4226.