

氏 名 (本籍)

上^{かみ}村^{むら}真^{まさ}生^お (新 潟 県)

学 位 の 種 類

博 士 (工 学)

学 位 記 番 号

博 甲 第 6024 号

学位授与年月日

平成 24 年 3 月 23 日

学位授与の要件

学位規則第 4 条第 1 項該当

審 査 研 究 科

数理物質科学研究科

学位論文題目

Creation of novel PEGylated bionanoparticles for fluorescence bioimaging and drug delivery

(蛍光バイオイメージングとドラッグデリバリーを目指した新規 PEG 化バイオナノ粒子の創製)

主査

筑波大学教授

工学博士

長 崎 幸 夫

副査

筑波大学教授

博士 (工学)

神 原 貴 樹

副査

筑波大学教授

工学博士

丹 羽 修

副査

筑波大学准教授

博士 (工学)

後 藤 博 正

【149】

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、バイオ分野におけるナノテクノロジー技術の導入が精力的に行われており、その中でもナノ粒子を用いた研究が注目を集めている。本論文では、ナノ粒子を用いて、生体内部を蛍光により観察する蛍光バイオイメージングと、薬物を患部のみに送達するドラッグデリバリーシステムを目指した研究を行った。まず、近赤外光励起により可視光（アップコンバージョン発光）および近赤外光を発する希土類含有セラミックスナノ粒子（RED-CNP）を蛍光バイオイメージングに用いるために、RED-CNP の一種である YNP の表面に、PEG-*b*-PAAc とストレプトアビジンを共固定し（PEG-SA-YNP）、ビオチンのみに対する特異的認識能と、それ以外の生体分子に対する非特異吸着抑制能を付与することを試みた。作製した PEG-SA-YNP をビオチン標識抗体プレートに加え、近赤外励起光（980 nm）を照射したところ、可視発光（550 nm, 660 nm）および近赤外発光（1500 nm）が見られ、PEG-SA-YNP がプレート上のビオチン標識抗体を特異的認識可能であることが確認された。一方、PEG-SA-YNP をビオチン未標識抗体プレートに加えた場合は発光がほとんどみられず、抗体プレートへの非特異吸着が抑制されていることが確認された。

さらに、RED-CNP を *in vivo* イメージングに応用するために、RED-CNP 表面の PEG ブラシの強固な固定および高密度化を行うことで、その分散安定性を極限まで向上させることを試みた。この目的を達成するために、PEG の末端にポリ（4-ビニルベンジルホスフォネート）（PVBP）セグメントを有するブロック共重合体（PEG-*b*-PVBP）を設計・合成し、YNP 表面を修飾（PEG-YNP(*b*））した。得られた PEG-YNP(*b*) の分散安定性を DLS 測定によって評価した結果、PEG-YNP(*b*) は PBS（10 mM PB, 150 mM NaCl）やウシ胎児血清（FBS）溶液（10 mM PB, 150 mM NaCl, 10 % FBS）中において平均粒径 200 nm で単分散であり、平均粒径、粒径分布ともに 1 週間以上安定してほとんど変化がないことが確認された。また、FBS 溶液中に分散した PEG-YNP(*b*) に近赤外励起光（980 nm）を照射したところ、可視発光（550 nm, 660 nm）および近赤外発光（1500 nm）が確認され、PBS 中においても PEG-YNP(*b*) はその発光特性を維持していることが確認された。さらに酸性水溶液（pH5）中における安定性を DLS により評価したところ、表面未修飾 YNP は短時間で溶解す

るのに対して、PEG-YNP(*b*) は平均粒径、粒径分布ともに3日間以上安定してほとんど変化がないことから、耐酸性が向上していることも示唆された。このような高い安定性は、ブロック共重合体中のポリスチレン構造によって疎水性層が形成されることで、水溶液中において極めて安定なPEG修飾表面が形成されていることで得られていると考えられる。さらにPEG-YNP(*b*) をマウスに尾静脈投与し、近赤外カメラによって観察したところ、マウスが生きたまま解剖することなく、体内の臓器に集積したPEG-YNP(*b*) の発光を、体外から観察することに成功した。

さらに本論文では、合成したPEG-*b*-PVBPを用いて、新たなブロックアイオノマーコンプレックス (BIC) 型ミセルを作製し、DDSへの応用を試みた。はじめに、PEG-*b*-PVBPとカチオン性物質とのコンプレックス形成を確認するため、PEG-*b*-PVBPと種々のカチオン性界面活性剤を混合することで、ミセルの形成を試みた。この際、カチオン性界面活性剤の構造がミセルの安定性に与える影響についても評価を行った。PEG-*b*-PVBPとカチオン性界面活性剤を用いてミセルを形成させ、高塩濃度下における安定性を評価したところ、PEG-*b*-PVBPのみで自己集合によって形成されたミセルは不安定であったのに対して、PEG-*b*-PVBPとカチオン性界面活性剤を用いて形成させたミセルは高塩濃度下でも安定であった。また、その安定性はカチオン性界面活性剤の構造によっても異なることがわかった。さらに、実際に腫瘍をターゲットとしたDDSキャリアーへの応用展開を目指し、PEG-*b*-PVBPとカチオン性の抗癌剤であるドキソルビシン (DOX) を用いてミセルを作製して (DOX/PEG-*b*-PVBP)、その評価を行った。得られたDOX/PEG-*b*-PVBPは、ゼータ電位測定により、静電的にコンプレックスを形成していることが確認された。このDOX/PEG-*b*-PVBPは血清共存下でも高い安定性を有することから、極めて安定なコンプレックスを形成していることもわかった。また、DOX/PEG-*b*-PVBP溶液の蛍光スペクトルを測定したところ、同濃度のDOX溶液と比較して、蛍光強度が低下していることが明らかとなった。一般にDOXは、ミセル内部などの疎水場に高濃度で取り込まれた場合、蛍光がクエンチすることが知られており、この結果からDOXがミセルコア部に効率的に内包されていることが示唆される。このDOX/PEG-*b*-PVBPは、PEG-*b*-PVBP構造中のリン酸基の電荷がpHによって変化することを利用して、正常な生体内条件 (pH7.4) ではDOXの漏れ出しがほとんどないのに対して、癌細胞内 (エンドーム / リソソーム) と同条件 (pH5.5) では急速にDOXを放出できることを確認した。また、ヒト乳癌由来MCF-7細胞を用いて、癌細胞内におけるDOX放出実験を行ったところ、共焦点顕微鏡による観察により、癌細胞内部にDOX/PEG-*b*-PVBPが取り込まれ、細胞内部のリソソームに達していることが明らかとなった。さらに、ヒト咽頭癌由来KB細胞を用いた実験により、DOX/PEG-*b*-PVBPは、DOXのような低分子抗癌剤に対して耐性を持つ多剤耐性癌細胞に対しても、効果的に細胞毒性を示すことが明らかとなった。

これらのそれぞれの特性を有するPEG化バイオナノ粒子は、近赤外バイオイメーシングとドラッグデリバリーキャリアーへの利用が期待される。

審 査 の 結 果 の 要 旨

1. 生体適合性ポリマーをベースとして、発光ナノ粒子を用いたバイオイメーシングへの応用から、さらに抗癌剤と組み合わせたドラッグデリバリーシステムまで研究を展開しており、さらに得られた結果についての確かな考察、今後への展望を記述しており、優れた論文であると言える。
2. 希土類含有セラミックスナノ粒子を生体内で利用するために、それ以前の研究で得られた問題点をもとに、新たにポリマーを設計、合成し、ナノ粒子の表面修飾を行うことで問題点を解決し、実際に生体内のバイオイメーシングに応用した点は評価に値する。
3. 新たに設計したポリマーをドラッグデリバリーキャリアーの形成に用いることで、生理条件下でも極めて高い安定性を有するキャリアーを形成するだけでなく、pH依存的に腫瘍内で抗癌剤をリリースすると

いう、理想的な材料設計に成功していることは、優れた研究成果であると言える。

4. 本論文に記載した内容には、まだ投稿論文として発表されていないデータも含まれ、今後論文として発表されることが期待される。

平成 24 年 2 月 10 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。