

称号及び氏名	博士（理学）	藤本 真理
学位授与の日付	平成 22 年 3 月 31 日	
論文名	「Fabrication of α - elastin and elastic model polypeptide cross-linked nanoparticles by gamma irradiation (ガンマ線照射による α -エラスチンおよびエラスチンモデルポリペプチドの架橋ナノ粒子化)」	
論文審査委員	主査	古田 雅一
	副査	原 正之
	副査	多田 俊治
	副査	岡 勝仁

論文要旨

第 1 章：序論

エラスチン線維は皮膚や肺、動脈、靭帯などの軟部組織において弾性の保持に大きく寄与している。この組織の破綻は大動脈弁狭窄症や皮膚弛緩症をはじめとする血管、皮膚障害や病害を引き起こすことが知られている。エラスチン線維は平滑筋細胞、線維芽細胞、軟骨細胞などで前駆体トロポエラスチン（分子量約 70 kDa）として生成された後細胞から分泌され、細胞外に存在する微細線維（マイクロフィブリル線維）と分子間相互作用後トロポエラスチン間でリジルオキシダーゼの働きによってデスマシン、イソデスマシンなどからなる架橋形成を経て分子間架橋を形成し、収縮可能で不溶性の弾性線維となる。この不溶性のエラスチン線維にシュウ酸を用いて熱処理を行い可溶化した部分を抽出したものが α -エラスチンである。

α -エラスチンにはグリシン (G)、バリン (V)、プロリン (P) の繰り返しアミノ酸配列GVGVPを含む疎水性領域と荷電アミノ酸を含む親水性領域が存在する。 α -エラスチンは水溶液中において低温では溶解しているが一定温度以上で凝集する特性を持つ。この特性は α -エラスチンの分子鎖中に存在するGVGVPによるものである。 α -エラスチンは水溶液の昇温に伴う凝集過程の初期に微小な分子集合体（マイクロコアセルベート）を形成することが知られている。一方、 ^{60}Co ガンマ線や電子線による放射線架橋はハイドロゲル作成など、種々の高分子加工に利用されており、GVGVPからなるエラスチンモデルポリペプチドについても ^{60}Co ガンマ線架橋シート作成の研究例がある。

従って、 α -エラスチン水溶液の昇温を制御してマイクロコアセルベートを生成させ、最適な条件下で放射線架橋法を適用することによりナノサイズの凝集体を作製することが可能ではないかという発想に至った。

100 nm 前後の粒径を有するナノ粒子は血管内において reticuloendothelial system (RES) の炎症の軽減や比較的太い血管につながっているがん細胞に特異的に到達し、逆に毛細血管につながっている正常細胞には到達しにくい enhanced permeability and retention effects (EPR effect) と呼ばれる効果を発揮し、薬剤徐放用担体として注目されている。そこで本研究では α -エラスチン及びそのモデルポリペプチドの凝集に必要な昇温条件について検討し、ナノサイズの粒子が生じていることを見出し、これにガンマ線架橋を組み合わせることによ

り架橋ナノ粒子の作製に成功した。また同時に架橋ナノ粒子形成に必要な要因や薬剤徐放用担体としての利用の可能性について基礎的検討を行った。

第2章： α -エラスチンの架橋ナノ粒子化

ウシ項韌帯由来 α -エラスチン(分子量10-60 kDa、Elastin Product Co, Inc.より購入)を用い、温度制御によってナノサイズの α -エラスチンの凝集体を作製し、この凝集体の形態を保持しながら ^{60}Co ガンマ線照射を行い、低温に戻しても凝集した α -エラスチンが溶解することなく安定で一定の大きさを有する架橋ナノ粒子の作製を試みた。純水に α -エラスチンを加え、4°Cまで冷却して溶解後、60°Cまで昇温して α -エラスチンを凝集させた。様々な昇温速度(0.2°C/分~6°C/分)における粒径への影響を検討した結果、10 mg/mlの α -エラスチン水溶液を昇温速度1.9°C/分で4°Cから60°Cまで昇温し、60°Cに保温しながら ^{60}Co ガンマ線照射を行う条件下で、平均粒径180 nmの粒度分布が狭く安定した粒子が得られた。この粒子は溶液温度を4°Cに戻しても再溶解せず、分散性が保持されていた(Fig 1)。

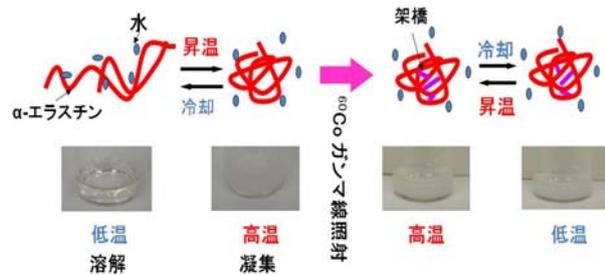


Fig. 1 架橋ナノ粒子作製原理

第3章：エラスチンモデルポリペプチドの架橋ナノ粒子化

α -エラスチン分子鎖には昇温時の凝集体形成に関与するGVGVPを含む疎水性領域とともに荷電アミノ酸も含まれている。そこで荷電アミノ酸が昇温時の凝集体形成と ^{60}Co ガンマ線照射によるナノ粒子化にどのように関与しているかを調べるために、 α -エラスチンのモデルポリペプチドとして、凝集体形成に関与する基本構造のみからなるポリペプチドI:(GVGVP)₂₅₁(Urry 教授よりご提供)と荷電性アミノ酸を含むポリペプチドII:(GVGVP GVGFP GEGFP GVGVP GVGFP GFGFP)₁₇(GVGVP)(Urry 教授よりご提供)、ポリペプチドIII:(GVGVP GVGFP GKGFP GVGVP GVGVP GVGVP)₂₂(GVGVP)(Urry 教授よりご提供)を用いて検討した。

α -エラスチンと同じ範囲の昇温速度条件下では、ポリペプチドIは水溶液(5 mg/ml)を28°C以上に昇温させると昇温速度に関わらず容易に凝集したが、 α -エラスチンと同じ昇温速度(1.9°C/分)においては ^{60}Co ガンマ線照射によりハイドロゲルが生成された。昇温速度の増加(4°C/分)に伴い、ゲルのサイズは減少したが、ナノ粒子は得られなかった。そこで、4°Cの水溶液を42°Cの純水に滴下して(最終濃度5 mg/ml)さらに急激な昇温(昇温速度:40°C/分)を行い、同じ温度下で ^{60}Co ガンマ線照射を行ったところ、平均粒径150 nmの粒度分布が狭く安定した架橋ナノ粒子が生成した。

一方、荷電アミノ酸を含むポリペプチドII、IIIは、純水に溶解させた場合、どのような濃度、昇温条件で昇温させても凝集は認められず、ガンマ線照射後も架橋粒子は得られなかった。そこで塩析による凝集性の改善を期待し、10 mMリン酸緩衝液(pH 6.2)にポリペプチドを溶かして昇温させたところ、グルタミン酸を含むポリペプチドIIのみ、濃度7 mg/mlにおいて25°C以上でポリペプチドの凝集が確認できた。この溶液を様々な昇温速度(0.2°C/分~6°C/分)で50°Cまで昇温し、 ^{60}Co ガンマ線照射を行ったところ、 α -エラスチンと同じ昇温条件(1.9°C/分)で平均粒径60 nmの安定した粒子が生成した。しかしリジンを含むポリペプチドIIIでは、どの緩衝溶液、濃度を用いてもポリペプチドは凝集せず、架橋粒子は得られなかった。

これらの結果から α -エラスチンの凝集にはGVGVPを含む疎水性領域が重要であることが再確認され、荷電アミノ酸を含むポリペプチドは水溶液中では凝集せず、凝集体の形成なしには ^{60}Co ガンマ線照射による架橋ナノ粒子は得られないことが示された。また凝集体が得られる条件下においても架橋ナノ粒子を得るためには昇温速度を十分低くする必要があった。こ

の原因としてはポリペプチドの荷電による静電的相互作用のため凝集に時間がかかることが推測された。 α -エラスチンは分子内に荷電アミノ酸を含む領域とGVGVPを含む疎水性領域が存在しているため、 α -エラスチンを効率良く凝集させ、架橋ナノ粒子を得るためにも時間をかけて昇温することが有効であることが示唆された。

第4章：ポリペプチド I における凝集体形成と架橋ナノ粒子化プロセスの解析

次に、 α -エラスチンの GVGVP を含む疎水性領域の凝集についてさらに知見を得るために、GVGVP のみを含むポリペプチド I を純水に溶解し（最終濃度 5 mg/ml）、昇温に伴う二次構造変化を CD 測定により検討した。 α -エラスチンの架橋ナノ粒子を得るための昇温速度（1.9°C/分）、より早い昇温速度（6°C/分）、ポリペプチド I の架橋粒子を得るための急激な昇温（40°C/分）の昇温速度条件で 42°C まで昇温した。得られたスペクトルを比較すると、急激な昇温（40°C/分）でポリペプチドを凝集させることにより 225 nm 付近にポリペプチド I 特有の Type II β -turn のバンドがより明瞭に現れていた。さらに分子動力学計算を用いて GVGVP の繰り返し配列からなるポリペプチド 3 本の凝集体形成をシミュレーションしたところ、凝集に伴って Type II β -turn に起因する構造が見られ、ポリペプチド鎖の中で疎水性の高いバリン、プロリンがより近接して配置されることが見出された。

一方、急激な昇温（40°C/分）により生じた凝集体をガンマ線架橋し、CD測定を行うと、Type II β -turn のバンドが照射前の約 4 分の 1 に減少した。このことから、ポリペプチド間で反応が生じていることが示唆された。またこのポリペプチドに含まれるバリン、プロリン、グリシンの混合水溶液を調製し⁶⁰Coガンマ線照射したところ、バリン濃度が他のアミノ酸に比べ著しく減少することが明らかになった。これらのことからポリペプチド鎖間の近接するバリン同士で架橋反応が生じている可能性が示唆された。

第5章：架橋ナノ粒子への薬剤の担持と薬剤徐放挙動の検討

得られた架橋ナノ粒子に抗がん剤であるメトトレキサート (MTX) とシスプラチンを担持させ、薬剤徐放挙動を計測した。ポリペプチド I 架橋ナノ粒子に疎水性の MTX を担持させ、10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2-7.4) 中 37°C で徐放させると初めの 2 時間で 8 割程度の薬剤が放出され、残りの 2 割は約 1 週間で徐々に放出された。グルタミン酸を含むポリペプチド II 架橋ナノ粒子のカルボキシル基にシスプラチンが塩基性条件下で配位し、シスプラチンを架橋ナノ粒子に安定に担持できること、また生理食塩水中では生理食塩水中の Cl⁻ と徐々に置換されることによりシスプラチンがポリペプチド鎖のカルボキシル基から解離し、少なくとも 1 週間以上持続的に徐放されることが見出された。

第6章：総括

α -エラスチンとモデルポリペプチド水溶液の昇温条件を検討することにより、⁶⁰Coガンマ線照射により薬剤徐放用担体に適したサイズの架橋ナノ粒子の作製が可能なることを初めて明らかにした。 α -エラスチンやポリペプチド II、III のように荷電アミノ酸を有する場合、溶液中での静電的相互作用がポリペプチドの凝集を妨げる要因となる可能性がある。しかし、溶液中の塩濃度を高め、昇温速度を低下させることにより、疎水性領域の凝集が可能となる。その結果、架橋ナノ粒子が得られる場合もある。逆に、ポリペプチド I のように非荷電アミノ酸から成るポリペプチドは、昇温速度が低いと凝集が過度に進み、適当なサイズの架橋ナノ粒子が得られない場合もある。この場合は逆に、急激な昇温の方がナノ粒子の生成に有利であると考えられる。

急激な昇温によるポリペプチド I の凝集体形成時には Type II β -turn 構造をとる分率が高くなることが明らかとなり、これがガンマ線照射による架橋ナノ粒子化に寄与する要因の 1 つである可能性が強く示唆された。分子動力学計算によるシミュレーションにおいてもポリペプチド鎖の凝集に伴い Type II β -turn 構造が現れ、放射線に対する反応性が高いバリ

ン、プロリンがより近接して配置されることが見出されたことは、 α -エラスチン分子鎖の疎水性領域が適切な昇温条件化で規則正しく配置されることにより、架橋反応が起こりやすい場が粒子内に形成されていると推測される。

審査結果の要旨

本学位論文は6つの章から構成され、第1章(序論)に続き、第2章では温度応答性を有する α -エラスチン水溶液に対して昇温速度とポリペプチドの凝集について検討し、4°Cから60°Cまで30分間かけて昇温させた凝集体に ^{60}Co ガンマ線照射することにより架橋ナノ粒子が得られることを見出した。第3, 4章では α -エラスチンの疎水性のモデルポリペプチド(GVGVP)₂₅₁に加え、荷電性アミノ酸、グルタミン酸、リジンを含むモデルペプチドについて同様に検討した結果、安定な架橋ナノ粒子生成には疎水性が重要であり、荷電性ペプチドについては溶液のイオン強度や昇温速度を最適化する必要があった。さらに(GVGVP)₂₅₁水溶液の架橋ナノ粒子生成の最適条件下では(GVGVP)特有のType II β -turn構造が見られることをCD測定や分子動力学計算により明らかにした。さらにポリペプチドの凝集時に ^{60}Co ガンマ線に対する反応性の高い疎水性アミノ酸、バリン、プロリンが接近する傾向にあることを見出した。第5章では抗がん剤、メトトレキセート(MTX)とシスプラチンを架橋ナノ粒子に担持させ、薬剤放出特性について調べた。第6章で研究結果を総括した。

近年、薬剤徐放用担体などを目的としたナノ粒子開発が医療、化粧品分野において期待されているが、これらの分野において注目されているエラスチンの温度応答性と架橋剤残留の恐れのない放射線架橋の組み合わせは独創的であり、今後の応用が期待される。本研究により、 α -エラスチンおよびモデルペプチドの温度応答性と放射線架橋を利用した安定なナノ粒子の生成条件が初めて明らかとなった。また昇温に伴うナノ粒子形成過程のポリペプチドにType II β -turn構造の形成を見出したことは架橋粒子の分子構造のさらなる解明の糸口となる興味深い知見である。

上記の研究成果は、 α -エラスチン及びエラスチンモデルペプチドに形成される分子集合体の性状と放射線架橋によるナノ粒子化との関係に新たな知見を加えるものである。さらに生体材料の加工とナノテクノロジー分野への応用に対する放射線利用の新たな可能性を拓くものでもある。これらの詳細な実験結果、考察が明確に記載され、論理的に結論が導かれており、研究内容の一部はすでに学術誌に掲載及び掲載予定であることから、学位論文として相応しいものと認められた。