

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム 再生医療等研究推進事業）

分担研究報告書

ベクターの機能化設計に関する研究

光応答性修飾金ナノクラスターのヘクターへの応用

分担研究者 大屋章二（国立循環器病センター研究所 生体工学部 室員）

#### 研究要旨

合成高分子系ベクターの分子工学的設計における高分子の機能化設計とシステム設計として、光カチオン発生基であるマラカイトグリーン基と金ナノ粒子を組み合わせたヘクター開発を行った。DNA との錯体形成および解離を光制御することによる高い遺伝子発現効率を目指した光応答性ベクターを新規に開発することを目的に、紫外光照射によってカチオンを生成し、遮光条件下で元に戻る性質を持つホトクロミノク分子として知られているマラカイトグリーンアルキルチオール化誘導体を新規に合成した。次にチオール化誘導体を金クラスターへ修飾することによってマラカイトグリーン修飾金クラスター型遺伝子キャリアーの開発を行い、紫外光照射によるホトクロミノク特性をマラカイトグリーン修飾金クラスターについて調べた。マラカイトグリーン基を利用することで、遺伝子導入機構の制御化能が獲得され、また、金ナノ粒子を用いることで遺伝子の体内での能動輸送化能が獲得できることになる。

研究協力者 舛田 健

国立循環器病センター研究所

生体工学部

#### A 研究目的

近年、人ゲノムの遺伝子解析が進むにつれ、今後ますます遺伝子治療の可能性やそれに対する期待感が大きくなっていくことは間違いない。遺伝子治療や遺伝子試薬が大きな支持を集めるためにはとこの塩基配列がどのような遺伝子の発現を担ってい

るかが同定され、その発現機構が解明された後に残される、いかにしてそれらの遺伝子を細胞内に導入し発現させるかという問題を解決することか必須条件となる。現在遺伝子を細胞内に導入するために使用されている遺伝子キャリアーにはウイルスヘクターと人工ヘクターがある。それぞれに長所と短所があるが、一般にウイルスヘクターは発現効率は高いか調製が困難であることと、何よりも安全性が証明されていないなどの問題点を有する。人工ヘクターに

はこれまで主にカチオン性高分子やカチオン性リポソームなどを中心に開発が行われてきたが、一般に発現効率かウイルスヘクターに較べて小さいことか主な欠点となっている。しかしながらウイルスヘクターに比へて安全性か高い人工ヘクターの開発は非常に重要な課題といえる。人工ヘクターの発現効率かウイルスヘクターに較べて小さい原因は、細胞内へ DNA の輸送を行った後 DNA を効果的に放出する機能かヘクターに備わっていないことか主な原因のひとつであると考えられる。これまでに本研究室では紫外光照射によってカチオンを生成し、遮光条件下で元の電氣的に中性な分子に戻る性質を持つホトクロミック化合物として知られるマラカイトグリーンを水溶性高分子に導入した光応答性ポリカチオン高分子ヘクターを開発し、DNA とのポリイオンコンプレックス形成および解離を光制御することに成功した。しかしながら高分子ヘクターは分子量や電荷数の分布を制御するのに高い合成技術を必要とすることか高分子体の構造および粒径制御などの難題か存在する。そこで本研究では適度な粒径を持ちサイズか均一な全クラスターをヘクターの基本骨格として、その表面にチオール基を介してマラカイトグリーン部位を導入したマラカイトグリーン修飾金クラスター型人工ヘクターの開発を行い、紫外光照射による DNA とのコンプレックス形成と熱異性化による DNA 放出という二つの機能を利用することによって高い遺伝子発現効率を有する新しい遺伝子導入システムを開発することを目的としている。

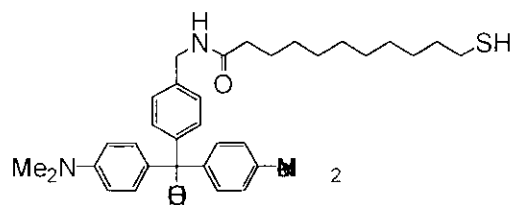
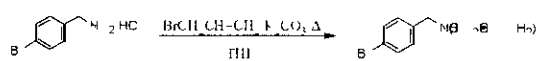


図 1 MG-SH

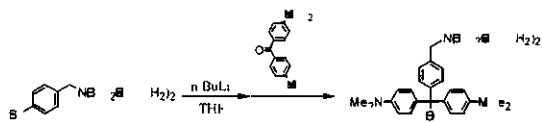


スキーム 1

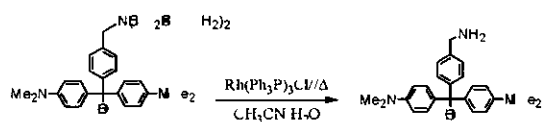
## B 研究方法

まず始めに我々は修飾金クラスター型ヘクターの分子設計を行った。修飾化合物の分子設計は、紫外光照射によりカチオン化への光異性化か進行する性質を有するマラカイトグリーンを基本骨格に、金クラスターへの吸着部位としてチオール基か導入された MG-SH をデザインした (図 1)。

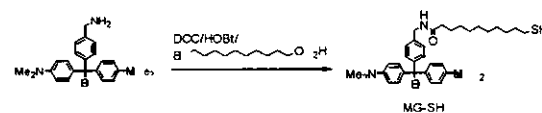
このマラカイトグリーン誘導体はチオール基とマラカイトグリーン部分との間を長鎖のアルキル基でつないているため、他の長鎖アルキル基を有するチオール誘導体と様々な比で混合した後金クラスターへの修飾を行えば、MG-SH の導入量を調整することか可能であり、その結果紫外光照射後に生成するカチオン化 MG-SH の量をコントロールすることによって DNA との相互作用を制御することか期待できる。以下に MG-SH の合成経路について示す。まず始めに 4-フロモベンシルアミン塩酸塩とアリルフロマイトを混合し、炭酸カリウム存在下 THF 中にて一晩加熱還流を行い一級アミノ基かアリル基で保護された *N,N*-アリル-4-フロモベンシルアミンを合成した (スキーム 1)。



スキーム 2



スキーム 3



スキーム 4

次に乾燥 THF 中にて 4-ブromo-*N,N*-シリアルベンシルアミンに *n*-ブチルリチウムを加えてリチウム試薬を生成させた後、ヒス(4,4-ジメチルアミノ)ヘンゾフェノンへの求核付加反応を行いマラカイトグリーン誘導体を得た(スキーム 2)。

得られたマラカイトグリーン誘導体は Wilkinson 触媒によるアリルアミノ基のエナミンへの変換に続く加水分解を経てアリル基が脱離した一級アミノ基を有するマラカイトグリーン誘導体へと変換された(スキーム 3)。

そして最後に得られたマラカイトグリーン誘導体と 10-メルカプトウンテカン酸とのカップリング反応を DCC-HOBt 法を用いて行い、目的とするアルキルチオール部位を有するマラカイトグリーン誘導体 MG-SH

を得た(スキーム 4)。

得られた MG-SH はまず金クラスターへの吸着および修飾を行う前に、紫外光照射による光異性化特性および熱異性化特性を有機溶媒中または水-有機溶媒中にて紫外可視吸光スペクトルを用いて調べた。次に MG-SH の全表面への吸着が可能であるか否かを調べるため MG-SH で金を真空蒸着した水晶版を修飾し、修飾金表面の X 線光電子スペクトル測定を行った。金クラスターへの MG-SH の吸着は既に粒径かわかっている(7 nm)金クラスターに修飾を行う場合は金クラスター表面に付着している保護剤を極性有機溶媒(アセトン、エタノールなど)中にて取り除いた後、得られた金クラスターと MG-SH を有機溶媒(クロロホルム、エタノールなど)中にて 24 時間攪拌後、遠心分離を行い金クラスター表面に吸着していない MG-SH を取り除いてから用いた。また金クラスターの調製と修飾を同時に行う場合はトルエン-水溶媒中でテトラクロロ水素金を相間移動触媒(*N,N,N,N*-テトラオクチルアンモニウムプロマイド)存在下にてトルエン層へ抽出後、MG-SH を添加し還元剤として水素化ホウ素ナトリウムを加えて攪拌を行い直接修飾金クラスターを調製し、有機層を分離した後溶媒を減圧留去して目的とする修飾金クラスターを得る。次に修飾金クラスターに紫外光を照射しその光異性化特性および熱異性化特性を MG-SH の光-熱異性化特性データとの比較検討を行いながら紫外可視吸光スペクトルを用いて評価した。そして、動的光散乱装置を用いて DNA の非存在下における修飾金クラスターの粒径測定を紫外光照射前後にて行った。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が発生した場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ホランティアを必要とする研究ではインフォームトコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

## C 研究結果

### C-1 MG-SH の合成

以下に MG-SH の合成方法について述べる。

#### C-1-1 *N,N*-ジアリル-4-プロモベンジルアミン

4-プロモベンジルアミン (2.50 g, 13.44 mmol) THF 溶液 (20 mL) にアリルフロマイト (200 mL, 3.0 eq) と炭酸カリウム (1.56 g, 1.5 eq) を加え、一昼夜加熱環流を行った。酢酸エチル (200 mL) と水 (100 mL×2) を加えて抽出を行った。有機層を硫酸マグネシウムで乾燥、濾過、濃縮後得られたオイルをシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル/n-ヘキサン=1/20) から精製し、オイル状の目的物を得た。化合物の確認は <sup>1</sup>H-NMR (クロロホルム-d) にて行った。収量 2.21 g 収率 74%

#### C-1-2 4- $\alpha,\alpha$ -ビス(4,4'-ジメチルアミノフェニル)ヒドロキシメチル-*N,N*-ジアリルベンジルアミン

*N,N*-シアリル-4-プロモベンジルアミン (2.21 g, 8.30 mmol) 乾燥 THF 溶液 (20 mL) に *n*-BuLi/ヘキサン溶液 (1.58 mol/L, 5.50 mL, 1.05 eq) を -78°C アルゴンカス雰囲気下にて攪拌しながら注射器を用いて滴下した。滴下後そのまま 1 時間攪拌を行った後、乾燥 THF (30 mL) に溶解したヒス(4,4'-ジメチルアミノ)ベンゾフェノン (1.80 g, 6.94 mmol) を -78°C アルゴンカス雰囲気下にてゆっくりと滴下した。滴下終了後遮光下にて徐々に室温に戻し一晩攪拌を行った。TLC にてヒス(4,4'-ジメチルアミノ)ベンゾフェノンの消失を確認後、溶媒を減圧留去し、水 (50 mL) を加えた後酢酸エチル (300 mL) にて抽出を行った。さらに有機層を水 (50 mL×2) で洗浄後硫酸ナトリウムで乾燥、濾過、濃縮を行いオイル状の残渣を得た。目的物の確認は <sup>1</sup>H-NMR (クロロホルム-d) にて行った。収量 1.20 g 収率 54%

#### C-1-3 4- $\alpha,\alpha$ -ビス(4,4'-ジメチルアミノフェニル)ヒドロキシメチルベンジルアミン

4- $\alpha,\alpha$ -ビス(4,4'-ジメチルアミノフェニル)ヒドロキシメチル-*N,N*-シアリルベンジルアミン (300 mg, 0.66 mmol) のアセトニトリル/水 (86/14) 溶液 (30 mL) にトリストリフェニルホスフィンロンウムクロライド (20 mg, 0.2 eq) を加え、加熱還流を開始した。2 時間後水-アセトニトリル溶液を滴下漏斗にて徐々に加え、反応系内の溶媒の量を一定に保ちながら加熱蒸留

を行った。2 時間後反応を停止した。TLC (クロロホルム/メタノール=5/1) にて原料の消失および新しいスポットを確認後アセトニトリルを減圧留去した。水層に 1 M 塩酸 (50 mL) を加え、クロロホルム (50 mL ×3) で洗浄を行った。水層を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液で中和後クロロホルム (50 mL ×3) で抽出を行い、有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、濾過、減圧留去を行った。化合物の確認は  $^1\text{H-NMR}$  (クロロホルム-d) にて行った。収量 240 mg、収率 97%

#### C-1-4 MG-SH

4- $\alpha,\alpha$ -ヒス(4,4'-ジメチルアミノフェニル)ヒドロキシメチルベンシルアミン (410 mg, 1.09 mmol) および 11-メルカプトウンデカン酸 (250 mg, 1.05 eq)、HOBT (221 mg, 1.5 eq) を含む塩化メチレン溶液 (10 mL) にトリエチルアミン (228  $\mu\text{L}$ , 1.5 eq) を加え、DCC (270 mg 1.2 eq) の塩化メチレン溶液 (5 mL) を水冷下 0°C にて滴下した。滴下終了後 そのまま室温にまで徐々に一晩攪拌を行い TLC (移動相 クロロホルム/メタノール=5/1) にて反応の進行を確認後溶媒を減圧留去した。化合物の精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (移動相 クロロホルム/メタノール=5/1) にて行った。目的物の生成は  $^1\text{H-NMR}$  (クロロホルム-d) より確認した。収量 420 mg、収率 20%

#### C-2 MG-SH の紫外可視吸収スペクトル

MG-SH の分光学的性質を紫外可視吸収スペクトルを用いて調べた。実験は MG-SH の塩化メチレン溶液 ( $1.0 \times 10^{-5}$  M) を石英

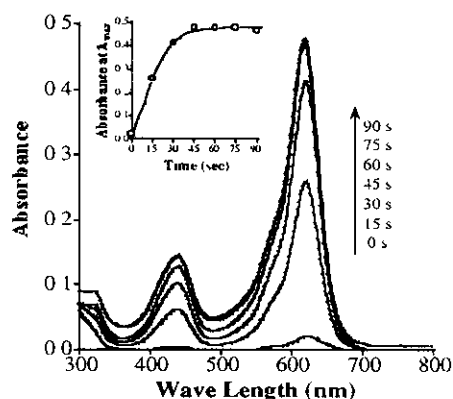


図 2 塩化メチレン中における MG-SH の紫外可視吸収スペクトル。0 s UV 照射無し、15 s ~ 90 s UV 照射。

セル(光路長 1 cm)に注ぎ、攪拌させながら 360 nm 以下の波長をカットした紫外光 (1.00 w/s) を 15 秒ごとに照射した(図 2)。

図 2 より MG-SH は MG と同様に UV 照射に伴って、ロイコ体からマラカイトグリーンカチオンへの光異性化に由来する 620 nm 付近における極大吸収の増加が見られたが、45 秒後にはほぼ異性化は飽和に達することか解った。またその吸収帯におけるモル吸光係数はおよそ 47000 であった。そこで次にマラカイトグリーンカチオンからロイコ体への熱異性化を遮光下、40°C にて紫外可視吸収スペクトル観測を行った。しかし 120 分間観測を続けたところ 620 nm における吸収に減少は見られず ほぼマラカイトグリーンカチオンのままでロイコ体への熱異性化が進まないことか解った。エタノール中でも同様に測定を行ったかロイコ体への反応は進行しなかった。そこで次に水-DMSO 溶液 (10%水-DMSO 溶液および 50%水-DMSO 溶液) 中において MG-SH

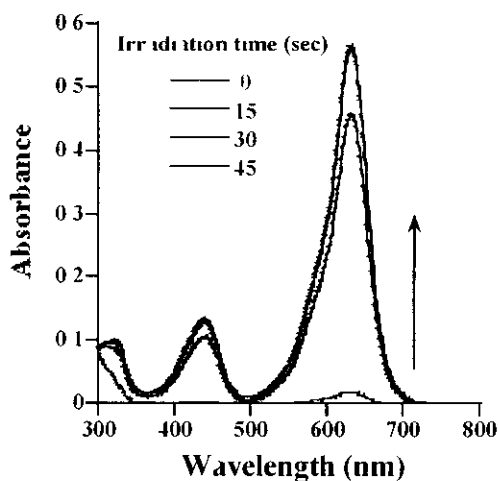


図3 10%水-DMSO 溶液中における MG-SH の紫外可視吸収スペクトル。0 s UV 照射無し 15 s~45 s UV 照射

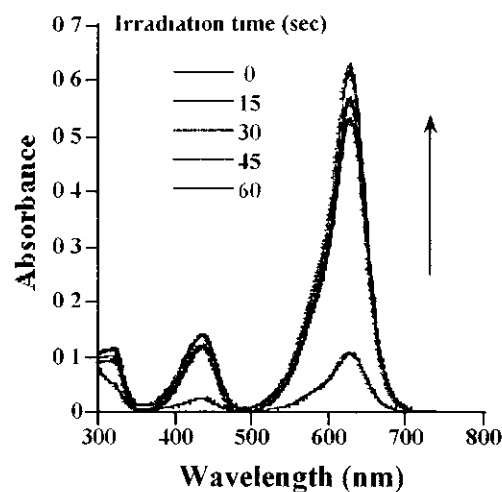


図5 50%水-DMSO 溶液中における MG-SH の紫外可視吸収スペクトル。0 s UV 照射無し 15 s~60 s UV 照射

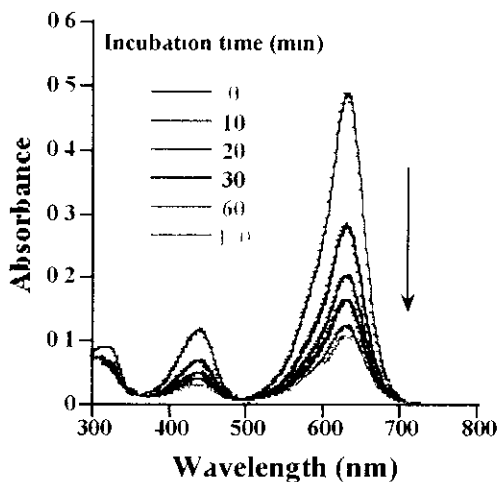


図4 10%水-DMSO 溶液中における MG-SH の紫外可視吸収スペクトル。温度 40°C

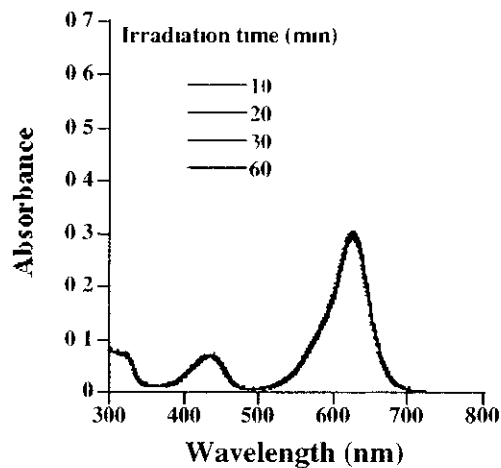


図6 50%水-DMSO 溶液中における MG-SH の紫外可視吸収スペクトル。温度 40°C

の紫外光照射によるカチオン体への光異性化と熱異性化によるロイコ体への逆反応について検討を行った。

図3より MG-SH は 10%水-DMSO 溶液中ではロイコ体からマラカイトグリーンカチオンへの光異性化が 30 秒後にはほぼ

異性化は飽和に達することかわかった。さらにロイコ体への熱異性化はおよそ 75%まで進行し、約 60 分てほぼ飽和に達することかわかった(図4)。50%水-DMSO 溶液中でもロイコ体から MG カチオンへの光

表 1 ESCA 測定による MG 修飾金表面の表面分析

サンプル	原子 (測定軌道)				S/C	N/C
	C (1s)	O (1s)	N (1s)	S (2p)		
Au+ 石英板	7.12	8.45	0.48	0.00	0	0.067
	実測値	理論値			—	—
1 mM 洗浄	26.30	9.57	3.40	1.11	0.042	0.129
	実測値	理論値			0.028	0.083
1 mM 未洗浄	31.33	10.45	2.39	0.84	0.027	0.076
	実測値	理論値			0.028	0.083
0.1 mM 洗浄	41.93	14.92	3.74	1.35	0.032	0.089
	実測値	理論値			0.028	0.083
Neat <sup>b)</sup>	81.09	5.64	7.90	2.74	0.034	0.097
	実測値	理論値			0.028	0.083

a)クロロホルム中にて 24 時間保存後クロロホルム洗浄および真空乾燥を行った。b)金基板を Piranha 溶液で洗浄後 MG-SH (10 mg) を載せ クロロホルムにて溶解、コーティングを行い室温にて 3 時間真空乾燥を行った

異性化速度は 10%水-DMSO 溶液中での挙動とほとんど変わらなかった (図 5)。

しかしながら 50%水-DMSO 溶液中ではマラカイトグリーンカチオンからロイコ体への熱異性化は非常に速く 測定開始から 10 分後には既に逆反応は平衡状態に達しており、およそ 50%までロイコ体への熱異性化が進むことがわかった (図 6)。以上の結果より MG-SH 修飾金クラスターの紫外可視吸収スペクトル測定も水-DMSO 系溶媒中に行うことにした。

### C-3 ESCA 測定による MG-SH 修飾金表面の表面分析

MG-SH の金表面への吸着を調へるため金を真空蒸着した水晶板に MG-SH で修飾を施し、修飾金表面の ESCA スペクトル測定を行った。実験はまず金表面上に付着した有機物等を取り除き金表面を清浄化するため、Piranha 溶液 (濃硫酸 30%過酸化水溶液=3:1) に 10 分間浸漬後 純水で洗浄、室温、減圧下にて乾燥を行い未修飾金表面を調製した。次に MG-SH のクロロホルム溶液 (10 mM および 0.1 mM) 中に金基板を浸し、24 時間遮光下 室温にて静置した。24 時間後修飾金基板を取り出し、クロロホルムで洗浄後 3 時間真空乾燥を行った後 ESCA スペクトルによる表面分析を行った。また比較としてガラス表面上に直接 MG-SH をコーティングしたサンプルについても同様に ESCA スペクトル測定を行った (表 1)。

修飾を行っていない金基板では炭素のピークについて著しい減少が見られた。それに対して修飾を行った基板に関しては、はっきりとした炭素ピークが観測された。そして酸素の検出量があまり変わらないことや非常に微量ながら窒素や硫黄に相当すると見られるピークも見られたこと さらには直接コーティングを行ったサンプル (測定後はコーティング表面全体が濃緑色に変化) との比較において構成元素比によく似た傾向が得られたことなどから金基板上において MG-SH が吸着していると判断することかてきた。

#### C-4 MG-SH 修飾金クラスターの紫外可視吸収スペクトル

MG-SH 修飾全クラスターの紫外光照射に対する紫外可視吸収スペクトルのスペクトル変化について調べた。実験は MG-SH 修飾金クラスターのエタノール溶液 (50 mg/mL, 20  $\mu$ L) を 10%水-DMSO 溶液または 50%水-DMSO 溶液 (30 mL) に添加し、石英セル(光路長 1 cm)内にて攪拌子で回転させながら 360 nm 以下の波長をカットした紫外光 (1.00 W/s) を 1 分ごとに照射した。MG-SH 修飾全クラスターでは期待される 620~630 nm 付近におけるマラカイトグリーンカチオンに由来する吸収体は観測されなかった。しかしながら、修飾コロイドをエタノール中に放置しておくことで溶液次第に緑色を示すことや IR スペクトルの結果からも、金クラスター表面に MG-SH が吸着していることが確認できた。紫外可視吸収スペクトル測定サンプルは DMSO 中においても大部分が粒子として沈殿するためスペクトル吸収を示す修飾金コロイドの分子数が少ないと考えられる。そこで有機溶媒と修飾金コロイドとの親和性を向上させることを目的に MG-SH で金クラスター表面を修飾後再び 2-メルカプトエタノールで修飾を行い、修飾金コロイドの紫外光照射に対するスペクトル変化を測定した。実験方法を次に示す。全コロイドのトルエン溶液 (231  $\mu$ g/100 mg) をアセトン (30 mL) 中へ攪拌しながら加え、10 分間室温にてそのまま攪拌を続けた。アセトン懸濁液をエノペントルフチューブに移し、遠心分離後アセトン除去、再びアセトン (10 mL) で懸濁してこの行程を 5 回繰り返した。最後にエタノール洗浄してからエタノール懸濁液 (20 mL) にメンブランフ

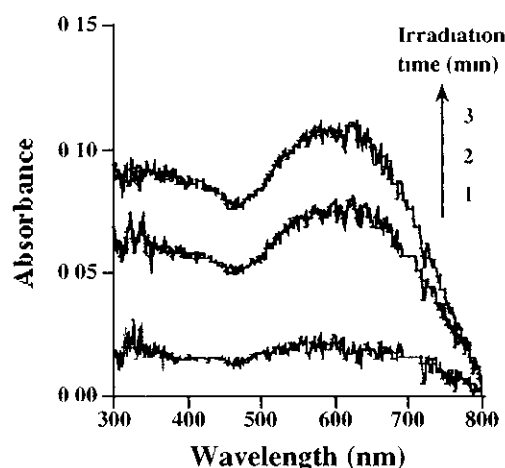


図 7 10%水-DMSO 溶液中における修飾全クラスターの紫外可視吸収スペクトル。

ィルターを通した MG-SH のエタノール溶液 (3.66 mg/mL) を攪拌しながら滴下し、遮光下にて 24 時間攪拌を行った。その後 2-メルカプトエタノール (4.35  $\mu$ L, 10 eq) を加え再び遮光下にて 24 時間攪拌を行った。攪拌後懸濁液を遠心分離、上澄み除去後エタノール (10 mL) を加え、数回遠心分離操作を繰り返した。最後にエタノール (10 mL) を加えた懸濁液から 10 または 20  $\mu$ L を採取し、10% (または 50%) 水-DMSO 溶液 (30 mL) に加えてこれを UV 測定サンプルとした。石英セル (光路長 1 cm) 中にてスターラーで攪拌させながら 340 nm 以上の波長をカットした紫外光 (1.00 cmW/s) を 1 分間または 1.5~3 分間ごとに照射し、それぞれについて紫外可視吸収スペクトル測定を室温下 (25 $^{\circ}$ C) にて行った。

図 7 および図 8 より非常に弱いながらも、どちらの測定条件においても 620 nm 付近におけるロイコ体からマラカイトグリーンカチオンへの光異性化に由来する極大吸収の増加が見られたか、MG-SH 単独で測定を



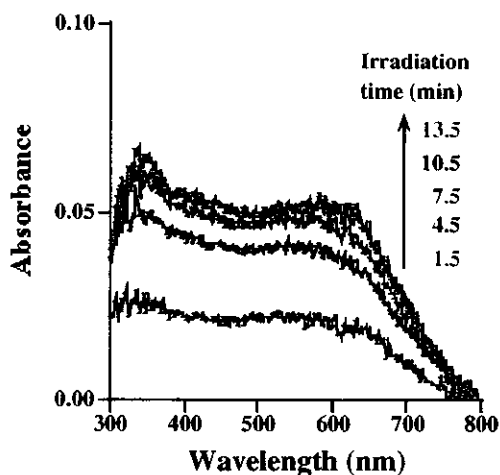


図 8. 50%水-DMSO 溶液中における修飾金クラスターの紫外可視吸収スペクトル。

行ったときの異性化速度に較べてカチオン体の生成が飽和に達するまでに要する時間に大きな増加が見られた。

#### C-5. 修飾金クラスターの粒径測定

次に MG-SH 修飾金クラスターの粒径測定を動的光散乱装置を用いて行った。測定は修飾前の金クラスターの保存状態と同様にトルエン中にて行った。得られた未修飾金クラスターの粒径は 1 から 20 nm ぐらいでの分布が見られ、ほぼ 7 nm 付近に収束していることがわかった。しかしながら、MG-SH 修飾金クラスターでは 90 から 200 nm 程の大きさにまでクラスターの巨大化が起こっていることがわかった。超音波による巨大クラスターの粉碎を試みたがその後の測定でも粒径に変化は無かった。水溶液中で測定を行うとさらに大きなクラスターを形成していることがわかった。

#### D. 考察

本研究では DNA とのポリイオンコンプレックス形成を光制御することにより細胞内にて DNA を効率よく放出し、高い遺伝子発現効率を可能とした光応答性ベクターを新規に開発することを目的としている。そこで可視光照射によってカチオンを生成し、遮光条件下で元に戻る性質を持つホトクロミック分子として知られているマラカイトグリーンのアルキルチオール化誘導体を新規に合成した。そしてチオール基の金分子への吸着を利用して得られた MG-SH を用いて金クラスターの修飾を行うことによってマラカイトグリーン修飾金クラスター型遺伝子キャリアの開発を試みた後、得られた MG-SH および MG-SH 修飾金クラスターの紫外光照射によるホトクロミック特性について調べた。まず合成した MG-SH は有機溶媒または水-有機溶媒中のどちらの条件下でも紫外光照射によりマラカイトグリーンカチオン体への光異性化を示すが、有機溶媒単独では遮光条件下におけるカチオン体からロイコ体への熱異性化はほぼ MG カチオンのままで逆反応が進行しないことが解った。この原因としては有機溶媒中ではロイコ体への異性化に必要な水酸化物イオン (-OH) の量が少ないためロイコ体への異性化が促進されないということが考えられる。その結果 10%水-DMSO 溶液中ではロイコ体への逆反応が進行し、その反応速度は 10%水-DMSO 溶液中ではさらに加速された。修飾金コロイドで異性化に要する時間が大幅に増加する原因はクラスターが巨大化するため紫外光がクラスターを透過せず、クラスター全体に光が当たるのに時間がかかることが考えられる。粒径測定から金クラスターが巨大化していることが

わかったが、この巨大化が MG-SH による修飾が原因なのかそれとも修飾前における保護剤の除去が原因なのかを調べたところ、アセトン中にて保護剤を除去した直後で既に未修飾金クラスターの巨大化が起きていることがわかった。この結果から金クラスター表面の保護剤を除去するとすぐにクラスターの凝集が起きることがわかる。また巨大化した金クラスター同士の凝集も水溶液中では見られたがこれは修飾金クラスターの表面を有機化合物が覆っているためであると考えられる。これらの問題点を解決するためには今後目的とする修飾金クラスターを MG-SH 存在下にてテトラクロロ水素化金を直接還元することにより調製する方法が有効であると考えられる。また MG-SH と親水性基を有するアルカンチオールを混合した系で修飾を行うことにより水に対してより親和性を持つ修飾金クラスターを調整することが可能であり、その場合ある程度クラスターの凝集を防ぐことができると考えられる。現在 DNA 存在下における DNA とのコンプレックス形成挙動の評価を粒形測定より行っており、DNA と MG-SH 修飾金クラスターのコンプレックス形成における量論比やクラスター表面に生成する電化数の最適化の検討を行っている。

## E. 結論

本研究ではまず可視光照射によってカチオンを生成し、遮光条件下で元に戻る性質を持つホトクロミック分子として知られているマラカイトグリーンのアルカンチオール化誘導体：MG-SH を新規に合成した。次に MG-SH の紫外光照射に対するカチオン体への異性化挙動を紫外可視吸光スペクトルを測定することにより調べた。その結果

水-DMSO 系溶媒中ではまずカチオン体への光異性化はおよそ 45 秒で飽和し、40℃におけるロイコ体への熱異性化は 75%ほどにまで戻ることがわかった。MG-SH 修飾金コロイドでも水-DMSO 系溶媒中ではカチオン体への光異性化が起きることから、MG-SH 修飾金コロイドは DNA 存在下では DNA とポリイオンコンプレックスを形成した後遺因子キャリアーとして細胞内へ DNA を輸送し、熱異性化によりポリイオンコンプレックスが崩壊することによって DNA を効率的に放出することが期待される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. T. Kawada, Y. Nakayama, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, *Biomaterials*, 2002, 23, 3169-3174.
2. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: heparin conjugated with poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus, *Langmuir*, 2002, 18, 4862-4872.
3. T. Masuda, Y. Nakayama, Development of a water-soluble matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty, *J. Med. Chem.*, 2003, in press.

## 2. 学会発表

1. 舛田健、中山泰秀、MMP 阻害薬の水溶性高分子化設計による血管傷害治療の促進化、第 51 回**高分子学会年次大会** (パシフィコ横浜)、2002 年 5 月 30 日
2. Masuda T, Nakayama Y, Drug material design for balloon angioplasty and stenting: Development of water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor. **European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference** (Winner), 2002, Aug. 30th.
3. Ohya S, Nakayama Y, Matsuda T, Matrix design in tissue engineering: In vitro and in vivo evaluation of thermoresponsive gelatin for cell scaffold. **European Society for Artificial Organs (ESAO) 2002 XXIX Conference** (Winner), 2002, Aug. 28th.
4. 大屋章二、中山泰秀、木戸秋悟、松田武久、AFM によるポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) 化ゼラチンゲルの超微細構造・物性測定とマトリックス機能との相関、第 24 回**日本バイオマテリアル学会** (早稲田大学国際会議場)、2002 年 11 月 29 日
5. 舛田健、庄田香織、中山泰秀、MMPI ポリマーの細胞遊走・増殖抑制効果と血管形成促進剤としての可能性、第 24 回**日本バイオマテリアル学会** (早稲田大学国際会議場)、2002 年 11 月 29 日
6. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、機能性人工細胞外マトリックス設計：感温

性ゼラチンの *in situ* ゲル硬化性 Scaffold 材料への応用、第 31 回**医用高分子シンポジウム** (上智大学)、2002 年 8 月 1 日

7. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、再生医療を目指す *in situ* 感温ゲル化性 Scaffold 材の開発、第 40 回**日本血管内治療学会** (札幌京王プラザホテル)、2002 年 10 月 3 日
8. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、再生医療における 3 次元人工細胞外マトリックス設計：感温性ゼラチンの分子設計とマトリックス材料としての機能評価、第 2 回**再生医療学会** (神戸国際会議場) 2003 年 3 月 11 日
9. 内藤洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、中山泰秀、巽英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、感温硬化性ゼラチンを用いた心筋細胞三次元培養の試み、第 2 回**再生医療学会** (神戸国際会議場) 2003 年 3 月 11 日

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

特になし



ベクターのシステム化に関する研究1：

生体内分解性高分子の開発

分担研究者 中山 敦好（行政独立法人 産業技術総合研究所人間系特別研究体 主任研究員）

研究要旨

遺伝子の局所送達化デバイスの遺伝子包埋層ならびにデバイス基材として用いる材料として、生分解性を有する高分子化合物の開発を行っている。柔軟性を有するものとペースト状のものとを合成した。柔軟性を有するものとして $\beta$ -メチル- $\delta$ -バレロラク톤を10-20%含有するポリ L-乳酸共重合体を合成した。 $\beta$ -メチル- $\delta$ -バレロラク톤の含有率が高いほど弾性に富むが、柔軟性と引っ張り強度とは相反する傾向にあり、柔軟性・強度のバランスを取ることが重要である。ペースト状の材料としては $\epsilon$ -カプロラク톤/ $\delta$ -バレロラク톤系コポリエステルとグリシドール含有ポリエステルを合成した。これらは良好な生分解性を示した。柔軟性を有するものは遺伝子導入デバイスの基材として、またペースト状のものは遺伝子を包埋層として利用を検討している。

A. 研究目的

遺伝子導入ベクターを担持させるための素材開発を行う。本開発により、作成された遺伝子導入ベクターを効率的に必要箇所にて機能を発現させることが可能となる。

生分解性ポリエステルはバイオメディカル分野以外にも農林園芸分野や包装材料分野など幅広い分野で注目されている。しかしながら、機能化に関してはまだ研究報告は少ない。機能化には生分解性の主鎖に置換基として機能性基を導入することが最も有効と考えられ、その足がかりとして水酸基の導入を考えた。水酸基は例えば酸塩化物をもつ生理活性物質と反応し、エステル結合を介して主鎖に導入される。こうしたポリマーは生体中においてエステル結合の加

水分解により、主鎖、側鎖共に分解し、徐放性、生分解性材料兼医薬として機能すると期待される。そこで水酸基を有する生分解ポリエステルを中心にペースト状のもの、柔軟性を有するフィルム化できるものの合成を行った。

B. 研究方法

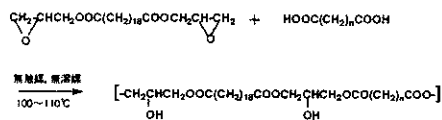
遺伝子導入ベクターを担持させるための材料開発としてラク톤、ラクチドなどの材料を出発物質とした開環重合法やオキシラン類と酸無水物との交互共重合によるコポリエステル、ポリエステル類の合成、オキシラン類とラク톤との組合せによるコポリエステルエーテル等の合成を行った。各種組合せ、各種組成からなる材料の性能評価を強度特性、熱特性、生分解特

性の面から行った。

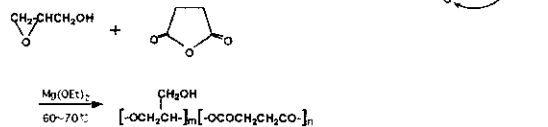
### B-1. 水酸基を有するポリエステルの重付加による合成

水酸基を有するポリエステル類の合成は2つのルートで検討した。(スキーム 1) その一つは長鎖二価脂肪酸のジグリシジルエステル化合物と二価脂肪酸類との重付加による方法であり、もう一つは次の項で報告するグリシドールと酸無水物やラクトン類との開環共重合法である。

#### 1. ジグリシジルエステル体とジカルボン酸の重付加



#### 2. グリシドールと無水コハク酸との開環共重合



(スキーム 1)

ジグリシジルエステル化合物としてはメチレン鎖 18 のエイコサン二酸のジグリシジルエステルを、ジカルボン酸としてはメチレン鎖 1 のマロン酸からアジピン酸、アゼライン酸、エイコサン二酸まで各種ジカルボン酸を用いた。重合は 100-130°C で無触媒でバルク重合で合成した。これらはテトラヒドロフラン、クロロホルム、石油エーテルなどを使い、再沈殿法により精製した。

### B-2. 水酸基を有するポリエステルの開環共重合による合成

グリシドールと酸無水物やラクトン類との開環共重合によるポリエステル合成として、酸無水物は無水コハク酸を、ラクトン類として  $\epsilon$ -カプロラクトンを用いた。開始剤としてマグネシ

ウムエトキシド、水酸化ナトリウム等を用い、50-70°C にて合成した。得られたポリマーはクロロホルム-メタノール混合溶媒などを用いて精製した。

### B-3. 柔軟な生分解性フィルム材料の合成

L-ラクチドと  $\beta$ -メチル- $\delta$ -バレロラクトン をモル比 60/40 から 90/10 の仕込み比で混合し、0.5mol% のテトラフェニルスズを触媒として用いて、150°C、3 日間重合を行った。クロロホルム/メタノールで再沈殿にて精製し、その 20wt% クロロホルム溶液を水平面を確保したシャーレ上に塗布し、キャストフィルム化した。その他の材料として、 $\alpha$ -ピロリドン等もモノマーとして用いた。

### B-4. ポリエステル主鎖上の水酸基の修飾

カルボン酸を塩化チオニルで酸クロリドに変換し、ピリジン中、氷浴にて反応させた。導入置換基としてアセチル基、プロピオニル基等の脂肪族基、安息香酸、p-メトキシ安息香酸等の芳香族置換基を用いた。

### B-5. ポリマーのキャラクタリゼーション

得られたポリマーのキャラクタリゼーションは NMR、IR、DSC、GPC 等により行った。

### B-6. 生分解性試験

酵素加水分解試験と活性汚泥分解試験を行った。酵素加水分解試験ではリン酸バッファー中にて主として *Rhizopus arrhizus* 由来のリパーゼを用いて 37°C、24 時間の分解試験を行い、分解によって生成した水溶性有機物の濃度を TOC 測定装置にて定量した (図 1)。100% 加水分解・水溶性化した値で除して分解度を求めた。また、活性汚泥分解試験では図のような装置を用い、無機培地中にて標準活性汚泥を用いて分

解実験を行い、分解によって生成した二酸化炭素量を無機性炭素濃度として TOC 測定装置で定量した。

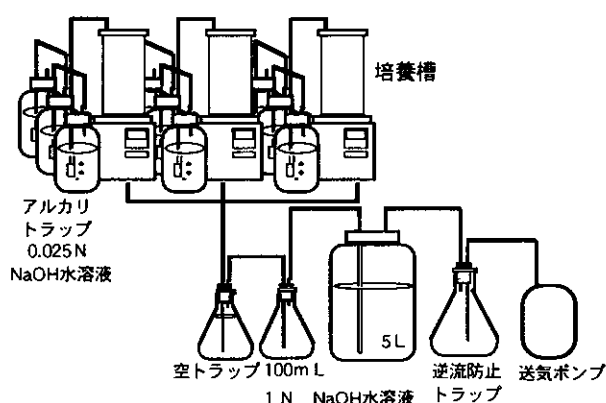


図 1. 生分解性評価システム

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究ではインフォームドコンセントを行った上で協力をお願いする。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

## C. 結果と考察

### C-1. 水酸基を有するポリエステル加重による合成

加重によるポリエステル合成はエイコサン二酸ジグリシジルエステルとジカルボン酸としてリンゴ酸、マロン酸、アジピン酸、アゼライン酸、セバシン酸、ドデカン二酸、エイコサン二酸を用いて行った。ポリマーは白色粉末として得られ分子量は 2400~7000 程度と比較的低いがこれは仕込みのモル数を正確に合わせることが困難であることが原因である。しかしながら、融点は 70~80℃程度を示した (表 1)。

Table. 1 Characterization of polyesters having side chain

Dicarboxylic acid (monomer)	Polyesters having OH		Acetylated Polyester	Polyester
	Tm (°C)	Mn	Tm(°C)	Tm(°C)
1 MAL	76	2400	54	50
2 M	89	2900	51	18
3 AZ	68	3900	50	38
4 SEB	68	3700	43	19
5 DDA	68	7000	37	38
6 OD	83	4100	47	49

1. MAL: L-Malic acid,  $\text{HOOC}-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})-\text{COOH}$

2. M : Malonic acid,  $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{COOH}$

3. AZE : Azelaic acid,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_7-\text{COOH}$

4. SEB : Sebacic acid,  $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_8-\text{COOH}$

5. DDA: 1,10-Decanedicarboxylic acid,

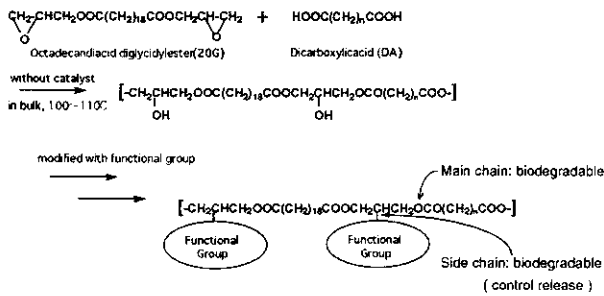
6. ODA: 1,18-Octadecanedicarboxylic acid,

$\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}-\text{COOH}$

Table.2 Polyesters having ester side chain

Reagent	Chemical structure
Acetyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOC(CH_3)_2)COO-]$
Propionyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOCCH_2CH_3)COO-]$
Hexanoyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOC(CH_2)_4CH_3)COO-]$
Benzoyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOCPh)COO-]$
p-Anisoyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOCPh-OCH_3)COO-]$
p-Nitrobenzoyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOCPh-NO_2)COO-]$
Ethyl succinyl chloride	$[-CH_2CHCH_2OOC(CH_2)_{18}COOCH_2CH(CH_2OOC_2H_4CO_2C_2H_5)COO-]$

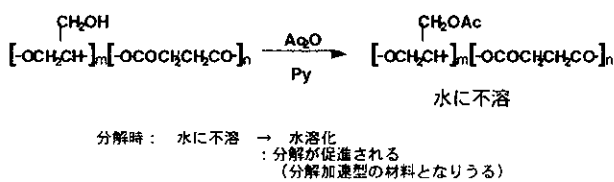
得られたポリマーの水酸基の修飾をアセチル化、プロピオニル化として行くと Tm はかなり低下し、アセチル化では 37~54℃、プロピオニル化では 18~50℃となり、水素結合の消失に伴う融点低下が起こったと推察される。その他の置換基導入も検討した。ヘキサノイル化、ベンゾイル化、アニソイル化は容易に進んだが、p-ニトロベンゾイル化とエチルスクシニル化は一部しか起こらなかった (表 2)。また、農業として知られる 2,4-ジクロロフェノキシ酢酸化も行うことができる。



(スキーム 2)

Table.3 Copolymerization of glycidol and succinic anhydride with Mg(OEt)2

Feed(G/SA)	Polym.Comp (G/SA)	Yield (%)	Form
50/50	50/50	>90	Paste
67/33	58/42	>90	paste
75/25	69/31	>90	paste
100/0	100/0	66	paste



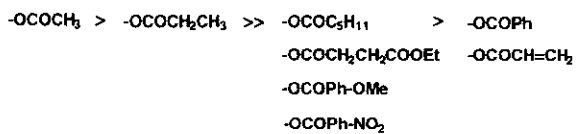
(スキーム 3)

Table 4 Enzymatic hydrolysis of copolyesters having side with lipase from *Rhizopus arrhizus*

Sample	C-number	TOC (ppm)		
		OH type	OSc type	OPr type
20G/MAL	4	40	520	330
20G/M	3	10	160	~0
20G/AZE	7	500	660	330
20G/SEB	8	20	300	~0
20G/DDA	10	100	440	120
20G/ODA	20	140	270	200

アセチル化体においては分解はかなり速く、これは水素結合の消失と側鎖アセチル基の優先的分解によると考えられる。その他の側鎖の分解性は定性的にはスキーム 4 に示した通りである。

各種側鎖の分解性



(スキーム 4)



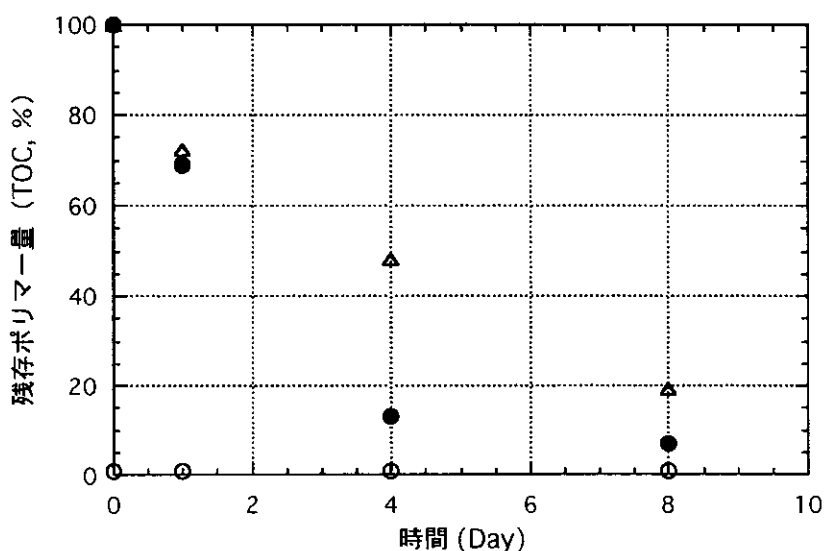


Figure Biodegradation of poly(glycidol-co-succinic anhydride)s using activated sludge. ○ ; control, ● ; G/SA=1/1, △ ; G/SA=3/1.

### C-2. 水酸基を有するポリエステルの開環共重合による合成

グリシドールと無水コハク酸の重合により得られる共重合体はコポリエステルエーテルであり、グリシドールと無水コハク酸の反応性の違いにより、得られたポリマーはグリシドール成分がややリッチであった。例えば、仕込み比がグリシドール 67/無水コハク酸 33 の場合、共重合体中の組成比はグリシドール成分 58 に対し、無水コハク酸成分 42 と、無水コハク酸成分が増加した。しかしながら、無水コハク酸はポリマー中に最大 50%までしか導入できず、これはポリマー鎖中に酸無水物結合が存在しないことを意味する。

ポリマーは全ての組成においてペースト状で水溶性であった。<sup>1</sup>H-NMR スペクトル解析から構造はスキームに示すような 1,2-位での結合の他に 1,3-位での結合も確認され、側鎖としてはヒドロキシメチレン基と水酸基の 2通りがあることがわかった。これらの側鎖水酸基はアセチル化を容易に受け、水に不溶化する。この性質

を用いれば分解の進行に伴い、(脱アセチル=水溶性化)による生分解の加速化が可能である。

### C-3. 生分解性の評価

リン酸バッファー水溶液(pH7.0)2ml 中にポリマー25mg を入れ、リパーゼ (*Rhizopus arrhizus*) 200unit による加水分解試験を行った。37°C24 時間の分解試験の後、0.2 ミクロンフィルターでろ過した後、水溶性有機物濃度測定し、表 4 のような結果を得た。OH タイプの生分解性試験結果から主鎖が短いものも長いものも分解性は低く、メチレン鎖長が7前後が最もよく分解した。

グリシドール/無水コハク酸系ポリマーは水溶性のため酵素加水分解による TOC (水溶性有機物濃度) 測定は不可であるため、JIS K6951 に準拠した活性汚泥を用いた分解法にて評価した。Fig. 2 からわかるように、組成に関わらずその分解はきわめて速いことがわかった。

## DE. 考察と結論

柔軟性に富んだコポリエステルフィルムを調製した。これらはモノマー、仕込み比を変えることで強度、弾性をコントロールすることができる。また、水酸基を持つポリエステル類を調製し、その水酸基が酸塩化物で修飾できることを示した。長鎖ジカルボン酸のジグリシジルエステルを原料とするものは Tm60℃前後の白色粉末であったが、グリシドール系のポリエステル及びコポリエステルエーテル類はペースト状で親水性に富む。グリシドール/ε-カプロラクトン系ではカプロラクトン量を増やすことによって不溶化させることも可能であった。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, I. Arvanitoyannis, H. Zhu, S. Aiba, "Chemical modification of chitosan 12: Synthesis of organo-soluble chitosan derivatives toward palladium adsorbent for chemical plating", Chem. Lett., 598-599 (2002)
2. H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, H. Zhu, H. Nagano, Y. Omura, H. Saimoto, Y. Shigemasa, S. Aiba, "Chemical modification of chitosan 13: Synthesis of organo-soluble, palladium adsorbable, and biodegradable chitosan derivatives toward the chemical plating on plastics", Biomacromolecules, 3, 1120-1

125 (2002)

3. H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, N. Yamamoto, S. Aiba, "Chemical modification of chitosan 14: Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation", Biomacromolecules, 3, 1126-1128 (2002)
4. H. Sashiwa, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, S. Aiba, "Dissolution of chitosan in hexafluoro-2-propanol", Chitin and Chitosan Research, 8, 249-251 (2002)
5. H. Sashiwa, S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki, K. Hiraga, K. Oda, S. Aiba, "Production of N-acetyl-D-glucosamine from α-chitin by crude enzymes from *Aeromonas hydrophila* H-2330", Carbohydr. Res., 337, 761-763 (2002)
6. S.Pivsa-Art, A. Nakayama, N. Kawasaki, N. Yamamoto, S. Aiba, "Biodegradability study of copolyesteramides based on diacid chlorides, diamine, and diols", J. Appl. Polym. Sci., 85, 774-784 (2002)

### 2. 学会発表

1. 中山敦好、川崎典起、山野尚子、山本 襄、相羽誠一、ウレタン結合の生分解性、高分子学会年次大会 (H14.5)
2. 中山敦好、生分解性プラスチックの適正使用のための分解菌データベース作成、産技

連物質工学部会高分子分科会 (H14.11)

3. 中山敦好、川崎典起、山本 襄、耐熱性生分解性高分子ナイロン 4 の開発、AIST 講演会 (H14.11)
4. A. Nakayama, N. Kawasaki, N. Yamano, N. Yamamoto, S.Murakami\* and S. Aiba, Biodegradability of Urethane bonds, IUPAC symposium (H14.12)
5. N. Yamano, A. Nakayama, N. Kawasaki, N. Yamamoto, and S. Aiba Nylon-4 Degradation by Bacteria Isolated from Activated Sludge, IUPAC symposium (H14.12) .
6. 中山敦好、生分解性プラスチックのデータベース構築、関西バイオポリマー研究会(H15.1).

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

