

遺伝子や造影剤を細胞へ送達するリン酸カルシウム ナノ粒子の簡便・迅速な作製技術の開発

国立研究開発法人 産業技術総合研究所

中村 真紀, 大矢根 綾子

Simple and Rapid Fabrication Techniques of Calcium Phosphate Nanoparticles for Delivering Genes and Imaging Agents

Maki Nakamura, Ayako Oyane

National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

1. はじめに

ヒトの硬組織の無機成分であるリン酸カルシウム (CaP) のナノ粒子 (本稿では直径 1 ~ 1000 nm の粒子とする) は, 非毒性で生体親和性に優れること, 細胞への取り込みや血管壁の通過の可能なサイズであること, 分解すると体液に含まれる無機イオン (カルシウムイオン, リン酸イオンなど) になることなどから, 生体内で機能する物質 (生体機能物質: 薬剤・遺伝子・造影剤・タンパク質など) を細胞や組織に送達するための担体として有用と考えられる。

過飽和な原料溶液中での均一核形成を起点に CaP 粒子を自発析出させる手法 (均一沈殿法) は, 体液環境に近い温和な条件で反応を進行できることから, タンパク質などの不安定な生体

機能物質を担持した CaP ナノ粒子の作製技術として有用である。ただし, 本手法では, ナノ粒子のサイズ・分散性の制御が難しく, この課題を解決するため, 安全性に懸念のある界面活性剤などの添加剤が多用されてきた。

筆者らは, 近年, 安全性への懸念の少ない液相原料を用い, 様々な生体機能物質を担持した CaP ナノ粒子を簡便・迅速に作製する技術を開発してきた^[1]。具体的には, 承認済みの医薬品を適当な比率で混合することで CaP 過飽和溶液を調製し, 同溶液中における生体機能物質と CaP との相互作用を利用することで, ナノ粒子のサイズ・分散性を制御してきた。本稿では, これらのナノ粒子作製技術と, 得られたナノ粒子の機能について紹介する。

2. 遺伝子を担持した CaP ナノ粒子の作製

目的の遺伝子を細胞に導入する遺伝子導入技術は, 疾患の治療や有用細胞の作成などに利用されている。CaP ナノ粒子は安価で安全性の高

〒 305-8565

つくば市東 1-1-1 中央第 5-41

TEL 029-861-4604

FAX 029-861-3005

E-mail: ma-ki-nakamura@aist.go.jp

い遺伝子担体として長年利用されてきたが、他の担体と比較して導入効率に劣ることが課題であった。筆者らは、Sogoらの手法^[2]を参考に、電解質補液などの承認済み医薬品のみを用いてCaP過飽和溶液を調製し、これにDNA（プラスミド）を添加して静置（～3時間）することで、DNA担持CaPナノ粒子を得た^[3]。本粒子は、比較的大きな負のゼータ電位（-25 mV程度）を有する単分散粒子（300～400 nm）であった。一方、DNAを添加せずに作製されたCaP粒子は、ゼータ電位が4 mV程度しかなく、より広い粒子径分布（ナノ～マイクロ）を示した。すなわち、粒子に担持されたアニオン性のDNA分子が、粒子間の静電反発による分散性維持と粒子径制御に寄与したと言える。溶液濃度と反応条件を最適化（25℃, 30分）して得られたDNA担持CaPナノ粒子（図1a,b）は、市販のCaP系遺伝子導入剤よりも1桁高い導入効率を示した（図1c）^[4]。また、DNAに加えてある種の磁性酸化鉄ナノ結晶（MRI用の承認済み造影剤であるフェルカルボトラン）をCaP過飽和溶液に添加すると、両者をCaPナノ粒子に共担持でき、粒子に磁性を付与できることを見出した^[5]。本粒子を磁石の存在下、3次元ペレット状に培養した細胞に作用させたところ、磁石非存在下よりも導入効率が向上した。さらに、本粒子をマウス一過性脳虚血モデルに動脈投与した結果、患部への磁気ターゲティングと遺伝子導入を示唆する予備的な結果を得た^[6]。以上、承認済み医薬品を原料として、遺伝子導

入用の磁性CaPナノ粒子を作製することができた。

3. 造影剤を担持したCaPナノ粒子の作製

免疫細胞の一種であるマクロファージの関連する炎症性疾患（動脈硬化・動脈瘤など）では、患部に集積するマクロファージを安全かつ高感度にイメージできる造影剤が早期診断に有用と期待されている。筆者らは、前出のMRI造影剤であるフェルカルボトランを添加したCaP過飽和溶液を37℃で30分静置し、フェルカルボトラン担持CaPナノ粒子を得た^[7]。しかし、本粒子は、分散性維持に十分なゼータ電位を持たず、直ちに凝集してしまった。そこで、フェルカルボトランに加えてアニオン性の承認済み医薬品であるヘパリンをCaP過飽和溶液に添加し、両者をCaPナノ粒子に共担持させることで、ゼータ電位約-15 mV、平均粒子径約300 nmの単分散粒子を得た（図2a）。本粒子は、フェルカルボトラン単体と比較してマウスマクロファージ細胞により高効率に取り込まれ（図2b）、フェルカルボトラン単体と同等のMRI造影能を示した（図2c）。さらに、フェルカルボトラン担持量を最適化した粒子をマウス頸動脈結さつモデル（動脈硬化のモデル）に静脈投与したところ、フェルカルボトラン単体投与と比較して、より多くのフェルカルボトランを病変部に送達できることが示唆された^[8]。以上、承認済み医薬品原料のみから、マクロファージイメージング用のCaPナノ粒子を作製すること

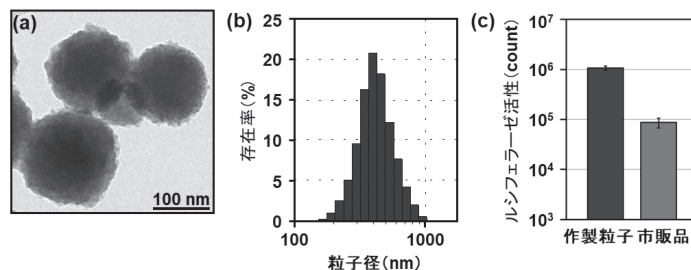


図1 DNA担持CaPナノ粒子の (a) 透過電子顕微鏡像, (b) 粒子径分布, (c) 遺伝子導入効率 (市販のCaP系遺伝子導入剤との比較)

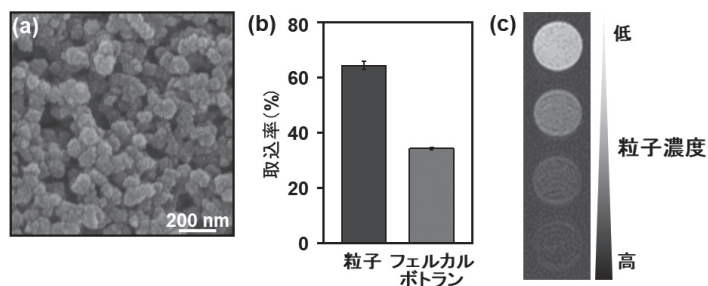


図2 フェルカルボトラン・ヘパリン共担持 CaP ナノ粒子の (a) 走査電子顕微鏡像, (b) 細胞取込率 (フェルカルボトラン単体との比較), (c) MRI 画像 (粒子濃度を変化させて寒天に固定し撮影した T2 強調画像)

ができた。

なお、前章、本章で紹介した粒子のマトリックスはいずれも、アモルファス CaP であった。アモルファス CaP は水溶液中で、より安定な結晶相 (水酸アパタイト等) へと変化することが知られている。今回の作製条件 (25 ~ 37 °C, 30 分以下) では、CaP 過飽和溶液中で均一核形成したアモルファス CaP が結晶化を抑制されたまま成長しつつ、生体機能物質と共沈複合化したと考えられる。この共沈複合化には、生体機能物質と CaP との親和性・相互作用が重要な役割を果たしている。生体機能物質の有する官能基の違いが CaP ナノ粒子中の担持量に大きな影響を及ぼすという報告もある^[9]。CaP と高い親和性を持ち、かつ比較的大きな電荷を有する生体機能物質 (DNA, ヘパリン) を用いたことで、同物質を担持したナノ粒子が分散状態を保ったまま等方成長した結果、界面活性剤を用いずとも、粒子径の制御された分散粒子を作製することができたと考えている。

4. おわりに

本稿で紹介した CaP ナノ粒子の作製技術では、安全性への懸念の少ない原料溶液を混合し、温和な条件下で短時間反応させるだけで、様々な生体機能物質を粒子に担持することができる。本技術により得られた粒子が、疾患の予防・診断・治療に貢献できることを期待している。

謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、JSPS 科研費 (JP15F15030, JP16H03831) などの助成を受けて実施された。研究実施に当たっては、産業技術総合研究所の Q. T. H. Shubhra 博士、筑波大学の鶴嶋英夫博士、東京医科大学の小菅寿徳博士、その他関係各位からご協力いただいた。

参考文献

- [1] 中村真紀, 大矢根綾子, セラミックス, 55 (2020) 189.
- [2] Y. Sogo, A. Ito, K. Fukasawa, N. Kondo, Y. Ishikawa, N. Ichinose, A. Yamazaki, *Curr. Appl. Phys.*, 5 (2005) 526.
- [3] A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, Y. Shimizu, Q. T. H. Shubhra, A. Ito, H. Tsurushima, *Colloids Surf. B*, 141 (2016) 519.
- [4] Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, H. Araki, M. Nakamura, H. Tsurushima, *Biomater. Sci.*, 5 (2017) 972.
- [5] Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, M. Nakamura, S. Puentes, A. Marushima, H. Tsurushima, *Mater. Today Chem.*, 6 (2017) 51.
- [6] Q. T. H. Shubhra, A. Oyane, M. Nakamura, S. Puentes, A. Marushima, H. Tsurushima, *Data in Brief*, 18 (2018) 1696.
- [7] M. Nakamura, A. Oyane, K. Kuroiwa, Y. Shimizu, A. Pyatenko, M. Misawa, T. Numano, H. Kosuge, *Colloids Surf. B*, 162 (2018) 135.
- [8] M. Nakamura, H. Kosuge, A. Oyane, K. Kuroiwa, Y. Shimizu, K. Aonuma, *Nanotechnology*, 32 (2021) 345101.
- [9] M. Nakamura, A. Oyane, K. Kuroiwa, H. Kosuge, *Colloids Surf. B*, 194 (2020) 111169.