

GAG をもちいたナノ粒子の製造と医療応用

小山 義之

結核予防会 新山手病院 臨床医用工学研究室

DNA とポリカチオンを水中で混合すると、微細な複合体粒子が生成することは、遺伝子治療の研究分野を中心に古くから知られ、その挙動、メカニズムが詳しく研究されている。一方、DNA 以外のイオン性高分子の複合体粒子の形成については意外と知られていない。

我々は、天然高分子を用いて DDS 等への適応可能な安全なイオン複合体微粒子を得るために、生体イオン性高分子であるプロタミン (PRT) とヒアルロン酸 (HA) を混合してみたところ、DNA の場合と同様、水に不要な微粒子複合体が生成する事を見出した。そこで、その複合体形成挙動を詳しく調べ、DDS を初めとする様々な医療応用について検討した。

【PRT/HA 複合体の形成挙動】

(1) ポリマー混合比の複合体表面電荷への影響

ポリカチオンである PRT が過剰の場合にはプラスに帯電した粒子が、またポリアニオンである HA が過剰だとマイナスに帯電した粒子が得られ、表面電荷はポリカチオンとポリアニオンの混合比率に応じて変化した。

(2) ポリマー濃度の複合体サイズへの影響

PRT/HA 複合体のサイズは混合するときのポリマー濃度によって変化し、ポリマー濃度が濃いほど得られる複合体粒子は大きく、薄いほど小さな粒子が生成した。両ポリマーの濃度が 1 mM 以下 (イオン性官能基濃度にして) の場合には直径 100 nm 以下の極微少なナノ粒子が得られた。

(3) 複合体の組成

複合体の組成は、その混合比にほとんど依存せず、常に PRT:HA = 40:60 であった。

【PRT/HA 複合体の細胞毒性】

PRT/HA 複合体の細胞毒性は、その表面電荷がプラスの場合もマイナスの場合も非常に低く、安全な複合体であることが確認された。

【PRT/HA 複合体を徐放担体として利用した DDS の開発】

我々は、GM-CSF などのサイトカイン遺伝子を用いた癌遺伝子治療システムを開発し、坦癌マウスや動物臨床研究において非常に高い効果が見られたことを報告してきた。一方、サイトカイン遺伝子を導入するかわりに、サイトカインタンパクそのものを直接投与した場合には、全く治療効果はみられなかった。これは、サイトカインの代謝が速く効果の持続が短いためと思われる。タンパク製剤の直接投与で高い治癒効果を得るためには徐放システムが必要不可欠であると考えた。

そこで上記の PRT/HA 複合体に GM-CSF を内包させ、タンパク徐放デバイスとして用いることを検討した。

(1) GM-CSF の PRT/HA 複合体への内包

GM-CSF に HA を混合した後に PRT を加えて 24 時間放置後、遊離の GM-CSF を定量したところ、約 70% の GM-CSF が PRT/HA 複合体中に内包されていることが分かった。

(2) GM-CSF を内包した PRT/HA 複合体の抗腫瘍効果

B16 メラノーマ細胞を移植した胆癌モデルマウスに上記の方法で調製した複合体を 1 回投与し、その後の腫瘍サイズ変化を測定した。

GM-CSF タンパクのみやサイトカインを内包していない空の複合体を投与したものでは急速に腫瘍が大きくなり、タンパク単独投与や複合体自体の抗腫瘍効果はほとんどみられなかった。

一方、GM-CSF を内包した PRT/HA 複合体においては明らかな腫瘍成長の抑制効果がみられ、特に表面電位がマイナスのものにおいては、腫瘍はほぼ完全に消失し、50 日以上経過しても再発は見られないという、非常に高い治癒効果が得られた。

以上のように、PRT と HA からなる生体高分子イオン複合体は、毒性の低い安全な微粒子として、注射可能なタンパク徐放デバイスなど、様々な医用材料としての応用が期待される。