

ミルクタンパク質からなる無機有機ハイブリッドナノスフェアの創製

慶應義塾大学大学院理工学研究科 基礎理工学専攻生物化学専修

藤本 啓二

Nanoparticles composed of biopolymers have received much attention as a useful material applicable to a variety of industrial fields. We focused on casein proteins, which are associated and assembled into an organic and inorganic supra-structure. We could prepare nanoparticles of beta-casein coupled with polyethylene glycol (PEG) by changing pH, temperature, and Ca^{2+} concentration. Since the obtained nanoparticles were soluble at body temperature, we tried to produce calcium phosphate as a cross-linker in a nanoparticle. The obtained particles had a diameter of approximately 100 nm at pH 7.4 and kept stable over a wide range of temperature. Phosphorous could be detected inside the nanoparticle with XPS and EDX measurements. It was also found that nanoparticles were disrupted by lowering pH from pH 7.4 to 4.0.

1. 緒言

バイオポリマーは生体適合性に優れたものが多く、そのいくつかは温度、pHなど生体内環境によって構造を変化させることができる。牛乳中にはバイオポリマーであるタンパク質が約3.2%含まれており、近年これらを食品以外の分野における素材として利用することが注目されている。多種類の牛乳タンパク質の中で主要なものにカゼインがある。牛乳タンパクであるカゼインは牛乳中で100nmスケールのミセルを形成しており、このミセルには主に α カゼイン、 β カゼインが含まれている。本研究では、ミセルを形成するカゼインのうち、 β カゼインに着目した。 β カゼインは生体適合性、生分解性に加え、アミノ基を数多く持つため、化学修飾が容易に行えるという利点がある。さらに β カゼインはpHや温度、 Ca^{2+} 濃度によって特徴的な会合挙動を示すバイオポリマーである。化学修飾により会合挙動を制御することで、生体適合性に優れたDDSキャリアとなるナノ粒子を作製することができる。本研究では、抗がん剤のターゲティングを目指し、正常血管では漏出しにくい化合物が腫瘍血管では漏出しやすく腫瘍部位に滞留しやすいといったEPR効果の利用を狙い、100nmスケールの粒子の作製を目指した。

図1にデザインコンセプトを示す。はじめに β カゼインを尿素を用いてランダムコイル状態に変化させて、アミノ基を介してPEG鎖を化学修飾する。次に、カルシウムイオン存在下でureaを透析によって除去することにより、100nmスケールの粒子を形成させた。その後、リン酸イ

オンを添加して、カゼイン内に含まれるカルシウムイオンと反応させることで粒子内にリン酸カルシウムを析出させた。得られたナノ粒子はリン酸カルシウムが架橋点として働き、PEG鎖が分散安定性を付与することになる(ナノスフェア)。最後に、作製した粒子にDDSキャリアに向けたモデル薬物の封入と放出の最適化を行った。

2. 実験

まず、修飾を施していない β カゼインの基礎的性質である会合挙動を詳しく研究した。すなわち、 β カゼイン水溶液の透過率および散乱強度測定により、pH、温度応答性および Ca^{2+} 濃度による β カゼインの会合力の変化を観察した。

これらを踏まえて、分散安定性の付与とナノ粒子化の制御を目的として、ureaにより鎖状にした β カゼインの NH_2 基にpolyethylene glycol (PEG)を化学修飾させることによって試みた。PEG修飾後にureaを取り除き、温度とpHを変化させることによりPEG- β カゼイン粒子を作製した。

続いて、生体内のpH条件においても粒子形状を維持させるため、 Ca^{2+} を添加することでPEG- Ca^{2+} β カゼイン粒子を作製した。

さらに Na_2HPO_4 および KH_2PO_4 を加えることでリン酸カルシウムと β カゼインの複合化を試み、有機無機ハイブリッドナノ粒子(Calcium phosphate-PEG- β casein nanoparticle, ナノスフェア)を作製した。複合化の際にキレート剤を用いることにより、PEG- Ca^{2+} β カゼイン水溶液に存在する Ca^{2+} を除去し、 Na_2HPO_4 および KH_2PO_4 との沈殿物を生じさせないようにした。

また、作製したナノスフェアに対し、組成分析、形態観察、二次構造の分析、表面電荷測定、および内部環境評価によるキャラクタリゼーションを行った。なお、この際リン酸カルシウムと複合化させない粒子(PEC粒子)を作製し、ナノスフェアの挙動を比較した。その後、リン酸カルシウムの低pHにて溶解するといった性質を考慮しpH応答性を検討した。



Preparation of inorganic-organic hybrid nanoparticles by chemical modification of milk protein, casein

Keiji Fujimoto
Graduate School of Science and technology,
Keio University

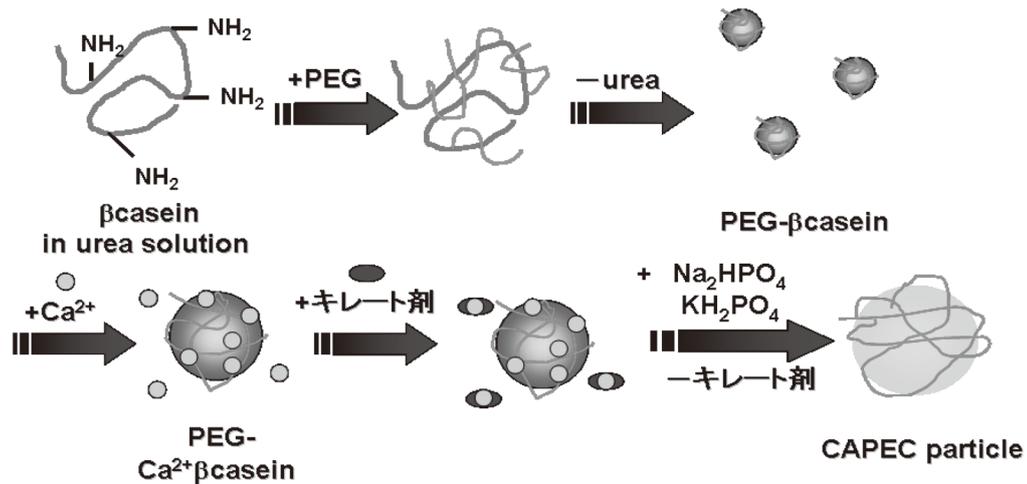


図1 カゼインから作る無機有機ハイブリッドナノスフェア

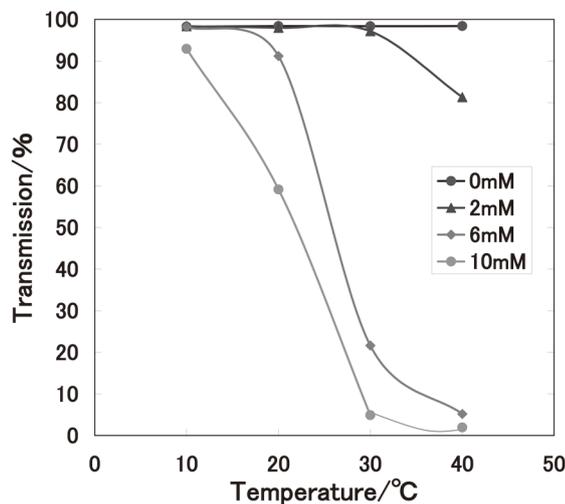


図2 カルシウムイオンによるβカゼインの会合挙動の変化

生体内環境を考慮した外部環境の変化に対するナノスフェアの変化を観察として、この場合にはpHの変化によるナノスフェアの崩壊性について粒子サイズの変化を測定することにより検討を行った。さらに、モデル薬物として正電荷を帯びた6-methoxy-N-ethylquindinium iodide (MEQ) を用いて、透析法によりナノスフェアへの取り込み挙動をMEQの蛍光強度変化から検討した。次に、MEQの放出実験を行うために、凍結乾燥させたナノスフェアに対し、MEQ溶液を4℃にて3日間浸透させた。未封入のMEQを限外ろ過にて除去した後、CAPAC粒子から放出されたMEQ濃度の経時変化を蛍光光度計で測定した。

3. 結果および考察

βカゼインはpHを等電点 (pI=4.6) へ近づけることで凝集体となって沈殿した。また、温度を上昇させることにより、βカゼインの散乱強度が上がり、βカゼインの会合が進んでいくことが示唆された。βカゼインは温度の上昇に

よって二次構造が崩れ、変性したまま疎水性結合して、より巨大な凝集体を形成すると考えられる。これより、βカゼインをナノ粒子として使用するためには、まず水中での安定性を上げるような改質を施す必要がある。

βカゼインは、4℃では400mMのCa²⁺が存在しても沈殿しないが、37℃では8~15mMのCa²⁺で沈殿する。このようにCa²⁺を加えると凝集しやすくなることが知られている。よって本研究では、加えたCa²⁺の量と温度によるβカゼインの会合挙動の関係を求めた。pH7.4の条件下で1000ppmのβカゼイン溶液にCa²⁺を添加して検討を行った。図2に示すようにβカゼインのみの溶液では温度による透過率の変化は見られないが、Ca²⁺の存在下では温度を上げるにつれ透過率が下降した。2.0mMでは40℃、6.0mMでは30℃、10.0mMでは20℃と、Ca²⁺濃度を上げていくと、より低い温度で透過率の急激な下降が見られるようになった。この結果よりCa²⁺濃度を上げていくことで、βカゼインを低温で会合させることができると考えら

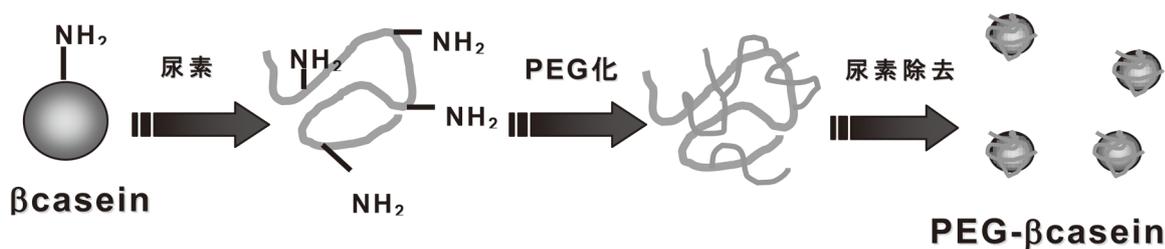


図3 粒子サイズ制御のためのカゼインのPEG修飾

れる。しかし得られたβカゼインの形態は凝集した不定形であり、サイズと形状を制御することはできなかった。

タンパク質はジスルフィド結合の還元切断と尿素の添加による水素結合の阻害によりアンフォールディングされ、三次元の立体から二次元の鎖状になる。そして一旦アンフォールディングしても還元剤と尿素を取り除くと自発的に天然構造が回復する。βカゼインにはシステイン残基が含まれていないため、ジスルフィド結合は存在しない。そのため、尿素のみによって、フォールディングの制御が可能であると考えられる。5000 ppmのβカゼインに尿素を加え、βカゼインの水素結合を切断した。尿素を加えることで沈殿が生じていたβカゼインが徐々に透明になっていき、尿素濃度2.0Mでは透過率がほぼ100%となった。尿素を添加して粒径が顕著に減少したβカゼインから尿素を抜くと、再びβカゼインの粒径である25nm付近の大きさに戻った。

そこで、βカゼインに安定性を付与するため両親媒性であるPEG修飾(図3)を行ったところ、環境応答性がPEGの導入率によって変化することを見出した。PEG導入率の高いβカゼインはpHおよび温度応答性を失い、会合が起こらなくなった。一方、低いPEG導入率では応答性は維持されており、会合が起こりやすい高温、低pH条件において直径100 nmスケールの粒子が生成することを見出した。βカゼインのみから作製した粒子はすぐに凝集してしましたが、このPEG-βカゼイン粒子は分散状態を維持していた。しかし、pHを生体内条件にすると、この粒子は溶解してしました。

そこで、この条件(pH7.4)においてCa²⁺を添加したところ、粒子の形成が観察された。PEG-βカゼインは高pHでは負電荷を帯びているため溶解状態であるが、Ca²⁺を添加することによって会合が促進されて粒子が形成されたと考えられる。このPEG-Ca²⁺βカゼイン粒子はシャープな温度応答性を示し、高温においては会合するが、室温に戻すことにより即座に粒子の形状を維持できなくなった。

次に、室温でも粒子形状を維持する粒子の作製を目指し、リン酸カルシウムとβカゼインの複合化を行った。TEMによる乾燥状態の観察を行った結果、pH7.4において直径

100nmほどのナノスフェアが分散して存在していることがわかった(図4)。図5にEDXにより領域の構成元素を定性分析した結果を示す。粒子が存在しない部位では検出されなかったリンとカルシウムのピークがCAPEC粒子には検出された。これにより、ナノスフェア内にはリン酸カルシウムの結晶が含まれていることが示唆された。

以上のように、ナノスフェアの温度変化や乾燥した状態における安定性が示された。しかし、この粒子をDDSキャリアとして応用するためにはキャリアが形状を維持したまま薬剤を目的部位まで運ぶことに加え、目的部位で保持していた薬剤を放出することが求められる。ナノスフェアの室温におけるpH応答性を調べたところ、この粒子は生体内pHでは粒子の形状を維持しているが、低pHにすると即座に粒子が崩壊することがわかった。この現象を利用することによって、pH変化による粒子の溶解によって薬剤を放出させることができると考えられる。バイオポリマーのような大きな物質は、エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれることが予想される。エンドソーム内は低pHに保たれていることから、低pHで崩壊するというナノスフェアの性質は、DDSキャリアに内包された薬剤を細胞内で放出できるという点から有利である。

そこで、モデル薬物として蛍光物質を用いて透析法によりナノスフェア内に封入することを試みたところ、正電荷を持つMEQという蛍光分子の場合に封入が観察された。おそらく、負電荷に帯電したナノスフェアとの静電相互作用により吸着および吸収されたものと考えられる。次にMEQのpH7.4およびpH4.0での放出実験を行った。外部溶液に放出されたMEQ濃度の経時変化を図6に示す。pH7.4では、徐々にMEQが放出されているのに対し、pH4.0では放出が一気に進んでいることがわかった。これは、pHを4.0まで低下させることによりナノスフェアが崩壊し、内部にMEQを保持することができなくなったためだと考えられる。実際にpH4.0において粒子が完全に崩壊するには約2日間かかったことから、50hrほどで放出が平衡に達したのは妥当な結果であると考えられる。

以上の結果から、無機有機ハイブリッドナノスフェアを用いてpHの低下による薬物放出のスイッチングを行うこ

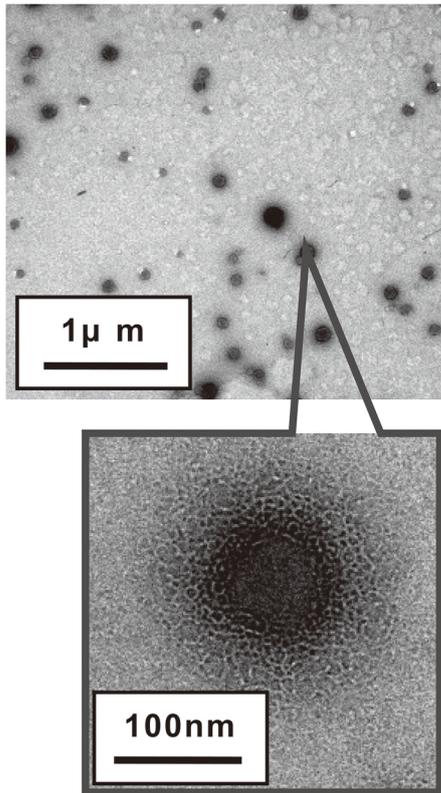


図4 ハイブリッドナノスフェアの透過型電子顕微鏡

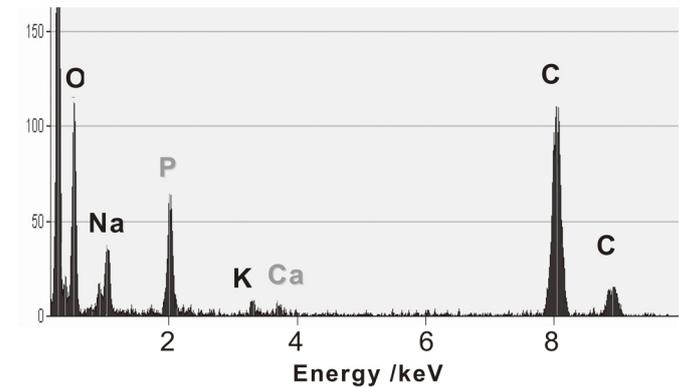
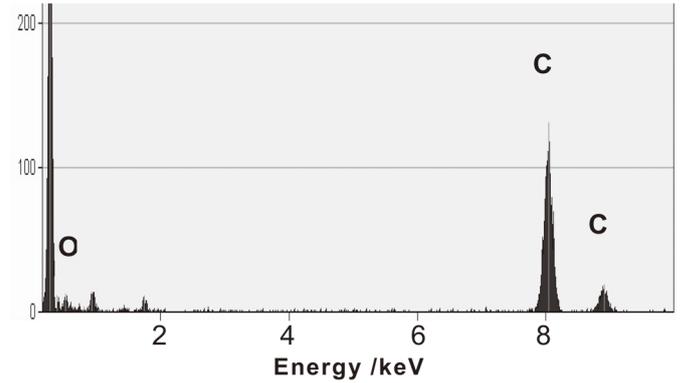


図5 EDXによるナノスフェアの元素分析

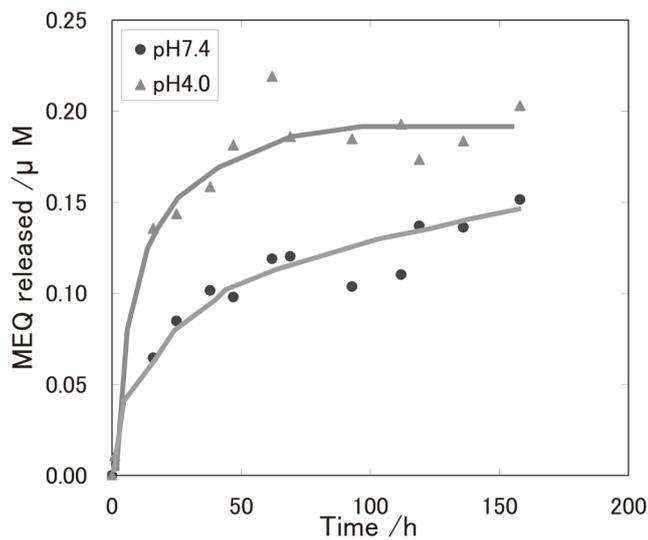


図6 pHによるナノスフェアからの薬物放出の変化

とができた。今後、粒子外部への薬物の吸着を抑制し、内部への封入効率を向上させる工夫が必要だと考えている。

4. 総括

バイオポリマーであるβカゼインを化学的に改質した後、無機物と複合化することによって、生体適合性に優れ、100nmスケールの無機有機ナノスフェアを作製すること

ができた。このナノスフェアはpH変化によって崩壊する性質を持ち、pH応答性DDSキャリアとして有望な素材であることがわかった。

謝辞

本研究は修士学生堀真帆君の貢献によるものが大きかった。ここに謝意を示す。