

フラーレンの自己集合ナノ構造とバイオ

南 皓輔

はじめに

ナノカーボンの一つにフラーレンがある。60個の炭素原子で構成されたサッカーボールの形をした球状分子であるフラーレン C_{60} は、1985年に発見された当初からさまざまな方面への応用が期待されてきた。1993年にフラーレンの各種バイオ関連への応用研究が報告されて以降、バイオへの応用が注目されるようになった¹⁻⁴⁾。近年では、ドラッグデリバリーシステム (DDS) や遺伝子治療のキャリア、薬剤・抗酸化剤、さらには再生医療に向けた生体足場材料への応用研究が進められている⁵⁾。フラーレンは抗酸化作用を持つため、フラーレンを添加した化粧品が市販されていることをご存知の方も多と思う。本稿では、筆者が研究しているフラーレンの自己集合制御と、そのバイオへの応用展開について紹介する。

なぜフラーレンなのか？フラーレンと自己集合

フラーレンの物性 フラーレンは、ベンゼンなどと同様に芳香族性を有する球状分子である。一般的に芳香族化合物は平面構造を有しており、その平面内を π 電子が非局在化している。しかし、フラーレンは、 π 共役系が歪んだ球平面を形成していることから (図1A)、特異な物性を示す。たとえば、その歪んだ π 共役系に由来する高い電子受容性 (電子を受け入れやすい性質) を有す

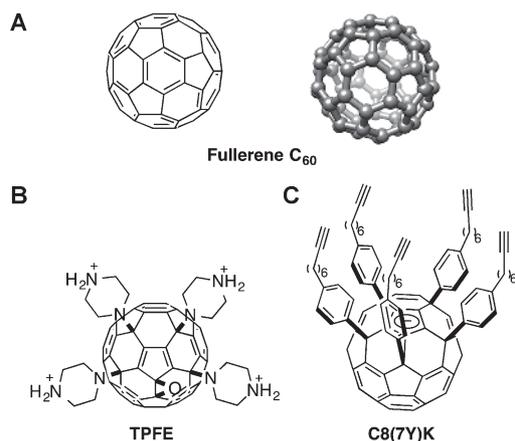


図1. 本稿で紹介するフラーレンとその誘導体の構造。A, フラーレン C_{60} の化学構造とその3Dモデル。B, カチオン性フラーレン (TPFE)。C, 末端アルキンを有する五重付加型フラーレン (C8(7Y)K)。フラーレンの骨格の上部がアニオン性を示す。

ることから、抗酸化作用やラジカルスカベンジャー能を示すことがよく知られている (本特集, 高野)。また、その高い電子受容性を利用したフラーレンへの付加反応・ラジカル反応といった化学反応も数多く報告されており、有機金属試薬を用いた数・位置選択的な反応も種々報告されている。これらの有機合成反応から、多彩な化学修飾フラーレンの合成が可能となった。特筆すべきことは、フラーレンは高い疎水性・疎溶媒性を示し、それ故、高い凝集力を持つ。フラーレンは、適切な合成戦略に基づいた化学修飾によって水溶性や両親媒性を付与することで、その集合体 (ナノ構造体) の構造を精密に制御可能であるという特徴を持つ。

フラーレンの自己集合 フラーレン C_{60} は、その高い凝集力と高い対称性から、単体では結晶性を示し、一次元の柱状結晶を形成する⁶⁾。この一次元ナノ構造体のフラーレン結晶は、フラーレンナノウイスキー (FNW) と呼ばれ、フラーレンの富溶媒と貧溶媒との界面にて結晶を析出させる「液液界面析出法」により調製される。FNWの結晶成長は、富溶媒と貧溶媒を変化させることで制御でき、柱状・ロッド状・ディスク状などさまざまなナノ構造体に作り分けることができる。

一方で、高度に化学修飾されたフラーレン誘導体は、その合成戦略に基づいた合理的な機能を有しているため、フラーレン C_{60} に比べて精密な構造制御が可能である。たとえば、フラーレンの高い凝集性を利用し、フラーレン骨格を疎水性部位とした両親媒性分子は、その分子構造や特性に応じて、さまざまなナノ構造体に作り分けることができる⁷⁻⁹⁾。これら化学修飾フラーレン誘導体によって得られるナノ構造体は、水溶性・水分散性を示すことから、多様なバイオ応用へと展開されている。

水溶性フラーレンを用いた遺伝子導入試薬

遺伝子輸送は、バイオテクノロジーのみならず遺伝子治療においても注目度の高い技術である。一般的に遺伝子輸送には、アデノウイルスなどのウイルス由来の試薬や合成リポソームが広く使われている。しかしながら、医療応用においては毒性などの安全性の観点から非ウイルス由来の新たな材料の開発が求められている。

DNAの輸送と保護 中村らは適切に分子設計した水溶性フラーレンを用いて遺伝子輸送ができることを見いだした^{10,11)}。カチオン性のアミノ基を複数導入した化学修飾フラーレンは、静電相互作用により効率的にプラ

スミドDNAと結合する。加えて、それらは、フラーレン骨格が有する高い凝集力により自己集合し、100 nm程度の微粒子を形成し、細胞内に効率的に外来遺伝子を輸送する。この微粒子形成により、立体的にDNAが保護され、DNaseによる分解が阻害されることも明らかになった。そして、中村らは、フラーレンに導入する有機基を最適化することで、カチオン性脂質を用いた市販の遺伝子導入試薬であるリポフェクチンと比べて外来遺伝子をより多く発現させるカチオン性フラーレンTPFE (図1B)を開発するに至った。

中村らはさらに、TPFEが市販のリポフェクチンと異なる体内動態を示すことを明らかにした¹¹⁾。TPFEを用いて、GFP遺伝子をマウスに静脈注射したところ、市販のリポフェクチンとは異なり、GFP遺伝子が主に肝臓と脾臓に輸送されることが明らかとなった。このTPFEを用いて、insulin-2遺伝子を導入することで、マウスの血糖値を下げることに成功した。このTPFEは、マウスにおいて毒性を示さなかったことから、毒性のない有用な遺伝子導入試薬として糖尿病をはじめ、さまざまな疾患の遺伝子治療へ応用できると期待されている。

階層的自己集合によるsiRNAの肺選択的輸送 筆者らは、中村らとともに毒性のないTPFEをsiRNAの導入試薬へと展開した¹²⁾。siRNAはRNA干渉によるエピジェネティックな遺伝子発現制御を行うことから、新たな遺伝子治療として着目されている。このsiRNAは、DNAと同じ核酸ではあるものの、大きさ・水溶性・安定性の点で二重鎖DNAとは大きく異なる。実際、siRNAの輸送材料にはDNAとは異なる分子設計が求められている。一方、TPFEは、遺伝子結合能を有する有機基と、高い自己集合力を有するフラーレン骨格とで構築されており、siRNAとも容易に会合すると考えられる。そこで、筆者らはTPFEを肺選択的なsiRNA輸送システムへ応用した。

肺の毛細血管は、生体内でももっとも狭い血管であり、その内径はおよそ6 μm程度と言われている。そのため、6 μmより大きなマイクロ粒子は肺に蓄積する。しかしながら、この蓄積した粒子は、肺で塞栓となり炎症を引き起こし、活性酸素種 (ROS) を産生するため、速やかに排出される必要がある。筆者らは、フラーレンの抗酸化作用がROSの産生を抑える点に着目した。そして、静脈内でフラーレンと血清タンパク質の「階層的な」会合体を形成させることで、フラーレンを肺に蓄積させるという戦略を立てた (図2)¹²⁾。TPFE-siRNA比を変えると、細胞内輸送能の高い数百nmの会合体形成を誘起するとともに、生体内での階層的自己集合を誘起する最適なTPFE-siRNAの組成比を見いだした。実際、この会合体は静脈中で血清タンパク質と会合しマイクロ粒子を形成した。この階層的会合によって形成されたマイク

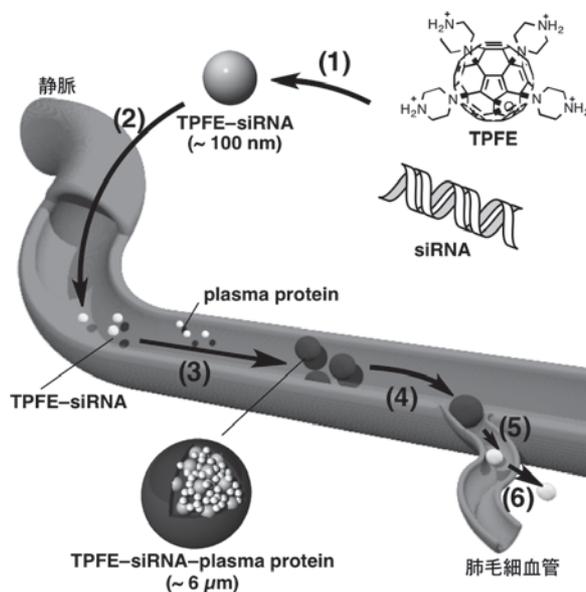


図2. TPFEの階層的自己集合による肺選択的輸送メカニズム、メカニズムのモデル図。(1) 自己集合によるTPFE-siRNA会合体形成 (ca. 100 nm)。(2) 静脈投与。(3) 血清タンパク質との自己集合による粒子径の増大 (ca. 6 μm)。(4) 肺毛細血管への蓄積。(5) TPFE-siRNA会合体の放出。(6) 肺細胞内へのTPFE-siRNA輸送。

ロ粒子は、速やかに肺に蓄積し、TPFE-siRNA会合体を肺毛細血管に放出した。放出されたTPFE-siRNA会合体は肺細胞内に選択的に取り込まれ、その後siRNAを放出した (図2)。siRNAを放出したTPFEは、速やかに肺から排出された。このように、階層的自己集合を誘起させることで、siRNAが肺選択的に輸送されるという新しい知見が得られた。注目すべきこととして、siRNA放出後のTPFEは一時的に肺細胞内に蓄積したにもかかわらず毒性を示さなかった。これは、フラーレンの速やかなクリアランスに加え、フラーレンの抗酸化作用が塞栓形成により産生されるROSを抑制したこと起因していると考えている。筆者らは、このTPFEによる肺選択的siRNA輸送を利用して、マウス疾患モデルの敗血症を有意に抑えることにも成功した。このように化学修飾フラーレンは、高効率かつ高機能な遺伝子導入試薬として大きな可能性を秘めている。

両親媒性フラーレン二重膜ベシクルによるDDS

中村らは、フラーレンC₆₀に5つの置換基を位置選択的に導入することにより、フラーレン骨格上にアニオンを生じさせた両親媒性フラーレンを合成した (図1C)^{13,14)}。この両親媒性フラーレンは水中に分散させると50 nm程度の二重膜ベシクル構造を形成する (図3A)。炭化水素長鎖を疎水性骨格とした一般的な脂質二重膜と異なり、フラーレン二重膜ベシクルはフラーレンを疎水性骨格として自己集合し、非常に安定な二重膜構

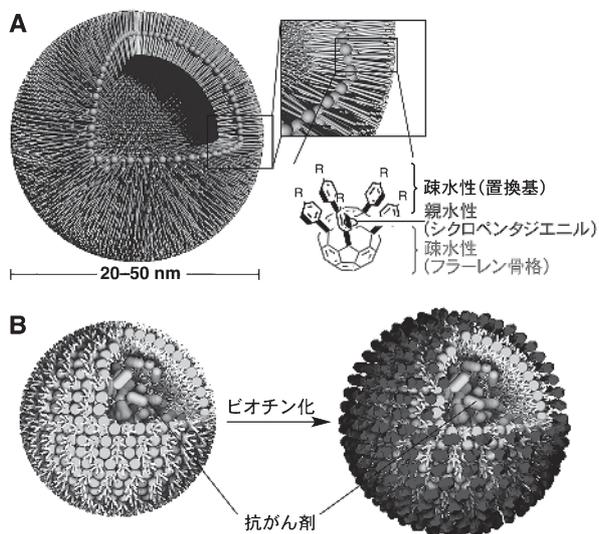


図3. 両親媒性フラーレン二重膜ベシクルによるDDS. A, フラーレン二重膜ベシクルの構造. B, 抗がん剤 (DOX) 内包フラーレン二重膜ベシクルDOX@C8(7Y)Kのモデル図.

造をとる. 脂質由来の二重膜では, 疎水性部位と親水性部位のバランスが崩れると二重膜構造が崩壊するのに対して, フラーレン二重膜ベシクルでは, フラーレンの高い疎水性により, 親水性部位に導入する置換基を種々変化させても二重膜構造が維持される^{15,16}. 興味深いことに, 疎水性置換基を導入した疎水-親水-疎水の三元型両親媒性フラーレンも, 安定な二重膜構造を形成する. そのため, 導入する置換基を合成化学的に変化させることで, これらを機能性二重膜ベシクルへと展開できる.

筆者は, 中村らとともに, 末端にアルキン部位を有する五重付加型フラーレンC8(7Y)Kのベシクルを輸送キャリアとしたDDSへと展開した¹⁷. C8(7Y)Kの末端アルキンを反応点として, クリック反応により生体機能分子であるビオチンを表面に修飾させた. 高分解能走査型電子顕微鏡観察から, アビジンがビオチンを認識して, C8(7Y)Kベシクル表面に集積することを見いだした. このことは, 二重膜構造を維持したまま, 表面に修飾した生体機能分子をタンパク質に認識させられることを示しており, DDSキャリアとしての応用可能性を示唆している. またC8(7Y)Kは, アニオンを生じることで安定な二重膜を維持している. それ故, 酸性条件下では, アニオンが消失し, 二重膜が崩壊する. そこで, 生理条件下より酸性に傾いているがん細胞内にC8(7Y)Kベシクルを送達することで, 二重膜構造を崩壊させ, 内部空間に取り込んだ薬剤を放出できると期待された. 抗がん剤 (DOX) を内包したC8(7Y)Kベシクルをビオチンで修飾した (図3B). この抗がん剤内包フラーレンベシクルDOX@C8(7Y)Kは, 抗がん剤のみを投与した群よりも高い抗がん活性を示した. このことから, DOX@

C8(7Y)Kは, 安定な二重膜ベシクル構造により, 内包した抗がん剤を効率的に細胞内へと輸送し, 細胞内にて二重膜構造を崩壊させることで内包薬剤を放出したことがわかった.

フラーレン二重膜ベシクルは, 先述した通り, 導入する置換基を適切に変換させることにより, ベシクル集合体の構造, サイズ, 機能を自由に制御できる¹⁸. また, それらは, 一般的な脂質二重膜と比べ, 非常に低い膜透過性を有しているため¹⁹, これらを活かした機能性材料への応用も期待されている.

自己集合フラーレンを並べた生体足場材料

これまで, 化学修飾フラーレンの自己集合体のバイオ応用について述べてきた. その一方で, 先述したように未修飾のフラーレン単体も, 適切に調製することで種々のナノ構造に作り分けられる⁶. 興味深いことに, ナノカーボン材料を生体足場材料とすることで細胞分化が誘導・促進されるという報告例もある. この生体足場材料による生体機能の制御は, 材料特性のみならず, その三次元構造によっても大きく変化することが知られている. それ故, これらのナノカーボン材料を単に使うだけでなく, 基板上で高次構造を制御することも非常に重要になる.

筆者らは, FNWを高度に配向させる基板作成法を開発し, それらを生体足場材料へと展開した. 先述した液液界面析出法を用いると, 直径500 nm程度, 長さが約300 nmの分散の少ないFNWが得られる⁶. ラングミュア・プロジェクト (LB) 法を用いて, このFNWの薄膜を気液界面 (水面) に形成させ, その薄膜を圧縮することでFNWの配向を揃え, 最後にガラス基板で引き上げることによって, 簡便に配向したFNWをガラス基板上へ集積できる²⁰. 得られた基板上では, 一軸方向にFNWが配向し, 約500 nmのパターン化した表面が構築された. さらに筆者らは, 特殊な装置を必要としない攪拌による配向法も開発した²¹. LB法は, 圧縮する際の水を利用した配向制御法であることに着目し, 気液界面を緩やかに攪拌し水流を作ることで配向が可能であると考えた. そこで, ピーカーに張った水面を緩やかに攪拌し, 界面にFNWの薄膜を形成させた. その後, 攪拌を止め静置し, 基板で引き上げた. FNWは, 円周部では一軸方向にそろった配向を示す一方, 中央部では湾曲した配向をとるという興味深い結果を得た (図4).

筆者らは, これらの方法で作製した配向FNW基板を, それぞれ骨芽細胞²¹・筋芽細胞²⁰の生体足場材料へと展開した. 配向FNW基板上に播種した骨芽細胞・筋芽細胞はともに高い接着性を示した. 特筆すべきことに, ガラス基板表面上とは異なり, FNW上には接着性タンパク質が満遍なく分布することがわかった. この結果は,

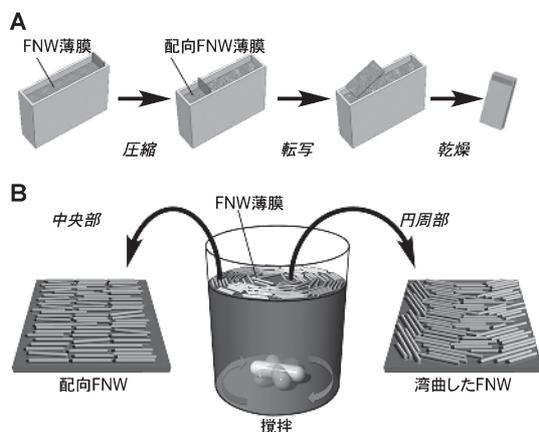


図4. 一次元フラーレン結晶FNWの配向法. A, B, ラングミュア・プロジェクト法 (Langmuir-Blodgett) (A) と攪拌法 (vortex-directed alignment) (B).

フラーレンナノ構造体が、細胞接着に対する高い親和性を有することを示唆している。さらに、細胞の配向・伸長がFNWの配向方向に揃っていることが明らかになった。筆者らは、筋芽細胞の筋分化がナノカーボン材料によって促進されるだけでなく、筋芽細胞が細胞形状を伸長させて細胞間で融合することで筋管細胞へと分化する性質に着目し、この配向FNW基板による筋分化制御を目指した。配向FNW基板上に播種した筋芽細胞を10日間培養したところ、分化マーカー遺伝子の発現量がガラス基板上に比べ顕著に増加していることがわかった。さらに、パターン化構造を有していないガラス基板上では、筋管細胞形成の方向がランダムなのに対して、配向FNW基板上では、筋管細胞形成の方向がFNWの配向方向と一致することが明らかとなった。生体組織工学の観点から考えると、実際の筋肉組織と同一の方向に筋管細胞を配向させることは非常に重要であることから、この配向FNW基板はさらなる応用が期待されている。

カーボンナノチューブやグラフェンを含むカーボンナノ材料は、再生医療・生体組織工学分野において、非常に注目されている。本稿の成果は、フラーレンの0次元分子としての特徴を最大限に利用し、種々のナノ構造体を制御することで達成されたものである。本稿では述べなかったが、化学修飾することで、フラーレンにさまざまな機能を容易に付与できる点も忘れてはならない。フラーレンナノ構造体を用いた生体足場材料は、今後ますます注目されるものと期待している。

おわりに

本稿では、フラーレンのバイオ応用として、遺伝子輸送キャリア、DDSキャリア、生体足場材料について筆者らの研究を中心に紹介した。フラーレンのバイオ応用

は紹介した以外にも非常に多岐にわたっている。昨今では、篠原らによって報告されたガドリニウム内包フラーレンGd@C₈₂によるMRI造影剤の開発²²⁾をはじめ、金属内包フラーレンのバイオ応用も目覚ましい。筆者の生まれた年に発見されたフラーレンは、30年以上経った今も、バイオ応用に向けて研究が進められている。このことは、フラーレンのバイオ応用の実現可能性の現れであると筆者は考える。一方で、これらの研究は、フラーレンの有機合成化学による修飾、超分子化学によるナノ構造体制御、生物学によるバイオ関連応用と、分野を大きくまたがって進められている。ここにあげた分野のみならず、さまざまな領域の研究者が参入することを期待している。

謝 辞

本研究では、筆者の所属していた東京大学理学部化学科、中村栄一先生をはじめ、東京大学医学部、野入英世先生、ならびに、物質・材料研究機構国際ナノアーキテクトニクス研究拠点、有賀克彦先生と、多くの共同研究者の協力のもと行われました。この場を借りて感謝申し上げます。

文 献

- 1) Tokuyama, H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7918 (1993).
- 2) Friedman, S. H. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6506 (1993).
- 3) Sijbesma, R. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6510 (1993).
- 4) Schinazi, R. F. *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **37**, 1707 (1993).
- 5) Nakanishi, W. *et al.*: *NanoToday*, **9**, 378 (2014).
- 6) Shrestha, L. K. *et al.*: *Chem. Asian J.*, **8**, 1662 (2013).
- 7) Nakamura, E. and Isobe, H.: *Acc. Chem. Res.*, **36**, 807 (2003).
- 8) Hirsch, A.: *Pure Appl. Chem.*, **80**, 571 (2008).
- 9) Nierengarten, J.-F. ed.: *Fullerenes and other carbon-rich nanostructures*, p. 23, Springer (2013).
- 10) Nakamura, E. and Isobe, H.: *Chem. Rec.*, **10**, 260 (2010).
- 11) Maeda-Mamiya, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 5339 (2010).
- 12) Minami, K. *et al.*: *Sci. Rep.*, **4**, 4916 (2014).
- 13) Sawamura, M. *et al.*: *Chem. Lett.*, **29**, 1098 (2000).
- 14) Zhou, S.-Q. *et al.*: *Science*, **291**, 1944 (2001).
- 15) Homma, T. *et al.*: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 1665 (2010).
- 16) Homma, T. *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 6364 (2011).
- 17) Harano, K. *et al.*: *Chem. Commun.*, **49**, 3525 (2013).
- 18) Burger, C. *et al.*: *J. Colloid Interface Sci.*, **275**, 632 (2004).
- 19) Isobe, H. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 14895 (2007).
- 20) Minami, K. *et al.*: *Adv. Mater.*, **27**, 4020 (2015).
- 21) Krishnan, V. *et al.*: *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**, 15667 (2015).
- 22) Mikawa, M. *et al.*: *Bioconjug. Chem.*, **12**, 510 (2001).