

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18846

研究課題名(和文)論理的高分子設計によるデュアルpH応答型ドラッグデリバリーキャリアの創製

研究課題名(英文)Development of dual pH-responsive drug delivery carrier by the logical design of polymer

研究代表者

蛭田 勇樹(Hiruta, Yuki)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・助教

研究者番号：60710944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：局所加温による温度変化、細胞内小胞の低pHに注目した2段階温度、pH応答性ブロックポリマーを設計し、抗がん剤のドキソルビシンを内包させてミセル化し、がん細胞選択的な取り込み、および細胞取り込み後の薬物放出が可能なドラッグキャリアを創製した。このポリマーミセルは、体温よりも少し高い温度で相転移することで、細胞取り込み量が増加した。細胞毒性への温度の影響を調べたところ、42℃では37℃に比べて有意な細胞毒性を示した。温度変化による細胞取り込みコントロールと細胞内小胞の酸性環境を認識しドキソルビシンを効率良く放出する2段階の応答機能を持ち、がん細胞に対して有効な作用を示した。

研究成果の概要(英文)：We report a polymeric micelle drug delivery system, which enables selective intracellular uptake with external thermal stimulation, and effective release of a drug at internal acidic endosomal pH. We developed dual temperature- and pH-responsive polymeric micelle encapsulated anti-cancer agent, doxorubicin (DOX). The resultant micelle exhibited a temperature-dependent phase transition at a temperature slightly higher than body temperature, and intracellular uptake of encapsulated DOX was accelerated above phase transition temperature. The cytotoxicity of doxorubicin (DOX)-loaded dual temperature- and pH-responsive micelles against human cervical cancer HeLa cells was significantly greater at 42 °C than at 37 °C. This proof-of-concept synergistic two-step delivery system with enhanced intracellular uptake upon external thermal stimulation and rapid release of DOX at internal acidic endosomal pH was effective against tumor cells in vitro.

研究分野：物理系薬学

キーワード：温度 pH 機能性高分子 ミセル DDS 抗がん剤 ナノ材料

1. 研究開始当初の背景

体内に投与された薬物は、代謝や排出作用により短時間で体外に放出されてしまい、長時間にわたって治療有効濃度に保つことはきわめて難しい。また、薬物自体が選択性をもたないために、正常組織にも影響を及ぼすことで副作用が出てしまう。ドラッグデリバリーシステム(DDS)は、このような問題を克服するための技術であり、体内での薬の徐放、病態組織への局所的輸送を制御するシステムである。高分子ミセルやリポソームはドラッグキャリアとして開発されており、長時間の血中安定性を達成してきたが、その反面、病態細胞内への取り込み効率が低くなるという問題が生じた。これを解決する方法として、外部刺激によって、病態組織で局所的に薬物を放出させる方法や、特定の病態細胞への取り込みをコントロールする技術がある。高分子化学の発展によって、温度、pH、酸化還元、光、超音波などの外部刺激にตอบสนองして、その構造性質を大きく変化させるインテリジェント高分子の合成やその応用研究が盛んに行われ、DDS 研究の発展にもそれらが大きく貢献している。また、ポリマーの精密合成法も進歩を遂げており、任意の分子量に制御して、グラフト、ブロック、ほし型などの制御された構造のポリマーを得ることが可能となっている。

このように刺激応答性ポリマーの発展が著しいにもかかわらず、これまでの外部刺激応答型のドラッグキャリアは、1つの刺激にตอบสนองして薬物の放出、もしくは、細胞取込をコントロールするというような単一の応答性を制御するものであった。

2. 研究の目的

抗がん剤のような薬物で言えば、がん細胞に選択的に取り込まれ、細胞内部で抗がん剤を放出するというように、標的細胞の特定のオルガネラで薬物を放出するかが重要となってくる。このようなドラッグデリバリーシステムを構築できれば、副作用の軽減、抗がん剤の効果を高めることが可能である。このような背景から、ポリマーの精密合成により、DDS 応用を目的とした新規 2 段階温度、pH 応答性ポリマーを論理的に創製し、今までにない画期的な DDS システムを構築することを目的とした。本研究では、局所加温による温度上昇にตอบสนองしてがん細胞選択的に取込が促進され、細胞内酸性小胞の pH にตอบสนองして薬物を放出するというように二段階で、薬物のデリバリーを時空間的にコントロールすることが可能なドラッグデリバリーキャリアを開発する(図1)。

3. 研究の方法

図2に示す温度応答性の親水性セグメントに Poly(NIPAAm-co-N,N-dimethylacrylamide)、pH 応答性の疎水性セグメントに poly[2-(diisopropylamino)ethyl

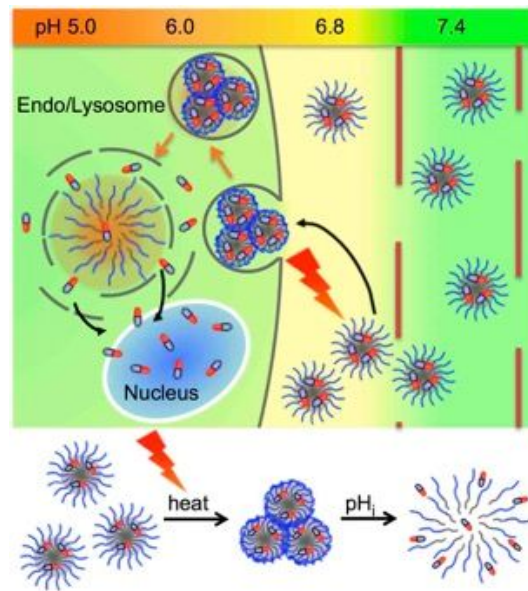


図1 2段階温度、pH 応答性ポリマーミセルによるドキソルビシンデリバリーのイメージ図

methacrylate]からなる両親媒性ブロックコポリマー(**PDP-b-ND**)を合成した。また、pH 応答性のない Poly(buthyl methacrylate)を疎水性セグメントとして、温度応答性のみを持つ両親媒性ブロックコポリマーを合成した(**PBM-b-ND**)。ポリマーの分子量、共重合組成はサイズ排除クロマトグラフィーおよび ¹H-NMR によって評価した。透析法によってミセルを形成させ、抗がん剤のドキソルビシンを内包した。相転移温度は温度変化に対する光透過率、粒子径は動的光散乱法によって求めた。ドキソルビシンを内包した **PDP-b-ND** および **PBM-b-ND** を用いて、培養温度によるヒト子宮頸癌由来(HeLa)細胞への取り込み能について、蛍光顕微鏡により観察した。また MTT アッセイにより 37 °C および 42 °C における細胞毒性を評価した。

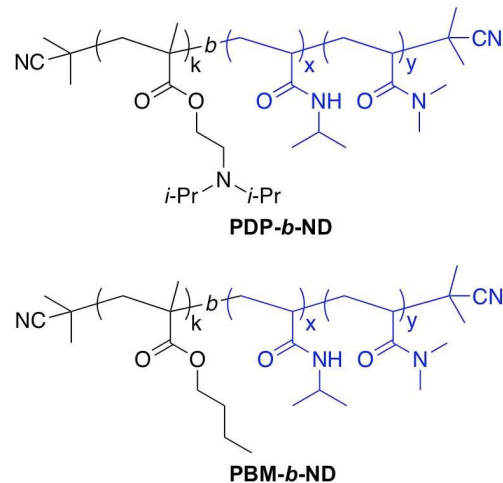


図2 PDP-b-ND および PBM-b-ND の構造式

4. 研究成果

図3に示すように、**PDP-*b*-ND** は pH 7.4, 6.4 では体温より少し高い温度 (38 °C ~ 39 °C) で光透過率が急激に下がった。これは、ミセル表面の温度応答性ポリマーが温度上昇とともに親水性から疎水性に相転移したためである。pH 5.4 になると、42 °C よりも高い温度で相転移が見られた。これは、pH 応答性ユニットがカチオン性となり親水性が高くなることで、温度応答性ユニットの相転移温度が上昇したと考えられる。**PBM-*b*-ND** は pH 応答性ユニットの代わりに疎水性ユニットとして PBMA を用いているために pH による変化はなかった。また、これらの温度応答性は可逆的であった。

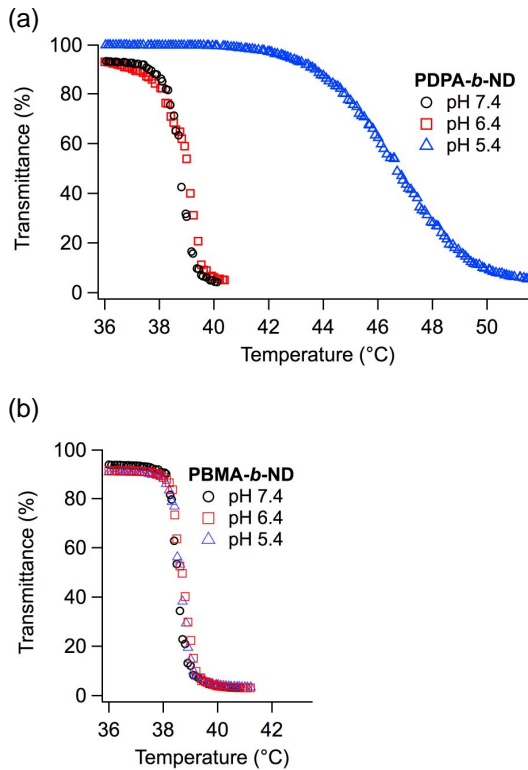


図3 温度変化に伴い変化する 0.5w/v% (a) **PDP-*b*-ND**, (b) **PBM-*b*-ND** ポリマーミセル溶液の光透過率

相転移温度とミセルの水中粒径の関係を評価するために、動的光散乱法により温度変化に対する流体力学的径を測定した (図4)。**PDP-*b*-ND** は pH 7.4, 6.4 の時に、37 °C では 50 nm 程度であり、単分散で PBS バッファー中に存在していることが考えられる。

42 °C では急激にサイズが増加しており、相転移によりミセル表面が疎水性となり、疎水性相互作用によって、凝集しサイズが大きくなったと考えられる。**PBM-*b*-ND** は pH に関係なく、同じように 37 °C では単分散、42 °C では凝集しサイズが増大する挙動を示した。**PDP-*b*-ND** は pH 5.4 では 37 °C、42 °C どちらの温度でも 9 nm 程度であり、ミセルが崩壊し、ポリマー単体としての大

きさが観察されたと考えられる。コア部分がカチオン性となり親水性になっていくことで、ミセルを形成する力が弱くなったためだと考えられる。これらの結果より **PDP-*b*-ND** は温度に応答して、親水性から疎水性に相転移する性質と pH に応答してミセルを崩壊させ、内包している薬物を放出できる性質を持つことが示された。

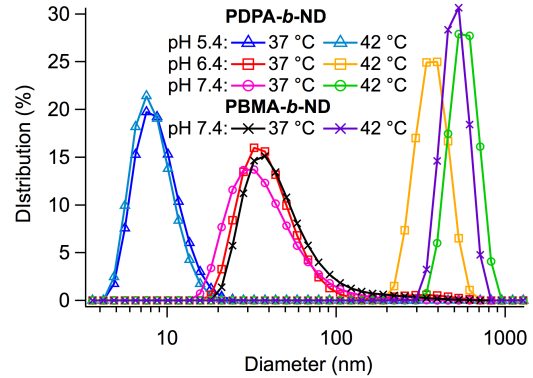


図4 動的光散乱法により測定したミセルの流体力学的径

温度による細胞取り込み能を調べるために、37 °C および 42 °C で HeLa 細胞にインキュベーションし、蛍光顕微鏡により観察した (図5)。

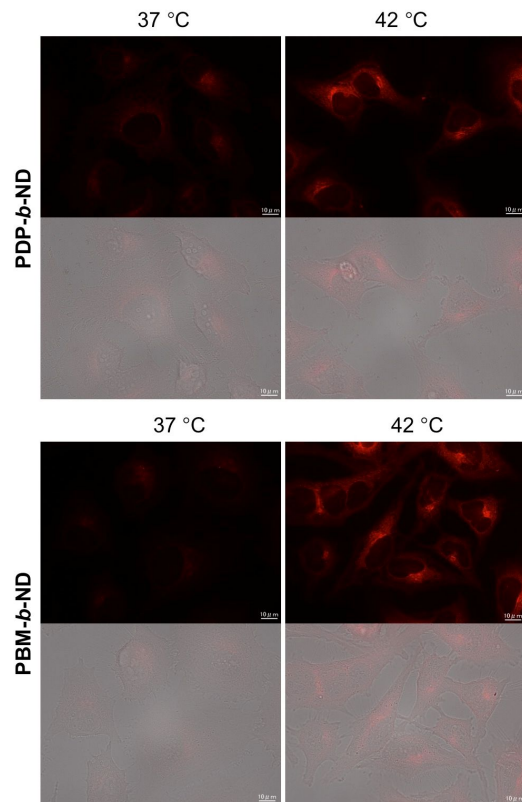


図5 37 °C と 42 °C で **PDP-*b*-ND** および **PBM-*b*-ND** を HeLa 細胞にインキュベーションした時の蛍光顕微鏡画像

PDP-b-ND、**PBM-b-ND** どちらにおいても、相転移温度以下の 37 °C では細胞内への内包ドキシソルビシンの取り込みは弱く、相転移温度以上の 42 °C では細胞取り込みの増大が見られた。これは相転移温度以上になるとミセル表面のポリマー鎖の疎水性が増すために、細胞への取り込みが増大したと考えられる。

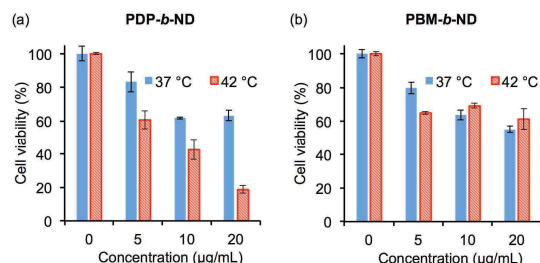


図 6 ドキシソルビシンを内包した (a) **PDP-b-ND**、(b) **PBM-b-ND** の細胞毒性に対する温度の影響 ($n = 3$)

MTT アッセイによって、細胞毒性への温度の影響を調べた (図 6)。 **PDP-b-ND** の場合、42°C では 37°C に比べて有意な細胞毒性を示した。また、疎水性ブロックに pH 応答性のない温度応答性だけを持つ **PBM-b-ND** では、細胞取り込みは 42°C で増加するものの、細胞毒性は有意な差は見られなかった。これらのことから、温度応答性による細胞取り込みの促進と細胞に取り込まれた後の pH 低下に伴うミセルの崩壊が細胞毒性に大きく寄与していることがわかった。そのため、このポリマーミセルは温度変化による細胞取り込みコントロールと細胞内小胞の酸性環境を認識し内包するドキシソルビシンを効率良く放出する 2 段階の応答機能を持ち、加温した部位選択的に抗がん剤を効率良く送達できる可能性を持つ。そのため、ハイパーサーミアとこのドキシソルビシン内包ポリマーミセルを組み合わせることで、副作用の低減、抗がん剤による治療効果がより増大する可能性を持つ。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 3 件)

1. Yuki Hiruta*, Yuki Kanda, Naoya Katsuyama, and Hideko Kanazawa*, "Dual temperature- and pH-responsive polymeric micelle for selective and efficient two-step doxorubicin delivery", *RSC Advances*, **2017**, Accepted. DOI: 10.1039/c7ra03579a. 査読有
2. Yuki Hiruta*, Ryo Nemoto, and Hideko Kanazawa*, "Design and synthesis of temperature-responsive polymer/silica hybrid nanoparticles and application to thermally controlled cellular uptake", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*,

2017, 153, 2-9. 査読有

3. Arisa Yamada, Yuki Hiruta, Jian Wang, Eri Ayano, and Hideko Kanazawa*, "Design of Environmentally Responsive Fluorescent Polymer Probes for Cellular Imaging", *Biomacromolecules*, **2015**, 16 (8), 2356-2362. 査読有

(学会発表)(計 17 件)

1. 蛭田勇樹「診断技術への応用を目指したスマートポリマープローブの精密設計」日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター(仙台) 2017 年 3 月 27 日
2. Yuki Hiruta, Yuki Kanda, Atsushi Miki, Yuki Nagata, and Hideko Kanazawa "Dual pH-responsive polymeric micelle for tumor cell selective uptake of anti-tumor agent" 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo, The University of Tokyo, Tokyo, November 28, 2016
3. 蛭田勇樹「がんの診断・治療を目指した pH 応答性高分子の精密合成」第 60 回日本薬学会関東支部大会、東京大学(東京) 2016 年 9 月 17 日
4. Yuki Hiruta, Yuki Nagata, Ryo Nemoto, and Hideko Kanazawa "pH-Responsive Polymer Nanomedicine for Acidic tumor Targeting" International Nanomedicine Conference, Flic en Flac, Mauritius, August 4, 2016
5. Yuki Hiruta, Ryo Nemoto, Yuki Nagata, and Hideko Kanazawa "Temperature-responsive fluorescence polymer nanoparticles with thermally controlled cellular uptakes" 2016 CRS Annual Meeting & Exposition, Seattle, USA, July 18, 2016
6. Yuki Hiruta, Yuki Nagata, Ryo Nemoto, and Hideko Kanazawa "Tumor acidity sensitive polymeric micelle for selective cellular uptake of doxorubicin" 2016 CRS Annual Meeting & Exposition, Seattle, USA, July 18, 2016
7. 蛭田勇樹、永田勇貴、根本遼、金澤秀子「固形がん選択的ターゲティングを目指した pH 応答性ポリマーミセルの創製と pH 選択的細胞取り込みの評価」第 32 回日本 DDS 学会学術集会、静岡県コンベンションツアーツセンター(静岡) 2016 年 7 月 1 日
8. 蛭田勇樹、根本遼、金澤秀子「温度応答性ポリマーナノ粒子の創製と温度による細胞取り込み制御」第 65 回高分子学会年次大会、神戸コンベンションセンター(神戸) 2016 年 5 月 26 日

9. Yuki Hiruta, Hideko Kanazawa “Temperature/pH-responsive Polymer Nanomaterials for Therapeutics and Diagnostics” EMN Meeting on Hydrogel Materials, Peninsula Excelsior Hotel, Singapore, May 11, 2016
10. 永田勇貴、山田有紗、根本遼、蛭田勇樹、金澤秀子「固形がん選択的ターゲティングを目指した pH 応答性高分子ミセルの創製」日本薬学会第 136 年会、パシフィコ横浜（横浜）2016 年 3 月 28 日
11. 蛭田勇樹、小出さやか、根本遼、金澤秀子「温度応答性有機・無機ハイブリッドポリマーナノ粒子の開発」第 25 回インテリジェント材料/システムシンポジウム、東京女子医科大学（東京）2016 年 1 月 8 日
12. Yuki Hiruta, Sayaka Koide, Jian Wang, Hideko Kanazawa “pH- and temperature-responsive organic-inorganic hybrid polymer nanoparticles with controlled cellular uptake” Pacifichem 2015, Oahu, USA, December 19, 2015
13. Arisa Yamada, Jian Wang, Yuki Hiruta, Hideko Kanazawa “Development of fluorescence probe for cellular imaging utilizing a temperature-responsive polymer” Pacifichem 2015, Oahu, USA, December 16, 2015
14. Ryo Nemoto, Jian Wang, Yuki Hiruta, Eri Ayano, Yoshie Maitani, Hideko Kanazawa “Preparation and characterization of thermo-responsive polymer modified liposomes aimed at application to anticancer agent delivery” Pacifichem 2015, Oahu, USA, December 16, 2015
15. Sayaka Koide, Jian Wang, Yuki Hiruta, Hideko Kanazawa “Development of Thermoresponsive Hybrid Nanoparticles Using Silica-block-copolymer” RSC Tokyo International Conference 2015, Makuhari, Japan, September 3, 2015
16. 蛭田勇樹、舟津孝明、王堅、小出さやか、金澤秀子「病態細胞の可視化を目指した温度・pH 応答性蛍光ポリマープロブの開発」PPF2015、長崎ホテル清風（長崎）2015 年 8 月 21 日
17. 小出さやか、王堅、蛭田勇樹、金澤秀子「シリカブロックコポリマーを用いた温度応答型ハイブリッド蛍光な粒子の開発」第 75 回分析化学討論会、山梨大学（山梨）2015 年 5 月 23 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蛭田 勇樹 (HIRUTA YUKI)
 慶應義塾大学・薬学部・助教
 研究者番号：60710944