

令和元年5月29日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16403

研究課題名(和文) 抗癌活性を持つ新規刺激応答性ミセルの開発：トリプルアタック癌治療とシナジー効果

研究課題名(英文) Design and Development of Anti-Cancer Smart Polymeric Nanomedicine that Allows Triple Synergistic Effect on Cancer Cure

研究代表者

金 栄鎮 (KIM, YOUNG-JIN)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・基礎科学特別研究員

研究者番号：90709205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：温度応答性高分子として生体適合性がよい poly(2-ethyl-2-oxazoline)(PEOz)を用いて、このPEOzを中心とした異なる3つの温度・pH応答性高分子の設計と合成に成功した((1)PEOz-hyd-DOX、(2)PEOz-hyd-PS、(3)PEOz-b-PPEEA)。その後、ナノサイズを持つ温度応答性スマートミセルキャリア(PEOzとDOX、PS部分がコアを形成し、カチオンポリマー鎖がシェルを形成する)をthin-film hydration methodで作製できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子系癌治療剤の開発は近年のバイオマテリアル、生体高分子、生命科学などの分野において国内外でホットトピックであり続けている。中には効率よく動物実験まで成功した優れた報告例もあるが、それらはほとんどが合成薬物・熱・合成遺伝子などによる成果であり、人への適用は非常に厳しく高いハードルである。本提案課題では、すでに体内で起こっているメカニズムを取り込むアイデアに至り、抗炎症と食細胞の食作用メカニズムを人為的に引き起こせしめ、人の病原の治療への応用に着想したことに学術的意義があると考えている。まだ結果に至っていないが、このアイデアは新たな治療メカニズムを提案したのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：The poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEOz), which has a good biocompatibility, was used here to design and synthesize three different kinds of temperature/pH-response polymers; (1) PEOz-hyd-DOX, (2) PEOz-hyd-PS, (3) PEOz-b-PPEEA. The thermo-responsive smart polymeric micelles were prepared by a thin-film hydration method and the hydrodynamic diameters at different temperature were obtained with nano-scaled size.

研究分野：生体高分子

キーワード：生体高分子

1. 研究開始当初の背景

最近様々な高分子を用いた癌又は特定の病原をターゲットにした薬物デリバリーシステムが注目されている。その中でも、機能性高分子を用いたミセル、リポソーム、パーティクル、ファイバーなどのキャリアを用いた治療法の開発が注目を集めている。しかし、特に、癌の治療のため開発された高分子キャリアや治療剤は、現在の段階では、薬物及び遺伝子のキャリアへの内包とそれらのデリバリーの効率が低いし、癌治療の効率が低い、副作用が多いという問題点がある。このような問題点を補完するため、高分子ミセルの内外部に生体分子や薬物などを組み合わせることにより癌又は特定病原のサイトへのデリバリーとリリースする技術が多く報告されているが、その効果も一過性に過ぎず、従来の対処療法が必要となると考えている。

本研究では、より高い薬物内包率とデリバリー効率を達成するため、新規温度応答性高分子ミセルを提案する。さらに、治療効率より高めるため刺激応答性高分子、薬物療法、遺伝子治療と癌細胞のアポトーシスを人工的な誘導するメカニズムを持つ高分子ミセルの設計と開発を提案する。

具体的には、(1)抗癌剤(doxorubicin: DOX)、(2)遺伝子(small interfering RNA: siRNA)と(3)フォスファチジルセリン(PS)を癌組織へのデリバリーとリリース可能なスマートミセルキャリアを開発する。また、ミセルキャリアの原料として刺激応答性高分子(温度・pH)を用いることで内包率を高めるし、癌細胞ターゲットの正確率も高めると考えられる。予想される癌治療のメカニズムは、(1)DOX による薬物療法、(2)siRNA を介した RNA 干渉による遺伝子治療と(3)PS を認識した免疫システムの活性化による癌細胞のアポトーシスを人工的な誘導となっておる(図1)。このようなスマートミセルキャリアの開発によって、癌細胞や癌組織のみに対し、副作用が低く、治療の高い効果と薬物治療と遺伝子治療だけでなく、癌細胞を人工的に死滅させることができる新しいスマート材料を用いた治療法の創出が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、より高効率な癌治療が可能な自己集合新規刺激応答性スマートミセルの設計と開発を行うことにその1次的な目的がある。スマートミセルを用いて、癌の治療のため化学療法(抗癌剤における治療)、遺伝子治療(RNA干渉における治療)と癌細胞の人工的なアポトーシス(フォスファチジルセリン(phosphatidylserine: PS)における人工的な癌細胞アポトーシス)の3つの方法で同時に癌細胞をアタックし、癌治療においてシナジー効果を生み出す刺激応答性をもつ新規スマートミセルキャリアの設計・開発により、高効率な癌治療が最終的な目的である(Figure 1)。

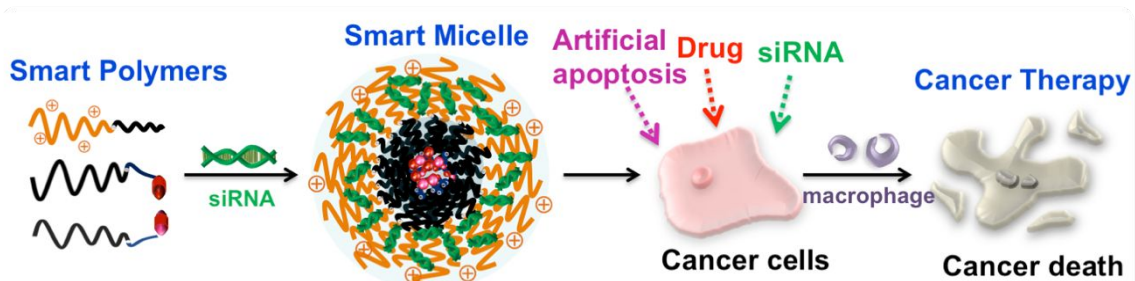


Figure 1. A concept illustration for proposed research. Temperature-responsive cationic block copolymer (siRNA), and drug, PS and pH-responsive cleavable link incorporating temperature-responsive polymers will be synthesized and used as sources of self-assembled smart micelles. Delivered polymeric micelles through vessels on the cancer site can be act as a nanomedicine with a synergistic triple anti-cancer effect by on-demand simultaneously release of siRNA, drug and PS for gene-/chemo-therapy and inducing artificial apoptosis, respectively.

3. 研究の方法

(1) 刺激応答性高分子とその共重合体の設計・合成

本研究の目標であるスマートミセルキャリアの作製のため、温度応答性高分子として生体適合性がよい poly(2-ethyl-2-oxazoline)(PEOz)を用いて、このPEOzを中心とした異なる3つの温度・pH 応答性高分子設計・合成を行った(Figure 2)。

PEOz のモノマーである 2-ethyl-2-oxazoline を開始剤 potassium iodide(KI)と ethyl 3-bromopropionate と (methyl *p*-toluenesulfonate)の存在下で開環重合を行うことで2種類のPEOzを合成した; PEOz-COOH と PEOz-OH (Figure 2)。

pH 応答性ヒドラゾンリンカー(hydrazine linker : hyd)を有する PEOz の設計・合成

得られた PEOz-COOH を thionyl chloride の存在下でカルボン酸基とヒドラゾンリンカーを反応させ PEOz-CONHNH₂(PEOz-hyd)を合成した。得られた PEOz-hyd の末端を抗癌剤の DOX と反応させ、(1)PEOz-hyd-DOX を合成した。癌細胞のアポトシスを誘導する PS 基を導入するためには、COP と n-(t-butoxycarbonyl)-L-serine methyl ester を反応させ、PS 前駆体を合成した後、PEOz-hyd の末端と反応させることで(2)PEOz-hyd-PS を合成した。

カチオン基を有する PEOz の共重合体の合成

本研究のカチオン高分子として、poly(2-aminoethyl ethylene phosphate)(PPEEA)を合成した。まず、PPEEA 前駆体(2-n-(t-butoxycarbonyl)ethanolamine-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane)の合成のため、n-(t-butoxycarbonyl)ethanolamine を合成した後、2-chloro-2-oxo-1,3,2-dioxaphospholane(COP)と反応させ、PPEEA 前駆体を合成する。最後に、PPEEA 前駆体と PEOz-OH を触媒(Sn(Oct)2)の存在下で反応させることで、カチオン基を有する(3)PEOz-*b*-PPEEA 共重合体を合成した。得られた 3 種類の高分子らは (1)PEOz-hyd-DOX、(2)PEOz-hyd-PS、(3)PEOz-*b*-PPEEA) ¹H-NMR でその構造分析を行った。

(2) スマートミセルキャリアの作製

スマートミセルキャリアは自己集合法で作製した。様々な方法があるが、本研究では、thin-film hydration method でミセルの作製を行った。3 種類の PEOz 高分子を有機溶媒に溶かした後、エバポレーターを用いて溶媒を飛ばし薄い高分子 film を作製した。その後、水に再溶解させ、温度と pH 応答性を有するスマートミセルを合成に成功した。PEOz と DOX、PS 部分がコアを形成し、カチオンポリマー鎖がシェルを形成する (Figure 1 and 2)。

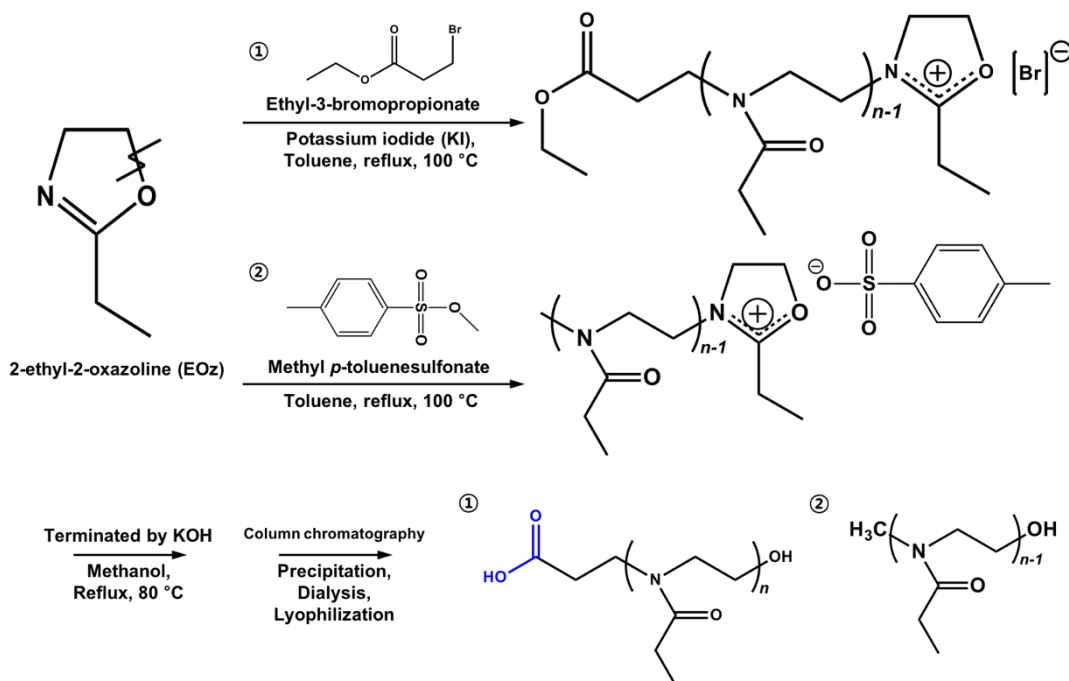


Figure 2. Strategies for synthesis of (PEOz)s with different end-groups; carboxylic acid end-group (COOH-PEOz-OH) and hydroxy end-group (CH₃-PEOz-OH). Those functional end-groups can be used for further modification of polymers.

4. 研究成果

本研究では、より高効率な癌治療が可能な刺激応答性を持つ高分子自己集合体ミセルの設計と開発にその目的がある。温度に応じて物性の変化制御が可能なスマートな性質・特性を用いて三つのそれぞれの癌治療方法(薬物治療、遺伝子治療、人工的アポトシス)の組み合わせと、それらのシナジー効果を生み出せ、癌治療の効果を極大化させる治療剤としての新規高分子ナノメディシンの開発を目指し、研究を進めた。

詳しくは、すべての材料のベースになる温度応答性高分子とした PEOz (poly(2-ethylene-2-oxazoline))の重合を行った。環状のモノマーに二つの異なる重合開始剤の存在下で反応させることで PEOz の末端に官能基 (COOH と OH) を有する PEOz の重合に成功した。得られた PEOz の末端を修飾させた後、目的である 3 種類の高分子の重合を行っ

た (1.PEOz-b-PPEEA: Cation polymer for gene therapy, 2.PEOz-hyd-DOX: Doxorubicin-conjugated pH-responsive PEOz for chemotherapy, and 3.PEOz-hyd-PS: PS-conjugated pH-responsive PEOz for artificial apoptosis inducing) 得られた 3 種類の高分子の化学構造を $^1\text{H-NMR}$ や FTIR などを確認し、重合の成功が確認できた。次のステップとして高分子ミセルの作成を行った (thin-film hydration method)。詳しくは、有機溶媒にすべての高分子を一度溶かした後、溶媒を全て蒸発させ薄い高分子膜を作成した。純水 ($70\text{ }^\circ\text{C}$) に再度溶解させた後、超音波をかけることで高分子ミセルの作成ができた。得られた高分子ミセルの直径を DLS (Dynamic Light Scattering) で測定した結果、およそ 224.0 nm ($25\text{ }^\circ\text{C}$) であった。一方で、温度が LCST (lower critical solution temperature) 以上の直径はおよそ 139.3 nm ($70\text{ }^\circ\text{C}$) に変化することが確認できた。この結果は、主な材料である PEOz の温度応答性に起因すると考えられ、昇温に応じて PEOz の分子が疎水化され高分子ミセルの直径が縮んでいると考えられる。今後は、温度応答性を持つ高分子ミセルの生体適合性を細胞実験で検討していく方針である。

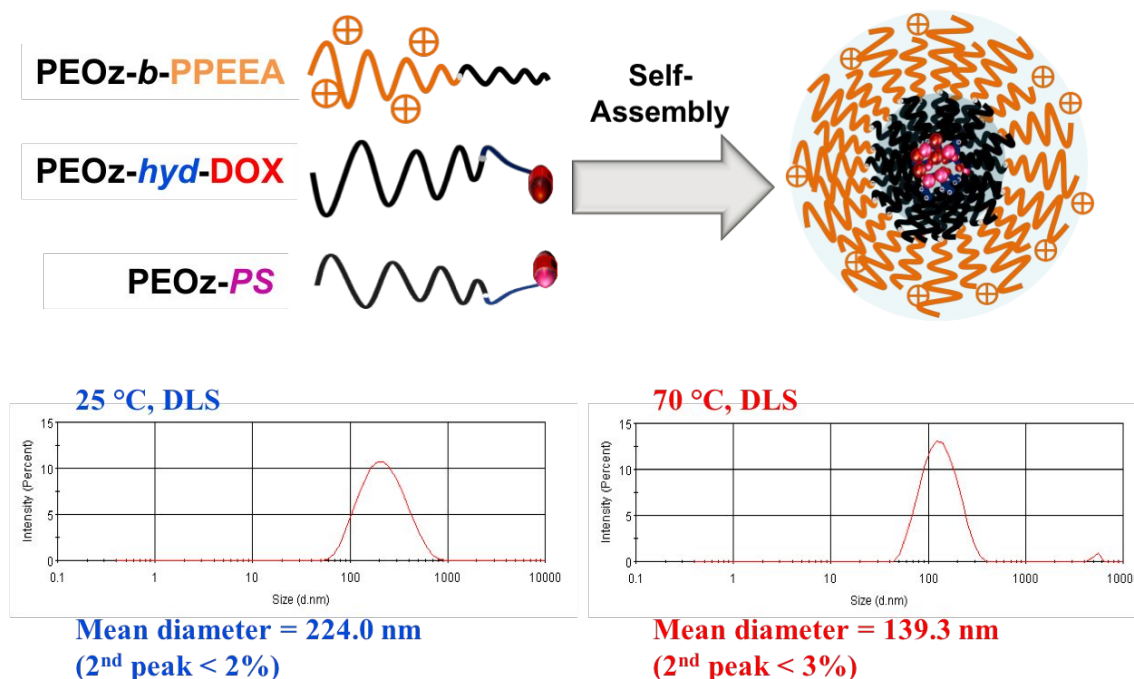


Figure 3. Polymeric micelles were prepared by thin-film hydration methods. The hydrodynamic size of polymeric micelles was investigated by DLS that results showed 224 nm and 139 nm at $25\text{ }^\circ\text{C}$ and $70\text{ }^\circ\text{C}$, respectively. Different hydrodynamic sizes were obtained at different temperature which was reversibly changed by temperature alteration because of expansion and contraction of PEOz temperature-responsive chains in response to temperature changes.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。