

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K06004

研究課題名(和文) LCST型・UCST型の機能を併せ持つ温度応答性 dendrimer の設計

研究課題名(英文) Design of thermosensitive dendrimers with both LCST/UCST functions

研究代表者

児島 千恵 (Kojima, Chie)

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50405346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：温度応答性ポリマーは加温によって白濁するLCST型と加温によって溶解するUCST型に大別され、インテリジェント材料として様々な分野で利用されている。本研究では、疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン(Phe)をもつカルボキシ末端 dendrimer は、LCST型とUCST型の性質をpHによってスイッチングできるユニークな性質を示すことを明らかにした。また、この dendrimer を皮内投与すると、リンパ節に集積し、これまでデリバリーが困難であったT細胞を含む様々な免疫細胞に取り込まれることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LCST型とUCST型の性質をpHによってスイッチングできる温度応答性材料はこれまでにない。本研究で作製した dendrimer は、新たなインテリジェント材料として様々な分野での応用が期待される。また、T細胞内部へのデリバリーは、現在のところ、抗体を付与したウイルスでしか達成されていない。本研究結果は、T細胞へのデリバリーが可能な安全性の高い非ウイルス性のナノ粒子として新しいデリバリー技術を提案することができる。

研究成果の概要(英文)：Temperature-responsive polymers are classified into LCST type which becomes turbid upon heating and UCST type which dissolves upon heating, which have used as intelligent materials in various fields. In this study, we found that carboxy-terminal dendrimers containing phenylalanine (Phe), a hydrophobic amino acid, exhibited a unique property that allows them to switch between LCST-type and UCST-type properties depending on pH. These dendrimers after the intradermal injection were useful for delivery into in lymph node-resident various immune cells, including T cells which had been difficult to deliver.

研究分野：高分子材料化学

キーワード： dendrimer 温度応答性 pH応答性 T細胞 ドラッグデリバリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温度応答性高分子は、インテリジェントマテリアルとして様々な分野で広く利用されており、ポリ N-イソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) はその代表例として知られている。温度応答性高分子には、低温で溶解し加温によって白濁する LCST 型と、低温で白濁し加温によって溶解する UCST 型がある。いずれも相転移温度を境に劇的に溶解性が変化し、その温度は高分子の親疎水性バランスで変化することが知られている。PNIPAAm をはじめとする LCST 型の温度応答性ポリマーについては非常に多くの研究がなされているが、UCST 型の温度応答性ポリマーの研究は LCST 型よりも立ち遅れており、温度応答性の制御、メカニズムの詳細、応用展開など、様々な知見の蓄積が望まれている。例えば、ドラッグデリバリー分野の研究においては、既存の LCST 型の温度応答性材料は加温によって細胞との相互作用を増強したり、リポソーム膜の構造を乱すことによる放出促進が実施されたが、UCST 型の温度応答性材料が開発されれば、温度刺激によって溶解する新規な薬物運搬体を提供することができる。

我々は、これまで様々な温度応答性 dendrimer の作製とそのバイオ応用について検討を行ってきた。Dendrimer は樹状構造の合成高分子であり、その分子量や構造を精密に制御することができる。また、その末端にある反応性官能基に様々な化合物を結合させたり、内部に低分子を内包することができる。これまでの研究で、PNIPAAm の部分構造 (イソプロピルアミド基) を結合した温度応答性 dendrimer を作製した (Haba, Kojima et al, *Angew Chem. Int. Ed.* 2007)。また、Dendrimer 末端に様々な疎水性分子を結合することによって、温度応答性 dendrimer を作製できることも明らかにしてきた (Haba, Kojima et al, *Macromolecules* 2006)。さらに、Dendrimer の内部空間による物質保持能を利用して、物質を内包した状態で加温することによって水溶液中から有機分子を分離・回収できることも明らかにした (Kono, Kojima et al, *JACS*, 2007)。バイオ応用においては、生体適合性に優れた温度応答性 dendrimer を作製する必要がある。そこで、温度に反応して高次構造が変化する蛋白質 (コラーゲンやエラスチン) に着目し、これらのモデルペプチドを dendrimer に結合することで温度応答性バイオ dendrimer の作製を行った (Kojima et al, *JACS*, 2009; Kojima et al, *Biopolymers*, 2013)。また、フェニルアラニン (Phe) は 1 残基のアミノ酸をポリアミドアミン (PAMAM) dendrimer に結合することによって LCST 型の温度応答性 dendrimer を作製できた (Tono, Kojima et al, *Langmuir*, 2006)。しかし、UCST 型の温度応答性を示す dendrimer の報告はなかった。

2. 研究の目的

バイオ応用においては、酸性条件で反応する温度応答性 dendrimer が有用である。しかし、これまで研究した Phe 結合 dendrimer は末端がアミノ基であるため塩基性のみで温度応答性を示した。そこで、酸性条件で反応するために、カルボキシ末端をもつ Phe 結合 dendrimer を作製した。すなわち、アミノ末端の PAMAM dendrimer に酸無水物を反応させてカルボキシ化し、その末端に Phe のアミノ基を反応させた。本研究では、Phe および様々な酸無水物を反応させたカルボキシ末端の Phe 結合 dendrimer を合成し、その温度・pH 応答性について検討した。また、物質分離への利用の可能性について検討を行った。

リンパ節は多数の免疫細胞が存在する組織であり、第 4 のがん治療法であるがん免疫療法において重要な役割を果たす。そのため、リンパ節へのデリバリーシステムの開発が求められている。我々は、これまでの研究で、アニオン性のカルボキシ末端 dendrimer を皮内投与すると、リンパ節に移行することを示してきた (Niki, Kojima et al, *Nanomedicine*, 2015)。そのため、上記で合成するカルボキシ末端の Phe 結合 dendrimer は温度応答性材料としてだけでなく、リンパ節へのデリバリーシステムにおいても有用であると考えられる。そこで、本研究で合成するカルボキシ末端をもつ Phe 結合 dendrimer のリンパ節移行性やリンパ節内の免疫細胞への取り込み挙動についても合わせて検討した。

3. 研究の方法

1) 様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendrimer の合成と温度・pH 応答性の評価

酸無水物と適切な保護基を有する Phe を結合することで、様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendrimer を合成した。図 1 のように、結合順を変更することで、末端が Phe の dendrimer もしくは酸無水物の dendrimer を合成することができる。また、酸無水物として、無水コハク酸 (Suc) だけでなく、シクロヘキサジカルボン酸無水物 (CHex)、無水フタル酸 (Ph) を反応させた dendrimer も合成した。さらに、PAMAM dendrimer の世代数の異なる dendrimer や、末端にスルホ基を導入した dendrimer も合わせて合成した。合成した化合物は ¹H NMR 解析によって同定した。そして、pH の異なる 1 mg/mL の各種 dendrimer 水溶液を作製し、500 nm での温度変化透過率測定を行った。

2) 様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendrimer の物質分離への応用

1) で合成した dendrimer にモデル薬物であるローズベンガルを担持させ、pH または温度が異なる条件で遠心分離した (11000 rpm, 5 分)。遠心前後での上澄み液の RB の吸収スペク

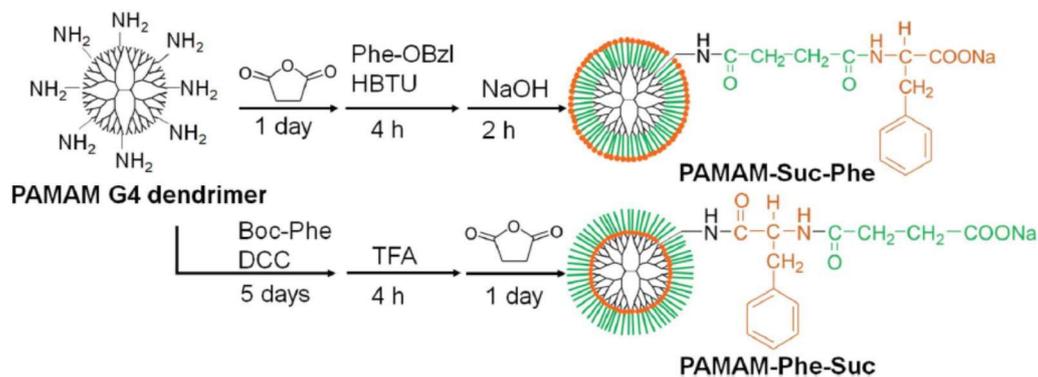


図1、種々のカルボキシ末端 Phe 結合 dendリマーの合成方法

トルを測定した。

3) 様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendリマーのリンパ節移行性および免疫細胞との相互作用の解析

1) で合成した dendリマーに緑色蛍光色素を結合させて蛍光標識した。この dendリマーをマウスの足に皮内投与し、膝窩リンパ節の蛍光イメージングを行った。また、膝窩リンパ節内の免疫細胞を採取して黄色蛍光色素 (PE) で標識した抗体 (CD3、CD45R、CD11c、F4/80) を用いてそれぞれ T 細胞、B 細胞、樹状細胞、マクロファージを染色した後、フローサイトメトリーで dendリマーと各種免疫細胞との相互作用について解析した。

4. 研究成果

1) 様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendリマーの温度・pH 応答性

まず、図1の上段のように、アミノ末端の PAMAM dendリマーに無水コハク酸 (Suc)、シクロヘキサンジカルボン酸無水物 (CHex) もしくは無水フタル酸 (Ph) を反応させた後に、カルボキシ末端を保護した Phe を反応し、脱保護することで、ほぼ全ての末端に酸無水物および Phe を結合した PAMAM dendリマーを合成した。図2に示すように、これらの dendリマーは中性付近の pH では溶解し、酸性領域の pH では白濁した。そして、その間の pH で UCST 型の温度応答性を示した。pH 応答性は酸無水物の構造によって変化し、疎水性の高い Ph および Chex を反応させた dendリマーでは、より高い pH 領域にて温度応答性を示した。これは、カルボキシ基の電離状態が温度・pH 応答性に関与していることを示唆している。

このように、カルボキシ末端の dendリマーは UCST 型の温度応答性を示した。我々は、アミノ末端の Phe 結合 dendリマーは LCST 型の温度応答性を示すことを報告してきたが、UCST 型の温度応答性 dendリマーは本研究が初めての報告となった。これまでの研究で、双性イオンをもつポリマーが UCST 型の温度応答性を示すことが知られている。合成した dendリマーでは、PAMAM dendリマーの内部三級アミンと末端カルボキシ基によって双性イオン構造をとるため、UCST 型の温度応答性を示したと考えられる。

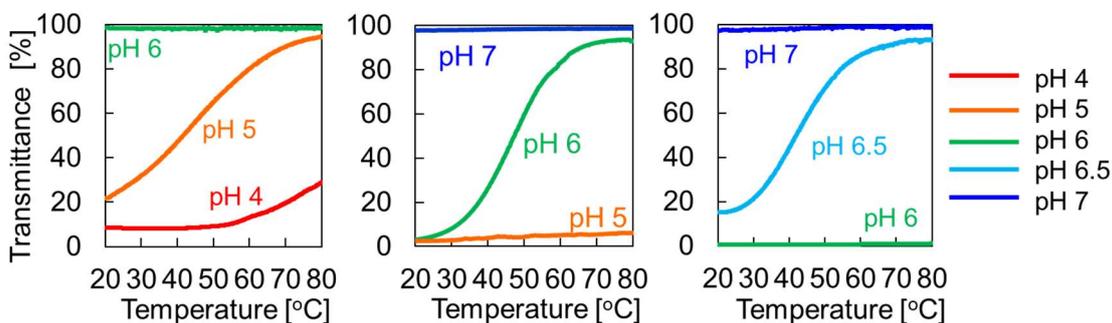


図2、カルボキシ末端 Phe 結合 dendリマーの温度・pH 応答性。左から G4-Suc-Phe、G4-Ph-Phe、G4-CHex-Phe の結果を示す。

次に、図1の下段のように、アミノ末端の PAMAM dendリマーに先にアミノ末端を保護した Phe を反応し、脱保護した後に、無水コハク酸を反応させた dendリマーを合成した。こちらもほぼ全ての末端に無水コハク酸と Phe を結合した PAMAM dendリマーが合成できたことを確認した。図1の上段と下段の化合物は結合順が異なるだけで、化学組成は同じ dendリマーであるが、図3に示すように、その pH・温度応答性は全く異なった。すなわち、pH6 では溶

解し、pH5.5ではUCST型の温度応答性を示し、pH5では白濁したが、さらにpHを下げるとpH4でLCST型の温度応答性を示した。pHによって温度応答性のLCST型・UCST型をスイッチングできるという非常に興味深い現象が確認された。

しかし、カルボキシ末端の dendrimer では、相転移挙動がブロードであった。カルボキシ基はpHによって電荷状態が変化するため、双性イオン構造が安定でないことが原因と考えられる。そこで、強酸であるスルホ基を末端に導入した Phe 結合 dendrimer (G4-Phe-SO₃Na) を合成し、温度・pH 応答性を調べた (図4)。その結果、カルボキシ末端と比較して、より弱酸領域でシャープな相転移挙動が確認された。これは、G4-Phe-SO₃Na では側鎖に第二級アミノ基とスルホ基を有しており、双性イオン構造が各末端で安定に形成できるためであると考えられる。

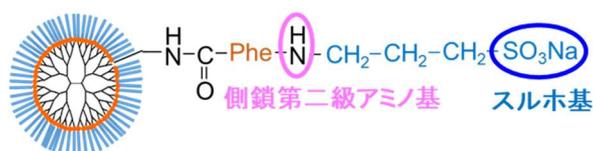


図4、スルホ末端 Phe 結合 dendrimer (G4-Phe-SO₃Na) の構造 (左) と温度・pH 応答性 (右)

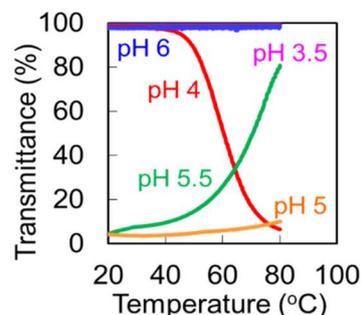
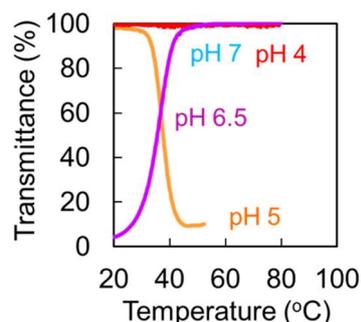


図3、G4-Suc-Phe の温度・pH 応答性



このように、アミノ末端の Phe 結合 dendrimer の末端をカルボキシ化もしくはスルホ化することによって、pH によって UCST 型と LCST 型をスイッチングできる新しいタイプの温度応答性 dendrimer を作製できた。これまでの研究では、水と有機溶媒の混合比によって UCST 型と LCST 型をスイッチングするという報告はあったが、本研究のように pH でスイッチングできるのを示した例はこれまでになく、新しい温度応答性ポリマーとしての応用が期待される。

2) 様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendrimer の物質分離への応用

物質分離はグリーンケミストリーにおいて重要な技術である。例えば、廃液からの有機物や金属イオンの除去は水環境の保全において極めて有用であるとともに、回収・再利用できれば資源の有効利用につながる。ローズベンガル (RB) は PAMAM dendrimer に内包することができる分子として知られている (Kojima et al, Bioconjugate Chem., 2007)。本研究では、モデル物質として RB を用いて、作製した pH 温度応答性 dendrimer における物質分離への展開の可能性について検討した (図5)。

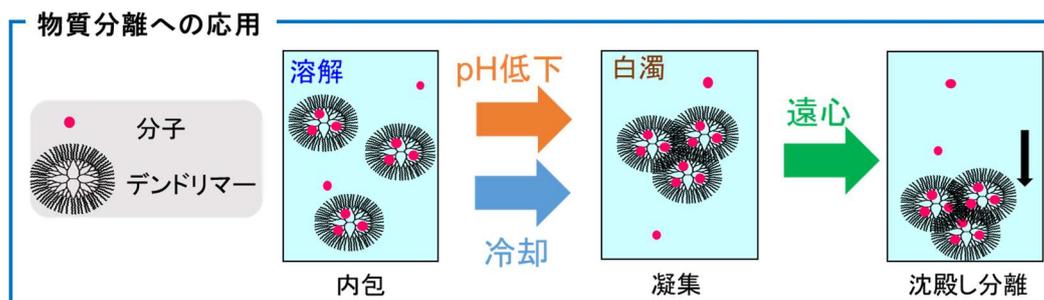


図5、温度・pH 応答性 dendrimer を利用した物質分離

G4-Ph-Phe に RB を担持させ、様々な pH および温度で遠心分離した。この dendrimer が白濁する pH 5 では、RB を内包した dendrimer が沈殿し、RB を水溶液から分離・回収することができた。しかし、G4-Ph-Phe の温度応答性はブロードであるため、冷却条件での分離回収は難しかった。そこで、G4-Phe-SO₃Na と RB を混合して冷却した後、遠心分離を行った。図6に示すように、4°Cに冷却して遠心することで、ほとんどすべての RB を水溶液から除去することができた。

以上より、pH・温度応答性の dendrimer の物質分離への展開の可能性が示唆された。

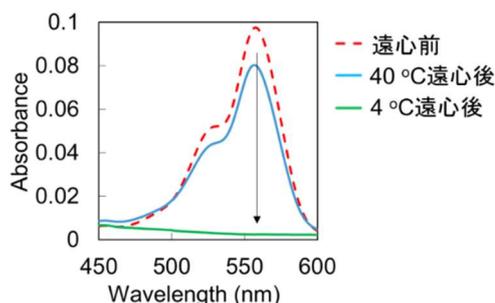


図6、G4-Phe-SO₃Na による RB の物質分離

3) 様々なカルボキシ末端 Phe 結合 dendriマーのリンパ節移行性と免疫細胞との相互作用

1) で合成した den-CHex-Phe (CPhe-den) をマウスに皮内投与し、その体内動態について検討した。Phe をもたないカルボキシ末端 dendriマー (C-den) と免疫細胞に取り込まれることが分かっているホスホ末端 dendriマー (P-den) と比較したところ、いずれもリンパ節に移行したが、den-CHex-Phe の移行量が最も多いことがわかった (図7)。また、リンパ節に存在する各種免疫細胞への取り込み能について検討したところ、CPhe-den では、これまでデリバリーが難しかった T 細胞にも取り込まれることが明らかとなった (図8)。

ex vivo の細胞取り込み実験で、37°Cでは CPhe-den は免疫細胞に取り込まれたが、4°Cでは取り込みがみられなかったことから、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれていることが示唆された。以上より、Phe をもつカルボキシ末端 dendriマーは T 細胞の内部へのデリバリーシステムへの応用の可能性が示された。既存の T 細胞デリバリー技術では細胞内部へのデリバリーは難しかったため、他の免疫細胞を介して間接的に T 細胞の活性制御がなされている。しかし、上記の dendriマーを用いることで、免疫反応で中心的な役割を果たす T 細胞への直接デリバリーシステムの構築が期待される。

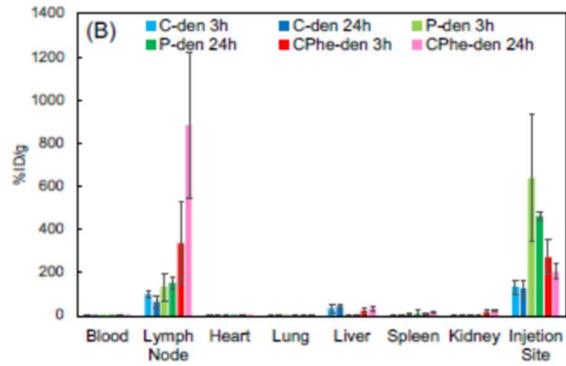


図7、様々な dendriマーの体内動態

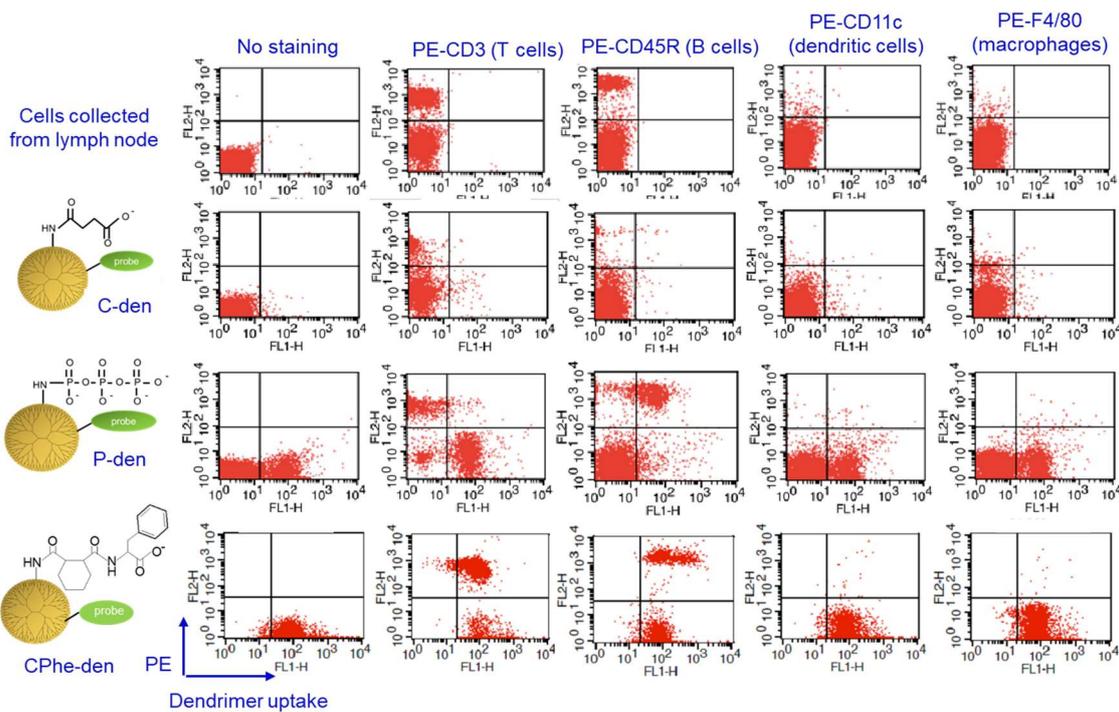


図8、様々な構造の dendriマーとリンパ節内の様々な免疫細胞との相互作用

以上のように、本研究を通じて、4つの大きな成果を得ることができた。

- 1) 世界初の UCST 型の温度応答性 dendriマーを作製した。
- 2) LCST 型・UCST 型の温度応答性を pH によってスイッチングできる極めてユニークな特長を持つ新規温度応答性ポリマーが作製された。
- 3) これらの dendriマーが物質分離に利用できることを示した。
- 4) 既存の技術では難しかった T 細胞内部へデリバリーできる dendriマーが作製された。

これらの研究成果は、インテリジェントマテリアルの創製やがん免疫療法のためのデリバリーシステムの構築に大きく貢献するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Y. Nishimoto, M. Nishio, S. Nagashima, K. Nakajima, T. Ohira, S. Nakai, I. Nakase, K. Higashikawa, Y. Kuge, A. Matsumoto, M. Ogawa, C. Kojima	4. 巻 12
2. 論文標題 Association of hydrophobic carboxyl-terminal dendrimers with lymph node-resident lymphocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 1474
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym12071474	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 M Tamaki, C. Kojima	4. 巻 10
2. 論文標題 pH-Switchable LCST/UCST-type thermosensitive behaviors of phenylalanine-modified zwitterionic dendrimers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RSC Adv.	6. 最初と最後の頁 10452-10460
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0RA00499E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mamiko Tamaki, Daichi Fukushima, Chie Kojima	4. 巻 8
2. 論文標題 Dual pH- and UCST-type thermo-sensitive dendrimers: phenylalanine-modified polyamidoamine dendrimers with carboxyl termini	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 28147-28151
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8ra05381b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 児島千恵	4. 巻 75
2. 論文標題 直鎖状および樹木状ポリリシンを用いた機能性バイオ材料	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 高分子論文集	6. 最初と最後の頁 137-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 児島千恵、玉木万美子、西尾実咲、西本豊、松本 章一
2. 発表標題 カルボキシ末端をもつフェニルアラニン修飾 dendrimer の刺激応答性と免疫細胞へのデリバリー
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 児島 千恵
2. 発表標題 リンパ節内の種々の細胞へのデリバリー技術の開発
3. 学会等名 創薬・基盤技術ビジネスフォーラム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 児島 千恵
2. 発表標題 樹状高分子を用いたリンパ節へのデリバリーシステム
3. 学会等名 BioMedical Forum 2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Chie Kojima
2. 発表標題 Targeting to Lymph Nodes by Anionic Dendrimers
3. 学会等名 The 16th Pacific Polymer Conference (PPC16)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西尾実咲、西本豊、中井慎也、中瀬生彦、松本章一、児島千恵
2. 発表標題 疎水性カルボキシ基末端デンドリマーの免疫細胞への取り込み挙動
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chie Kojima
2. 発表標題 Preparation of LCST/UCST Type Thermosensitive Dendrimers
3. 学会等名 The 8th TKU-ECUST-OPU-KIST-UH-IHU-KMITL-UTAR-TNU Joint Symposium on Advanced Materials and Applications (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Tamaki, Chie Kojima
2. 発表標題 Various Acid-terminal Phenylalanine-modified Dendrimers Switching LCST/UCST Thermosensitive Behaviors by pH
3. 学会等名 The 8th TKU-ECUST-OPU-KIST-UH-IHU-KMITL-UTAR-TNU Joint Symposium on Advanced Materials and Applications (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児島 千恵
2. 発表標題 デンドリマーの表面加工による体内動態の制御とターゲティング能の付与
3. 学会等名 第68回高分子討論会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児島 千恵
2. 発表標題 アミノ酸・ペプチドの結合によるデンドリマーナノ粒子の機能化
3. 学会等名 未来へのバイオ技術"勉強会「バイオ素材百花繚乱14」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chie Kojima, Mamiko Tamaki
2. 発表標題 UCST-type Thermosensitive Dendrimers
3. 学会等名 11th International Dendrimers Symposium (IDS11) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉木万美子、児島千恵
2. 発表標題 カルボキシル末端フェニルアラニン修飾デンドリマーのpH・温度応答メカニズムの検討
3. 学会等名 第65回高分子研究発表会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 児島千恵、玉木万美子
2. 発表標題 フェニルアラニンの導入によって作製したLCST型およびUCST型温度応答性デンドリマー
3. 学会等名 第68回高分子学会年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 玉木万美子、福嶋大地、児島千恵
2. 発表標題 フェニルアラニンを結合したカルボキシ末端 dendriマーの UCST 型温度応答挙動
3. 学会等名 第67回高分子学会年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 玉木万美子、児島千恵
2. 発表標題 フェニルアラニンを修飾した dendriマーが示す温度応答性のスイッチング
3. 学会等名 第64回高分子研究発表会（神戸）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 児島千恵、玉木万美子、福嶋大地
2. 発表標題 様々なフェニルアラニン修飾 dendriマーの合成と pH および温度の二重刺激応答性
3. 学会等名 第67回高分子討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mamiko Tamaki, Chie Kojima
2. 発表標題 Carboxyl-Terminal Phenylalanine-Modified Dendrimers with Dual pH- and Thermo-Sensitivity
3. 学会等名 The 7th ECUST-TKU-KIST-OPU Joint Symposium on Advanced Materials and Applications, Shanghai (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Maniko Tamaki, Chie Kojima
2. 発表標題 pH and Temperature Response of Phenylalanine- and Succinic Acid-Modified Dendrimers
3. 学会等名 The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 C. Kojima
2. 発表標題 Different Features of Dendritic and Linear Polylysines as a Cell Scaffold and a Nanoplatform
3. 学会等名 The 10th International Dendrimer Symposium(IDS2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 児島千恵、斎藤憲、近藤英作
2. 発表標題 腫瘍標的能と抗がん活性をもつペプチドを結合したデンドリマーの設計
3. 学会等名 第66回高分子学会年次大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 免疫細胞に移行する担体	発明者 児島千恵、西本豊	権利者 大阪府立大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-206377	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

児島研究室HP
http://www2.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/kojima_lab/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------