

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K12090

研究課題名（和文）生体組織内反応性ナノ粒子によるがん組織固定化技術の開発

研究課題名（英文）Development of tumor tissue fixation method by controlling chemical reaction between stimuli-responsive materials and biological molecules

研究代表者

秋元 淳（AKIMOTO, JUN）

国立研究開発法人理化学研究所・創発物性科学研究センター・研究員

研究者番号：80649682

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ナノ粒子を利用してがん組織周辺にネットワーク構造を形成させることでがん組織の機能を物理的に阻害する方法について検討した。生体内でネットワーク構造を形成させるためには、外部刺激に反応して安定な架橋構造を形成させる必要があることから、温度に反応して化学反応の進行を制御可能なナノ粒子型のゲル化剤について開発した。開発した粒子は、温度上昇または降下に反応した粒子の構造変化で官能基を露出させることで、官能基間のカップリング反応の進行を制御できゲル化を促進できる。本研究では、細胞組織に対するゲル化の実現までには至らなかったが、血管内部に適用する生体塞栓剤としての応用が期待できる結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がんの化学的治療の方法で物理的治療と同様に生体からがん組織を隔離する技術の方法論を提案した。生体内の組織を生体内に隔離するには、人工物で生体組織と相互作用しないように隔離する必要がある。本研究は、生体から隔離するための基材開発を行い、温度変化で化学架橋されたゲルを作製することに成功した。本研究で開発した材料では、生体組織内で強固なゲルを形成するには不十分であることがわかったが、架橋に利用する結合を生体内の低分子化合物と干渉しないものに変換することで生体内での応用も可能になることが期待でき、新しいがん治療法の開発の端緒になったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed in situ tumor fixation method to physically inhibit the function of tumor tissue by forming a network structure on tumor tissue using nanoparticles. In order to form the stable crosslinking structure on tumor tissues, covalent bond crosslinks is necessary to be formed by external signals. Thus, we developed a nanoparticle-type gelator that can control the progression of the chemical reaction in response to temperature changes. The developed particles can control the progression of the coupling reaction between the functional groups by exposing the functional groups on the nanoparticles through the thermal structural change of the thermoresponsive particles. In addition, we have succeeded in forming stable hydrogel against temperature changes. This thermally forming hydrogel system is expected to be applied as an embolization agent for blood vessels including tumor tissues.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ハイドロゲル 刺激応答性 化学架橋ゲル がん治療 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

がん治療では、まず手術により切除が可能であればがん組織を物理的に除去する。これによりすべてのがん細胞が除去できればがんは完治する。しかし、切除不能なものや広範囲におよぶ転移巣に対しては抗がん剤や放射線などの化学療法が行われる。通常の化学療法は、薬剤や放射線照射によりがん細胞一つ一つを殺傷することで治療効果を与える。これらの手法でがん組織を治療するには、複数のがん組織学的・分子生物学的課題（薬物送達法、間質の壁、薬剤耐性、がん幹細胞など）があり、これを1つもしくは複数の薬剤・手法で解決することが要求される。これら問題を1つでも解決できないとがん治療効果は殆ど獲得できず、またがん幹細胞が1つでも残存していれば真の完治とはいえず常に再発の恐れが生じることが問題である。このようにがん治療において手術による物理的除去と化学療法は相補的な関係にあり、どちらも完全な治療法でないことからがん治療は困難を極めている。そこで、物理的治療法と化学療法を補完する橋渡しの治療法を開発すれば、これまでにないがん治療効果が得られることが期待できる。手術による物理的な治療方法では病巣を体内から切除し、病巣を体内から分離している。化学療法では体内から体外に病巣を排出することができないことから、化学療法でこれと同等な効果を実現するには、がん組織を体内に分離・隔離する方法が有効であると考えられる。つまり腫瘍組織に対して人工的にゲル様のネットワーク構造を形成させることができれば、がん細胞・組織周辺を人工物で被覆することによりがん組織を生体から隔離し、生体に影響を及ぼさない状態に転化できると期待できる。つまりこのようながんを物理的な障害により生体から隔離することができれば、がんの転移や組織浸潤といった脅威を排除できると考えられる。このようながんを体内に隔離する技術を確立することで、“がんを無害化させて体内で共存する”という新しいがん治療が実現できると考えられる。

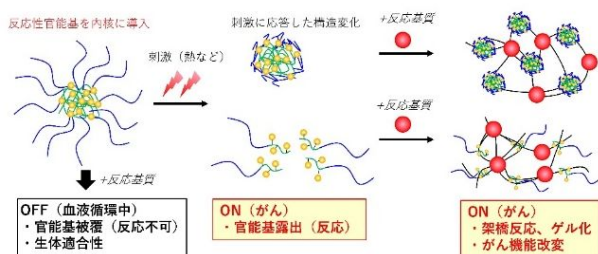


図1 刺激応答性ナノ粒子の構造変化を利用した化学反応制御法。ナノ粒子は外部刺激にตอบสนองして構造を変化させて官能基を露出する。これにより、反応基質（生体内のたんぱく質や基質となる官能基を導入したナノ粒子）と反応して架橋構造を形成させることで、腫瘍環境を改変することができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ナノ粒子をがん組織内に送達後、がん組織内においてナノ粒子間もしくは生体分子との反応により、がん組織内にゲル構造を形成し、このゲルの空間構造を利用して細胞増殖・遊走や物質透過性を制御する方法を開発することを目的とする。この方法は、手技的には従来の化学療法と同様であるが、がん細胞・組織周辺にゲル構造を形成させることができればがんを生体内から隔離されることから、手術のような物理的治療効果を得ることができ、化学療法と物理的治療の両者を融合した新規がん治療法の開発につながる。これを実現するために、架橋剤または架橋点を導入したナノ粒子を合成し、がん組織に送達後、任意の刺激に応じて反応点が露出するシステムを構築する。これにより、任意の刺激にตอบสนองしてがん組織内での架橋反応が促進され、ナノ粒子同士またはナノ粒子と生体物質のゲル構造を形成することができる。このゲル構造により細胞および物質の移動を物理的に制御することができれば、がんはその機能を喪失するために物理的治療法と同等の効果が得られる。このがん組織内ゲル化システムは、反応場の違いにより発現する機能が異なると想定される。ナノ粒子により血管内にゲルを形成すれば、塞栓形成により腫瘍への物質供給が可能となる。これに対してがん組織内に細胞の透過を抑制するサイズのゲル層が形成すれば、がん細胞の増殖・遊走が抑制されることから、がん組織を良性腫瘍と同様な性質に転換させることが期待できる。さらに緻密なゲル層を形成し、栄養、酸素の供給が遮断できれば、内部の細胞は壊死しがんの機能を完全に崩壊させることが可能となる。このようにしてがん組織をゲル層より完全に被覆できれば、この組織は生体から隔離されるため、生体に対して無害化できる。このようなナノ粒子を利用した物理的な障壁によりがん組織の機能を制御する方法を実証できれば、化学療法の特性を活用して手術による組織切除のような物理的治療効果が得られる革新的ながん治療法になる。本研究ではこのような治療法を実現するために、がん組織にデリバリー可能で生体内で化学反応を制御するためのゲル化剤を設計し、この機能評価をおこなった。

3. 研究の方法

(1) 温度変化にตอบสนองして生体分子と反応するナノ粒子の開発

熱にตอบสนองして構造が変化する温度応答性ナノ粒子に生体高分子と反応性を有する官能基を修飾し、この粒子と生体高分子間の反応を温度変化で制御する方法について検討した。温度低下により崩壊するナノ粒子は、アルデヒド基を導入した温度応答性セグメントと親水性のポリエチレングリコールからなる ABA トリブロックコポリマーを合成し、温度上昇による温度応答性高分子の疎水性相互作用で高分子を会合させて作製した。また、温度応答性セグメントと疎水性セグメントを結合したブロックコポリマーとアミンに反応性を有するスクシンイミド基を導入したセグメントと疎水セグメントを有するブロックコポリマーをそれぞれ合成した。このブロックコポリマーを混合後、会合させて、温度上昇により外殻に導入したスクシンイミド基の反応性が変化するヘテロアーム型の温度応答性ナノ粒子を合成した。これらのナノ粒子を、アミン基質存在下で構造変化、反応性の変化を動的な光散乱法および透過型電子顕微鏡で観察した。また、レオメーターを利用して混合溶液の温度変化に対する粘弾性の変化を評価して、溶液のゾル/ゲル転移挙動と温度応答性高分子の物性および構造変化の関係性について検討した。

(2) 非イオン性高分子で被覆したカチオン性ナノ粒子による選択的細胞死誘導技術の開発

がん細胞は正常細胞と比較して細胞膜に過剰に発現している糖鎖によって強く負に帯電している。このことから正電荷の高分子は細胞膜と強く静電相互作用し細胞膜構造に障害を与え、強い毒性が発現することが知られている。しかし、正電荷が強すぎると正常細胞にも毒性が発現してしまうことからカチオン性高分子を生体内に投与することは困難である。本研究では、カチオン性高分子を非イオン性高分子で被覆することで、正常細胞とがん細胞に対して膜障害性を制御する方法について検討した。

疎水性セグメント、カチオン性セグメント、非イオン性セグメントからなるトリブロックコポリマーを合成した。このポリマーを水中で会合させて、外殻が非イオン性高分子で被覆されたカチオン性ナノ粒子を作製した。得られたナノ粒子溶液の粒径および電位を測定した。また、この高分子ミセルを培養液に添加後、正常細胞およびがん細胞に添加して培養した。細胞膜障害性はラクターデヒドロゲナーゼ (LDH) アッセイ法でおこなった。また、共焦点顕微鏡によりナノ粒子の細胞内局在を観察し、カチオン性ナノ粒子を非イオン性高分子で被覆することによる細胞への影響を評価した。

4. 研究成果

(1) 温度低下により崩壊する粒子を利用したゲル化剤の開発

温度応答性ナノ粒子の構造変化を利用して化学反応を制御する方法について検討した。温度応答性高分子に、一級アミンと反応するアルデヒド基を導入したトリブロックコポリマーを合成した。この高分子は、高温の水中で会合させると温度応答性高分子間の疎水性相互作用によりフラワー状のナノ粒子を形成した。一方、室温まで温度を低下させるとナノ粒子構造は崩壊し、ユニマー状態に変化した。アミノ基を有するポリアリルアミン、アルブミンと相互作用させると、高温の粒子状態では、アルデヒド基がナノ粒子の内核に分布するために外界のアミンとの反応が抑制された。一方、温度低下させると粒子構造が崩壊してアルデヒド基が露出したことにより、露出したアルデヒド基が外界のアミン分子と反応し化学架橋することが示された。この高分子溶液は 2wt% と比較的低濃度でゲル化し、ナノ粒子構造の崩壊とともに瞬時に反応が起こりゲル化することがわかった。特に、このナノ粒子はポリアリルアミンと共有結合で架橋されることから、一度温度低下により架橋構造を形成するとゲル構造は分解せず、不可逆性を示すことが明らかとなった。

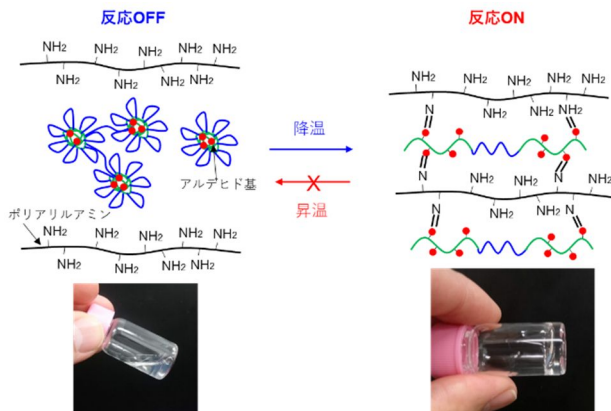


図2 温度応答性ナノ粒子とポリアリルアミンを混合溶液の温度変化によるゾル/ゲル転移挙動とその反応機構

(2) 温度上昇によりゲル化するヘテロアーム型ナノ粒子の開発

(1) で温度低下によりゲル化する方法を構築したが、生体内で温度を低下させることは技術

的に難しいことからがん治療への応用は難しい。そこで、ナノ粒子の構造を改良し、温度上昇により反応性を促進する材料を設計した。両親媒性の温度応答性ブロックコポリマーと反応性官能基であるスクシンイミド基を有するブロックコポリマーをそれぞれ合成し、この粒子を自己会合させることで外殻が温度応答性高分子と反応性官能基であるスクシンイミド基を有する高分子からなるヘテロアーム型のコアシェル型ナノ粒子を作製した。この粒子は、室温で温度応答性高分子が膨潤している状態では、官能基が表面に露出しない。これにより、外部のアミン基質に対して反応性が低下し、ナノ粒子溶液の粘性増加は確認されなかった。一方、温度上昇により温度応答性高分子を収縮させると、反応性官能基が粒子表面に露出して外界のアミン分子との反応の促進が観察され、溶液をゲル化させることに成功した。温度上昇により、ゾルゲル転移挙動を制御するには、温度応答性高分子の被覆量および、ヘテロアーム型ナノ粒子とアミン分子の比率が重要であることがわかり、最適化することで温度上昇による迅速なゾルゲル変化を引き起こすことに成功した

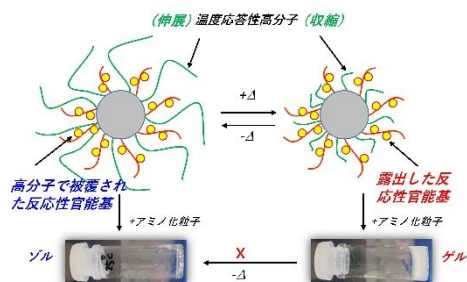


図3 温度応答性高分子の構造変化を利用した反応性官能基(スクシンイミド基)の反応性制御。温度変化による高分子の膨潤・収縮により官能基の反応性が変化しゾル-ゲル転移の制御に成功した。

(3) カチオン性ナノ粒子を利用した選択的細胞死制御技術の開発

本研究では、ナノ粒子の物理的・化学的性質のみを利用して細胞の機能を制御する方法とその細胞毒性メカニズムについて検討した。カチオンナノ粒子は、がん細胞に対して強い細胞膜障害性を示すが、正常細胞にも毒性を示すことが知られている。そこで、カチオン性高分子の細胞障害性を制御するために、カチオン性ナノ粒子表面を親水性高分子で被覆することで正常細胞への障害性を緩和させる方法を探索した。カチオン性ナノ粒子の表面を非イオン性高分子で被覆したナノ粒子を合成した。非イオン性高分子で被覆しない粒子のゼータ電位は約20 mVであったが、非イオン性高分子を被覆することで数mVに低下した。これらの粒子を正常細胞およびがん細胞に作用させると、カチオン性粒子は正常細胞、がん細胞に関わらず高い細胞障害性を示した。一方、非イオン性高分子を被覆した粒子は、がん細胞へは細胞障害性が観察されたのに対して、正常細胞への障害性が低下した。共焦点レーザー顕微鏡で、ナノ粒子の細胞内分布を観察したところ、がん細胞では細胞膜表面に多くの粒子が観察され、迅速な細胞内移行性が観察された。また、細胞膜障害性をLDHアッセイで評価したが、細胞膜の損傷は無視できる程度であった。これらの結果より、親水性高分子をコーティングしたカチオン性ナノ粒子による細胞活性の変化は、細胞膜損傷ではなく、細胞内に組み込まれたナノ粒子の蓄積によるものであることを明らかとした。カチオン性ポリマーによる細胞毒性を抑制するためには、カチオン性ナノ粒子を親水性ポリマーで完全に覆い、カチオン性効果を発揮しないようにする必要があり、低濃度の細胞に適用することで、カチオン性ポリマーによる非選択的な細胞毒性を抑制することができることを明らかとした。

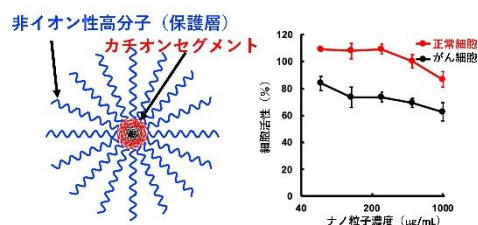


図4 非イオン性高分子で被覆したカチオン性ナノ粒子の構造と正常細胞とがん細胞の活性変化。がん細胞の活性を有意に低下させることに成功した。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Akimoto Jun, Lin Hsiu-Pen, Li Yaw-Kuen, Ito Yoshihiro	4. 巻 577
2. 論文標題 Controlling the electrostatic interaction using a thermal signal to structurally change thermoresponsive nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects	6. 最初と最後の頁 27 ~ 33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2019.05.052	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 該当する
1. 著者名 Akimoto Jun, Tamate Ryota, Okazawa Shingo, Akimoto Aya M., Onoda Michika, Yoshida Ryo, Ito Yoshihiro	4. 巻 4
2. 論文標題 Reactivity Control of Polymer Functional Groups by Altering the Structure of Thermoresponsive Triblock Copolymers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 16344 ~ 16351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.9b01816	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 Park So Jung, Akimoto Jun, Sakakibara Naoki, Kobatake Eiry, Ito Yoshihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Thermally Induced Switch of Coupling Reaction Using the Morphological Change of a Thermoresponsive Polymer on a Reactive Heteroarmed Nanoparticle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Applied Materials & Interfaces	6. 最初と最後の頁 49165 ~ 49173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsami.0c12875	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 -
1. 著者名 Lin Hsiu Pen, Akimoto Jun, Li Yaw Kuen, Ito Yoshihiro	4. 巻 20
2. 論文標題 Selective Control of Cell Activity with Hydrophilic Polymer Covered Cationic Nanoparticles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2000049 ~ 2000049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202000049	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 So Jung Park, Jun Akimoto, Eiry Kobatake, Yoshihiro Ito
2. 発表標題 Irreversible hydrogel formation by coupling reaction control using structural change of thermo-responsive hetero-armed nanoparticle
3. 学会等名 CEMSupra 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋元淳・Hsiu-Pen Lin・Yaw-Kuen Li・伊藤嘉浩
2. 発表標題 電荷高分子導入による温度応答性高分子ミセルの分散安定性評価
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 秋元淳、Park So Jung、小島英理、伊藤嘉浩
2. 発表標題 化学反応性の制御可能な温度応答性ナノ粒子を利用したインジェクタブルゲルの開発
3. 学会等名 第36回日本DDS学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 So Jung Park, Jun Akimoto, Eiry Kobatake, Yoshihiro Ito
2. 発表標題 Thermally controlled gelation by morphological change of temperature responsive polymer on hetero-armed nanoparticle
3. 学会等名 3rd GLowing Polymer Symposium in KANTO
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------