

機関番号：24403

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007～2010

課題番号：19200040

研究課題名（和文） 精密な薬物送達のための標的集積・温度応答・可視化多重機能性ナノベシクルの創製

研究課題名（英文） Development of multifunctional nano-vesicles having target accumulation, temperature-response, and imaging abilities

研究代表者

河野健司（KONO KENJI）

大阪府立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：90215187

研究成果の概要（和文）：本研究では、鋭敏な温度応答機能、腫瘍集積機能、可視化機能を集積化した多機能型ナノベシクルを構築した。このようなキャリアシステムを用いることで、高効率で標的病巣にキャリアを集積させ、可視化機能によって標的病巣への集積過程を追跡し、ベストなタイミングで標的病巣を加温することによって、効果的でしかも病巣限定的な薬物攻撃が実現することができた。この成果は、患者ごとに異なる多様な病巣に対して、最適な化学治療を提供できるパーソナル癌化学治療につながるものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we successfully developed a new type of multifunctional nanovesicles that have tumor-accumulating, temperature-responsive drug releasing, and MRI-detectable functions. Highly efficient tumor chemotherapy was achieved using the multifunctional nanovesicles. Results might lead to the development of personalized chemotherapy that provides best chemotherapy optimized to individual patient.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	14,800,000	4,440,000	19,240,000
2008年度	10,500,000	3,150,000	13,650,000
2009年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2011年度	0	0	0
総計	36,400,000	10,920,000	47,320,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノ医療、ナノカプセル、ドラッグデリバリー、可視化、MRI、がん治療、診断

1. 研究開始当初の背景

近年、種々の抗癌剤や siRNA 等の新しい作用機序に基づく優れた生理活性分子や高活性薬物が次々に開発され、これらの分子の最大限の薬理作用を保障するために、それらの分子を標的作用部位に精密に送り届けるキャリアシステムの開発が急務になっている。このようなキャリアシステムは、送り届ける薬物分子の性質に応じて、体内の病巣組

織レベル、あるいは、標的組織細胞内部レベルの精度で送達することが求められる。このような精密な薬物デリバリーを行えるキャリアシステムは、ガンなどの難治性疾患に対する化学医療の有用性を飛躍的に高めることができる。しかも、病巣の特性は、患者個人によって多様であることから、患者個人の特性に基づいた薬物治療は、その治療効果を高めるうえで不可欠である。しかし、患者個

人の差異は、現在の薬物治療においては必ずしも反映されていない。このような、患者個人の特性に対応して、薬物分子をその作用部位に、正確に送り届けることにできる、個人対応型の精密薬物送達システムの開発が将来の薬物治療技術において強く求められる。

河野（代表者）は、世界で初めて、温度応答性高分子とリン脂質ベシクル（リポソーム）の複合化による温度応答性リポソームを構築し、その機能向上を目指して研究を進めてきた。そして青島（分担者）との共同研究により、ビニルエーテル系感温性高分子の複合化によって、従来のシステムに比べて格段に高い温度応答性（45℃加温時、1分以内に85%の薬物放出）を示すリポソームを開発し、このリポソームを用い腫瘍の局所加温（投与6時間後45℃で10分間）によって、マウスの腫瘍だけに抗癌剤を作用させ、その成長を強く阻害することに成功した。このような基礎的な研究成果を踏まえて、本研究が着手された。

2. 研究の目的

本研究では、鋭敏な温度応答機能を有するナノベシクルをベースとして、①その温度応答機能の先鋭化とともに、②標的（腫瘍）集積機能、および③体内におけるキャリアの集積位置をモニターするための可視化機能、の3つの機能を集積化することを中心として、高精度で薬物を標的に送達するための先進ナノキャリアシステムを構築することを目指した。このようなキャリアシステムを用いることで、高効率で標的病巣にキャリアを集積させ、可視化機能によるキャリアのモニター化によって標的病巣への集積過程を追跡し、ベストなタイミングで標的病巣を加温することによって、効果的でしかも病巣限定的な薬物攻撃が実現できる。

このように、合目的な機能を多重化し、それらの協同効果によるデリバリー精度の飛躍的向上と、患者ごとに異なる多様な病巣（腫瘍）に対して、最適な化学治療を提供できるパーソナル癌化学治療への展開を目指した。

3. 研究の方法

以下の3つの項目について研究を進めた。

(1) マイルドな局所加温に鋭敏に応答する温度応答機能型ナノベシクルの構築。リビング重合法に基づく高感度温度応答性高分子の精密合成および、温度応答性 dendrimer を用いて高感度温度応答性両親媒性分子を合成し、温度応答性機能素子を開発した。これらの温度応答性素子と脂質膜との相互作用を利用することによって、超高感度温度応答性の実現を試みた。

(2) 体内分布の高感度モニター機能を付与

するための可視化機能素子の構築。リポソーム等に体内における可視化機能を付与するための機能素子として、MRI検出可能なイオン（ガドリニウム等）を多量担持した dendronized lipid を開発し、これをナノベシクルに導入することによって、MRIによって可視化できるナノベシクルの構築を目指した。また、MRIによって体内分布および腫瘍集積過程の高感度モニター化を試みた。また、X線CTなどによって高感度検出が可能な金属ナノ粒子（金ナノ粒子等）担持 dendrimer を開発し、その導入によるベシクル可視化への展開を試みた。

(3) 温度応答性ナノベシクルに可視化機能および腫瘍集積機能を多重化することによる多重機能集積型ナノベシクルの構築。上記①および②によって開発された超高感度温度応答型ベシクルにMRI高感度検出素子を複合化することによって、多重機能性ナノベシクルの構築を試みた。薬物送達の精度の向上に対する多重機能集積の重要性を明らかにし、標的限定的な精密薬物送達に基づく薬物治療効果の飛躍的な向上の実現を試みた。

4. 研究成果

本研究は、鋭敏な温度応答機能、標的（腫瘍）集積機能、および体内におけるキャリアの集積位置をモニターするための可視化機能、の3つの機能を集積化することによって、高精度で薬物を標的に送達するための先進ナノキャリアシステムを構築し、標的限定的な精密薬物送達に基づく薬物治療効果の飛躍的な向上を目指した。

(1) マイルドな局所加温に鋭敏に応答する温度応答機能型ナノベシクルの構築

(1)-① 感温性ポリマー修飾リポソームの開発

リポソーム（リン脂質ベシクル）に温度応答性を付与するための素子として、種々の構造のポリビニルエーテル型感温性ブロック共重合体を開発した。このポリマーをリポソームに複合化することで高感度型リポソームを作製した。このベシクルの脂質組成の最適化を行い、温度応答性の高感度化を行った。得られたリポソームは、血清存在下において体温では抗癌剤ドキシソルビシンを安定に内部に保持したが、ポリマーの転移温度（約40℃）以上において瞬時に抗癌剤を放出し、極めて鋭敏な温度応答性を示した。また、生体適合性と温度応答機能を同時にリポソームに付与するための機能素子として、ポリエチレングリコールを末端に結合したポリビニルエーテルブロック共重合体を新規に合成した。この新規な生体適合・感温性ポリマーで修飾したリポソームは、従来の感温性ポリマー修飾リポソームに比べてより優れた

血中滞留性を示し、また良好な温度応答機能を発現した。

(1) - ② 温度応答性デンドロン脂質を用いた高感度ナノベシクルの開発

種々の世代数のポリアミドアミンデンドロンと2つのオクタデシル基からなる高分子脂質であるデンドロン脂質を用いて、そのデンドロン部末端にアルキルアミド基を導入することで、温度応答性デンドロン脂質を合成した。このデンドロン脂質は低温において安定なベシクルを形成したが、特定の温度以上において急激に不安定化して著しく凝集した。電子顕微鏡などを用いて形態を観察したところ、このデンドロン脂質ベシクルは、逆ヘキサゴナル構造に転移したり、融合して大きなベシクル状に変化することがわかった。また、アルキルアミド基の構造を調節したり、その組成を調節することで、望む温度において不安定化する温度応答性ナノベシクルが得られることを見出した。さらに、この温度応答性デンドロン脂質ナノベシクルは、生体適合性高分子であるポリエチレングリコール鎖を導入することも可能であり、低分子を保持することも可能であった。このように、新規なアルキルアミド末端デンドロン脂質を用いることで、温度に鋭敏に反応して形態転移する新しいタイプの温度応答性ベシクルを開発することに成功した。

(2) 体内分布の高感度モニター機能を付与するための可視化機能素子の構築。

8個の末端アミノ基を有するポリアミドアミンデンドロン脂質にガドリニウムキレート結合させることで、多数のガドリニウムイオンを担持したデンドロン脂質を開発した。このガドリニウムデンドロン脂質をリポソームに含有させることで、リポソームにMRI検出機能を付与することができる。また、ポリアミドアミンデンドリマー内部で金イオンを還元して金ナノ粒子を生成させることによって、金ナノ粒子を担持したデンドリマーの作製を行った。デンドリマー内部において金イオンを連続的に還元することで金ナノ粒子を成長させることに成功した。金ナノ粒子はX線CT、超音波法、光温響効果など様々な方法によって検出可能であることから、このデンドリマー金ハイブリッドをベシクルに組み込むことで高感度可視化機能を付与するための機能素子として使うことが可能である。

(3) 温度応答性ナノベシクルに可視化機能および腫瘍集積機能を多重化することによる多重機能集積型ナノベシクルの構築。

(3) - ① 金ナノ粒子を複合化したリポソーム
金ナノ粒子は、超音波法やX線CTなどで

可視化できる。そこで、金ナノ粒子の脂質膜ベシクルへの複合化について検討した。クエン酸還元法で調製した金ナノ粒子をリポソームとインキュベートすることで金ナノ粒子複合化ナノベシクルの調製に成功した。一方、リポソーム膜上への金ナノ被膜の形成も試みた。リポソームの存在下、塩化金酸イオンの還元を行うと、リポソーム膜が金ナノ被膜で覆われた。この金被膜は、近赤外領域に吸収を示し、また、近赤外光の照射によって発熱した。さらに、この金ナノ皮膜を有するリポソームは、その内部に薬物を封入できる。したがって、体内でのモニター化ができ、しかも、金赤外光誘導発熱と抗癌剤放出の2重攻撃によってがんを選択的に攻撃する、新しい高性能治療用デバイスの開発に成功した。

(3) - ② 高感度温度応答・可視化多重機能性リポソーム

40℃付近で親水性から疎水性に急激に変

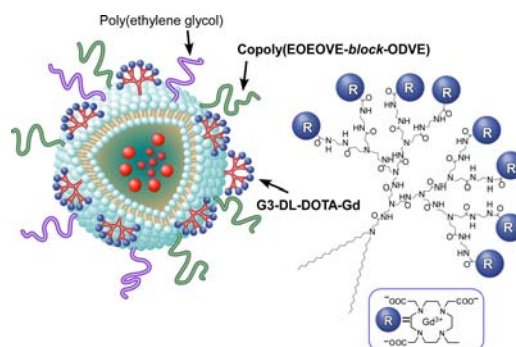


図1. 腫瘍集積・温度応答・可視化多重機能性リポソームの設計。

化するポリビニルエーテルブロック共重合体と②で開発したガドリニウムデンドロン脂質を抗癌剤ドキシソルピシン内包PEG化リポソームに複合化することで、腫瘍集積機能、高感度温度応答機能、MRI可視化機能を併せ持つ多重機能性リポソームを開発し

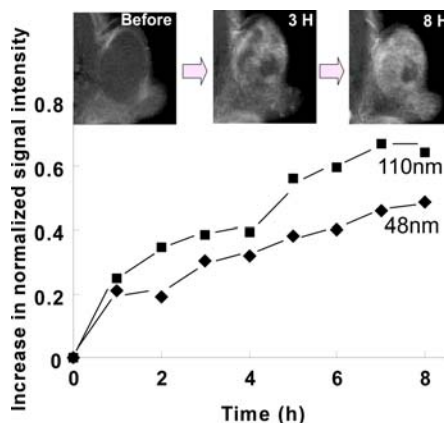


図2. MRIによる多重機能性リポソームの腫瘍集積過程の追跡。粒径110nmおよび48nmのリポソームを投与し、腫瘍部位のシグナル強度をモニターした。

た(図1)。このリポソームを担癌マウスに投与し、MRIによってリポソームの体内挙動の追跡を行った。腫瘍へのリポソームの集積量は8時間にわたって増大することがわかった。リポソーム投与8時間後に腫瘍部位を44℃で加温することで、選択的に腫瘍組織の成長を強く抑制することができた。さらに、多重機能性リポソームの可視化機能を用いることで、腫瘍への集積は腫瘍体積に依存して異なること、また、リポソームの腫瘍集積の効率はリポソーム粒径によって異なることがわかった(図2)。

MRIを用いることによって多重機能性リポソームの体内挙動はリアルタイムで追跡することができる。このようなリポソームを用いることで、患者個人に対して最適な粒径のリポソームを選択したり、最適のタイミングで薬物を放出させることが可能になることから、個人対応型のがん化学治療につながるものと期待される。

(3) - ③ デュアルシグナル応答性リポソーム

温度によって、体内の標的病巣の細胞内部に選択的に薬物送達を制御できる新しいタイプの多重機能性リポソームとして鋭敏な温度応答機能とpH応答機能を有するデュアルシグナル応答性リポソームを開発した。このリポソームは、アルキルアミド基とカルボイキシル基をもつ多分岐型ポリグリシドール誘導体をリポソームに複合化させることで作製された。デュアルシグナル応答性リポソームは、弱酸性環境下加温されたときのみ不安定化して内包薬物を鋭敏に放出した。がん細胞にこのリポソームを取り込ませた後、加温すると、細胞全体に薬物が拡散した。したがって、このデュアルシグナル応答性リポソームはタンパク質や核酸医薬などを標的細胞選択的に細胞内デリバリーするキャリアとして有用である。

本研究を通して、キャリア機能の多重化によって、キャリアによる薬物デリバリーの精度を飛躍的に高められる可能性が示された。特に、刺激応答機能と可視化機能を組み合わせた機能の多重化によって、リアルタイムのデリバリーのモニター化を可能にし、そのような生体内情報が薬物デリバリーによる最大限の効果につながることを示した点が本研究の最大の成果である。本研究成果をさらに発展させることで、それぞれの患者個人に対して最大限の治療効果を与える、個人対応型の新しいがん化学治療への展開につながることを確信する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計31件)

- ① K. Kono, E. Murakami, Y. Hiranaka, E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, K. Sakurai, "Thermosensitive molecular assemblies from PAMAM dendron-based lipids", *Angew. Chem. Int. Ed.*, in press.
- ② E. Yuba, A. Harada, Y. Sakanishi, K. Kono, Carboxylated hyperbranched poly(glycidol)s for preparation of pH-sensitive liposomes, *J. Controlled Release*, 149, 72-80 (2011).
- ③ K. Kono, S. Nakashima, D. Kokuryo, I. Aoki, H. Shimamoto, S. Aoshima, K. Maruyama, E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, Y. Ishizaka, "Multifunctional liposomes having temperature-triggered release and magnetic resonance imaging for tumor-specific chemotherapy", *Biomaterials*, 32, 1387-1395 (2011).
- ④ C. Kojima, Y. Umeda, A. Harada, K. Kono, "Preparation of near-infrared light absorbing gold nanoparticles using polyethylene glycol-attached dendrimers", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 81, 648-651 (2010).
- ⑤ Y. Umeda, C. Kojima, A. Harada, H. Horinaka, K. Kono, "PEG-attached PAMAM dendrimers encapsulating gold nanoparticles: growing gold nanoparticles in the dendrimers for improvement of their photothermal properties", *Bioconjugate Chem.*, 21, 1559-1564 (2010).
- ⑥ E. Yuba, C. Kojima, A. Harada, Tana, S. Watarai, K. Kono, "pH-Sensitive fusogenic polymer-modified liposomes as a carrier of antigenic proteins for activation of cellular immunity", *Biomaterials*, 31, 943-951 (2010).
- ⑦ C. Kojima, K. Yoshimura, A. Harada, Y. Sakanishi, K. Kono, "Synthesis and characterization of hyperbranched poly(glycidol) modified with pH- and temperature-sensitive groups", *Bioconjugate Chem.*, 20, 1054-1057 (2009).
- ⑧ K. Kono, C. Kojima, N. Hayashi, E. Nishisaka, K. Kiura, S. Watarai, A. Harada, "Preparation and cytotoxic activity of poly(ethylene glycol)-modified poly(amidoamine) dendrimers bearing adriamycin", *Biomaterials*, 29, 1664-1675 (2008).

- ⑨ N. Sakaguchi, C. Kojima, A. Harada, K. Koiwai, K. Shimizu, N. Emi, K. Kono, "Generation of highly potent nonviral gene vectors by complexation of lipoplexes and transferrin-bearing fusogenic polymer-modified liposomes in aqueous glucose solution", *Biomaterials*, 29, 1262-1272 (2008).
- ⑩ C. Kojima, Y. Hirano, E. Yuba, A. Harada, K. Kono, "Preparation and characterization of complexes of liposomes with gold nanoparticles", *Colloids Surf. B:Biointerfaces*, 66, 246-252 (2008).

[学会発表] (計 121 件)

- ① 河野健司, 様々な刺激に応答するナノベシクルの設計とドラッグデリバリー機能, 平成 22 年度東海シンポジウム, 名古屋 (26.1.2011).
- ② K. Kono, Design of multifunctional nanovesicles for temperature-sensitive drug release and imaging, Particles 2010 Conference, Orlando, USA (23.5.2010).
- ③ K. Kono, Design of stimuli-responsive liposomes for accurate drug delivery, The 6th IUPAC, Wuhan, China (13.10.2010).
- ④ K. Kono, Design of stimuli-responsive nanovesicles for accurate drug delivery, International Symposium on Polymer Chemistry, Suzhou, China (5.6.2010).
- ⑤ K. Kono, E. Murakami, A. Harada, Design of temperature-sensitive molecular assemblies using PAMAM Dendron-based lipids, 238th American Chemical Society National Meeting & Exposition, Washington, DC, USA (16, 8, 2009).

[図書] (計 9 件)

- ① K. Kono, "Polymer-based nanomaterials for drug delivery", in *Environmentally Harmonious Chemistry for the 21st Century*, M. Anpo, K. Mizuno (Eds), pp. 149-162, Nova Science Publishers, NY (2010).
- ② 弓場英司, 河野健司, 「機能性リポソーム」, 超分子サイエンス&テクノロジー, pp. 1180-1185 (2009), エヌ・ティー・エス.
- ③ 河野健司, 児島千恵, 「温度応答性高分子を用いた温度応答性ナノキャリア」, 遺伝子医学 MOOK 別冊, 絵で見てわかるナノ DDS —マテリアルから見た治療・診断・予後・予防、ヘルスケア技術の最先端—, pp. 106-112 (2007), メディカルドゥ.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: ポリグリシドール誘導体及びこれを含む複合薬物担体
 発明者: 河野健司、改田知宏、弓場英司、坂西裕一
 権利者: 大阪府立大学、ダイセル化学 (株)
 種類: 特許
 番号: 特願 2009-114181
 出願年月日: 2009. 5. 11
 国内外の別: 国内

名称: 常磁性金属含有ポリアミドアミンデンドロン脂質
 発明者: 河野健司、青木伊知男
 権利者: 大阪府立大学、放射線医学総合研究所
 種類: 特許
 番号: 特願 2008-121573
 出願年月日: 2008. 5. 7
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.osakafu-u.ac.jp/ohka/ohka9/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 健司 (KONO KENJI)
 大阪府立大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号: 90215187

(2) 研究分担者

青島 貞人 (AOSHIMA SADAHITO)
 大阪大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号: 50183728
石坂 幸人 (ISHIZAKA YUKIHITO)
 国立国際医療センター研究所・部長
 研究者番号: 30281687
児島 千恵 (KOJIMA CHIE)
 大阪府立大学・大学院 21 世紀科学研究機構・講師
 研究者番号: 50405346

(3) 連携研究者

なし