

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007 ~ 2008

課題番号：19790138

研究課題名 (和文) インテリジェントポリマーを用いた in vivo ドラックデリバリーの研究

研究課題名 (英文) Study of in vivo drug delivery system using intelligent polymer

研究代表者

綾野 絵理 (AYANO ERI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10424102

研究成果の概要：外部温度変化に応答し、その構造・性質を変化させる機能性ポリマー、poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) と生分解性ポリマーである PLA(ポリ乳酸)を用いて、薬物放出制御機能・ステルス性を備えた新しいナノ粒子製剤を開発した。ナノ粒子を細胞へ取り込ませたところ、相転移温度を境に取り込みの ON-OFF が確認されたことから、人体に影響の無い程度のわずかな温度変化で取り込みの制御が可能であることが示された。このナノ粒子の実用化により、少ない投与量による副作用の軽減、高い QOL を目指せる製剤となることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	300,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：インテリジェントポリマー, DDS, ナノ粒子, PNIPAAm, 相転移温度, PLA

1. 研究開始当初の背景

(1) 申請者がこれまで使用している poly(*N*-isopropylacrylamide) PNIPAAm は、水中温度刺激に応答し、32℃より低温側では水に溶解し水和伸展状態、高温側では水に不溶となり脱水和収縮状態と構造変化を起こす温度応答性高分子である。PNIPAAm は温度変化により可逆的かつ鋭敏に変化し、固体表面に導入すると、低温側では親水性、高温側では疎水性というように、温度変化に応答した表面

物性変化が期待できる。さらに、新たに pH 等の周囲の環境を認識する機能を付加した環境応答性高分子を分子設計し、固体表面へ修飾することにより、環境応答性を付与したインテリジェントな高機能表面の作製を行い、これらを利用した溶出制御に成功している (J. Chromatogr. A, 1119, 51 (2006); J. Sep. Sci., 29, 738 (2006); J. Chromatogr. A, 1119, 58 (2006))。申請者はこれまで新規に機能性高分子を分子設計し、これを利用した新しい分離

システムを開発し、世界に先駆けた研究を行ってきた。

(2)薬物などを「必要な時に、必要な場所で、必要な量だけ効率よく作用させる」DDS は、薬物の副作用を抑制し効果的に薬物投与を行う技術である。薬物の標的部位への到達性と滞留性の向上、より精密な薬物放出制御の実用化のため、薬物を担持する薬物キャリア材料の開発が必要となる。薬物キャリアの大きさが小さすぎると、体外への排出、逆に大きすぎると体内異物除去システムにより排除されてしまう。また、数十 nm サイズの薬物キャリアは Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果により固形ガン組織に集積しやすい環境が形成される。このように、ナノテクノロジーと DDS の関係は非常に強く、ナノサイズの薬物キャリア (ナノ粒子) の開発が必要となってきた。

今後機能性高分子を DDS のナノキャリアとして新しく設計することは、創薬分野、医療分野への革新的な展開が期待される。

2. 研究の目的

高齢化社会に向け、DDS 製剤のような患者にやさしい薬剤はますますニーズが高まってくる。また、近年次々に開発・実施されてきた遺伝子検査・診断により明らかにされる個々のヒトの体質を考慮したゲノム情報に基づくテーラーメイド医療などの治療に適した DDS 製剤の開発が求められている。本研究では、より高機能な高分子を設計し、それを用いて医療全般への包括的な活用のため、これまで行ってきた分離の技術にとどまらず、DDS のナノキャリアとして新しく分子設計し、抗がん剤やその他医薬品、DNA および生理活性ペプチド等の薬剤化の際に有用な手段となる、刺激応答性の薬物放出制御機構も備えた新規薬物送達システムを開発し、創薬分野、医療分野全般への貢献を目指している。また、ナノキャリアは低分子・高分子の薬物ばかりではなく、遺伝子キャリアとしても利用することができる。将来的には機能性高分子を遺伝子キャリアとして使用し、温度や外部または内部環境制御による遺伝子導入技術に応用し、診断・治療用や創薬など、医療現場での実用化を目指す。

温度応答性高分子 PNIPAAm を DDS のための高分子ミセルやリポソーム等に応用しているという報告はある。申請者は PNIPAAm に生分解性ポリマーであるポリ乳酸 (PLA) を共重合させ、これと PLA とのブレンドにより、コアシェル型の粒子化を行う。ポリマーをブレンドすることで、より安定な粒子が作製できるものと考えられる。また、合成高分子を使用するため、高分子を自由に分子設計することが可能である。また、合成高分子は、物理化学的性状を制御することができるため、粒

子の作製時にある程度の性質を予測することができるなどの利点がある。医薬品を内封したナノ粒子が安定に血中を通り標的部位へ運ばれると、外部からの温度刺激により、薬物を必要な時に必要な量だけ放出することができ、より効果的な放出制御が可能となる。また、これを遺伝子キャリアとしても利用することで、創薬への応用につながるものと考えられ、将来的には新規なデザインの DDS 製剤として臨床応用への実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 新規インテリジェントナノ粒子の合成

Poly (*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) は、外部からの温度刺激に応答し、低温側での水和伸展状態と高温側での脱水和収縮状態との間で鋭敏かつ可逆的な変化を起こす機能性高分子である。PNIPAAm をナノ粒子に応用することにより、体内の温度変化や外部からの過熱により自動的に、あるいはリモートコントロールで薬物の放出制御が可能となると考えられ、薬物運搬・放出デバイス等、さらに高度な機能を持たせたインテリジェントな DDS の研究を行えるものと考えられる。DDS は、薬物の標的部位への到達性と滞留性の向上、より精密な薬物放出制御のために、粒子設計には親水性・疎水性のバランスに加え粒子サイズの制御などが非常に重要な要因となる。本研究で使用する PNIPAAm は、親水性高分子として知られていて、これに疎水性モノマーを導入すると疎水性のバランスを自由にコントロールすることができる機能性高分子の作製が可能となる。また、合成高分子を用いることで、サイズを自由に制御することができ、薬物運搬・放出制御に最適な大きさのインテリジェントなナノ粒子を設計することができる。

申請者は、主に低分子薬物を運搬する対象物として考えている。これらの低分子薬物は、親水性・疎水性のバランスだけではなく、イオン性解離基を有するものもたくさん存在する。そのため、これまでの DDS 技術で重要であった、親水性・疎水性のバランスによる疎水性相互作用のみならず静電的相互作用を利用した機能展開をしていくことも重要となる。

これまで、温度応答性高分子を用いた研究では、高分子ミセルやリポソームを作製し、熱による放出制御抑制について報告されている。申請者は、PNIPAAm と、PLA とのブロック共重合体を分子設計し、その中に種々薬物を封入したナノ粒子の作製を行う。PLA における研究では、親水性ポリマーとしてポリエチレングリコール (PEG) を化学結合させたナノ粒子に関する報告がある。申請者は PEG の代わりに温度応答性高分子等のインテリジェントポリマーを結合させることにより、薬物放出の制御が可能になると考えている。また、種々ポリマーの導入量をコントロールするこ

とにより、粒子径の制御や機能の制御などが可能となってくるものと考えられる。

(2) ナノ粒子の物理的評価

作製したインテリジェントポリマーを用いたナノ粒子は、粒子径測定による粒子サイズの評価、NMR 測定などによる環境応答性高分子と PLA との組成比の確認、さらに表面電位測定などにより温度や外部刺激に応答した電位変化について確認することで評価を行う。また、これらの機能を保持したままでの安定性の評価、及び温度やその他外部環境等の刺激による放出効果などの評価も併せて行い、より高い標的性、薬物放出制御のコントロールが自由に制御可能であるインテリジェントナノ粒子の開発を目指す。これらの解析から、インテリジェントナノ粒子の物理的な機能解明へ発展させていく。

(3) インテリジェントナノ粒子の細胞への取り込みによる局在観察

マウスマクロファージ用細胞(RAW264.7 細胞)に、作製したインテリジェントナノ粒子を LCST 前後の温度で取り込ませ、ナノ粒子の評価を行う。蛍光色素(ローダミン)でラベル化したインテリジェントナノ粒子を作製し、蛍光顕微鏡を用いて、ナノ粒子の細胞内局在について知見を得る。

4. 研究成果

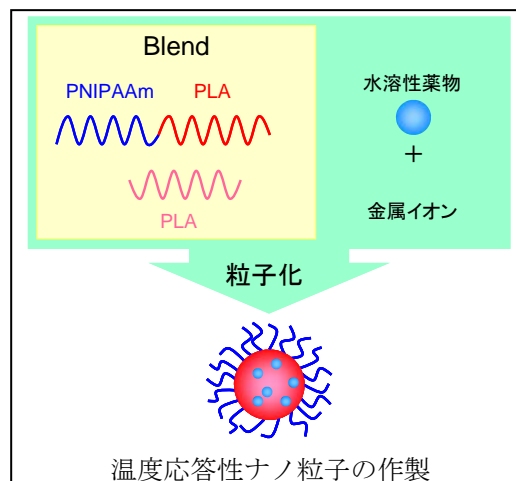
(1) 新規インテリジェントナノ粒子の作製

① PNIPAAm-PLA ブロック共重合体の合成

末端に水酸基を有する PNIPAAm を、連鎖移動剤に 2-mercaptoethanol、開始剤に Benzoylperoxide(BPO)を用いてラジカル重合により作製した。GPC により分子量を測定した結果、分子量 10000 の PNIPAAm を作製することができた。PNIPAAm は相転移温度(LCST)を有するため、500nm での透過率を測定したところ、34℃に LCST を持つ PNIPAAm が得られていることが確認された。これと、DL-lactide を開管重合により、触媒に tin(II)2-ethylhexanoate を用いることで PNIPAAm-PLA ブロック共重合体を作製した。また、PNIPAAm-PLA ブロック共重合体は、NMR により確認を行った(PNIPAAm: 4.0 ppm, PLA: 5.2 ppm)。

② 温度応答性ナノ粒子の作製

PNIPAAm-PLA ブロック共重合体と PLA ホモポリマーをブレンドし、O/W 型溶媒拡散法によりコア部に PLA、シェル部に PNIPAAm から成るコア-シェル型の温度応答性ナノ粒子を作製した。薬物には、炎症性疾患の治療を目指しリン酸ベタメタゾンを使用した。水溶性薬物であるリン酸ベタメタゾンは亜鉛と錯体を作らせることで、効率よく粒子内に封入させた。

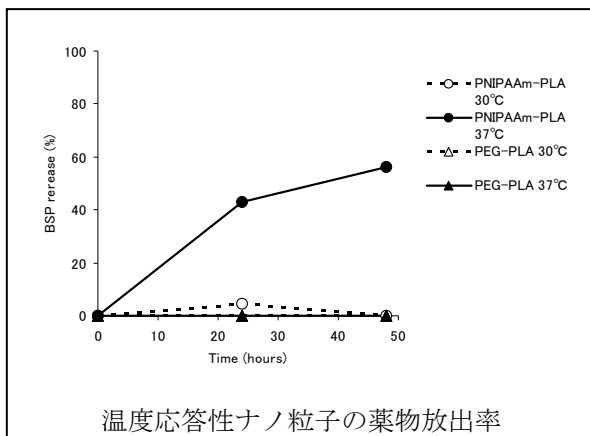


(2) ナノ粒子の物理的評価

作製されたナノ粒子の粒子径を光散乱法により測定したところ 150nm の粒子径を有するナノ粒子が作製されたことが確認された。

本研究で使用されているナノ粒子は、温度に応答するため、温度を変化させながら、表面電位測定を行った。PLA における研究でよく使用されているステルス効果を有する PEG-PLA で作製したナノ粒子を対象として測定を行った。温度を 10℃から 50℃まで変化させたところ、PEG-PLA 粒子は温度によらず一定のゼータ電位変化を示したが、PNIPAAm-PLA 粒子は温度を上げることによってゼータ電位が減少していることが確認された。低温状態では表面の PNIPAAm が親水性状態であるため、PEG のように水層を作りその結果、表面電位は中性付近を示し、温度を上げることにより PNIPAAm 表面が疎水性へと変化し、その結果、PLA のカルボン酸が粒子表面に現れ、表面電位が負へと減少したのではないかと考えられた。

また、温度による薬物の放出についても確認したところ、LCST (34℃) より低温の 30℃では薬物の放出は見られないが、LCST より高温の 37℃では、薬物の放出が見られ、温度に応答した薬物放出制御がなされることが確認された。従って、薬物放出制御のコントロールが自由に制御可能であるインテリジェントナノ粒子が作製されたものと考えられた。また、37℃では時間変化により徐々に薬物が放出していたことから、温度応答性ナノ粒子の徐放性製剤としての有用性も示唆された。



(3) インテリジェントナノ粒子の細胞への取り込みによる局在観察

蛍光色素（ローダミン）でラベル化した PNIPAAm-PLA 粒子を作製し、マウスマクロファージ様細胞（RAW264.7）へ取り込ませ、蛍光顕微鏡により局在観察を行った。細胞への取り込みは、LCST 以下の 30°C と LCST 以上の 37°C で行った。PLA のみで作製した PLA のローダミンラベル化粒子、PEG-PLA で作製した PEG-PLA ラベル化粒子を対象として使用した。LCST 以下では、PNIPAAm-PLA 粒子は細胞への取り込みが抑制され、LCST 以上での取り込み促進が観察された。一方、PLA 粒子は 30°C、37°C という温度によらず細胞への取り込みに差は見られなかった。PLA 粒子は疎水性粒子であるため、細胞へとりこまれやすかったものと考えられる。また、PEG-PLA 粒子は、温度によらず細胞への取り込みが抑制された。ステルス性を有する PEG-PLA 粒子は、親水性ポリマーである PRG の影響により、表面に水和層が形成されたためと考えられる。PNIPAAm-PLA 粒子は、LCST 以上の温度において高分子修飾ナノ粒子表面の物性が親水性から疎水性へと変化したことにより、細胞への取り込みが促進したものと考えられた。また、LCST より低温では、表面が親水性となっているため、水和層が形成され、PEG-PLA 粒子と同様なステルス性を確認することができ、そのため取り込みが抑制されたものと考えられた。

本研究で開発した機能性ナノ粒子は、細胞取り込み実験において、温度刺激により、低温状態では PEG 修飾粒子と同様なステルス性を確認することができた。LCST 以上では、細胞内に効果的に粒子（薬物）が取り込まれ、人体に影響の無い程度のわずかな温度変化で細胞取り込みが制御可能であることが示された。

我々が作製した温度応答性ナノ粒子は、低温においてステルス効果が確認され、温度による細胞取り込み制御が可能であることから、今後は *in vivo* 実験等により、薬効評価

について検討する予定である。低温でのステルス効果により血中を安定に滞留した後、温度スイッチを ON にすることで癌や炎症部位など目的とした組織に効果的に集積させ、薬効を示すことが可能となる。このような機能性ナノ粒子の実用化により少ない投与量による副作用の軽減、高い QOL を目指せる製剤となることが期待される。

(4) 今後の展望

我々はこれまでの研究において、温度応答性高分子に pH 等の周囲の環境変化を認識する機能を付加した環境応答性高分子を用いた研究も行っている。今後は、温度の他に pH にも応答する環境応答性高分子を薬物キャリアに応用し、新しいナノ粒子製剤についても検討を行う。これにより、優れたターゲティング能と、体内の温度変化及び、病変部位の生体内 pH 変化に応答した薬物放出制御が可能となるものと思われる。

また、標的化のためにターゲティング能の付与を目的として、温度応答性ナノ粒子への特異的なリガンドの修飾についても検討する。

温度スイッチの ON-OFF により放出制御や標的指向性が制御可能であるため多機能ナノ粒子製剤として、臨床応用を目指して研究を進める。

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 1 件)

- ① Tsutomu Ishihara, Tetsushi Kubota, Tesu Choi, Miyuki Takahashi, Eri Ayano, Hideko Kanazawa, Megumu Higaki. Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *Int. J. Pharm.*, 375, 148-154 (2009), 査読有。

[学会発表] (計 8 件)

- ① 綾野絵理、坂本千賀子、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫. 温度応答性高分子を用いたナノ微粒子キャリアの開発. 日本薬学会第 129 年会. 2009 年 3 月 26 日 - 28 日. 京都.
- ② 坂本千賀子、鈴木祐輔、金澤秀子、綾野絵理、檜垣恵、岡野光夫. 温度応答性リポソームの薬物放出制御およびがん細胞における殺細胞効果. 第 24 回 DDS 学会. 2008 年 6 月 29 日 - 30 日. 東京.
- ③ 綾野絵理、石原務、久保田哲史、檜垣恵. PLA/PLA-PEG ナノ粒子による臓器分布および細胞内取り込み機構の解明. 日本薬学会第 128 年会. 2008 年 3 月 26 日 -

- 28日. 横浜.
- ④ Tsutomu Ishihara, Eri Ayano, Megumu Higaki, Yutaka Mizushima. Development of stealth nanoparticles with high anti-inflammatory activity. 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. July 7-11, 2007. Long Beach, California.
 - ⑤ 綾野絵理、石原務、高橋幸、藤森史江、久保田哲史、金澤秀子、水島裕、檜垣恵. ステルス型ナノ粒子の細胞内取り込みと生体内分布. 第23回DDS学会. 2007年6月14日 - 15日. 熊本.
 - ⑥ 矢崎リサ、石原務、久保田哲史、綾野絵理、柴田祥依、金澤秀子、水島裕、檜垣恵. ステルス型ナノステロイドの血中動態と関節炎モデル動物における薬効. 第23回DDS学会. 2007年6月14日 - 15日. 熊本.
 - ⑦ 藤森史江、石原務、矢崎リサ、綾野絵理、水島裕、檜垣恵. ステルス型ナノステロイドの潰瘍性大腸炎モデル動物における薬効. 第23回DDS学会. 2007年6月14日 - 15日. 熊本.
 - ⑧ 金澤秀子、坂本千賀子、鈴木祐輔、岡野光夫、綾野絵理、檜垣恵. 環境応答性高分子を用いた機能性リポソーム及び遺伝子導入法に関する基礎的研究. 第23回DDS学会. 2007年6月14日 - 15日. 熊本.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綾野 絵理 (AYANO ERI)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：10424102

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし