

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03823

研究課題名（和文）低侵襲治療のための音増感剤デリバリーナノコンポジットの開発

研究課題名（英文）Development of sonosensitizer delivery nanocomposites for minimally invasive cancer therapy

研究代表者

原田 敦史（Harada, Atsushi）

大阪公立大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：50302774

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、超音波力学療法に用いる音増感剤のがん特異的ドラッグデリバリーを実現するため、種々機能を組み込んだ合理的設計による高分子/酸化チタンナノ粒子ナノコンポジットの開発に取り組んだ。生体適合性を有する高分子に酸化チタン修飾するための官能基を末端に導入するため新規移動剤を開発し、それを用いたRAFT重合により目的とした高分子を得る合成方法を確立した。合成方法が確立された高分子での酸化チタンナノ粒子の修飾を行い、生理的条件下での酸化チタンナノ粒子の分散安定性の向上に成功した。さらに、細胞内環境で開裂するジスルフィド結合を連結部にもつブロック共重合体の合成にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本国民最大の死亡原因とされる「がん」に対する治療法の開発は重要であり、化学療法、放射線療法、外科療法が三大がん治療法として知られる。その中で、超音波力学療法は、非侵襲的かつ人体に安全な超音波を利用した治療法であり、組織減衰係数が低いため生体組織深部がんへの効果的な治療法となりえるため、次世代のがん治療法として注目される。この超音波力学療法の実現には、超音波照射に反応して活性酸素種（ROS）を発生させるために必要な音増感剤を腫瘍組織へ送達し超音波に対する感度を上昇させる必要がある。そのための新たに高分子材料を開発した。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop polymer/titanium dioxide nanoparticle nanocomposites with various functions through rational design, in order to realize cancer-specific drug delivery of sonosensitizers for use in sonodynamic therapy. We developed a new transfer agent to introduce functional groups at the ends of biocompatible polymers for modifying them with titanium dioxide, and established a synthesis method to obtain the desired polymers by RAFT polymerization using the agent. We modified titanium dioxide nanoparticles with a polymer for which a synthesis method had been established, and succeeded in improving the dispersion stability of titanium dioxide nanoparticles under physiological conditions. Furthermore, we succeeded in synthesizing a block copolymer with a disulfide bond at the linking part that is cleaved in the intracellular environment.

研究分野：生体機能材料化学

キーワード：超音波力学療法 音増感剤 酸化チタンナノ粒子 低侵襲治療

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本国民最大の死亡原因とされる「がん」に対する治療法の開発は重要であり、化学療法、放射線療法、外科療法が三大がん治療法として知られる。その中で、超音波力学療法は、非侵襲的かつ人体に安全な超音波を利用した治療法であり、組織減衰係数が低いため生体組織深部がんへの効果的な治療法となりえるため、次世代のがん治療法として注目される。この超音波力学治療法の実現には、超音波照射に応答して活性酸素種 (ROS) を発生させるために必要な音増感剤を腫瘍組織へ送達し超音波に対する感度を上昇させる必要がある。そのため、腫瘍組織および標的細胞内器官へ音増感剤を効率的に送達するための技術・材料の開発が肝要となる。

2. 研究の目的

超音波力学療法によるがん治療は、非侵襲性であると同時に生体に安全な超音波を利用するため副作用が少なく、生体中の減衰が少なく深部腫瘍の治療が可能であることから次世代のがん治療法として注目される。効果的な超音波力学療法を実現するためには、標的がん細胞内に音増感剤を選択的に送達し超音波の感受性を高める必要がある。本研究では、この超音波力学療法に用いる音増感剤のがん特異的ドラッグデリバリーを実現するため、音増感剤である酸化チタンナノ粒子に、高血中滞留性、腫瘍蓄積性、細胞内取り込み能、細胞内ミトコンドリア標的能を全て一つに備えた合理的設計によるポリマー/酸化チタンナノ粒子ナノコンポジットの開発に取り組んだ。音増感剤である酸化チタンナノ粒子を腫瘍組織および細胞内ミトコンドリアに送達するための合理的設計に基づくナノコンポジットを開発し、これを用いた音増感剤ドラッグデリバリーシステムを開発する。ミトコンドリアは、細胞内でエネルギー産生など様々な重要な機能を担う細胞内小器官であり、損傷することで細胞死が誘導される。本研究では、ミトコンドリア指向性リガンド末端を有するポリマーを酸化チタンナノ粒子に修飾したナノコンポジット (第一世代) の調製と超音波力学療法への応用を目指した。さらに、ジスルフィド結合形成によりポリエチレングリコールを最表面に修飾することで、ナノコンポジットに血中安定性を付与 (第二世代) にも取り組んだ。

3. 研究の方法

3. 2. RAFT- PO_4H_2 の合成と RAFT 重合による PMPC 及び P(OEGMA) の合成

4-シアノ-4-(フェニルカルボノチオイルチオ)ペンタン酸 N-スクシンイミジルエステル (546.6 mg, 1.45 mmol) を DMSO (30 mL) に溶解した。O-ホスホリルエタノールアミン (234.6 mg, 1.66 mmol) を炭酸緩衝液 (pH 9、15 mL) に溶解した。これらの溶液を混合し、暗所・室温で 18 時間、これらの分子間のカップリング反応を促進した。生成物は、メタノールと水を使用した逆相シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。メタノールと水をそれぞれ蒸発と凍結乾燥で除去し、乾燥生成物を得た。収率は 82% であった。

PMPC の合成は以下の操作で行った。MPC (1 mmol)、RAFT- PO_4H_2 (10、20、40、80 μmol)、VA-044 (2.5、5.0、10、20 μmol) を脱イオン水 (3、3、5、8 mL) に溶解した。溶液をシュレンクフラスコに加えた。数回の N_2 /脱ガスプロセスの後、暗所で 24 時間 40 に加熱することにより重合を開始した。重合後、凍結乾燥によりポリマー (PMPC- PO_4H_2) を得た。PMPC-COOH を調製するために、MPC (1 mmol)、RAFT-COOH (10、20、40、および 80 μmol)、および VA-044 (2.5、5.0、10、および 20 μmol) を含むメタノール (3 mL) のプレポリマー溶液と同じ条件下で RAFT 重合を行った。P(OEGMA) の合成は以下の操作で行った。RAFT- PO_4H_2 、OEGMA (Mn = 500)、開始剤 V-501 をそれぞれイオン交換水に溶解した。これらの混合溶液をシュレンク管に入れ、脱気した後に 70 のオイルバスで遮光しながら 24 時間重合した。その後、凍結乾燥し、 ^1H NMR 測定とゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) 測定を行った。

3. 4. PMPC 修飾 TiO_2 ナノ粒子の調製

TiO_2 ナノ粒子を、Brij98 (1.5 mL) を溶解した脱イオン水に分散させ、PMPC- PO_4H_2 または PMPC-COOH 水溶液 (1.5 mL) を TiO_2 ナノ粒子の分散液と混合した (最終濃度: 1 mg/mL TiO_2 、0.5 mM Brij98、10 mg/mL PMPC)、pH を 4.0 に調整した後、混合物を暗所・室温で 24 時間インキュベートした。インキュベートした粒子のサイズ分布を DL により決定した。分散液の上清を限外濾過 (50,000 Da) で分離し、上清と元の PMPC 水溶液の UV-Vis スペクトルを測定して、 TiO_2 ナノ粒子上の PMPC- PO_4H_2 または PMPC-COOH の修飾を評価した。

3. 6. P(OEGMA) 修飾 TiO_2 ナノ粒子の調製

Brij98 (0.5 mM) に TiO_2 分散液を加えて攪拌し、分子量 4000、4500、9000 の P(OEGMA) を加えた (TiO_2 : 1 mg/mL, P(OEGMA): 6.31 μM)。なお、P(OEGMA) の仕込み量については数平均分子量を物質質量に換算し、3 種類の P(OEGMA) 間で見かけの物質質量が揃うように調整した。NaOH 溶液を用いて pH を 4.0 に調整した後、室温で遮光しながら 24 時間攪拌した。その後、イオン交換水で 6 分の 1 濃縮の限外ろ過 (分画分子量 100,000) を 3 回行うことで精製した。Brij98 中での精製前後の動的光散乱 (DLS) 測定を行った (TiO_2 濃度: 45 $\mu\text{g/mL}$ 、温度: 25)。また、コントロールとしてポリマー添加なしで同様の操作を行い、 TiO_2 ナノ粒子のみで DLS 測定を行った。

3.7. P(OEGMA)のジチオベンゾエート末端の変換

P(OEGMA) (10 mg) をイオン交換水 (1 mL) 中で種々物質量の NaBH_4 と反応させ、ジチオベンゾエート末端をチオールへの変換を検討した。P(OEGMA)末端の変換率は、ジチオベンゾエート由来の 496 nm における吸光度の減少率から算出した。

3.8. N-[2-(2-ピリジルジチオ)エチル]アミン (PDEA) 塩酸塩の合成

ジピリジルジスルフィド (4.41 g; 20.0 mmol) をメタノール (30 mL) と酢酸 (0.8 mL) の混合溶液に溶解した。メタノール (20 mL) に 2-アミノエタンチオール塩酸塩 (1.14 g; 10.0 mmol) を溶解し、滴下漏斗を用いてアルゴン下でジピリジルジスルフィド混合溶液に滴下した後、16 時間攪拌した。エバポレーターでメタノールを除去した後、生成物を脱水ジエチルエーテル (50 mL) で 2 回洗浄した。上澄みを除去した後、生成物をメタノール (10 mL) に溶解し、ジエチルエーテル (200 mL) で再結晶した。真空乾燥後、 $^1\text{H NMR}$ 測定を行った。

3.9. mPEG-PDEA の合成

mPEG (2.00 g) と NPC (0.605 g; 3.00 mmol) を、超脱水 THF (20 mL, 8 mL) にそれぞれ溶解した。mPEG 溶液に TEA (0.624 mL; mPEG に対して 4.5 eq) を加えた後、その溶液に滴下漏斗を用いて NPC 溶液を滴下し、遮光しながら室温で 3 日間攪拌した。濾過後、エバポレーターで溶媒を濃縮し、氷冷ジエチルエーテル (150 mL) で再沈殿した。吸引濾過後、減圧乾燥し、 $^1\text{H NMR}$ 測定を行った。次に、PDEA 塩酸塩 (308.68 mg; 1.39 mmol) を超脱水 THF (36.4 mL) に溶解し、TEA (290.4 μL ; 1.39 mmol) を加えた。mPEG-NPC (1.0 g; 0.462 mmol) を超脱水 THF (45.8 mL) に溶解し、PDEA 溶液に滴下した後、3 日間攪拌した。沈澱を濾過で除去した後、ジエチルエーテルで 2 回再沈澱したが精製が不十分であったため、飽和食塩水 (50 mL) とクロロホルム (50 mL) で分液し、精製した。減圧乾燥後、 $^1\text{H NMR}$ スペクトルと GPC 測定を行った。

3.11. P(OEGMA)-S-S-mPEG-PDEA の合成

P(OEGMA)末端のジチオベンゾエートの還元において、反応開始から一晩経過した溶液 200 μL (P(OEGMA); 10 mg/mL) を、1.0, 1.5, 2.0 eq の mPEG-PDEA (0.81, 1.22, 1.62 mg) をイオン交換水 (100 μL) に溶解した mPEG-PDEA 溶液に滴下し、25 $^\circ\text{C}$ で一晩攪拌した。反応の進行を確認するため、反応溶液を NaNO_3 水溶液 (20 mM) で希釈し、GPC 測定を行った。

4. 研究成果

我々は、まず RDRP を用いて生理条件下で高いコロイド安定性を有する生体適合性ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) 修飾 TiO_2 ナノ粒子の作製を検討しました (図 1)。この目的を達成するために、ホスホン酸基を含む RAFT 剤が新たに設計され、ホスホン酸基はカルボン酸と比較して TiO_2 表面とより強く相互作用することができるため、RAFT 剤を用いた RAFT 重合によりホスホン酸官能化ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC- PO_4H_2) が合成された。我々は、生理条件下での PMPC- PO_4H_2 修飾 TiO_2 ナノ粒子のコロイド安定性が、カルボン酸を有するポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) (PMPC) (PMPC-COOH) 修飾 TiO_2 ナノ粒子のコロイド安定性よりも高いことを明らかにした。PMPC-COOH は市販の RAFT 剤 [4-シアノ-4-(フェニルカルボチオイルチオ)ペンタン酸:RAFT-COOH] を使用して調製した。2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) 修飾 TiO_2 ナノ粒子のコロイド安定性に対する PMPC- PO_4H_2 の分子量の影響も詳細に調査した。

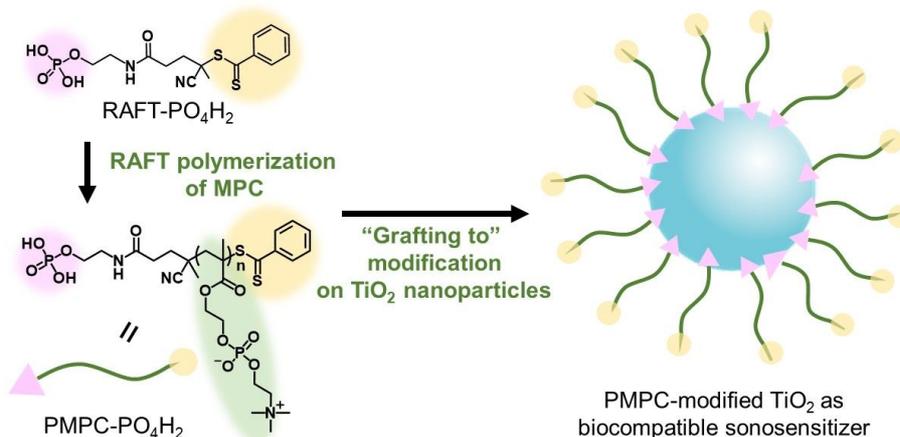


図 1 生体適合性音響増感剤としての PMPC 修飾 TiO_2 ナノ粒子の調製の概略図

PMPC は水溶性であり、脂質二重層のホスホリルコリンモチーフに由来する高い生体適合性を持っています。 TiO_2 ナノ粒子上の生体適合性ポリマーとして PMPC を修飾するために、ホスホン酸基 (RAFT- PO_4H_2) を持つ新しい水溶性ジチオベンゾエートベースの RAFT 剤が合成されました。このホスホン酸基は TiO_2 ナノ粒子と安定した結合を形成できます。4-シアノ-4-(フェニルカルボチオイルチオ)ペンタン酸 N-スクシンイミジルエステルを、ジメチルスルホキシド/水の混合物中で O-ホスホリルエタノールアミンと反応させました。生成物は逆相シリカゲル

クロマトグラフィーで精製しました。対象 RAFT 剤の精製は、 $^1\text{H-NMR}$ で確認した。RAFT- PO_4H_2 の制御剤としての重合制御能力を、RAFT-COOH の性能と比較することにより、MPC の RAFT 重合を介して調査しました。実験では、MPC と RAFT- PO_4H_2 の供給モル比を変更することによって PMPC の目標分子量を調整しました。ここで、供給モル比 $[\text{MPC}]/[\text{RAFT-PO}_4\text{H}_2]$ は 10、20、40、および 80 に設定されました。脱イオン水を重合の溶媒として選択しました。RAFT- PO_4H_2 を使用したすべての重合におけるモノマー変換率は、 $^1\text{H-NMR}$ によって約 99% と推定されました。RAFT- PO_4H_2 (PMPC- PO_4H_2) を用いて調製した PMPC の数平均分子量 (M_n) は、目標分子量を 3,400、6,300、12,200、および 24,000 に設定したときに、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により、それぞれ約 5,600 (M_w/M_n : 1.10)、7,600 (M_w/M_n : 1.11)、12,000 (M_w/M_n : 1.12)、および 20,000 (M_w/M_n : 1.15) と評価されました (図 2)。

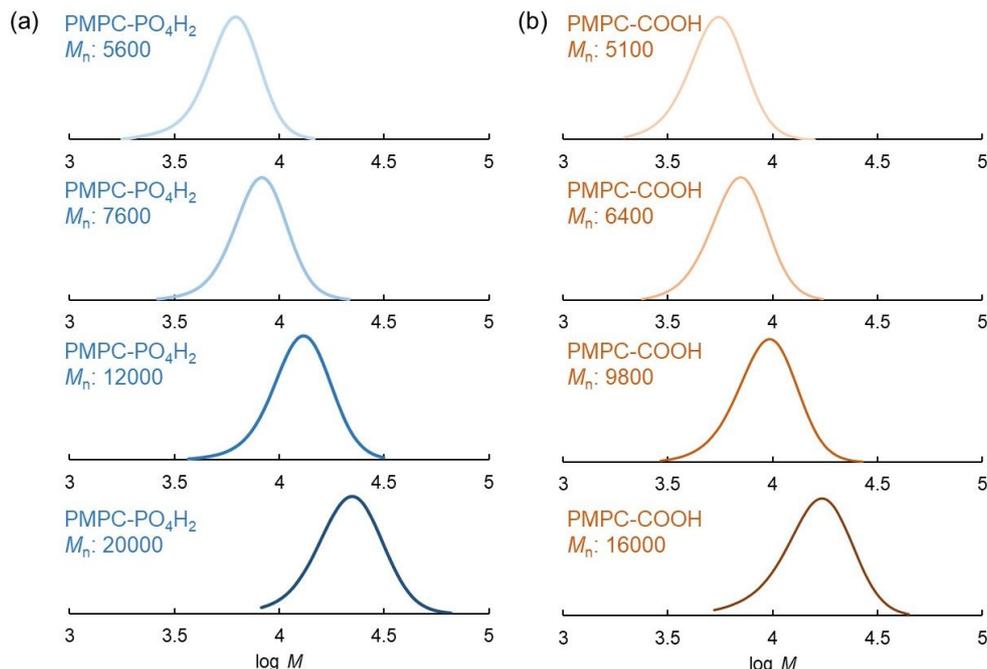


図 2 異なる目標分子量を持つ RAFT- PO_4H_2 と RAFT-COOH を使用した MPC の RAFT 重合後に得られた PMPC- PO_4H_2 (a) と PMPC-COOH (b) の GPC チャート

PMPC 修飾 TiO_2 ナノ粒子の調製では、PMPC- PO_4H_2 と PMPC-COOH を用いたグラフト法を用いて PMPC 修飾 TiO_2 ナノ粒子を調製した種々条件下で調製、分散安定性評価を行った結果、純水希釈に対する PMPC- PO_4H_2 修飾 TiO_2 粒子のコロイド安定性が PMPC-COOH 修飾 TiO_2 粒子のそれよりも高いことが確認された。

生体適合性高分子として PMPC を選択した場合、末端のホスホン酸だけでなく側鎖と TiO_2 ナノ粒子との相互作用を懸念される挙動があった。そこで、ポリ(オリゴエチレングリコールメチルエーテルメタクリレート)(P(OEGMA))を生体適合性高分子と用いることを検討し、その合成方法を確立した。得られた P(OEGMA)を用いて TiO_2 ナノ粒子の修飾を行った。

Brij98 中で TiO_2 ナノ粒子に種々分子量の P(OEGMA)を修飾した TiO_2 -P(OEGMA)、並びに P(OEGMA)未修飾の TiO_2 ナノ粒子について行った DLS 測定の結果 (図 3) より、単峰性の粒径分布、および P(OEGMA)の分子量増加に伴う粒径の増大から、 TiO_2 ナノ粒子に P(OEGMA)が修飾されたことを確認した。さらに、 TiO_2 ナノ粒子単体で界面活性剤中に分散させたところ、多峰性の粒径分布が見られ、粒径が大幅に増大したことから、 TiO_2 ナノ粒子に P(OEGMA)を修飾したことによる分散安定性の付与が確認された。生理的な塩濃度を再現したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に TiO_2 -P(OEGMA)を分散させ、30 分毎に経時的に DLS 測定を行い、インキュベーション時間に対して平均粒径をプロットした (図 3)。全ての TiO_2 -P(OEGMA)について一定時間単峰性のピークを維持していたが、インキュベーションの長期化に伴い、凝集し、二峰性の粒径分布を示した。単峰性のピークを維持した時間は P(OEGMA)の分子量増加に伴って長期化し、分子量が 4000、4500、9000 と増大するごとに、単峰性のピークが維持された時間は 60、90、240 分と増加した。これは OEG 鎖が水和することによると考えられる。また、PMPC 修飾した場合と比べて P(OEGMA)修飾した方が高い分散安定性を示すことが確認された。

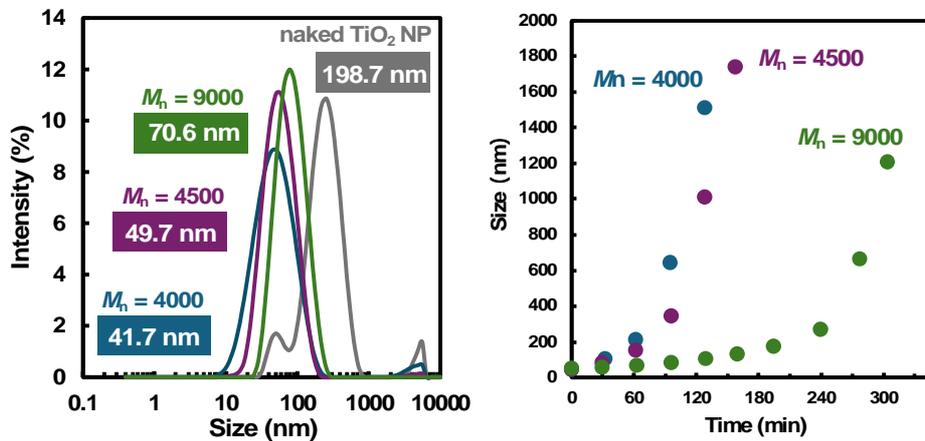


図3 種々分子量の P(OEGMA)で修飾した TiO₂ ナノ粒子の粒径分布と生理食塩水中での分散安定性評価

第一世代ナノコンポジットとして P(OEGMA)修飾が有効であることが確認されたので、第二世代ナノコンポジット調製のための高分子材料合成を検討した。連結部に還元環境応答性を示すジスルフィド結合を有する生体適合性ブロック共重合体の合成スキームを図4に示す。

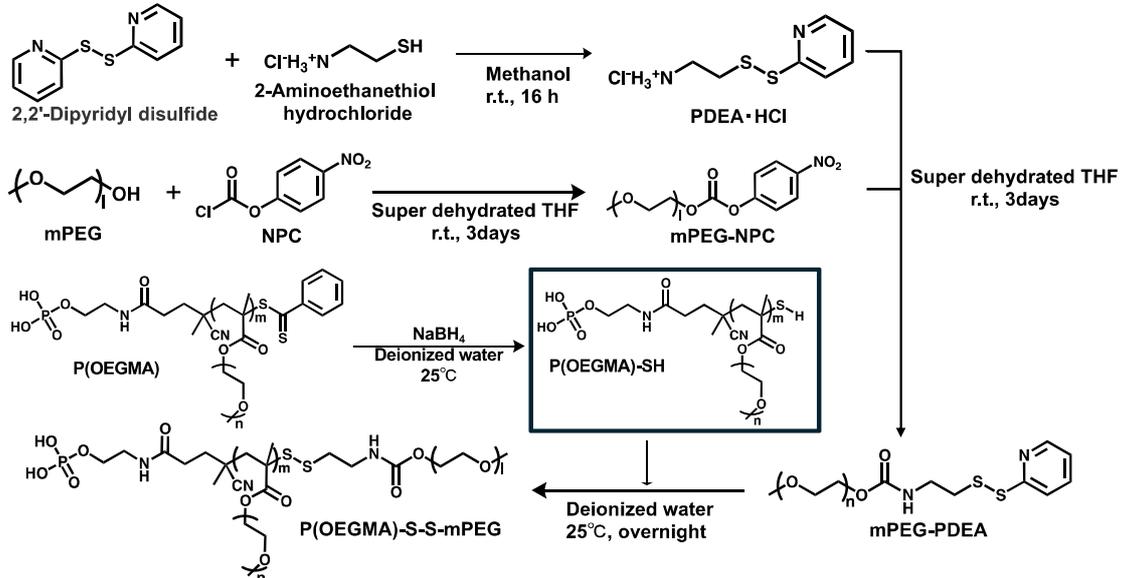


図4 連結部に還元環境応答性を示すジスルフィド結合を有する生体適合性ブロック共重合体の合成

各合成段階での構造の確認は、¹H NMR 測定及び GPC 測定により行った。最終的に、P(OEGMA)-S-S-mPEG の合成は GPC 測定より確認した。種々当量の mPEG-PDEA (1.0, 1.5, 2.0 eq) と P(OEGMA)-SH をイオン交換水中で反応させた後の反応溶液を NaNO₃ 水溶液 (20 mM) で希釈し、GPC 測定を行ったところ、P(OEGMA)-S-S-mPEG の生成が確認された。P(OEGMA)の末端 SH への変換率を向上させることで、目的としたブロック共重合体を高効率で得ることが可能であるとえられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kitayama Yukiya, Katayama Aoi, Shao Zhicheng, Harada Atsushi	4. 巻 15
2. 論文標題 Biocompatible Polymer-Grafted TiO ₂ Nanoparticle Sonosensitizers Prepared Using Phosphonic Acid-Functionalized RAFT Agent	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 2426 ~ 2426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/polym15112426	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 井上梓, 片山葵, 北山雄己哉, 弓場英司, 原田敦史
2. 発表標題 超音波力学療法のための生体適合性高分子修飾 TiO ₂ ナノ粒子の調製
3. 学会等名 第72回高分子年次大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井上梓, 片山葵, 北山雄己哉, 弓場英司, 原田敦史
2. 発表標題 超音波力学療法への応用に向けた生体適合性ブロック共重合体修飾TiO ₂ ナノ粒子の作製
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 A. Katayama, Z. Shao, Y. Kitayama, E. Yuba, A. Harada
2. 発表標題 Preparation of TiO ₂ Nanoparticles Grafted with Biocompatible Polymers Synthesized with Phosphonic Acid-Functionalized RAFT Agents for Sonodynamic Therapy
3. 学会等名 MRM2023 / IUMRS-ICA2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 原田敦史
2. 発表標題 機能性高分子を利用した金属ナノ粒子の分散安定性制御と回収技術
3. 学会等名 ナノマテリアルジョイントミーティング2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 片山葵，江本隼也，北山雄己哉，弓場英司，原田敦史
2. 発表標題 超音波力学療法応用を指向した生体適合性高分子修飾TiO2ナノ粒子の作製
3. 学会等名 第68回高分子研究発表会（神戸）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 R A F T 剤として使用可能な化合物及びそれを用いたポリマーの製造方法	発明者 原田敦史、北山雄己哉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-110820	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	北山 雄己哉 (Kitayama Yukiya) (40649745)	大阪公立大学・大学院工学研究科 ・准教授 (24405)	

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