

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14469

研究課題名（和文）リン脂質ポリマーの精密重合に基づく高機能性磁性ナノ粒子の創製とその医療応用

研究課題名（英文）Preparation of functional magnetic nanoparticles based on controlled radical polymerization of phospholipid polymers and their medical applications

研究代表者

金子 真大（Kaneko, Masahiro）

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：60881191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、磁性ナノ粒子の医療応用を広く実現するため、高分子の修飾による粒子の表面設計と機能化に取り組んだ。高分子の鎖長やユニット組成比の制御、機能性ユニットの導入技術に基づき、ナノ粒子の表面構造と機能の関係を検討した。磁性ナノ粒子を用いたがん温熱治療に焦点をあて、(1)ミトコンドリア指向性磁性ナノ粒子の開発に基づくがん温熱治療効果の増強、(2)薬剤担持可能な磁性ナノ粒子を用いたがん温熱治療、(3)血中投与可能なステルス性磁性ナノ粒子の開発と腫瘍への粒子の送達量向上を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

磁性ナノ粒子は、その磁気応答性や交流磁場による発熱といった特性から、MRIにおける造影剤や磁気温熱療法、磁気によるドラッグデリバリーシステム（DDS）など、医療分野の様々な場面での活躍が期待されている。本研究は、適切な構造を有する高分子の表面修飾に基づく磁性ナノ粒子の表面機能化により、ナノ粒子の細胞内局在の制御、薬剤担持機能の付与、血中投与による腫瘍への蓄積量の向上が実現できることを示した。以上の成果は、磁性ナノ粒子の血中投与に基づくがんの温熱治療やMRIによる診断、ならびに薬剤担持型磁性ナノ粒子によるDDSの実現など、磁性ナノ粒子の医療応用に向けた重要な基盤技術となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on surface design and functionalization of the nanoparticles through polymer modification, aiming for a wide range of medical applications of magnetic nanoparticles. We investigated the relationship between the surface structure and function of the nanoparticles by controlling the chain length and unit composition ratios of the polymers, and by introducing functional units. Focusing on cancer hyperthermia, we achieved (1) enhancement of the cancer hyperthermia effect based on the preparation of mitochondria-targeted magnetic nanoparticles, (2) drug-loadable magnetic nanoparticles, and (3) preparation of stealth magnetic nanoparticles that can be administered in the blood and improve delivery efficiency to tumors.

研究分野：生体医工学

キーワード：磁性ナノ粒子 リン脂質ポリマー 原子移動ラジカル重合 表面開始重合 温熱療法

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

磁性ナノ粒子は、その磁気応答性や交流磁場による発熱といった特性から、MRI における造影剤や磁気温熱療法、磁気によるドラッグデリバリーシステムなど、医療分野の様々な場面での活躍が期待されている。しかし、血中安定性や目的部位へのターゲティング能などの機能性の不足から、その実利用は限られている。ここで、磁性ナノ粒子に対して機能を付与する上では、その表面構造の制御が重要である。本研究では、高い生体適合性を有する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ポリマーを応用し、磁性ナノ粒子表面に、構造明確な MPC ポリマー層を構築する (図 1)。ポリマー末端にターゲティング基や細胞膜透過性基のような機能性基を付与することで、MPC ポリマーの鎖長及び密度、表面に存在する機能性基の個数が規定された磁性ナノ粒子を創製する。本研究では、構造明確なポリマー層に基づく、表面構造と機能の関係の解明と、その関係理解に基づく高機能性磁性ナノ粒子の創製を行う。また、磁性ナノ粒子の医療応用のモデルとしてがん温熱療法を行い、創製した磁性ナノ粒子の機能を検証する。

### 2. 研究の目的

本研究では、磁性ナノ粒子表面への構造が明確な MPC ポリマー層の構築に基づく、粒子の表面構造と機能 (細胞毒性・血中安定性・体内動態・目的部位への蓄積割合など) の関係の解明と、その関係理解に基づく高機能性磁性ナノ粒子の創出を目的とした。特に、磁性ナノ粒子のがん温熱治療への応用に焦点をあて、粒子の機能を検討した。具体的には、(1) ミトコンドリア指向性磁性ナノ粒子の開発、(2) カテコール基含有 MPC ポリマーを用いた薬剤担持型磁性ナノ粒子の開発、(3) 血中投与を指向したステルス性磁性ナノ粒子の開発に取り組んだ。

### 3. 研究の方法

#### (1) ミトコンドリア指向性磁性ナノ粒子の開発

MPC ユニット、マグネタイト表面への結合能力を有する 2-methacryloyloxyethyl succinate (MES) ユニット、ミトコンドリア指向性を有する 4-vinylbenzyl triphenylphosphonium (VTPP) ユニットにより構成される poly (MPC-co-MES-co-VTPP) (PMET) を原子移動ラジカル重合により合成した。また、比較対象として VTPP ユニットを持たない poly (MPC-co-MES) (PME) を合成した。鉄イオン水溶液とアンモニアを用いた共沈法によりマグネタイトナノ粒子を合成し、その反応液に PME または PMET を加えて攪拌することで、ポリマー被覆マグネタイト (MNPs@PME、MNPs@PMET) を調製した。マウス結腸がん CT26 細胞培地にポリマー被覆マグネタイトを加え 24 時間培養し、交流磁場を 15 分間照射した後、細胞生存率を評価した。また、CT26 細胞を移植した担癌マウスの腫瘍に粒子を直接注射し、交流磁場を 30 分間印加することで温熱治療を行った。治療後、腫瘍体積を経時的に計測した。

#### (2) カテコール基含有 MPC ポリマーを用いた薬剤担持型磁性ナノ粒子の開発

MPC と dopamine methacrylamide (DMA) ユニットにより構成される poly(MPC-co-DMA) (PMD) を 2,2'-azobis(isobutyronitrile) を開始剤とするフリーラジカル重合により合成した。MPC と DMA の仕込みモル比を 99:1、97.5:2.5、90:10、70:30 とすることで PMD1、PMD2.5、PMD5、PMD10、PMD30 をそれぞれ合成した。また、DMA ユニットを持たない poly(MPC) (PMPC) も合成した。合成したポリマーをマグネタイトナノ粒子の水分散液に添加し混合することで、PMD 被覆マグネタイトナノ粒子 (MNPs@PMD および MNPs@PMPC) を作製した。マクロファージ様 RAW264

細胞へ粒子を添加し、24 時間後に鉄濃度測定により粒子の細胞取り込み量を評価した。また、MNP<sub>s</sub>@PMD に抗がん剤であるボルテゾミブ (BTZ) を添加することで、MNP<sub>s</sub>@PMD-BTZ を作製した。CT26 細胞に粒子を添加した後、43 °C で温度が保たれるように交流磁場を 30 分間印加し、24 時間後に細胞生存率を測定した。

### (3) 血中投与を指向したステルス性磁性ナノ粒子の開発

シランカップリング反応により、磁性ナノ粒子 (Magnetic nanoparticles, MNPs) 表面に原子移動ラジカル重合法 (ATRP) の開始基 3-(trimethoxysilyl)propyl 2-bromo-2-methyl propanoate を修飾した。この粒子に対して、MPC と ethyl 2-bromoisobutyrate (EBiB) を添加して表面開始 ATRP を行うことで MPC ポリマー被覆磁性ナノ粒子 (MNP<sub>s</sub>-PMPC) を調製した。MPC と EBiB の仕込みモル比[MPC]/[EBiB]を 10、50、100 に調節することで、10 量体、50 量体、100 量体の PMPC 層を有する磁性ナノ粒子 MNP<sub>s</sub>-PMPC<sub>10</sub>、MNP<sub>s</sub>-PMPC<sub>100</sub> をそれぞれ合成した。また、EBiB を添加せずに重合を行うことで MNP<sub>s</sub>-PMPC<sub>x</sub> を合成した。

マウスマクロファージ様細胞 RAW264 細胞培地に MNP<sub>s</sub>-PMPC を添加し、24 時間後にナノ粒子の細胞内への取り込み量を鉄濃度測定により評価した。血中投与による腫瘍組織への蓄積量を調べるため、CT26 腫瘍を担持したマウス尾静脈へ MNP<sub>s</sub>-PMPC の血中投与を行い、24 時間後の腫瘍への蓄積量を鉄濃度測定により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) ミトコンドリア指向性磁性ナノ粒子の開発

MNP<sub>s</sub>@PME、MNP<sub>s</sub>@PMET の水分散液に交流磁場照射を照射したところ、同程度の発熱特性が認められた。CT26 細胞の培地にポリマー修飾磁性ナノ粒子を添加したところ、MNP<sub>s</sub>@PME、MNP<sub>s</sub>@PMET は同程度細胞内に取りこまれた。また、粒子を添加して培養した CT26 細胞を TEM により観察したところ、MNP<sub>s</sub>@PMET を添加した細胞のみで、ミトコンドリア内に粒子が蓄積する傾向が認められた。次いで、磁性ナノ粒子を取り込んだ CT26 細胞に対して交流磁場の印加により *in vitro* 温熱治療を行ったところ、ミトコンドリア指向性ユニットを含有した MNP<sub>s</sub>@PMET を用いた群では、MNP<sub>s</sub>@PME を用いた群に比べ殺細胞効果が向上した。さらに、CT26 腫瘍担がんマウスの腫瘍部位に磁性ナノ粒子を直接注射し、*in vivo* での温熱治療効果を検討した。温熱治療群で腫瘍の成長が抑制される傾向が認められ、MNP<sub>s</sub>@PME を用いた温熱治療群ではマウス 6 匹中 2 匹の腫瘍が完全退縮した一方で、MNP<sub>s</sub>@PMET を用いた温熱治療群

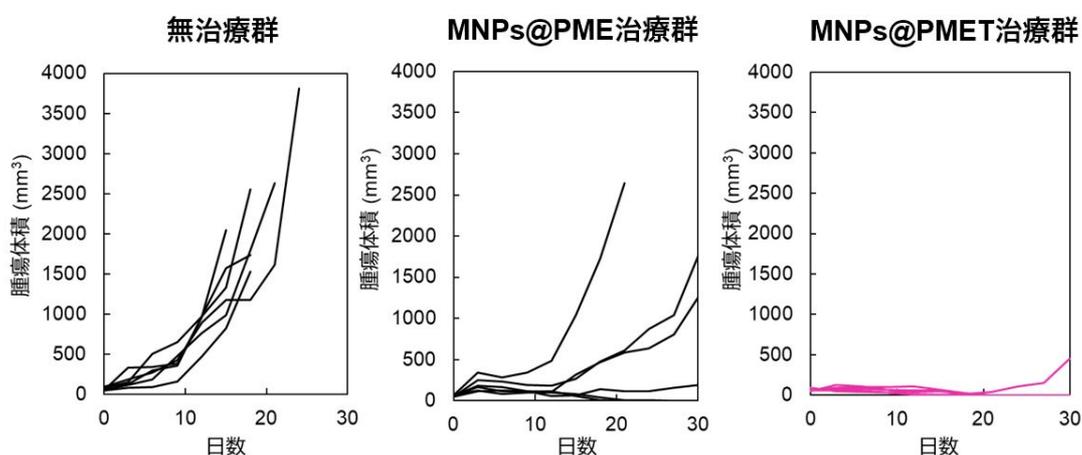


Fig. 1 CT26 腫瘍担がんマウスに MNP<sub>s</sub>@PME または MNP<sub>s</sub>@PMET を直接注射し、温熱治療を行った後の腫瘍体積の推移。

ではマウス 6 匹中 5 匹の腫瘍が完全退縮した (Fig. 1)。以上の結果は、磁性ナノ粒子表面にミトコンドリア指向性基を含有したポリマーを修飾することで、粒子の細胞内局在を制御し、温熱治療効果を増強できることを示している。

### (2) カテコール基含有 MPC ポリマーを用いた薬剤担持型磁性ナノ粒子の開発

種々のユニット組成比を有する PMD を合成し磁性ナノ粒子へ表面修飾を行った。DMA ユニットは、カテコール基を介した粒子表面への結合能力と、ボロン酸部位との可逆的結合による薬剤担持機能を提供する。MNPs@PMD の水分散液に交流磁場照射を照射したところ、どの粒子を用いた場合も発熱が確認された。次いで、粒子の PBS 中での分散安定性を評価した (図 1)。7 日後には未修飾の粒子と MNPs@PMPC、MNPs@PMD1 は沈殿していた。DMA ユニットを含まない MNPs@PMPC や DMA ユニット含有量の小さい MNPs@PMD1 では粒子とポリマーとの結合が比較的弱く、ポリマーが PBS 中のリン酸イオンなどに置換されることで剥離し粒子が沈殿したと推測される。

次いで、RAW264 細胞における粒子の取り込み量を評価した。ポリマーを修飾していない粒子の取り込み率は添加量の約 18% であった。PMD を修飾した粒子ではいずれも取り込み率が減少し、MNPs@PMD 30 > MNPs@PMD1 > MNPs@PMD2.5 > MNPs@PMD10 > MNPs@PMD5 の順に低くなった。DMA ユニット含有量が小さい場合、粒子との結合が弱くポリマーが剥離することで、細胞に取り込まれやすくなったと考えられる。一方、DMA ユニット含有率が高い場合は、粒子表面に露出するカテコール

基が多くなり、細胞との相互作用が生じ取り込み率が増加したと考えられる。さらに、MNPs@PMD5 と MNPs@PMD10 に対して抗がん剤である BTZ を担持し、in vitro における温熱治療効果を検証した。温熱療法により CT26 細胞の生存率が低下する傾向が認められた (Fig. 2)。さらに、BTZ を担持した粒子を用いた系ではより大きく生存率が低下した。以上の結果は、ポリマーの分子設計により、磁性ナノ粒子表面への安定的な修飾とマクロファージに対するステルス性、薬剤の担持機能を兼ね備えた粒子が創製できることを示している。

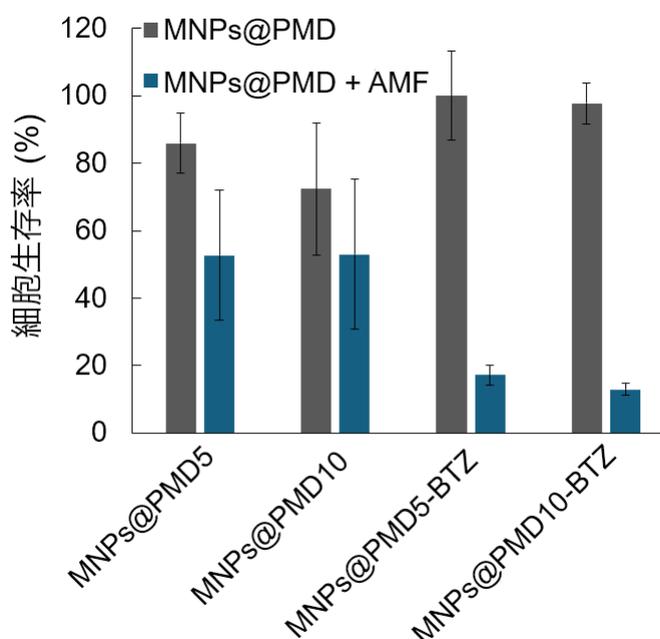


Fig. 2 CT26 細胞培地に BTZ を担持した MNPs@PMD5 または MNPs@PMD10 を添加し、温熱治療を行った後の細胞生存率。

### (3) 血中投与を指向したステルス性磁性ナノ粒子の開発

50~200 nm 程度の粒径を有したナノ粒子は、enhanced permeability and retention effect により、腫瘍組織へ蓄積しやすいことが知られている。しかし、血中投与により生体内に導入されたナノ粒子は、肝臓等の細網内皮系に捕捉されて体外へ排除されることが問題となる。したがって、温熱治療に十分な粒子量を腫瘍に集積させるためには、生体内で安定かつ貪食細

胞に捕食され難い表面構造を有した磁性ナノ粒子が必要不可欠である。本項では、血中投与可能な磁性ナノ粒子の創出を目指し、異なるポリマー鎖長を有する poly(MPC) (PMPC) 層を磁性ナノ粒子表面に構築し、ポリマー鎖長が粒子特性に与える影響を検討した。

熱重量測定と FT-IR 測定から、MNPs 表面に PMPC 層が構築されていることが確認された。次にステルス性を検証するため、RAW264 への取り込みを評価したところ、取り込み量は MNPs > MNPs-PMPC<sub>10</sub> > MNPs-PMPC<sub>50</sub> > MNPs-PMPC<sub>100</sub> の順に小さくなった。MNPs-PMPC と未修飾の MNPs をそれぞれ担がんマウスに尾静脈投与し、粒子の腫瘍への蓄積量を検討した。その結果、MNPs-PMPC<sub>10</sub> と MNPs-PMPC<sub>50</sub> に比べ、MNPs-PMPC<sub>100</sub> を注射したマウスでは腫瘍における粒子の蓄積量が大きかった (Fig. 3)。さらに、粒子表面により長い鎖長を有する PMPC 層を構築するため、犠牲開始剤を添加せず

に重合を行うことで MNPs-PMPC<sub>x</sub> を合成した。MNPs-PMPC<sub>x</sub> の腫瘍への蓄積量は、MNPs-PMPC<sub>100</sub> に比べ約 2 倍に向上した。以上の結果から、磁性ナノ粒子表面の PMPC の鎖長が大きくなるほど、マクロファージに対するステルス性と血中投与時の腫瘍集積率が向上することが明らかになった。本成果は、磁性ナノ粒子の血中投与に基づくがんの MRI イメージングや温熱療法の実現可能性を示唆している。

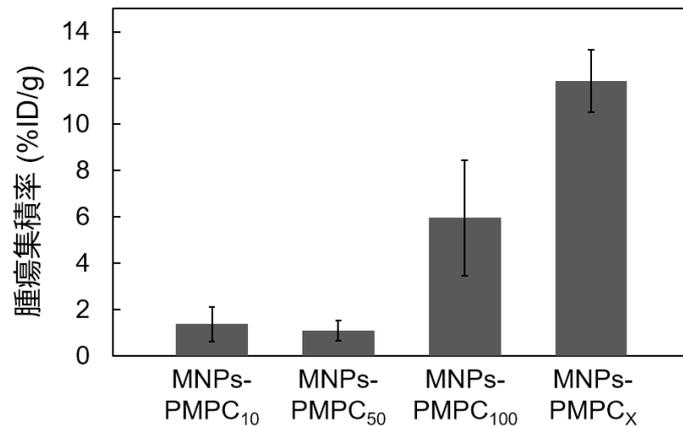


Fig. 3 CT26 腫瘍担がんマウスに MNPs-PMPC を尾静脈注射し 24 時間時間経過した後の腫瘍集積率。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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<br>金子真大、井藤彰                                  | 4. 巻<br>38          |
| 2. 論文標題<br>ハイパーサーミアにおける酸化鉄ナノフラワーの開発 - ナノ構造と発熱能の関係 - | 5. 発行年<br>2022年     |
| 3. 雑誌名<br>Thermal Medicine                          | 6. 最初と最後の頁<br>68-70 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3191/thermalmed.38.68 | 査読の有無<br>有          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

|   |                           |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaneko Masahiro, Yamazaki Hiroto, Ono Takahiro, Horie Masanobu, Ito Akira   | 4. 巻<br>114               |
| 2. 論文標題<br>Effective magnetic hyperthermia induced by mitochondria targeted nanoparticles modified with triphenylphosphonium containing phospholipid polymers | 5. 発行年<br>2023年           |
| 3. 雑誌名<br>Cancer Science  | 6. 最初と最後の頁<br>3750 ~ 3758 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/cas.15895  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>山崎裕永、金子真大、井藤彰             |
| 2. 発表標題<br>ミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子によるがん温熱療法 |
| 3. 学会等名<br>第74回日本生物工学会（2022）         |
| 4. 発表年<br>2022年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>山崎裕永、金子真大、井藤彰                 |
| 2. 発表標題<br>がん温熱療法のためのミトコンドリア標的型磁性ナノ粒子の開発 |
| 3. 学会等名<br>化学工学会第52回秋季大会                 |
| 4. 発表年<br>2021年                          |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>金子真大、山崎裕永、井藤彰                   |
| 2. 発表標題<br>ハイパーサーミアに向けたミトコンドリア指向性マグネタイトの開発 |
| 3. 学会等名<br>第34回東海ハイパーサーミア研究会               |
| 4. 発表年<br>2021年                            |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>金子真大、大野孝紘、井藤彰                       |
| 2. 発表標題<br>磁性ナノ粒子の血中投与を指向したリン脂質ポリマー被覆磁性ナノ粒子の開発 |
| 3. 学会等名<br>第36回中部ハイパーサーミア研究会                   |
| 4. 発表年<br>2023年                                |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大野孝紘、金子真大、井藤彰                           |
| 2. 発表標題<br>血中投与によるがんの診断と治療を指向したリン脂質ポリマー被覆磁性ナノ粒子の開発 |
| 3. 学会等名<br>第75回日本生物工学会(2023)                       |
| 4. 発表年<br>2023年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>雪下 奏斗、金子 真大、堤内 要、井藤 彰              |
| 2. 発表標題<br>がんの温熱療法のための生体模倣リン脂質ポリマー被覆磁性ナノ粒子の開発 |
| 3. 学会等名<br>化学工学会第54回秋季大会                      |
| 4. 発表年<br>2023年                               |

〔図書〕 計1件

|  |                 |
|--|-----------------|
| 1. 著者名<br>金子真大、井藤彰                                       | 4. 発行年<br>2022年 |
| 2. 出版社<br>サイエンス&テクノロジー                                   | 5. 総ページ数<br>533 |
| 3. 書名<br>金属ナノ粒子の合成・設計・制御と応用技術（担当：機能性磁性ナノ粒子の合成法と医療分野への応用） |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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 |
|---------|---------|
|---------|---------|