

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22810009

研究課題名（和文）弾性率の異なる自己組織化集合体の創製と体内動態

研究課題名（英文）Characterization and *in vivo* evaluation of nano-sized polyion complex vesicles with varying elasticity

研究代表者

安楽 泰孝（ANRAKU YASUTAKA）

東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員

研究者番号：60581585

研究成果の概要（和文）：『DDS デバイスを構築していく上で“キャリアの弾性率”という新しい基礎的知見を見出す』といった申請者のコンセプトを、腫瘍への集積性が弾性率によって異なるといった点で明らかにすることに成功した。また弾性率、架橋率によっては細胞への取り込みが異なることも明らかになり、体内動態(*in vivo*)と細胞取り込み(*in vitro*)においてキャリアの弾性率に関連性があることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We have previously demonstrated interesting properties in spontaneously formed submicron-sized polyion complex vesicles (Nano-PICsomes) via the self-assembly of a pair of oppositely charged polymers, whereby cross-linking of the PIC membrane by a condensation reagent can control many properties, including improvement of blood circulation and biodistribution. In this time, we succeeded in the characterization and *in vivo* evaluation of Nano-PICsomes with various cross-linking ratios and sizes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,180,000	354,000	1,534,000
2011 年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,340,000	702,000	3,042,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：自己組織化中空粒子・ドラッグデリバリーシステム・弾性率・体内動態

1. 研究開始当初の背景

昨今、ナノテクノロジー主導のバイオテクノロジーに関する研究が盛んに行われている。これらの研究の目標の一つに、生体内で活躍できる『バイオナノデバイス』の創製がある。そのため、DNA やタンパク質をはじめとして、様々な生体高分子の機能を模倣し、材料として応用する研究が行われており、DDS キャリア、あるいはバイオイメージングをインセンティブとして開発が進んできた。

特に DDS キャリアには、封じ込め機能（薬剤を封じ込め途中で漏らさない）、運搬機能（目標患部まで安定して確実に運搬）等が要求されるが、血中半減期の短い生理活性ペプチド・タンパク質などを薬剤として用いる場合には、さらにバイオアベイラビリティを飛躍的に高めることができる技術が必要とされている。キャリアの長期血中循環性は、薬の量や投与回数を軽減するといった点からも患者の QOL 向上に大きく貢献できる。こ

れまでに種々のナノ構造体が検討されてきてはいるが、短絡的な結果の解釈が多く、キャリア自身の材料設計において基礎科学的な視点・包括的な視点がまだまだ不足しており、これまでの知見が十分フィードバックされているとは言い難い。実際、キャリアの形態・物性から体内動態に関する考察は最近始まったばかりと言って良い。特に『キャリアの弾性率と体内動態との関係』に注目した研究・報告は少なく、とりわけ中空粒子については皆無である。血液細胞の中でも著しく長い血中半減期を示す赤血球(半減期 120 日)に注目すると、その寿命は老化または病的原因によって柔軟性の低下した赤血球が脾臓に存在する脾索の網の目を通過することができずにマクロファージに貪食され消失することによることが知られている。このように材料学的視点から赤血球の特徴をみても、その弾性率が長期血中滞留性にとって重要なファクターであることは想像に難くない。

2. 研究の目的

近年進境の著しいドラッグデリバリーシステム(DDS)の中にあつて、さらなる進展が期待されている有用な DDS キャリアの創製、とりわけこれまで注目されていなかったキャリアの弾性率と体内動態(血中滞留性、臓器分布、組織浸透性)との相関を明らかにすることを目的としている。最近、申請者らが開発した Nano-PICsome (生体適合性部位と高分子電解質部位からなる自己組織化中空集合体)は、構成高分子の種類を変えることなく容易に物性コントロール(サイズ、物質透過性、塩安定性)が可能であるといった点で汎用性の高い DDS キャリアとして有利なポテンシャルを複数有している。このシステムをさらに洗練し、架橋率、弾性率の異なる粒子の構築とその物性評価を第一の目標とした。さらに、単なる DDS キャリアとしての基礎物性のみでなく、in vitro, in vivo 評価を通して革新的なドラッグデリバリーツールに発展させる。また DDS デバイスを構築していく上で“キャリアの弾性率”という新しい基礎的知見を見出し、申請者のコンセプトの正しさを実証する。

3. 研究の方法

本研究ではまず、先行研究の成果を受け、加える架橋剤の量を変えて調製した架橋 Nano-PICsome の架橋率の算出方法の確立を試みる。その後、架橋率の異なる Nano-PICsome の弾性率を求め、DDS への応用を見据え、異なる架橋率による安定性の相違等の物性に関する評価も併せて行い、細胞実験に臨む。細胞実験では、毒性の評価の他、細胞質での Nano-PICsome の安定性についても評価する。さらに、

Nano-PICsome を担がんマウスの尾静脈より循環血液中に導入することによって、弾性率・サイズによる血中滞留性、臓器分布および組織浸透性といった体内動態の相違について評価を試みる。各段階で不具合が生じた場合は、適宜ポリマー設計・架橋剤の選定にフィードバックし、迅速な問題の解決を図る。これらの知見を活かして、Nano-PICsome の汎用的 DDS キャリアとしてのポテンシャルを図る。

4. 研究成果

(1) 架橋率算出法の確立

架橋率は、濃度既知の架橋 Nano-PICsome を重水置換した後に、全反射型赤外吸収(ATR-IR)法にて-CONH 伸縮振動、または-COO伸縮振動のピーク強度比を比較することで架橋率を算出することに成功した。その結果、添加する EDC 量を変える事で架橋率を~90 %近くまでコントロールできる事が明らかになった (表 1)。

表 1. ATR-IR 測定より算出した架橋率

EDC等量	0	0.1	0.5	1	5	10
架橋率 (%)*	0	9.5	38.6	55.9	74.2	89.9

(2) 安定性評価

得られた架橋率の異なる Nano-PICsome の生理条件下での安定性については、動的光散乱測定(DLS)、蛍光相関分光法(FCS)を用いて評価を行った。架橋剤である EDC が粒子形成時に含まれる-COOH 基に対して 0.5 等量以上加えることで、生理条件下での安定性が賦与されることが明らかになった。

(3) 弾性率測定

得られた粒子の弾性率を原子間力顕微鏡(AFM)のフォースカーブを解析し算出した所、約 10 kPa から 1 MPa まで容易に、幅広く弾性率をコントロールすることができる事が明らかとなった。既存のベシクル(リポソーム、ポリマーソーム)では弾性率を変化させるには、膜の厚みを変えるしかないが、高分子ベシクルで膜厚を 20 nm から 40 nm まで変えたところで、弾性率は 10 MPa から 20 MPa 程度しか変化できない(Chen, Q. et. al. *Soft Matter*, 2009, 5, 4944-4950.)。さらにベシクルのサイズが同一であるならば、膜厚を変えることで内水相の体積が減ることは明らかである。こういった点からも加える架橋剤の量を変えるのみで、幅広く弾性率をコントロールできることは、本研究の目的である弾性率の異なる粒子の体内動態を評価する上で最適であることが示唆された。

(4) In vivo 評価

これらの粒子を用い、血中循環性を含む体内動態の評価を担がんマウス(C-26, マウス大腸がん)を用いて重点的に行なった。これまでに申請者がサイズの異なる架橋 Nano-PICsome (10 等量架橋, 100-300 nm)の体内動態について既に報告しているが(JACS, 2011)、10 等量架橋の粒子で EPR 効果による腫瘍集積性は 150 nm 以下の粒子でのみ観察された。今回、サイズ (100, 200 nm)、架橋率 (0.5, 1, 3, 5, 10 等量)ともに変えて検討を行なった。まずいずれのサイズにおいても 3 等量以上架橋した架橋 Nano-PICsome において高い血中循環性を示した。当初の申請者は、赤血球のようにある弾性率において著しく高い滞留性を示す事を予想したが、それに反し、架橋率が高い程(弾性率が高い程)、高い血中循環性を示す事が明らかになった。これは血中での安定性においては、弾性率よりも粒子の安定性の方が重要なファクターであることを示唆していると考えられる。一方、EPR 効果による腫瘍への集積性は、弾性率を上手くコントロール(血中滞留性はあり、低い架橋率・弾性率において)することで、従来集積しなかった 200 nm の粒子が集積する事が明らかになった(図 1)。これはおそらく粒子の弾性率が下がり、変形能が増した事による為だと考えられる。こういったサブミクロンサイズの粒子が EPR 効果による腫瘍集積性を示した方向例は過去になく、大変興味深い結果だと言える。

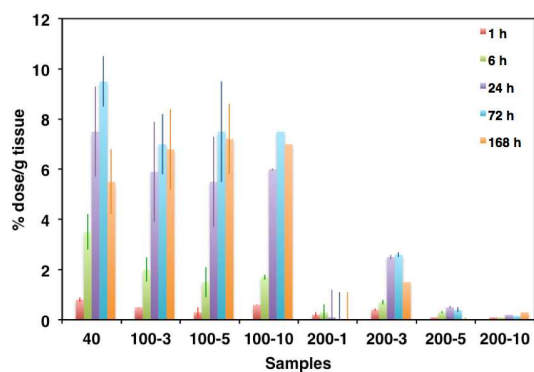


図 1. サイズ、架橋率の異なる架橋 Nano-PICsome の腫瘍集積性

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

① 岸村 顕広, 安楽泰孝, 片岡 一則
Development of Polyion complex vesicles 'Nano-PICsomes' with tunable size and stability in submicron region. 査読有り, 高分子, 59, 2010, 15-16.
<http://www.spsj.or.jp/c5/kobunshi/kobu2010/hottopics1006.html>

[学会発表] (計 18 件)

① Yasutaka Anraku, Akihiro Kishimura, Kazunori Kataoka Development and Functional Evaluation of Nano-sized Polyion Complex Vesicles (Nano-PICsomes) for Intelligent DDS Carrier The 12th Pacific Polymer Conference (PPC12), Jeju Shilla Hotel, Jeju Island (Korea), November 17, 2011

② 安楽泰孝, 岸村 顕広, 片岡 一則 規則的メゾ構造体を有するポリオンコンプレックスの創製と構造制御, 第 60 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都大学 吉田キャンパス, 2011 年 9 月 8 日

③ 安楽泰孝, 岸村 顕広, 片岡 一則 インテリジェント DDS キャリアへの応用を指向したポリオンコンプレックス型中空粒子 Nano-PICsome の開発, 第 60 回コロイドおよび界面化学討論会, 京都大学 吉田キャンパス, 2011 年 9 月 8 日

④ 安楽泰孝, 岸村 顕広, 片岡 一則 架橋率の異なるポリオンコンプレックス型中空粒子(nano-PICsome)の基礎物性評価と体内動態評価, 第 60 回高分子討論会, 岡山大学津島キャンパス, 2011 年 9 月 29 日

⑤ 安楽泰孝, 岸村 顕広, 片岡 一則 生体内デリバリーキャリアを指向したポリオンコンプレックス型中空粒子の創製と評価, 第 40 回医用高分子, 関西大学千里山キャンパス 100 周年記念館 ホール 1, 2011 年 7 月 25 日

⑥ Yasutaka Anraku, Spontaneous Formation of Nano-sized PICsomes with Their Properties, Trilateral Symposium on NanoBio Integration, Berlin University, (Germany), October 2, 2010.

⑦ Yasutaka Anraku, Akihiro Kishimura, Makoto Oba, Yuichi Yamasaki, Kazunori Kataoka Spontaneous Formation of Nano-sized PICsomes with Their Properties, 37th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Oregon Convention Center, (USA), July 14, 2010.

⑧ 安楽泰孝, 岸村 顕広, 宮田 完二郎, 大庭 誠, 山崎 裕一, 片岡 一則 新規ポリオンコンプレックス型中空粒子 Nano-PICsome の血中滞留性及び臓器分布に関する評価, 第 26 回日本 DDS 学会, 大阪国際交流センター, 6 月 17 日, 2010 年

⑨ 安楽泰孝, 岸村 顕広, 宮田 完二郎, 大庭 誠, 山崎 裕一, 片岡 一則 サイズ制御された

Nano-PICsome の血中滞留性及び臓器分布に関する評価、第 59 回高分子年次大会、パシフィコ横浜、5 月 26 日、2010 年

〔産業財産権〕

○出願状況（計 4 件）

① 名称：核酸を膜内に含有するベシクル
発明者：片岡一則、岸村顕広、宮田完二郎、大庭誠、安楽泰孝、須磨知也、Sayan Chuanoi
権利者：東京大学
種類：特願
番号：2010-117823
出願年月日：2010.05.21
国内外の別：国内

② 名称：物質内包ベシクル及びその製造方法
発明者：片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝、宮田完二郎
権利者：科学技術振興機構
種類：特願
番号：2010-117821
出願年月日：2010.05.21
国内外の別：国内

③ 名称：静電結合型ベシクル
発明者：片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝、Stephanie Lee、小出彩、酒井満
権利者：東京大学
種類：特願
番号：2010-168880
出願年月日：2010.07.28
国内外の別：国内

④ 名称：微細相分離構造体及びその製造方法
発明者：片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝
権利者：科学技術振興機構
種類：特願
番号：2011-196335
出願年月日：2011.09.08
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/>

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/nanobiof/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安楽 泰孝 (ANRAKU YASUTAKA)
東京大学・大学院工学系研究科・特任研究員
研究者番号：60581585