

令和元年6月17日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H03184

研究課題名(和文) 形態と表面物性が変化する感温性粒子の調製と細胞取り込み制御

研究課題名(英文) Preparation of thermoresponsive particles with shape and surface property alteration and their controlled phagocytosis

研究代表者

菊池 明彦 (Kikuchi, Akihiko)

東京理科大学・基礎工学部材料工学科・教授

研究者番号：40266820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、温度変化に伴い表面物性と形状を変化させる温度応答性コア-コロナ型微粒子を調製し、温度変化に伴う微粒子の表面物性と形状がマクロファージへの取り込みに与える影響を明らかにすることを目的に研究を行なった。種々微粒子の細胞内取り込みを比較したところ、表面が比較的疎水性になるとマクロファージへの取り込みは増大する傾向にあることが明らかになった。さらに、微粒子の形状は細胞内取り込みに大きな影響を与え、ロッド形状よりも球状微粒子で疎水性微粒子の取り込みが増大することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

診断や薬物キャリアとしての微粒子は数多く研究されているが、微粒子の表面物性と形状が細胞への取り込みに与える影響について、疎水性粒子を用いた研究が展開されつつある。一方、刺激に応答して微粒子の形状や表面物性を制御し細胞への取り込みを制御する研究はない。本研究の成果は、微粒子の形状と表面物性が細胞への取り込みに与える影響を明らかにした点で、新規な診断・薬物治療目的のキャリアを設計する上で重要な知見となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The objective of this research was to elucidate the effects of surface property and shape of thermoresponsive core-corona type nanoparticles on phagocytosis by macrophages. Hydrophobic particles showed larger phagocytosis than hydrophilic particles regardless of the particle shapes. However, particle shape showed greater influence on phagocytosis, spherical particles were phagocytized than rod-shaped particles regardless of surface properties of particles and hydrophobic and spherical particles showed largest phagocytosis. Such findings would be utilized to selective internalization of DDS carriers by changing shape and surface property by sole temperature changes.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：感温性微粒子 表面物性 形状 貪食

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高分子からなる微粒子は、医療分野において、診断薬やドラッグデリバリーシステム (DDS) の担体として治療に適用されるなど、きわめて幅広い分野での応用がこれまでに研究されてきており、工業的に重要な材料の一つとなっている。一方、多くの微粒子は比較的単一の材料から調製されている。例えば、DDS の担体として用いられる高分子ミセルなどは、疎水性[1]、または高分子電解質複合体[2]をコアに、コロナ層に親水性で生体適合性の高いポリ(エチレングリコール)(PEG)を有するコア-コロナ型微粒子に相当する形状を有する。同様に、微粒子調製時に高分子末端にビニル基を有するマクロモノマーを用いて分散重合を行うと、コア-コロナ型微粒子を調製しうる[3-5]。このとき、マクロモノマーに刺激応答性高分子を用いると、種々の物理刺激、化学刺激に応答して微粒子表面の物性を变化させる刺激応答性コア-コロナ型高分子微粒子を調製できる。最近になって、微粒子の形状を变化させ、その形状の違いによって種々の特性が変化することが報告されてきた。生体内に侵入した細菌やウイルスなどの粒状物質を処理する免疫の一次応答を担当するのはマクロファージや樹状細胞である。薬物キャリアやイメージング剤として用いられる微粒子についても、マクロファージや樹状細胞が取り込みを行うことが知られている。Hirota らは微粒子の粒径がマクロファージへの取り込みに大きく影響することを報告した[6]。さらに粒径 6  $\mu\text{m}$  のポリスチレンのマクロファージへの取り込みが最大になったことを報告している[7]。Mitrugotri ら[8]も同様の報告をした。さらに最近、Mitrugotri らのグループでは、高分子の球状微粒子からロッド状微粒子を得る方法と、そのマクロファージへの取り込み挙動の解析から[9-12]、微粒子のマクロファージへの取り込みを利用した医療用途への応用について、精力的に研究を発表している。ロッド状微粒子では短軸側から細胞に接近した場合には貪食が起こるものの、長軸側から細胞に接近した場合には細胞内への貪食が抑制されることを報告した。扁平ディスクや土星形状の微粒子においても貪食は抑制されることが明らかになった。上述した微粒子はポリスチレンや PLGA などからなり、ガラス転移温度が比較的高いために、形状を変更した後は細胞と接触する生理的環境 (pH 7.4, 37°C, I=0.15) では変化しない材料であった。一方、刺激に応答して形状を变化させることができれば、微粒子の機能制御を実現しうるため、興味深い。そこで、本研究では、温度変化で形状と表面物性を同時に制御可能な感温性微粒子を設計することを検討した[19, 20]。一方、体温近傍では微粒子表面は疎水性で、かつ形状もロッド状から球状に変化してしまうため、生理活性温度 37°C で表面物性、形状を制御しうる微粒子の設計と、細胞との相互作用を明らかにすることで、マクロファージによる微粒子貪食に与える微粒子の表面特性と形状の影響を明らかにすることができると考えた。本研究では、鎖長制御された PNIPAAm 誘導体からなるマクロモノマーの合成と、マクロモノマー法を利用したコアのガラス転移温度を制御した微粒子の調製を行い、本微粒子の、温度変化に伴う微粒子表面物性と形状がマクロファージへの取り込みに与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

### 2. 研究の目的

本研究では、コロナ鎖の下限臨界溶液温度 (LCST) を生体温度近傍で制御するため、NIPAAm と親水性の *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm) を ATRP 法によって共重合させ、末端変換法により P(NIPAAm-co-DMAAm) (PID) マクロモノマーを合成した。このマクロモノマーを用いて、コアの  $T_g$  値を变化させるために、*n*-propyl methacrylate (PMA) と methyl methacrylate (MMA) との共重合を行い、コアの  $T_g$  を種々变化させた温度応答性コア-コロナ型微粒子をマクロモノマー法によって調製した。これら、微粒子の表面物性と形状の違いで細胞との取り込みにどのように影響を与えるか解析した。

### 3. 研究の方法

本研究では NIPAAm と親水性である *N,N*-dimethylacrylamide (DMAAm) の共重合体 P(NIPAAm-co-DMAAm) (PID) を微粒子のコロナ層に用いた。この PID の LCST は NIPAAm と DMAAm の仕込み比によって容易に制御でき、仕込み比を变化させることで細胞培養温度前後の LCST が得られ、表面が親水性あるいは疎水性になりうる微粒子が得られると考えられる。また、微粒子のコアには *n*-propyl methacrylate (PMA) と MMA との共重合体 P(PMA-co-MMA) を用いた。PPMA の  $T_g$  は 33 °C [21] であるが、105 °C の  $T_g$  をもつ PMMA [21] と共重合させることで、細胞培養温度前後の  $T_g$  が得られ、微粒子の形態が温度によってコントロールできると考えた。そこで、コアとコロナ双方に温度応答性機能を付与した温度応答性コア-コロナ型微粒子を調製し、その物性解析を行った。

調製した種々微粒子を  $T_g$  以上の温度で一軸延伸し、P(PMA-co-MMA)-*g*-PID ロッド状微粒子を調製した。そして、温度変化にともなう微粒子の表面物性や形状変化が細胞取り込みに与える影響を解析した。

### 4. 研究成果

種々 LCST 値を有する PID マクロモノマーを用いて温度応答性コア-コロナ型微粒子を調製した。調製した P(PMA-co-MMA)-*g*-PID 微粒子の SEM 観察から、球状微粒子の調製を確認した。Table 1 に調製した微粒子の物性を示した。

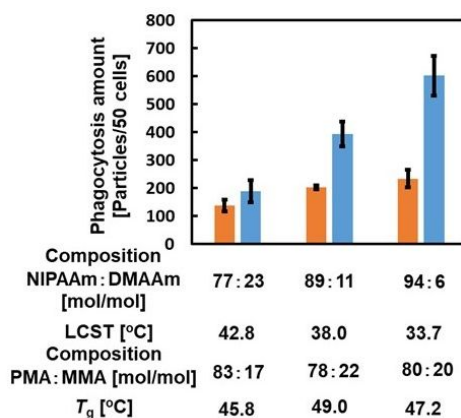
**Table 1** Characterization of P(PMA-co-MMA)-g-PID nanoparticles.

PID macromonomer <sup>a)</sup> (mol/mol)	PMA:MMA <sup>a)</sup> (mol/mol)	LCST <sup>b)</sup> (°C)	T <sub>g</sub> <sup>c)</sup> (°C)	diameter <sup>d)</sup> (nm)	M <sub>n</sub> <sup>e)</sup>
94:6	92:8	33.7	36.4	730±10	19.4
	80:20		47.2	690±40	21.5
89:11	93:7	38.0	34.4	610±10	20.3
	78:22		49.0	690±55	19.8
77:23	93:7	42.8	36.9	675±65	19.5
	83:17		45.8		18.6
80:20	100:0	46.1	27.0	410±25	20.9
	91:9		37.7	405±30	26.6
	84:16		42.8	440±40	18.3
	78:22		44.7	360±30	21.4
	71:29		48.8	350±30	19.9

a) Determined by <sup>1</sup>H-NMR in CDCl<sub>3</sub>. b) Determined by transmittance changes at 500 nm. Solvent: PBS (pH = 7.4, I = 0.15); Heating rate: 1 °C/min. Polymer conc. 0.5 w/v %. c) Determined by DSC (temperature range of -20 to 70 °C at a heating rate of 5 °C/min). d) Determined by SEM (n = 30, mean ± SD). e) Determined by GPC (PEG standard).

**Table 1** より, コア成分の PMA と MMA の仕込み比を変化させることで組成比も制御できた。また, DSC 測定から算出した微粒子の T<sub>g</sub> 値は, MMA 含量の増加とともに高くなる傾向を示した。得られた粒子の粒径は比較的単分散であった。

以上で調製した種々微粒子を T<sub>g</sub> 以上の温度で一軸延伸し, P(PMA-co-MMA)-g-PID ロッド状微粒子を調製した。そして, 温度変化にともなう微粒子の表面物性や形状変化が細胞取り込みを与える影響を調べ, その結果を **Figure 1** に示した。



**Figure 1** Phagocytosis amounts of particles by macrophages (Mouse RAW264.7 M φ cells) after 24 h incubation. Macrophages were seeded at  $1.2 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>. Data are presented as the mean ± SD (n = 3).

まず, 表面物性の違いにともなう微粒子の細胞取り込みを比較すると, 微粒子の形状によらず, 微粒子表面が親水性(37°C < LCST)の場合, 微粒子は細胞内への取り込みが抑制され, 微粒子の表面が疎水性(37°C > LCST)の場合, 細胞内への取り込みは多くなった。また, 微粒子の表面が親水性から疎水性へ変化する境界にある(37°C ≃ LCST)微粒子の場合は, 細胞内への取り込み量は中間的な値を示した。一方, 形状の違いにともなう微粒子の細胞取り込みを比較すると, 表面物性によらず球状微粒子のほうがロッド状微粒子よりもマクロファージへの取り込みが増大することが明らかになった。これは, マクロファージがロッド状微粒子と接触する角度 Ω の大きさによりマクロファージとの接触面が変化するため, 取り込みが変化すると考えられる[10]。Ω < 45° の場合, アクチン繊維の伸長が起こり取り込みを促進するが, Ω > 45° の場合, アクチン繊維の伸長が十分に起こらず細胞内への取り込みを抑制する。これにより, ロッド状微粒子は表面物性によらず取り込みが抑制されるものと考えられた。以上より, 表面物性と形状を, 温度変化で制御可能な感温性微粒子を調製できた。本研究で調製した微粒子の表面物性と形状の制御を通じ, マクロファージへの取り込み量を抑制・促進しうることから, これらの微粒子は薬物治療や細胞治療を実現しうる新規微粒子材料として期待できる。

#### 参考文献

- [1] K. Kataoka, et al., J. Control. Rel., 24 (1993) 119-132. [2] K. Kataoka, et al. Adv. Drug Deliv. Rev., 47 (2001) 113-131. [3] M. Akashi, et al., Angew. Makromol. Chem., 132 (1985) 81-89. [4] T. Akagi, et al., Polymer, 48 (2007) 6729-6747. [5] M. Q. Chen, et al., J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem., 37 (1999) 2155-2166. [6] K.

Hirota, et al., J. Control. Rel., 119 (2007) 69-76. [7] T. Hasegawa, et al., Coll. Surf. B-Biointerfaces, 60 (2007) 221-228. [8] J. A. Champion, et al., Pharm. Res., 25 (2008) 1815-1821. [9] J. A. Champion, et al., J. Control. Rel., 121 (2007) 3-9. [10] J. A. Champion, S. Mitragotri, PNAS, 103 (2006) 4930-4934. [11] J. A. Champion, S. Mitragotri, Pharm. Res., 26 (2009) 244-249. [12] N. Doshi, S. Mitragotri, Pros One, 5 (2010) e10051. [13] P. Kolhara, et al., PNAS, 110 (2013) 10753-10758. [14] S. Barua, S. Mitragotri, ACS Nano, 7 (2013) 9558-9570. [15] S. Barua, et al., PNAS, 110 (2013) 3270-3275. [16] A. Banerjee, et al., J. Control. Rel., 238 (2016) 176-185. [17] S. Kumar, et al., J. Control. Rel., 220 (2015) 141-148. [18] R.A. Meyer, et al., Small, 11 (2015) 1519-1525. [19] T. Matsuyama, et al., Langmuir, 29 (2013) 15770-15777. [20] T. Matsuyama, et al. Coll. Surf. B-Biointerfaces, 123 (2014) 75-81. [21] R. P. White, J. E. G. Lipson, ACS Macro Lett., 4 (2015) 588-592. [22] K. Nagase, et al., RSC Adv., 5 (2015) 66155-66167. [23] T. Maeda, et al., Biomacromolecules, 7 (2006) 545-549.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 23 件)

国内学会(14 件)

1. 菊池明彦、鈴木琢磨、松山拓矢、麻生隆彬、石原 量、温度刺激で形状変化する感温性ナノロッドのマクロファージ取り込み挙動、第 32 回日本 DDS 学会学術集会(静岡) 2016 年 6 月 30 日 ~ 7 月 1 日
2. 菊池明彦、鈴木琢磨、松山拓矢、石原 量、麻生隆彬、細胞による取り込み制御を実現する感温性コア-コロナ型ロッド状微粒子の調製、第 65 回高分子討論会(横浜) 2016 年 9 月 14 日 ~ 9 月 16 日
3. 菊池明彦、鈴木琢磨、松山拓矢、川瀬雅俊、岡藤泰平、石原 量、麻生隆彬、感温性コア-コロナ型微粒子の形状がマクロファージによる貪食に与える影響、第 66 回高分子討論会(愛媛)、2017 年 9 月 20 日 ~ 9 月 22 日
4. 菊池明彦、小助川陽太、川瀬雅俊、石原 量、麻生隆彬、感温性ロッド状微粒子の調製と細胞取り込み制御、第 39 回日本バイオマテリアル学会大会(東京)、2017 年 11 月 20 日 ~ 11 月 21 日
5. 菊池明彦、バイオマテリアル応用を目指した刺激応答性微粒子の調製、第 29 回散乱研究会(東京)、2017 年 11 月 22 日(招待講演)
6. 小助川 陽太、川瀬 雅俊、麻生隆彬、石原量、菊池明彦、コアのガラス転移温度を制御した温度応答性コア-コロナ型ロッド状微粒子の調製及び細胞取り込み評価、第 27 回日本 MRS 年次大会(横浜)、2017 年 12 月 5 日 ~ 12 月 7 日
7. 川瀬 雅俊、小助川 陽太、米津健太、麻生隆彬、石原量、菊池明彦、変形可能なコア-コロナ型温度応答性微粒子の調製と物性解析、第 27 回日本 MRS 年次大会(横浜) 2017 年 12 月 5 日 ~ 12 月 7 日
8. 小助川陽太 川瀬雅俊 麻生隆彬 石原 量 菊池明彦、コアのガラス転移温度を制御した変形可能な温度応答性コア-コロナ型微粒子の調製及び細胞取り込み挙動、第 67 回高分子学会年次大会(名古屋) 2018 年 5 月 23 日 ~ 5 月 25 日
9. 菊池明彦 小助川陽太 川瀬雅俊 小松周平 麻生隆彬 石原 量、薬物キャリアを指向した感温性微粒子の表面物性と形状が細胞取り込みに与える影響、第 34 回日本 DDS 学会学術集会(長崎) 2018 年 6 月 21 日 ~ 6 月 22 日
10. A. Kikuchi, Y. Kosukegawa, M.Kawase, T.-A. Asoh, R. Ishihara, Influence of particle shapes and surface property on phagocytic activity of macrophages, 第 6 7 回高分子討論会(北海道)、2018 年 9 月 12 日 ~ 9 月 14 日(英語セッション発表)
11. 菊池明彦、感温性微粒子の調製と診断材料としての応用、第 2 回東京理科大学-横浜市立大学合同シンポジウム(横浜) 2018 年 11 月 23 日(依頼講演)
12. 菊池明彦 小助川陽太 川瀬雅俊 小松周平 麻生隆彬 石原 量、親水性表面を有する感温性ロッド状微粒子の細胞内取り込み制御、第 4 回東京理科大学総合研究院再生医療と DDS の融合研究部門シンポジウム 第 16 回東京理科大学 DDS 研究センターシンポジウム(東京) 2018 年 12 月 12 日
13. M. Kawase, S. Komatsu, T.-A. Asoh, A. Kikuchi, Effects of shape and surface properties of thermoresponsive core-corona type particles on phagocytosis by macrophages, 第 68 回高分子学会年次大会(大阪) 2019 年 5 月 29 日 ~ 5 月 31 日(英語セッション発表)
14. 菊池明彦、川瀬雅俊、小松周平、麻生隆彬、形状と表面物性変化を利用した温度応答性コア-コロナ型微粒子の細胞への取り込み挙動、第 35 回日本 DDS 学会学術集会(横浜) 2019 年 7 月 4 日 ~ 7 月 5 日(発表予定)

国際学会(9 件)

1. A. Kikuchi, T. Suzuki, T. Matsuyama, R. Ishihara, T.-A. Asoh, Effect of Shape and Surface Property of Thermoresponsive Core-corona Type Nanoparticles on Phagocytosis, Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition 2016 (USA) 2016 年 7 月 17 日 ~ 7 月 20 日
2. A. Kikuchi, T. Suzuki, T. Matsuyama, R. Ishihara, T.A. Asoh, Preparation of thermoresponsive transformable nanoparticles and their interaction with cells, 2nd International Symposium on Nanoarchitectonics for Mechanobiology (Tsukuba, Japan), 2016 年 7 月 27 日 ~ 7 月 28 日
3. A. Kikuchi, T. Matsuyama, T. Suzuki, T. Yamada, R. Ishihara, T.-A. Asoh, Thermoresponsive core-corona type nanoparticles for diagnosis and controlled phagocytosis, 3rd International Conference on Biomaterials Science in Tokyo (ICBS2016) (東京), (2016 年 11 月 28 日 ~ 11 月 30 日(招待))
4. A. Kikuchi, T. Suzuki, T. Matsuyama, R. Ishihara, T. Asoh, Transformable thermoresponsive polymer particles for regulated cellular interaction, The 11th SPSJ International Polymer Conference(IPC2016) (福岡), 2016 年 12 月 13 日 ~ 12 月 16 日
5. A. Kikuchi, M. Kawase, S. Okafuji, R. Ishihara, T.-A. Asoh, Thermoresponsive core-corona type nanoparticles for regulated cellular interaction, 2017 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (USA), 2017 年 7 月 16 日 ~ 7 月 19 日
6. A. Kikuchi, T. Suzuki, T. Matsuyama, M. Kawase, S. Okafuji, R. Ishihara, T.-A. Asoh, Controlled phagocytosis of thermoresponsive core-corona type nanoparticles, International Union of Materials Research Societies-The 15th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017) (Kyoto, ), 2017 年 8 月 28 日 ~ 8 月 30 日(招待)
7. A. Kikuchi, Thermoresponsive and Transformable Core-corona Type Nanoparticles for Controlled Cellular Uptake, 3rd International BioMedical Interface Symposium (Okinawa), 2018 年 3 月 10 日 ~ 3 月 11 日(招待)
8. A. Kikuchi, Y. Kosukegawa, M. Kawase, S. Komatsu, R. Ishihara, T.-A. Asoh, Controlled Phagocytosis Of Relatively Hydrophilic Core-corona Type Spherical- Or Rod-shaped Particles, 2018 Controlled Release

Society Annual Meeting & Exposition (USA), 2018年 7月 22日 ~ 7月 24日

9. A. Kikuchi, Y. Kosukegawa, S. Komatsu, M. Kawase, T.-A. Asoh, R. Ishihara, Thermoresponsive transformable core-corona type particles for controlled cellular uptake, The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC 2018) (Hiroshima, Japan), 2018年 12月 5日 ~ 12月 7日

〔図書〕(計 2件)

1. 藤本啓二、菊池明彦、他 40名、共著、高分子微粒子ハンドブック、シーエムシー出版(東京)、2017 p.200-208, 全 316 ページ
2. 宮田隆志、菊池明彦、他 156名、共著、刺激応答性高分子ハンドブック、NTS(東京)、2018 p. 414-419 ページ(全 806 ページ)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名: 川瀬 雅俊

ローマ字氏名: KAWASE, Masatoshi

研究協力者氏名: 小助川 陽太

ローマ字氏名: KOSUKEGAWA, Yota

研究協力者氏名: 小松 周平

ローマ字氏名: KOMATSU, Syuuhei

研究協力者氏名: 麻生 隆彬

ローマ字氏名: ASOH, Taka-Aki

研究協力者氏名: 石原 量

ローマ字氏名: ISHIHARA, Ryo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。