

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19700407  
 研究課題名（和文） 表面機能性を有する新規温度応答性ナノミセルの分子設計と薬物キャリアへの応用  
 研究課題名（英文） Newly molecular design of outermost surface functionalized thermoresponsive nano-micelles for drug carrier systems  
 研究代表者  
 中山 正道（NAKAYAMA MASAMICHI）  
 東京女子医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：00338980

研究成果の概要：分子量制御した温度応答性高分子鎖と疎水性高分子鎖からなるブロックコポリマーを合成し、種々の官能基を温度応答性高分子鎖末端に導入することで、表面機能型温度応答性高分子ミセルを作製した。ミセル表面に蛍光基を導入することにより、ミセルの相転移温度以上で細胞内への移行が著しく増大することを明らかにした。また、スルホンアミド誘導体を導入することで、生体内の低 pH 環境に応答して相転移を引き起こす薬物キャリアを構築した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	420,000	3,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：高分子ミセル, 薬物伝達システム, RAFT 重合, 薬物キャリア, 温度応答性, 表面機能化, ポリ(*N*-イソプロピルアクリルアミド)

## 1. 研究開始当初の背景

高分子ミセルは、両親媒性のブロックコポリマーから形成されるナノ会合体である。薬物コンテナとして機能する疎水性内核を親水性の外殻が取り囲んだ二層構造からなり、単分散度の高いきわめて安定な構造を持つことから、血中滞留型の薬物キャリアとして注目されている。最近では、ミセル表面にペプチドや糖類などの機能性部位を導入したアクティブターゲティング型高分子ミセルが報告されてきている。このような機能性ミセルを作製する上で、分子量制御されたブ

ックコポリマーの合成と親水性高分子鎖末端側への機能性部位の導入はきわめて重要なファクターである。しかしながら、これまでラジカル重合性モノマーから分子量制御されたブロックコポリマーを合成し、これらの末端に機能性基を導入することは容易ではなかった。

本研究代表者は下限臨界溶液温度(LCST)を境に親水性-疎水性と変化する温度応答性高分子 Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PIPAAm) の共重合体をミセルの外殻成分とした温度応答性高分子ミセルを分子設計し、

効率的な薬物治療に関する検討を行ってきた。これまでに、ミセルの LCST 以上で内包した疎水性抗がん剤を温度変化のみで迅速に放出することに成功し、局所加温と併用した新しいがん化学療法を提案した。その研究のなかで、分子量制御されたブロックコポリマーが容易に合成可能なリビングラジカル重合法の一つである可逆的付加-開裂連鎖移動型 (RAFT) 重合に着目し、高分子ミセルを構成する分子量制御された温度応答性ブロックコポリマー末端に種々の官能基を導入する技術を確認した。この際、高分子ミセル表面に存在する官能基の疎水性を高めることで、ミセルの LCST を低温側にシフトできることを見いだした。興味深いことに、疎水性と親水性の異なる官能基をそれぞれ温度応答鎖末端にもつブロックコポリマーを任意の比率で混合して作製したミセルでは、表面官能基の比率で相転移温度を自由に調整できることが明らかとなった。この結果は、温度応答性高分子ミセルの表面に機能性官能基を導入することにより、標的指向性をもつアクティブターゲティング型薬物キャリアを作製できるだけでなく、ナノミセル自体の性質を劇的に変化できることを示唆している。この背景を受け、本研究では、機能性末端をもつ温度応答性ブロックコポリマーからなる表面機能型温度応答性高分子ミセルの分子設計とその機能解析に重点を置き研究を推進した。

## 2. 研究の目的

表面機能型の温度応答性高分子ミセルとして以下の系を提案する。

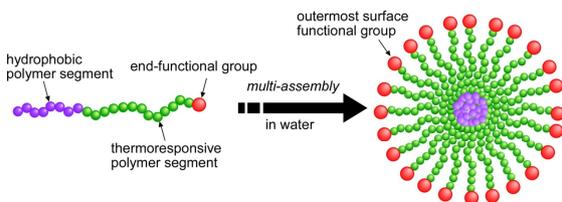


図1 表面機能型温度応答性高分子ミセル

pH 応答型表面ミセル: ミセル表面の官能基を刺激により親水性-疎水性変化させることで、温度応答性高分子ミセルの相転移温度を制御する技術を確認した。表面に導入する官能基としては、 $pK_a$  を 6.2 にもつスルホンアミド誘導体を用い、細胞内リソソームや固形がん近傍の低 pH 環境 (pH 5~6) に応答して相転移を引き起こし、薬物の放出速度を促進する高分子ミセルを設計する。pH 変化に対するミセルの表面電位と相転移温度との関係性を評価し、インテリジェント薬物キャリアとしての可能性を考察する。

蛍光標識型応答型表面ミセル: 組織・臓器あるいは細胞内における高分子ミセルの分布を可視化することで、ミセルの体内分布や細胞内移行のメカニズムを解析する。具体的な研究方針としては、RAFT 重合により疎水性高分子鎖と温度応答性高分子鎖が連結した分子量制御されたブロックコポリマーを合成する。このとき、得られるミセルの LCST が 40 付近 (血中循環中に相転移しない温度) になるように IPAAm に親水性モノマーである *N,N*-dimethylacrylamide を共重合する。機能性部位のポリマー末端への導入は、ポリマー末端の RAFT 剤由来の官能基を分解することで生成するチオール基を利用する。得られたミセルでは、粒径分布、表面電位、相転移温度、薬物内包効率について評価する。相転移温度を境とする温度変化における細胞内の取り込み速度の違いについて経時的にモニタリングし、細胞内分布と細胞内移行のメカニズムを解析する。

高分子ミセルはブロックコポリマーからなる自己会合体であり、さまざまな機能性官能基を導入したブロックコポリマーをミセル作製時に混合するだけで、表面多機能型の高分子ミセルを作製することが可能となる。将来的には、機能を付加した各種ポリマーから多機能型温度応答性高分子ミセルの創製を目指す。

## 3. 研究の方法

ブロックコポリマーの合成と末端への機能性官能基の導入: 本研究では、分子量制御されたブロックコポリマーを RAFT 重合により合成した。まず、疎水性高分子鎖として、Poly(*n*-butyl methacrylate) (PBMA) を RAFT 剤存在下で合成した。次に PBMA をマクロ RAFT 剤とすることで、温度応答性高分子鎖である Poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-dimethylacrylamide) (P(IPAAm-*co*-DMAAm)) を連結したブロックコポリマーを合成した。一方、RAFT 重合をより、水酸基を持つ連鎖移動剤存在下、P(IPAAm-*co*-DMAAm) を合成し、1 位に水酸基、2 位にジチオエステル基を有する温度応答性高分子を合成した。このポリマーの末端のヒドロキシル基から D,L-lactide を開環重合した。得られたポリマーは、<sup>1</sup>H-NMR とゲル排除クロマトグラフィーにより、化学組成と分子量分布を決定した。

ブロックコポリマー末端のジチオベンジル基を処理することで生成するチオールを介して様々な機能性官能基を導入した。pH 応答性部位の導入には、二重結合をもつアクリロイルスルホンアミド誘導体を合成し、ポリマー末端のチオール基に付加反応した。また、蛍光基の末端導入では、Oregon Green488 のマレイミド誘導体を末端チオール基と反応した。

**高分子ミセルの作製とキャラクタリゼーション**：機能性表面をもつ温度応答性高分子ミセルに関して、それぞれ表面電位、粒径分布、臨界ミセル濃度、相転移温度についてキャラクタリゼーションをおこなった。

**温度変化にともなう細胞相互作用の解析**：ミセルを含む培養液でウシ血管内皮細胞を 37 および 42 でインキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) およびフローサイトメトリーを用いて温度変化によるミセルの細胞内移行の違いを評価した。

**疎水性抗がん剤の内包実験**：高分子ミセル溶液に対してパクリタキセル (PTX) のエタノール溶液 (ミセル水溶液に対して 1/10 量) を加え、純水に対する透析によりエタノールを除去し、PTX 内包高分子ミセル溶液を得た。動的光散乱法により高分子ミセルの粒径分布を測定した。また、逆相高速液体クロマトグラフィーにより PTX の内包効率を評価した。

#### 4. 研究成果 pH 応答型表面ミセル

Poly(benzylmethacrylate) (PBzMA) と (P(IPAAm-co-DMAAm)) が連結したブロックコポリマーを RAFT 重合により合成した (数平均分子量 9000, monomer units: IPAAm/DMAAm/BzMA=21/12/13)。得られたブロックコポリマーの温度応答性高分子鎖末端のジチオベンゾエート基をアミノ分解でチオール基に置換した後、pH により親水性/疎水性が変化する acryloyl sulfadimethoxine (SDM, pKa=6.2) 基をマイケル付加反応により導入した。

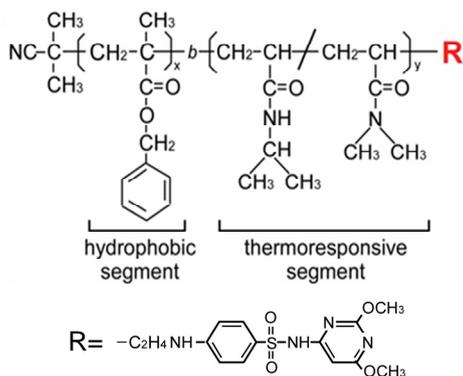


図2 末端Sulfadimethoxine基を有する温度応答性ブロックコポリマーの化学構造

SDM 末端を有するブロックコポリマーを用いて作製した高分子ミセルは約 20nm の単分散な粒径分布を示した。各 pH におけるミセルの表面電位の違いを検討したところ、低 pH 側になるにしたがい、表面電位が消失していくことが明らかとなった。この結果は、ミセル

表面の SDM 基がプロトン化することにより、アニオン性から非荷電になったためであると考えられる。次に pH 変化 (pH 8.5-5.0) にともなうミセルの温度応答性挙動の違いを検討した。pH 応答性部位である SDM 基を表面に有するミセルでは、低 pH 側になるにしたがい、ミセルの LCST が約 39 から約 23 の範囲で低温側に大きくシフトすることが明らかとなった。これは低 pH になることで表面に存在する SDM 基がプロトン化することにより荷電が消失し、疎水性になることでミセル外殻を構成する IPAAm 誘導体の脱水和を著しく促進したためであると考えられる。以上の結果より、ミセル表面に pH 応答性基を導入することで、pH により温度応答性挙動を制御するマルチシグナル応答型の高分子ミセルを構築することが可能となった。

#### 温度変化にともなう細胞相互作用の解析

RAFT 重合をより、水酸基を持つ RAFT 剤存在下、P(IPAAm-co-DMAAm) を合成し、1 位に水酸基、2 位にジチオエステル基を有する温度応答性高分子を合成した。このポリマーの末端のヒドロキシル基から D,L-lactide を開環重合した数平均分子量 11300, monomer units: IPAAm/DMAAm/LA=54/29/14)。

ブロックコポリマー末端のジチオベンジル基を処理することで生成するチオール基を介して蛍光基である Oregon Green488 を導入した。得られたブロックコポリマーより作製した高分子ミセルは、LCST を約 39.5 を持つことが明らかとなった。この高分子ミセルは、LCST よりも低温側では約 25nm の単分散な粒径分布を示したが、高温側では約 600nm の凝集体を形成することが分かった。

温度応答性高分子ミセル (LCST=39.5) を含む培養液でウシ血管内皮細胞を 37 および 42 でインキュベートし、共焦点レーザー顕微鏡 (CLMS) およびフローサイトメトリーを用いて温度変化によるミセルの細胞内移行の違いを評価した。CLMS 観察では、ミセルの LCST より低温の 37 では蛍光標識ミセル由来の蛍光がほとんど観察されなかった。一方、LCST 以上の 42 では核の周辺部を中心に細胞全体的に粒子状の蛍光が観察された。

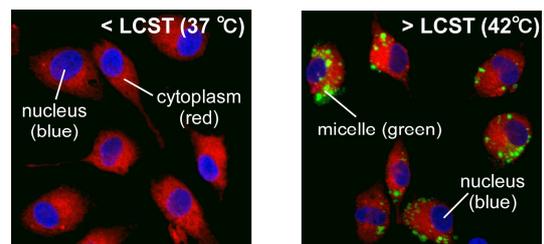


図3 温度変化にともなうミセルの細胞内分布の違い

フローサイトメトリー測定による細胞内取り込み量を検討した結果、LCST より低温 (37 °C) では顕著な細胞内取り込みは観察されなかった。一方、LCST 以上の温度 (42 °C) では時間経過と共にミセルの取り込み量が増加し、約 6 時間で飽和することが明らかとなった。温度変化に応じて取り込み量が異なる要因として、LCST 以下の温度では外殻が親水性であるために細胞表面との相互作用が弱く、取り込みが抑制される。これに対して LCST 以上の温度では、温度応答鎖が相転移に伴い疎水性に変化することにより細胞表面への接着が促進し、取り込み量が増大するためであると考察される。以上の結果より、温度変化によるミセルの細胞内移行の違いを利用することで、薬物や遺伝子の細胞内導入を温度変化で制御できる可能性が示唆された。

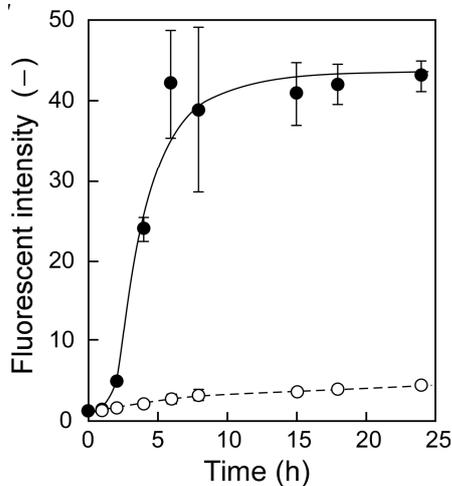


図 4 温度変化にともなうミセルの細胞内取り込み量の違い

#### 疎水性抗がん剤の内包実験：

PTX 未内包ミセルおよび PTX 内包ミセル ([PTX]/[polymer] = 13.5 wt%) の粒径は、両者において単分散であり、PTX 内包後も、均一な粒径の粒子が得られたと考えられる。PTX 未内包の高分子ミセルでは、ミセルの平均粒径は約 18nm であったのに対し、PTX 内包ミセルでは、約 21~25nm であった。これは、高分子ミセルの疎水性内核に薬物が内包されたことによって、ミセルの内径が増大し、粒径が大きくなったと考察される。また、仕込みのポリマー重量に対する PTX 重量が 20wt% の高分子ミセル溶液では、20wt% 以下の高分子ミセルと比較して、粒径が増大している。これは、18.4wt% の PTX を含む高分子ミセル溶液においては、薬物内包後のミセルの安定性が保持されていないためと考えられる。これらのことから、仕込みのポリマー重量に対する PTX 重量が 15wt% 以下が最適であると考えられる。

疎水性薬物である PTX の水に対する溶解度

は約 0.3 μg/mL である。今回、高分子ミセル溶液を用いることで、450 μg/mL 濃度の PTX の可溶化に成功した。これは PTX の水溶解性の 1500 倍の PTX を可水溶化していることを示唆している。以上の結果より、高分子ミセル溶液では、疎水性薬物パクリタキセルをミセルに内包することで、溶解性を飛躍的に向上できることが明らかになった。

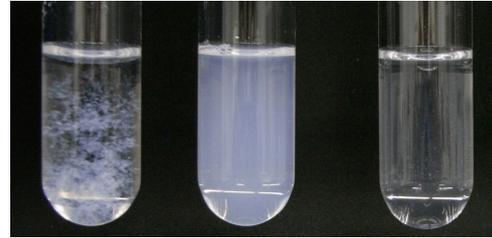


図 5 高分子ミセルによる PTX の可水溶性の向上、(左) PTX in 10%エタノール溶液 (中央) PTX in linear P(IPAAm-co-DMAAm)溶液、(右) PTX in P(IPAAm-co-DMAAm)/PLA ミセル水溶液

#### 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4件)

Jun Akimoto, Masamichi Nakayama, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, "Temperature-Induced Intracellular Uptake of Thermoresponsive Polymeric Micelles", *Biomacromolecules*, in press, 査読有

Jun Akimoto, Masamichi Nakayama, Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, "Molecular Design of Outermost Surface Functionalized Thermoresponsive Polymeric Micelles with Biodegradable Cores", *J. Polym. Sci., Part A, Polym. Chem.*, 46, 7127-7137, 2008, 査読有

Masamichi Nakayama, Teruo Okano, "Unique Thermoresponsive Polymeric Micelle Behavior via Cooperative Polymer Corona Phase Transitions", *Macromolecules*, 41, 504-507, 2008, 査読有

Masamichi Nakayama, Joo Eun Chung, Takanari Miyazaki, Masayuki Yokoyama, Teruo Okano, "Thermal modulation of intracellular drug distribution using thermoresponsive polymeric micelles", *Reactive & Functional Polymers*, 67, 1398-1407, 2007, 査読有

〔学会発表〕(計 2件)

Masamichi Nakayama, Yayoi Kawahara,  
Hideko Kanazawa, Teruo Okano,  
“Molecular Design of  
Thermoresponsive Polymeric Micelles  
with Surface pH-Responsive  
Sulfonamide Moieties”, 14th  
International Symposium on Recent  
Advances in Drug Delivery Systems,  
2009.2.17, ソルトレイクシティ (USA)  
Masamichi Nakayama, Jun Akimoto,  
Kiyotaka Sakai, Teruo Okano, “Surface  
Functionalization and  
Characterization of Thermoresponsive  
Polymeric Micelles”, 1st Asian  
Biomaterials Congress, 2007.12.6, 茨  
城県つくば市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 正道 (NAKAYAMA MASAMICHI)  
東京女子医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00338980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし