

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25288101

研究課題名(和文) 光熱変換分子のフラーレンを内包した感温性コンプレックスのがん治療への応用

研究課題名(英文) Application of thermo-sensitive complex containing photothermal conversion molecule, fullerene to cancer therapy

研究代表者

遊佐 真一 (Yusa, Shin-ichi)

兵庫県立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00301432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：光熱変換効果のあるフラーレン(C60)を水に溶解する方法を開発した。感温性ジブロック共重合体とC60でコンプレックス形成させ、C60を可溶化した。コンプレックスはコアにC60を含み、シェルは感温性ポリマーで覆われている。加温によるコンプレックス間の凝集でサイズ増加が観測された。将来的には、体内にコンプレックスを導入し、癌周辺の加温で、C60を集積化して光照射による発熱で癌にダメージを与える。

研究成果の概要(英文)：We have developed a method to dissolve hydrophobic fullerene (C60) which shows photothermal conversion effect in water. Thermo-responsive diblock copolymers which were prepared via a controlled radical polymerization method were used to dissolve C60 in water by complex formation of the diblock copolymer with C60. The C60 complex was consisted of C60-containing core and thermo-responsive shells. The size of the C60 complex increased due to inter-complexes aggregation with increasing temperature. In the future when the C60 complex is injected into the body, the complex may accumulate at tumor site by warming around the affected part. If light is irradiated to the affected part, the temperature of C60 increased to damage tumor site.

研究分野：高分子合成

キーワード：高分子 自己組織化 ナノチューブ・フラーレン 癌 高分子構造・物性 近赤外線 ドラッグデリバリーシステム 生体適合性高分子

1. 研究開始当初の背景

近年、光熱変換材料としてカーボンナノチューブ(CNT)や金ナノロッドに関する研究が報告されている。例えば棒状の金ナノ粒子である金ナノロッドは、通常のコロイド粒子に比べて表面プラズモン吸収が近赤外領域まで長波長側にシフトするため、近赤外光を効率良く熱に変換できる。多層CNTの場合、1064 nm (53 mW) の近赤外光を照射すると10秒以内に90℃近くまで温度が上昇することが報告されている。

近赤外光は水分子やタンパク質などの生体組織の吸収が極めて低いため、組織透過性が高く「生体の窓」と呼ばれている。この近赤外光を用いたイメージングや、近赤外光を熱に変換する光熱変換効果で悪性腫瘍などの病変組織周辺にのみ、熱によるダメージを与えて標的とする組織を破壊する副作用の少ない治療法が提案されている。しかし金ナノロッドやCNTによる光熱変換効果でがん治療を行う場合、そのサイズと毒性に問題がある。CNTは直径数nmで長さが数μmにおよぶ。金ナノロッドは直径が10nmで長さが40~100nm程度で、細胞への取り込みは困難である。さらにCNTはそれ自体の高い毒性について懸念されている。金ナノロッドは作製時に使用するカチオン性界面活性剤の毒性が指摘されている。一方、フルレレン(C₆₀)はサイズが非常に小さく、強い毒性は報告されていない。

申請者は未修飾のC₆₀および比較のための多層CNTと、近赤外領域に吸収を持たないポリフッ化ビニリデン(PVDF)の粉末に直接808 nm (1 W/cm²) の近赤外光を照射したときの照射時間と温度の関係を調べた。多層CNTの場合、近赤外光照射から5秒以内にサーモグラフィの測定限界の500℃を超えた。C₆₀の場合、10秒間以内に400℃以上に達することを確認した。比較のPVDFに近赤外光を照射しても全く温度は変化しなかった。したがって、C₆₀には潜在的に近赤外光による高効率な光熱変換効果があることを既に見出した。

C₆₀は疎水性が高く、全く水に溶解しないため化学修飾による水溶性化合物への誘導体化、γ-シクロデキストリンなどの水溶性化合物との錯体形成、水溶性のポリ(N-ビニルピロリドン)(PNVP)とのコンプレックス形成などの方法で水に可溶化する必要がある。申請者はC₆₀に対する親和性の高いPNVPと、感温性のポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)(PNIPAM)による二重親水性ジブロック共重合体を使用することで、C₆₀を水に可溶化するという着想に至った。PNIPAMは室温で水に溶解するが、温度を上昇させると、ある温度で脱水和が起こり水に不溶となる。この温度は下限臨界溶液温度(LCST)と呼ばれている。そこで本研究では感温性ジブロック共重合体を用いてC₆₀の水への可溶化と近赤外光による光熱変換を利用して、腫瘍細胞への集積・取り込みの促進および治療への応用を試みるという着想に至った。

胞への集積・取り込みの促進および治療への応用を試みるという着想に至った。

2. 研究の目的

C₆₀は近赤外光による光熱変換効果を期待できるが水に不溶である。そこで感温性ジブロック共重合体とコンプレックスを形成することで水へ可溶化する(図1)。コンプレックスの表面は感温性のPNIPAMシェルで覆われると予想されるので、温度をLCST以上に昇温すると、濃度が高い場合はコンプレックス間の会合でサイズの増加が起こると期待できる。

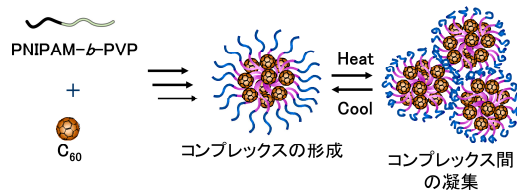


図1 C₆₀と感温性ジブロック共重合体によるコンプレックス形成と温度応答の概念図

体内にコンプレックスを導入すると、体内循環で希釈されて腫瘍血管から腫瘍組織に取り込まれる。その後、患部に微弱な近赤外光を照射するとC₆₀の光熱変換による温度上昇に伴い、希釈状態のコンプレックス表面は疎水性に変化して組織との親和性が高くなる。したがってC₆₀内包コンプレックスは患部周辺に集積化して腫瘍細胞内に取り込まれやすくなると予想される。患部にC₆₀を集積化した後、高強度の近赤外光を照射して熱を発生させ、選択的に腫瘍組織のみにダメージを与えられる。そこで本研究では、より多くのC₆₀を水に可溶化できるジブロック共重合体を設計する。さらにコンプレックスのサイズおよびLCSTを最適に調節するため、精密ラジカル重合で組成・分子量の制御を行う。

本研究では未修飾のC₆₀と感温性ジブロック共重合体のコンプレックス形成で、C₆₀を水に可溶化する。患部周辺の加温または微弱な近赤外光照射による感温性コンプレックス表面の極性の変化により、標的治療の効果を大きく改善できると期待される。このような感温性のC₆₀内包コンプレックスの光熱変換効果による患部への集積化およびがん治療を行った報告例は無い。近赤外光を使用するので、比較的深層部の腫瘍組織にもダメージを与えられる。本研究成果により革新的ながん治療システムの創出が期待される。

3. 研究の方法

親水性のPNVPは生体適合性でC₆₀との親和性が高いことが知られている。しかしモノマーのNVPは非共役であるため通常の制御ラジカル重合法では重合の制御が困難で、ジブロック共重合体を合成できない。そこで本研究では有機テルル化合物を使用した制御ラ

ジカル重合法の TERP (organotellurium-mediated living radical polymerization) で重合することで図 2 に示す感温性の PNIPAM と PNVP によるジブロック共重合体を合成する。

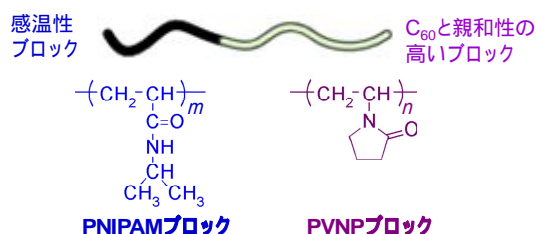


図 2 感温性ジブロック共重合体の化学構造

本申請者は既に連携研究者の山子茂教授(京大化研)と共同で TERP を使用した PNVP の重合制御と、ブロック共重合体の合成が可能であることを報告している。ポリマーの構造と組成の確認を赤外および NMR 測定で行う。GPC で分子量と分子量分布を調べる。また C_{60} を可溶化する感温性ジブロック共重合体の構造に関しては、特に次の 3 つの項目を重点的に検討する。

- i) C_{60} の水に対する可溶化量
- ii) コンプレックスのサイズ
- iii) LCST の制御

4. 研究成果

水溶性で生体適合性の非共役モノマーである NVP と感温性で共役モノマーの NIPAM からなるジブロック共重合体 (PNVP-*b*-PNIPAM、図 2) を TERP により合成した。このような構造の制御された、共役・非共役モノマーからなるジブロック共重合体を合成できる方法は TERP しかない。比較のために可逆的付加-開裂連鎖移動 (RAFT) 型制御ラジカル重合法でも NVP の重合を行ったが、分子量分布は TERP で合成したものよりも広いことが確認できた。TERP を用いることで初めて PNVP-*b*-PNIPAM を合成できた。

i) C_{60} の水に対する可溶化量

これまでの報告では、水に対する C_{60} の可溶化量を最大にするためのブロック共重合体のデザインに関する研究は十分ではなかったため、 C_{60} の水への可溶化量が最大となるように、PNVP と感温性ブロックの組成を調節したジブロック共重合体の合成を行った。水への C_{60} の可溶化量は UV-vis 吸収スペクトルで定量的に評価した。最適な PNVP ブロックの鎖長の感温性ジブロック共重合体を使用することで C_{60} を水に可溶化できることを確認した (図 3)。

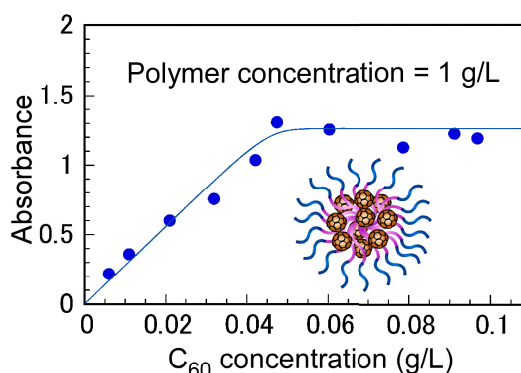


図 3 感温性ジブロック共重合体 (1 g/L) による C_{60} の水への可溶化: C_{60} の濃度と吸光度の関係 (約 0.05 g/L まで C_{60} を可溶化できている)

一定のポリマー濃度 (1 g/L) の場合、使用する C_{60} の量が多いほど、可溶化量も多くなったが、0.05 g/L 以上からは、使用する C_{60} の量を増加しても、可溶化量は飽和して変化しなくなった。

ii) コンプレックスのサイズ

固形腫瘍では腫瘍血管新生が誘導される反面リンパシステムが構築されない。腫瘍血管は未熟な血管内皮細胞から構築されるため血管透過性が亢進し、正常な血管において、通常は漏出しにくい粒径が 100 nm 程度の高分子物質でも、腫瘍血管では漏出しやすい。さらに漏出した高分子物質は漏出箇所停滞しやすい。このような現象は EPR (enhanced permeability and retention) 効果として知られている。そこでジブロック共重合体の鎖長のコントロールにより、コンプレックスの直径が 100 nm 程度になるように調節すれば、コンプレックスは透過性が異常に亢進した腫瘍の毛細血管系を通じて腫瘍組織の間質腔にのみ侵入するので、パッシブターゲティングによる選択的集積化が期待される。

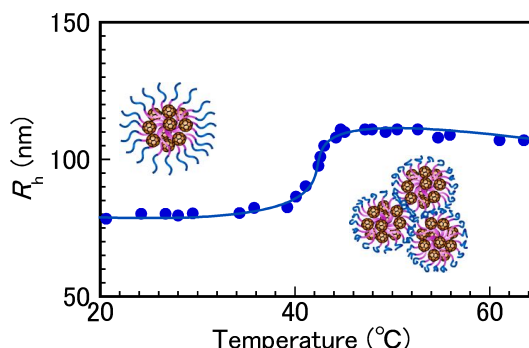


図 4 C_{60} コンプレックスの流体力学的半径 (R_h) の温度依存性

本研究では制御ラジカル重合法の TERP で感温性ジブロック共重合体を合成したので、目的に合わせて分子量を制御することで

コンプレックスの粒径を自在に調節可能である。ポリマーの鎖長の最適化を行った結果を図4に示す。体温付近の37℃で、 R_h は約75 nmで、加温して44℃付近になると R_h は約120 nmに増加した。この温度ではコンプレックス間の凝集は起こっていないが40℃付近から粒径の増加が観測されたので、コンプレックス間の凝集が起こりはじめたと考えられる。

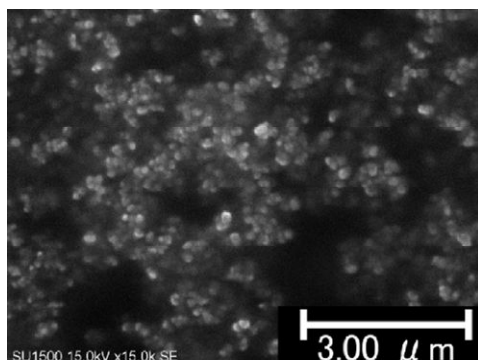


図5 C₆₀コンプレックスのSEM観察

図5に室温で調製したC₆₀を内包した感温性コンプレックスの走査電子顕微鏡(SEM)観察の結果を示す。直径約140 nmの球状の粒子が観測された。この粒径は、体温付近の37℃での R_h は約70 nmでSEMの結果と一致した。

iii) LCSTの制御

図4からコンプレックスの温度応答が観測される温度範囲は、約40℃付近なので、体内に導入して加温することで、粒径が増加して、フラレンが目的患部のみに集積化すると期待される。

上記実験は、実験計画通りに進めることができた。さらに実験を進めると、PNVPだけでなく、親水性の生体適合性高分子であるポリ(2-メタクリロイロキシエチルホスホリルコリン)(PMPC)にも、疎水性のC₆₀を水に可溶化できる能力があることを見出した。PMPCは細胞膜を形成するリン脂質の親水性部位であるホスホリルコリン基を側鎖結合したメタクリレート型ポリマーである。非常に親水性の高いポリマーであることが知られているが、申請者等は偶然にPMPCがC₆₀を水に可溶化できることを発見した。一般的にPMPCは、PNVPよりもタンパク吸着を抑制可能であり、共役モノマーから合成されるため、容易に重合できる。この発見は、今後本研究をさらに発展・展開させるのに大いに役立つと期待される。

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83件)

C. E. McNamee, S. Fujii, S. Yusa, M. Kappl, Physical properties of mixed Langmuir monolayers of polystyrene particles with poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hair and a poly(2-hydroxyethyl methacrylate) polymer at an air/water interface, *Soft Matter*, 査読有, 13, 2017, 1583-1593

DOI: 10.1039/c6sm02529c

S. Fujii, S. Yusa, Y. Nakamura, Stimuli-responsive liquid marbles: Controlling structure, shape, stability, and motion, *Advanced Functional Materials*, 査読有, 26, 2016, 7206-7223

DOI: 10.1002/adfm.201603223

P. Parekh, S. Ohno, S. Yusa, E. V. Lage, M. Casas, I. Sández-Macho, V. K. Aswal, P. Bahadur, Surface and Aggregation Behavior of Pentablock Copolymer PNIPAM₇-F127-PNIPAM₇ in Aqueous Solutions, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, 120, 2016, 7569-7578

DOI: 10.1021/acs.jpcc.6b03948

A Fujihara, K. Itsuki, N. Shimada, A. Maruyama, N. Sagawa, T. Shikata, S. Yusa, Preparation of Ureido Group Bearing Polymers and Their Upper Critical Solution Temperature in Water, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, 査読有, 54, 2016, 2845-2854

DOI: 10.1002/pola.28183

S. Ohno, K. Ishihara, S. Yusa, Formation of Polyion Complex (PIC) Micelles and Vesicles with Anionic pH-Responsive Unimer Micelles and Cationic Diblock Copolymers in Water, *Langmuir*, 査読有, 32, 2016, 3945-3953

DOI: 10.1021/acs.langmuir.6b00637

R. Takahashi, T. Sato, K. Terao, S. Yusa, Reversible Vesicle-Spherical Micelle Transition in a Polyion Complex Micellar System Induced by Changing the Mixing Ratio of Copolymer Components, *Macromolecules*, 査読有, 49, 2016, 3091-3099

DOI: 10.1021/acs.macromol.6b00308

A. Iwanowska, S. Yusa, M. Nowakowska, K. Szczubiałka, Selective adsorption of modified nucleoside cancer biomarkers by hybrid molecularly imprinted adsorbents, *Journal of separation science*, 査読有, 39, 2016,

3072-3080

DOI: 10.1002/jssc.201600132

B. Kalaska, K. Kaminski, J. Miklosz, S. Yusa, E. Sokolowska, A. Blazejczyk, J. Wietrzyk, I. Kasacka, K. Szczubialka, D. Pawlak, M. Nowakowska, A. Mogielnicki, Heparin-binding copolymer reverses effects of unfractionated heparin, enoxaparin, and fondaparinux in rats and mice, *Translational Research*, 査読有, 177, 2016, 98-112. e10
DOI: org/10.1016/j.trsl.2016.06.009

T. Yazawa, T. Shojo, M. Asahara, S. Yusa, A. Mineshige, Y. Daiko, Analysis of Nanoporous Glass Surface Modified by Silane Coupling Reagents with Double SH Groups and Its In Situ Oxidation Targeting for Novel Proton-conducting Organic-Inorganic Nanohybrid, *Chem. Lett.*, 査読有, 45, 2016, 1099-1101
DOI: 10.1246/cl.160547

N. Nishizawa, S. Fujii, T. Kakuta, K. Tanaka, S. Yusa, Y. Chujo, Y. Nakamura, Polystyrene-polyhedral oligomeric silsesquioxane core-shell element-block polymer particles fabricated via heterocoagulation method, *Chem. Lett.*, 査読有, 45, 2016, 1168-1170
DOI: 10.1246/cl.160545

T. Ohata, K. Ishihara, Y. Iwasaki, A. Sangsuwan, S. Fujii, K. Sakurai, Y. Ohara, S. Yusa, Water-soluble complex formation of fullerenes with a biocompatible polymer, *Polym. J.*, 査読有, 48, 2016, 999-1005.
DOI: 10.1038/pj.2016.60

S. Yusa, S. Ohno, T. Honda, H. Imoto, Y. Nakao, K. Naka Y. Nakamura, S. Fujii, Synthesis of silsesquioxane-based element-block amphiphiles and their self-assembly in water, *RSC Adv.*, 査読有, 6, 2016, 73006-73012
DOI: 10.1039/c6ra13995g

C. V. Nguyen, S. Yusa, C. M. Phan, Stability of Aqueous Film with a Photo-Responsive Surfactant, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 査読有, 49, 2016, 714-719
DOI: 10.1252/jcej.15we290

Y. Arisaka, Y. Nishijima, S. Yusa, N.

Takeda, Photo-Induced In Situ Crosslinking of Polymer Brushes with Dimethyl Maleimide Moieties for Dynamically Stimulating Stem Cell Differentiation, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 査読有, 27, 2016, 1331-1340
DOI:
http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2016.1196531)

J. Xie, K. Nakai, S. Ohno, H. J. Butt, K. Koynov, S. Yusa, Fluorescence Correlation Spectroscopy Monitors the Hydrophobic Collapse of pH-Responsive Hairy Nanoparticles at the Individual Particle Level, *Macromolecules*, 査読有, 48, 2015, 7237-7244
DOI: 10.1021/acs.macromol.5b01435

R. Takahashi, T. Sato, K. Terao, S. Yusa, Intermolecular Interactions and Self-Assembly in Aqueous Solution of a Mixture of Anionic-Neutral and Cationic-Neutral Block Copolymers, *Macromolecules*, 査読有, 48, 2015, 7222-7229
DOI: 10.1021/acs.macromol.5b01368

R. Enomoto, M. Sato, S. Fujii, T. Hirai, A. Takahara, K. Ishihara, S. Yusa, Surface patterned graft copolymerization of hydrophilic monomers onto hydrophobic polymer film upon UV irradiation, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 査読有, 52, 2014, 2822-2829
DOI: 10.1002/pola.27308)

Y. Iwasaki, M. Sakiyama, S. Fujii, S. Yusa, Surface modification of mammalian cells with stimuli-responsive polymers, *Chem. Commun.*, 査読有, 49, 2013, 7824-7826.
DOI: 10.1039/C3CC44072A

[学会発表](計244件)

S. Yusa, Thermo-responsive Polyion Complex Micelles, Energy Materials Nanotechnology, EMN Croatia Meeting, Dubrovnik (Croatia), 4-7, May 2016, Oral, Invited lecture

S. Yusa, Water-soluble Thermo-Responsive Diblock Copolymer Prepared via Organotellurium-Mediated Controlled Radical Polymerization (TERP), International Nanomedicine

Conference, Hilton Mauritius Resorts & SPA, Flic-en-Flac, (Mauritius), 1-4, Aug. 2016, Oral, Invited lecture

S. Yusa, Water soluble-diblock copolymers prepared via organotellurium mediated radical polymerization (TERP), 8th International Workshop on Advanced Materials Science and Nanotechnology, IWAMSN 2016, Ha Long City (Vietnam), Nov. 8-12, 2016, Oral

S. Yusa, S. Ohno, and K. Ishihara, Polymer Micelles Formed from Oppositely Charged Anionic pH-responsive Unimer Micelles and Cationic Diblock Copolymers, 3rd International Conference on Biomaterials Science (ICBS2016) in Tokyo, Ito Hall at The University of Tokyo, Tokyo (Japan), November 28-30, 2016, Oral

遊佐 真一、大野 沙耶香、石原 一彦、pH 応答ユニマーミセルとジブロック共重合体によるポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルとベシクルの形成、第 65 回高分子討論会、神奈川大学 横浜キャンパス(神奈川)平成 28 年 9 月 14-16 日 (2016)、口頭

〔図書〕(計 4 件)

遊佐真一、高分子ミセルとドラッグデリバリーシステム (DDS) 構造制御による革新的ソフトマテリアル創成 ~ ブロックコポリマーを中心として ~、CSJ カレントレビュー、化学同人、2017 年出版予定

S. Yusa, Chapter 11 Stimuli-responsive Polymer Micelles, in Stimuli-Responsive Interfaces, T. Kawai, M. Hashizume (Eds.), pp 187-208, 2017, ISBN:978-981-10-2461-0

遊佐真一、第 3 章 pH 応答性ポリマーミセルを鋳型にした中空粒子の合成、中空粒子の合成と応用、監修:藤正督、2016、pp.21-29、シーエムシー出版

遊佐真一、第 4 章、pH 応答性を有するジブロック共重合体の会合によるミセル形成、界面活性剤の最新研究・素材開発と活用技術、監修:荒牧賢治、2016、pp. 28-34、シーエムシー出版

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 潤滑油添加剤および潤滑油組成物
発明者: 栗原和枝、山田真爾、遊佐真一
権利者: 国立大学法人東北大学
種類: 特許
番号: 特許願 2015-97708 号
出願年月日: 平成 28 年 12 月 15 日
国内外の別: 国内

名称: ポリ(2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン-b-2-ウレイドエチルメタクリレート)共重合体及びそれにより形成される高分子ミセル
発明者: 丸山厚、嶋田直彦、遊佐真一
権利者: 国立大学法人東京工業大学、公立大学法人兵庫県立大学
種類: 特許
番号: 特許願 2014-53966 号
出願年月日: 平成 26 年 3 月 17 日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.eng.u-hyogo.ac.jp/msc/yusa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

遊佐 真一 (YUSA, Shin-ichi)
兵庫県立大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 00301432

(2) 研究分担者

横山 昌幸 (YOKOYAMA, Masayuki)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20220577

白石 貢一 (SHIRAIISHI, Kouichi)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40426284

藤井 秀司 (FUJII, Syuji)
大阪工業大学・工学部・教授
研究者番号: 70434785

岩崎 泰彦 (IWASAKI, Yasuhiko)
関西大学・工学部・教授
研究者番号: 90280990

(3) 連携研究者

山子 茂 (YAMAGO, Shigeru)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号: 30222368

(4) 研究協力者

なし