

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K17912

研究課題名(和文)細胞内環境を認識する多刺激応答性ゲル微粒子によるナノトランスポーターの創製

研究課題名(英文)Preparation of multi stimuli-responsive gel particles as nano-transporter that recognize intercellular environment

研究代表者

河村 暁文(Kawamura, Akifumi)

関西大学・化学生命工学部・助教

研究者番号：50612579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内環境を認識して薬物を放出するナノトランスポーターの創製を目的として、酸性かつ還元環境において膨潤する二重刺激応答性ゲル微粒子を設計・合成した。得られたゲル微粒子は、酸性かつ還元環境において劇的に膨潤した。また、その細胞内動態を観察したところ、ゲル微粒子の細胞毒性は低く、エンドサイトーシス経路により細胞内に取り込まれることがわかった。さらにゲル微粒子内への抗がん剤やオリゴ核酸の内包プロトコルを確立し、ゲル微粒子からの薬物放出挙動を評価したところ、酸性かつ還元環境下において薬物の放出が促進されることがわかった。このような二重刺激応答性ゲル微粒子はナノトランスポーターとして有用である。

研究成果の概要(英文)：pH- and reducing environment-responsive gel particles were prepared by soap-free emulsion copolymerization of N, N-diethylaminoethyl methacrylate (DEAEMA), poly(ethylene glycol) dimethacrylate and cystamine bisacrylamide (CBA). The resulting gel particles were colloiddally stable and had diameters of approximately 200 nm. Under acidic conditions, the swelling ratio of the CBA-DEAEMA gel particles increased drastically in response to glutathione as a reducing agent. The drastic swelling of the gel particles under acidic and reducing environment is attributed to ionization of DEAEMA and dissociation of disulfide bonds of CBA that act as crosslinks. In addition, Dil, hydrophobic fluorescent dye, was successfully loaded into the CBA-DEAEMA gel particles. The Dil-loaded gel particles were taken up by L929 cells by endocytosis. In addition, the release of doxorubicin from gel particles were successfully increased with acidic and reducing environment.

研究分野：高分子化学

 キーワード：刺激応答性ゲル微粒子 テム 核酸デリバリー  
 pH応答性 還元環境応答性 ソープフリー乳化重合 ドラッグデリバリーシス  
 マイクロRNA干渉

### 1. 研究開始当初の背景

近年、20~22塩基のオリゴ核酸であるmiRNAは、さまざまな疾患によってその発現量に変化することから非常に注目を集めており、その発現量の定量や機能の阻害(サイレンシング)は、新たな疾患の診断や治療法として期待されている。例えば、ターゲットmiRNAの相補配列を有し、強固に二重鎖形成するアンチセンスロッド核酸(as-LNA)を細胞内に導入し、miRNAのサイレンシングにより疾患を治療する試みが始まっている。しかし、分子量の低いオリゴ核酸誘導体から形成されるas-LNAは、既存の遺伝子導入試薬であるカチオン性脂質やカチオン性高分子と安定に複合体を形成できず、効率的にこれらを細胞内へ導入することが困難である。そこで、簡便に合成でき、オリゴ核酸を安定して保持可能なナノトランスポーターが求められていた。

### 2. 研究の目的

抗がん剤やオリゴ核酸などの薬物を安定に保持可能なナノトランスポーターとして、ゲル微粒子に着目した。われわれはこれまでに、グルコースに応答して膨潤するグルコース応答性ゲル微粒子の合成に成功している。グルコース応答性ゲル微粒子は、動的架橋点として糖-レクチン複合体を有し、標的グルコースの存在下で糖-レクチン複合体架橋が解離しゲル微粒子が膨潤する。さらに、グルコース応答性ゲル微粒子は、側鎖に3級アミンを有するジエチルアミノエチルメタクリレート(DEAEMA)を主モノマーとして構成されており、ソープフリー乳化剤乳化重合により簡便に合成可能である。そこで本研究では、ナノトランスポーターとして、DEAEMAを主モノマーとしたゲル微粒子に、還元環境に応答して切断されるジスルフィド結合を動的架橋点として導入した二重刺激応答性ゲル微粒子の合成について検討した。また、このゲル微粒子の二重刺激応答挙動と細胞内動態ならびに薬物放出挙動について評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 二重刺激応答性ゲル微粒子の合成

モノマーとしてpHに応答する3級アミノ基を有するジエチルアミノエチルメタクリレート(DEAEMA)と還元環境で切断されるジスルフィド結合を有する架橋剤の*N,N'*-シスタミンビスアクリルアミド(CBA)、および架橋剤かつ分散安定剤のポリ(エチレングリコ

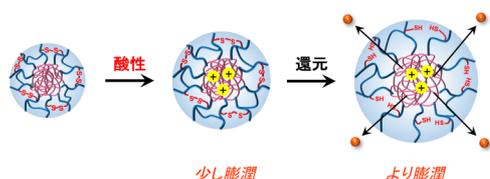


図1. 二重刺激応答製ゲル微粒子によるナノトランスポーターの模式図

ール)ジメタクリレート(PEGDMA)とを超純水中で超音波により分散させた。この分散液にレドックス開始剤である過硫酸アンモニウム(APS)と*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED)とを加え、窒素雰囲気下、50℃で6時間ソープフリー乳化重合させ、CBA-DEAEMAゲル微粒子を得た。

#### (2) 二重刺激応答性ゲル微粒子の機能評価

① 二重刺激応答性ゲル微粒子の応答挙動  
ゲル微粒子を異なるpHの水溶液中に分散させ、さらに還元剤であるグルタチオン(GSH)を添加し、動的散乱法(DLS)を用いて粒径を測定することで、その応答挙動を評価した。

#### ② ゲル微粒子の毒性評価と細胞内動態

マウス線維芽細胞(L929)にCBA-DEAEMAゲル微粒子を接触させたのち、L929細胞の細胞生存率をWST-8アッセイによって評価した。また、CBA-DEAEMAゲル微粒子に疎水性蛍光色素であるDiIを内包させ、L929細胞に接触させた後、L929の細胞核およびリソソームをそれぞれDAPIとLysoTrackerで染色し、共焦点レーザー顕微鏡観察により、CBA-DEAEMAゲル微粒子の細胞内動態を観察した。

#### ③ ゲル微粒子の薬物放出挙動

CBA-DEAEMAゲル微粒子に抗がん剤であるドキソルビシンを内包した。さらに、透析法を用いることで、各緩衝液中におけるゲル微粒子からの薬物放出を検討した。

#### ④ ゲル微粒子へのオリゴ核酸の内包

CBA-DEAEMAゲル微粒子分散液を塩酸とGSHを用いて酸性かつ還元環境にした後、オリゴ核酸を加えた。その後、水酸化ナトリウムと過酸化水素を用いて塩基性かつ酸化環境にしてオリゴ核酸をCBA-DEAEMAゲル微粒子内に内包した。続いて、透析によりオリゴ核酸内包ゲル微粒子を精製し、その透析の外部溶液をSYBRgreenで染色して蛍光スペクトルを測定することで、ゲル微粒子へのオリゴ核酸の内包を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 二重刺激応答性ゲル微粒子の合成

さまざまなCBA含有率を有するゲル微粒子のソープフリー乳化重合による合成について検討した。その結果、CBA含有率0から25mol%のCBA-DEAEMAゲル微粒子の合成に成功した。いずれのCBA-DEAEMAゲル微粒子も水中で安定に分散した。また、動的散乱測定により粒径を測定したところ、200nm程度の単分散なゲル微粒子が得られたことがわかった(表1)。

#### (2) 二重刺激応答性ゲル微粒子の応答挙動

図2には、さまざまなCBA含有率のゲル微粒子のpH応答挙動を示した。図より、いずれ

表 1. ソープフリー乳化重合による CBA-DEAEMA ゲル微粒子の合成結果

CBA 含有率 (mol%)	粒径 (nm)	多分散度指数
0	197	0.058
10	189	0.015
20	190	0.001
25	185	0.056

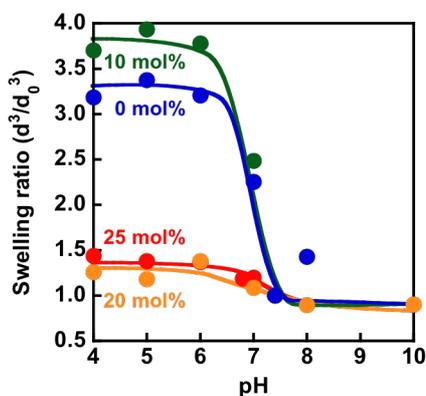


図 2. CBA-DEAEMA ゲル微粒子の pH 応答挙動

のゲル微粒子も酸性環境下において膨潤率が増加することがわかる。また、CBA 含有率の増加に伴って、酸性環境下におけるゲル微粒子の膨潤が抑制された。これは、CBA 含有率の増加に伴う、ゲル微粒子の架橋密度の増加によるものと考えられる。

次に、酸性環境下で膨潤が抑制できた CBA 含有率 20 mol% のゲル微粒子を用いて、pH と還元環境の二重刺激応答挙動について検討した (図 3)。その結果、還元剤であるグルタチオン (GSH) を添加しない条件では、酸性環境下においてゲル微粒子の膨潤が抑制された。一方、GSH を添加すると、酸性環境下で大きく膨潤率が増加した。酸性では DEAEMA のアミノ基のプロトン化による膨潤がジスルフィド架橋により抑制されるが、GSH の添加によりジスルフィド架橋が切断されるためにゲル微粒子が顕著に膨潤したと考えられる。以上の結果から、得られた CBA-DEAEMA ゲル微粒子は、酸性かつ還元環境を認識して大き

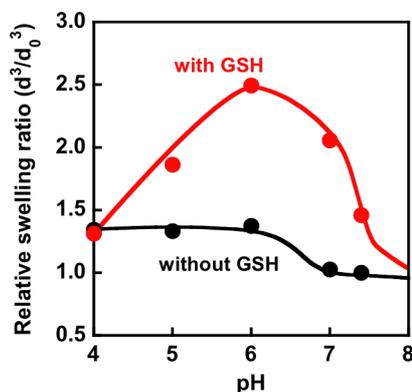


図 3. CBA-DEAEMA ゲル微粒子の pH/還元二重刺激応答挙動

く膨潤する二重刺激応答性ゲル微粒子であることが明らかになった。

### (3) 二重刺激応答性ゲル微粒子の細胞毒性と細胞内動態

L929 細胞に対する CBA-DEAEMA ゲル微粒子の細胞毒性を WST-8 アッセイにより評価した (図 4)。その結果、ネガティブコントロールであるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) は 0.1 mg/mL においてほぼすべての細胞が死滅したのに対して、CBA-DEAEMA ゲル微粒子は 0.5 mg/mL においても高い細胞生存率を示し、非常に細胞毒性が低いことがわかった。

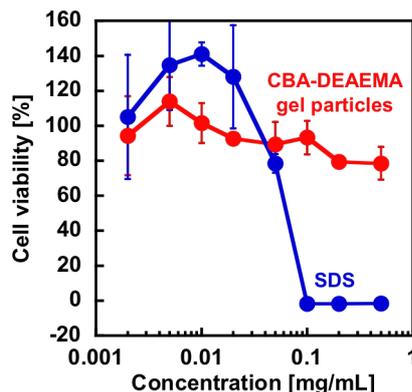


図 4. CBA-DEAEMA ゲル微粒子の細胞毒性試験

細胞膜を染色する疎水性色素である DiI を CBA-DEAEMA ゲル微粒子に内包し、これを用いて CBA-DEAEMA ゲル微粒子の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。DiI 単体を L929 細胞に接触させたところ、細胞膜から DiI の蛍光が確認できた。これに対して、DiI 内包ゲル微粒子を L929 細胞に接触させたところ、細胞質全体から DiI の蛍光が観察され、L929 細胞に取り込まれていることがわかった (図 5)。

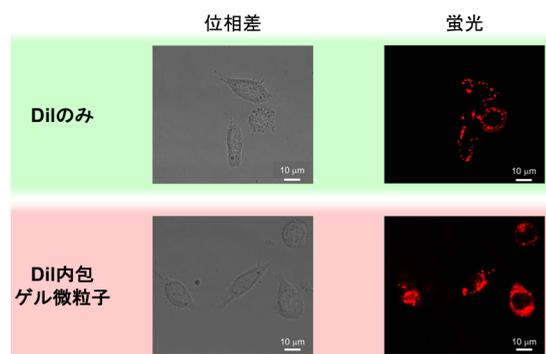


図 5. DiI 単体および DiI 内包 CBA-DEAEMA ゲル微粒子を接触させた L929 細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像

そこで、L929 細胞の細胞核とリソソームをそれぞれ DAPI と LysoTracker で染色して、CBA-DEAEMA ゲル微粒子の細胞内取り込み機構について検討した。図 6 より、LysoTracker と DiI の蛍光が重なった部分が確認できる。これは、一部の DiI 内包ゲル微粒子がリソソ

ーム内に存在しており, DiI 内包ゲル微粒子がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれたことを示唆している。さらに, 細胞質内から LysoTracker の蛍光と一致しない DiI の蛍光も確認できる。これらの結果より, DiI 内包ゲル微粒子は, DEAEMA の 3 級アミノ基によるプロトンスポンジ効果によってエンドソームから脱出し, 細胞質へと移行したと推察される。

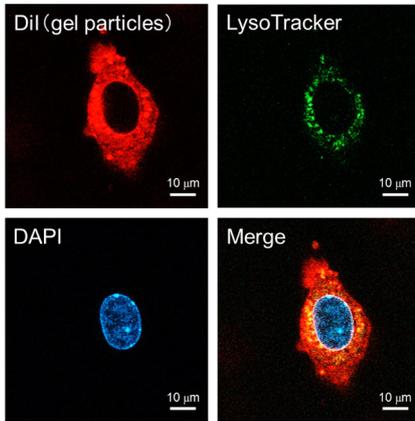


図 6. DiI 内包 CBA-DEAEMA ゲル微粒子の細胞内動態

(4) 二重刺激応答性ゲル微粒子の刺激応答性薬物放出挙動

CBA-DEAEMA ゲル微粒子は細胞毒性が低く, エンドサイトーシスにより細胞質内に取り込まれることが明らかになったので, 抗がん剤であるドキソルビシン (Dox) をモデル薬物としてゲル微粒子に内包し, その刺激応答性放出挙動について検討した。図 7 には Dox 内包 CBA-DEAEMA ゲル微粒子のリン酸緩衝溶液中ならびにジメチルアセトアミド (DMAc) 水溶液中の蛍光スペクトルを示した。Dox が難溶であるリン酸緩衝溶液中では Dox の蛍光がほとんど見られないのに対して, DMAc 中では Dox の蛍光が確認できた。Dox は濃度消光することが知られており, PB 中で Dox の蛍光が確認できなかったことから, CBA-DEAEMA ゲル微粒子内部に Dox が内包されたことがわかった。

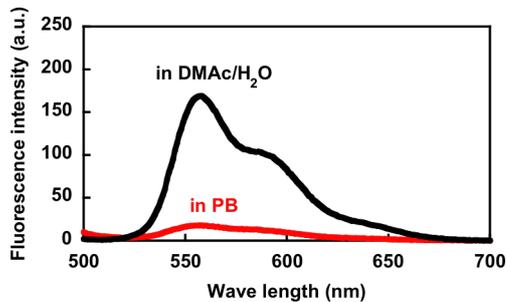


図 7. Dox 内包 CBA-DEAEMA ゲル微粒子の蛍光スペクトル

図 8 には各緩衝液中におけるゲル微粒子からの Dox の放出挙動を示した。図より, pH 7.4

の中性環境下ではゲル微粒子からの Dox の放出が抑制されていることがわかる。一方, ジチオスレイトール (DTT) の添加と pH の低下に伴って, ゲル微粒子からの Dox の放出量が増加した。さらに, CBA-DEAEMA ゲル微粒子が最も膨潤する条件である酸性かつ還元環境下の 2 つの刺激を同時に与えた際, 最も多くの Dox を放出した。これは, DEAEMA のプロトン化とジスルフィド結合の切断が起こり, ゲル微粒子が大きく膨潤するためと考えられる。

以上の結果から, CBA-DEAEMA ゲル微粒子は, ソープフリー乳化重合により非常に簡便に作製できるだけでなく, 疎水性薬物を内包でき, 酸性かつ還元環境下で劇的に膨潤して薬物放出することが明らかになった。このようなゲル微粒子は, 細胞質内で薬物放出可能な DDS キャリアとして期待できる。

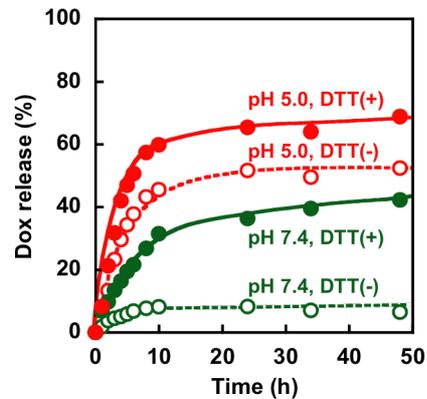


図 8. CBA-DEAEMA ゲル微粒子からの Dox 放出挙動

(5) CBA-DEAEMA ゲル微粒子へのオリゴ核酸の導入

CBA-DEAEMA オリゴ核酸を細胞質内に運搬するナノトランスポーターとしてゲル微粒子を用いるために, オリゴ核酸のゲル微粒子への内包について検討した。まず CBA-DEAEMA ゲル微粒子を酸性かつ還元環境で膨潤させた後, オリゴ核酸を添加した後, 塩基性かつ酸化環境にすることで, オリゴ核酸をゲル微粒子内に内包した。図 9 には, オリゴ核酸を内包したゲル微粒子を透析した際の

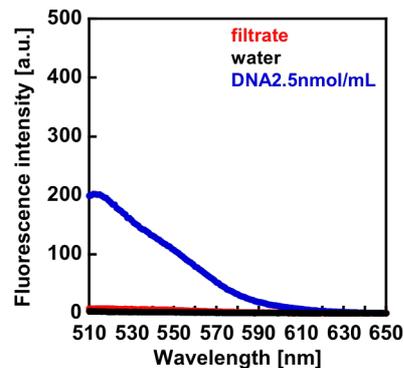


図 9. オリゴ核酸を内包したゲル微粒子を透析した際の外部溶液の蛍光スペクトル

外部溶液にオリゴ核酸の染色剤である SYBRgreen を添加した際の蛍光スペクトルを示した。図より、オリゴ核酸に SYBRgreen を添加した際に見られる蛍光スペクトルが、透析の外部溶液から確認されなかったことがわかる。従って、オリゴ核酸が CBA-DEAEMA ゲル微粒子内に安定に内包されたことが示唆された。

以上の結果から、CBA-DEAEMA ゲル微粒子は疎水性の抗がん剤だけでなく、オリゴ核酸も安定に保持することができ、miRNA のサイレンシングによる疾患の治療に応用可能なナノトランスポーターとしての有用性が期待できる。

## 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 5 件)

- ① K. Matsumoto, A. Kawamura, T. Miyata, Conformationally Regulated Molecular Binding and Release of Molecularly Imprinted Polypeptide Hydrogels That Undergo Helix-Coil Transition, *Macromolecules*, 査読有, 50, 2017. 2136-2144.
- ② R. Narapratpong, G. Kawanaka, H. Masayoshi, A. Kawamura, T. Miyata, Development of Protein-Recognition SPR Devices by Combination of SI-ATRP with Biomolecular Imprinting Using Protein Ligands, *Molecular Imprinting*, 査読有, 43, 2016, 21-30.
- ③ K. Matsumoto, B. D. B. Tiu, A. Kawamura, R. C. Advincula, T. Miyata, QCM Sensing of Bisphenol A Using Molecularly Imprinted Hydrogel/Conducting Polymer Matrix, *Polym. J.*, 査読有, 48, 2016, 525-532.
- ④ 河村 暁文, 標的分子に応答するゲル微粒子, *高分子*, 査読無, 65, 431-432 (2016).
- ⑤ K. Matsumoto, A. Kawamura, T. Miyata, Structural Transition of pH-Responsive Poly(L-Lysine) Hydrogel Prepared via Chemical Crosslinking, *Chem. Lett.*, 査読有, 44, 2016, 1284-1286.

[学会発表] (計 2 6 件)

- ① A. Harada, S. Ueno, A. Kawamura, T. Miyata, Preparation of Dual Stimuli-Responsive Gel Particles as DDS Carriers and Their Drug Release Properties, 11th International Gel Symposium (GelSympo2017), 2017 年 3 月 7 日, 日本大学津田沼キャンパス (千葉)
- ② 原田 綾佳, 上野 峻佑, 河村 暁文, 宮田 隆志, DDS キャリアを目指した二重刺激応答性ゲル微粒子の創製とその薬物放出挙動, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016 年 11 月 21 日, 福岡国際会議場 (福岡)
- ③ A. Kawamura, A. Harada, S. Ueno, T. Miyata,

Preparation of pH/Redox-re responsive Gel Particles as Smart Carriers for Intracellular Delivery, Polymer Networks Group Meeting (PNG2016), 2016 年 6 月 20 日, Stockholm (Sweden).

- ④ 河村 暁文, 生体内環境認識能を有する刺激応答性ゲル微粒子の設計とそのバイオ応用, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016 年 5 月 27 日, 神戸国際会議場 (兵庫) (招待講演) .
- ⑤ 河村 暁文, 原田 綾佳, 上野 峻佑, 宮田 隆志, 細胞内環境応答型デリバリーキャリアとしての二重刺激応答性ゲル微粒子の合成とその薬物放出制御, 第 27 回高分子ゲル研究討論会, 2016 年 1 月 19 日, 東京大学 (東京) .
- ⑥ 河村 暁文, 上野 峻佑, 宮田 隆志, 細胞内 DDS キャリアとしての二重刺激応答性ゲル微粒子の合成とその薬物放出挙動, 第 64 回高分子討論会, 2015 年 9 月 16 日, 東北大学 (宮城) .
- ⑦ A. Kawamura, S. Ueno, T. Miyata. Design of Biologically Stimuli-Responsive Gel Particles for Biomedical Applications, International Symposium for Advanced Materials Research (ISAMR2015), 2015 年 8 月 18 日, Sun Moon Lake, Taiwan (招待講演) .

[図書] (計 2 件)

- ① A. Kawamura, T. Miyata, Elsevier, *Biosensors: Biomaterials Nanoarchitectonics* (Ed. M. Ebara), 2015, 157-176.
- ② A. Kawamura, T. Miyata, Springer Berlin Heidelberg, *pH-Responsive Polymer: Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials* (Eds. S. Kobayashi and K. Müllen), 2015, 1619-1626.

[その他]

平成 27 年度 高分子学会 高分子研究奨励賞 受賞  
「分子応答性を有するソフトナノマテリアルの創製」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河村 暁文 (KAWAMURA, Akifumi)  
関西大学・化学生命工学部・助教  
研究者番号: 5 0 6 1 2 5 7 9

### (2) 研究協力者

宮田 隆志 (MIYATA, Takashi)