

令和元年6月12日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05928

研究課題名(和文) 急速混合法による層状複水酸化物の合成とそのドラッグデリバリー材料への応用

研究課題名(英文) Synthesis of anticancer agent/layered double hydroxide by rapid-mixing method and its application of materials for drug delivery

研究代表者

會澤 純雄 (Aisawa, Sumio)

岩手大学・理工学部・准教授

研究者番号：40333752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：層状複水酸化物(LDH)の薬物運搬体(キャリア)材料への応用を目的とし、急速混合法および共沈法による抗がん剤(5-フルオロウラシル：5-FUまたはメトトレキサート：MTX)/LDHの合成と有機修飾(ポリエチレングリコール：PEG)による抗がん剤/LDHの粒径制御および抗がん剤/LDHの細胞毒性について検討した。その結果、急速混合法または共沈法により抗がん剤/LDHの合成に成功し、有機修飾することで分散性を向上させることに成功した。抗がん剤/LDH(5-FU/LDH)の細胞毒性はHeLa細胞(ヒト子宮頸がん由来)に対して、5-FUに比べ約7倍高くなることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は、必要なとき、場所、量の薬剤を標的部位へ送達し、薬理作用を高め、副作用を低減させることが目的である。申請者の目的は層状複水酸化物(LDH)を基材とした薬物運搬体(キャリア)材料の創製である。LDHは、生体親和性や薬剤の担持量が多いなどの特徴があり、キャリア材料への応用が期待される無機ナノ材料である。本研究結果により、LDHはリポソームや高分子ミセルに対抗できる、新規な無機系ナノキャリアの創製に発展する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the synthesis and organic modified (polyethylene glycol: PEG) of the anticancer agent (5-fluorouracil: 5-FU or methotrexate: MTX)/LDH by the rapid mixing and coprecipitation methods for the application of layered double hydroxide (LDH) were investigated. In order to promote the cellular uptake of the anticancer agent, the particle size control of the anticancer agent/LDH and the cytotoxicity assay of the anticancer agent/LDH were also studied. The results of XRD, FT-IR and XPS suggested that the anticancer agent/LDH was obtained by both methods. The result of DLS indicated that the average particle size of the anticancer agent/LDH was ca. 200 nm. SEM image of the anticancer drug/LDH also revealed that the anticancer agent/LDH particle formed the large size aggregation; however, the primary particle size was 150-200 nm. The cytotoxicity of the anticancer agent/LDH was found to be about 7 times higher than that of 5-FU against HeLa cells.

研究分野：無機材料化学

キーワード：層状複水酸化物 インターカレーション 抗がん剤 ドラッグキャリア ドラッグデリバリーシステム

様式 C-19, F-19-1, Z-19, CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ドラッグデリバリーシステム(DDS)は、必要なときに、必要な場所へ、必要な量の薬剤を標的患部へ送達し、薬理作用を高め、副作用を低減させることを目的としている。近年、新薬開発は大規模な予算と時間が必要になるため、その開発環境は難しくなりつつある。そこで、既存の薬剤とドラッグデリバリー(DD)材料を組み合わせることで、薬理作用を向上させる DDS が注目されている。DD 材料としては、リポソームや高分子ミセルなどの有機系 DD 材料、量子ドット、金ナノロッド、マグネタイト、炭酸カルシウム、水酸アパタイトやメソポーラスシリカなどの無機ナノ材料を基材とした無機系 DD 材料があり、これらを用いた研究・臨床例は多数報告されている。しかし、いずれの DD 材料も副作用や安全性、薬剤の安定性や担持量、細胞への輸送効率などの改良点や機能付与が求められている。

本研究課題で取り上げた層状複水酸化物(LDH)は、図1に示した構造と一般式で表される無機ナノ材料の一つであり、その特徴は、(1)各種ゲスト分子(薬剤や生体分子など)をその層間へ取り込むことができる、(2)薬剤の担持量が多い、(3)取り込んだゲスト分子を徐放できる、(4)層間のゲスト分子の安定性を向上させるなどがあげられる。そのため、LDHは薬剤や生体分子を貯蔵できる分子コンテナやキャリア材料として利用することが検討されており、DD材料への応用に向けた研究報告例も増加している¹⁾最近では *in vitro* ならびに *in vivo* での薬剤/LDHの細胞毒性や薬理作用の向上に関する研究例²⁾も報告されており、LDHはDD材料へ応用可能なナノ材料として認識されている。しかし、培地や緩衝溶液中、生体内におけるLDH粒子の凝集が課題である。

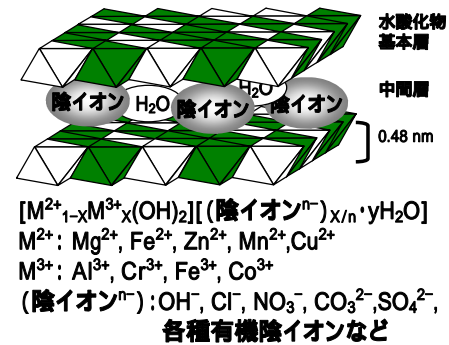


図1 層状複水酸化物の構造と一般式

エンドサイトーシスは、細胞が細胞外から細胞内へ様々な物質を取り込む機構で、これは物質のサイズや膜透過性、膜たんぱく質などの受容体に依存することがわかっている。エンドサイトーシスの経路は数種類存在し、その経路は取り込む物質の粒径によって変化することが報告されており、小粒径のLDHはクラスリン介在エンドサイトーシス経路で細胞内へ取り込まれることが提示されている。しかし、凝集したLDHは細胞内への輸送効率が低いファゴサイトーシスまたはマクロピノサイトーシス経路になるため、薬剤などを効率的に輸送する経路には適していない。この課題を解決するために、小粒径(70~200 nm)で高分散性のLDHの合成方法を確立すれば、LDHをDD材料への応用が期待される。

2. 研究の目的

近年、エンドサイトーシスは、細胞膜に接触した粒子の末端の形状や面積に依存し、それ自体の粒径や長さに影響されないことが報告されている。したがって、LDHは多少の凝集体を形成しても、細胞膜に接触するLDHの面積をコントロールすれば、細胞内へのLDHの導入効率を改善できると考えた。また、小粒径で高分散性のLDHを合成できれば、凝集体を形成した場合でも、細胞内への導入量は向上すると予想した。

本研究の目的は、急激な過飽和状態を発生させ、結晶成長を抑制することで小粒径のLDHが合成可能な急速混合法ならびに一般的なLDHの合成方法である共沈法により、抗がん剤/LDHの合成とLDHの粒径におよぼす合成条件の影響を検討した。また、抗がん剤/LDH合成の際、有機修飾剤がLDHの粒径や分散性におよぼす影響についても調べた。さらに、LDHのDD材料への応用を考慮し、抗がん剤/LDHのがん細胞に対する細胞毒性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 急速混合法による抗がん剤/LDHの合成

所定量、所定濃度、所定Mg/Alモル比のMg(NO₃)₂-Al(NO₃)₃混合水溶液と水酸化ナトリウム水溶液を、シリンジとニードルを用い、所定pHに調整した抗がん剤(5-フルオロウラシル:5-FUまたはメトトレキサート:MTX)水溶液にかき混ぜながら数秒以内に加えて、抗がん剤/LDHを合成した。

(2) 共沈法による抗がん剤/LDHの合成

抗がん剤水溶液に所定量、所定濃度、所定Mg/Alモル比のMg(NO₃)₂-Al(NO₃)₃混合水溶液とNaOH水溶液を用いてpHを調整しながら滴下し、抗がん剤/LDHを合成した。

急速混合法および共沈法どちらの方法についても、LDHの粒径や分散性におよぼすMg-Al混合水溶液の濃度、pH、添加時間、反応温度、かき混ぜ熟成時間、Mg/Alモル比などの影響を系統的に調べ、DD材料に適した粒径のLDHが生成する合成条件を調べた。また、有機修飾剤としてポリエチレングリコール(PEG)またはフォルリン酸(FOL)を抗がん剤水溶液に添加し、抗がん剤/有機修飾剤/LDHの合成を試み、粒径や分散性におよぼす有機修飾剤の影響についても検討した。

(3) 固体生成物の評価

結晶構造の評価

LDHの結晶性および層間距離は、粉末X線回折装置(XRD)によって評価した。装置はD8 ADVANCE, Bruker製を用い、測定条件は、対陰極Cu(Niフィルター)、管電圧40 kV、管電流40 mAで、測定範囲は2θ = 2-70°で行った。

官能基の種類の評価

LDHの官能基は、フーリエ変換赤外分光光度計 (FT-IR) によって評価した。装置は、Thermo Fisher Scientific 社製、Nicolet NEXUS 670 FTIR 型を利用し、測定方法はATR法を用いた。熱特性

LDHの熱特性は、示差熱重量測定装置 (TG-DTA) によって評価した。装置は、Rigaku (株) 製 TG8120 型を使用した。測定条件は 試料量: 5 mg、測定範囲: 20-800°C/min、参照試料: $-Al_2O_3$ 、雰囲気: 窒素で行った。

粒子形状の評価

LDHの形状観察は、オスミウムコーターを蒸着させた後、電界放出型走査型電子顕微鏡 (FE-SEM) または極低加速電圧走査型電子顕微鏡 (ULV-SEM) で行った。オスミウムコーターは、フィルジェン (株) 製、OPC40 型を使用し、FE-SEM は日本電子 (株) 製 JSM-7001F 型、ULV-SEM は日本電子 (株) 製 JSM-7800 型を使用した。

粒度分布の評価

LDHの粒度分布は、電気泳動光散乱光度計 (DLS) によって評価した。装置は、大塚電子 (株) 製 ELSZ-2000 型を使用した。DLSのサンプルは、2 mgのLDHを蒸留水 20 mLに加え、30分間超音波した分散液を用いた。

金属イオンならびに抗がん剤の定量

LDH中のMg、Al量は、原子吸光光度計 (AAS) によって評価した。装置は、島津製作所 (株) 製 AA-7000 型を使用した。その際、Al用測定試料は、LDH 10 mgを0.1 M HClで溶解させた後、100 mLのメスシリンダーに入れて、蒸留水でメスアップして、測定した。Mg用測定試料は、Al用測定試料を蒸留水で50倍に希釈した。

抗がん剤の定量は紫外可視分光光度計 (UV-vis) で行った。装置は日本分光 (株) 製 V-570 型を用いた。測定はLDH 10 mgに蒸留水と0.1 M HNO_3 水溶液をpH 2.5になるまで加え、蒸留水で100 mLにメスアップし他水溶液を用い、測定波長は265 nm (5-FU) ならびに303 nm (MTX) で行った。

結合エネルギー

LDHの結合エネルギーは、X線光電子分光法 (XPS) により評価した。装置は、ULVAC-PHI 社製 PHI-5000 VersProbe を用いた。測定条件は、Al K線、検出角 45° である。インジウムの上にLDHを固定し、加速電圧4 kVのイオン銃で粉末の表面を6 s エッチングし、酸化物を除去した後に測定を行った。

(4) 抗がん剤/LDHの細胞毒性試験

対数増殖期にあるHeLa細胞懸濁液を96 wellプレート中の各wellに5000 cells/wellになるように100 μ Lずつ播種し、37 $^\circ$ C、CO₂濃度5%雰囲気下で前培養を6時間行った。続いて各薬剤および各LDHを培地に分散させることで1.0 mg/mLの分散液とし、超音波処理を3分間行った。超音波処理した分散液を100 μ g/mLに調製し、これを倍々希釈しながら96 wellプレートの各wellに10 μ Lずつ添加した。倍々希釈は8回行い、9つの分散液濃度条件で各wellに添加した。分散液を添加した後、46時間培養し、各wellにWST-8を各wellに10 μ Lずつ添加し2時間培養することで発色させた。最後に各wellに0.1 M HCl溶液を10 μ Lずつ添加し反応を停止させ、マイクロプレートリーダー (SH-1200, Q コロナ電気 (株)) を用いて波長450 nmにおける吸光度を測定し、細胞生存率は以下の式で計算した。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = \text{Abs} / \text{Abs}^{\text{control}} \times 100$$

4. 研究成果

(1) 急速混合法による抗がん剤/LDHの合成

Mg/Al モル比 = 2~4 で合成した5-FU/LDHのXRD図を図2に示す。急速混合法で合成した5-FU/LDHの面間隔値は約0.80 nmと共沈法で合成した際の面間隔値1.0 nmに比べ減少するこ

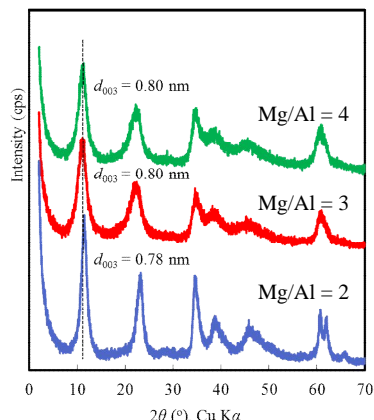


図2 5-FU/LDHのXRD図

5-FUのモル濃度: 30 mM, 合成pH: 9,
反応時間: 3 h, Mg/Alモル比: 2-4.

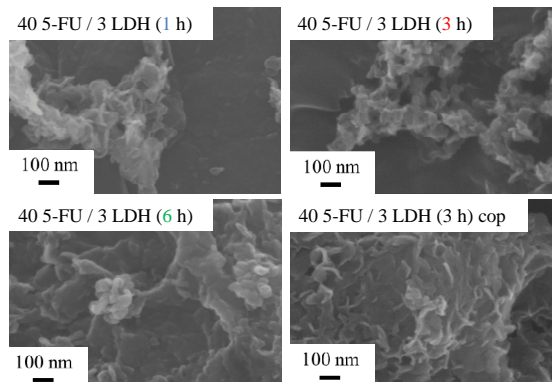


図3 40 5-FU / 3 LDH (反応時間 h)のSEM写真

5-FUのモル濃度: 30 mM, 合成pH: 9,
反応時間: 1~6 h, Mg/Alモル比: 3.

とがわかった。これは、本法の場合、5-FU 水溶液に Mg-Al 混合水溶液を急速に加え、LDH の 1 次核を発生させて結晶成長を抑制し、5-FU の取り込み量が減少するためと考えられた。また、LDH 層間には 5-FU と硝酸イオンが取り込まれるため、結晶性が低下すると考えられた。したがって、他のモル比に比べ Mg/Al モル比 = 3 の結晶性が低く、5-FU の取り込み量も多いと考えられた。FT-IR の測定結果から、5-FU の C-F 伸縮振動に帰属される吸収ピークが 1220 cm^{-1} に観察されたことも 5-FU の LDH への取り込みを支持している。AAS および UV-vis から、5-FU/LDH は、5-FU 濃度 40 mM、Mg/Al モル比 = 3 およびかき混ぜ時間 3 h のときに、5-FU の取り込み量が最大となった。DLS の結果から 5-FU/LDH の平均粒径は 100 ~ 200 nm であり、目標とした粒径の抗がん剤/LDH の合成条件を見出した。

各反応時間 (Mg/Al モル比 = 3) において合成した 5-FU/LDH の SEM 写真を図 3 に示す。すべての反応時間において LDH は凝集体を生じていたが、一次粒径は DLS の結果と一致するサイズであり、その形状は板状であることがわかった。XPS の結果 (図 4) から、5-FU/LDH は LDH の基本層と 5-FU の静電相互作用により Mg2p および Al2p のピークが低エネルギー側に化学シフトすることが示された。また、TG-DTA の結果から、5-FU の熱安定性は、5-FU が LDH の層間に取り込まれることによって、約 140 向上することがわかった。

つぎに、平均粒径 100 ~ 200 nm の 5-FU/LDH が得られた同じ条件下において、MTX/LDH の合成を試みたところ、LDH 層間への MTX の取り込みは観察されなかったため、実験方法を急速混合法から共沈法に変更し、検討を行った。

(2) 共沈法による MTX/LDH の合成

XRD の測定結果より、MTX/LDH の面間隔値は 2.24 nm と NO_3/LDH の面間隔値 0.78 nm よりも拡大した。FT-IR の測定結果より、MTX/LDH のカルボキシ基の非対称伸縮振動 (1600 cm^{-1} , 1560 cm^{-1}) は、MTX (1643 cm^{-1} , 1602 cm^{-1}) に比べ低波数側へシフトした。これは、アニオン化した MTX のカルボキシ基と LDH との静電相互作用に起因すると考えられた。TG-DTA, UV-vis, AAS の測定結果より、MTX/LDH の MTX 含有率は、合成 pH 9 のとき 44.9 %、pH 10 のとき 10.6 % であることから、MTX の取り込み量は pH に大きく影響されることがわかった。これは pH の上昇にともない、共存陰イオンである水酸化イオンが優先的に LDH へ取り込まれるため、MTX の取り込み量が減少すると考えられた。DLS 測定と SEM 観察より、MTX/LDH ならびに有機修飾剤として PEG を添加した MTX/PEG/LDH の粒径は数 μm であった。LDH の電位は層間へ電荷の高い陰イオンを取り込むことにより低下し、粒子間の静電気反発の減少にともない、凝集体を形成することが明らかとなった。MTX/LDH の分散性を改善するために、MTX/LDH の粒径におよぼす PEG の添加条件や合成条件の影響を調べたが、いずれも凝集体を形成することがわかった。

(3) 共沈法による 5-FU/有機修飾剤/LDH の合成

前述のとおり、MTX/LDH の粒径・分散性は有機修飾剤を添加しても改善されることがわかった。ここでは 5-FU の副作用を低減させるフォルリン酸 (FOL) と抗がん剤を同時に取り込んだ LDH (5-FU/FOL/LDH) の合成を試み、各種 LDH の粒径におよぼす FOL または PEG の添加による影響について検討した。

図 5 に 5-FU/FOL/LDH および 5-FU/FOL/PEG/LDH の XRD 図を示す。いずれの LDH の面間隔値は 0.80 nm と層間の拡張は観察されなかったが、FT-IR の測定結果から、5-FU、PEG および FOL に帰属される吸収ピーク、TG-DTA の測定結果から、それらの熱分解に伴う発熱が観察された。以上の結果、5-FU および FOL は LDH の層間に取り込まれていることが示唆された。DLS の測定結果から、LDH の粒径は PEG の濃度に影響され、5-FU/FOL/LDH では分散剤を 0.2 g 添加して合成したとき、粒径を 200 nm 以下に制御することができた。また、SEM 観察より、5-FU/FOL/LDH の一次粒子は約 100 nm の粒径であった。

(4) 抗がん剤/LDH の細胞毒性試験

つぎに、これまで合成した各種 5-FU/LDH の細胞毒性試験を検討した。図 6 に細胞毒性におよぼす各種 5-FU/LDH の分散液濃度と細胞生存率の関係を示す。

その結果、5-FU および 5-FU/PEG/LDH は高い細胞毒性を示した。5-FU は濃度が $1.0\text{ }\mu\text{g/mL}$ 以下でも細胞生存率が 50 % 前後となっておりその後の濃度の上昇に伴う細胞毒性の向上はみられなかった。一方、15 mM 5-FU/0.2 g PEG/LDH は濃度の上昇に伴い細胞毒性が向上し、試料濃度が $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 付近から 5-FU を超える細胞毒性を示した。これは 5-FU が LDH に取り込まれることで、LDH 基本層由来の正電荷によって細胞に取り込

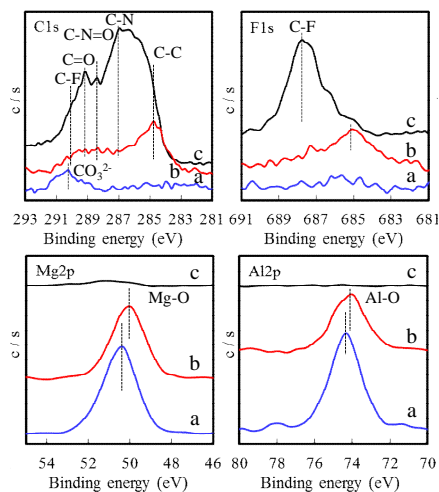


図4 (a) 5-FU, (b) 40 5-FU/3 LDH (3 h) (c) $\text{NO}_3/3$ LDH (3 h)のXPSスペクトル図

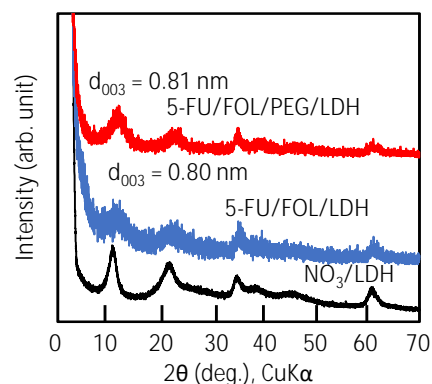


図5 5-FU/FOL/LDHおよび 5-FU/FOL/PEG/LDHのXRD図

まれやすくなったことに起因している。また、試料濃度が 10 $\mu\text{g/mL}$ 以下で、5-FU の方が高い細胞毒性を示したのは、各種 5-FU/LDH に含まれている 5-FU の量が少なく、細胞毒性を発現できなかったと推察した。一方、FOL/LDH や FOL/PEG/LDH の細胞毒性は低く、また、5-FU/FOL/PEG/LDH も 5-FU の含有量が少ないため FOL/LDH や FOL/PEG/LDH 細胞毒性は低いことが明らかとなった。

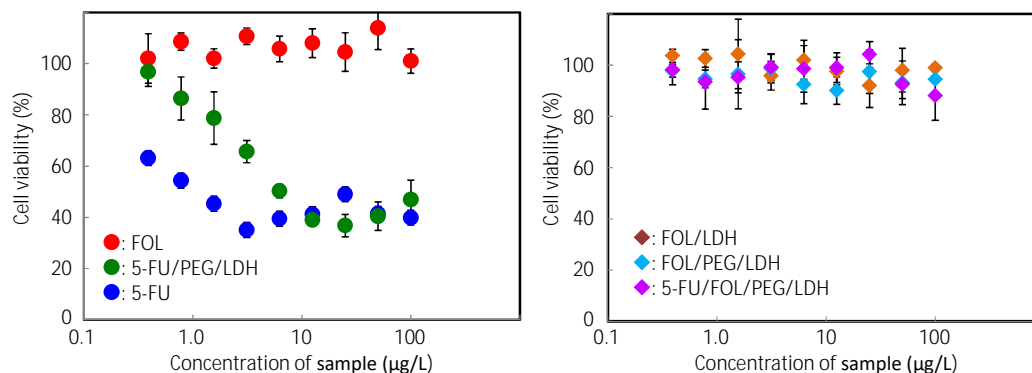


図6 HeLa細胞の生存率におよぼす各種LDHの影響

(5) まとめ

以上の結果、合成方法として急速混合法ならびに共沈法を用い、DD 材料への展開が期待される小粒径 (70 ~ 200 nm) の抗がん剤/LDH を生じる合成条件を、5-FU を用いることで見出すことができた。また、有機修飾剤である PEG を用い、その分散性を向上させることができた。一方、MTX を用いた場合、MTX/LDH の粒径制御は、急速混合法や有機修飾剤を用いても、電位の減少に起因する凝集のため困難であることがわかった。

5-FU/LDH、5-FU/PEG/LDH および 5-FU/FOL/PEG/LDH の細胞毒性を調べた結果、5-FU/LDH > 5-FU/PEG/LDH > 5-FU/FOL/PEG/LDH となり、粒径には影響されず、5-FU の含有率に依存することがわかった。予想した細胞毒性におよぼす LDH の粒径の効果は観察されなかったが、*in vitro* と *in vivo* では実験環境が異なるため、各試料の *in vivo* における検討も必要である。今後、LDH をさらに高機能性ドラッグデリバリー材料として応用・発展できるよう、これらの課題解決に向けて取り組む予定である。

<引用文献>

- 1) Dai *et al.*, 2015, Methotrexate intercalated layered double hydroxides with the mediation of surfactants: Mechanism exploration and bioassay study, *Materials Science and Engineering C*, **57**, 272-278
- 2) Zuo *et al.*, 2017, A Facile way of modifying layered double hydroxide nanoparticles with targeting ligand-conjugated albumin for enhanced delivery to brain tumour cells, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **9**, 20444-20453

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 12 件)

會澤純雄, 小川優吾, 安ヶ平理久, 桑静, 平原英俊, 抗がん剤/層状複水酸化物の合成とそのドラッグキャリアへの応用, 日本セラミックス協会 2019 年年会, 2019

會澤純雄, 山崎春菜, 桑静, 平原英俊, コアシェル型マグネタイト@層状複水酸化物@抗がん剤の合成, 第 57 回セラミックス基礎科学討論会, 2019

會澤純雄, 小川優吾, 桑静, 平原英俊, Mg-Al 系層状複水酸化物へのメトトレキサートの取り込み挙動, 平成 30 年度日本セラミックス協会東北北海道支部研究発表会, 2018

佐藤久子, 瀧本和誉, 會澤純雄, 層状複水酸化物中にインターカレートしたアミノ酸の振動円二色性スペクトル, 第 62 回粘土科学討論会, 2018

會澤純雄, 小川優吾, 桑静, 平原英俊, Intercalation behavior of methotrexate into Mg-Al layered double hydroxide, 平成 29 年度化学系学協会東北大会, 2018

AI SAWA, Sumio; SATO, Takuji; TAKATORI, Takuya; SANG, Jing; HIRAHARA, Hidetoshi, Synthesis of 5-fluorouracil/layered double hydroxide by rapid-mixing method, 日本化学会第 97 春季年会, 2018

會澤純雄, 佐藤卓司, 高取拓哉, 桑静, 平原英俊, 急速混合法による 5-フルオロウラシル/層状複水酸化物の合成とその細胞毒性, 第 61 回粘土科学討論会, 2017

會澤純雄, Fabrication of Biomolecules and Drugs Nanocarrier using Layered Double Hydroxide, 平成 29 年度化学系学協会東北大会, 2017 (招待講演)

SUMIO AISAWA , HONOKA TAKEMURA , SANG JING , HIDETOSHI HIRAHARA , SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF HOLLOW NANOSPHERE LAYERED DOUBLE HYDROXIDE AS DRUG CARRIER , 16th International Clay Conference, 2017 (国際学会)

會澤純雄, 佐藤卓司, 高取拓哉, 桑 静, 平原英俊, 急速混合法による抗がん剤/層状複水酸化物の合成とその細胞毒性試験, 第33回日本DDS学会学術大会, 2017

AISAWA, Sumio; SATO, Takuji; TAKATORI, Takuya; SANG, Jing; HIRAHARA, Hidetoshi, Synthesis of 5-fluorouracil/layered double hydroxide by rapid-mixing method, 日本化学会第97春季年会, 2017

會澤純雄, 層状複水酸化物を基材としたドラッグデリバリー材料の創製, 第10回東北大学多元物質科学研究所 新機能無機物質探索研究センターシンポジウム, 2017 (招待講演)

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。