

平成22年5月17日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20750162

研究課題名 (和文) 抗ガン剤／層状複水酸化物複合体の合成とその細胞毒性

研究課題名 (英文) Synthesis and cytotoxicity of anticancer drug intercalated layered double hydroxide

研究代表者

會澤 純雄 (AISAWA SUMIO)

岩手大学・工学研究科・助教

研究者番号：40333752

研究成果の概要 (和文)：層状複水酸化物 (LDH) は、ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用が期待される無機ナノ粒子の一つである。本研究では、抗ガン剤である 5-fluorouracil (5-FU) と LDH を複合化した 5-FU/LDH ならびに 5-FU/LDH を各種生体分子により修飾した生体分子/5-FU/LDH を合成し、その細胞毒性について検討した。その結果、各種 5-FU/LDH の合成に成功した。5-FU/LDH の細胞毒性は 5-FU に比べ高くなり、さらに生体分子/5-FU/LDH はガン細胞に対し多くの 5-FU を輸送でき、細胞毒性が向上することを見出した。以上の結果、生体分子/薬物/LDH は少ない薬物の量で効果的に作用する DDS への応用が期待される。

研究成果の概要 (英文)：Layered double hydroxide (LDH) is a class of nanomaterials that have attracted considerable attention for their potential utility as drug and biomolecule delivery. In this study, the synthesis of the anticancer drug, (5-fluorouracil (5-FU))/LDH and the modification of the 5-FU/LDH with various biomolecule (biomolecule/5-FU/LDH) have been investigated. Moreover, the cytotoxicity assay of the both LDHs for various mammalian cells has also been studied. The 5-FU/LDH was characterized by various techniques such as XRD and FT-IR that demonstrated the successful intercalation of 5-FU into the LDH. Then, the surface of the 5-FU/LDH was modified with biomolecules. After the modification, the 5-FU/LDH maintained its original LDH structure. The 5-FU/LDH and biomolecule/5-FU/LDH have 1.9 and 7.7 times better drug efficacy than naked 5-FU. The biomolecule/5-FU/LDH exhibited a quick cytotoxicity effect compared with the 5-FU/LDH. The present results demonstrate that the biomolecule modified LDH has the great potential of biocompatible drug carrier.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：材料化学・無機工業材料

キーワード：層状・層間化合物, ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

標的細胞に一定量の薬物を任意の期間だけ徐放させるドラッグデリバリーシステム (DDS) は高度な疾病の治療における重要な課題である。現在、様々な研究分野において、DDS に関する研究が数多く試みられているが有効な手段は少ない。薬物のキャリアとしてはアデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスベクターおよびリポソーム、高分子ミセル、 dendrimer、カーボンナノチューブ、カーボンナノホーンなどの非ウイルスベクターに関する研究が行われているが、副作用、安全性、安定性、細胞への薬物の輸送効率などの問題が残されている。一方、様々な無機ナノ粒子は薬物のキャリア材料として注目されている。中でも無機層状化合物は、工業材料として多量に生産・使用され、新規な機能性材料開発への発展が期待されるナノ材料である。例えばモンモリロナイトは、医薬品ならびに食品分野において安全性が確立されており、非ウイルスベクターとして経口遺伝子導入剤への応用が見出されている。本研究で取上げた層状複水酸化物 (LDH; 図 1) は、無機層状化合物の一種であり、陰イオン交換能を持つことから、様々なインターカレーション反応を用いた有機/無機ナノ複合体の基盤材料として研究されている。近年、LDH の二次元層空間をナノスケールで制御可能な分子貯蔵領域としてとらえ、分子コンテナ、分子キャリアおよびナノフードへの応用を目的とした研究が注目されている。とくに、抗ガン剤ならびに抗生剤など、LDH への薬物の取り込みに関する研究が活発に行われている。しかし、薬物/LDH の細胞毒性ならびに細胞への薬物の輸送効率の向上に関する研究はほとんど行われていない。

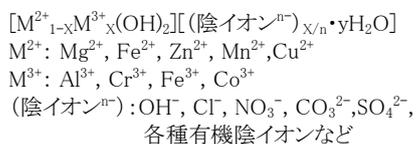
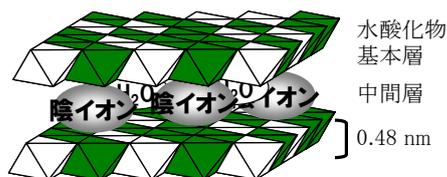


図1 LDHの構造

2. 研究の目的

本研究では、制酸剤として多くの医薬品 (胃薬) に配合されている LDH と抗ガン剤を複合化した抗ガン剤/LDH の合成を試み、その細胞毒性について検討した。また、抗ガン剤/LDH を生体分子 (ペプチド、コラーゲン、ポリエチレングリコール) により修飾した生体分子/抗ガン剤/LDH の合成を検討し、各

種 LDH の細胞毒性、細胞への抗ガン剤の輸送効率、つまり LDH のドラッグキャリアとしての可能性について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

2008 年度は抗ガン剤/LDH の合成、2009 年度は前年度合成した抗ガン剤/LDH を用い、生体分子/抗ガン剤/LDH 合成を行った。また、両年度とも各種 LDH の細胞毒性について調べた。なお、抗ガン剤としては、比較的安価で、水溶液中においてアニオン化する 5-フルオロウラシル (5-FU) を用いた。

(1) 5-FU/LDH の合成

5-FU/LDH は、 $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 混合水溶液 (Mg/Al モル比=2~4) を所定温度、窒素雰囲気下において pH 調整しながら 5-FU 水溶液に滴下する共沈法により合成した。また、 NO_3^-/LDH および Cl^-/LDH と 5-FU 水溶液を混合し、所定時間かき混ぜるイオン交換法により 5-FU/LDH を合成した。

どちらの方法においても、5-FU の取り込み量におよぼす反応条件 (5-FU 濃度、固-液比、pH、反応温度など) の影響について調べた。

(2) 生体分子/5-FU/LDH の合成

生体分子/5-FU/LDH は、(1) で合成した 5-FU/LDH を生体分子水溶液に添加し、窒素雰囲気下、所定温度、所定時間振とうすることにより合成した。その際、生体分子の濃度、固液比、pH、反応時間が修飾量におよぼす影響について検討を行った。生体分子としては平均分子量が 1000 と 2000 のコラーゲンペプチド (CP1000, CP2000)、大豆ペプチド (SP) コラーゲンナトリウム (Cho1)、ポリエチレングリコール (Peg) を用いた。

(3) 5-FU/LDH および生体分子/5-FU/LDH の評価

各種 LDH は、XRD, FT-IR, TG-DTA, UV-Vis, AAS, ICP-MS, 粒度分布, SEM, TEM などにより組成分析、構造解析ならびに形状観察を行った。

(4) 細胞毒性試験

各種 LDH の細胞毒性試験は以下の二法を用いて評価した。なお、試験には L929 細胞 (マウス) ならびに HeLa 細胞 (ヒト) を用いた。

①コロニー形成試験: 24ウェルプレートに播種した細胞へ所定量のLDHを分散した培地を添加し、所定時間インキュベーター内で培養後、コロニー形成率を算出した。

②WST法: 96ウェルプレートに播種した細胞へLDHを所定量分散した培地を添加し、インキュベーター内で培養する。所定時間培養した後、細胞計数試薬を添加し発色させ、マイクロプレートリーダーを用い、所定波長により吸光度を測定することで細胞の生存率を算出した。

4. 研究成果

(1) 5-FU/LDHの合成とその細胞毒性

はじめに、共沈法による5-FUの取り込みにおよぼすpHの影響について検討を行った。図2に固体生成物のXRD図を示す。5-FU/LDHの結晶性は合成pHに影響され、pHの上昇に伴い結晶性が向上することがわかった。pH 9におい

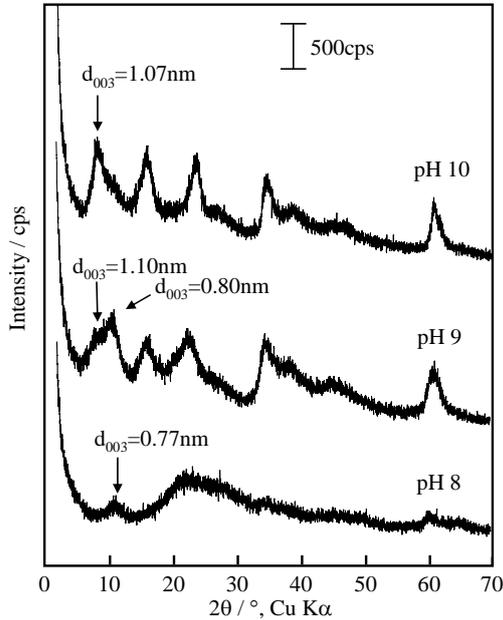


図2 共沈法で合成した5-FU/LDHのXRD図

て、結晶性は低いものの、5-FU/LDHの面間隔値が1.1nmと0.80nmであることから、5-FUはLDH基本層対し平行方向と垂直方向に配向して取り込まれていると考えられた(図3)。つぎに、取り込みにおよぼす5-FU濃度の影響(5~25mM)について検討を行った。固体生成物のXRDから、面間隔値は0.90~1.10nmに拡大

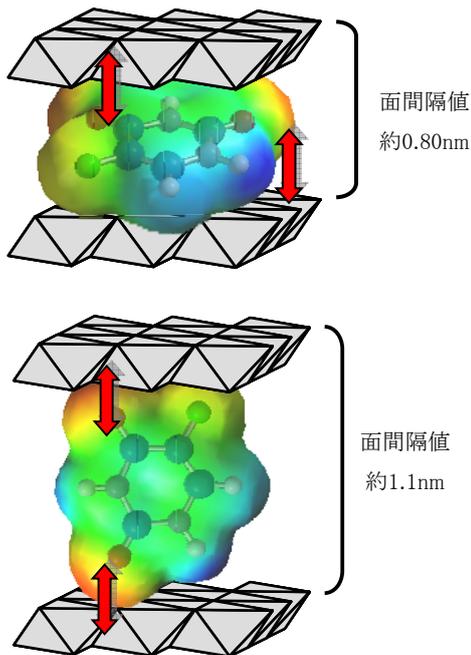


図3 5-FU/LDHの取り込みモデル図

し、5-FUの取り込みが示された。また、20mM以上の濃度の場合、1.10nmおよび0.80nmに回折ピークが観察されたことから、2種類の配向を有することが明らかとなった。つぎに、反応時間の影響について調べるために熟成を24時間行った。しかし、LDHへ取り込まれた5-FUの一部は、共存するNO₃⁻とイオン交換反応によりLDH層間から放出されるため、面間隔値は1.10nmから0.77nmに減少した。5-FU/LDHのFT-IRスペクトル図より、5-FUに帰属される吸収ピークが観察されたことから、5-FUはLDH層間に取り込まれていることが示された。以上の結果、共沈法によるLDHへの5-FUの取り込み挙動が明らかとなった。

イオン交換法によるLDHへの5-FUの取り込みについて検討を行った結果、取り込み挙動は出発LDH、つまり層間のNO₃⁻またはCl⁻に大きく影響されることがわかった。NO₃⁻/LDHを用い、5-FUの取り込みにおよぼすpH、5-FU濃度、反応時間の影響について調べたところ、面間隔値の拡大が観察され、結晶性は共沈法に比べ高いことがわかった(図4)。また、FT-IRスペクトルから、5-FUに帰属される吸収が観察されたことから、5-FUの取り込みが示された。一方、Cl⁻/LDHを用いた場合、pHならびに5-FU濃度を変化させても、Cl⁻の電荷密度はNO₃⁻に比べ高いためイオン交換されず、LDHの面間隔値の変化は観察されなかった。そこで、反応時間を長くすることで、徐々に5-FUがLDH層間へ取り込まれ、面間隔値は0.78nmから1.07nmに拡大した。しかし、Cl⁻/LDHに帰属する回折ピークも観察されたため、生成物はCl⁻/LDHとの混合物であることが示された(図4)。表1に各種5-FU/LDHの化学組成を示す。Mg/Al比は2.0を維持し、5-FUの取り込み量はLDHの陰イオン交換容量の約5~7割を満たし

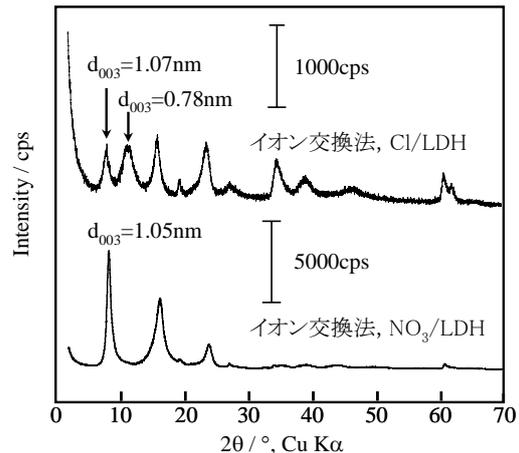


図4 イオン交換法で合成した5-FU/LDHのXRD図

表1 5-FU/LDHの組成式

取り込み方法	組成式	5-FU/Al モル比
共沈法	$[Mg_{0.68}Al_{0.32}(OH)_2][5-FU_{0.19}(NO_3)_{0.13} \cdot 0.42H_2O]$	0.59
イオン交換法, NO ₃ ⁻ /LDH	$[Mg_{0.68}Al_{0.32}(OH)_2][5-FU_{0.23}(NO_3)_{0.09} \cdot 0.38H_2O]$	0.72
イオン交換法, Cl ⁻ /LDH	$[Mg_{0.67}Al_{0.33}(OH)_2][5-FU_{0.14}Cl_{0.19} \cdot 0.43H_2O]$	0.46

ていることが明らかとなった。

(2) 5-FU/LDHの細胞毒性

細胞毒性試験の結果から、L929細胞に対する細胞毒性は、5-FU単独に比べ、同量の5-FUを含む5-FU/LDHを添加することで向上した。さらに、図5に示したとおり、5-FU/LDHの添加量の増加にともないHeLa細胞のコロニー形成率は著しく減少することが明らかとなった。通常、細胞の表面は負電荷を帯びており、5-FUは陰イオンのため細胞表面の電荷の反発により細胞内へ取り込まれにくい。しかし、正電荷を持つLDHと複合化することにより、細胞表面との電荷の反発が弱まり、細胞表面へのLDH粒子の吸着が起りやすくなり、細胞内へのエンドサイトーシスが促進されことで細胞毒性が向上すると考えられた。また、粒度分布の結果から、細胞への5-FUの輸送効率は5-FU/LDHの粒子サイズに影響されることが示唆された。さらに、 CO_3/LDH 、 NO_3/LDH および Cl/LDH の細胞毒性は低いため、コロニー形成率の減少はLDHとの複合化による5-FUの輸送効率の向上に起因することが示された。

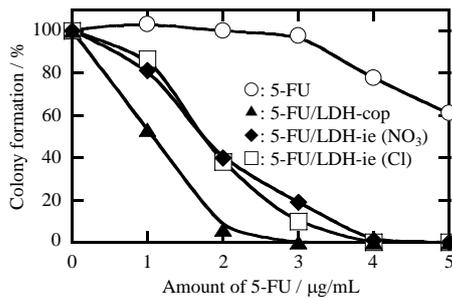


図5 HeLa細胞のコロニー形成率におよぼす5-FU/LDHの影響

(3) 生体分子/5-FU/LDHの合成

つぎに、各種生体分子による5-FU/LDHの表面修飾を試みた。CPを修飾した結果、XRD図より、修飾後の面間隔値は変化しないことから、CPは5-FU/LDH表面に吸着していると考えられた(図6)。しかし、CPの取り込みに起因するショルダーも $2\theta=3^\circ$ 付近に観察されたことから、CPが取り込まれ一部の5-FUはLDH層間から放出されたことがわかった。一方、SPはアスパラギン酸ならびにグルタミン酸が多く含まれているため、LDH層間に取り込まれやすく、面間隔値は5-FUの放出に伴い1.05nmから0.82nmに縮小した。このことから、SPはLDHの修飾に適さないことが示された。

図7にCholおよびPegを修飾した5-FU/LDHのXRD図を示す。修飾後も5-FU/LDH由来の回折ピークが観察されたことから、LDH構造を保ち、5-FUは層間に保持されていることが示された。また、生体分子が吸着したことにより層構造が若干乱雑になり、5-FUの配列が不均一になるため修飾前後に面間隔値がわずかに変化した。Chol/5-FU/LDHのXRD

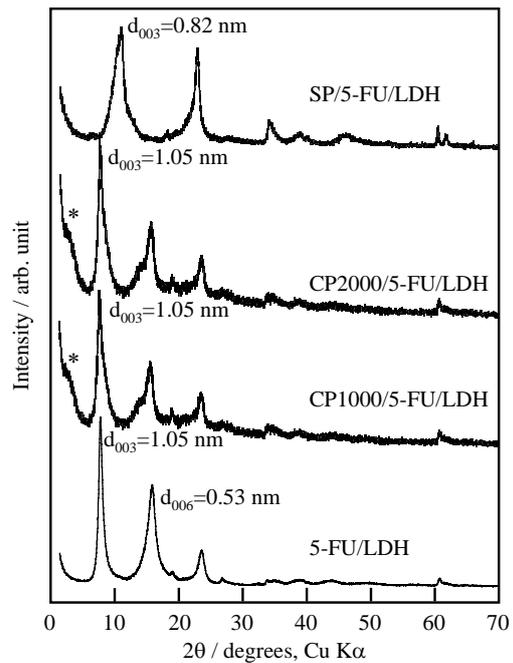


図6 生体分子/5-FU/LDHのXRD図

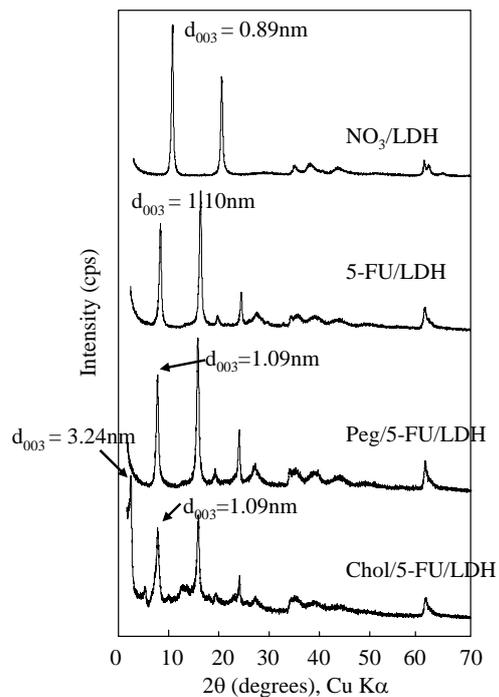


図7 各種5-FU/LDHのXRD図

図から、 $d_{003}=3.24\text{nm}$ にCholが層間に取り込まれたことを示す回折ピークが観察された。つまり、一部の5-FUが放出されていることがわかった。Peg/5-FU/LDHの面間隔値は変化せず、FT-IRスペクトル図からPeg由来の吸収が観察された。これらの結果から、PegはLDH層間へ取り込まれずLDHに吸着していると考えられた。

(4) 生体分子/5-FU/LDHの細胞毒性

ペプチド/5-FU/LDHの細胞毒性について、L929細胞を用いたコロニー形成法で検討し

た結果、5-FUの半数致死濃度 (LC_{50})を100%とした場合、5-FU/LDHは192%, CP1000/5-FU/LDHは767%となり、CP1000による修飾が有効であった (図8). とくにCP1000/5-FU/LDHの細胞毒性が高く、5-FUは細胞内へ効率的に転送されることが明らかとなった. 5-FUの細胞へ輸送は、LDHとの複合化による負電荷の反発の低減ならびにCP1000修飾によるリガンドとしての作用により向上すると考えられた. さらに、WST法を用いて、5-FUの薬効の発現時間について調べたところ、曝露時間12時間における細胞の生存率は、5-FU: 80%以上、5-FU/LDH: 60%, CP1000/5-FU/LDH: 20%となり、細胞のエンドサイトーシスによりCP1000/5-FU/LDHは細胞内へ取り込まれ、5-FUをLDHから放出していることが明らかとなった.

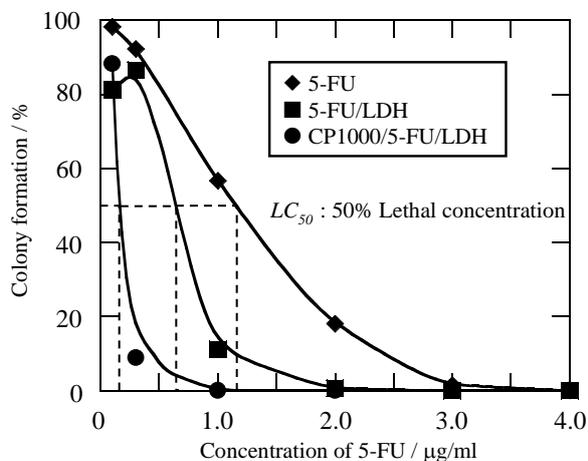


図8 L929細胞のコロニー形成率におよぼす生体分子/5-FU/LDHの影響

WST法による、CholならびにPeg/5-FU/LDHの細胞毒性試験を行った結果を図9 (L929細胞)ならびに図10 (HeLa細胞)に示す. ここでは、5-FU/LDHを基準とし、横軸は5-FUの添加量、縦軸は薬理効率すなわち細胞に対する5-FUの輸送効率を示している. L929細胞に対する5-FUの薬理効率は、Peg/5-FU/LDH: 2.2倍、CP1000/5-FU/LDH: 4.0倍、Chol/5-FU/LDH: 12倍に向上することが明らかとなった. とくに、Chol/5-FU/LDHは膜透過性をもつCholを修飾することでLDHの細胞膜透過性が改善され細胞内へ取り込まれやすくなると考えられた. 図10より、HeLa細胞に対する5-FUの薬理効率は、5-FU: 0.75倍、Chol/5-FU/LDH: 1.5倍、Peg/5-FU/LDH: 2.4倍となり、生体分子の修飾によりHeLa細胞への5-FUの輸送効率が向上した. L929細胞に対して高い毒性を示したChol/5-FU/LDHは、5-FU/LDHの1.5倍であった. L929細胞とHeLa細胞でこのような違いが生じた理由としては、細胞膜への吸着性や膜タンパク質の構造が異なるためと考えられた. また、粒度分布から、LDH表面をPegにより修飾することで、

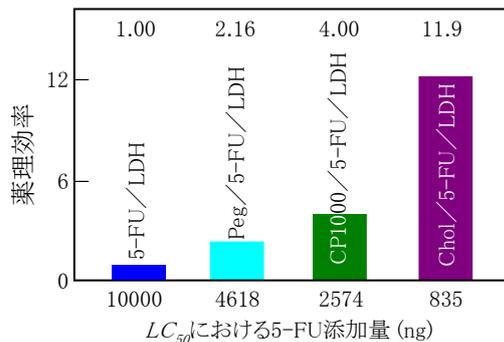


図9 各種5-FU/LDHの細胞毒性 (L929細胞)

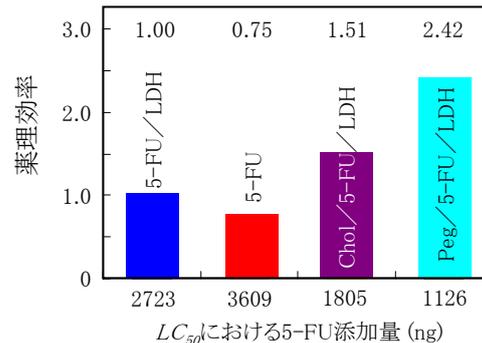


図10 各種5-FU/LDHの細胞毒性 (HeLa細胞)

凝集しているLDHの二次粒子が一次粒子に解砕されやすい、つまりLDHの分散性も影響することが示唆された. そのため、Peg/5-FU/LDHは細胞の種類に関係なく薬理効率が向上すると考えられた.

(5)まとめ

本研究により、図11に示したとおり、LDHの薬物や生体分子を輸送するキャリアとしての可能性を見出すことができた. しかし、LDHをはじめ粘土化合物や各種無機材料をDDS材料として捉えた研究はまだ少なく、実用化へ展開するには、ターゲティングや徐放制御などの新たな機能付与、細胞へのLDHの取り込み挙動の解明、*in vivo*による検討などの課題が多く残されており、今後はこれらを解決するための戦略が必要である.

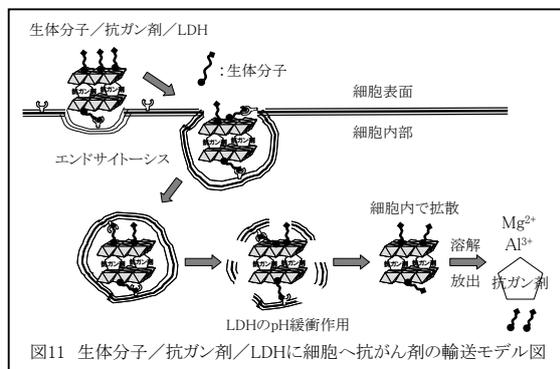


図11 生体分子/抗ガン剤/LDHに細胞へ抗がん剤の輸送モデル図

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2件)

1. 會澤純雄, 医薬成分のキャリアとしての層状複水酸化物, 粘土科学, 48, 137-144 (2009) 査読無
2. A. Yasutake, S. Aisawa, N. Kobashi, S. Takahashi, H. Hirahara, E. Narita, Intercalation Behavior of 5-Fluorouracil into Mg-Al Layered Double Hydroxide, Clay Science, 4, 49-54 (2008) 査読有

[学会発表] (計13件)

1. 會澤純雄, 成田榮一, 抗がん剤/層状複水酸化物ナノ複合体の合成とその細胞輸送特性, 資源・素材学会 平成22年度春季大会, 東京大学生産技術研究所, 2010.3.30
2. 會澤純雄, 熊坂惇, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 表面修飾した抗がん剤/層状複水酸化物の合成とその細胞増殖抑制効果, 日本化学会第90春季年会, 近畿大学, 2010.3.27
3. 會澤純雄, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, ペプチド/抗がん剤/層状複水酸化物複合体の合成とその細胞増殖抑制効果, 無機マテリアル学会第119回学術講演会, 大垣市情報工房スィンクホール, 2009.11.6
4. 會澤純雄, 生体分子/層状複水酸化物ナノ複合体の合成とその細胞への取り込み, 平成21年度化学系学協会東北大会 第2回ナノマテリアルコロキウム, 日本大学工学部 (郡山市) 2009.9.20
5. 會澤純雄, 平原英俊, 成田榮一, 層状複水酸化物を用いたドラッグ・デリバリー・システム, 第53回粘土科学討論会, 岩手大学, 2009.9.11
6. 熊坂惇, 安武愛子, 會澤純雄, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 抗がん剤/層状複水酸化物ナノ複合体の合成とその細胞毒性, 第53回粘土科学討論会, 岩手大学, 2009.9.11
7. 會澤純雄, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, ペプチド/5-フルオロウラシル/層状複水酸化物の合成とその細胞増殖抑制効果, 第25回日本 DDS 学会学術集会, 東京ドームホテル, 2009.7.3
8. A. Yasutake, S. Aisawa, H. Hirahara, S. Takahashi, E. Narita, Peptide-embellished 5-FU/LDH Nanohybrid Particles for Drug Delivery System, The 14th International Clay Conference 2009, Castellaneta Marina, Italy, 2009.6.14
9. S. Aisawa, A. Yasutake, H. Hirahara, S. Takahashi, E. Narita, Synthesis and Cellular Uptake of Peptide Modified 5-Fluorouracil/Layered Double Hydroxide

Nanohybrid, 15th International Symposium on Intercalation Compounds, Tsinghua University, Beijing, China, 2009.5.11

10. A. Yasutake, S. Aisawa, N. Kobashi, S. Takahashi, H. Hirahara, E. Narita, Application of 5-Fluorouracil Intercalated Layered Double Hydroxide for Drug Delivery System, 6th International Conference on Inorganic Material, Dresden, Germany, 2008.9.30
11. 會澤純雄, 小橋直将, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 5-フルオロウラシル/層状複水酸化物複合体の合成とその細胞増殖抑制効果, 第52回粘土科学討論会, 沖縄ポートホテル, 2008.9.4
12. 會澤純雄, 小橋直将, 安武愛子, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 5-fluorouracil/層状複水酸化物複合体の合成とその細胞毒性試験, 第24回日本 DDS 学会学術集会, 六本木アカデミーヒルズ, 2008.6.29~30
13. 安武愛子, 會澤純雄, 高橋諭, 平原英俊, 成田榮一, 無機層状化合物へのペプチド類の取り込み挙動, 無機マテリアル学会第116回学術講演会, 首都大学東京, 2008.6.6

[その他]

ホームページ等

http://www.eng.iwate-u.ac.jp/jp/seeds/docs/sumio_AISAWA_1.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

會澤 純雄 (AISAWA SUMIO)
岩手大学・工学研究科・助教
研究者番号: 40333752