

機関番号：32612

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790041

研究課題名 (和文) 炎症性疾患治療を目的とした機能性高分子を用いた
ナノ微粒子キャリアの開発研究課題名 (英文) Development of nanoparticles using intelligent polymers
as a treatment for inflammatory disease

研究代表者

綾野 絵理 (AYANO ERI)

慶應義塾大学・薬学部・研究員

研究者番号：10424102

研究成果の概要 (和文)：生分解性ポリマーであるポリ乳酸(PLA)及び温度応答性ポリマーである poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を用いて PNIPAAm-PLA/PLA ブレンドナノ粒子(温度応答性ナノ粒子)を作製した。温度応答性ナノ粒子は、LCST を境に低温側では水和層形成によりステルス性を備え、粒子表面が疎水性になることにより、細胞取り込み効率が向上する粒子を作製することができた。本研究では炎症性疾患に使用するリン酸ベタメタゾンを含封し、薬物放出実験、血清タンパクとの安定性、細胞内への取り込み観察を行った。温度応答性ナノ粒子は、温度による取り込み制御が可能な DDS 製剤であることが示された。

研究成果の概要 (英文)：We designed the temperature-responsive and biodegradable block copolymer, poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-DL-lactide) (PNIPAAm-*co*-PLA) was synthesized by ring-opening polymerization of DL-lactide and used as a carrier for an ideal drug delivery system. PNIPAAm exhibits a thermally reversible phase transition in aqueous solution at 32 °C. This transition temperature is called the lower critical solution temperature (LCST). When the temperature is below the LCST of the thermo-responsive block, nanoparticles are formed with the hydrated outer shell and the hydrophobic inner core. When the temperature exceeds the LCST, the outer shell shrinks and becomes hydrophobic. Our temperature-responsive nanoparticles successfully exhibited thermo-responsive drug release and cellular uptake while possessing biodegradable character.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：インテリジェントポリマー、DDS、ナノ粒子、PNIPAAm、相転移温度、PLA

1. 研究開始当初の背景

(1)これまで、薬物の標的部位への到達性と滞留性の向上、より精密な薬物放出制御の実用化のため、生体適合性・生分解性のポリ乳酸/ポリグリコール酸(PLA/PLGA)をコアとする

ナノスフェアをドラッグデリバリーのキャリアとして研究してきた。ナノサイズに設計することで EPR (Enhanced Permeability and Retention) 効果により血管透過性の亢進した関節リウマチ滑膜組織などの炎症組

織に特異的に分布することを明らかにしている。また、網内系(RES)への取り込みを抑制して、血中滞留性を向上させるために親水性ポリエチレングリコール(PEG)を付加してステルス化を図った製剤に関する研究も種々されていて、関節炎モデルでの薬効等の評価がなされている (Arthritis Rheum 56:S389 (2007))。

(2)申請者は、水中において低温側では水和伸展し親水性に、高温側では脱水和収縮し疎水性へと構造変化を起こす温度応答性高分子である Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)を利用した溶出制御に成功している(J. Chromatogr. A, 1119, 51 (2006); J. Sep. Sci., 29, 738 (2006))。また、pH等の周囲の環境変化を認識する機能を付加し、温度に応答して疎水性と荷電性の二つの性質を制御できる環境応答性高分子の分子設計も行っている(J. Chromatogr. A, 1119, 58 (2006))。申請者はこれまで新規に機能性高分子を分子設計し、これを利用した新しい分離システムを開発し、世界に先駆けた研究を行ってきた。また、PNIPAAmとPLAのブロック共重合体を分子設計し、PLAと混合することにより、コア部がPLA、シェル部がPNIPAAmから成る温度感受性機能を有する粒子設計も行っている。

2. 研究の目的

病変部位への薬物のターゲティングに加え、局所での薬物の放出制御機能を兼ね備えた、ナノ微粒子製剤の開発を行う。温度応答性高分子を薬物キャリアに応用することで、インテリジェントなナノ微粒子製剤が可能となる。また、これらを用いて局所での細胞内取り込み機構についての解明を進めるとともに、ナノ粒子の選択的な局所標的化の効率をあげるため、特異的なリガンドの付加を検討し、次世代のナノDDS製剤として実用化を目指す。薬物としてステロイドあるいは免疫抑制剤を用いたナノ微粒子を開発することで、関節リウマチ、気管支喘息、潰瘍性大腸炎などの慢性炎症性免疫疾患の画期的な治療法確立を目指す。

副作用を軽減してコンプライアンスも向上するDDS製剤のような患者に優しい薬剤の開発は、臨床現場から待ち望まれており、医療界に与える恩恵は非常に大きい。これまでにリポソーム製剤、高分子ミセル製剤や固体微粒子製剤等が血中投与用のDDS製剤として開発されており、標的組織へのターゲティング能の向上は確認されているが、標的組織に到達後の薬物の分布や放出に関しての知見は少なく、製剤として更なる創意工夫が必要であると考えられる。本研究では、炎症・免疫疾患を対象に病変部位へのターゲッ

ティング機能、及び病変局所での薬物徐放機能を兼ね備えたインテリジェントなナノ微粒子製剤を独自の手法により開発し実用化することを目的とする。PLA/PLGAの粒子と、温度応答性高分子または、pH等の周囲の環境変化を認識する機能を付加した環境応答性高分子を結合させた薬物キャリアを作製し、新規なインテリジェントなナノ微粒子製剤を開発する。

本研究の特色は、炎症組織への標的化と、特に薬物放出能制御が自由にコントロールできるナノ微粒子を分子設計できることである。高分子ミセルが親水性ポリマーと疎水性ポリマーからなるブロックポリマーから形成されているのに対し、本研究では疎水性からなるナノ微粒子の表面を疎水性ポリマーと親水性ポリマーとのブロックコポリマーにより修飾した微粒子を調整する。疎水性ポリマーには生分解性ポリ乳酸(PLA)を用い、親水性ポリマーに温度応答性高分子のPNIPAAm、あるいはそれに荷電性の機能を付加させた環境応答性高分子を用いることで、生体内の温度変化、あるいはpH等の内部環境変化に応答した薬物放出のON-OFF制御が可能となり、DDS製剤の拡大が期待される。また、合成高分子を利用するため、モノマーの選択段階で機能を予測できるなどの利点もある。このことは患者個々に対して最適なテーラーメイド治療を実現するための重要な基盤としても期待される。

3. 研究の方法

(1)新規インテリジェントなナノ微粒子の調整
①PNIPAAm-PLA, Poly(NIPAAm-co-DMAPAAm)-PLAブロック共重合体の合成

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm)は水中において低温では水分子と水和することで親水性を示すが、32°Cの相転移温度(LCST)を境に水分子が脱水和し、疎水性へと可逆的な変化を起こす機能性高分子である。PNIPAAmをナノ粒子に応用することにより、体内の温度変化や外部からの過熱により自動的に、あるいはリモートコントロールで薬物の放出制御が可能となると考えられる。申請者は、主に低分子薬物を運搬する対象物として考えている。これらの低分子薬物は、親水性・疎水性のバランスだけではなく、イオン性解離基を有するものもたくさん存在する。そのため、これまでのDDS技術で重要であった、親水性・疎水性のバランスによる疎水性相互作用のみならず静電的相互作用を利用した機能展開をしていくことも重要となる。そこで、本研究ではカチオン性モノマーでありpHに依存する*N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm)をPNIPAAmと共重合させ、ナノ粒子に応用した。

末端に水酸基を有する PNIPAAm、Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm) を、連鎖移動剤に 2-mercaptoethanol、開始剤に azobisisobutyronitrile (AIBN) を用いてラジカル重合により作製した。これを GPC により分子量測定を行った。さらに、500nm での透過率変化測定により、相転移温度 Lower Critical Solution Temperature (LCST) の測定を行った。これと、DL-lactide を開管重合により、触媒に tin(II)2-ethylhexanoate を用いることで PNIPAAm-PLA ブロック共重合体を作製した。また、NMR により PNIPAAm-PLA および Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm)-PLA ブロック共重合体の確認を行った (PNIPAAm: 4.0 ppm, PLA: 5.2 ppm)。

②温度応答性ナノ粒子の作製

PNIPAAm-PLA および Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm)-PLA ブロック共重合体と PLA ホモポリマーをブレンドし、薬物としてリン酸ベタメタゾンをアセトンに溶解し、水に滴下することで O/W 型溶媒拡散法にナノ粒子を調整した。これにより、コア部に PLA、シェル部に PNIPAAm および Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm) から成るコア-シェル型の温度応答性ナノ粒子を作製した。薬物として使用したリン酸ベタメタゾンは、水溶性薬物であるため、亜鉛と錯体を作らせることで、効率よく粒子内に封入させた。封入率は HPLC により測定した。

(2) 温度応答性ナノ粒子の物性評価

作製したナノ粒子をリン酸バッファーで希釈、温度変化による粒径及び電位変化を測定した (Malvern Instrument Ltd, Zetasizer Nano-ZS)。また、透過率変化測定により血清中での安定性評価を行った。さらに、温度依存性の薬物放出挙動の検討のため、内封薬物濃度を一定に調整、経時的にサンプリングを行い、粒子内残存薬物量を HPLC により測定した。

(3) ナノ粒子の細胞への取り込みによる局在観察

マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7 細胞) を 1×10^6 cell/mL/well で播き、Fluorescein 標識ナノ粒子を添加、LCST より低温側の 30°C、高温側の 37°C、5% CO₂ 下で培養した。培養後、蛍光顕微鏡観察及び蛍光強度をプレートリーダーで定量し、ナノ粒子の細胞内局在についての知見を得る。

4. 研究成果

(1) 新規インテリジェントナノ微粒子

① PNIPAAm-PLA, Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm)-PLA ブロック共重合体の合成

末端に水酸基を有する PNIPAAm、Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm) を、ラジカル重合によ

り作製した。GPC により分子量を測定した結果、分子量 10000 の高分子を合成することができた。また、透過率測定により LCST を求めたところ、PNIPAAm は 34°C、Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm) は 37.2°C であった。DMAPAAm はカチオン性モノマーであるため、PNIPAAm に共重合させることにより、PNIPAAm より LCST が高くなったものと考えられる。

さらに、これら高分子と DL-lactide との開管重合により PNIPAAm-PLA および Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm)-PLA ブロック共重合体を作製し、NMR により確認した。

②温度応答性ナノ粒子

PNIPAAm-PLA および Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm)-PLA ブロック共重合体と PLA ホモポリマーをブレンドし、O/W 型溶媒拡散法により、温度応答性ナノ粒子を作製した(それぞれ PNIPAAm 粒子、DMAPAAm 粒子とする)。温度応答性ナノ粒子はコア部に PLA、シェル部に PNIPAAm および Poly (NIPAAm-co-DMAPAAm) から成るコア-シェル型であると考えられる。また、封入したリン酸ベタメタゾンは水溶性薬物であり、通常は疎水性の強いコア部には封入されにくい。しかし、亜鉛と錯体を作らせることにより、リン酸ベタメタゾンを疎水化し、効率よく粒子内に薬物を封入することができた (J. Control. Release 105, 68 (2005))。(図 1)

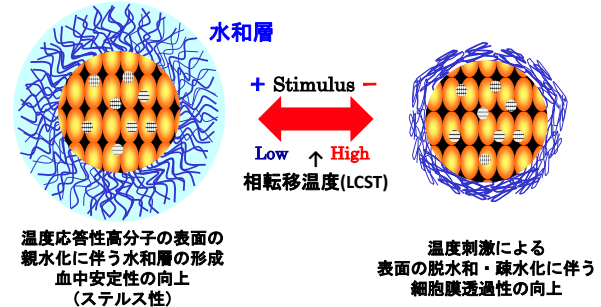


図 1 温度応答性ナノ粒子

(2) 温度応答性ナノ粒子の物性評価

①温度変化による粒径及び電位変化

作製されたナノ粒子の粒径を Zetasizer Nano-ZS を用いて測定したところ、PNIPAAm 粒子、DMAPAAm 粒子いずれも 150nm の粒径を有するナノ粒子が作製された。また、本研究で使用されているナノ粒子は、温度にตอบสนองするため、10~50°C まで温度変化を加えながら粒径の測定を行った。PNIPAAm 粒子は温度上昇に伴い大きな粒径の変動はみられなかった。しかし、DMAPAAm 粒子では温度上昇により急激な粒径の変化が確認された。DMAPAAm を導入したことにより静電的な力が働き、凝集が生じたものと考えられる。一般に、粒子同士の凝集を抑制するために必要な

と電位は±10 mV 以上だと言われている。DMAPAAm を導入したことで電位の上昇がみられ、プラスの荷電が生じたが、温度上昇に伴い電位の絶対値の減少が生じたことも凝集の原因と考えられる。

と電位変化においても、10～50℃まで温度変化を加えながら測定した。PLA のみで作製した PLA 粒子と、PEG で表面修飾した PEG 粒子を対照として測定した。低温状態では PLA 粒子は強いマイナスチャージを示し、PEG 粒子、PNIPAAm 粒子は表面が親水性による水和層により中性付近の電位を示した。また、DMAPAAm 粒子は DMAPAAm のカチオン性モノマーの影響によりプラスチャージを示した。PLA 粒子は温度上昇に伴い電位があがっていくのに対し、PNIPAAm 粒子、DMAPAAm 粒子のいずれの温度応答性ナノ粒子も温度上昇に伴い低下する傾向が見られた。しかし、PEG 粒子は温度変化による電位の変化は見られなかった。PLA はカルボキシル基を有するため PLA 粒子は強いマイナスチャージを示したと考えられる。一方、PEG や PNIPAAm など表面修飾したナノ粒子ではその電荷がマスクされ、電位が上昇し中性付近の電位を示したと考えられる。温度応答性ナノ粒子で温度の上昇に伴い電位の低下が見られたのは、表面の PNIPAAm 鎖が収縮し、PLA が粒子表面に露出した結果、電位の低下が起こったものと考えられる。これらの結果から、温度応答性高分子を導入することで、粒子表面の温度による性質制御が可能であることが示された。

②血清中安定性評価

ナノ粒子が安定に溶液中に分散していると、溶液が白濁するため吸光度は高値を示すが、粒子が血清タンパクと結合・凝集を起こすと沈殿が生じ、上部の溶液の透過性が上がるため、吸光度は低下する。つまり、高い吸光度を維持し続ける粒子は、血清タンパクとの相互作用が小さく、ステルス性が高いと言える。

血清中安定性試験では、PNIPAAm 粒子は温度による表面特性変化を示し、LCST 以下の 30℃では PEG 粒子同様血清中で安定に分散していたが、LCST 以上の 37℃では血清との凝集体を形成し、沈殿が生じた。これは、粒子表面に導入した PNIPAAm の温度による性質変化に起因したものと考えられる。PNIPAAm をブレンドしたナノ粒子は、LCST 以下では粒子表面に水和層を形成、PEG 同様血清タンパクとの相互作用を抑制しステルス性を示すが、LCST 以上になると PNIPAAm の脱水和により水和層が消失、疎水表面となりステルス性を失ったと考えられる。

③薬物放出挙動

PNIPAAm 粒子の温度による薬物放出挙動を確認するため、37℃ (>LCST)、30℃ (<LCST)、4℃(保存温度)の3点で薬物放出挙動を測定した。保存温度である 4℃ではいずれのナノ粒子でも薬物放出が起こらないことが明らかとなり、安定にナノ粒子を保存できていることが確認された。

LCST 以上の 37℃では PLA 粒子や PEG 粒子が薬物放出を起こさないのに対し、PNIPAAm 粒子は素早い放出を示した。LCST 以上では PNIPAAm が脱水和を起こすことで、粒子に歪みが生じ、その歪みに起因した薬物放出が生じたと考えられる。一方、LCST 以下の 30℃において PNIPAAm 粒子は、他粒子同様、薬物放出の抑制がみられた。PNIPAAm が粒子表面に水和層を形成し、安定な粒子を保つことで、封入薬物を安定に保持していたと考えられる。以上のことより、PNIPAAm 粒子は温度による薬物放出制御が可能であることが示された。

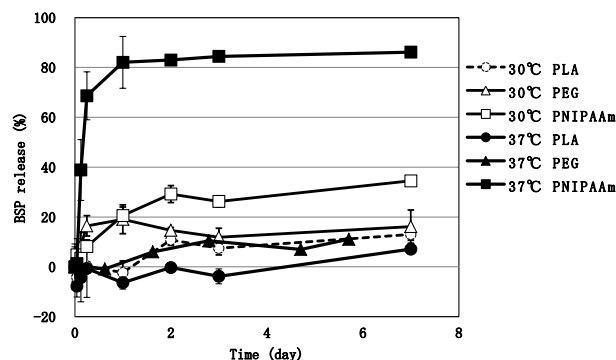


図2 ナノ粒子の温度による薬物放出挙動

(3) ナノ粒子の細胞への取り込みによる局在観察

蛍光色素 (Fluorescein) 標識ナノ粒子を作製し、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264.7) へ取り込ませ、蛍光顕微鏡により局在観察を行った。細胞は脂質二重膜からなり、親水性物質は透過し難く、疎水性物質は透過しやすいという性質を有する。そこで、PNIPAAm 粒子の温度による性質変化により、細胞膜透過性が制御可能であるかについて検討した。細胞への取り込みは、LCST 以下の 30℃と LCST 以上の 37℃で行った。

蛍光標識化 PNIPAAm 粒子の RAW264.7 細胞への取り込みは、37℃では確認されたが 30℃では確認されなかった。一方、蛍光標識化 PEG 粒子では両温度ともに取り込みが確認されず、蛍光標識化 PLA 粒子では両温度で取り込みが確認されたことから、PNIPAAm 粒子は温度による取り込み制御が可能であることが示された。これは、粒子表面に導入した

PNIPAAm の温度による性質変化に起因し、LCST 以下では粒子表面に水和層を形成、細胞膜透過性が低下するが、LCST 以上では疎水性へと変化し、細胞膜透過性が向上したものと考えられる。

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2件)

- ① Tadashi Nishio, Eri Ayano, Yusuke Suzuki, Hideko Kanazawa, Teruo Okano. Separation of phosphorylated peptides utilizing dual pH- and temperature-responsive chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1218, 2079-2084 (2011), 査読有.
- ② Tsutomu Ishihara, Tetsushi Kubota, Tesu Choi, Miyuki Takahashi, Eri Ayano, Hideko Kanazawa, Megumu Higaki. Polymeric nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate with different release profiles and stealthiness. *Int. J. Pharm.*, 375, 148-154 (2009), 査読有.

[学会発表] (計12件)

- ① 上田康弘、綾野絵理、金澤秀子、岡野光夫。温度による薬物放出制御を目的とした機能性リポソームの基礎的検討。第53回日本薬学会関東支部。2010年10月2日。東京。
- ② 唐木美由紀、綾野絵理、西尾忠、金澤秀子、岡野光夫。機能性高分子を用いた新規ナノ粒子製剤の開発。第26回ライフサポート学会大会(WWLS2010)。2010年9月18日-20日。大阪。
- ③ 唐木美由紀、綾野絵理、西尾忠、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫。細胞内デリバリーを目的とした温度応答性ナノ粒子の表面特性評価。バイオメディカル分析科学シンポジウム2010。2010年7月21日-23日。松島。
- ④ 上田康弘、綾野絵理、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫。温度による薬物放出制御を目的とした機能性リポソームの物性評価。バイオメディカル分析科学シンポジウム2010。2010年7月21日-23日。松島。
- ⑤ Hideko Kanazawa, Tadashi Nishio, Eri Ayano. Dual Temperature and pH-Responsive Chromatography Utilizing Functional Polymer. 35th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC2010). June 19 - 24, 2010. Boston, USA.
- ⑥ 唐木美由紀、綾野絵理、小林浩規、坂本千賀子、西尾忠、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫。温度応答性高分子を用いた新規ナノ粒

子製剤の開発。第26回日本DDS学会学術大会。2010年6月17日-18日。大阪。

- ⑦ 上田康弘、石川真、坂本千賀子、綾野絵理、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫。機能性高分子を用いた温度応答性リポソームの薬物放出及び細胞取り込み制御。第26回日本DDS学会学術大会。2010年6月17日-18日。大阪。
- ⑧ 唐木美由紀、綾野絵理、坂本千賀子、西尾忠、金澤秀子、岡野光夫、檜垣恵。温度応答性高分子を用いたナノ粒子製剤の開発。日本薬学会第130年会。2010年3月28日-30日。岡山。
- ⑨ Cikako Sakamoto, Makoto Ishikawa, Yasuhiro Ueda, Miyuki Karaki, Fei-Ru Hsiao, Eri Ayano, Hideko Kanazawa, Teruo Okano. TEMPERATURE-DEPENDENT DRUG RELEASE UTILIZING FUNCTIONAL POLYMER INTRODUCED LIPOSOME. Asian Federation for Pharmaceutical Sciences 2009. October 15 - 18, 2009. Fukuoka, Japan.
- ⑩ 唐木美由紀、綾野絵理、坂本千賀子、金澤秀子。細胞内デリバリーを目的としたナノ粒子の表面特性評価。日本分析化学会第58年会。2009年9月24日-26日。札幌。
- ⑪ 上田康弘、石川真、坂本千賀子、綾野絵理、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫。温度応答性リポソームの温度による薬物放出制御。第22回バイオメディカル分析科学シンポジウム。2009年7月15日-17日。岐阜。
- ⑫ 綾野絵理、唐木美由紀、小林浩規、坂本千賀子、西尾忠、金澤秀子、檜垣恵、岡野光夫。温度応答性高分子を用いた新規ナノ粒子製剤の開発。第25回日本DDS学会学術大会。2009年7月3日-4日。東京。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

綾野 絵理 (AYANO ERI)
慶應義塾大学・薬学部・研究員
研究者番号：10424102

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし