

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03827

研究課題名(和文) 表面機能化微粒子の設計と免疫細胞との相互作用制御

研究課題名(英文) Preparation of surface-functionalized particles and their interaction with immune cells

研究代表者

菊池 明彦 (KIKUCHI, Akihiko)

東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・教授

研究者番号：40266820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、微粒子の形状(球・ロッド)、表面の親水性/疎水性、特異的リガンドの有無を変化させた温度応答性微粒子と、初期免疫に関わるマクロファージとの相互作用を明らかにすることを目的にした。表面物性によらず微粒子がロッド形状では胞への取り込みは抑制された。一方、球状微粒子では、表面が疎水性になるほど細胞への取り込みは増大することが明らかになった。マクロファージはマンノース受容体を有することから、マンノースを微粒子最表面に導入すると、球状でかつ表面が疎水性の微粒子よりもはるかに多い微粒子の取り込みが起こることが明らかになった。本研究の成果は、マクロファージへの選択的薬物送達に役立つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、温度刺激という単純な物理刺激を用いることで、微粒子の形状や表面物性を制御しうる材料設計を行なった。初期免疫を司るマクロファージと微粒子との相互作用を、物理刺激の制御のみでコントロールできる可能性を示した本研究成果は、マクロファージへの選択的薬物送達の可能性を見出しただけでなく、用いる薬物によってはマクロファージの生物活性を制御しうる可能性があることから、がん免疫を改善しうる可能性がある、学術的にも社会的にも意義のある成果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to clarify the interaction between macrophages, which are involved in early immunity, and temperature-responsive nanoparticles with different shapes (spheres or rods), hydrophilic/hydrophobic surfaces, and the presence or absence of specific ligands. Regardless of surface properties, rod-shaped nanoparticles inhibited uptake into macrophages. On the other hand, it was revealed that for spherical microparticles, the more hydrophobic the surface, the greater the uptake into cells. Because macrophages have mannose receptors, it was elucidated that introducing mannose to the outermost surface of particles resulted in the uptake of much more nanoparticles than spherical nanoparticles with hydrophobic surfaces. The results obtained from this study are considered to be useful for selective drug delivery to macrophages.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：温度応答性 コア-コロナ型微粒子 表面物性 微粒子形状

## 1. 研究開始当初の背景

マクロファージは微粒子の表面物性 (E. Ayano, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **99**, 67 (2012))、形状 (J. A. Champion, S. Mitragotri, *PNAS*, **103**, 4930 (2006))、硬さ (K. A. Benigo, Y. I. Wang, *J. Cell Sci.*, **115**, 849 (2002)) などを認識し、粒子の貪食能が変化することが報告されている。さらに Mitragotri らは微粒子の形状が細胞への取込みに大きく影響し、素材は全く同じポリスチレン、あるいはポリ(ラクチド-グリコリド)であるものの、その形状が球状の微粒子とロッド状微粒子とで細胞への取り込みが変化し、球状微粒子がより選択的に貪食されることを示している (E.C. Cho, *et al.*, *Small*, **6**, 517 (2010), J. W. Yoo, S. Mitragotri, *PNAS*, **107**, 11205 (2010))。薬物キャリアとして用いられるリポソームや、高分子ミセル、などに代表されるナノ粒子 (200nm 以下) (A. Z. Wilczewska, *et al.*, *Pharmacol. Rep.*, **64**, 1020 (2012), H. Cabral, K. Kataoka, *J. Control. Rel.*, **190**, 465 (2014)) に比べ、これら微粒子のサイズは十分大きく、数 $\mu\text{m}$ 程度で取り込みが極大となることが知られる (K. Hirota, *et al.*, *J. Control. Rel.*, **119**, 69 (2007))。

一方、これまでに、物理化学的な刺激によって微粒子の形態が変化することで細胞内への取り込み制御を実現した例はほとんどない。申請者らは、鎖長制御した高分子に重合性官能基を導入したマクロモノマーの調製と微粒子設計を行い、温度応答性コロナを有する粒径制御したナノ〜マイクロ微粒子を調製した (T. Matsuyama, *et al.*, *Langmuir*, **29**, 15770 (2013))。さらに、コアのガラス転移温度( $T_g$ )を制御した微粒子設計を行い、球状、ロッド状微粒子の調製と、温度変化に伴う形状変化を明らかにした (T. Matsuyama, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **123**, 75 (2014))。この技術を活用し、前回助成を受けた科学研究費補助金 (H1603184, H28-30) にて形状変化する温度を生理的な温度である 37°C よりも高くし、表面物性が同温度で親水性、疎水性、境界状態、の3種の球状、ロッド状微粒子を調製し、表面物性と形状が貪食に与える影響を調査し、形状が貪食に与える影響が大きいことを見出した。一方、細胞とこれら粒子との相互作用を検討する際、細胞の代謝の影響や、細胞膜上に存在するリガンドとの相互作用が貪食に与える影響は明らかでない。また、将来的に細胞への薬物送達などを目指す場合、分解性を有する温度応答性微粒子の調製が求められる。

## 2. 研究の目的

本申請で推進する研究では、コア  $T_g$  もしくは融点 ( $T_m$ ) を生理的な温度付近に有し、加温によりロッド状から球状に変化するとともに、表面物性を親水性から疎水性へと変化させる微粒子の細胞への取り込みに与える細胞代謝系の影響を明らかにするとともに、形状と表面物性の変化が、生体免疫に与える影響を明らかにすることで、免疫細胞と薬物キャリアとの相互作用に与える薬物キャリアである微粒子の特性に関する重要な知見が得られると考えた。さらに、マクロファージへの微粒子の動的な取り込み制御を目指し、マクロファージの細胞膜表面に存在するマンノースレセプター (A. K. Azad, *et al.*, *J. Cytol. Mol. Biol.*, **1**, 5 (2014)) との特異的相互作用を発現する温度応答性微粒子を新規に設計し、細胞と微粒子との相互作用に与える特異相互作用の効果を明らかにすることを目的にした。

## 3. 研究の方法

(1) 温度応答性微粒子の調製: クロロメチルфтаルイミドを開始剤に用い、所定量の *N*-イソプロピルアクリルアミド (NIPAAm) と *N,N*-ジメチルアクリルアミド (DMAAm) を室温下で所定時間原子移動ラジカル重合を行い、メルカプトプロピオン酸を加えて反応停止した。開始末端のヒドラジン分解によりアミノ末端基に変換後、メタクリロイルクロリドと反応させ、開始末端にメタクリルアミド基を導入した。さらに、成長末端にマンノースを導入したマクロモノマー (MA-PID-mannose) を合成した。各反応は、 $^1\text{H}$  NMR もしくは  $^{13}\text{C}$  NMR で構造解析するとともに、ゲル浸透クロマトグラフィーで分子量と分子量分布を見積もった。また 500nm での温度変化に伴うマクロモノマー水溶液の透過率変化から、マクロモノマーの下限臨界溶液温度 (LCST) を決定した。

次に、コアのガラス転移温度を制御するため、プロピルメタクリレート (PMA)、メチルメタクリレート (MMA) をその仕込み組成を制御して MA-PID-mannose と分散共重合しコア-コロナ型微粒子を調製した。このとき、水/メタノール混合溶媒を用いることで、重合と同時に微粒子形成を行った (M. Akashi, *et al.*, *J. Appl. Polym. Sci.*, **391**, 2027 (1990), T. Matsuyama, *et al.*, *Langmuir*, **10**, 15770 (2013), T. Matsuyama, *et al.*, *Coll. Surf. B*, **123**, 75 (2014))。得られた微粒子の粒径は動的な光散乱法を用いて解析した。また、走査型電子顕微鏡観察により微粒子形状を明らかにした。

(2) ロッド状微粒子の調製: 平均重合度 500 のポリビニルアルコール (PVA) 水溶液に微粒子を混和、分散させ、フラットシャーレ中に展開し乾燥させることで微粒子含有フィルムを作成した。PVA フィルムを短冊状に切断し、ヒートガンで 60°C に加温しながら一軸延伸し、その後、冷水中で PVA を溶解除去後遠心分離することでロッド形状にした微粒子を得た。微粒子の形状は、走査型電子顕微鏡観察により明らかにするとともに、長軸/短軸比(アスペクト比)を決定した。

(3) 形状、表面物性の異なる微粒子とマクロファージとの相互作用解析：表面物性、形状、マンノースの有無等、種々異なる物性を有する微粒子を、マウス単球由来マクロファージ(RAW264.7)の培養系に、24 h 作用させ、Lyso Tracker により微粒子を貪食した細胞のリソソーム蛍光強度と同視野内で無蛍光の細胞の蛍光強度比から、微粒子の取り込み挙動の比較を行った。

#### 4. 研究成果

本研究では、形状と表面物性を制御した微粒子を用い、これら微粒子を貪食する初期免疫を司る免疫細胞の機能と貪食との相関を明らかにすることを目的にした。本研究推進期間に以下の点に焦点を当てて、研究を遂行した。研究成果の概要を述べる。

(1) 分解性コアを有する微粒子の調製：主鎖に分解性ポリエステルであるポリ(ε-カプロラクトン)、側鎖に親水性ポリエチレングリコールを有するグラフトポリマーをラジカル重合で合成した。この高分子と融点制御した分岐型ポリカプロラクトンを種々混合比のもとで混合した溶液から微粒子を調製し、一軸延伸することでロッド状微粒子を得た。得られた球状微粒子とロッド状微粒子をマクロファージ細胞と培養すると、ロッド状微粒子に比して球状微粒子がより細胞内に取り込まれることが明らかになった。ロッド状にすることで微粒子表面の親水性高分子鎖密度が多少変化していることが考えられるが、基本的に微粒子表面は親水性である。上記の結果は、マクロファージは微粒子表面が親水性であっても、形状をより強く識別し、球状微粒子を優先的に細胞内に取り込むことが明らかになった。

(2) マンノース残基を有する温度応答性マクロモノマーの合成：マクロファージや樹状細胞など初期免疫を司る細胞はマンノース受容体を有する。そこで、マンノース残基を導入した温度応答性マクロモノマーの合成を行った。反応条件を制御することで、数平均分子量が約8,000でビニル基とカルボキシ基を定量的に導入した両末端官能性温度応答性高分子の合成に成功した(Table 1)。さらに、成長末端側のカルボキシ基にマンノースを導入し、その導入量とLCSTを調べた結果をTable 2に示す。Table 2の結果から、成長末端側カルボキシ基に定量的にマンノースを導入できたことが明らかになり、かつ、共重合組成を制御することで、マクロモノマー(MA-PID-mannose)のLCSTを37°C前後で制御できることも明らかになった。

Table 1. Characterization of Ph-PID-COOH.

Sample	NIPAAm:DMAAm (molar ratio)		$M_n$ [ $\times 10^4$ g/mol]*1	$M_n$ [ $\times 10^4$ g/mol]*2	$M_w/M_n$ *2	Vinyl[%]*1	COOH[%]*3
	Feed	Copolymer*1					
1	98:2	98:2	0.80	1.2	1.07	89.1	50.0
2	95:5	93:7	0.82	1.0	1.10	86.5	48.9
3	90:10	87:13	0.86	0.92	1.07	92.1	49.2
4	85:15	81:19	0.86	0.83	1.10	87.2	47.1
5	80:20	76:24	0.76	0.84	1.05	83.2	49.1

\*1 Determined by <sup>1</sup>H NMR

\*2 Determined by GPC

\*3 Determined by <sup>13</sup>C NMR

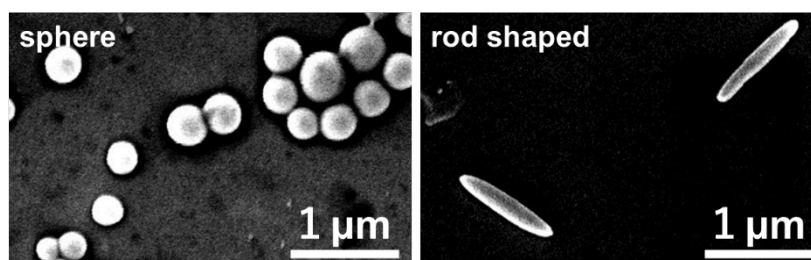
Table 2. LCST for different composition ratios MA-PID-mannose.

Sample	NIPAAm: DMAAm (copolymer ratio)	LCST [°C]*4	mannose group*1 [%]
1	98:2	35.5	46.0
2	93:7	38.5	48.5
3	87:13	41.0	47.4
4	81:19	47.7	46.8
5	76:24	51.5	45.4

(3) 温度応答性微粒子の合成：前項で調製したマンノースを導入したマクロモノマーと、疎水性モノマー(PMA/MMA)とを水/アルコール混合溶媒で所定時間重合を行い、温度応答性コアコロナ型微粒子を得た。疎水性モノマーの組成によらず、得られた微粒子の平均粒径は動的散乱測定から350~400 nm、走査型電子顕微鏡観察から340 nm程度で制御可能であることが明らかになった。これら微粒子の示差走査熱量解析を行い、コアのガラス転移温度( $T_g$ )を測定したところ、PMA/MMAの組成比に応じて、27°Cから52°Cの範囲で制御しうることも明らかになった。

(4) ロッド状微粒子の調製：微粒子を含有したPVAフィルムの一軸延伸と、その後のPVAの溶解除去により、ロッド状微粒子を得た。得られた微粒子の形状を確認したところ、**Figure 1**の結果を得た。この結果から、長軸／短軸比を求めたところ、3から4で制御できた。

得られたロッド状微粒子分散水溶液を、コアの $T_g$ 前後の温度でインキュベートしたところ、コア $T_g$ 以上の温度ではロッド状微粒子は短時間内に球状微粒子へと変化する一方、コア $T_g$ 以下の温度では、ロッド形状を24時間以上に渡り維持できることがわかった。



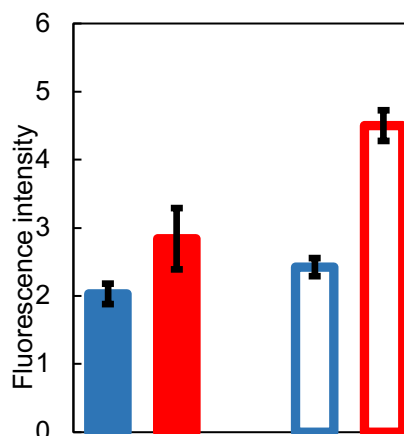
**Figure 1.** SEM images spherical and rod-shaped P(PMA-co-MMA)-g-PID-mannose.

(5) 形状、表面物性の異なる微粒子とマクロファージとの相互作用解析：前項目までで調製したコアのガラス転移温度( $T_g$ )を37°Cを境により低温、もしくは高温に有し、かつ微粒子表面のコロナ鎖の親水性、疎水性を体温近傍で制御した微粒子を用い、マクロファージ培養系に加え、24時間接触後の微粒子の取り込み挙動の確認を行なった。以前採択されていた科学研究費助成事業で実施した研究において用いた微粒子は約700 nmの粒径であったため、顕微鏡下で直接微粒子の取り込み挙動を確認することができたが、本研究で調製された微粒子は400 nm前後の粒径であったため、顕微鏡下で直接観察が困難であった。そこで、細胞内リソソームを検出する蛍光色素であるリソトラッカーを用い、微粒子と相互作用させた細胞を染色したところ、微粒子を相互作用させた場合のみ、強くリソトラッカーの蛍光が細胞から発せられた。そこで、リソトラッカーの蛍光強度を指標に、微粒子とマクロファージとの相互作用を解析することとした。具体的には、37°Cで①微粒子形状（球状／ロッド状）、②微粒子表面の親水性／疎水性の違い、③マンノース残基の有無、のそれぞれ異なる微粒子とマクロファージとの相互作用を解析した。

まず、微粒子の形状（球状／ロッド状）の影響を調べたところ、微粒子表面が親水性／疎水性いずれの場合も球状微粒子がより取り込まれ、ロッド状微粒子を取り込んだ細胞からのリソトラッカーの蛍光発光はそれほど大きい結果とならなかった。この結果は、これまでの研究で代表者らが明らかにした結果と同様であった。次に、微粒子表面の親水性／疎水性の影響を特に球状粒子で調べた結果を**Figure 2**に示す。マンノースが存在しない微粒子では、親水性微粒子に比べ、表面が疎水性の微粒子の取り込みがより多くなることわかる（**Figure 2**, closed bars）。すなわち、微粒子の形状と表面物性を制御すると微粒子と細胞との相互作用、細胞による食食挙動を制御しうることが明らかになった。

マクロファージは、マンノース受容体をその細胞膜に有することから、微粒子表面にマンノースを導入すると、微粒子表面物性とその形状が取り込みに与える影響にマンノースの存在がどのような影響を与えるかを検討した。その結果、**Figure 2**, open barsに示すように、マンノースの影響は特に疎水性球状微粒子の場合に大きく働き、疎水性球状微粒子よりもはるかに多い微粒子が取り込まれる（**Figure 2**, open red bar）ことがわかった。すなわち、マクロファージによる微粒子の取り込みには、微粒子の形状、表面物性、表面に固定した特異的リガンドの有無が大きく影響することが明らかになった。これらの微粒子の物性を効果的にコントロールすることで、マクロファージへの微粒子の選択的取り込みを制御しうることが示された。

以上の結果は、マクロファージへの微粒子の取り込み制御と同時に、ガン免疫治療における、マクロファージの活性化を行いうる薬物キャリアへの展開も考えるものと思われ、きわめて意義深い重要な基礎知見であると考えられる。



**Figure 2.** Fluorescent intensity changes of macrophages taken up spherical particles. Blue: HPL, Red: HPB, Closed: without mannose, Open: with mannose.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Komatsu Syuuhei, Yamada Satoshi, Kikuchi Akihiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Preparation of Degradable and Transformable Core/Corona-Type Particles that Control Cellular Uptake by Thermal Shape Change	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 ACS Biomaterials Science & Engineering	6. 最初と最後の頁 897 ~ 904
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsbmaterials.3c01554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 山田悟史、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 生体温度で変形可能な分解性コア - コロナ型微粒子の細胞取り込み挙動
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小松周平 山田悟史 菊池明彦
2. 発表標題 ロッド状分解性微粒子の調製と細胞との相互作用解析
3. 学会等名 第51回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生出 智宏、小松 周平、菊池 明彦
2. 発表標題 マクロファーシ認識部位を有する変形可能な温度応答性高分子微粒子の調製
3. 学会等名 第71回高分子討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 生出智宏 小松周平 菊池明彦
2. 発表標題 マクロフェージ認識部位を有する温度応答性高分子微粒子の設計
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akihiko Kikuchi
2. 発表標題 Stimuli-responsive particles as biomaterials
3. 学会等名 International Symposium on Advanced Biomaterials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田悟史、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 生体温度で変形可能なコアを有するコア-コロナ型分解性微粒子の作製
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田悟史、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 形状と表面物性を制御可能な分解性コア - コロナ型微粒子の設計
3. 学会等名 第50回医用高分子シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田悟史、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 分解性コア - コロナ型微粒子の生体温度付近での形状制御
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiko KIKUCHI, Syuuhei KOMATSU, Taka-Aki ASOH
2. 発表標題 Smart thermoresponsive particles for particle-shape dependent cellular interaction
3. 学会等名 2021 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田悟史、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 生体温度付近で変形可能な分解性コア-コロナ型微粒子の調製
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 生出智宏、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 マクロファーージ標的部位を有する感温性高分子微粒子と細胞との相互作用解析
3. 学会等名 第73回高分子学会年次大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Akihiko Kiikuchi, Syuuhei Komatsu, Taka-Aki Asoh
2. 発表標題 Thermo-sensitive particles as biomaterials
3. 学会等名 5th International Bio/Medical Interface Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Akihiko Kikuchi, Syuuhei Komatsu
2. 発表標題 Controlled Phagocytosis of Thermoresponsive Transformable Core-Corona Particles
3. 学会等名 MRM2023 IUMRS-ICA2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生出智宏、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 最表面にマクロファージ認識部位を有する温度応答性高分子微粒子の調製
3. 学会等名 第45回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生出智宏、小松周平、菊池明彦
2. 発表標題 最表面にマンノースを導入した温度応答性高分子微粒子の調製と物性解析
3. 学会等名 第72回高分子討論会
4. 発表年 2023年



1. 発表者名 Akihiko Kikuchi, Syuuhei Komatsu, Taka-Aki Asoh
2. 発表標題 Interaction of thermoresponsive transformable particles with macrophages
3. 学会等名 International Polymer Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 生出智宏, 赤嶺辰晃, 小松周平, 菊池明彦
2. 発表標題 最表面にマンノースを有する温度応答性微粒子の調製
3. 学会等名 第72回高分子学会年次大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久保 允人  (Kubo Masato)  (40277281)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授   (32660)	
研究分担者	小松 周平  (Komatsu Syuuhei)  (60843844)	東京理科大学・先進工学部マテリアル創成工学科・助教   (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------