

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800013

研究課題名（和文）水溶性薬剤を内包する新規 DDS キャリアの創製とクリックリリースシステムの開発

研究課題名（英文）Development of novel DDS carriers incorporating water-soluble drug and potential for click release

研究代表者

三浦 裕 (MIURA YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40557980

研究成果の概要（和文）：

本研究では Si-O 結合を介して水溶性の薬剤（ジェムザール）を内包する高分子ミセル型 DDS キャリアを開発した。また、内包された薬剤の徐放を pH の変化によって制御することに成功した。キャリアの安定性ならびに細胞毒性について検討したところ、A549 に対する細胞毒性試験ではコントロール（ジェムザール単独）に比べ約 50 倍有意である IC<sub>50</sub> 値を示した。また、Cy5 ラベル化したキャリアの蛍光強度から、24 時間後に 10% のキャリアが血液中で残存していることが確認された。これらの成果は疎水性の薬剤を中心に研究されてきた DDS の研究領域へ“親水性薬剤のデリバリー”という可能性をもたらすものであり、今後のさらなる発展が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Drug delivery system (DDS) have enormous potential to improve the efficacy of cancer treatment by chemical modification of drug vehicles. However, limited DDS strategies have been reported with water-soluble drugs, and so far no candidate to reach up to the clinical use. We have developed novel strategy to prepare DDS carrier incorporating water-soluble drug: gemcitabine, and study the potential of this carrier for DDS usage. The contents were the followings.

- i) Preparation of gemcitabine incorporated DDS carrier.
- ii) Drug release behavior: pH-responsive
- iii) *in vitro* activity of carrier.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,180,000 | 354,000 | 1,534,000 |
| 2011 年度 | 1,160,000 | 348,000 | 1,508,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 2,340,000 | 702,000 | 3,042,000 |

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学/生体材料学

キーワード：ドラッグデリバリー、ナノ材料

## 1. 研究開始当初の背景

化学と医学の境界領域ではドラッグデリバリーシステム(DDS)への関心が高く、世界中で多くの研究者が開発を試みており、一部のナノ DDS 医薬品は日本においても承認されつつある。しかし、これまでのナノ DDS 医薬は殆どが疎水性の薬物を中心に開発が進んでおり、親水性の薬物については十分な検討は行われていない。例えば、悪性胸膜中皮腫に効果的な薬剤であるアリムタ®(ペメトレキセド)は点滴静注で投与されるため、薬物が血流によって移動、拡散し、結果として疾患部位における取込効率が悪くなり、時には重篤な副作用を引き起こす。そのため、治療においては 20 日間の休薬を余儀なくされている。また、代謝拮抗性抗悪性腫瘍剤であるジェムザール®(ゲムシタビン)も投与量が多く(1回 1000 mg/m<sup>2</sup>)、その殆どは体全体に拡散するため、白血球減少、好中球減少などの重大な副作用を誘発する原因となっている。したがって、水溶性薬物を内包する DDS 医薬の開発は可及的速やかに行われるべき重要な課題と考えられた。これまで親水性薬物の DDS が検討されていぬ主な原因は、親水性薬物の送達物質(キャリア)化が技術的に困難であるためである。全身投与に用いられる DDS 医薬品としては主に高分子ミセル型キャリアとリポソーム型キャリアが開発されているが、前者は親疎水性バランスをミセル形成の駆動力としているため、親水性薬物の内包については解決すべき課題が多い。後者のリポソーム型は親水性薬物の内包が可能であるが、内包効率、安定性などに問題があり実用化に至っていない。したがって、親水性薬物を用いた DDS を実現するためには、これまでと違った戦略でナノ DDS キャリアを合成することが必須となっていた。そこで我々はシリコンケミストリーに着目した。シリコンケミストリーは、反応系の簡便さ、反応試薬の汎用性の高さや加水分解制御の容易さから、有機合成における保護・脱保護、工業的なプロセスにおいてはゾルゲル法として多用される有用な化学の一つである(*Tetrahedron* 2004, 60, 5833-5871. *Macromolecules* 2000, 33, 7639-7648.)。しかし、このような化学を採用した DDS キャリアの合成や、薬剤のリリース制御に取り組んだ研究はこれまで例がなく未踏の研究分野になっていた。本研究では、親水性薬物を DDS キャリア内へ内包させるために、上記のシリコンケミストリーを鍵反応とした合成戦略(図 1 参照)をもって課題に挑戦した。

## 2. 研究の目的

本研究では、近年著しい成長を遂げている DDS の中であって、Silicon Chemistry を鍵

反応とすることで、(1)これまでナノ製剤化が困難であった水溶性の薬物を内包する新規ナノキャリアの創製、(2)細胞内の環境変化に伴って 100%の薬物を叙放可能にする“クリックリリース”システムの構築、(3)新規ナノキャリアの血中滞留性の制御、(4)新規ナノ DDS 医薬の治療効果について検討することである。

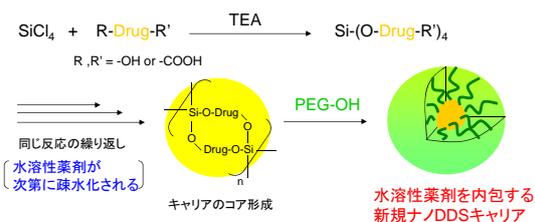


図 1. 水溶性薬物を内包する DDS キャリアの合成戦略

## 3. 研究の方法

(1) モデル化合物による Si-O 結合形成ならびに加水分解性能の確認

合成: 水酸基を有する低分子化合物への Si-O 結合の導入

機能: pH 変化による安定性、加水分解速度の確認

評価: GC/MS, 29Si NMR, 1H NMR

(2) ポリエチレングリコール-ポリアミノ酸共重合体の合成とゲムシタビンの導入およびナノキャリア化の検討

合成: ゲムシタビン内包ナノキャリア

機能: pH 変化による安定性、加水分解速度の確認

評価: DLS, GC, 1H NMR

(3) ゲムシタビン内包ナノキャリアの機能評価

合成: 蛍光ラベル化キャリア

評価: 細胞毒性試験、血中安定性の確認

評価: DLS, HPLC, プレートリーダー

## 4. 研究成果

(1) モデル化合物による Si-O 結合形成ならびに加水分解性能の確認

異なる基質による Si-O 結合形成能を理解するために種々のアルコール類(イソプロピルアルコール、メントール、p-クレゾール、2,6-ジメチルフェノール、BHT など)とシリケートの反応性を確認した。はじめにエステル交換反応を用いて生成物の組成を 29Si NMR を用いて確認したところ、各アルコール類の反応性は基質の高さに応じて変化し、さら生成物の分布はパスカルの三角形に従うこ

とが確認された (図 2)。また、触媒として酸を加えた場合には、反応が短時間で終了することも確認された (図 3)。

図2 <sup>29</sup>Si NMR results of Tetraethyl orthosilicate (TEOS) / Isopropyl alcohol (IPA) solutions

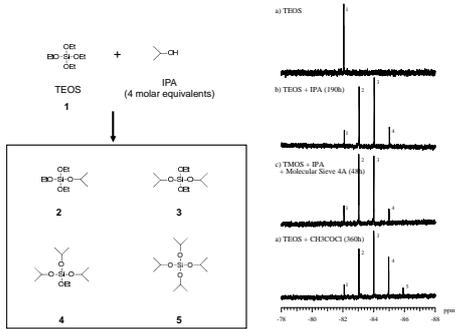
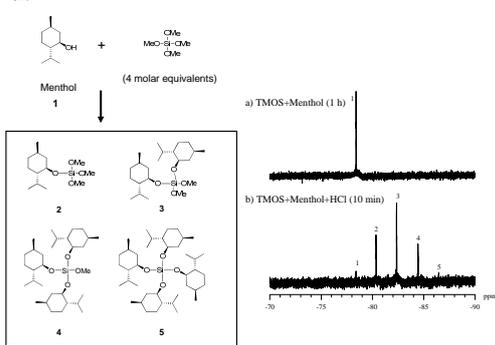


図3 <sup>29</sup>Si NMR results of Tetramethyl orthosilicate (TMOS) / Menthol solutions



次に各生成物の安定性および加水分解能について検討を行った。その結果、加水分解反応の速度は生成物の嵩高さや電子状態に応じて異なること (図 4)、また、合成時に生成する中間体を経由せずにすべての Si-O 結合が瞬時に解裂することが見出された。これらの現象は、図 5 に示すような効果 (隣接する Si-OH の酸性度がもたらす触媒作用) が現れたためであると推察される。

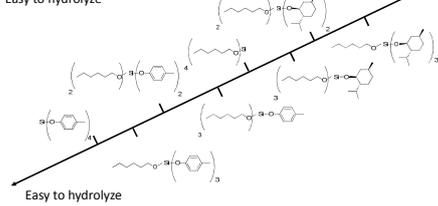
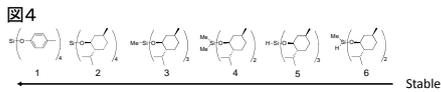
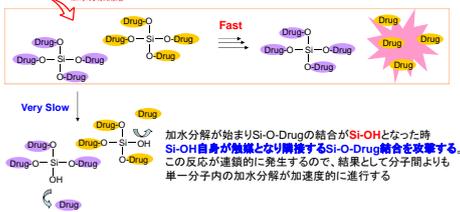


図5 クリックリリース(加水分解)の基本反応



(2) ポリエチレングリコール-ポリアミノ酸共重合体の合成とゲムシタビンの導入およびナノキャリア化の検討

(1)の結果を踏まえてゲムシタビンを内包する DDS キャリアの合成を試みた。ミセル形成能と生成ミセルのサイズ、ゲムシタビンの内包効率を勘案しながら最適化を図った結果、図 6 に示されるブロックポリマーを採用した。

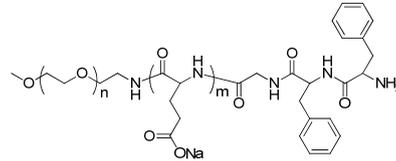


図 6. 水溶性薬剤を内包する DDS キャリア用のポリマー構造

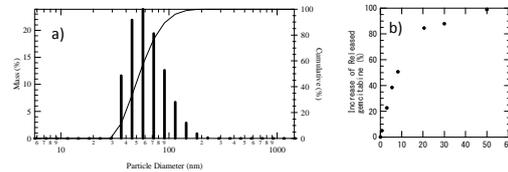


図 7 DLS measurement of nanoparticle a); size = 67 nm, span = 1.15. hydrolysis of nanoparticle at pH = 5.5.

図 6 のポリマーのジメチルアセトアミド溶液を水中へ滴下した後に透析、凍結乾燥を行うことでプリカサーミセルを形成させた。次に溶媒をトリエチレンアミンを含むテトラヒドロフランへ変更し、SiC14 ならびにゲムシタビンと反応させることで粒径 67nm の DDS キャリアを得た。得られたキャリアは pH7.4 では安定であったが、pH5.5 の生理学的条件下では速やかに加水分解を開始した (図 7)。このように Si-O 結合を利用することで、簡便かつ効率的に水溶性薬剤を内包する DDS キャリアを調整可能であることが確認できた。

(3) ゲムシタビン内包ナノキャリアの機能評価

(2) で調整されたキャリアを用いて *in vitro* におけるキャリアの安定性ならびに細胞毒性試験について検討した。その結果、ヒト肺がん細胞株 A549 に対する細胞毒性試験ではコントロール (ジェムザール単独) に比べ約 50 倍有意である IC<sub>50</sub> 値を示すことが確認された。また、マウス血液中における安定性を Cy5 ラベル化したキャリアの蛍光強度を追跡することで調べたところ、24 時間後においても 10%のキャリアが残存していることが確認された。

平成 22 年度から本年度までの検討で、本研究で新たに調整された DDS 医薬は親水性の薬剤を内包し、かつ pH の変化に応じたクリックリリースが可能であること、ならびに

優れた血中安定性と腫瘍細胞への増殖抑制効果を示すことが確認された。これらの成果は疎水性の薬剤を中心に研究されてきたDDSの化学へ“親水性薬剤のデリバリー”という可能性をもたらすものであり、今後のさらなる発展が期待される。

#### 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3件)

1. Kagaya, H., Oba, M., Miura, Y., Koyama, H., Ishii, T., Takato, T., Kataoka, K., Miyata, T. " Impact of polyplex micelles installed with cyclic RGD peptide as ligand on gene delivery to vascular lesions" *Gene Therapy* 2012, 19, 61-69. 査読有。
2. Kim, H., Miura, Y., Macosko, C., W. " Graphene/Polyurethane Nanocomposites for Improved Gas Barrier and Electrical Conductivity" *Chemistry of Materials* 2010, 22, 3441-3450. 査読有。
3. Fuchise, K., Sone, M., Miura, Y., Sakai, R., Narumi, A., Sato, S., Satoh, T., Kakuchi, T. "Precise synthesis of poly(1-adamantyl methacrylate) by atom transfer radical polymerization" *Polymer Journal* 2010, 42, 626-631. 査読有。

[学会発表] (計6件)

1. 三浦裕、Improved physicochemical properties of antitumor drug platinum-loaded micelles with  $\alpha$ -helix in their core budgets、The 11th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems、Lahaina, Maui, Hawaii, USA、2011年12月16日。
2. 三浦裕、白金錯体制がん剤内包高分子ミセルのコア中における高次構造と形態相関、第60回高分子討論会、岡山大学 津島キャンパス、2011年9月28日。
3. 三浦裕、白金錯体制がん剤を内包する高分子ミセル型DDSのコア構造に着目した機能制御、第27回日本DDS学会、東京大学本郷キャンパス、2011年6月9日。
4. 三浦裕、Characteristics of antitumor drug DACHPt-loaded micelles formed from conformation-controlled PEG-*b*-P(Glu)、第60回高分子年次大会、大阪国際会議場、2011年5月25日。
5. 三浦裕、白金錯体制がん剤 DACHPt と PEG-P(Glu) ブロック共重合体から形成される高分子ミセルの構造解析、第32回日本バイオマテリアル学会、グランドプリンスホテル広島、2010年11月29日。
6. 三浦裕、表層を機能化したプラチナ制がん剤内

包ミセルの合成とその評価、第59回高分子討論会、北海道大学高等教育機能開発センター、2010年9月16日。

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 裕 (MIURA YUTAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：40557980

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし