

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25350549

研究課題名(和文) ガン温熱化学療法に有効なナノキャリアの開発

研究課題名(英文) Development of nanocarriers for cancer thermochemotherapy

研究代表者

森本 展行 (Morimoto, Nobuyuki)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00313263

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)：ガン温熱化学療法へ展開しえるナノキャリアの開発を目指し、ポリエチレングリコール(PEG)とポリ(3-ジメチル(メタクリロイルオキシエチル)アンモニウムプロパンスルホン酸)(SB)によるコポリマーを調製した。このポリマーは生理条件下においてもナノスフィアを形成し、細胞毒性をほとんど示さないこと、膜透過が主要と考えられる経路での細胞内導入能を明らかとした。抗ガン剤であるドキソルビシン(Dox)を化学修飾したポリマーは低温でも細胞内へ効率よく導入でき、導入効率からDoxの薬効を低下させずに細胞毒性を発揮し、アポトーシスを誘導した。

研究成果の概要(英文)：Copolymers of 3-dimethyl(methacryloyloxyethyl)ammonium propanesulfonate and poly(ethylene glycol) methacrylate were prepared to develop cancer thermochemotherapy. Among these polymers, the random copolymers formed nanospheres self-assembly in physiological solution conditions. Moreover, the random polymers exhibited little cytotoxicity and effective cellular uptake based on membrane translocation as the main pathway of internalization. The polymer was effectively internalized into cells even after conjugation with doxorubicine, a cancer drug. The conjugated polymer exhibited the cell killing activity without reducing the drug efficacy and induced apoptosis of cancer cells.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノキャリア 刺激応答性 スルホベタインポリマー 温熱化学療法

### 1. 研究開始当初の背景

ガン温熱療法は、生体よりやや高い熱 (~42°C) を患部一帯に加温することで、低 pH 環境のガン細胞を選択的に死滅させる手法である。正常細胞の免疫能の亢進を期待しえることに加え、副作用がなく多数回の治療を行うことができ、他の治療法との併用も可能である。温熱化学療法は薬剤投与の減量も視野にいれられるため、副作用の軽減や温度増強などによる治療回数の軽減など今後一層期待される手法となりえよう。温熱療法としてのナノ粒子は、磁性ナノ粒子を用いて発熱体、あるいは画像診断に用いる研究が国内外で多く展開されている。しかし温熱化学療法への中空ナノ粒子の展開は、リポソームを用いた例が報告される程度である。これらの背景から、温熱化学療法に特化したナノキャリアの開発が、画期的なガン治療につながると想起するに至った。

その一方で研究代表者は近年、ポリエチレングリコール (PEG) とスルホベタイン (SB) モノマーの組みあわせからなるポリマーの設計と水溶液特性の評価を行っている。これらはいずれも生体適合性に優れたユニットである。加えて SB は純水中で温度上昇に伴い溶解する上限臨界溶液温度 (UCST) を示し、末端のスルホ基は水の構造を壊す効果を有していることが知られている。これらのユニットからなるコポリマーを調製すると、水中にてその高分子構造に依存してナノ~マイクロメートルサイズの粒子が自己組織的に形成されることを見いだしている。

### 2. 研究の目的

本研究では、ガン標的指向性を有した UCST 型ポリマーソームを PEG-b-SB ブロックコポリマーをベースに調製することで、ガン温熱化学療法へ展開し得るナノキャリアの開発を行う。

本研究では、まず化学療法に適応し得るポリマーの設計と評価を行う。バッファー条件下でもナノメートルサイズの中空ナノ粒子構造を保持ししえる組成比を決定する。その上で薬物内包、放出特性を確認後、末端修飾によるガン細胞への取込み向上を狙う。次にガン細胞培養液にポリマーを添加し、8MHz の周波数を印加し、今後の展望を得る。

### 3. 研究の方法

(1) 分子量が比較的揃った SB ポリマーを可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により水-メタノール系の共溶媒から調製した。各分子量の PEG を修飾した連鎖移動剤を用いてブロックコポリマーを、またカルボキシル基を有した連鎖移動剤を用いて末端官能基化したランダムコポリマーの調製を行った。

(2) 得られたポリマーのキャラクタリゼーションは、NMR および GPC により組成比、分子量とその分布を評価した。これらポリマーの水溶液中での会合体形成について表面張力

測定、動的光散乱測定、あるいはレーザー散乱測定により評価した。また透過型電子顕微鏡を用いて調製された粒子の観察を行った。

(3) ミクロスフィアへ熱 (5°C ~ 70°C)、塩強度 (0 ~ 1 M)、電場 (10V, 0 ~ 100MHz)、流動場 (0 ~ 10,000s<sup>-1</sup>) をそれぞれ付加して刺激応答性を評価した。

(4) ポリマーと細胞との相互作用は、毒性の評価、および蛍光分子を修飾したポリマーを用い取込量のフローサイトメーターによる定量的評価および共焦点レーザー顕微鏡による細胞内分布の観察から評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) PEG-b-SB ブロックコポリマー

PEG 分子量が 1,000、2,000、5,000 の SB との各種ブロックコポリマーを合成した。これら水中に分散させると自己組織的にマイクロメートルサイズの粒子を形成した。ところがこの粒子は当初の予想と異なり、中空状態はとりえるものの不安定であり、中実の粒子が安定状態であることが明らかとなった。

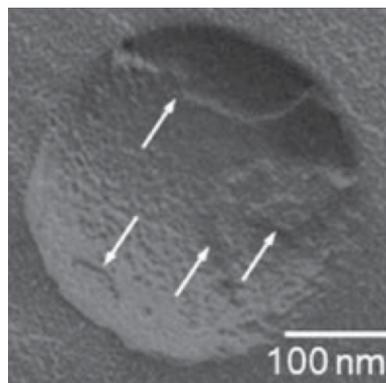


図1 PEG-b-PDMAPS ミクロスフィアの TEM 像

透過型電子顕微鏡観察よりこの粒子は密にパッキングされた多重膜構造を有していた。各ポリマーの水溶液 (10mg/mL) を加熱すると上限臨界共溶温度 (UCST) を示し、とくに PEG 分子量が 1,000 の場合において SB ブロックの重合度が大きくなるにつれてその UCST も上昇し、制御しえることを見いだした。この際、マイクロ粒子は UCST 以上への加熱により 1 分以内に解離すること、また温度を低下させることで単分散なサブマイクロメートルサイズの粒子を形成しえることを見いだした。またこの転移温度を利用することで、ミクロスフィア形成時に荷電性のオリゴ DNA やタンパク質、ナノ粒子などを共存させることでその内部に取り込むことが可能であった。

また塩化ナトリウムをミクロスフィア溶液中に添加すると濃度に依存して転移温度が低下すること、また 100 mM を超えるとミクロスフィアは解離し、転移温度を示さないことを明らかとした。このため、ピリジニウム基を有した SB(PySB) を導入したブロックコポリマーを導入した。このポリマーは高塩濃度状況下においても自己組織化ナノ-ミクロス

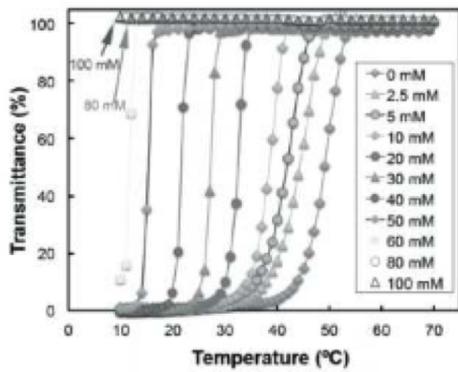


図2 塩化ナトリウム添加による UCST の挙動変化

フィアが形成しえること、またその粒径は PySB ユニット数ではなく PEG 鎖長に依存していることを明らかとした。しかしその一方で生理条件下においても UCST は示さず、強固なスフィアを形成するとともに、高濃度条件では細胞毒性が発現することを確認したため、さらなるポリマー設計の検討が必要である。

一方で PEG-SB は電場と流動場についても応答し構造変化を誘起しえることを光学顕微鏡による直接観察から明らかとした。静的条件下においても接触して解離する挙動は見られるものの、融合がおこるのは希である一方で、10V、1Hz 前後の周波数を印加することでミクロスフィア間の接触時に融合が加速的に促進されることがわかった。この融合挙動は SB の重合度、周波数、塩濃度により促進させ得ることを明らかとした。この接触挙動より流動場条件でも融合が起こりうるとの予想



図3 電場印加条件下でのミクロスフィアの融合挙動



図4 せん断応力除去時のミクロスフィアへの分裂挙動

から、同様に顕微鏡下でのせん断応力を付加したところ、ミクロスフィア間で融合し流れに沿ってアスペクト比が 4,000 以上まで伸張しえること、せん断力を除去すると分裂し、サイズの揃ったミクロスフィアを再形成しうることを見いだした。これらはすべて水系の

溶液で制御しえることから、マイクロフルイデクス分野における液滴としての応用展開も考えられる。

(2)P(DMAPS-co-PEGMA)ランダムコポリマー RAFT 重合により得られたランダムコポリマー P(DMAPS-ran-PEGMA)は、いずれの分子量においても生理条件下で 15~35 nm 程の比較的粒径のそろった電氣的に中性なナノ粒子を自己組織的に形成し、1 mg/mL 以下の条件では細胞毒性は認められなかった。このポリマー末端にフルオレセインを修飾し HeLa 細胞への導入を試みたところ、血清存在下においても濃度依存的に細胞内へ取り込まれた。ナノスフィアの細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、細胞質や核など細胞内に広く分布することが観察された。

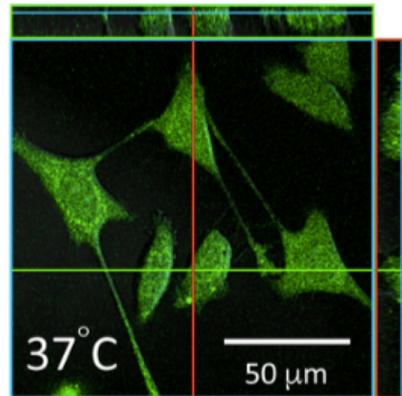


図5 フルオレセイン修飾した P(DMAPS-co-PEGMA) の細胞内分布

ナノスフィアの細胞内への取り込みは 4 °C アッセイや各種エンドサイトーシス阻害剤存在条件下での細胞取り込み挙動に阻害が起きないことから、ポリマーナノ粒子の細胞内取り込みの主な経路はエンドサイトーシスではなく、膜透過である可能性が高いと考えられた。フルオレセインの代わりにローダミン B を修飾したところ、ミトコンドリアへの高い集積性が確認された。ローダミン類はミトコンドリアへ集積しやすいことが知られるが、ポリマーに対して 1 分子を修飾するだけでミトコンドリアへの集積能を付与することに成功した。さらにドキシソルピシンを安定なアミド結合を介してポリマー末端へ修飾を行って HeLa 細胞に添加した。この結果、ナノスフィアは核への集積が誘引されるとともに、核構造の収縮からアポトーシスの誘引が示唆された。このことから、ドキシソルピシン由来と考えられる細胞毒性を発揮することが確認された。低分子であるドキシソルピシン分子の細胞内導入効率と比較してその導入率はおよそ 30%から 50%に低減するものの、この導入効率を考慮するとドキシソルピシン修飾ポリマーの細胞毒性は未修飾のドキシソルピシンとほぼ同程度であると推察された。さらに試作した

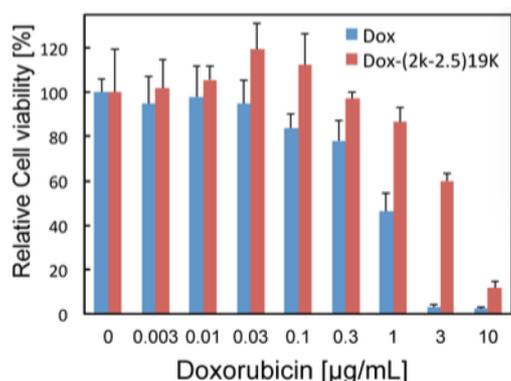


図 6 ドキソルビシン修飾した P(DMAPS-co-PEGMA) の細胞毒性

誘電加温システムで 8 MHz の電場を印加したところ、約 15% 程の毒性向上がみられた。

以上より P(DMAPS-ran-PEGMA) ナノスフィアはガン温熱化学療法に向けた細胞内キャリアとして有望であると考えられた。しかしその一方で、当初に想定したキャリアは、細胞に取り込まれにくく、がん細胞に過剰発現している葉酸レセプターを利用して取込選択性を向上させるというコンセプトであった。このため、正常細胞にも積極的に取り込まれる本キャリアは、今後がん治療に適用を考える上では患部への直接投与や標的細胞までのデリバリーを意識したシステムの構築が今後必要となろう。

#### 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 8 件)

1. N. Morimoto, M. Wakamura, K. Muramatsu, S. Toita, M. Nakayama, W. Shoji, M. Suzuki, F. M. Winnik. Membrane translocation and organelle-selective delivery steered by polymeric zwitterionic nanospheres. *Biomacromolecules*. **17**, 1523-1535, 2016. (査読あり)  
DOI: 10.1021/acs.biomac.6b00172
2. T. Wazawa, N. Morimoto, T. Nagai, M. Suzuki. Rotational motion of rhodamine 6G tethered to actin through oligo (ethylene glycol) linkers studied by frequency-domain fluorescence anisotropy. *Biophys. Physicobiol.* **12**, 87-102, 2015. (査読あり)  
DOI: 10.2142/biophysico.12.0\_87
3. 森本 展行, 野村直之. バイオマテリアルとしての微粒子, バイオマテリアル: 生体材料 **33**, 278-283, 2015. (査読なし)
4. N. Morimoto, K. Muramatsu, S. M. Nomura, M. Suzuki. Trading polymeric microspheres: Exchanging DNA molecules via microsphere interaction. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* **128**, 94-99, 2015. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.014
5. N. Morimoto, T. Wazawa, Y. Inoue, M. Suzuki.

Dynamic transformations of self-assembled polymeric microspheres induced by AC voltage and shear flow. *RSC Adv.* **5**, 14851-14857, 2015. (査読あり)

DOI: 10.1039/C4RA17056C

6. N. Morimoto, Y. Sasaki, K. Mitsunushi, E. Korchagina, T. Wazawa, X.-P. Qiu, S. M. Nomura, M. Suzuki, F. M. Winnik. Temperature-responsive telechelic dipalmitoylglycerol poly(*N*-isopropylacrylamide) vesicles: real-time morphology observation in aqueous suspension and in the presence of giant liposomes. *Chem. Commun.* **50**, 8350-8352, 2014. (査読あり)  
DOI: 10.1039/C4CC03199G

7. N. Morimoto, K. Muramatsu, T. Wazawa, Y. Inoue, M. Suzuki. Self-assembled microspheres driven by dipole-dipole interactions: UCST-type transition in water. *Macromol. Rapid. Commun.* **35**, 103-108, 2014. (査読あり)  
DOI: 10.1002/marc.201300798

8. N. Morimoto, M. Yamazaki, J. Tamada, K. Akiyoshi. Polysaccharide-Hair Cationic Polypeptide Nanogels: Self-Assembly and Enzymatic Polymerization of Amylose Primer-Modified Cholesteryl Poly(l-lysine). *Langmuir* **29**, 7509-7514, 2013. (査読あり)  
DOI: 10.1021/la3047774

[学会発表] (計 20 件)

1. N. Morimoto, R. Takei, S. M. Nomura, M. Suzuki. Trading of DNA oligomers encapsulated into self-assembled microsphere. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Pacifichem2015)(国際学会) 2015 年 12 月 15 日~2015 年 12 月 20 日. Hawaii, USA.
2. 若村 優, 森本 展行, 中山 勝文, 東海林 互, 鈴木 誠. スルホベタインコポリマーナノスフィアの細胞内導入機構解析. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会. 2015 年 11 月 09 日~2015 年 11 月 10 日. 京都テルサ(京都).
3. 森本 展行, 若村 優, 中山 勝文, 東海林 互, 鈴木 誠. 細胞膜透過型スルホベタインコポリマーナノスフィアによる細胞内動態制御. 第 37 回日本バイオマテリアル学会大会. 2015 年 11 月 09 日~2015 年 11 月 10 日. 京都テルサ(京都).
4. 若村 優, 森本 展行, 中山 勝文, 東海林 互, 鈴木 誠. PEG-スルホベタインコポリマーナノスフィアによる細胞内動態制御. 第 64 回高分子討論会. 2015 年 09 月 15 日~2015 年 09 月 17 日. 東北大学(仙台).
5. 武井 里歩, 森本 展行, 野村 慎一郎, 鈴木 誠. 多層膜ミクロスフィアに内包した DNA の交換とその配列依存性. 第 64 回高分子討論会. 2015 年 09 月 15 日~2015 年 09 月 17 日.

- 東北大学(仙台).
6. 千島亮太郎、今尾麻人、最上譲二、渡辺貴文、和沢鉄一、森本展行、鈴木 誠. Mg/Ca 結合 F- アクチンの多重水和状態. 第53回日本生物物理学会年会. 2015年09月13日~2015年09月15日. 金沢大学(金沢).
  7. 森本展行、若村 優、中山 勝文、東海林 互、鈴木 誠. 細胞膜透過型高分子ナノスフィアの設計と細胞内動態解析. 第31回日本DDS学会学術集会. 2015年07月02日~2015年07月03日. 京王プラザホテル (東京).
  8. 森本展行、武井 里歩、野村 慎一郎、鈴木 誠. 多層膜ミクロスフィア中への DNA オリゴマー内包とその交換挙動. 第64回高分子学会年次大会. 2015年05月27日~2015年05月29日. 札幌コンベンションセンター(札幌).
  9. 森本展行. スルホベタイン含有ポリマー粒子の設計と機能. 2014KIPS 若手シンポジウム. 2014年12月12日~2014年12月12日. 京都大学(京都). 招待講演
  10. 森本展行、若村優、中山勝文、東海林互、鈴木 誠. スルホベタイ-PEG コポリマーナノ粒子の細胞内取込挙動. 第36回バイオマテリアル学会大会. 2014年11月17日~2014年11月18日. 長崎大学(長崎).
  11. 佐藤正義、最上譲二、森本展行、鈴木 誠. NaCl, NaI 水溶液におけるハイパーモバイル水の熱容量および密度の評価. 第52回日本生物物理学会年会. 2014年9月25日~2014年9月27日. 札幌コンベンションセンター(札幌).
  12. 和沢鉄一、森本展行、鈴木 誠. LN 変調器を用いた高精度周波数領域蛍光異方性測定による蛍光色素の回転運動解析. 第52回日本生物物理学会年会. 2014年9月25日~2014年9月27日. 札幌コンベンションセンター(札幌).
  13. 若村優、森本展行、中山勝文、東海林互、鈴木 誠. PEG-スルホベタインコポリマーナノ粒子と細胞との相互作用. 第63回高分子討論会. 2014年9月24日~2014年9月26日. 長崎大学(長崎).
  14. 森本展行、村松かんな、関根由莉奈、鈴木 誠. PEG-b-スルホベタインブロックコポリマーミクロスフィアの動的構造制御. 第63回高分子討論会. 2014年9月24日~2014年9月26日. 長崎大学(長崎).
  15. 森本展行. 自己組織型スマートポリマーナノ~ミクロ粒子の設計と機能. 第42回東北地区高分子若手研究会. 2014年7月28日~2014年7月30日. ホテルルーセントタカミヤ(山形). 招待講演
  16. 森本展行、佐々木優、和沢鉄一、鈴木 誠、Francoise Winnik. 熱応答性テレケリック型ポリマーベシクルの水溶液特性. 第63回高分子年次大会. 2014年5月28日~2014年5月30日. 名古屋国際会議場 (名古屋).
  17. 森本展行、村松かんな、和沢鉄一、鈴木 誠. ポリ(スルホベタイン)-PEG ブロックコポリマー粒子の刺激応答特性. 第35回日本バイオマテリアル学会大会. 2013年11月25日~2013年11月26日. タワーホール船堀(東京).
  18. 石杜和希、王楊天、丹野則彦、最上譲二、和沢 鉄一、森本展行、鈴木 誠. 誘電緩和分光測定によるオリゴリン酸 Na、アルキルカルボン酸 Na、アルキルスルホン酸 Na の水和特性. 第51回日本生物物理学会年会. 2013年10月28日~2013年10月30日. 国立京都国際会館(京都).
  19. 森本展行、村松かんな、和沢鉄一、鈴木 誠. スルホベタインブロックコポリマーによる多層膜ポリマーベシクルの調製と動的構造変化. 第62回高分子討論会. 2013年09月11日~2013年09月13日. 金沢大学(金沢).
  20. 村松かんな、森本展行、鈴木 誠. スルホベタインを有する温度応答性ブロックコポリマーの水溶液特性. 第62回高分子討論会. 2013年09月11日~2013年09月13日. 金沢大学(金沢).

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

森本展行 (MORIMOTO, Nobuyuki)

東北大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00313263

### (2)連携研究者

鈴木 誠 (SUZUKI, Makoto)

東北大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：60282109