

段階的薬物放出に向けたグルタチオン応答性 starPEG ヒドロゲルの設計

日大生産工(院) ○和田 輝
日大生産工 柏田 歩

1 緒言

ヒドロゲルはその三次元網目構造中に水溶性薬物のみならず高分子薬物の封入も可能であることから広範囲にわたって利用可能な薬物送達担体の素材として有望である。

ヒドロゲルの代表的な骨格素材であるポリエチレングリコール(PEG)は良好な生体適合性、透明性、力学物性などの特徴がある、そして、この特性を有する4分岐鎖ポリエチレングリコール(starPEG)を用いたヒドロゲルは均質な網目構造を形成することから、応力集中が起こり難く、優れた強度のヒドロゲルを作成できる。

starPEG からなるヒドロゲルを薬物送達担体として用いるためにヒドロゲルの架橋点や薬物担持部位に刺激応答性を持たせることによって目的の環境における薬物の放出が可能となる。そこで、本研究では外部刺激として生体内における還元剤として知られているグルタチオン(GSH)に着目した。

GSH は細胞内に 0.1~10 mM と、細胞外と比較して高濃度で存在している。そこで、高濃度の GSH に応答するようなヒドロゲルを設計することにより、目的の細胞内でのみ薬物を放出できる系が構築できると考えられる。本研究ではヒドロゲルの架橋点をチオール基とマレイミド基とのマイケル付加反応により形成させた。そして、チオールの種類すなわち pKa を変えることにより GSH による架橋点の開裂速度を変化させることを考えた。pKa 値が小さいチオール基に基づく架橋は GSH による還元反応を受け、迅速な開裂が期待されるが、pKa 値が大きいチオール基に基づく架橋では開裂速度の低下が予想される。今回設計したヒドロゲルは迅速な開裂が期待できる架橋を用いてヒドロゲルに薬物を直接結合させ、開裂速度がより遅い架橋を用いて

高分子薬物の封入が可能なゲルネットワークを形成した。

ヒドロゲルに複数の薬物を同時に担持し、異なる時間オーダーで放出することが可能になれば現在の DDS 担体よりも魅力的な DDS 担体となる。段階的な薬物放出が可能になれば、投与回数の減少、期間を開けた薬物の放出、即効性を要する薬物と長時間での効能が期待される薬物の段階放出などが可能になる。

2 実験操作

2-1 チオール基とマレイミド基によるマイケル付加型架橋を有する starPEG ヒドロゲルの合成と GSH 応答性評価

チオール基を末端に有する starPEG として市販品(starPEG-SH)とともに、合成した starPEG-MPP を用いた。starPEG-MPP は4末端にヒドロキシ基を有するポリエチレングリコール(starPEG-OH)、4-メルカプトフェニル酢酸 40 当量と p-トルエンスルホン酸(p-TSA) 0.4 当量をトルエン 20 mL に溶解させ、窒素気流下で 48 時間攪拌しながら還流させた。その際に、ディーンスタークトラップを用いて合成した。これら、チオール基を末端に有する starPEG を純水でマレイミド基を末端に有する starPEG-MAL と 1:1 混合することでヒドロゲルを得た。

合成したヒドロゲルに GSH 溶液および緩衝液を添加し、経時変化による質量分析を行うことで、ヒドロゲルの崩壊挙動の評価を行った。さらにヒドロゲル中にローダミン標識リポソームを担持し、ヒドロゲル架橋の開裂に伴うリポソームの放出挙動を、HITACHI F-2500 蛍光光度計により評価した。すなわち、ローダミン標識リポソーム封入ヒドロゲルに GSH 溶液および緩衝液を添加し、経時変化による蛍光挙動を測定することで、リポソームの放出挙動を評価した。

**Design of Guatathione Responsiveness for
Graded Chemical Release StarPEG Hydrogels**
Hikaru WADA and Ayumi KASHIWADA

2-2 GSH 応答性ヒドロゲルを用いた異なる時間オーダーでの薬物放出系の構築

モデル薬物である Drug コンジュゲートは 4-アミノベンゼンチオールを純水で N_{α} -(tert-ブトキシカルボニル)-L-トリプトファン N -スクシンイミジル(Boc-Trp-OSu)とモル比 1:1 混合させることで合成した。合成した Drug コンジュゲートを starPEG-MAL の 4 末端のひとつに結合させることで、starPEG-Drug を合成した。その後、starPEG-Drug コンジュゲートと starPEG-SH を純水で 1:1 混合することでヒドロゲルの合成を行った。GSH 溶液存在下において、ヒドロゲルから解離した Trp の蛍光とヒドロゲルの質量変化を測定することで、モデル薬物の放出挙動とヒドロゲルの崩壊挙動の評価を行った。

3 結果および考察

3-1 GSH に応答したヒドロゲルの崩壊挙動

GSH 存在下および不在化における starPEG-MPP および starPEG-SH ヒドロゲルの崩壊挙動を質量変化により評価した。その結果、アリアルチオール架橋を有する starPEG-MPP ヒドロゲルにおいてのみ、GSH 存在下において短時間で顕著な質量損失とゾル化を確認することができた。このことから、アルキルチオール架橋とアリアルチオール架橋の解離定数 (pK_a) の差よりヒドロゲルの崩壊挙動に差を確認することができ、設計どおり GSH によりチオール架橋の開裂であることがわかった。

3-2 ヒドロゲルの崩壊によるリポソーム放出挙動

ヒドロゲルの崩壊によるリポソーム放出挙動の評価は、リポソームの標識に用いたローダミンの蛍光強度変化により行った。

その結果、ヒドロゲルの崩壊挙動と同様にアリアルチオール架橋を有する starPEG-MPP ヒドロゲルにおいてのみ GSH 存在下における、短時間で顕著な蛍光強度の増大を観測した。このことから、アリアルチオール架橋の開裂によるヒドロゲルの崩壊に伴う内封リポソームの放出が確認できた。

3-3 異なる時間オーダーでの薬物放出を可能とするヒドロゲルの設計

アリアルチオールを介してモデル薬物である Trp を結合させた starPEG-Drug ヒドロゲルからの GSH 存在下における Trp 遊離の放出挙動の評価は、蛍光測定より行った。GSH 存在

下での Trp 誘導体の蛍光強度の経時変化を Fig. 1 に示す。

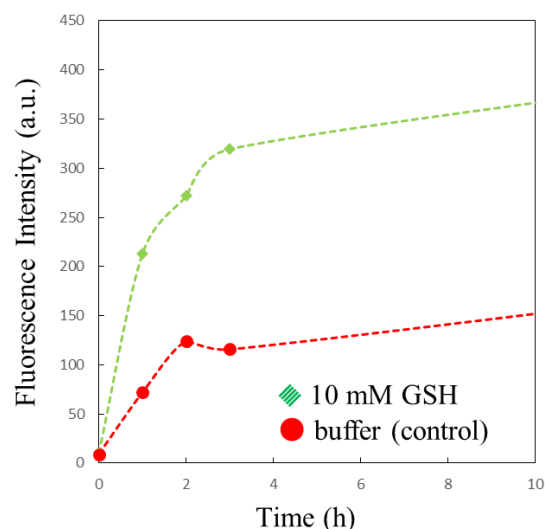


Fig. 1 Release of model drug from starPEG-Drug incubated with GSH solution.

GSH 存在下では短時間で顕著な Trp 誘導体の蛍光強度の増加が確認できた。このことは、より pK_a 値が小さいアリアルチオール架橋の開裂による 1 段階目の薬物放出を示している。一方、アルキルチオール架橋を介したヒドロゲルの崩壊を確認できなかった。

4 結言

本研究では、チオール基とマレイミド基のマイケル付加反応による starPEG ヒドロゲル形成を可能とした。そして、架橋点に用いるチオール基の pK_a により架橋点の開裂とヒドロゲルの崩壊における GSH 応答性の制御が可能であることがわかった。今後は適切な pK_a 値を有するチオール基とマレイミド基からなる架橋により形成され、GSH による還元を利用した開裂速度の制御が可能なヒドロゲルを構築することを用いて 2 段階薬物放出の系へ発展させていく。

[参考文献]

- 1) A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Bioconjugate Chem.* **2011**, 22, 1946–1953.
- 2) A. D. Baldwin, K. L. Kiick, *Polym. Chem.* **2013**, 4, 133–143.
- 3) Y. Liang, K. L. Kiick, *Biomacromolecules* **2016**, 17, 601–614.