ISSN 2186-5647

P-41

生体内還元剤存在下で崩壊するポリエチレングリコールを基材としたヒドロゲルの設計

日大生産工 (院)　○坂本柚樹　日大生産工　柏田歩

1. 緒論

ポリエチレングリコール (PEG)は水和能と生体適合性の高さから，生体材料として広く用いられている。さらに, 4 分岐 PEG (4-arm-PEG)は均一な三次元網目構造を形成することが可能なことから，薬物送達担体としてのヒドロゲルの基材として非常に有用である。また，末端に適切な官能基を導入することにより，ヒドロゲルの形成と崩壊の過程における様々な応答因子を有する架橋点を形成することができる。本研究では，応答因子として生体内還元剤であるグルタチオン (GSH)による還元反応に着目した。GSH は，グルタミン酸，システイン，グリシンが結合したトリペプチドであり，システイン残基由来のチオール基が求核性を有する還元剤として作用し，チオールージスルフィド交換反応を介して細胞内における不要な酸化反応によって形成したジスルフィド結合を切断することが知られている。GSH は正常細胞周囲において 10 μM 程度の低濃度で存在しているが，がん細胞などの異常細胞周囲では 10 mM 程度の高濃度で存在している。このことから，異常細胞環境下で薬物を放出する, GSH 応答性薬物送達担体に関する研究が広く行われている [1), 2)]。

本研究では，末端にチオール基を有する 4-arm-PEG-SH を基材とし，架橋剤として OPSS-PEG-OPSS を用いることで，ジスルフィド結合を架橋点に有するヒドロゲルを設計した。そして，4 分岐 PEG の架橋形成による分子量の揃った網目構造のサイズを考慮し，サイズ調節が可能な蛍光標識リポソームを内封モデル薬物として採用した。高濃度の GSH 存在下におけるジスルフィド結合の切断によるヒドロゲル崩壊に伴うリポソームの放出挙動は，蛍光スペクトルにより評価した。

2. 実験操作

2-1. 蛍光標識リポソーム内封ヒドロゲルの調製

リン脂質 (DPPC)と蛍光色素が結合した脂質(NBD-PE)を 99：1 の組成で丸底プロピレンチューブ内でクロロホルムに溶解し，窒素気流下でクロロホルムを除去し，真空ポンプで減圧乾燥させ脂質薄膜を得た。得られた脂質薄膜に PBS 溶液を 1 mL 加えて相転移温度以上で 30 分水和させた後，ボルテックスミキサーで振盪することで脂質懸濁液を得た。得られた脂質懸濁液を 500 μL ずつに分け，エクストルーダーでポリカーボネート膜を 21 回通過させ 50 nm または 100 nm リポソーム溶液を得た。それぞれのリポソーム溶液を 10 倍希釈し，脂質濃度 0.1 mM の溶液とした。得られた溶液 125 μL に 4-arm-PEG-SH (MW.10000) 12.5 mg と OPSS-PEG-OPSS (MW.1000) 2.5 mg をそれぞれ溶解し，混合することで蛍光標識リポソーム内封ヒドロゲルを得た。

2-2. GSH 存在下におけるヒドロゲルの崩壊挙動と内封リポソームの放出挙動の評価

GSH を PBS 溶液に溶解し，異常細胞環境下に匹敵する 10 mM GSH 溶液を調製した。その後, 2-1. で調製した蛍光標識化リポソーム内封ヒドロ

Design of Poly (ethylene glycol) Based Biological Reductant Triggered Degradable Hydrogels
Yuzuki SAKAMOTO and Ayumi KASHIWADA

ゲルを GSH 溶液または PBS 溶液に浸漬し，一定時間ごとにヒドロゲルの質量と浸漬溶液の NBD に基づく蛍光強度を測定した。

3. 結果および考察

直径 50 nm と 100 nm のリポソームを内封したジスルフィド結合架橋 4-arm-PEG ヒドロゲルを調製し，10 mM　GSH 溶液または PBS 溶液に浸漬した際の質量損失および蛍光強度の変化を経時的に追跡した。

ヒドロゲルの経時的質量変化を eq.　(1)で，放出リポソームの経時的蛍光強度変化を eq.　(2)でそれぞれ評価した。

$$W\ (\%) = \frac{w_t}{w_0} \times 100 \qquad (1)$$

$$F\ (\%) = \frac{F_t - F_0}{F_{max} - F_0} \times 100 \qquad (2)$$

w_t　浸漬後 t 時間後におけるヒドロゲルの質量

w_0　t=0 におけるヒドロゲルの質量

F_t　浸漬後 t 時間後における蛍光強度

F_0　t=0 における蛍光強度

F_{max}　ヒドロゲル崩壊後の最大蛍光強度

PBS 溶液に浸漬した系の F_{max} については，ヒドロゲルの質量変化が認められなくなった後，浸漬溶液に GSH を添加し，ヒドロゲルを崩壊させ，測定した。質量変化について Fig. 1 に，そして，蛍光強度変化について Fig. 2 に示す。

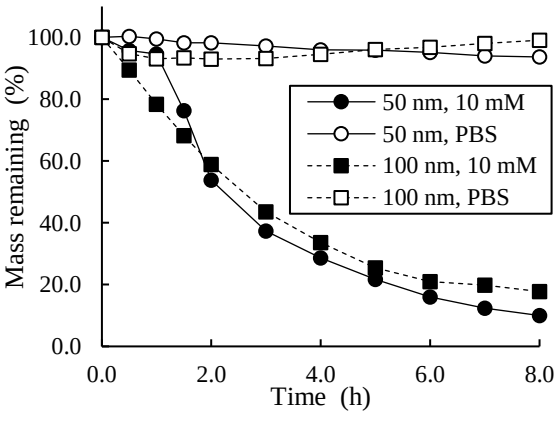

Fig. 1 Mass loss study of hydrogels.

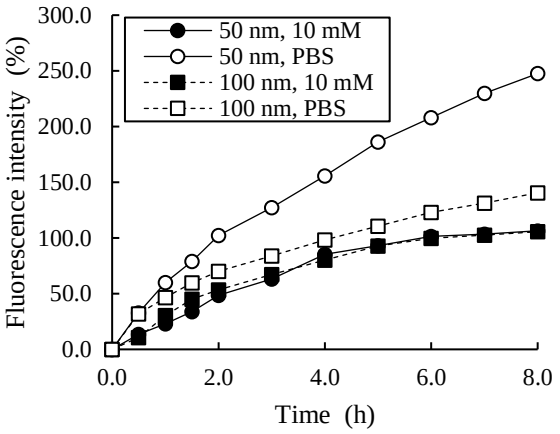

Fig. 2 Time course of fluorescence intensity of NBD-labeled liposomes by degradation of hydrogels.

ヒドロゲルの崩壊に伴う質量損失は，高濃度 GSH 環境下において顕著に確認され，優れた崩壊挙動を示した。一方，蛍光強度変化による内封リポソームの放出挙動については，GSH を含まない PBS 溶液に浸漬した系においても大幅な蛍光強度の増大が確認された。 この結果はヒドロゲル内で部分的にリポソームが崩壊した可能性を示唆しており，系の設計において再検討が必要である。

4. 結言

本研究では，生体内還元剤である GSH 存在下で崩壊挙動を示すヒドロゲルの形成を可能にした。一方，ヒドロゲルにリポソームを内封した系については予想した放出挙動が認められなかった。今後は，ヒドロゲル内封中に崩壊しないリポソームの設計，もしくはリポソーム以外の担持方法を検討する。

5. 参考文献

1) Y. Liang, K. L. Kiick, *Biomacromolecules*, 2016, 17, 601-614.

2) D. Gu, S. Tan, A. J. O'Conner, G. G. Qiao, *ACS Boimater*. *Sci*. *Eng*. 2018, 4, 1696-1707.