

薬物送達担体としての還元剤応答性ヒドロゲルの設計

日大生産工 (院) ○坂本 柚樹 日大生産工 柏田 歩

1 緒論

薬物治療において、治療部位への効果的な薬物送達を可能にする、薬物送達システム (Drug Delivery System: DDS) が治療効率の向上と副作用の低減の観点から注目されている。

代表的な薬物送達担体として、細胞膜を構成するリン脂質からなるリポソーム,¹ 疎水性高分子と親水性高分子のブロック共重合体から構成される高分子ミセル,² 生体適合性高分子を架橋することにより形成するヒドロゲルなどが挙げられる。リポソームや高分子ミセルは水溶液中に分散しており、血中投与により全身を巡らせる必要がある。一方、ヒドロゲルは患部へ直接留置になる局所的な薬物治療が可能である。また、ヒドロゲルは架橋点の崩壊により担持薬物を放出させるため、架橋点の結合様式の種類や基本材料となる高分子濃度によって崩壊速度を制御することで薬物徐放性を持たせることが可能になり、長期的な有効治療濃度の維持という観点からも薬物送達担体として非常に魅力的である。

ヒドロゲルによる薬物治療は、治療部位近傍の薬物放出を想定しているため、薬物送達過程より薬物放出過程の考慮が重要となる。そして、ヒドロゲルから薬物を放出させる際、がん細胞などの異常細胞周囲の環境に反応して薬物放出可能な系の設計が有効である。がん細胞の増殖には、高い活性酸素種 (ROS) 生産を伴うが、高濃度の ROS は、細胞死の原因となる。そこで、がん細胞は生体内還元剤であるグルタチオン (GSH) を合成し、細胞内の抗酸化状態を高めることで、最適な条件で増殖する。³ また、GSH はタンパク質中のチオール基 (-SH) が ROS によりジスルフィド結合 (-S-S-) を形成した際に、チオール-ジスルフィド交換反応を介してジスルフィド結合を切断し、抗酸化状態を維持している。したがって、正常細胞では 10 μM 程度の低濃度で存在している GSH が、

異常細胞では 10 mM 程度の高濃度で存在している。

本研究では、異常細胞周囲における高い GSH 濃度と GSH のジスルフィド結合切断能に着目した。そこで、架橋点にジスルフィド結合を有するヒドロゲルを設計することで、異常細胞周囲において効果的に担持した薬物を放出させることが可能になると考え、末端にチオール基を有する四分岐型ポリエチレングリコール (4-arm-PEG-SH) および両末端にピリジルジスルフィド基を有する直鎖 PEG (OPSS-PEG-OPSS) を基本材料としたヒドロゲルを設計した。ヒドロゲルに担持するモデル薬物として、蛍光標識化したりポソームを用い、高濃度 GSH 存在下における架橋点のジスルフィド結合の切断に伴うヒドロゲルの崩壊挙動、およびヒドロゲルの崩壊に伴うリポソームの放出挙動を評価した。

2 実験操作**2-1 蛍光標識化リポソーム溶液の調製**

ポリプロピレンチューブに、リポソーム調製時にリン脂質 (DSPC) 濃度が 1 mM になるように秤量し、DSPC に対して 1 mol% のナイルレッド (NR) を混合し、クロロホルムで溶解し、窒素気流下でクロロホルムを除去した後、さらに真空ポンプで減圧乾燥し、脂質薄膜を得た。得られた脂質薄膜に緩衝液 (PBS, pH 7.4) を 1 mL 加え、DSPC の相転移温度以上である 60 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分水和させた後、ボルテックスミキサーで振盪し、脂質懸濁液を得た。得られた脂質懸濁液を液体窒素で凍結させ、60 $^{\circ}\text{C}$ に加温して融解させる操作を 5 回繰り返した後、エクストルーダーを用いて、直径 100 nm のリポソーム分散溶液を得た。

2-2 リポソーム担持ヒドロゲルの調製

4-arm-PEG_{10k}-SH 12.5 mg (1.25 μmol) 及び OPSS-PEG_{1k}-OPSS 2.5 mg (2.5 μmol) をそれぞれ 2-1 で得られたリポソーム溶液 125 μL に溶解させた後、それぞ

れの PEG 溶液を混合することでリポソーム担持ヒドロゲル 250 μL を得た。

2-3 ヒドロゲルの崩壊挙動及び担持リポソームの放出挙動の評価

2-2 で得られたヒドロゲルを濃度の異なる GSH/PBS 溶液 (10 mM, 10 μM , 0 M) 1 mL にそれぞれ浸漬させ、一定時間ごとにヒドロゲルの質量を測定し、eq. 1 に従い残存率を求め、ヒドロゲルの崩壊挙動を評価した。また、浸漬溶液の蛍光強度から eq. 2 を用い放出率を求め、リポソームの放出挙動を評価した。

$$W(\%) = \frac{w_t}{w_0} \quad \text{eq. 1}$$

W 質量残存率

w_t 時間 t 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

$$F(\%) = \frac{f_t - f_0}{f_{\max} - f_0} \quad \text{eq. 2}$$

F リポソーム放出率

f_t 時間 t における浸漬溶液の蛍光強度

f_0 $t=0$ における浸漬溶液の蛍光強度

f_{\max} ヒドロゲル完全崩壊時の最大蛍光強度

3 結果と考察

蛍光標識化リポソームを担持したヒドロゲルを GSH 溶液に浸漬させ、ヒドロゲルの崩壊に伴う質量変化 (Fig. 1) とヒドロゲルからのリポソーム放出に伴う浸漬溶液中の蛍光強度変化 (Fig. 2) を経時的に追跡した。

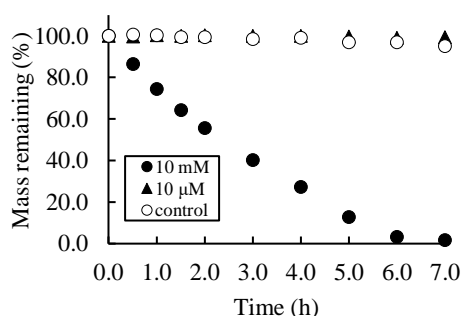


Fig. 1 Mass loss study of hydrogels.

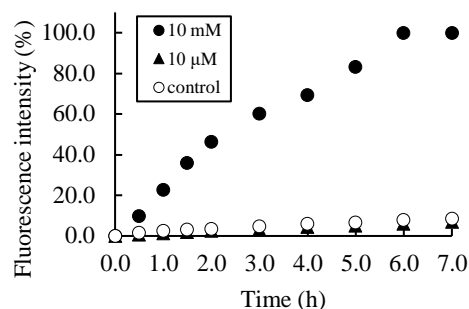


Fig. 2 Increase of fluorescence intensity of released NR-labeled liposome from hydrogels.

10 mM GSH 溶液にヒドロゲルを浸漬させた系では、緩やかな質量損失が認められるとともに、ヒドロゲルの質量損失に対応した蛍光強度の増大が認められ、ヒドロゲルの崩壊に伴うリポソームの放出挙動が示された。また、10 μM GSH 溶液では質量損失と蛍光強度の増大がほとんど認められなかった。したがって、本研究で設計したヒドロゲルは、がん細胞周囲に相当する環境において効率的な薬物放出が可能であるといえる。

4 結言

本研究で設計したヒドロゲルは、高濃度 GSH 存在下、すなわちがん細胞環境において効果的な担持薬物の放出挙動を示した。また、GSH 存在下において架橋点のジスルフィド結合の切断に伴い、ヒドロゲルが崩壊することから、体内にヒドロゲルが残存せず、治療後の患者の QOL 向上が見込める有用な薬物送達担体となり得るほか、溶液を混合することで容易かつ迅速に形成することが可能であるため、インジェクタブルゲルとしての応用も期待でき、低侵襲医療の発展に繋がる。

5 参考文献

- (1) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. *J. Mol. Biol.* **1965**, *13*, 238-252.
- (2) Jones, M. C.; Leroux, J. C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **1999**, *48*, 101-111.
- (3) Hayes, J. D.; Dinkova-Kostova, A. T.; Tew, K. D. *Cancer Cell* **2020**, *38*, 167-197.