

高分子薬剤の放出を可能とする腫瘍細胞 (環境) 応答性ヒドロゲルの設計

日大生産工(院) ○松戸 しず花 日大生産工 柏田 歩

1. 緒言

近年、薬物治療における副作用低減のために、必要な場所に必要な時間オーダーで、薬剤を届けるための薬剤送達技術であるドラッグデリバリーシステム(DDS)が注目されている。DDSには薬剤を担持させるための担体が必要とされるが、代表的な担体のひとつとしてヒドロゲルが挙げられる。しかしながら、ヒドロゲルの課題の1つとして、不均一な網目構造による薬剤の内封効率の悪さ、そして2つ目にDDS担体として標的細胞や組織に送達させた際に、独特の環境下でのヒドロゲル崩壊による担持薬剤の予期せぬ放出が考えられる。

そこで、4分岐ポリエチレングリコール(4-arm PEG)から形成されるヒドロゲルを利用することで、均一な網目内に担持する薬剤の分子量制御が可能にできると考えた¹⁾。

また、標的とする腫瘍細胞周囲には、活性酸素を還元するためのグルタチオン(GSH)が10 mM程度の高濃度で存在していることから、GSHによって切断可能なヒドロゲルの架橋点を設計することにより、腫瘍細胞のみの薬剤放出が可能になるヒドロゲルの調製が実現可能となると考えた²⁾。

そして、このヒドロゲルの架橋点に使用しない末端を用いて薬剤またはミセルのような小胞を直接担持させることで、さらなる付加価値を提供することができる。

ミセルは外側が親水性の表面に対し、内側に疎水性部位有しており、疎水性の薬剤を担持することが可能である。その中でもpH変化によって薬剤の放出を可能とするポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルの設計が望ましい。

しかし、静電相互作用により形成されるPICミセルは血中条件で安定性を有さず、ヒドロゲル同様に放出時間の制御ができないことが課題として挙げられる。

そこで、pH7.4で薬剤と見立てたMyoglobinのアミノ基とPICを構成するブロックコポリマー先端のCarboxy dimethyl maleic anhydride(CDM)との間にペプチド結合を形成させ、PICの安定性を向上させるとともに、腫

瘍細胞特有の環境である6.5程度の低pHで切断し薬剤を標的である腫瘍細胞に放出させることができると考えた³⁾。

本研究では、サイズ(分子量)の異なる2種類の薬剤を内封または直接結合させたヒドロゲルを調製し、GSH存在下において時間差で薬剤放出可能となる系の設計と薬剤を担持させたPICミセルを薬剤内封ヒドロゲルに直接担持させ、低pHかつGSH存在下で異なる種類の薬剤放出が可能となる系の設計を目標としており、その前段階としてGSH応答性Albumin内封ヒドロゲル、Lysozyme結合ヒドロゲル、さらにMyoglobin担持ミセルの評価を行った。

2. 実験方法および測定方法

2-1 ヒドロゲルの調製とGSHに応答した質量変化の評価

GSH応答性が期待されるジスルフィド結合とともにアリアルチオール-マレイミド結合を架橋点とする4-arm PEGヒドロゲルとGSH応答性を有さないことが予想されるアルキルチオール-マレイミドを架橋点とするヒドロゲルを調製し、GSH存在下での崩壊をヒドロゲル質量の経時変化により評価した。

2-2 GSH存在下でのAlbumin放出挙動測定

本実験では、高分子量薬剤モデルとしてAlbuminを用いた。2-1と同様にAlbumin内封ヒドロゲルを調製した。

得られたヒドロゲルをPBS(コントロール)、10 μM GSH(正常細胞条件)、10 mM GSH(異常細胞条件)溶液に浸漬させた。GSH存在下で放出されたAlbuminの経時変化を吸光測定と標識化されたAlbumin(BSA-488)の蛍光測定により評価した。

また、ヒドロゲル崩壊挙動を質量の経時変化により評価した。

2-3 GSH存在下でのLysozyme放出挙動測定

本実験では低分子量薬剤モデルとしてLysozymeを用いた。

Lysozymeはジスルフィド結合を介して末端にアルキルチオール基を有する4-arm PEGの一端と結合させ、残りの3つの末端を、マレイミド基を末端に有する4-arm PEGと結合させて目的のヒドロゲルを作製した。得られたヒドロゲルをPBS (コントロール), 10 μ M GSH (正常細胞条件), 10 mM GSH (異常細胞条件) 溶液に浸漬させ、放出されたLysozymeとAlbuminの経時変化を吸光度測定により追跡した。また、ヒドロゲル崩壊挙動に関してはヒドロゲル質量の経時変化により評価した。

3. 実験結果および検討

3-1 架橋点のGSH応答性評価

異常細胞周囲の環境に匹敵する 10 mM (高濃度) GSH 存在下で、ジスルフィド架橋ゲルは数時間程度、アリアルチオール - マレイミドゲルは 2~3 日程度かけて崩壊し、GSH に対する時間差を有した崩壊挙動が認められた。

3-2 Albumin 内封ヒドロゲルの GSH 応答性評価

サイズ(分子量)の大きい薬剤をヒドロゲルに内封することを想定した Albumin 内封ヒドロゲルを高濃度 GSH 溶液に浸漬したところ、架橋点を形成する結合の違いによる時間差を有したヒドロゲルの崩壊に伴う Albumin の放出が認められた。

しかし、アリアルチオール - マレイミドゲルは、Fig. 1 に示す通り、PBS 溶液に浸漬させた際にも時間経過に伴った Albumin の放出が認められ、ヒドロゲルの安定性向上が課題となる(Fig. 1)。

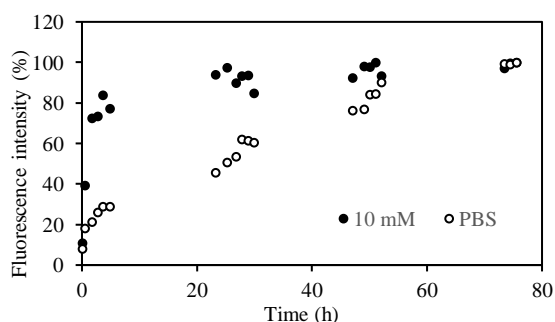


Fig. 1 GSH 存在下および不在下におけるアリアルチオール - マレイミドゲルからの Albumin 放出の経時変化

3-3 Lysozyme 結合ヒドロゲルの GSH 応答性評価

また、ヒドロゲルに GSH 応答性の結合を介して、サイズ(分子量)の小さい薬剤を結合することを想定した Lysozyme 結合ヒドロゲルを高濃度 GSH 溶液に浸漬したところ、ヒドロゲルから脱離するように Lysozyme の放出が認められた(Fig. 2)。したがって、GSH 存在下でヒドロゲルの崩壊はせず、担持薬物のみの放出が認められたと考えられる。

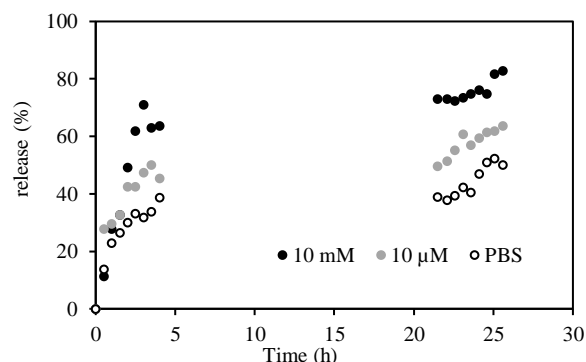


Fig. 2 ヒドロゲルに結合した Lysozyme の GSH に応答した放出の経時変化

4. まとめ

以上の結果から、GSH 応答性の結合を用いて Albumin を内封したヒドロゲルに、Lysozyme を結合させることにより、GSH 存在下におけるサイズ(分子量)の異なる薬剤を時間差で放出させる系の設計が可能になると考えられる。

今後は親水性薬剤と疎水性薬剤を送達させ、腫瘍細胞環境下において時間差で放出させることを想定した系の設計として、myoglobin 内包ミセルの放出挙動の測定を目指す。

5. 参考文献

- 1) Baldwin, Aaron D., and Kristi L. Kiick. "Reversible maleimide-thiol adducts yield glutathione-sensitive poly (ethylene glycol)-heparin hydrogels." *Polymer Chemistry* 4.1 (2013): 133-143.
- 2) Kharkar, Prathamesh M., April M. Kloxin, and Kristi L. Kiick. "Dually degradable click hydrogels for controlled degradation and protein release." *Journal of Materials Chemistry B* 2.34 (2014): 5511-5521.
- 3) Tao, Anqi, et al. "Polymeric micelles loading proteins through concurrent ion complexation and pH-cleavable covalent bonding for in vivo delivery." *Macromolecular Bioscience* 20.1 (2020): 1900161.