

高分子薬物の段階的な放出制御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, 薬物を目的の場所に選択的に送達することで効果を最大限に高め, 薬物治療における副作用低減を目指すための薬物送達技術である Drug Delivery System (DDS) が注目されている. DDS には薬物を担持させるための担体が必要とされるが, 4 分岐ポリエチレングリコール (4-armed PEG) を基本構成材料としたヒドロゲルは, 均一な網目を形成し, 薬物の分子量を考慮した担持が可能¹⁾であるため, DDS 担体として魅力的である. しかしながら, ヒドロゲルの DDS 担体としての利用には, 標的細胞や組織への送達過程でのヒドロゲル崩壊に伴う担持薬物の予期せぬ放出が課題として挙げられる.

そこで, ヒドロゲルが送達先である腫瘍細胞周囲の環境にのみ応答して, 担持薬物の放出を制御することを考えた. 標的とする腫瘍細胞は, 活性酸素による酸化ストレスを排除し, 腫瘍細胞の増殖を促進させるために, 生体内還元剤として知られるグルタチオン (GSH) を 10 mM 程度の高濃度に保持している. そのため, GSH によって切断可能な結合をヒドロゲルの架橋点に導入することで, 送達過程では担持薬物を放出せずに腫瘍細胞送達後に薬物を放出させるヒドロゲルの調製が実現できると考えた²⁾. そして, ヒドロゲルの架橋点に薬物またはミセルのような小胞を直接結合させることで, 放出時間の制御だけでなく, 疎水性分子の腫瘍細胞への送達が期待される.

架橋点に結合させるミセルは両親媒性のブロックコポリマーの自己集合による形成とともに, ヒドロゲルに直接担持困難な疎水性薬物を内部に組み込むことが可能である. さらに, その中でもポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルは, pH 変化を刺激として, 薬物の放出制御ができることが示されている³⁾. しかし, 静電相互作用により形成される PIC ミセルは生理的条件で不安定であり, ミセルの崩壊に伴う薬物の放出時間の制御は極めて困難である.

そこで, pH 7.4 で薬物と見立てた Myoglobin の側鎖であるアミノ基と PIC を構成するブ

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ることで, PIC の安定性を向上させるとともに, 腫瘍細胞周囲の 6.5 程度の弱酸性条件でペプチド結合を切断し薬物を標的である腫瘍細胞に放出できると考えた.

本研究では, サイズ (分子量) の異なる 2 種類の薬物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物放出可能となる系の設計と薬物を担持させた PIC ミセルを薬物内封ヒドロゲルに直接担持させ, 弱酸性条件かつ GSH 存在下で異なる種類の薬物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 結合ヒドロゲルからの各薬物モデルの放出挙動を評価した. さらに Myoglobin 担持ミセルの形成に関する評価を行った.

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または電子吸引基及びチオール基を有するアリールチオール - マレイミド結合を架橋点としてヒドロゲルを調製した. また, GSH 応答性を有しないと予想されるアルキルチオール - マレイミド結合を架橋点としてヒドロゲルを調製し, GSH 存在下での崩壊挙動をヒドロゲル質量の経時変化から評価した.

2-2 GSH 存在下での Albumin 放出挙動の評価

本実験では, 高分子量薬物モデルとして 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 10 mM GSH (腫瘍細胞条件), 10 μ M GSH (正常細胞条件), PBS (コントロール) 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

Design of tumor cell environment-responsive hydrogels enabling stepwise controlled release of polymeric drugs

Shizuka MATSUDO and Ayumi KASHIWADA

価した。また、ヒドロゲルの崩壊挙動を質量の経時変化から評価した。

2-3 GSH 存在下での Lysozyme 放出挙動の評価

本実験では低分子量薬物モデルとして 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-armed 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-armed 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 10 mM GSH (腫瘍細胞条件)、10 μ M GSH (正常細胞条件)、PBS (コントロール) 溶液に浸漬させ、放出された Lysozyme の吸光度を経時的に測定した。また、ヒドロゲルの崩壊挙動に関してはヒドロゲルの質量を経時的に追跡した。

3. 実験結果と考察

3-1 架橋点の GSH 応答性評価

腫瘍細胞周囲の環境に匹敵する 10 mM (高濃度) GSH 存在下で、ジスルフィド架橋ヒドロゲルは数時間程度で、アリアルチオール - マレイミドヒドロゲルは 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を示した。

3-2 Albumin 内封ヒドロゲルの GSH 応答性評価

サイズ (分子量) の大きい薬物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、低濃度 GSH 溶液に浸漬し、ヒドロゲルからの Albumin の放出挙動を経時的に評価した。(Fig. 1)

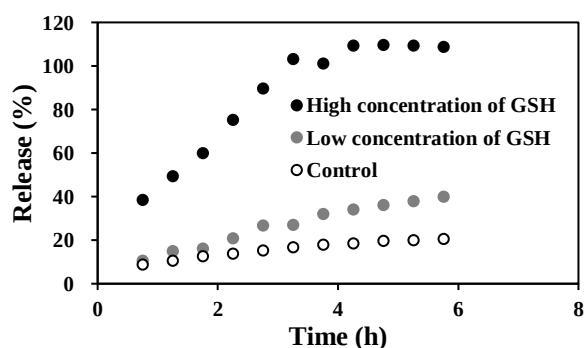


Fig. 1 Time course of release of albumin from disulfide cross-linked hydrogels in response to GSH.

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。

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) の小さい薬物を結合することを想定し、高濃度 GSH 存在下における Lysozyme 結合ヒドロゲルからの放出挙動を評価した。(Fig. 2) 高濃度 GSH 溶液に浸漬後、ヒドロゲルから脱離するように Lysozyme の放出が認められた。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。

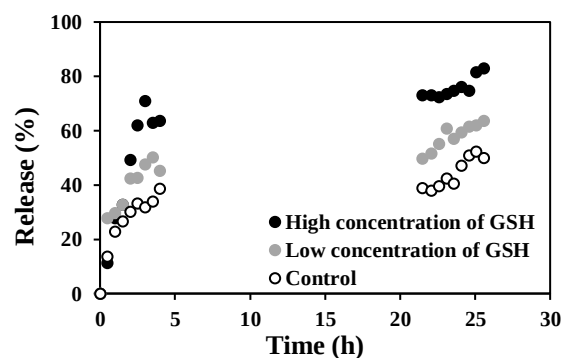


Fig. 2 Time course of release of lysozyme bound hydrogels in response to GSH.

4. 結言

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 を直接結合させることにより、GSH 存在下でサイズ (分子量) の異なる薬物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。

今後は親水性薬物と疎水性薬物を送達させ、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、ミセルに内包した Myoglobin の放出挙動の評価を行う。

5. 参考文献

- 1) Baldwin, A.D.; Kiick, K.L. *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 133-143.
- 2) Kharkar, P.M.; Kloxin, A.M.; Kiick, K.L. *J.Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 5511-5521.
- 3) Tao, A.; Huang, G.L.; Igarashi, K.; Hong T.; Liao, S.; Stellacci, F.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Kataoka, K.; Cabral, H. *Macromol. Biosci.* **2019**, *20*, 1900161.