



# 血小板ヒッチハイキング型ドラッグデリバリーシステムの創生 — 炎症部位での薬物放出に向けた オンデマンド薬物放出機能の搭載 —

## 1. 研究の目的

ドラッグデリバリーシステム (DDS) は、必要な時に、必要な場所で、必要な量の薬剤を放出させることで、最大限の薬効と最小限の副作用とを両立する未来医療として活発に研究されている。既報のDDSでは、薬剤運搬体 (DDSキャリア) として高分子ミセルやリポソーム、高分子微粒子などが検討されてきた。しかし、これらは生体から異物として認識され血中から排出されるために、薬効の長期化や患部のみでの薬効発現には未だ大きな障壁がある。そこで近年、自己の細胞や小胞などをDDSキャリアとして応用する試みがなされている。これらは異物として認識されず、長期間安定に体内を循環できることに加え、特定の部位に集積する機能を備えている。申請者らは、自己由来の細胞のひとつである血小板に着目した。血小板は血液中に大量に含まれる2~4 μmの無核の細胞であり、その寿命は約10日である。また、血小板は炎症部位に集積して活性化され、顆粒内容物を放出することにより、炎症の沈静化にも関与する。このような長期にわたる血中滞留と、特定の炎症部位への集積、および内容物の放出という血小板の機能は、極めて高機能なDDSキャリアと見なすことができる (表1)。そこで本研究では、自己の血小板を抗炎症薬剤の運搬体として利用する“血小板ヒッチハイキング”型DDSの確立を目標とする (図1)。血小板は、がんや動脈硬化、関節リウマチといった炎症部位に能動的に集積する機能を有していることから、血小板に運搬させる薬剤の選択により、これらの炎症性疾患に対する効果的な治療が可能になる。

表 1. 血小板と従来型 DDS キャリアとの比較

	従来型 DDS キャリア (リポソーム、ミセルなど)	血小板
サイズ	10~200 nm	2~4 μm
血中滞留性 (長期が好ましい)	数時間~数日	約 10 日
標的指向性	腫瘍部位 (受動的・EPR 効果)	炎症部位 (能動的)
新たな標的 指向性の付与	可能	可能
内容物の放出 する環境条件	温度や pH、生分解など	活性化因子 (主にタンパク質)

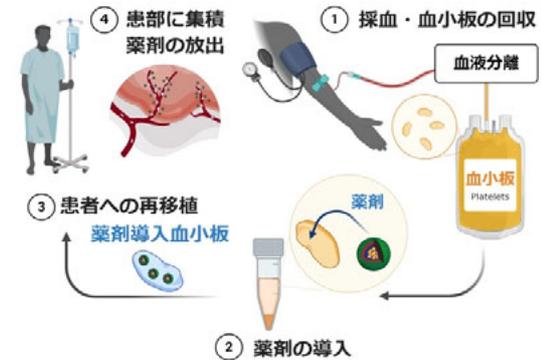


図 1. 血小板ヒッチハイキング型 DDS の概要

## 2. 研究の計画

血小板を薬物デリバリーキャリアとして用いるためには、血小板の機能を損なうことなく効率良く内部へ薬剤を導入し、疾患部位において薬効を発現させる必要がある。本研究では、高い薬物内封効率を可能にする高分子ベシクル調製法を確立し、さらにこの高分子ベシクルに時空間制御型の薬剤放出機能を組み込む。また、抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析も並行して進める。本研究では、以下の研究課題に取り組む

### (1) 光応答性高分子ベシクル調製法の確立

- ① 両親媒性ブロック共重合体の合成
- ② 水和法による両親媒性ブロック共重合体のナノ構造体形成
- ③ Inverted Emulsion法による高分子ベシクルの調製
- ④ 光応答性モノマーの合成

### (2) 抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析

- ① 抗炎症剤メトトレキサート (MTX) への蛍光標識
- ② MTXの血小板への取り込み挙動の解析

### 3. 研究の成果

#### (1) 光応答性高分子ベシクル調製法の確立

##### ① 両親媒性ブロック共重合体の合成

可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine) (PMPC) を合成した。

核磁気共鳴分光法ならびにゲル浸透クロマトグラフィーによりPMPCの分子量と重合度とを測定した結果、数平均分子量16900、重量平均分子量19500、多分散度1.15、重合度28であることがわかった。続いて、PMPCをmacroRAFT剤として用い、RAFT重合によりbutylmethacrylate (BMA) を

PMPCから伸長させることによりPMPC-*b*-PBMAを得た。今回、高分子ベシクルを得るために、3種類の疎水性ブロック (PBMA) の鎖長を有するブロック共重合体を合成した。合成した結果を表2に示した。以上の結果より、高分子ベシクルを調製するための両親媒性ブロック共重合体の合成に成功した。

表2. PMPC-*b*-PBMAの合成結果

	$D_p^{a)}$	$M_n^{b)}$ ( $\times 10^4$ )		
Run 1	35	1.64	2.32	1.10
Run 2	68	2.64		
Run 3	93	1.85	2.54	1.37

<sup>a)</sup> Calculated from <sup>1</sup>H NMR spectra. <sup>b)</sup> Calculated from GPC curves using near-mono disperse poly(methyl methacrylate) calibration standards.

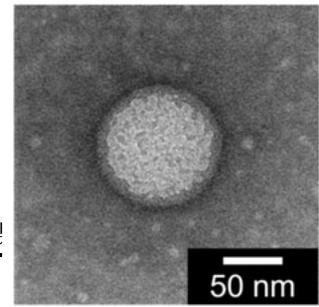


図3. Inverted Emulsion法により得られた高分子ベシクルのTEM画像

##### ② 水和法による両親媒性ブロック共重合体のナノ構造体形成

得られた両親媒性ブロック共重合体を用いて、ベシクル形成可能な両親媒性ブロック共重合体の組成を検討した。まず、PMPC-*b*-PBMA60 mgをエタノール60 mLに溶解させ、減圧留去することによりPMPC-*b*-PBMA膜を調製した。次に、250 mMスクロース水溶液50 mLを加え、マグネティックスターラーを用いて一晩攪拌した。その後、プローブ

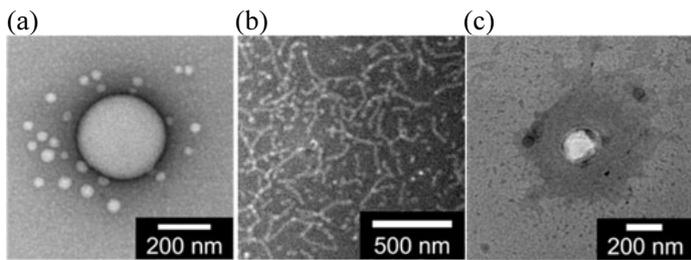


図2. 水和法により調製した両親媒性ブロック共重合体の透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像。PBMA ブロックの重合度 : (a) 35, (b) 68, (c) 93。

型超音波照射機を用いて超音波照射した。分散液中の高分子集合体を直接観察するために、得られた分散液を乾燥させ、ネガティブ染色によりTEM観察を行った。図2には得られたTEM画像を示した。PBMAブロックの重合度が35のものにおいては、ベシクル様の構造体が観察された (図2(a))。一方、PBMAブロックの重合度が68のものにおいては、ワームライクミセル様構造が確認されたが (図2(b))、PBMAブロックの重合度が93のものにおいては、明確な構造体は確認されなかった (図2(c))。臨界充填パラメーターに従うと、両親媒性分子の親水部と疎水部との体積比がほぼ等しいときにベシクルが形成される。ベシクル様構造体が観察されたブロック共重合体は、親水性のPMPCブロックの重合度が28であり、疎水性のPBMAブロックの重合度が35である。重合度がほぼ等しいことから、親疎水部の体積比がほぼ同等となったために、ベシクル様構造体は形成できたと考えられる。以上の結果から、PMPC<sub>28</sub>-*b*-PBMA<sub>35</sub>がベシクル形成に適したブロック共重合体であることが明らかになった。

##### ③ Inverted Emulsion法による高分子ベシクルの調製

水和法によるベシクル形成について検討し、PMPC<sub>28</sub>-*b*-PBMA<sub>35</sub>がベシクル形成に適したブロック共重合体であることがわかった。そこで、Inverted emulsion法によるベシクル形成について検討した。まず、280 mgのPMPC<sub>28</sub>-*b*-PBMA<sub>35</sub>を7.0 mLのトルエンに分散させ、そこに0.5 mLの250 mMスクロース水溶液を添加した。次に、プローブ型の超音波照射機を用い、超音波照射し、W/Oエマルジョンを調製した。続いて、30 mgのPMPC<sub>28</sub>-*b*-PBMA<sub>35</sub>を分散させた250 mMスクロース水溶液とトルエンの二相系に調製したW/Oエマルジョン

を0.5 mL添加した。この溶液に遠心分離機を用いて5分間5750 gの遠心力を加えることにより高分子ベシクルを調製した。動的光散乱法により、得られたベシクルの粒径を測定したところ、127 nmであることがわかった。図3には、Inverted Emulsion法により調製した高分子ベシクルのTEMの画像を示した。図より、100 nm程度のベシクル様構造体が形成していることがわかった。また、TEMの画像よりベシクル様構造体の膜厚を測定すると16 nmであった。これはPMPC-*b*-PBMAが二重膜を形成する上で十分に考えられる長さである。したがって、Inverted emulsion法により、高分子ベシクルが形成できたことが示唆された。

#### ④ 光応答性モノマーの合成

紫外線照射により崩壊する光応答性高分子ベシクルを調製するために2-nitrobenzyl methacrylateの合成を行った。まず、3.06 gの2-nitrobenzyl alcoholと3.07 gのTriethylamineを15 mLのジクロロメタンに溶解させ、氷浴下で30分間攪拌した。その後、2.70 gのmethacryloyl chlorideが溶解したジクロロメタン10 mLを滴下し、25 °Cで一晩攪拌した。生成した沈殿物をろ過で除き、減圧留去した。その後、得られた粗生成物をフラッシュクロマトグラフィー（溶離液：酢酸エチル/ヘキサン = 15 / 85 (v/v)）により精製したのち減圧流去し、黄色液体を得た。図4には得られた黄色液体の核磁気共鳴分光スペクトルを示した。図より、ケミカルシフトおよび積分値が理論値と一致していることから、光応答性モノマーである2-nitrobenzyl methacrylateの合成に成功したことがわかった。

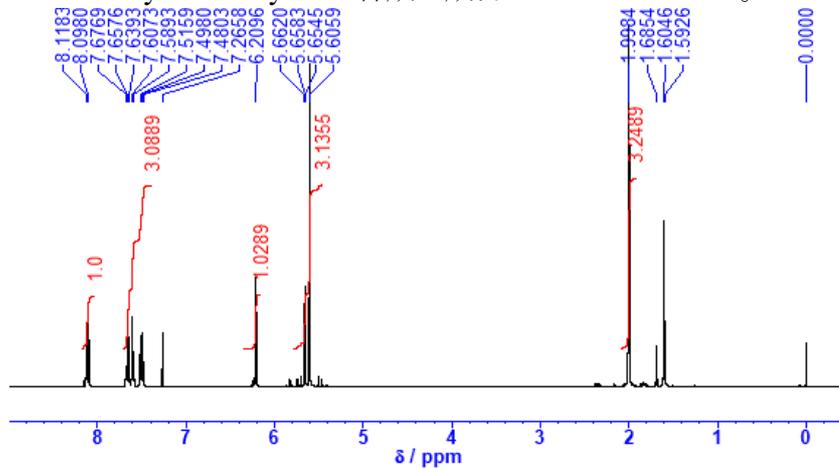


図4. 光応答性モノマー2-nitrobenzyl methacrylateの<sup>1</sup>H NMRスペクトル

#### (2) 抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析

##### ① 抗炎症剤メトトレキサート (MTX) への蛍光標識

MTXの蛍光標識と血小板への取り込み挙動の定量評価を試みた。まず、MTXに蛍光試薬である4-Acetamido-7-mercapto-2,1,3-benzoxasiazole (AABD-SH)をトリフェニルホスフィンおよび2,2'-ジピリジルジスルフィドを用いて縮合した。AABD-SHはカルボキシ基と反応してチオエステルを形成すると強い蛍光を発するが、得られた複合体 (MTX-AABD) はMTXもしくはAABD-SHには見られない強い蛍光 ( $\lambda_{ex}=368$  nm,  $\lambda_{em}=542$  nm) が検出された。以上の結果から、蛍光ラベル化MTX (MTX-AABD) が得られたことがわかった。

##### ② MTXの血小板への取り込み挙動の解析

ラット全血から調製した血小板懸濁液 ( $1.0 \times 10^9$  cells / ml : HEPES緩衝液) と濃度の異なるMTX-AABD溶液 (0.5, 0.25, 0.05 mM : HEPES緩衝液) を体積比1:9で混合し、遮光下、37 °Cで所定時間インキュベートした。その後、遠心分離で回収した血小板をRIPA緩衝液で溶解し、血小板溶解液中のMTX-AABDの蛍光強度 ( $\lambda_{ex}=368$  nm,  $\lambda_{em}=542$  nm) を測定したところ、MTX-AABDの濃度およびインキュベーション時間に応じてMTX-AABDの血小板への導入量が増加する傾向が認められ、最大で $0.5 \times 10^6$  mM程度のMTX-AABDが血小板内へ移行していることが示唆された。MTX-AABD導入血小板をリン酸緩衝液 (PBS) に分散 ( $2.0 \times 10^8$  platelets/mL) し、PBSへ溶出するMTX-AABDの定量を試みたところ、ごく初期の溶出のみ検出され、経時的な溶出挙動の評価には至らなかった。これらの結果から、MTX導入量の向上とMTX徐放能の付与が、血小板ヒッチハイキングによるMTXの運

搬を実現するための重要な因子になることが分かった。

#### 4. 研究の反省・考察

##### (1) 光応答性高分子ベシクル調製法の確立

検討を重ねた結果、高分子ベシクルを調製可能なブロック共重合体の組成を見出すことができた。この組成を基本にして、光応答性モノマーをもちいて疎水性ブロックを合成することにより、光応答性高分子ベシクルを調製できると考えられる。高分子ベシクルを調製可能なブロック共重合体の組成を見出すことに時間がかかり、研究期間内に光応答性部位を導入した高分子ベシクルの調製に至らなかったが、引き続き検討を進めていく。

##### (2) 抗炎症剤の血小板への取り込み挙動の解析

血小板へのMTXの導入量が当初の予想より高くなく、改善が必要であることがわかった。そこで、MTX導入量の向上を図り、MTX-ポリリジン複合体の合成とその血小板への移行挙動の評価を進めていく。

#### 5. 研究発表

##### (1) 口頭発表

- ① 柿木佐知朗, ペプチドを利用した医療材料表面の生理的活性化と非活性化, 第5回 日本金属学会 第7分野講演会, 2022年12月11日, 大阪 (招待講演) .
- ② 河村 暁文, 双性イオンポリマーの特性を利用したソフト(ナノ)マテリアルの創出, 2022年度関西接着ワークショップ第2回研究会, 2022年11月28日, オンライン (招待講演)
- ③ Akifumi Kawamura, "Emulsion-templated Synthesis of Smart Nanocapsules and Core-shell Microgels", International Congress on Pure and Applied Chemistry 2022, 2022年11月25日, マレーシア (招待講演)
- ④ 柿木佐知朗, 松下夕真, 埜口友里, Aldona Myzk, 上田正人, 岩崎泰彦, Roman Major, コラーゲン骨格模倣ペプチド固定表面のアンチファウリング特性, 第44回日本バイオマテリアル学会大会, 2022年11月21日, 東京.
- ⑤ 柿木佐知朗, 松下夕真, 埜口友里, Aldona Myzk, 上田正人, 岩崎泰彦, Roman Major, コラーゲン骨格構造様オリゴペプチド固定表面のin vitro動的環境下における血液適合性の評価, 第60回日本人工臓器学会大会, 2022年11月4日, 愛媛.
- ⑥ 河村 暁文, 川口 真穂, 成瀬 一希, Emrick Todd, 宮田 隆志, 水溶性ブロック共重合体を用いた還元環境応答性ナノカプセルの設計, 第51回医用高分子シンポジウム, 2022年7月25日, 東京.