

研究テーマ 「スルホベタインポリマーの温度依存的な細胞内移行メカニズムの解明」

研究責任者 所属機関名 岐阜薬科大学
官職又は役職 助教
氏名 土井 直樹 メールアドレス doi@gifu-pu.ac.jp

共同研究者 所属機関名 岐阜薬科大学, 中部学院大学
官職又は役職 名誉教授, 学事顧問
氏名 葛谷 昌之

所属機関名 岐阜薬科大学
官職又は役職 教授
氏名 近藤 伸一

所属機関名 岐阜医療科学大学
官職又は役職 教授
氏名 笹井 泰志

所属機関名 松山大学
官職又は役職 准教授
氏名 山内 行玄

(令和元年度募集) 第32回 助成研究 完了報告書

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

本研究では、所定温度以下で水に溶解し、所定温度以上で分子同士の会合の生じる、上限臨界溶液温度 (UCST) を示すスルホベタインポリマーが、体温と同様の 37℃ よりも低温 (4℃) 環境における癌細胞内への取り込みが促進されるメカニズムの解明に向け、スルホベタインポリマーの温度応答能評価、細胞癌の種類による細胞内移行性の差異ならびに時間依存性について詳細に検討を行った。

UCST を示すポリマーでは、疎水性鎖の導入が UCST の上昇を引き起こすことから、種々の温度における UCST を有するスルホベタインポリマーの合成のため、スルホベタインモノマーと疎水性モノマーとのランダム共重合を行い、疎水性鎖の構成割合を調整したスルホベタインポリマーを合成した。得られたスルホベタインポリマーの温度依存的なモルフォロジー変化について検討するため、ゼータサイザーを用いた粒子サイズの温度変化を測定したところ、UCST 以下の温度では疎水性鎖の構成割合により粒子サイズの上昇変化に相違が認められた。したがって、スルホベタインポリマーを構成する疎水性鎖の構成割合を変化させることで、その粒子サ

イズ調製と温度に応じた粒子サイズの増大、すなわちスルホベタインポリマーの分子間の静電相互作用ならびに疎水性相互作用に変化の生じることが示唆された。

癌細胞の種類によるスルホベタインポリマーの細胞内取り込みについて検討するため、蛍光物質としてフルオレセインを導入したスルホベタインポリマーを合成し、肝癌細胞株 (HepG2) と難治性固形癌として知られる膵臓腺癌細胞株 (BxPC-3) に対する細胞内取り込みの温度・時間依存性について Flow cytometry を用い評価した。HepG2 では、37°C の場合、0.5 時間以内にスルホベタインポリマーの細胞内取り込みが認められ、以降は細胞内取り込みが飽和する傾向を示した。4°C では、0.5 時間で 37°C の場合と同様のスルホベタインポリマーの細胞内取り込みが起り、その後時間依存的に細胞内移行性の増大が認められた。一方、BxPC-3 では、37°C の場合、HepG2 の 37°C の場合に比べ、時間に関係なく顕著にスルホベタインポリマーの細胞内取り込みが低いことが明らかとなった。4°C では、時間依存的なスルホベタインポリマーの細胞内移行性が認められた。ヒト膵癌細胞は、ヒアルロン酸を過剰発現しており、細胞外に産出されたヒアルロン酸がバリアーとして働くことで、高分子やナノキャリアの細胞内取り込みが抑制されることが知られているが、スルホベタインポリマーでは UCST 以下の温度により細胞内移行能が顕著に高まることから、癌を標的とする温度依存的な薬物送達システムへの応用が期待出来る。

2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

双性イオン型高分子は、細胞膜の構成成分であるホスファチジルコリンを模倣した構造を有する高分子であり、高い親水性とタンパク非吸着性を示すことから、ステントやカテーテル等の医療用材料、生体物質を検出するバイオセンサーの表面修飾、そして、薬物送達システム (DDS) を実現するナノキャリア開発に向け鋭意に研究されている。スルホベタインポリマーは、側鎖官能基としてスルホ基とアンモニウム基を有する双性イオン型高分子であり、所定温度以下で水に溶解し、所定温度以上で高分子同士の会合が生じる、上限臨界溶液温度 (UCST) を示すことが知られている。(Fig. 1, 2)

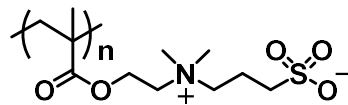


Fig. 1 スルホベタインポリマー

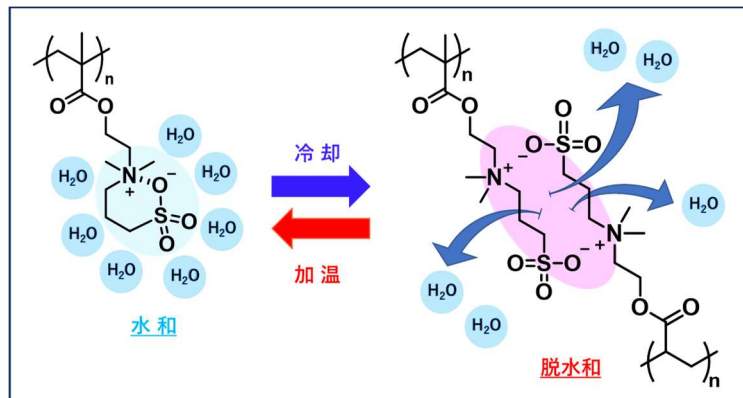


Fig. 2 温度依存的なスルホベタインポリマーの構造変化

当研究グループは先行研究により、スルホベタインモノマーと蛍光物質であるフルオレセインを有するビニルモノマーとの共重合を行い、得られたスルホベタインポリマーをヒト肝癌細胞株 (HepG2) に投与したところ、低温 (4°C) 環境では体温と同様の 37°C に比べ、10 倍以上高い癌細胞内の蛍光強度が認められた。ナノスケールの粒子サイズを有する高分子、あるいはその自己組織化により形成される高分子ミセル等のナノキャリアは、一般的にエンドサイトーシスによる細胞内取り込みを受けやすく、4°C の環境は全てのエンドサイトーシス経路を阻害することが知られている。したがって、4°C におけるスルホベタインポリマーの細胞内移行性は、エンドサイトーシス以外の経路によることが明らかであるが、通常の細胞培養環境である 37°C に比べ劇的な取り込みが生じた要因を解明できていない。

かかる背景より、本研究では、スルホベタインポリマーの低温環境における細胞内移行性が、UCST 以下の温度ではスルホベタインポリマーの側鎖官能基が脱水和状態をとることで疎水性となり、癌細胞膜との親和性が向上することに起因すると考え、以下の 2 点について検討を行った。

- i) 疎水性高分子を導入したスルホベタインポリマーの合成および UCST 評価
- ii) 細胞癌の種類によるスルホベタインポリマーの細胞内移行性とその時間依存性評価

i) 疎水性高分子を導入したスルホベタインポリマーの合成および UCST 評価

UCST 以下の温度におけるスルホベタインポリマーの細胞内移行性について検討するには、種々の UCST を有するスルホベタインポリマーの合成が不可欠である。直鎖状のスルホベタインポリマーの UCST は、ポリマー濃度と分子量に依存していることが知られており (R.T. Garner et al., *Polymer*, 27, 1734-1742 (1986), H. Willcock et al., *Polym. Chem.*, 5, 1023-1030 (2014)), UCST を示すには数十万以上の分子量を要する。しかし、生体への投与を指向したナノキャリアとしてスルホベタインポリマーを用いるには、分子量を数万以下へと制御する必要がある。そこで、本研究では、分子量を 1 万程度に制御した UCST を有するスルホベタインポリマーを合成するため、スルホベタインモノマーと疎水性モノマーとのランダム共重合を行うこととした。(Fig. 3)

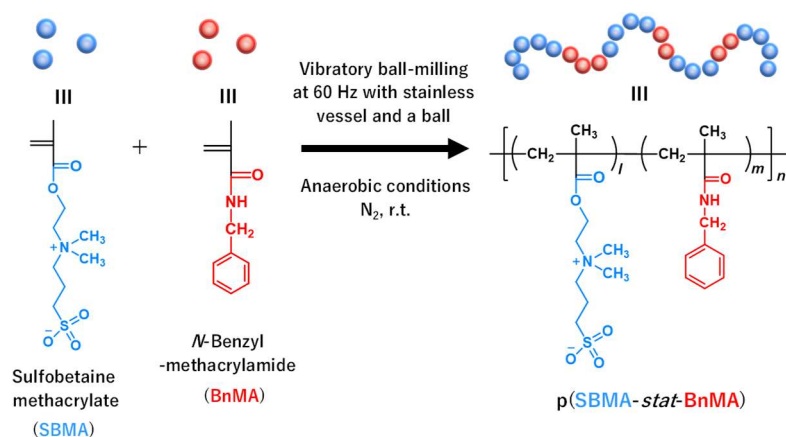


Fig. 3 疎水性鎖を導入したスルホベタインポリマーの合成スキーム

双性イオン型モノマーは親水性が高いために、疎水性モノマーと共に溶解させることが困難である、あるいは、両者が溶解した場合、モノマーと触媒との相性により不均一な組成のコポリマーが合成されることが懸念される。当研究グループは、固体ビニルモノマーの固相重合に関する研究を展開しており、溶媒かつ触媒を一切用いることなく、ビニルモノマーの重合が進行することを実証している。

そこで、スルホベタインメタクリレート (SBMA) と疎水性モノマーとして N-ベンジルメタクリルアミド (BnMA) を各組成比で調製した混合粉末について固相共重合を種々の時間行い、得られた生成物の ¹H-NMR 測定により、各ビニルモノマーのオレフィンプロトンに由来する積分値の減少率を基に、転化率の経時変化を評価した。Fig. 4 に示すように、SBMA 85 mol% と BnMA 15 mol% との共重合を行った場合、時間依存的な転化率の上昇が認められ、1 時間の重合により定量的にスルホベタインポリマーが合成された。また、各ビニルモノマーの組成比に関係なく、1 時間の重合により定量的なポリマー合成が認められた。さらに、各重合時間で得られた生成高分子のサイズ排除クロマトグラフィー測定を行ったところ、生成高分子の分子量とその分布は指数関数的に低減し、1 時間の重合により分子量約 8,000 の単分散性 (多分散度 1.05) のスルホベタインポリマーが得られた。目的とする分子量 1 万程度のポリマーを合成したことから、以降の検討では、1 時間の重合により得られたポリマーを用いることとした。

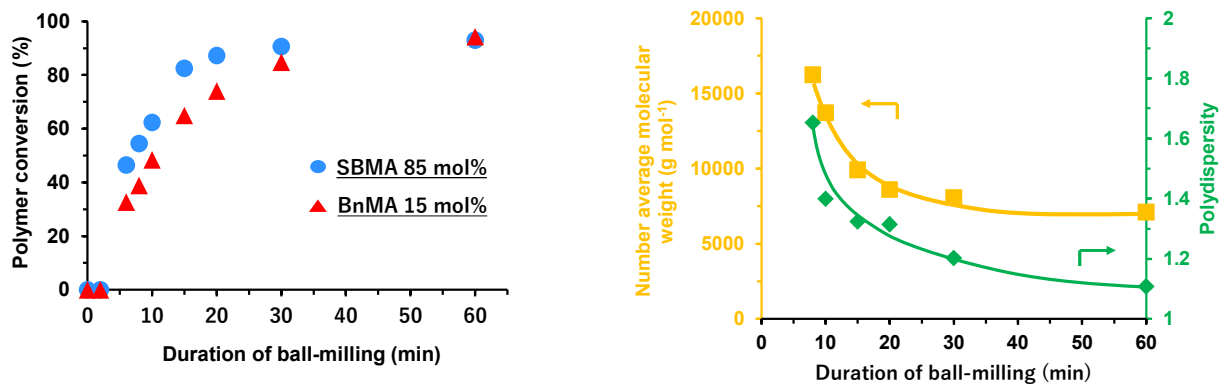


Fig. 4 転化率の経時変化 (左) と生成高分子の分子量とその分布 (右)

水に溶解したスルホベタインポリマーは、UCST 以下の温度では、側鎖官能基が開環することで分子内および分子間での静電相互作用が働き、それに続く疎水性相互作用により粒子サイズの増大が生じることが知られている。一般的に UCST 評価には、温度可変 UV-Vis を用いた 500 nm 程度の波長の透過率について検討が行われるが、UCST 以下の温度におけるスルホベタインポリマーの粒子サイズに関する詳細は明らかでない。そこで、温度可変 Zeta-sizer を用いたスルホベタイン水溶液の粒子サイズについて検討を行った。Fig. 6 に示すように、疎水性鎖を持たないスルホベタインポリマー (PSBMA) では、11°C 以下の温度により粒子サイズの増大が認められ、7°C では約 850 nm の粒子を形成していることが明らかとなった。

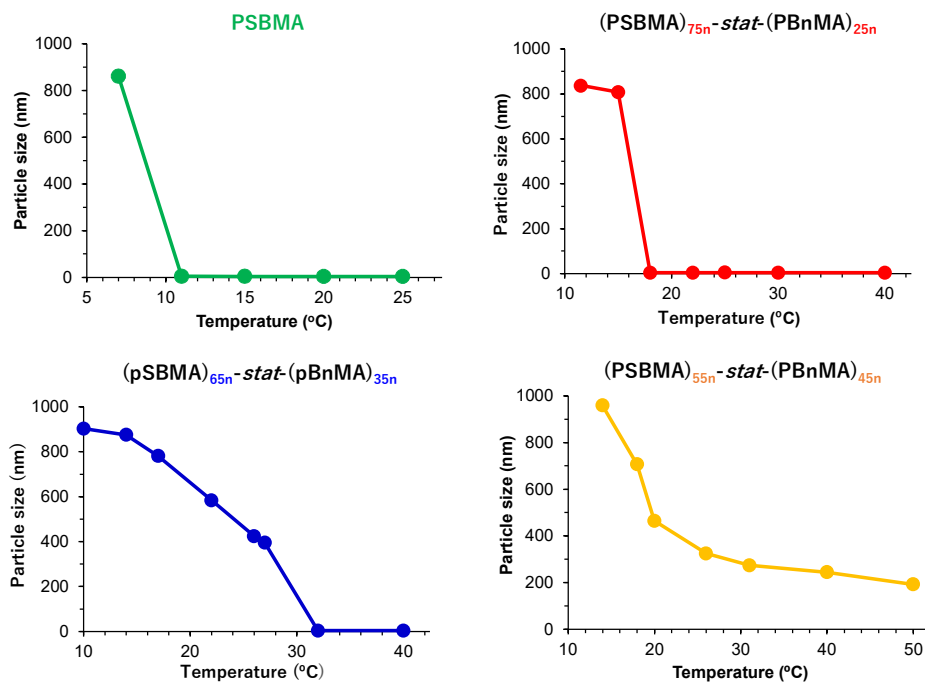


Fig. 6 疎水性鎖を導入したスルホベタインポリマーの粒子サイズの温度変化

また、25 mol% の疎水性鎖から構成されるスルホベタインポリマーでは、18°C 以下の温度から粒子サイズの増大が起こり、35 mol% の疎水性鎖を有するポリマーでは、32°C 以下の温度よ

り粒子サイズが増大することを明らかにした。両者の比較より、35 mol% の疎水性鎖を有するポリマーでは、UCST 以降では緩やかな粒子サイズの増大が認められたことから、疎水性鎖の構成比が多いポリマーは、疎水性鎖同士の相互作用をトリガーとした分子間の会合が生じるものの、側鎖官能基が閉環している親水性の高いスルホベタインの寄与により粒子サイズの増大が抑制されていると考えられる。そして、興味深いことに、45 mol% の疎水性鎖より構成されるスルホベタインポリマーでは、体温付近から 50 °C までの温度において、約 200 nm の粒子サイズを有することが明らかとなった。したがって、所定以上の疎水性鎖を有するスルホベタインポリマーでは、疎水性鎖同士の相互作用により分子内および分子間での会合により、ミセルを形成していることが示唆された。

ii) 細胞癌の種類によるスルホベタインポリマーの細胞内移行性とその時間依存性評価

血中投与されたナノスケールのサイズを有するナノキャリアは、血管壁の狭い正常組織へ移行しにくく、血管壁の脆い癌組織へ選択的に移行しやすいことが知られている。また、肝癌や肺癌等の上皮性癌はナノキャリアの移行性が高く、膵癌やスキルス性胃癌等の低分化腺癌では、ナノキャリアの移行性がサイズ依存的事であることが報告されている。UCST 以下の温度において、スルホベタインポリマーは粒子サイズが増大することから、癌細胞への取り込みが抑制を受けるのではないかと考え、異なる癌細胞株を用いた 37 °C あるいは 4 °C におけるスルホベタインポリマーの細胞内取り込み試験を実施した。

蛍光物質であるフルオレセインを導入したメタクリル酸誘導体、フルオレセインメタクリレート 7 mol% と SBMA 93 mol% との固相共重合により、分子量約 8,000 (PDI = 1.10) の蛍光ラベル型スルホベタインポリマーを合成し、ヒト肝癌細胞株 (HepG2) と難治性固形癌として知られるヒト膵臓腺癌細胞株 (BxPC-3) に対する細胞内取り込みの温度・時間依存性について Flow cytometry を用い評価した。

Fig. 7 に示すように、37 °C の HepG2 では、0.5 時間以内にスルホベタインポリマーの細胞内取り込みが認められ、以降は細胞内取り込みが飽和する傾向を示した。4 °C では、0.5 時間で 37 °C の場合と同様のスルホベタインポリマーの細胞内取り込みが起これ、その後時間依存的に細胞内移行性の増大が認められた。

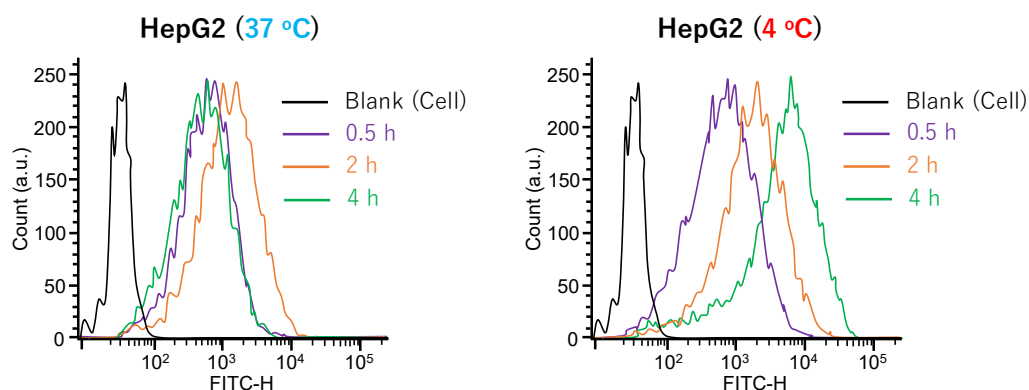


Fig. 7 HepG2 におけるスルホベタインポリマーの細胞内移行性

一方、Fig. 8 に示すように、37 °C の BxPC-3 では、37 °C の HepG2 に比べ時間に関係なくスルホベタインポリマーの細胞内取り込みが明らかに低い結果が得られた。4 °C では、時間依存的なスルホベタインポリマーの細胞内移行性が認められ、37 °C の場合に比べ顕著な移行性の向上を示した。ヒト膵癌細胞は、ヒアルロン酸を過剰発現しており、細胞外に産出されたヒアルロン酸がバリアーとして働くことで、高分子やナノキャリアの細胞内取り込みが抑制されることが知られているが、UCST 以下の温度ではスルホベタインポリマーの側鎖官能基が脱水和状態をとることで疎水性となり、癌細胞膜との親和性が向上することを支持する基礎的知見が得られた。

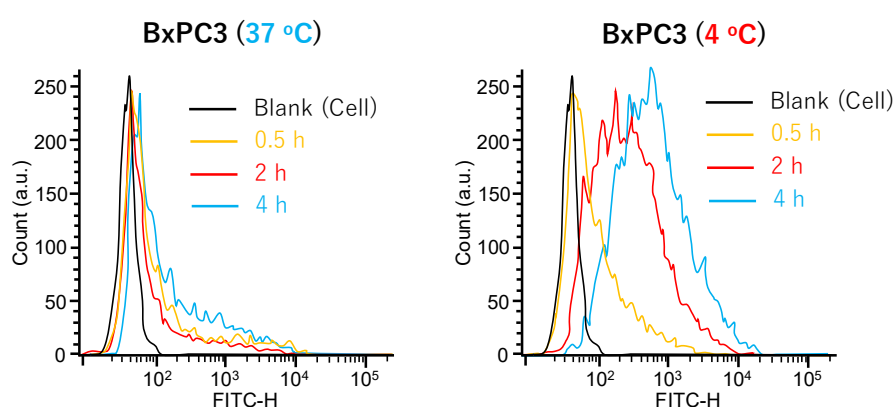


Fig. 8 BxPC-3 におけるスルホベタインポリマーの細胞内移行性

以上の知見を集約すると、本研究では、種々の構成割合の疎水性鎖を導入したスルホベタインポリマーを合成し、疎水性鎖の構成比によりスルホベタインポリマーの UCST が制御可能であることを明らかにした。各スルホベタインポリマーの UCST 以下の温度における粒子サイズは、疎水性鎖の構成割合が少ないタイプではスルホベタインの寄与に伴う劇的なサイズの増大が認められ、疎水性鎖の構成割合が多くなることで、温度依存的に緩やかな粒子サイズの増大を示した。本研究により得られた、疎水性鎖の構成割合の異なるスルホベタインポリマーは、11~32 °C の温度域に UCST を示すことから、幅広い温度域での応答能を有するポリマー開発が期待出来る。

また、フルオレセインを導入したスルホベタインポリマーは、ヒト肝癌細胞株では、体温と同様の温度において高い移行性を示したが、難治性固形癌であるヒト膵癌細胞株では、非常に移行性が低いことが明らかとなった。しかし、UCST 以下の温度では、癌細胞の種類によらず高い細胞内移行性が認められた。以上、本研究成果は、UCST 以下の温度においてスルホベタインポリマーの脱水和が生じることで疎水性環境を形成する特性が、スルホベタインポリマーの細胞内移行性の向上に寄与していることを示唆する重要な知見である。