

刺激応答性 PEG 化ナノゲルの調製と生体材料への展開

筑波大 (TIMS)¹・筑波大 (TARA)²・筑波大院数理物質³・筑波大院人間総合⁴大石 基^{1,2,3}・長崎 幸夫^{1,2,3,4}

【緒言】近年の遺伝子解析技術・分子生物学の急速な発展に伴い、抗ガン剤に代表されるような薬物およびプローブ分子の研究・開発が日増しに盛んとなってきている。このような研究・開発において、新たな生理活性や機能を発現する薬物・プローブ分子の探索と伴に、これら薬物・プローブ分子を標的組織・細胞に送達させ、目的の場所で期待通りの機能を発現させるナノデバイスの開発が注目を集めている。我々は、コアにポリアミンゲルおよびシェルに PEG 鎖を有するナノ粒子 (PEG 化ナノゲル) が、ガン組織 pH およびエンドソーム pH に応答して体積相転移を示すことを見出している [1,2]。本研究では、この PEG 化ナノゲルのコアにプローブ分子および薬物を組み込み、ガンのピンポイント診断・治療のためのナノデバイスの設計および構築を行った (Fig. 1)。

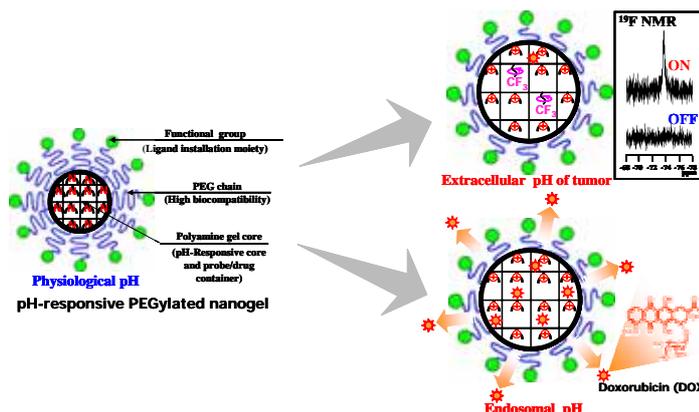


Figure 1. Schematic illustration of pH-responsive PEGylated nanogels for pinpoint diagnosis and therapy.

【実験】様々な比でフッ素モノマーとアミンモノマーを共重合した pH 応答性 PEG 化ナノゲルは、これまでと同様の方法で合成を行った。また、pH 応答性 PEG 化ナノゲルへの薬物 (ドキシソルピシン: DOX) の内包は、有機溶媒を用いたエバポレーション法により行った。一方、pH 応答性 PEG 化ナノゲルの診断機能評価は、pH を変化させ ¹⁹F NMR を測定することで行った。さらに、治療効果の評価は、培養細胞をもちいて、蛍光顕微鏡を用いた細胞内局在の解析および生存率を測定することで行った。

【結果・考察】様々なフッ素モノマーの組成を有する pH 応答性 PEG 化ナノゲルの pH に対する粒径変化を Fig. 2 に示す。その結果、フッ素モノマーの組成が増加するに従い粒径変化および相転移 pH が低くなることが明らかとなった。また、フッ素モノマーの組成が 50% 以上では pH に応答した体積相転移を示さなかった。これは、フッ素モノマーの組成が増加するに従い、コアの疎水性が増すことが原因と考えられる。Fig. 3 に生理条件下 pH=7.4 および固形ガン周辺 pH=6.5 における、ナノゲルの ¹⁹F NM

Preparation and Biomedical Application of Stimuli-Responsive PEGylated Nanogels

Motoi OISHI^{1,2,3}, and Yukio NAGASAKI^{1,2,3,4} (¹Tsukuba Research Center for Interdisciplinary Materials Science, ²Center for Tsukuba Advanced Research Alliance, ³Graduate School of Pure and Applied Sciences, and ⁴Graduate School of Comprehensive Human, University of Tsukuba, 1-1-1 Tenn-noudai, Tsukuba, Ibaraki 305-8573, JAPAN). Tel: 029-853-5935, Fax: 029-853-5935, e-mail: oishi@nagalabo.jp

Key Word: Nanogel / Stimuli-Responsive Sphere / PEG / MRI / DDS

Abstract: We describe the synthesis and characterization of stimuli-responsive PEGylated nanogels composed of a cross-linked poly[2-(*N,N*-diethylamino)ethyl methacrylate] (PDEAMA) core and PEG tethered chains that bear a carboxylic acid group or an acetal end-group as a platform moiety for the installation of bio-tags. In addition, PEGylated nanogels show unique properties and functions in synchronizing with the reversible volume phase transition of the PDEAMA core in response to various stimuli, such as pH, ionic strength and temperature. In this paper, we list some of the biomedical applications of the nanogels, including pinpoint diagnostic nanodevice and drug delivery nanodevice.

R のシグナル強度を示す。いずれの組成においても生理条件下 pH=7.4 では、ピークは全く観測されなかったが (OFF 状態)、固形ガン周辺 pH=6.5 においてはフッ素モノマーの組成が 50%未満で顕著にピークが観測された (ON 状態)。これは、pH が低下することでアミノ基がプロトン化され、コア内部が親水性となり、かつイオン浸透圧の上昇に伴い膨潤することで、フッ素モノマーセグメントの運動性が高くなったためであると考えら

れる。また、フッ素モノマーの組成が 10%で最大のピーク強度を示した。これは、ナノゲルの膨潤度とフッ素モノマーの含有量 (組成) が大きく影響しているためであると考えられる。すなわち、フッ素モノマーを共重合した pH 応答性 PEG 化ナノゲルは、¹⁹F MRI におけるガン特異的なプローブであることが示唆された。

次にフッ素モノマーを共重合していない pH 応答性 PEG 化ナノゲルに抗癌剤である DOX を内包させ、pH 応答性薬物キャリアとしての評価を行った。様々な pH における薬物リリース挙動を検討したところ、生理条件下 pH=7.4 においてはほとんど薬物リリースが観測されなかったが (約 10%のリリース量)、エンドソーム内 pH=6.5-5.3 では顕著な薬物リリースが観測された (約 40%のリリース量)。また、この DOX を内包した pH 応答性 PEG 化ナノゲル、DOX を内包した PEG 化ナノゲル (pH 非応答性) および DOX 単独の細胞内局在の観察を蛍光顕微鏡により行った (Fig. 4)。その結果、DOX 単独では、1 時間後には核に集積しているのが観察されたが、DOX を内包した pH 応答性 PEG 化ナノゲルおよび DOX を内包した PEG 化ナノゲル (pH 非応答性) では細胞質にのみ分布しているのが明らかとなった。また、36 時間後では、DOX を内包した PEG 化ナノゲル (pH 非応答性) は細胞質にのみ分布しているのに対して、DOX を内包した pH 応答性 PEG 化ナノゲルは DOX の核への集積が観察された。すなわち、この DOX を内包した pH 応答性 PEG 化ナノゲルは、エンドソーム内 pH に応答して薬物をリリースするキャリアであることが示唆された[3]。

【謝辞】本研究を進めるにあたりましてご協力いただいた、飯島道弘博士 (小山高専 講師)、林寿人博士 (筑波大) および角谷省吾氏 (筑波大) に感謝いたします。

[1] Hayashi, H.; Iijima, M.; Kataoka, K. Nagaski, Y. *Macromolecules* **2004**, *37*, 5389.

[2] Oishi, M.; Hayashi, H.; Itaka, K.; Kataoka, K.; Nagaski, Y. *Colloid Polym. Sc.*, **2007**, *285*, 1055

[3] Oishi, M.; Hayashi, H.; Iijima, M.; Nagaski, Y. *J. Materials Chem.* **2007**, in press

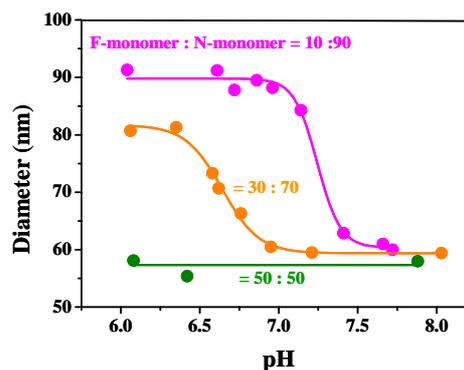


Figure 2. pH-dependency of the diameters of the PEGylated nanogels containing F-monomer.

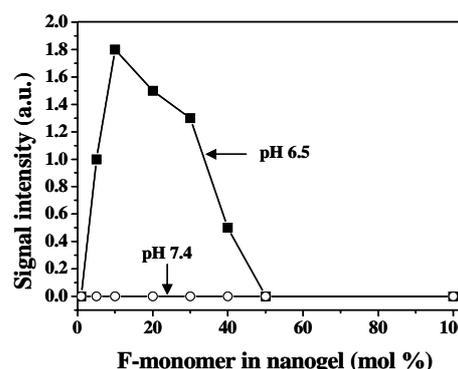


Figure 3. Intensity of the ¹⁹F MR signals of the PEGylated nanogels containing various amounts of F-monomer at pH 6.5 and 7.4.

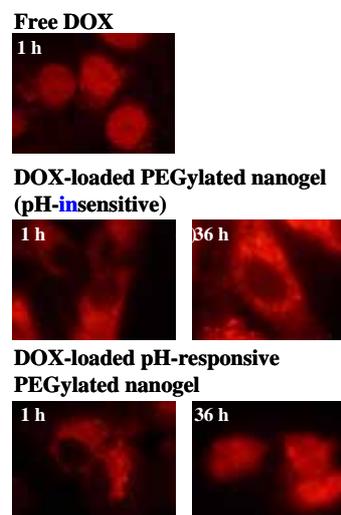


Figure 4. Fluorescence microscope images of the HuH-7 cells incubated with free DOX, DOX-loaded PEGylated nanogel (pH-insensitive), and DOX-loaded pH-responsive PEGylated nanogel