

図2 HA-IDA/CDDP ナノゲルのコンセプト

IDAの代わりにマロン酸 (MA) を用いて、同様のスキームでマロン酸修飾ヒアルロン酸HA-MAを合成した。IDAがCDDPと錯体配位すると8員環を形成する一方で、MAは6員環を形成する。このためMAの方がIDAよりもキレート形成定数が高いことが予想される。

またHAの代わりにカルボキシメチルセルロース(CMC)を用い、CMC-IDAを作製した。CMCはHAと非常に似た物性を示す一方で、ヒト細胞上の膜レセプターとは相互作用しないbio-inertな物質であることが知られている。このため物性は類似しつつ、生物学的が異なるHAの対照物質として用いられる。

引き続き、HA-IDA (またはHA, CMC, CMC-IDA) 0.20 gを15mL純水に溶解し、EtOHをHAが凝集しないように微量ずつ滴下した。さらに2-chloro-1-methylpyridinium iodide 66mgを添加した後、Triethylamine 70 μ L滴下し、FTSC 4.0mgを添加して、110 $^{\circ}$ Cで24時間還流した。最後に、純水/NaCl水溶液で透析の後に、凍結乾燥を行って、蛍光測定により修飾率を決定した。

2.2. ナノゲル調製

HA-IDA 5mg/mL溶液 (母液A) とCDDP 15mg/mL (母液B) 溶液をマイクロチューブ内で混合し、ヒートブロック95 $^{\circ}$ Cで加熱した。これを20分間水上で冷却し、純水で透析した後凍結乾燥する事によりナノゲルを作製した。原子吸光によってCDDP含有量を決定し、ナノゲルPBS溶液の粒子径をDLS (動的光散乱) によって測定した。

2.3. ナノゲルのがん細胞標的性の検証

胃がん腹膜播種細胞株であるMKN45Pは、共同研究者の東京大学附属病院腫瘍外科・北山准教授によって作製されたものを用いた。MKN45をヌードマウスに腹腔投与し、回収された腹水から培養、再投与を繰り返すことによって

樹立されたもので、高度な転移性を持つ細胞株である。また、腹腔の腹膜・臓器漿膜を覆っている中皮細胞の株化細胞であるMet-5A (ATCC; CRL-9444) を用いた。

まずMKN45Pに対して、HA-IDA及びCMC-IDAを投与し、その取り込みを共焦点顕微鏡によって観察した。さらにHA-IDA/CDDPナノゲルを調製し、同様に共焦点顕微鏡によって観察した。さらにHA-IDA/CDDPナノゲル、HA-MA/CDDPナノゲル、HA/CDDPナノゲル、CMC-IDA/CDDPナノゲルを作製し、0.1mg/mLの濃度でMKN45Pに添加4時間後、FACS測定によって取り込み量を比較した。

さらにMKN45PまたはMet-5Aを24穴プレートで培養し、ナノゲルを投与後、1日後にMTT assayによって殺がん細胞効果を検証した。

2.4. スフィロイド培養とナノゲルの浸透実験

共同研究者である東京大学生産技術研究所・酒井教授の指導の下、ポリジメチルシロキサン (PDMS) ハニカムマイクロウエルシートを既報に従い、ソフトリソグラフィ法によって作製した¹⁾。良く洗浄したシリコンウエハ上にフォトレジスト (SU-8; MicroChem, Newton, MA) をスピニングにより塗布し、フォトマスクを用いて露光後、現像液で処理し、CF₃⁺イオンを利用した反応性イオンエッチング (装置: SAMCO, Model RIE-10NR) を行った後に剥離して、モールドを作製した。PDMSと触媒 (Silpot 184, Dow Corning, Tokyo, Japan) を9:1で混合してモールドに流し込み、75 $^{\circ}$ Cで2時間加熱後に剥離して、酸素プラズマで10秒間処理後、親水化コーティングのためにMPCポリマー (Lipidure-CR1701, Nichiyu) のエタノール溶液に浸漬して、PDMSハニカムシートを得た。ハニカムシートを、24穴プレートと同様のフレームの底にセットし、酸素透過性24穴プレートを作製した (図3)。

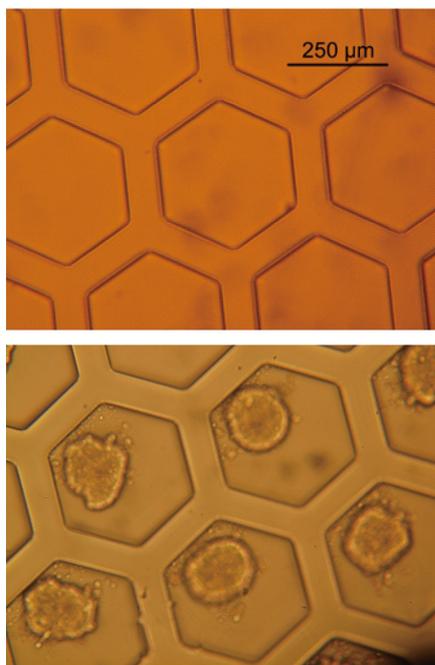


図3 作製したPDMS ハニカム培養プレート(上)と胃がん細胞株：MKN74 を用いて作製したスフィロイド

得られた培養プレートは底面素材にPDMSを用いているために、通常のポリスチレンディッシュの80倍の酸素を供給することが可能で、生理活性が高く、細胞密度が高いスフィロイドを作製することが可能である。

本研究ではPDMSハニカム培養プレートを用いて、胃がん細胞株であるMKN74を 5×10^6 cells/cm²で播種し、5日間培養することによって、直径200μm程度のスフィロイドを得た。さらに蛍光標識を行ったHA-IDA/CDDP ナノゲル、及びCMC-IDA/CDDP ナノゲルを0.1mg/mLの濃度で添加し、10時間後に共焦点顕微鏡観察によってナノゲルの浸透速度を評価した。

3. 結果

3.1. ナノゲルのキャラクタリゼーション

HA-IDAのIDA部位のメチレン基、HAのアセチル基のプロトン積分値の比から、修飾率を決定した(図4左)。IDA修飾率は40%程度まで向上可能であり、本研究ではHA-IDA(IDA修飾率35%)とHA-MA(MA修飾率36%)を用いた。

HA-IDA、HA-MA、及び対照物質としての未修飾のHAをCDDPと混合し、加熱してナノゲルを得た。未修飾HAもグルクロン酸のカルボキシル基とキレートすることによってナノゲル化する。DLS測定によって、PBS中ではHAが70μm程度に対して、ナノゲル化することによって10~20μmまで粒子径が変化した。またキレート配位子の種類によって粒子径が異なることが示され、ナノゲルサイズがHA-MA > HA-IDA > HAとなった。CDDPの水への溶解度はそれほど大きくないため、錯体形成定数が高いMAのCDDP配位数が一番多く、より疎水化して最も小さいサイズを取ったものと考えられる。

3.2. ナノゲルのがん細胞標的性

CD44はHAの6糖分を認識すると言われている。このためHAのCD44結合能は、化学修飾によって即座に失われるものではないが、HA主鎖への化学修飾率が増加するに従って、親和性は低下していくことが知られている。さらにHAを介したCD44のラフト化促進、あるいは低分子HAや可溶性CD44との競合によるラフト構造の消滅が、細胞の活性化や静止期への移行と、密接に関連していると言われている。また細胞種により活性化と静止化は刺激に対して逆転するケースも報告されている。このためHA-IDAやナノゲルが確かにがん細胞に取り込まれることを

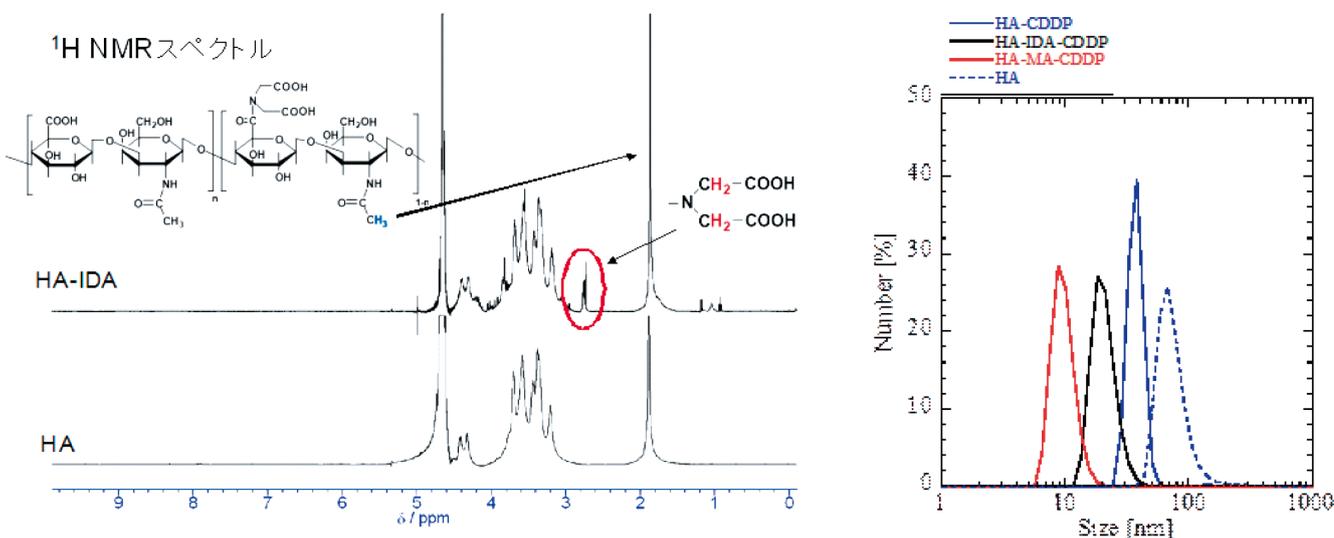


図4 HA-IDAの¹H NMR (左図)とCDDPと混合・加熱・透析を行って作製した各ナノゲルの動的光散乱により測定した粒子径(右図)

示すことが重要である。

HA-IDAとCMC-IDAの取り込み共焦点顕微鏡写真を図5に示す。CMC-IDAと比較して、HA-IDAが活発に播種細胞株に取り込まれていることが観察される。さらにHA-IDA/CDDPナノゲルの取り込み過程を共焦点顕微鏡で観察した結果を図6に示す。CDDPと錯体配位しナノゲル化しても、高いエンドサイトーシス効率を示した。すなわち、本研究においてはHAにIDA修飾を施しても、さらに

CDDPと錯形成をさせて複合化させても、効率的にエンドサイトーシスされることを示した。

さらにFACSによって各種ナノゲルの取り込み量を図7に示す。PBS中4時間後の時点で各ナノゲルはCDDPを十分に担持している (data not shown)。まずCD44発現量が高かった播種細胞株MKN45Pで取り込み量が多い一方で、中皮細胞株Met-5Aでは取り込み量が少ない。またCMC-IDA/CDDPナノゲルの取り込み量が一番少ない。

一方で興味深いことに、リガンドポリマーとしてHAを用いた時より、化学修飾を施したHA-MA、HA-IDAを用いたナノゲルの取り込み効率が高くなった。この点については、ナノゲルの構造とエンドサイトーシスの機構の関係をより詳細に調べていく必要がある。

以上の結果を踏まえ、MKN45PとMet-5Aに対してナノゲルを添加し、MTT assayを行った結果を図8に示す。CMC-IDA/CDDPナノゲルは若干毒性が低下するものの、CDDPとほぼ同様の用量作用曲線を描く。これに対してHA-IDA/CDDPナノゲルとHA-MA/CDDPナノゲルは、播種細胞に対しては遊離CDDPと同程度かそれ以上の殺細胞効果を発現するのに対し、中皮細胞に対しては非常に低い毒性を示し、がん細胞選択性を発現して著しく副作用を低減できる可能性が示唆された。

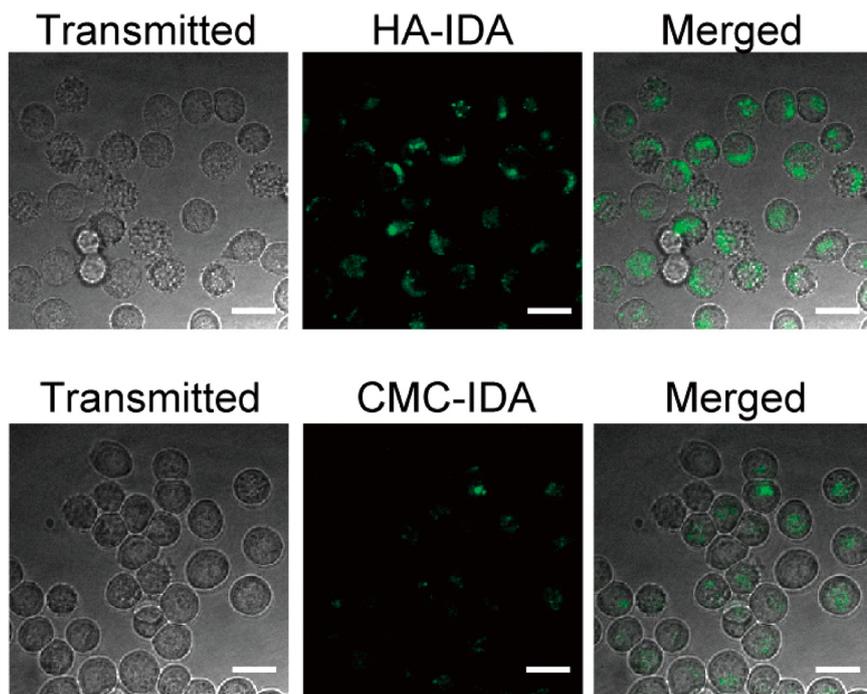


図5 HA-IDA 及び CMC-IDA の MKN45P 取り込み効率

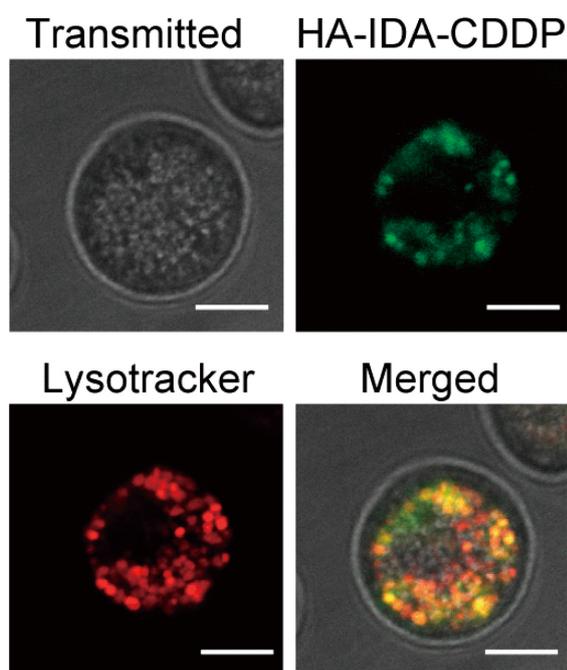


図6 ナノゲルの MKN45P 取り込み過程の共焦点顕微鏡観察

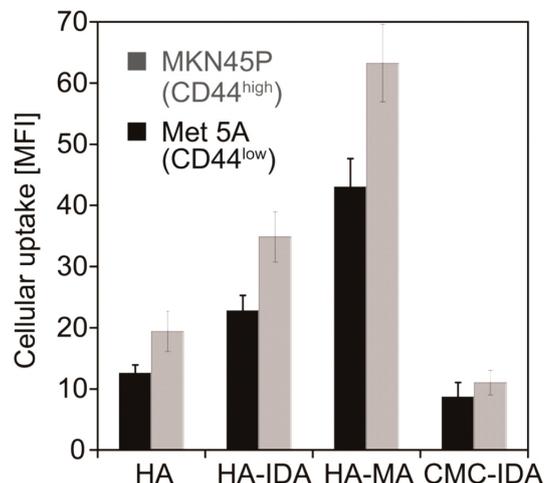


図7 各ナノゲルの MKN45P 取り込み量の比較

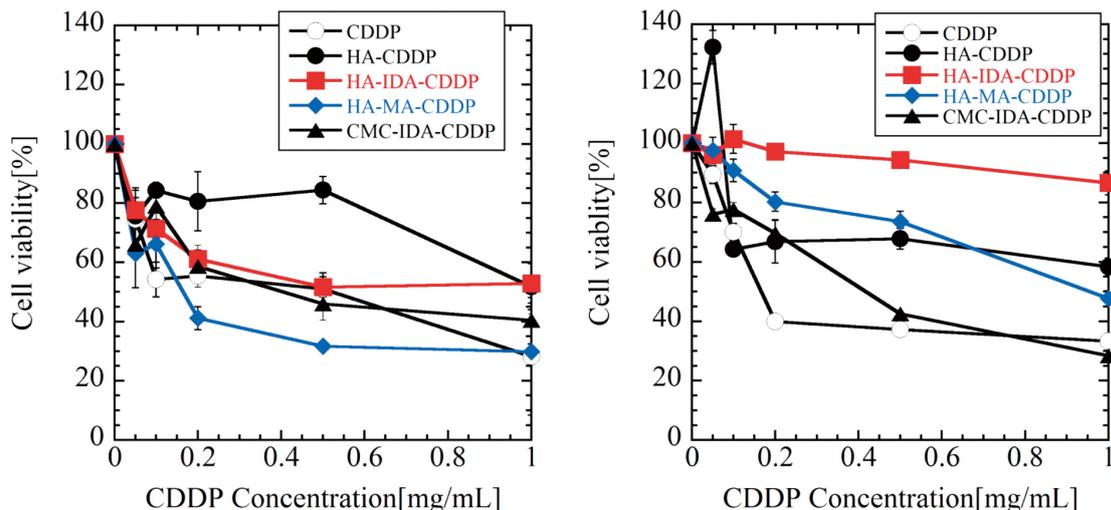
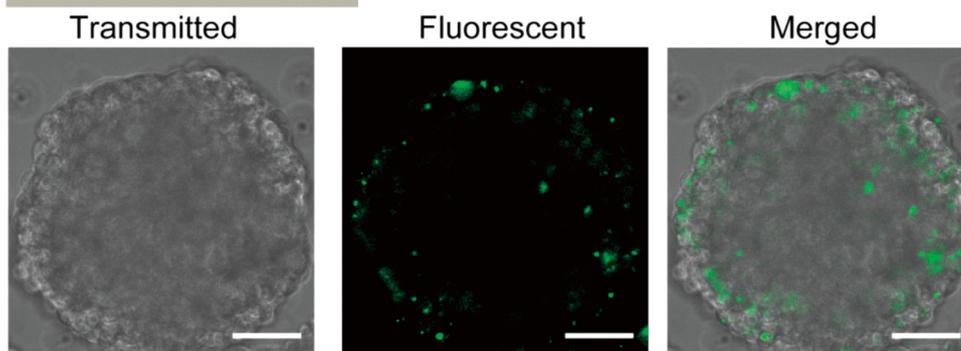


図8 各ナノゲルの腹膜播種細胞株 MKN45P (左)と中皮細胞株 Met-5A (右)への MTT assay の結果

HA-IDA(Polymer)



HA-IDA-CDDP(Nanogel)

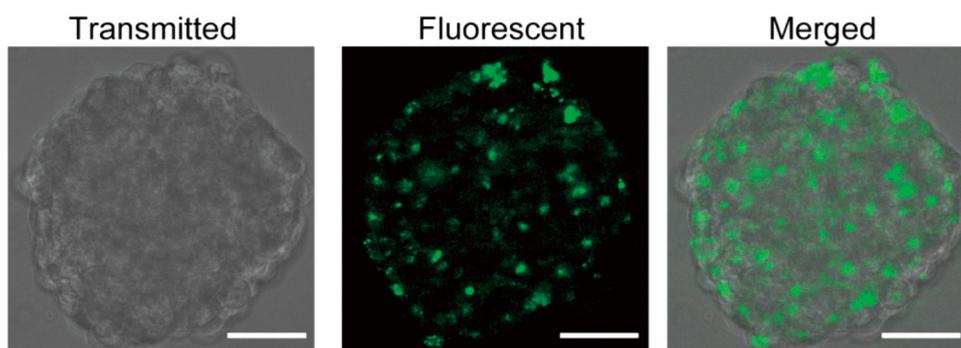


図9 MKN74 スフィロイド浸透性：HA-IDA (上)及び HA-IDA/CDDP ナノゲル(下)

3. 3. 胃がん細胞スフィロイドへのナノゲル浸透性

例え *in vitro* で高い効果を示しても、最終的に *in vivo* で高い効果を示さなければ意義ある研究とは言えない。腹膜播種に対する抗がん剤の腹腔投与で期待することは、腹腔から播種巣への抗がん剤の直接的な浸透による送達である。全身循環に移行してから血流を介して播種巣に抗がん剤が送達されるならば、静脈投与と同等の効果しか得られない。このために、外部境界から播種巣内部へのナノゲル浸透速

度を制御することは決定的に重要である。本研究では、プレート培養を用いた通常の *in vitro* 実験と動物モデルを用いた *in vivo* 実験をブリッジするものとして、スフィロイドを用いたナノゲルの浸透性評価を試みた。

実験結果を図9に示す。まずHA-IDAのみをスフィロイド外部から添加した所、10時間後でもスフィロイド内部までポリマーが拡散していない。一方で、CDDPとキレートさせHA-IDA/CDDPナノゲル化することによってスフ

イロイド中心部までナノゲルが拡散するとともに、プレート実験の結果とも良く一致してエンドサイトーシス効率も非常に高いことが観察された。これはHA-IDAのCDDPの配位の有無により、サイズや脂溶性が劇的に変化するためであると考えられる。

4. 考 察

ヒアルロン酸に二座配位子であるイミノ二酢酸 (IDA) やマロン酸 (MA) を修飾したヒアルロン酸誘導体を開発し、CDDPとのキレート形成により自発的に組みあがるナノゲルの開発を行って、IDAとMAという異なったリガンドを用いることにより、ナノゲルのサイズ等が異なることを明らかにした。さらにナノゲルはがん細胞に効率的に取り込まれ、遊離CDDPと同等かそれ以上の抗がん特性を発揮するのに対して、中皮細胞に対する毒性を劇的に低減できることを初めて明らかにした。

さらに一歩踏み込み、高酸素透過性培養プレートを用いて胃がん細胞スフィロイドを作製することに成功し、スフィロイド中でナノゲルの拡散性が劇的に向上することも見出した。現在 *in vitro* の結果に基づき、動物実験の検討を開始している。

ヒアルロン酸のCD44との結合、エンドサイトーシス、分解、細胞内情報伝達は、まだまだ不明な点が多く生理学的な研究が精力的に行われている。ナノゲルが効率的にエンドサイトーシスされる機構については、ヒアルロン酸分解酵素、エンドサイトーシス阻害剤やオリゴHA、抗CD44等を用いた更なる研究の深化が必要である。またナノゲルが間質中を拡散する機構についても、FCS等を用いたより詳細な研究が期待される。

5. 総 括

本研究では、ヒアルロン酸 (HA) にイミノ二酢酸 (IDA) 等を修飾した非常に単純な化学合成で作製したHA誘導体 (HA-IDA) を用いた研究である。EDTA等はかなりの高濃度を静脈投与しても安全なことがわかっている。イミノ

二酢酸はEDTAを丁度半分にしたと考えられる分子であり、潜在的に生体適合性が高い分子であると考えられる。実際合成したHA-IDAそのものは、繰り返し実験を行った結果 *in vitro* と *in vivo* での毒性は非常に低いことが明らかになった。合成スキームと化学構造の単純さから、将来臨床で十分に利用可能な材料となりうる。一方でこのポリマーとシスプラチン (CDDP) から作製したナノゲルの機能は、本研究で明らかにしたように、腹膜播種の腹腔投与DDSを実現する上で様々な利点を持っていることが明らかになった。今後は他のがん種への適用検討も有益であると考えられる。

さらに本研究とコスメトロジー分野への貢献を総括する。一般にHAの組織浸透性は非常に低く、分子量1kDa以下のHAの角質透過性などが報告されているが、本研究で用いている100kDaのHAが組織を浸透していくことはない。しかしイオンとキレートすることによって、組織の間質中を高速拡散することが示唆された。近年、ヒアルロン酸は保水性を高める化粧品材料として需要が増加している。HAをイオンや疎水性物質と複合化して、分子量が高いHAの回転半径を抑え、ナノサイズ化することにより組織浸透性を制御する、と考えれば、本研究はDDSの分野に止まらず、広く化粧品のR&Dにも応用可能な知見であると考えられる。

6. 謝 辞

本研究の遂行にあたりコスメトロジー研究振興財団よりご援助を賜りましたことを感謝申し上げます。ヒアルロン酸をご供与頂いたキッコーマンケミファに感謝致します。またスフィロイド作製プレートの作製をご指導頂いた東京大学生産技術研究所・酒井康行教授、腹膜播種細胞株をご供与頂いた東京大学医学部付属病院・北山丈二准教授に感謝致します。最後に、本研究の実験を行ったバイオエンジニアリング専攻修士課程2年平本翔大君、JSPS博士研究員・太田誠一博士に感謝致します。