総合論文

光照射による生理活性物質の機能制御法の開発

村山 周平^{*1}, 加藤 大²

生命機能は様々な生理活性物質によって制御されていることから、細胞内・生体内において生理活性物質の機能を非侵襲的に時空間制御可能な手法を開発することで生命機能を自在に操作できるようになり、生命機能の解明や疾病原因の究明、さらには医療にも貢献できると考えられる。著者らは、ゲルの3次元網目構造を利用して、「多様な生理活性物質について」「任意のタイミングで」「外部信号によって標的とする位置だけで」「非侵襲的に」働かせることが可能な方法を開発し、PARCEL法と名づけ、医療応用への展開を目指している。本制御法において、内包分子はゲルの網目構造に物理的に捕捉されており、網目構造の大きさを変えることで、タンパク質から核酸、低分子に至る様々な物質を制御できる。また、内包分子はゲルの網目構造に保護されているため細胞内でも安定に存在することができ、必要時に外部信号で放出させ活性化することが可能である。ゲル材料となるモノマーの種類によってゲル分解信号を容易に変更することができ、これまでに光で分子の機能制御に成功している。本粒子は非常に柔らかく、タンパク質内包したゲルは迅速に腎排泄されるが、量子ドットを内包したゲルは体内動態が変化し、高い血中滞留性と腫瘍への蓄積が見られた。このような結果から、将来的には診断と治療を一体化する安全なセラノスティクスプローブへの応用が期待できる。

1 緒言

生命機能は、タンパク質をはじめとする様々な生理活性物質の働きによって制御されており、細胞内や生体内において、それらの生理活性物質についてその機能を、非侵襲的かつ精確に時空間制御可能な手法を開発することができれば、生命機能を自在に操作することが可能になり、生命の解明や疾病原因の究明につながると期待できる。

また、医療の分野においては、生体内の目標とする疾患部位以外の場所で薬剤が機能し、正常な細胞・器官を損傷することによって副作用が生じていることから、侵襲性の低い医療を目指すうえで、タンパク質製剤をはじめとする治療薬や診断検査薬といった薬剤を標的とする『必要な場所である』疾患部位のみで、『必要な量だけ』、『必要な時に』選択的に機能させるドラッグデリバリーシステムの構築が求められており、様々な研究が精力的に行われている。さらに、機能性薬剤キャリア (therapeutic: 治療) について、腫瘍などの疾患を認識し外部から観測可能な機能 (diagnostic: 診断) を付与することで、侵襲性を抑えて治療と診断の一体化 (theranostics: セラノスティクス) を行

うことが期待できる。

これまでに、タンパク質をはじめとする薬剤の機能発現について、光・磁気・超音波・pH等の外部信号によって制御するキャリアとして、ケージ化合物、ベシクルやミセル等の二重膜構造を用いた粒子などが開発されているが、このようなキャリアに薬剤を担持させるためには、個々の化合物に対して化学的な修飾など、特別な操作が必要であり、低分子薬剤からタンパク質まで大きさや性質の異なる様々な物質についてそれらの特別な操作無しに、物質の機能を非侵襲な外部信号で制御することができる簡便で汎用的な方法は、ほとんど存在しなかった。

著者らは、ゲルを構成する網目構造に着目し、X字型の光開裂性架橋剤を材料とするゲルのケージを利用し、外部からの光信号によってタンパク質などの物質について放出・機能発現を制御する新しい汎用的手法を開発し、Protein Activation and Release from Cage by External Lightの頭文字を取って、疾患部位に薬剤を安全に届けるイメージ (Fig. 1) から、「小包」に因んでPARCEL法と名づけた。本法は、光応答性ゲルが形成する3次元網目構造を利用して、機能を維持した状態でタンパク質・核酸・酵素など様々な生理活性物質について物理的に内包するものである。内包物質の大きさが網目構造の形成する隙間 (孔) よりも大きい場合、物質のゲル内での移動は制限され、ゲル外部に存在する物質と相互作用できなくなるため内包物質の機能が抑制される。このようなゲルに対し

* E-mail: murayama.shuhei@qst.go.jp

¹ 国立研究開発法人量子科学研究開発機構放射線医学総合研究所分子イメージング診断治療研究部: 263-8555 千葉県千葉市穴川4-9-1

² 東京大学大学院薬学系研究科: 113-0033 東京都文京区本郷7-3-1

Fig. 1 Image of the PARCEL method

Fig. 2 A) Structure of the photo-responsive linker: 1, connection unit; 2, photo cleavable unit; 3, control mesh size unit. B) Mechanism of photocleavage of *o*-nitrobenzyl group.

て、外部から光信号を加えると網目構造の切断が起こり、拡張された網目構造の隙間から内包されていた物質が外部に放出され、内包物質はその活性を回復する。

この光応答性ゲルの特徴は、ゲルを構成する架橋剤を変更することで、内包可能な物質、応答する外部刺激、ナノ粒子の硬さや、動態などを容易に変更可能な点である。例えば、架橋剤の主骨格となっているモノマーの鎖長を変化させることで、ゲルを構成する網目構造の大きさが変化し、内包可能な物質について大きさを調整することができる。また、内包物質は、ゲルの網目構造と化学的な結合を形成せずに物理的に保持されているだけであるため、内包

可能な物質の性質にほとんど制限は無い。その他にも、ゲルを構成する刺激開裂性架橋剤の種類を変化させることで、ゲルが分解する外部信号を変更することが可能であり、これまでに光のみならず放射線で分解するゲルの開発にも成功している。さらに、内包する物質の固さを変化させることで、粒子の固さを変え、体内での動態を大きく変えることにも成功した。

本稿では、著者らが過去に論文として報告している各種刺激応答性ゲルを用いた、生理機能性物質の制御とそれによる生体機能制御の研究について、個々の事例を出して紹介する。

2 光応答性ゲルによる生理活性物質の機能制御

2・1 光応答性ゲルによるタンパク質機能制御

ポリエチレングリコール (polyethylene glycol, PEG) は、親水性が強く、また、その鎖長が異なるものを市販品として容易に入手できることから、親水性ゲルの材料として優れており、著者らは、X字型のPEGをベースに、末端にゲル形成部位としてのアクリル酸残基、間に光開裂性置換基として*o*-ニトロベンジルユニットを導入し、分子量6000近くのX字型の光開裂性架橋剤を設計・合成し (Fig. 2A)、タンパク質 (トリプシン) 存在下、アクリルアミドと共にラジカル重合させることで、トリプシンを内包する光応答性のウェルサイズ (7 mm ϕ 程度) のゲルを調製した。このゲルは、アクリルアミド鎖とX字型の光開裂性架橋剤が構成する網目構造を持ち、それによって、トリプシンを外部環境から隔離し、安定な状態で保護している。ゲルに含まれる光開裂性置換基の*o*-ニトロベンジルユニットは紫外光の照射によって、5員環を形成した後に切断される (Fig. 2B)。トリプシン内包ゲルにおいて、光照射によってこの反応が起こると、網目構造が崩壊し、ゲルからの分子の放出が生じる。光信号によるこのゲルからのトリプシンの放出は、基質を用いて放出された酵素の活性を測定し確認した。この酵素活性は加えた光信号の強さに応じて強くなった (Fig. 3)。これは、外部からの光信号の量に応じて、ゲル鎖を構成する架橋剤の光開裂性置換基の切断が進んで、ゲルの網目構造が崩壊し、ゲル中に含まれているトリプシンが順次放出されたことを示唆している。

トリプシンをはじめとするプロテアーゼは、液中に溶かした状態で放置すると、プロテアーゼ同士がお互いに作用して自己消化が起こり、結果として酵素活性の低下が生じるが、ゲルを構成する網目構造は、内包するタンパク質を外部環境から隔離すると共に、内包されたタンパク質同士自身をもお互いに隔離しており、自己消化を抑え、長期間、酵素活性を保持することにも成功している (Fig. 4)。

また、本ゲルでは、網目構造を用いて、物理的にトリプシンを保持して機能制御を行っており、様々なタンパク質

Fig. 3 Effect of the UV light intensity of trypsin activity
All samples were measured in triplicate. Error bars represent means SD value.

について、その機能制御が可能であると考えられた。そこで実際にキモトリプシン、サーモリシン、パパイン、エラスターゼ、 γ -GTP (γ -guanosine triphosphate) など様々なタンパク質について、タンパク質自身に対する修飾など無しに、光信号によりその機能制御を試みた (Fig. 5)。一部の分子量の小さなタンパク質は光照射前から若干の酵素活性がみられており、酵素のゲルからの漏出が考えられた。計算上の網目の孔径は 12.4 nm であり、この大きさによって、約 30k Da 以上の大きさのタンパク質を保持し、その機能を制御していると考えられる¹⁾。

このように、ゲルを構成する網目構造はタンパク質同士の相互作用を低減する一方で、水をはじめとする低分子については自由に通すことが可能であり、トリプシン内包のゲルに対して、トリプシンの低分子基質を加えた場合、基質がゲルの中に浸入していき、保持されているトリプシンによって消化され、消化物がゲルの外へ徐放されることも確認している。

2.2 光応答性ゲルによる低分子の機能制御

一部の分子量の小さいタンパク質について、若干のゲルからの漏出がみられたこと、さらに低分子基質について網目構造による相互作用の障害が起きなかったという結果は、孔径が分子に比して大きいことによるものであり、網目構造の大きさをより小さくすることで、小さいタンパク質や、低分子化合物についても機能制御が可能になると考えた。そこで、第1世代ポリプロピルイミン-テトラミン-デンドリマーをベースに、分子量 553 と 1/10 程度の大きさの X 字型架橋剤を設計・合成した。光応答性の機能については、別に光開裂性架橋剤を合成した。これらの架橋剤

Fig. 4 Stability of encapsulated trypsin

Trypsin was stored 37 °C for a half day within the gel or solution. The remaining activities of trypsin was calculated by determining the ratio of the measured activity after UV irradiation versus the initial observed activity, which was measured just after preparation of the enzyme samples.

Fig. 5 Activities of five different enzymes encapsulated within hydrogel networks

Blue bars represent enzymatic activities before irradiation, and red bars represent those observed after irradiation.

Fig. 6 Fluorescence of five different size of fluorescein

blue bars, mean intensity without irradiation; red bars, mean intensity with irradiation. Error bars represent standard deviations.

Fig. 7 Trypsin activity by means of the UV irradiation of trypsin-containing nano gels *in vitro*

All samples were measured in quintuplet, and error bars indicate standard deviations.

を重合させることで、計算上は孔径 3.6 nm の網目構造を持つゲルを調製することができた。このゲルを用いることで、以前は光照射前にゲルからの漏出が確認された小さいタンパク質についてゲルからの漏出を抑えることができた。さらに糖鎖に結合させ分子量を調整したフルオレセインについても、幅広い範囲でゲルからの漏出を抑えて、光信号による放出制御することに成功している (Fig. 6)。同様に、先述のゲルでは困難であったベンゾイルアルギニンニトロアニリド (benzoylarginine nitroanilide, BAPNA)、4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 等、分子量数百の低分子化合物についても、放出を制御することにも成功した。本制御法では、内包分子に対して化学的な修飾を行っていないことも併せて、この結果は内包する分子の性質を問わずに機能制御が可能であるというゲルの 3 次元構造による機能制御法の汎用性の高さを示している²⁾。

2・3 光応答性ナノ粒子ゲルによる細胞内機能制御

このような、PEG ゲルは、内包物に対する選択性の高さと、内包物質を安定に保持することが可能な性質から、汎用的な生理機能制御のための材料として、期待が持てるが、ウェルサイズの大きさでは、生体への投与や、生体内での機能制御において、物理的に侵襲性が高く、適応が困難であるため、その性質を保ったまま、ゲル自体の微小化を試みた。生理活性物質共存下で、ラジカル重合の進行を制御することで 150～200 nm 程度の粒径をもつナノ粒子ゲルを開発した。この粒子径は反応時間を制御することでより小さい粒子を作ることに成功している³⁾。プロテアーゼの放出実験によって、このナノ粒子ゲルについても同様に光信号によって内包する生理機能性物質を放出制御

することを確認している (Fig. 7)。

実際に、*vivo* の条件で、ナノ粒子による分子機能制御ができる事を確認するべく、一般的なプロテアーゼによって分解されることで蛍光を発する基質であるボディピー (boron-dipyrromethene, BODIPY) カゼインをナノ粒子に包含し、細胞内にマイクロインジェクション法によって導入した。導入した細胞は、光照射前は基質の分解が生じず BODIPY 由来の蛍光は観察されないが、光照射することで BODIPY 由来の蛍光を確認することができた。これは、ナノ粒子ゲルの形状であっても、光照射前は内包する分子をその網目構造によって、細胞内に遍在する様々なプロテアーゼから隔離・保護されており、光信号によって鎖が切断された結果、ゲルの網目構造が崩れて、内包していた BODIPY カゼインが細胞内に放出され、細胞内に存在する各種プロテアーゼと相互作用できるようになり、細胞内プロテアーゼによって分解が生じたことを示している。

この様に、細胞内でタンパク質を外部信号によって放出・機能制御が可能なが示されたため、基質のみならず細胞内で生理活性機能を持つタンパク質を放出・機能させることで、細胞の機能応答を引き出すことが可能であると予想した。そこで本ナノ粒子ゲルに細胞死に関連するタンパク質である caspase-3 を内包し、細胞内にマイクロインジェクション法で導入し、その後、局所部分だけに光刺激を与えて局所的に caspase-3 を放出させた。結果、光照射を行った部位周辺から細胞が膨らみ始め、最終的には細胞全体に広がって細胞の崩壊を引き起こした (Fig. 8)。これは、光照射した部位で、caspase-3 が放出されたのちに細胞内の流れによって細胞全体に caspase-3 が広がっていった結果であると考えられ、細胞内での微小環境でのタンパク質の役割の分析などに応用できると期待している⁴⁾。

Fig. 8 Local activation of caspase-3 by focused UV
PCM, images show the progress of cell death induced by focused light; GFP, Recombinant proteins GFP which produced by cell and labeled the cytoskeleton of cell, to conform circumstances of cell; Texas-Red, Small florescence compound Texas-red, is injected with nano gel to check the nano gel is injected or not to cell; before irradiation and 2, 4, and 10 min after irradiation. The red circle indicates the irradiation point. All scale bars are 20 μm .

3 生体機能制御に向けた展開

3.1 ナノ粒子の高機能化

本ナノ粒子ゲルはウェルサイズゲルと同様に、網目構造によって物理的に分子を保持しており、網目構造より小さい物質は徐放されるが、網目構造の大きさを調整することで、化学的・生物学的な性質を問わず、分子量数百の rhodamine B から、70k Da を超えるデキルトランなどの糖鎖など、タンパク質以外の様々な物質についても安定に内包し機能を制御することが可能である (Fig. 9)。

また、核磁気共鳴法 (nuclear magnetic resonance, NMR) 及び計算モデルで確認したところ、ナノ粒子材料の X 字型架橋剤の 4 本の腕の内、周囲の架橋剤と結合して網目形成に関与している腕は 2~3 本であり、残る結合していない腕について、他の性質を持つ架橋剤を結合させることでゲルに新たな性質を加えることが可能であると予想された⁵⁾。

特に *vivo* の実験においては粒子に正の電荷を加えることで、細胞内への取り込みの向上が期待できることから、カチオン性のモノマーを設計・合成し、ナノ粒子ゲルの調製時に加えて、ナノ粒子表面に正電荷を付与した。このようなカチオン性のナノ粒子に蛍光色素 (フルオレセイン) を内包したものを、高分化型ヒト肝癌由来細胞株の HuH-7 細胞に添加したところ、カチオン性モノマーの存在比 0 % ではほとんど細胞内にナノ粒子由来の蛍光は検出されなかつ

Fig. 9 Nano gel can contain many kinds of molecules
All scale bars are 20 μm .

Fig. 10 Variation of the efficiency of nanoparticles internalization in HuH-7 cells with DAB-Ac percentage
The numbers of cells with fluorescence, the total number of cells, and the internalization efficiency are shown at the upper right of each panel. All scale bars are 20 μm .

たが、モノマー比 5 % を超える位から多くの細胞に蛍光が確認された (Fig. 10)。一方で、モノマー比 50 % を超えるようなナノ粒子では、細胞に対する毒性も見られた。

この細胞への取り込み機構を解明するために、細胞に各種のエンドサイトーシス阻害剤を添加したうえで同カチオン性ナノ粒子ゲルを添加したところ、クラスリン介在性エンドサイトーシス阻害剤である chlorpromazine を添加した時のみ、細胞内への導入が抑制されたことから、本粒子の細胞内への導入機構をクラスリン介在性エンドサイトーシスによるものであると証明した。

このナノ粒子ゲルは、今まで示してきたゲルの性質を失っておらず、網目構造によって内包分子を外部環境から隔離することができ細胞内でタンパク質基質を 4 日間に渡り安定に保存し、その後放出し機能させることが可能であった (Fig. 11)⁶⁾。

Fig. 11 UV activation of nano gel with BODIPY in cells

All scale bars are 20 μm .

3・2 カチオン性光応答性ナノ粒子ゲルを用いた siRNA による細胞機能制御

核酸は、負の電荷を持ち、遺伝情報の発現に重要な働きを担う。その中でも特に siRNA (small interfering RNA) は少量でタンパク質合成を一過的に停止することが可能であり、外部からの遺伝子を導入することが無いため、医療応用が期待される。一方、siRNA は生体内での不安定性から、そのままでは生体に投与しても十分に働かせることができないため、キャリアに安定に保持した状態で目的とする疾患の標的部位に運ぶ仕組みが必要である。

著者らは、siRNA がもつ負の電荷と、ナノ粒子ゲルが持つ内包物を外部環境から隔離し安全に保持することが可能な性質に着目し、カチオン性ナノ粒子ゲルについて、その電荷の強さを調節することで siRNA を外部環境から隔離した状態でゲルに安全に担持し、光照射によって siRNA の放出制御が可能なナノ粒子ゲルを開発した。光によるナノ粒子からの siRNA の放出制御はアガロースゲル電気泳動にて確認することができた。このナノ粒子ゲルを用いて、ルシフェラーゼ過剰発現細胞内で siRNA を放出し、ルシフェラーゼ合成を停止し、その活性を抑えることに成功している (Fig. 12)⁷⁾。

3・3 ガンマ線応答性ナノ粒子ゲルによる機能制御

生理活性物質に対する制御信号として、可視光は侵襲性が低く、照射範囲の時空間コントロールが容易であることから、細胞レベルでの機能制御には適している。一方で、深達性が弱く、皮膚の表層部位 (数 mm) までしか信号を伝達できず、深達性の強い長波長の光を用いたとしても、生体内での機能制御に用いることは困難である。他の制御信号として広く用いられている、熱や磁気、超音波等は、照射範囲の選択性の低さや、侵襲性などから、生体内での機能制御のための信号としては不向きである。一方、光の 1 種である放射線は、放射線治療など、腫瘍の治療にも用

Fig. 12 Effect of an encapsulated molecule on the silencing ability of the luciferase gene

Errors are standard deviation of the mean.

Fig. 13 Structure of the gamma ray responsive linker

1, connection unit; 2, gamma ray cleavable unit; 3, control mesh size unit.

いられるものであり、低侵襲性と体内深達性、照射範囲の制御の容易さなどから、生理活性物質の放出/機能制御のための非常に有望な信号である。

著者らが開発した X 字型の光開裂性架橋剤は、中心部の網目構造を構成する PEG 部位、光で応答するニトロベンジルユニット、末端で他の架橋剤とゲル構造を構築するためのアクリル酸残基の 3 種類の構造からなるものであり、放射線を用いた生体内深部での機能制御を見据えて、材料モノマーの光開裂性のニトロベンジルユニットについて、 γ 線によって切断され有機硫黄ラジカルが生じるジスルフィド基に置換した γ 線開裂性架橋剤を設計・合成した (Fig. 13)。この架橋剤をタンパク質と共に重合させることで、 γ 線に応答するタンパク質内包ナノ粒子ゲルを調製し、モデルタンパク質であるトリプシンを、現在放射線治療で利用されている照射強度の γ 線の照射によって放出することに成功している (Fig. 14)。このようなナノ粒子ゲルによって放射線治療時に薬剤を同時に放出することが可能になる。例えば、腫瘍塊深くにあるがん幹細胞に対して、周囲の腫瘍細胞を放射線で破壊して、幹細胞への道筋を作り、直接医薬品を送達することで効率かつ低侵襲で治療する放射線とナノ粒子ゲルのハイブリッド療法のモデルの

Fig. 14 Regulation of the enzymatic activity of the gamma ray responsive nanoparticle using gamma-ray irradiation

The data are means $\pm$ SD of three independent experiments.

構築が期待できる。また、抗炎症剤を包含させたゲルを調製し、放射線治療時の放射線によって治療と同時に抗炎症剤を放出して、放射線治療後の周辺細胞での炎症を予防する放射線治療における防護システムモデルの開発が期待できる。さらに、転移性のがんについて、転移先のすべての腫瘍細胞に対して放射線を照射し治療することは、転移先の腫瘍細胞が小さすぎて観測できない、体全体に照射する線量が大きくなりすぎるなどの点から、事実上不可能であるが、原発部位の腫瘍を放射線で治療する際に同時にナノ粒子ゲルで免疫賦活剤を放出する。これによって免疫を活性化することができ、原発部位の腫瘍細胞と同じ情報を持つ転移先の腫瘍細胞に対しても免疫機構を作用させることが可能になる。この結果、現在では検出することが困難な極めて初期の小さな転移細胞に対しても免疫系を利用して治療が可能になり、『1度の照射で身体全体のがんを治療する』という、転移がんに対する新しい治療法のモデルとするなど、放射線応答性の物質の機能制御法は新しい治療法としても期待が持てる⁸⁾。

3・4 ナノ粒子ゲルの体内動態

この様に簡単に機能を追加・変更することができ、なおかつ物質の大きさにかかわらず多様な分子について、化学修飾などの複雑な操作無く機能制御できるという性質を生かして本ナノ粒子ゲルを生体内で用いることを考えた。

本ナノ粒子ゲルのサイズはダイナミック光散乱光度計 (Dynamic light scattering, DLS) にて測定したところ、150 ~ 200 nm 程度と EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) によって腫瘍への蓄積も予想できる大きさであった (Fig. 15)。臨床へ向け、体内でのナノ粒子の動態・生物毒性などを調べるべく、核磁気共鳴画像法 (magnetic resonance imaging, MRI) の造影剤を包含しかつ蛍光を付与したナノ粒子ゲルを colon26 担がんマウス (BALB/c) の尾静脈から投与した。MRI 測定の結果 15 分以内で膀胱

Fig. 15 Size of nano gels by DLS

Red: nano gel with dextran-Mn which is a high molecular (40k Da) MRI imaging probe, as same size as proteins previously used, and fluorescein. Blue: nano gel with trypsin and fluorescein. Green: nano gel with ferritin and alexa647. These data were measured by DLS

Fig. 16 MRI images of mouse before and after the administration of nano gels containing encapsulated Mn^{2+} probe

中にナノ粒子を含む尿の造影が確認された (Fig. 16)。さらに回収した尿も投与直後からナノ粒子に由来すると考えられる強い蛍光を測定することができた。また尿を透過電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope, TEM) で確認したところ、投与前と似た形のナノ粒子を確認したことから、本ナノ粒子ゲルはその形状を保ったまま尿中に排泄されることがわかった。

また、TEM において、本ナノ粒子ゲルは、600 nm 程度の円状の物であり、DLS とは大きく異なる測定結果が得られた。そこで詳細な物性を確認するべく原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM) にてナノ粒子ゲルの形状を測定したところ、長径 600 nm、高さ 20 nm 前後の円盤状の形状であった (Fig. 17)。TEM や AFM にて、DLS と異なる粒径が測定されたが、TEM・AFM では円盤状、DLS は球と仮定し、体積計算をしたところ、ほぼ同じ体積になることがわかり、本粒子は非常に柔軟であり 150 nm の球

Fig. 17 Size of nano gels by AFM
The blue bar is 1 μm .

Fig. 18 Size of nano gels with QD by AFM
The blue bar is 200 nm.

状の粒子が変形し長径 600 nm の円盤状に潰れていると考えている。

このゲル構造に由来する柔軟性が 15 分以内という迅速な腎排泄に関係すると考えられる。一般的なドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System, DDS) キャリアに用いられるナノ粒子は肝排泄性であり、肝臓に集積後に分解され排泄されるが、その際に、ナノ粒子に内包する薬剤が漏出するため、肝毒性が問題になることが多い。そのため、本ナノ粒子が持つ高い腎排泄性は生体で用いる上で有利であり安全な医薬品キャリアとして非常に期待できる⁹⁾。

3.5 ナノ粒子の体内動態と腫瘍への蓄積

このような早い腎排泄性は、生体に対する安全性と言う面では有利であるが、生体内を滞留せずに、すぐに排泄されるために、複数回の投与が必要になり、投与による侵襲や、経済的な効率の面で不利になる。そこで、薬剤の投与効率を向上させるために、早すぎる排泄を抑え薬剤の疾患部位への集積性を上げることも求められる。著者らは、3.4で示したゲル自体の柔軟性をナノ粒子ゲルに内包する物質を変えることで変化させ、腎排泄を抑えて血中での滞留性を上げ集積性を向上させることを考え、10～20 nm の金属粒子を核とする量子ドットをゲルに包含したナノ粒子ゲルを調製した。

この量子ドット内包ナノ粒子は、DLS で粒径が 150～200 nm 前後とタンパク質内包ナノ粒子と変わらないものであり、また、AFM で確認したところ、量子ドットの粒と思われる塊をゲルに含んでいる様子を観察している (Fig. 18)。

このナノ粒子ゲルを担がんマウスに投与して、量子ドッ

Fig. 19 Fluorescent images of colon cancer-grafted mouse, at different time intervals after i.v. injection of nano gel with QD

The yellow arrow indicates the tumor area. The blue arrow indicates the liver area.

トの蛍光によって生体内での動態を観察したところ、タンパク質包含ナノ粒子ゲルでは 15 分程度で尿中に出ていたものが、5 時間以上にわたって血中に長く滞留し、EPR 効果によると思われる腫瘍への粒子の蓄積が確認された (Fig. 19)^{10)~12)}。

さらに詳細な粒子径制御にも成功しており、将来的には、この血中滞留性・蓄積性の変化の機構を詳細に解明し、それを制御して利用することで、薬を送達させるときには血中滞留性が高く選択的に疾患部位に集積するが、疾患が無い場合は速やかに腎排泄されるシステムを構築できると考えられ、先に示した、核酸を含む様々な種類の生理活性物質を長期間安定に保存し必要時に機能を活性化する機能、 γ 線による放出制御で期待できる生体内深部での機能制御能等と組み合わせることで、より安全で効率の良い汎用的な医薬品キャリアになると期待できる。

4 おわりに

著者らは、PARCEL 法と名づけた、ゲルの 3 次元網目構造を利用して、「多様な生理活性物質について」「任意のタイミングで」「外部信号によって標的とする位置だけで」「非侵襲的に」働かせることが可能なナノ粒子ゲルを用いた機能制御法を開発し、医療応用への展開を目指して研究を進めている。本制御法のカギとなっているナノ粒子ゲルは、非常に柔らかくタンパク質を内包した場合迅速に腎排泄されるが、量子ドットを内包したゲルは排泄性が変化し、高い血中滞留性と腫瘍への蓄積が見られるという、興味深い特性を持つ。

疾患部位選択的に薬剤を届け、副作用を軽減するということを目指して研究が進められている他の多くのナノ粒子キャリアにおいて、長時間の体内循環後、最終的には肝臓にトラップされ、分解されるときに内包する薬剤が漏出し、副作用を生じるという課題がある。この PARCEL 法を改良し、ゲルの硬度を外部信号によって変化させ体内動態を制御することができるようになれば、投与後、疾患部位を探し (診断)、疾患部位で薬剤を放出する (治療)、さら

に, 治すべき疾患部位が存在しない場合は, 体内動態を変化させて尿から迅速に排泄 (低侵襲性) させることが可能な, 次の世代のセラノスティクスキャリアとなると期待できる。

謝 辞

本研究の一部は, JSPS 科研費 (26860032), 東大院薬: 創薬科学における世界拠点形成のための国際的研究指導者育成プログラム等の助成を受けて遂行した。ナノ粒子を用いた siRNA の機能制御に関しては, 独国ルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン (Ludwig-Maximilians-Universität München, LMU) の E. Wagner 教授及び同研究室メンバーに, また動物実験においては量研機構の青木 TL 及び同研究室メンバーに, ご協力・ご助言をいただきました。ここに謝意を表します。

文 献

- 1) S. Murayama, M. Kato : *Anal. Chem.*, **82**, 2186 (2010).
- 2) S. Murayama, F. Ishizuka, K. Takagi, H. Inoda, A. Sano, T. Santa, M. Kato : *Anal. Chem.*, **84**, 1374 (2012).
- 3) Y. Shibata, S. Murayama, T. Amamoto, T. Santa, M.

Kato : *Appl. Spectrosc. Rev.*, **51**, 669 (2016).

- 4) S. Murayama, B. Su, K. Okabe, A. Kishimura, K. Osada, M. Miura, T. Funatsu, K. Kataoka, M. Kato : *Chem. Commun.*, **48**, 8380 (2012).
- 5) K. Takagi, S. Murayama, T. Sakai, M. Asai, T. Santa, M. Kato : *Soft Matter*, **10**, 3553 (2014).
- 6) S. Murayama, T. Nishiyama, K. Takagi, F. Ishizuka, T. Santa, M. Kato : *Chem. Commun.*, **48**, 11461 (2012).
- 7) S. Murayama, P. Kos, K. Miyata, K. Kataoka, E. Wagner, M. Kato : *Macromol. Biosci.*, **5**, 626 (2014).
- 8) S. Murayama, J. Jo, K. Arai, F. Nishikido, R. Bakalova, T. Yamaya, T. Saga, M. Kato, I. Aoki : *Anal. Chem.*, **87**, 11625 (2015).
- 9) S. Murayama, J. Jo, Y. Shibata, K. Liang, T. Santa, T. Saga, I. Aoki, M. Kato : *J. Mater. Chem. B*, **1**, 4932 (2013).
- 10) R. Bakalova, Z. Zhelev, B. Nikolova, S. Murayama, I. Tsoneva, I. Aoki, T. Saga : *Gen. Physiol. Biophys.*, **34**, 393 (2015).
- 11) S. Atanasova, B. Nikolova, S. Murayama, E. Stoyanova, I. Tsoneva, Z. Zhelev, I. Aoki, R. Bakalova : *Anticancer Res.*, **36**, 4601 (2016).
- 12) R. Bakalova, B. Nikolova, S. Murayama, S. Atanasova, Z. Zhelev, I. Aoki, M. Kato, I. Tsoneva, T. Saga : *Anal. Bioanal. Chem.*, **408**, 905 (2016).

Method for Functional Control of a Bioactive Substance by Light

Shuhei MURAYAMA^{*1} and Masaru KATO²

^{*} E-mail : murayama.shuhei@qst.go.jp

¹ Department of Molecular Imaging and Theranostics, National Institute of Radiological Sciences, National Institute for Quantum and Radiological Science and Technology, 4-9-1, Anagawa, Inage-ku, Chiba-shi, Chiba 263-8555

² Graduate School of Pharmaceutical Sciences and GPLII Program, The University of Tokyo, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033

(Received December 13, 2016; Accepted March 28, 2017)

The maintenance of biological functions depends on the balance between the amounts and function of the many kinds of molecules in the cells, tissues and body fluids. Most of the biochemical and physiological processes (*e.g.*, proliferation, differentiation, migration, and death) are controlled by concentration changes of intracellular compounds. The induction and real-time detection of these compounds gives information concerning the role molecules. The described methods for controlling the molecular activity are usually based on external signals, such as temperature, magnetism, pH, *etc.* However, these signals do not allow hard local irradiation, as well as most of the techniques are invasive. Among them, light (in particular, gamma rays) is one of the most preferred signals to control the molecular function, due to its low invasiveness and deep-tissue penetration. We developed a simple preparation procedure for protein-encapsulated nanoparticle (nanogels with mesh structure) and used them for spatiotemporal activity control of various proteins and other molecules. The method was named “PARCEL”. The encapsulated molecule was kept by the gel matrix. The change of the mesh size allows a control of many kinds of molecules, as: proteins, enzymes, nucleic acids, and small compounds. The nano-gels were delivered into the cells by endocytosis and were retained into the cells for at least 4 days. We can change the molecular release signal by changing reactive unit. The nano-gels with protein were excreted rapidly through the urine without collapse. On the other hand, the nano-gels with quantum dots were characterized by long-term circulation into the bloodstream and have accumulated in solid tumors. We expect the “PARCEL” method to be useful in the preparation of photo-activated biosensors, theranostic drug delivery systems, and catalysis.

Keywords: theranostics; tetra nano gel; protein control; DDS.