〔原著論文〕

TiO₂ ナノ粒子内包ポリオンコンプレックスミセルによる
疎水性プロドラッグの可溶化と超音波照射効果

山本 聡^{*1}・古川 和樹^{*1}・小野 雅文^{*1}
弓場 英司^{*1}・原田 敦史^{*1}・河野 健司^{*1}

(受付 2017 年 8 月 31 日・審査終了 2017 年 10 月 25 日)

(早期公開 2017 年 12 月 13 日・DOI:10.1295/koron.2017-0063)

要 旨 生体深達度の高い超音波照射によって活性酸素種を生成する超音波増感剤を利用した超音波力学療法 (SDT) が、生体深部の疾患治療に有効な低侵襲治療として期待されている。筆者らは、超音波増感剤である二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子に着目し、ポリオンコンプレックスミセルに内包して細胞内ヘデリバリーした後、超音波照射を行うことで一重項酸素生成を通じた殺細胞効果を示すことを明らかにしてきた。本研究では、TiO₂ ナノ粒子を内包したミセル内部の疎水場へ疎水性プロドラッグであるカルモフルを分配させることによって可溶化した。可溶化されたカルモフルの抗がん活性およびミセルに内包された TiO₂ ナノ粒子への超音波照射による SDT 効果を *in vitro* 細胞生存率評価により、カルモフルの加水分解による 5-フルオロウラシル生成を逆相クロマトグラフィ測定により検討した。これらの評価により抗がん活性と SDT 効果の相加効果によって細胞死が誘導されることを確認した。

1 緒 言

光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT) は肺がんをはじめ、さまざまながん治療に適用されており、その侵襲性の低さから新たながん治療法として注目を集めている。効果的な PDT を実現するために、光増感剤やその運搬体の開発を目的とした研究が多数報告されている^{1)~3)}。腫瘍に集積した光増感剤は特定の波長のレーザー照射により励起状態となり、基底状態に遷移する際の酸素分子との光化学反応により、一重項酸素 (¹O₂) やヒドロキシラジカル ($\cdot$ OH) などの活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を生成する。この ROS が殺細胞効果を誘導するため、レーザー照射を行った部位でのみ治療効果が発現する。一方、腫瘍細胞に取り込まれた後、エンドソーム内に存在する光増感剤は細胞質への薬物運搬のための photochemical internalization (PCI) に用いられる^{4),5)}。PCI とは、光増感剤へのレーザー照射に

より生成した ROS がエンドソーム膜の崩壊を誘起することで、エンドソーム内での捕捉やリソソームでの分解を防ぎ、光増感剤を含む薬物を細胞質に移行させる手法である。これらのように光増感剤への光照射により生成する ROS を利用した PDT や PCI の研究が盛んに行われている⁶⁾。しかしながら、光は生体透過性が低いため、生体透過性が高い近赤外光で励起可能な光増感剤の開発が必要となるなど、治療分野での利用には課題が残されている。

近年、光増感剤であるヘマトポルフィリンやクマリン e6 に超音波照射することで ROS を生成することが明らかになっており、超音波増感剤としての利用が期待されている^{7),8)}。超音波は医療診断分野ですでに広く用いられており、生体組織に吸収されることなく生体深部まで到達することができる。したがって、生体深部での超音波増感剤への超音波照射による ROS を利用した超音波力学療法 (sonodynamic therapy, SDT) や sonochemical internalization (SCT) への期待が高まっている。

二酸化チタン (TiO₂) は紫外光照射による光励起によって $\cdot$ OH や HO₂ $\cdot$ 、¹O₂、O₂⁻などの ROS を生成する

^{*1} 大阪府立大学大学院工学研究科物質・化学専攻応用化学分野 (〒599-8531 堺市中区学園町 1-1)

光触媒として広く用いられているが⁹⁾、近年、光照射だけでなく超音波照射によっても ROS が生成されるが明らかになっている¹⁰⁾。筆者らはこの TiO₂ の超音波増感剤としての特性に着目し、SDT への利用を目的に、TiO₂ ナノ粒子 (TiO₂ NP) とポリエチレングリコールをグラフト鎖に有するポリアリルアミン (PAA-g-PEG) を混合することで、TiO₂ NP を内包したポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルを構築した¹¹⁾。この PIC ミセルが培養細胞に取り込まれた後、超音波照射することで、殺細胞効果が高い ROS である ¹O₂ を生成し、照射部位特異的にアポトーシスを誘導することを明らかにした。SDT 効果は、超音波照射によって生成する ROS は反応性が高いため寿命が極めて短いことから、治療効果発現の高度な時空間制御が可能な一方で、持続的な治療効果の発現が期待できないという問題もある。この課題を解決するアプローチとして、他の化学療法剤を用いた化学療法との併用を考えた。

本報では、TiO₂ NP 内包 PIC ミセルによるカルモフル (フッ化ピリミジン系抗がん剤 5-フルオロウラシル (5-FU) のプロドラッグ) の可溶化、*in vitro* における併用効果および超音波照射化におけるカルモフルの加水分解について検討した。

2 実験

2.1 試薬

PAA-g-PEG は既報に従って合成され¹²⁾、PAA 数平均分子量 15,000 に対して、数平均分子量 2,000 の PEG グラフト鎖が PAA 側鎖アミノ基に対して 13 mol% 導入されたものを用いた。光触媒二酸化チタンゾル (STS-100) は石原産業 (株) から購入したものを用いた。5-フルオロウラシル (5-FU)、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) は和光純薬工業 (株) から、カルモフルは東京化成工業 (株) から購入したものを用いた。ダルベッコ変法イーグル (DMEM) 培地は、日本製薬 (株) から購入した。牛胎児血清 (FCS) は、Biowest (株) から購入した。

2.2 TiO₂ NP 内包 PIC ミセルの調製およびカルモフルの可溶化

二酸化チタン重量の 10 倍となるように濃度を調製した PEG-g-PAA 水溶液 3.0 mL に TiO₂ 分散液 (TiO₂ 濃度 26.7 mg/mL) を 1.0 mL 加えかくはんした後、1 日静置し NaOH 水溶液および蒸留水を用いて、全量が 6.0 mL になるように中和した。その後、限外ろ過 (分画分子量; 200,000) により余剰の PEG-g-PAA を除去するとともに、溶媒をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に置換した。PIC ミセル形成の確認は、動的光散乱 (DLS) 測定により行った。また、種々濃度のカルモフルの DMSO 溶液を、45 µg/mL の TiO₂ NP を含む PIC ミセル溶液に添加する

ことにより可溶化させた。PIC ミセルの粒径へのカルモフル可溶化の影響を DLS 測定 (ELS-8000, 大塚電子 (株) 製) により評価した。

2.3 細胞生存率評価

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を 6 well dish に 200,000/well 播種し、10% FSC 含有 DMEM 培地で 48 時間培養した。10% FSC 含有 DMEM 培地を取り除き、カルモフル可溶化 TiO₂ NP 内包 PIC ミセルなどのサンプルを播種し、10% FSC 含有 DMEM 培地で 4 時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し、DMEM 培地 5.0 mL を加え、細胞接着面から十分距離をとって 10 分間超音波 (周波数 1.0 MHz; 出力 1.0 W/cm², duty cycle 25%) を照射した。10% FSC 含有 DMEM 培地に培地交換した後 48 時間培養し、細胞を 2 回 PBS で洗浄した後、MTT 試薬 (10 mg/mL in PBS) 120 µL と DMEM 培地 2.0 mL を加え 3 時間培養した。その後、細胞を PBS で 2 回洗浄し 0.1 M HCl 含有イソプロパノール溶液 2.0 mL を加え、その溶液の 490 nm の吸光度を ARVO_{SX} multilabel counter (Perkin Elmer) により測定した。

2.4 カルモフルの加水分解評価

カルモフルの加水分解反応は、逆相クロマトグラフィ測定により評価した。カルモフル濃度が 0.35 M のカルモフルの PBS 分散液およびカルモフル可溶化 PIC ミセル水溶液を調製し、30°C で静置あるいは超音波照射 (周波数 1.0 MHz; 出力 2.0 W/cm²; duty cycle, 10%) を行い、所定時間にサンプルを一部回収し、逆相クロマトグラフィ測定を行った。逆相クロマトグラフィ測定は、逆相カラムとして Shodex ODP-50G を、溶出液として 40 mM NaCl 含有 20 mM 酢酸緩衝液 (pH 4.0) とアセトニトリルの体積比 35:65 の混合溶媒を用い、流速 0.6 mL/min (低圧グラジェントポンプ PU-2089, JASCO) で 254 nm の吸収 (UV-2075, 日本分光 (株) 製) を検出した。

3 結果および考察

PIC ミセル水溶液に含まれる TiO₂ NP の重量に対して、カルモフルの重量が等量となるまでの種々濃度のカルモフル DMSO 溶液を、PIC ミセル水溶液に添加することによってカルモフルの可溶化を行った。PIC ミセル溶液の代わりに PBS を用いた場合、カルモフル溶液を添加すると、ただちに白色沈澱が生じたが、PIC ミセル水溶液にカルモフル溶液を添加しても沈澱形成は認められず、カルモフルの可溶化が確認された。そこで、種々比率のカルモフル溶液と混合した PIC ミセル水溶液について DLS 測定により相対散乱強度および平均粒径の変化を評価した (Figure 1)。ここで、相対散乱強度は、カルモフルを含まない PIC ミセル水溶液の散乱強度を基準とした相対値である。評価を行ったカル

Figure 1. Mean diameter and relative scattering intensity for TiO₂ NPs-incorporated PIC micelles mixed with varying amounts of carmofer. (closed circle, mean diameter; gray bar, relative scattering intensity).

Figure 2. Cell viabilities of HeLa cells treated by carmofer, 5-FU and TiO₂ NPs-incorporated PIC micelles with and without ultrasound irradiation (sonication). After 24 hours incubation with the samples, sonication was performed for 5 mins (frequency, 1.0 MHz; power, 2.0 W/cm²; and duty cycle, 10%). The concentration of TiO₂ NPs, carmofer and 5-FU were fixed to be 45 µg/mL, 45 µg/mL (0.175 mM) and 23 µg/mL (0.175 mM), respectively. Data presented as the average of three experiments ± SD.

モフルと TiO₂ NP の重量比の範囲においては、相対散乱強度、平均粒径のいずれにおいても顕著な変化は確認されなかった。これは、疎水性化合物であるカルモフルが、PIC ミセルの内部の PAA 主鎖と TiO₂ NP からなる疎水的な PIC へと分配され可溶化されたためであると考えられる。Figure 1 において、TiO₂ NP と同重量のカルモフル添加による沈殿形成やミセルの凝集は確認されず、カルモフルが可溶化されていることが確認された。この実験で用いた PIC ミセルの組成は、Polymer/TiO₂ NP=1.79 であることが熱分析により確認されてい

る¹¹⁾。したがって、PIC ミセル重量に対して、36% のカルモフルが可溶化されている。カルモフル可溶化の最大量の決定は行っていないが、TiO₂ NP 内包 PIC ミセルが疎水性化合物を効率よく可溶化できることが確認された。

次に、カルモフルの抗がん活性および TiO₂ NP 内包 PIC ミセルの SDT 効果を MTT アッセイにより評価した (Figure 2)。カルモフル、5-FU、PIC ミセルについて超音波照射の有無、また、カルモフルあるいは 5-FU と PIC ミセルの混合水溶液について超音波照射の有無での

Figure 3. Evaluation of hydrolysis of free carmofur and micelle-solubilized carmofur with and without sonication. (a) Time-course of reverse phase chromatography charts for free carmofur in PBS. (b) Change in carmofur concentration with sonication or incubation time for free carmofur (square symbols) and micelle-solubilized carmofur (circle symbols). Samples with and without sonication are represented by closed and open symbols, respectively. The concentration of TiO_2 NPs and carmofur were fixed to be $90 \mu\text{g/mL}$ and $90 \mu\text{g/mL}$ (0.35 mM). (frequency, 1.0 MHz ; power, 2.0 W/cm^2 ; and duty cycle, 10%).

細胞生存率を評価した。超音波照射の有無にかかわらずコントロール(未処理細胞)では高い細胞生存率を示していることから、超音波照射による細胞生存率への影響がないことがわかる。同様に、カルモフルと5-FUについても超音波照射の影響は確認されなかったが、5-FUに関しては、コントロールと比較して若干の細胞生存率低下が確認された。これは、5-FUの制がん活性によるものであると考えられる。PICミセルは、超音波照射なしでは、高い細胞生存率を維持しており、細胞毒性は認められないが、超音波照射を行うと、細胞生存率が約60%まで低下した。これは、細胞に取り込まれたPICミセルが、超音波照射によって一重項酸素を含む活性酸素種を生成することで殺細胞効果(SDT効果)が誘導されたためである¹¹⁾。興味深いのは、カルモフルあるいは5-FUとPICミセルを混合した場合である。超音波照射を行っていない場合、5-FUはPICミセルと混合しても5-FU単独の場合と同程度の細胞生存率であった。これは、水溶性の高い5-FUはPICミセルと混合しても、PICミセルへはほとんど分配されないため、単独での抗がん活性の効果のみが現れたと考えられる。一方、カルモフルはPICミセルと混合すると、それぞれ単独では細胞生存率の低下は認められなかったにもかかわらず、約60%までの細胞生存率の低下が確認された。これは、カルモフルがPICミセルによって可溶化され細胞内へ送達され、細胞内での加水分解によって5-FUに変化されたことを示唆している。また、5-FUでは約80%の細胞生存率であるのに対し、PICミセルによって可溶化されたカルモフルは約60%までの細胞生存率の低下を誘

導した。これは、カルモフルと5-FUは同一モル量での実験結果であるため、PICミセルが疎水性化合物であるカルモフルのキャリアとして有効に機能したことを示している。さらに、PICミセルで可溶化したカルモフルに対して、超音波照射を組合せると、細胞生存率は約30%まで低下した。5-FUとPICミセルの混合溶液についても超音波照射の効果は認められるが、カルモフル・PICミセル・超音波の組合せが、最も効果的な細胞生存率の低下を誘導した。

疎水性プロドラッグであるカルモフル、超音波増感剤である TiO_2 NPを内包したPICミセルと超音波の組合せによって、効果的に細胞生存率の低下を誘導することが確認できたが、細胞死を誘導する機構について考えるためには、超音波照射のカルモフル加水分解反応への影響を検討する必要がある。そこで逆相カラムを用い、カルモフルの加水分解速度への超音波照射の影響を評価した。Figure 3(a)にカルモフルをPBSに分散させたときの逆相クロマトチャートの経時変化を示す。カルモフルは酵素による加水分解だけでなく水による加水分解も受ける。初期においては溶出時間4.8分付近にカルモフルが検出されるが、時間経過に伴い、ピーク面積が減少し、新たに溶出時間3.7分付近に5-FUのピークが現れ、そのピーク面積が増加することが確認された。カルモフルのピーク面積を濃度に換算し、その時間変化をプロットしたのがFigure 3(b)である。いずれの条件においてもカルモフル濃度の指数関数的に減少していることがわかる。カルモフルの加水分解速度には、PICミセルによる可溶化の影響は見られなかった。超

Figure 4. Schematic image of the performances of carmofur-solubilized PIC micelles in the cell.

音波照射下においては、カルモフル単独、ミセル可溶化カルモフルのいずれにおいても加水分解速度が低下しており、加水分解速度定数 (Figure 3(b) のプロットの傾き) がカルモフル単独は 73%, ミセル可溶化カルモフルは 60% まで低下しており、反応速度低下はミセル可溶化カルモフルの方が顕著であった。カルモフルの加水分解反応は溶媒である水との反応によって進行するが、ROS 検出プローブとして dihydrorhodamine 123 を用いた実験では、 TiO_2 NP を含まない PBS 中においても超音波の照射時間および強度に依存した ROS 生成が確認されており¹¹⁾、また、超音波照射は溶媒分子をラジカル化することが知られていることから^{13), 14)}、超音波照射下では水分子が OH ラジカルとして存在するため反応速度が低下したと推測される。さらに、 TiO_2 NP が存在すると、OH ラジカル以外の ROS も生成し、それらと水分子との反応が生じ、カルモフルの加水分解反応速度が低下したと推測される。

以上の結果から Figure 2 において確認されたカルモフル・PIC ミセル・超音波の組合せによる細胞死誘導機構のイメージ図を Figure 4 に示す。これまでに PIC ミセルはエンドサイトーシスで取り込まれ、ミトコンドリアへの局在が PIC ミセル調製に用いるポリマー組成によって異なり、多くのミトコンドリアにミセルが分布するものほど効果的に細胞死 (アポトーシス) を誘導することが確認されている¹⁵⁾。細胞内でのミセルの分布の違いは、エンドソーム脱出の有無によると考えられ、エンドソーム内にとどまっているものと細胞質へ移行している

ものが共存していると考えられる。PIC ミセルによって可溶化され細胞内に運ばれたカルモフルは、ミセル内での加水分解反応により親水性の 5-FU となり、ミセルから細胞質へとリリースされる。Figure 2 に示した細胞生存率評価では、細胞取込時間として 4 時間静置した後に超音波が照射されたが、Figure 3(b) に示したカルモフルの加水分解評価から細胞取込時間の間にほぼすべてのカルモフルが 5-FU となりミセルからリリースされていると考えられる。その後、超音波照射が行われ、 TiO_2 NP が超音波増感剤として機能し ROS を生成し、生成した ROS がミトコンドリアへダメージを与えたと考えられる。つまり、 TiO_2 NP への超音波照射による SDT 効果とカルモフルから生じた 5-FU の抗がん活性効果は、相乗的ではなく相加的に作用したと考えられる。結果として、超音波増感剤による SDT 効果あるいはプロドラッグの抗がん活性効果単独では、細胞死を誘導できなかった細胞に対して、もう一方の効果が働くことによって、効果的な細胞生存率の低下が誘導されたと考えられる。

4 結 言

本研究では、 TiO_2 ナノ粒子を内包したポリイオンコンプレックスミセルによる疎水性プロドラッグ (カルモフル) の可溶化を確認した。可溶化の効果によりミセルはカルモフルのキャリアとして機能し、加水分解反応によりカルモフルが 5-FU に変換され抗がん活性を示すことが確認された。さらに、超音波照射を行うこと

によって、ミセルに内包されている超音波増感剤 (TiO₂ ナノ粒子) により活性酸素種が生成し殺細胞効果を示すことが確認された。プロドラッグによる抗がん活性と超音波増感剤による SDT 効果が相加的に働くことにより効果的な細胞生存率の低下が誘導されることが確認された。これらの知見は、抗がん活性発現メカニズムやプロドラッグから活性種への変換反応に活性酸素種が関与する化合物を用いることで、抗がん活性と SDT 効果が相乗効果による超音波プロドラッグ治療 (Sono-prodrug therapy) の開発につながるものである。

謝 辞 本研究は、テルモ生命科学芸術財団一般研究開発助成金および日本学術振興会特別研究員奨励費による助成によって行われたものである。

文 献

- 1) J. Xu, F. Zeng, H. Wu, C. Hu, and S. Wu, *Biomacromolecules*, **15**, 4249 (2014).
- 2) Z. Hou, Y. Zhang, K. Deng, Y. Chen, X. Li, X. Deng, Z. Cheng, H. Lian, C. Li, and J. Lin, *ACS Nano*, **9**, 2584 (2015).
- 3) S. He, Y. Qi, G. Kuang, D. Zhou, J. Li, Z. Xie, X. Chen, X. Jing, and Y. Huang, *Biomacromolecules*, **17**, 2120 (2016).
- 4) T. Endoh, M. Shishido, and T. Ohtsuki, *J. Controlled Release*, **137**, 241 (2009).
- 5) T. Ohtsuki, S. Miki, S. Kobayashi, T. Haraguchi, E. Nakata, K. Hirakawa, K. Sumita, K. Watanabe, and S. Okazaki, *Sci. Rep.*, **5**, 18577 (2015).
- 6) C. E. Olsen, K. Berg, P. K. Selbo, and A. Weyergang, *Free Radical Biol. Med.*, **65**, 1300 (2013).
- 7) K. Tachibana, N. Kimura, M. Okumura, H. Eguchi, and S. Tachibana, *Cancer Lett.*, **72**, 195 (1993).
- 8) H. Wang, Q. Liu, K. Zhang, P. Wang, Q. Xue, L. Li, and X. Wang, *J. Photochem. Photobiol., B*, **127**, 182 (2013).
- 9) A. Fujishima and K. Honda, *Nature*, **238**, 37 (1972).
- 10) N. Shimizu, C. Ogino, M. F. Dadjour, and T. Murata, *Ultrason. Sonochem.*, **14**, 184 (2007).
- 11) A. Harada, M. Ono, E. Yuba, and K. Kono, *Biomater. Sci.*, **1**, 65 (2013).
- 12) A. Kawamura, C. Kojima, M. Iijima, A. Harada, and K. Kono, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **46**, 3842 (2008).
- 13) G. Cravotto and P. Cintas, *Chem. Soc. Rev.*, **35**, 180 (2006).
- 14) R. Silva, H. Ferreira, and A. Cavaco-Paulo, *Biomacromolecules*, **12**, 3353 (2011).
- 15) S. Yamamoto, M. Ono, E. Yuba, and A. Harada, *Nanomaterials*, **7**, 268 (2017).

[Original Papers]

Solubilization of a Hydrophobic Prodrug and the Ultrasound Irradiation Effect to TiO₂ Nanoparticles-Incorporated Polyion Complex Micelles

Satoshi YAMAMOTO^{*1}, Kazuki FURUKAWA^{*1}, Masafumi ONO^{*1}, Eiji YUBA^{*1}, Atsushi HARADA^{*1}, and Kenji KONO^{*1}

^{*1}Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Osaka Prefecture University (1-1 Gakuen-cho, Naka-ku, Sakai 599-8531, Japan)

Sonodynamic therapy (SDT) using ultrasound irradiation instead of photoactivation as in photodynamic therapy, has emerged as a promising treatment for various types of cancer. We have focused on titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) as a sonosensitizer which can generate reactive oxygen species by sonication. TiO₂ NPs-incorporated polyion complex micelles were developed for the delivery into the cells. Here, carmofur being a hydrophobic prodrug was solubilized into the micelles. From *in vitro* experiments, it was confirmed that carmofur-solubilized micelles effectively suppress the cell viability due to the additive effect of the anticancer effect of 5-fluorouracil produced by hydrolysis of carmofur and the SDT effect.

KEY WORDS TiO₂ Nanoparticle / Prodrug / Sonodynamic Therapy / Polyion Complex Micelle /

(Received August 31, 2017; Accepted October 25, 2017; Advance Publication December 13, 2017) [*Kobunshi Ronbunshu*, **75**, 42—47 (2018)]

©2018, The Society of Polymer Science, Japan