



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (薬学)
報告番号	甲第1652号
学位記番号	第335号
氏名	星川 晃宏
授与年月日	平成 29年 3月 31日
学位論文の題名	DDS キャリアを目指したドラッグプラットフォームとしての金ナノ粒子の有用性に関する研究
論文審査担当者	主査： 山中 淳平 副査： 尾関 哲也, 中川 秀彦, 田中 正彦

名古屋市立大学学位論文

**DDS キャリアを目指したドラッグプラットフォーム
としての金ナノ粒子の有用性に関する研究**

平成 28 年度

(2017 年 3 月)

本論文は、平成 28 年度 (2017 年 3 月) 名古屋市立大学大学院薬学研究科において審査されたものである。

主査

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 コロイド・高分子物性学分野
山中 淳平 教授

副査

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 薬物送達学分野
尾関 哲也 教授

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 薬化学分野
中川 秀彦 教授

名古屋市立大学 大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野
田中 正彦 准教授

本論文は、学術情報雑誌に掲載された次の報文を基礎とするものである。

A. Hoshikawa, T. Tagami, C. Morimura, K. Fukushige, T. Ozeki :
Ranibizumab biosimilar/polyethyleneglycol-conjugated gold nanoparticles as a novel drug
delivery platform for age-related macular degeneration,
J. Drug Deliv. Sci. Technol., **38**, 45-50, 2017

A. Hoshikawa, M. Nagira, M. Tane, K. Fukushige, T. tagami, T. Ozeki :
Preparation of Curcumin-Containing α -, β -, and γ -Cyclodextrin/Polyethyleneglycol
-Conjugated Gold Multifunctional Nanoparticles and Their in Vitro Cytotoxic Effects on
A549 Cell,
Biol. Pharm. Bull., 41(6), 908-914, 2018

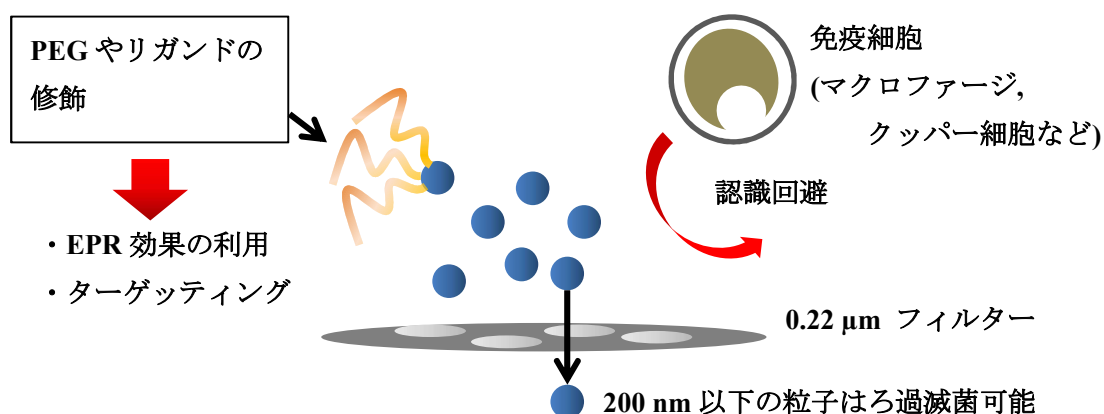
本論文の基礎となる研究は、尾関 哲也 教授の指導の下に名古屋市立大学大学院薬学研究科において行われた。

目次

1. 緒言	-3-
2. 液中還元法における金ナノ粒子調製において還元剤が金ナノ粒子調製に及ぼす影響	-6-
2.1 背景と目的	
2.2 試薬及び実験方法	
2.3 結果及び考察	
2.4 小括	
2.5 引用文献	
3. Ranibizumab バイオシミラー搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製と血管新生阻害効果の検討	-17-
3.1 背景と目的	
3.2 試薬及び実験方法	
3.3 結果及び考察	
3.4 小括	
3.5 引用文献	
4. Curcumin 包接シクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製と <i>in vitro</i> におけるがん細胞に対する殺細胞効果の評価	-33-
4.1 背景と目的	
4.2 試薬及び実験方法	
4.3 結果及び考察	
4.4 小括	
4.5 引用文献	
5. 結語	-45-
6. 謝辞	-46-

1. 緒言

昨今のドラッグデリバリーシステム，いわゆる DDS 研究 における薬物送達キャリアとしてナノ粒子は重要な特徴を持つ。その特徴としては以下のことがあげられる。①粒子をナノサイズ化 (特に 200 nm 以下) することによりマクロファージやクッパー細胞などの免疫細胞の認識が低下する。②Polyethyleneglycol (PEG) やリガンドを表面修飾させることにより，血中滞留性の向上や標的とする細胞・組織へのターゲッティングが可能であり，PEG 化など血中滞留性を高めた数十 nm のナノ粒子は 1986 年に前田ら¹⁾によって発見された Enhanced permeability and retention (EPR) 効果によって効果的に腫瘍組織内に蓄積されることが知られている。③また，特に 200 nm 以下の粒子はろ過滅菌できる。注射剤などの無菌製剤に適応可能である²⁾ (Scheme 1-1)。



Scheme 1-1 DDS におけるナノ粒子製剤の利点

近年，金ナノ粒子を基盤としたドラッグデリバリーシステムが注目されている。還元条件下で調製される金ナノ粒子は、現在一般的に用いられている薬物ナノキャリア，例えばリポソームおよびミセルよりも小さいサイズ範囲へ調製することが容易である。また，主にチオール基やジスルフィドが金 (Au) と容易に強固な結合を形成する (Au-S 結合) ことから^{3,4)}，治療物質やリガンド，PEG 鎖などを金ナノ粒子の表面に結合することが可能である。さらに，金ナノ粒子をイメージングに使用できるとの報告もされている⁵⁾。その一例としては X 線 CT のイメージング材料としての機能が挙げられる。伝統的な CT 造影剤は，X 線を効果的に吸収することができるので，ヨウ素を含む分子である。しかしながら，それらは標的化の欠如，短いイメージング時間および高い毒性の

ような欠点を有しており、その適用が制限される。したがって、新規の造影剤は高い X 線吸収効率、標的特性、適切な代謝時間および生体適合性を含む利点を有することが期待される。GNPs は構造設計を通してこれらの必要なすべての特性を持つことが知られており有用なイメージング材料として期待されている。

以上の理由から、多機能性を有する金ナノ粒子は薬物ナノキャリアを目的とした新規プラットフォームとして使用できると期待されている。

しかしながら、特に我が国においては DDS 領域における金ナノ粒子の研究は未だ発展段階であり、他の一般的に使用されているキャリアと比較して不明確な部分も多いことが現状である。そこで本研究として、DDS キャリアを目指したドラッグプラットフォームとしての金ナノ粒子の有用性を検討すべく、以下について研究を行った。

1. 液中還元法における金ナノ粒子調製において還元剤が金ナノ粒子調製に及ぼす影響

2. Ranibizumab バイオシミラー搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製と血管新生阻害効果の検討

3. Curcumin 包接シクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製と *in vitro* におけるがん細胞に対する殺細胞効果の評価

1. については DDS キャリアと使用するための、核粒子となる金ナノ粒子の調製に関する研究である。2., 3. は 1. で調製した金ナノ粒子を使用し、DDS キャリアを調製した応用研究である。

引用文献

- 1) M. Yasuhiro, and H. Maeda. *Cancer research* 46.12 (1986)
- 2) DDS キャリア作成プロトコル集, 株式会社シーエムシー出版, 205 (2015)
- 3) R. G. Nuzzo, D.L.Allara, *J.Am. Chem. Soc.*, 105, 4481 (1983)
- 4) C. D. Bain and G. M. Whitesides, *Science*, 240, 62, (1988)
- 5) Chen W, Zhang S, Yu Y, Zhang H, He Q., *Adv Mater*; 28, 8567 (2016)

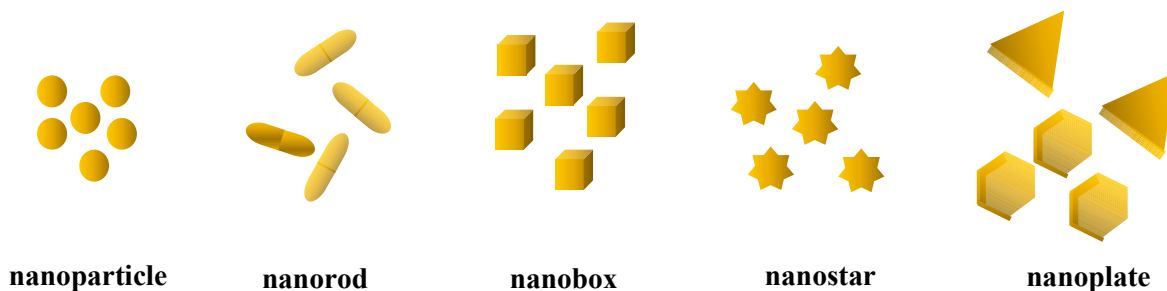
2. 液中還元法における金ナノ粒子調製において還元剤が金ナノ粒子調製に及ぼす影響

2.1 本章における実験の目的

金ナノマテリアルに関する研究は1857年にファラデーらによって金ゾルが発表¹⁻³⁾されて以来、様々な分野で研究され、発展してきた。現在では、Scheme 2-1に示すような様々な形状やサイズの金ナノマテリアルが合成されている。報告されている金ナノマテリアルとしては球形 (gold nanoparticle), 立方体 (gold nanobox), 棒状 (gold nanorod), 平板状 (gold nanoplate), 珊瑚状 (gold nanostar) 等がある⁴⁾。これらの金ナノマテリアルは分子やバルク状態では得られない特徴を利用して光電変換材料, 触媒, センサーやイメージング材料などの医療技術への応用が期待されている。

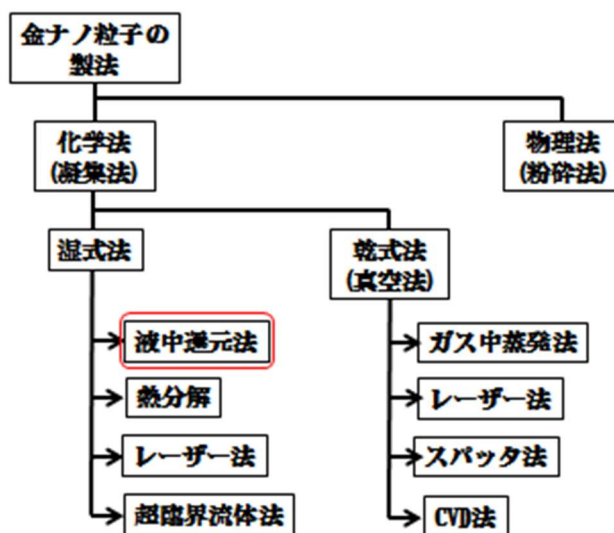
前述した様々な形状の金ナノマテリアルは合成研究報告も多く、比較的シャープに粒子径を制御できている。これらの金ナノマテリアル合成系におけるサイズ制御は、主に界面活性剤, 安定化剤高分子, チオール化合物等の吸着物質の吸着強度や濃度を調節して行う。または還元剤の選択や pH 制御で強度を調製する等により還元速度を制御して行う。これらの粒子径制御は LaMer モデル (2.3 に詳細を記載) に基づく^{5,6)}。

本章の研究においては調製法が比較的簡便である球形金ナノ粒子に着目し、DDS キャリアのドラッグプラットフォームとして適した粒子の調製を行うことを目的とした。



Scheme 2-1 現在研究されている金ナノマテリアルの一例

現在, 金ナノ粒子には主に Scheme 2-2 に示すような様々な調製方法が報告されている. 本章においてはこの中でも湿式法のうちの液中還元法に着目した. 液中還元法は塩化金酸溶液を原料とし, 還元剤の添加によって 0 価の金原子を取りだし凝集させる調製方法である. 本法は特別な機器を必要とせず, ワンステップで均一な金ナノ粒子を簡便に形成できる手法として現在, 幅広く金ナノ粒子の調製に用いられている⁵⁾.



Scheme 2-2 金ナノ粒子の調製方法の大分類

金ナノテクノロジー -その基礎と応用- p.66

シーエムシー出版, 2014.12.8 普及版 発行 より抜粋

このように, 液中還元法は非常にシンプルな原理によって金ナノ粒子を得る方法であるため, 還元剤の種類や添加量を変化させることにより還元力を変化させることが出来, 先述の金ナノマテリアル同様に容易にサイズ制御が可能であると予想される. 本章における研究としては液中還元法を用いて以降 3, 4 章で調製する DDS キャリアとして適切かつ有用な金ナノ粒子の調製方法を検討するとともに, 基礎的な物性評価を行った.

2.2 試料と実験方法

2.2.1 試料

今回使用した Hydrogen tetrachloroaurate (III) tetrahydrate ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), sodium tetrahydroborate (NaBH_4), アスコルビン酸, sodium citrate は全て試薬グレードのものを和光純薬工業 (Osaka, Japan) より購入した. また, 調製にはすべて Milli-Q 水 (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いた.

2.2.2 NaBH_4 及びアスコルビン酸還元金ナノ粒子の調製

NaBH_4 還元金ナノ粒子調製は Brust⁸⁾らの方法を, アスコルビン酸還元は Horisberger⁹⁾らの方法を基に, 調製を行った.

内径約 3 cm, 高さ約 9 cm のバイヤル瓶に 264 μM の HAuCl_4 水溶液を 30 mL 加え, 全長 2 cm, 最大幅 0.7 cm のマグネティックスターラーバーを用いて約 700 rpm で攪拌した. 攪拌条件下で還元剤として要時調整し, 1 mL の NaBH_4 (0.45, 1.32, 2.90, 4.76, 6.30 $\times 10^{-5}$ mol), アスコルビン酸 (0.57, 1.70, 3.41, 3.97 $\times 10^{-5}$ mol) の各水溶液を瞬時に添加した. その後 24 h 反応させたものを金ナノ粒子分散液として以降の実験で評価した.

2.2.3 クエン酸還元金ナノ粒子の調製

クエン酸還元金ナノ粒子は Frens¹⁰⁾らの方法を基に, 調製を行った.

前項と同様に 264 μM の HAuCl_4 水溶液を 30 mL 準備し, 約 700 rpm で攪拌しながら加温した. HAuCl_4 水溶液を沸騰させ, 還元剤である 1 mL のクエン酸ナトリウム (1.94, 3.88, 7.75, 11.63 $\times 10^{-5}$ mol) 水溶液を添加した. その後 80°C, 20 min 反応させ, 室温に戻したものを金ナノ粒子分散液として以降の実験で評価した.

2.2.4 調製した金ナノ粒子の物性評価

調製した粒子の粒子径及び多分散指数は動的光散乱法により, Malvern Zetasizer Nano-S instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) を用いて測定した. 400~600 nm の粒子吸光スペクトルは UV-visible spectroscopy (UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて測定した.

2.2.5 透過型電子顕微鏡 (TEM) による粒子の観察

調製した粒子分散液をカーボンコート Cu グリッド上に適量加えた後に, 室温で乾燥させたものをサンプルとした. JEOL JEM-1400 plus (JEOL Ltd., Japan) を用いて, 電圧条件として 100 kV にて粒子を観察した.

2.2.6 還元剤の還元力 (還元当量数) の測定

本実験では Okouchi ら¹¹⁾の方法を基に実験を行った。有効ヨウ素濃度として 0.2 mg/mL のポビドンヨード (イソジン[®]うがい薬, meiji Co. Ltd., Tokyo, Japan) 溶液 10 mL をはかりとり、マグネティックスターラーを用いて十分に攪拌した。攪拌条件下でこの溶液に還元剤 (NaBH₄, アスコルビン酸)を少量ずつ加えていき、ポビドンヨード由来の褐色が無色となる量を目視で確認し、滴定法にて測定した。還元力は以下の式に代入して求めた。

$$\text{Reductive activity} = \frac{\text{アスコルビン酸 (3.97} \times 10^{-5} \text{ mol) の滴定量}}{\text{サンプルの滴定量}}$$

2.3 結果と考察

単分散粒子の生成機構を最も端的に説明するモデルで、よく知られているものに LaMer モデルがある。LaMer モデルは次式が導き出されている^{5,6)}。

$$N_{\infty} = Q_0 V_m / \dot{v}$$

N_{∞} : 最終的に得られる粒子数, Q_0 : 核生成期における前駆体モノマーの供給速度,

V_m : 粒子 1 mol 当たりの個体体積, \dot{v} : 生成核の体積成長速度

金ナノ粒子合成系におけるサイズ制御は 2.1 で述べたように吸着性の添加物や溶媒を利用することで \dot{v} を制御する方法⁷⁾や還元剤の選択等により、 Q_0 を制御できることが報告されている⁷⁾。本研究においては DDS キャリアの最適化のために、粒子形成後に粒子表面修飾 (もしくは結合) 量を制御しやすい、後者の還元剤の種類や添加量を変化させ、粒子径の変化を検討した。

2.3.1 DLS による各種還元剤によって還元した金ナノ粒子の粒子径の測定

DLS を用いて NaBH_4 , アスコルビン酸, クエン酸ナトリウムで還元した金ナノ粒子の粒子径 (粒子体積ピークの平均値) を測定した (Fig.1-1). クエン酸ナトリウムで還元した粒子は還元剤の添加量の変化にほとんど依存せず, 約 15~30 nm のナノ粒子を得ることが出来た (Fig. 1-1A). アスコルビン酸還元金ナノ粒子は還元剤の添加量の増加に伴い, 約 20 ~ 10 nm と平均粒子径の減少が確認でき, 均一な金ナノ粒子を得ることが出来た (Fig. 1-1B). さらに, NaBH_4 で還元した金ナノ粒子の場合においても, その添加量を $1.32 \times 10^{-5} \sim 6.30 \times 10^{-5} \text{ mol}$ と増加させることにより約 30 ~ 5nm の平均金ナノ粒子径の減少が確認され, 再現性良く粒子径を制御し調製できていることが確認された (Fig. 1-1C).

アスコルビン酸と NaBH_4 による還元 of いずれにおいても, 還元剤の添加量 (濃度) の増加に伴い, 粒子径が減少することが確認された. 一般に反応物質の濃度の増加に伴い反応速度は増加する. したがって, 今回の結果から反応速度の増加に伴い粒子径が減少する可能性が示唆された. これらの結果は前述の LaMer モデルとも相関する結果である. また, クエン酸還元金ナノ粒子は調製時に温度を上昇させることから濃度以外のパラメーターの影響によりアスコルビン酸と NaBH_4 のような顕著な相関がみられなかったと推察される. さらに, NaBH_4 は強力な還元剤として知られており, 還元速度が大きい. したがって, 還元金ナノ粒子において $0.45 \times 10^{-5} \text{ mol}$ 添加したものは NaBH_4 の添加量が極めて少なく, 溶液全体に拡散されるより早く還元反応が完了してしまい, 粒子径のばらつきが大きくなったと考察している.

アスコルビン酸や NaBH_4 による還元において, 適切な還元剤の添加量を選択することで均一な金ナノ粒子の調製と粒子径の制御が可能であることが示唆された. また, NaBH_4 還元はアスコルビン酸還元と比較してより微細な還元剤の添加量の違いで大きな粒子径の変化を得ることが出来, 粒子形成後の分散媒の塩強度がより低い条件で微細な粒子径の制御が可能であることを示している.

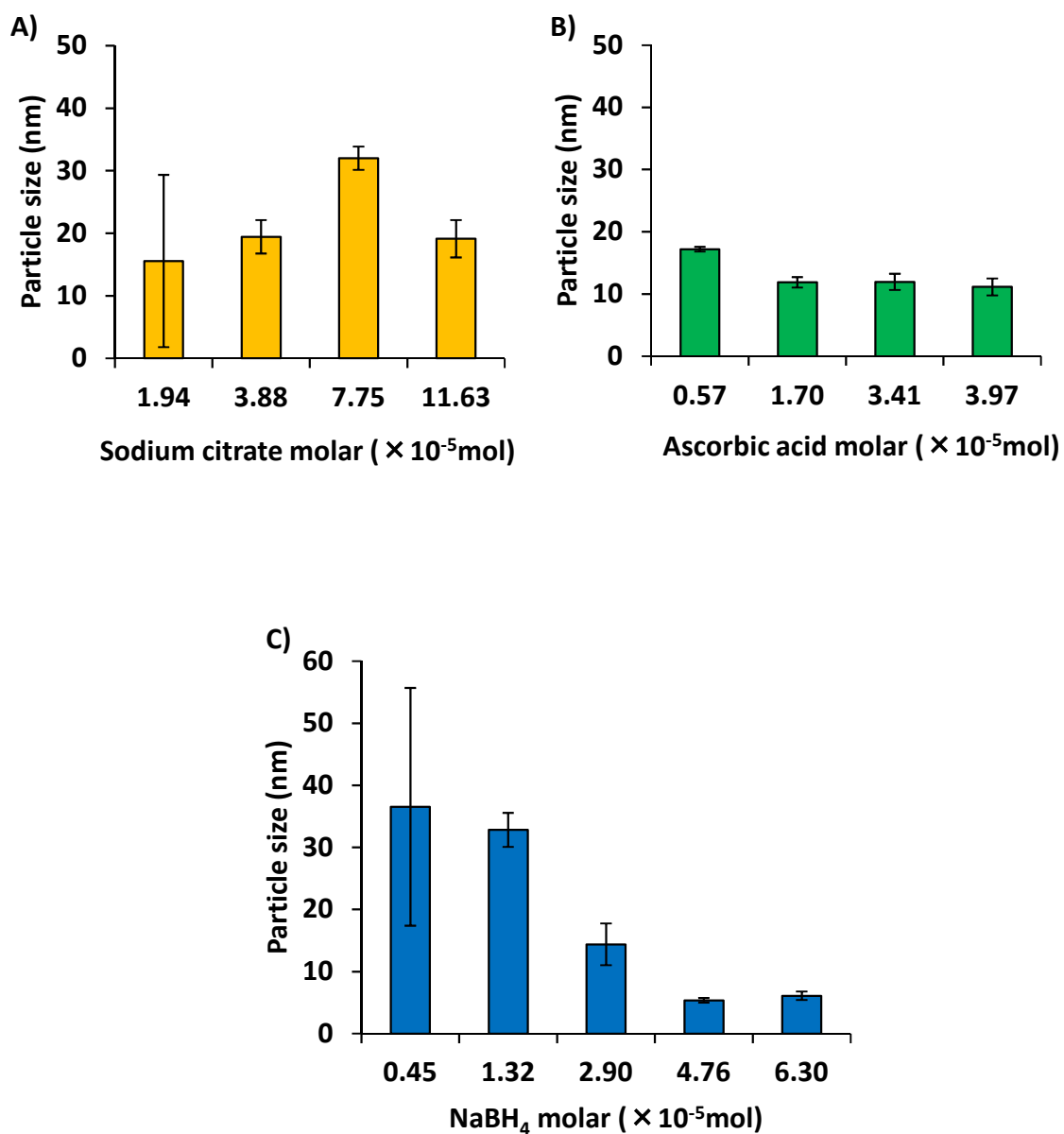


Fig.2-1 Effect of reducing agents on gold nanoparticles (GNPs) size
A) Sodium citrate reduced GNPs, B) Ascorbic acid reduced GNPs,
C) NaBH₄ reduced GNPs

Results are shown as mean \pm SD, n = 3.

2.3.2 NaBH₄還元金ナノ粒子の紫外可視吸光スペクトルの観察

金ナノ粒子はナノスケールの空間に原子・分子が閉じ込められた状態であり、バルク状態とは異なった性質を示すことが知られている。その特性の一つに金ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴 (LSPR) が挙げられる。プラズモンとは貴金属中の自由電子の集合的な振動であり、量子的に記述される。LSPR は粒子表面に存在する自由電子のプラズモン周波数が可視~近赤外域の光電場の周波数域に存在するため、光電場と共鳴して著しく励起される現象である。この現象は、金ナノ粒子の紫外可視吸光スペクトルによって一般的に観察でき、吸光極大ピークとして現れる。LSPR のピーク波長は Drude モデル (導体の電子輸送の古典的モデル) や共振条件を用いて以下の式で示される¹¹⁾。

$$\omega_{\max} = \omega_p / \sqrt{(2\varepsilon_m + 1)}$$

$$\lambda_{\max} = \lambda_p \sqrt{(2n_m^2 + 1)}$$

$$\text{※ DM} = \{4\pi r^3 / 3\} \{3\varepsilon_m / (2\varepsilon_m + \varepsilon)\} \{(\varepsilon - 1)E_0 / 4\pi\}$$

ω_{\max} : LSPR のピーク周波数, ω_p : プラズモン周波数, ε_m : 粒子間媒体の誘電率

λ_{\max} : LSPR ピーク波長, λ_p : プラズマ周波数に対応する波長,

n_m : 粒子媒体の屈折率, DM: 双極子能率 ε : 金ナノ粒子の誘電率,

E_0 : 外部電場

上記の式より、粒子および粒子媒体物性は LSPR のピークの結果に大きく影響する。

一般に金ナノ粒子の粒子径の増大に伴って、プラズモン吸光極大ピークが高波長側にシフトする。そこで、紫外可視吸光スペクトルを観察することで 2.3.1 において粒子径を制御した NaBH₄還元金ナノ粒子の大小関係を比較し、DLS の結果との相関性を評価した (Fig. 2-2)。紫外可視吸光スペクトルの観察の結果、DLS の測定による金ナノ粒子の粒子径の増大に伴ってプラズモン吸光極大ピークが高波長側にシフトしている様子が確認できた。これにより、紫外可視吸光スペクトルの観察結果は DLS における粒子径測定の結果と相関が得られたと考えられる。本実験の LSPR ピーク値の結果は先行文献¹³⁾と比較した結果、ほぼ同程度の結果を示したが、ずれた部分も存在した。この理由としては、分散媒の誘電率の違いや還元した際に生成されるプロトン数の違い¹⁴⁾、粒子径の均一性や粒子の凝集率の違いによるものであると考察している。

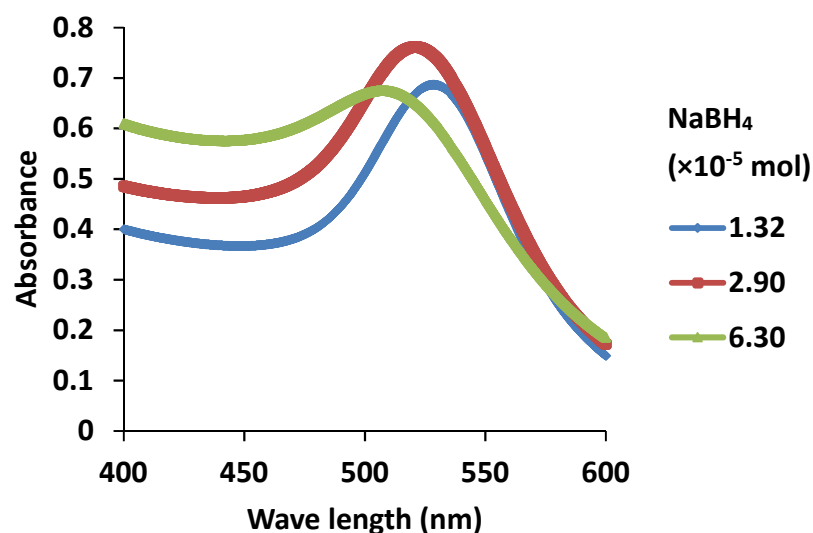


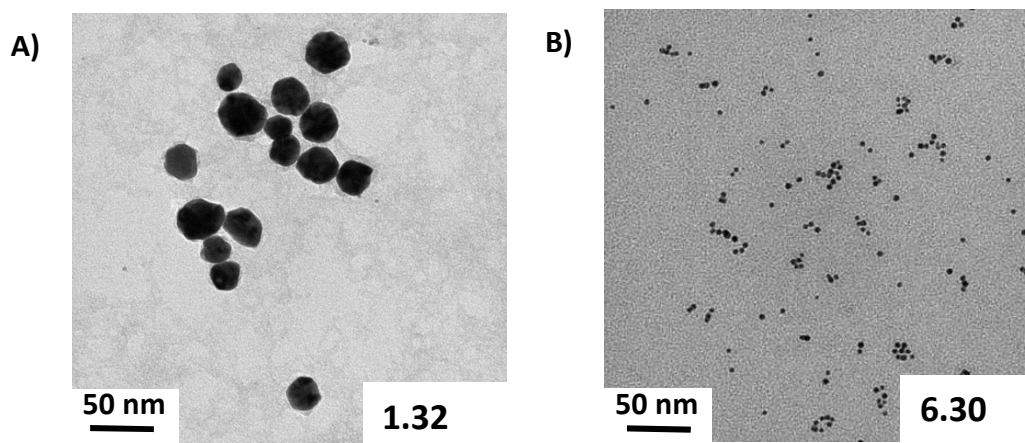
Fig.2-2 UV-Vis spectrum of NaBH₄ reduced GNPs

2.3.3 TEM による NaBH₄ 還元金ナノ粒子の観察

本項では 2.3.1 で調製・粒子径制御した NaBH₄ 還元金ナノ粒子について TEM を用いてその外観の観察を行った (Fig. 2-3). DLS の測定結果で約 30 nm であった金ナノ粒子 (NaBH₄ 1.32 × 10⁻⁵ mol 添加) は TEM による観察でもフェレー径として平均約 30 nm の粒子であることが観察できた (Fig. 2-3A). しかしながら, 球形以外の粒子も多数確認された. また, DLS の測定結果で約 5 nm であった金ナノ粒子 (NaBH₄ 6.30 × 10⁻⁵ mol 添加) は TEM による観察でもフェレー径として約 5 nm の球形の均一な粒子であることも観察できた (Fig. 2-3B).

Fig.1~3 の結果から金ナノ粒子の調製時に NaBH₄ の添加量を変化させることにより, 平均粒子径として約 5~30 nm に制御可能であることが確認できた.

また, 本研究において 100% 効率で粒子が 5 nm で均一に調製された場合, 5.0 × 10¹² 個/mL (金の密度 19.3 g/cm³) 調製できると算出される.



**Fig.2-3 TEM image of NaBH₄ reduced GNPs A) 1.32×10^{-5} mol,
B) 6.30×10^{-5} mol**

2.3.4 還元剤の還元力(還元当量数)が粒子径に及ぼす影響

本項では、前項までの結果において還元剤の濃度の増加に伴う粒子径の減少が測定・観察されたことから、金ナノ粒子の粒子径の変化は還元剤の還元速度の変化によるものではないかと推察した。しかしながら、還元剤の濃度上昇は還元速度のみに影響するのではない。濃度が影響する因子の一つに還元力(還元当量数)がある。そこで、NaBH₄とアスコルビン酸について還元剤の還元力(今回測定したものは還元力の中の還元当量数である)を測定し、還元力と粒子径の関係を明らかにした(Fig. 2-4)。Fig. 2-4の結果から同一還元剤であれば還元力の増加に伴い粒子径が減少する傾向が得られた。しかしながら、還元力の増大に伴う粒子径の減少が観察できなかったため、純粋な還元力(還元当量数)に依存しない。

この結果は金ナノ粒子の粒子径は還元当量数ではなく還元速度に大きく影響するというこれまでの結果や知見と一致するものである。

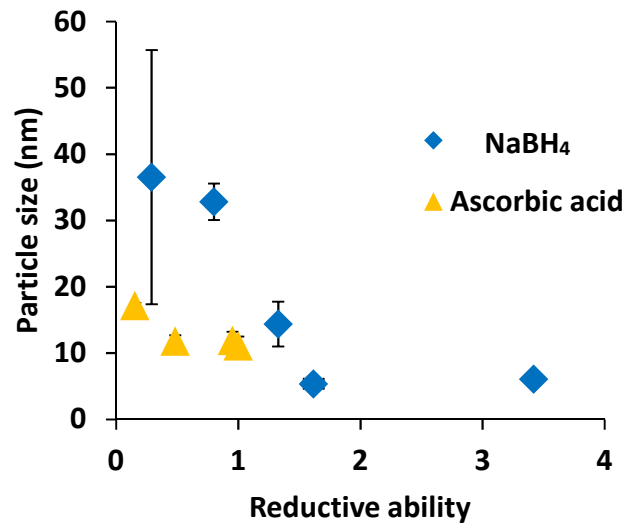


Fig.2-4 Effect of reducing agents reductive ability on GNP size
Results are shown as mean \pm SD (n = 3).

2.4 小括

金ナノ粒子の原料となる塩化金酸一定条件下での液中還元法による金ナノ粒子の調製において還元剤の種類や調製時の添加量 (濃度) を変化させることによって様々なサイズの金ナノ粒子の調製できた。本実験から平均粒子直径として約 5 nm~30 nm という微細な粒子径範囲で金ナノ粒子を制御可能であることが示唆された。特に, NaBH₄ 6.30×10^{-5} mol 添加した金ナノ粒子は 5 nm の均一な粒子が調製可能であることが確認できた。

金ナノ粒子調製にあたり, その粒子径は純粋な還元力 (還元当量数) に影響しないことが確認でき, 還元速度の影響の高さの可能性が示唆された。

本章で調製した金ナノ粒子は調製条件を制御することで, 微細な粒子径を均一に調製可能であった, また, 今回調製した NaBH₄ 還元金ナノ粒子の粒子表面には他の還元剤⁵⁾と比較して保護物質を有していないことが考えられ, その後の粒子表面への修飾は比較的自由に行うことが可能であることが示唆された。これは標的部位への集積を目的とするような DDS キャリアの調製に重要である。

以上より, 本章で調製した約 5 nm の金ナノ粒子はナノ化する DDS 研究に十分利用できる。

本章で調製した NaBH₄ 還元金ナノ粒子はその応用研究として以降の章で DDS 製剤の核粒子として使用しているので参照されたい。

2.5 引用文献

- 1) M. Faraday, *Philos. Trans. R. Soc. London*, 147, 145 (1857)
- 2) M. Faraday, *Ann. Phys.*, 101, 383 (1857)
- 3) M. Kerker *J. Colloid Interface Sci.*, 112, 302 (1986)
- 4) Chen W., Zhang S., Yu Y., Zhang H., He Q., *Advanced Materials*, 28(39), 8567 (2016)
- 5) 金ナノテクノロジー –その基礎と応用- 株式会社シーエムシー出版 (2014)
- 6) Sugimoto T., Kimijima K., *J. Phys. Chem. C.*, 112 18760 (2007)
- 7) Oh E., Susumu K., Goswami R., Mattoussi H., *Langmuir*, 26(10), 7604 (2010)
- 8) Brust M, Walker M, Bethell D, Schiffrin D, Whyman R, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 801 (1994).
- 9) M. Horisberger and M. Tacchini-Vonlathen, *Histochemistry*, 77, 37 (1983)
- 10) G. Frens, *Nature*, 241, 20 (1973)
- 11) S. Okouchi, Y. Kurita, K. Yoshida, P. Thanatuksorn, S. Ikeda *J. Hot Spring Sci.* 61, 106 (2011),
- 12) Mayer K. M., Hafner J. H., *Chemical reviews*, 111(6), 3828 (2011).
- 13) Link S., El-Sayed M. A., *J. Phys. Chem. B*, 103, 8410 (1999)
- 14) Ershov B. G. E., Abkhalimov E. V., Solovov R. D., Roldughin V. I. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18 (19), 13459 (2016)

3. 加齢黄斑変性症治療を目的とした Ranibizumab バイオシミラー搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製と血管新生阻害効果の検討

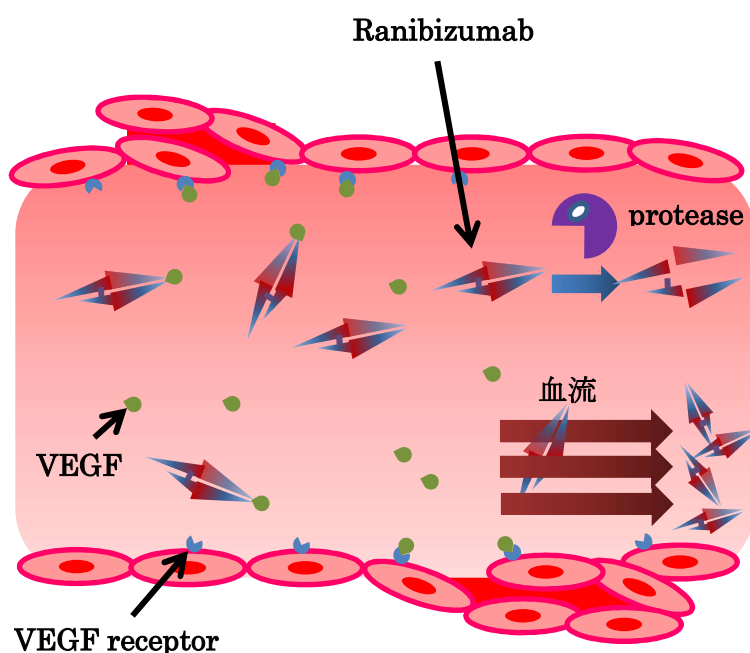
3.1 本章における実験の背景と目的

血管新生は、現存する血管から発現する微小血管の形成をもたらす生理学的過程である¹⁻³⁾。この現象は、癌や慢性関節リウマチ、心臓血管疾、および眼疾患 [例えば、増殖性糖尿病性網膜症および加齢黄斑変性症 (AMD)] などの病理学的プロセスにおいて誘導されると認識されている。血管新生の進行は、AMD 患者において失明などの重大な結果を生じることがある。抗血管新生療法を用いた血管新生の阻害は、標的疾患を治療するための戦略として現在治療に用いられている。血管新生は、アンギオポエチン、カドヘリン、線維芽細胞増殖因子、マトリックスメタロプロテアーゼ、トランスフォーミング増殖因子、および血管内皮増殖因子 (VEGF) などのいくつかの因子によって調節される⁴⁾。VEGF は血管内皮細胞の増殖および出芽を誘導し、血液血管内皮細胞上に発現する VEGF 受容体と相互作用する。VEGF と内皮細胞との相互作用を遮断する療法は、特に AMD に対する証拠に基づく薬剤となることが期待され⁵⁾、抗 VEGF 療法の基準が定められており⁶⁾、現在 VEGF 特異的抗体 (ベバシズマブ)、アプタマー (ペガブタニブ)、抗体断片 (ラニビズマブ)、および VEGF 受容体融合タンパク質 (アフリベセプト) が市販されている⁷⁾。

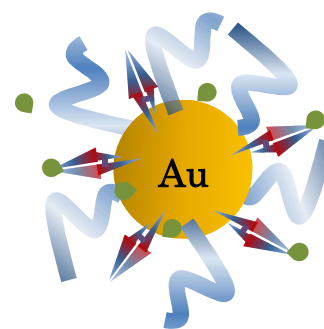
金ナノ粒子を基盤とした DDS への適応は第 1 章で示したように他の DDS キャリアと比較し、微細な粒子ながら多機能であることが期待されることから魅力的である。金ナノ粒子の薬物動態、生体内分布および毒性に関する安全性は、実用上の懸念事項であるが、組換えヒト腫瘍壊死因子 α およびポリエチレングリコール (PEG) 結合金ナノ粒子が近年、がん患者の臨床試験に使用されており、結果は安全なプロファイルを示している⁸⁾。これに関連して、PEG 化は水和層を形成し、治療タンパク質の分解を促進するマクロファージおよびプロテイナーゼによる非特異的取り込みを引き起こすオプソニン化に関連するタンパク質などの様々なタイプのタンパク質の吸着を防止することが可能である。この技術は、PEG 化タンパク質薬物の適用を進めてきた⁹⁾。

本研究では、Ranibizumab を送達するための金ナノ粒子ベースのプラットフォームに焦点を当てた。VEGF に対する特異的抗体フラグメントである Ranibizumab は、AMD の治療のための標準的な治療法となっている。Ranibizumab は比較的小さいサイズ (約 50 kDa) を有し、組織に容易に浸透すると考えられるためベバシズマブと比較して、短い眼内消失半減期を有する (Scheme 3-1)¹⁰⁾。

したがって、本実験では金ナノ粒子に **Ranibizumab** バイオシミラーを結合させることを計画した。以前の当研究の別グループの実験において眼に持続的に薬物を放出させるモデルとし、**Ranibizumab** バイオシミラー封入乳酸グリコール酸共重合体 (PLGA) 微粒子の調製に成功している¹¹⁾。バイオ医薬品のジェネリック医薬品であるバイオシミラーは、医療経済分野で重要となることが予想されており、規制に関する研究が注目されている^{12,13)}。本実験では **Mab / PEG 結合金ナノ粒子** (約 5 nm) を新規 AMD 治療戦略として設計した。期待される利点は以下の通りである 1) 小さな金ナノ粒子への搭載によるサイズの増大は、眼内の **Mab** の迅速な排除を防ぐことができ、2) ナノ粒子の **PEG** 化は、病理学的に眼における高いプロテアーゼレベル (Scheme 3-1) から **Mab** を保護することができる。本実験では **Mab** と **PEG** との比を変化させることによって **Mab / PEG 結合金ナノ粒子** (Scheme 3-2) を特徴付け、*in vitro* でヒト血管内皮細胞に基づくアッセイを使用することによって治療効果を調べた。



Scheme 3-1 **Ranibizumab** の問題点



Scheme 3-2 **Mab** 搭載 **PEG** 化金ナノ粒子の模式図

3.2 試料及び実験方法

3.2.1 試料

粒子の核となる金ナノ粒子は第 2 章における NaBH_4 還元 (調製時 6.30×10^{-5} mol) のものを使用した. Ranibizumab バイオシミラー (Mab) は Meiji Seika ファルマ 株式会社で合成したのものを使用した. PEG-SH として mPEG-SH (MW: 5 kDa) と O-(2mercaptoethyl)-O'-methylpolyethylene glycol (MW: 10 kDa) はそれぞれ Creative PEGWorks (Winston-Salem, NC, USA) 及び Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した. VEGF-A は和光純薬工業 (Osaka, Japan) から購入した. 試薬はすべて試薬グレードのものを使用した.

3.2.2 Mab 搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製

第 2 章で調製した NaBH_4 還元金ナノ粒子分散液 4 mL に対し, PEG-SH (5k Da, 10k Da) 水溶液 ($0.0281 \mu\text{mol}$, Au/PEG モル比 30/1 の場合) を添加し, 1 h 攪拌条件下で反応させた. その後, Amicon[®] Ultra (100 kDa, Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて未反応の PEG-SH を除去し, PEG 化金ナノ粒子分散液 (PGs) を 1 mL に濃縮・精製した. PGs 500 μL に対し, 1 mg/mL の Mab 水溶液 16.1 μL (2 章で直径 5 nm 金ナノ粒子を 100% 調製できたと仮定した場合の 1 粒子あたり Mab 20 分子相当量) 加え, 攪拌した後 4°C で一晩反応させた. 反応させた金ナノ粒子分散液は超遠心 (85,000 rpm, 10 min, 4°C) によって 4 回洗浄することで未反応の Mab を除去し, Mab 搭載 PEG 化金ナノ粒子 (MPGs) を精製した.

3.2.3 粒子物性評価

調製した粒子の粒子径及び多分散指数 (PDI) は動的光散乱法により, Malvern Zetasizer Nano-S instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) を用いて測定した. 450~550 nm の粒子吸光スペクトルは UV-visible spectroscopy (UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて測定した. Mab 濃度は DC[™] protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて定量した.

3.2.4 TEM による粒子の観察

調製した粒子分散液をカーボンコート Cu グリッド上に適量加えた後に, 室温で乾燥させた. その後 2% 酢酸ウラン溶液で試料を染色させたものをサンプルとし, JEOL JEM-1400 plus (JEOL Ltd., Japan) を用いて電圧条件として 100 kV にて粒子を観察した.

3.2.5 細胞培養

今回使用したヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVECs) は Lonza (Basel, Switzerland) より購入した. HUVECs は endothelial cell basal medium-2 (EBM-2, Lonza) に添加因子として human epidermal growth factor, hydrocortisone, human recombinant fibroblast growth factor- β , VEGF, insulin-like growth factor, ascorbic acid, heparin, fetal bovine serum 及び gentamicin/amphotericin-B (全て EBM-2 付属品) を加えたものを培地として用いた. HUVECs は 37°C, 5% CO₂ 条件で培養し, 本章の実験に使用した.

3.2.6 Tube formation assay

Tube formation assay により血管新生阻害効果を評価することで, 3.2.2 にて調製した MPG_s の抗 VEGF-A 効果について検討を行った.

本実験の前処理として Matrigel[®] (Corning, NY, USA) を 96 ウェルプレートに各 50 μ L ずつ加え, 37°C で 1 h インキュベートし, Matrigel[®] を凝固させた. さらに, 予め抗原抗体反応として VEGF-A とサンプル (Mab, PG_s, MPG_s) を室温で 1 h 混合・反応させた. 反応モル比及び濃度は Table 3-1 に示した. MPG_s は Mab 濃度換算量として, PG_s は反応させた MPG_s と同等の粒子数となるように反応させた. Matrigel[®] 処理したプレートに添加因子のうち全ての成長因子を除いた, 1% FBS 含有 EBM-2 に分散させた HUVECs 懸濁液 (10,000 cells/well) と抗原抗体反応溶液を VEGF-A 濃度として 50 ng/mL, 5 ng/well となるように加えた. 37°C, 5% CO₂, 4 h インキュベートした後に光学顕微鏡を用いて HUVECs の血管形成を観察した. HUVECs の血管形成阻害効果を定量的に評価するため 1 サンプルあたりランダムに選択した 3 箇所 (1 辺 500 μ m の正方形 (面積として 0.25mm²) 中の完全に連結した血管数を目視で観察し, 計測した.

Table 3-1 Premixing of Mab and VEGF for the Tube formation assay

VEGF-A/Mab (molar ratio)	untreated	1/1	1/2	1/4
VEGF-A (ng/mL)	0	500	500	500
Mab (ng/mL)	0	625	1250	2500

3.2.7 細胞増殖抑制効果の検討

まず, 前処理として 3.2.6 と同様に抗原抗体反応を 1 h 行った. その後 96 ウェルプレートに 3.2.6 と同様の EBM-2 に分散させた HUVECs 懸濁液 (10,000 cells/well) と抗原抗体反応溶液を 50 ng/mL, 5 ng/well となるように加えた. 37°C, 5%CO₂, 24 h インキュベートし, 細胞増殖を Cell Counting Kit (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて評価した.

3.2.8 有意差検定

GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて One-way ANOVA による有意差検定を Tukey's multiple comparison test (Fig. 3-4, 3-5B, 3-7) により行った。また, unpaired t-test (Fig. 3-6) も同様に行った。

3.3 結果と考察

未修飾の金ナノ粒子は, 様々な内在性タンパク質による吸着を受け, 容易に凝集する。対照的に, 金ナノ粒子上の PEG コーティングは, 非特異的吸着を防止し, 血液循環時間を延長することができる。Zhang ら¹⁴⁾の研究では, 高分子量(5 kDa)の PEG 鎖は低分子量 (2 kDa) の PEG 鎖よりも優れた安定性を *in vitro* で示した。さらに, より小さなサイズ (20 nm) の PEG 化金ナノ粒子は, より大きなサイズの PEG 化金ナノ粒子 (40 nm および 80 nm) と比較して, より良好な血液循環を示すことを報告している。

Zhang らは腫瘍治療に焦点を当てていたが, 本実験では限局性疾患として AMD に焦点を当てた。限局性疾患に対する金ナノ粒子の適用の例として, Lee ら¹⁵⁾が報告したリウマチ性関節炎に対する局所注射用ヒアルロン酸/トシリズマブ複合金ナノ粒子が挙げられる。親水性ポリマー、例えば PEG およびヒアルロン酸のコーティングは, 局所条件におけるコロイド安定性に寄与し得る。この知見は今後 *in vivo* 実験を行う上で非常に重要である。今回の実験では, Mab の他の組織への分布を妨げるだけでなく, 比較的大きな表面積のために Mab を表面に多く担持することが期待される, より小さなサイズの PEG 化金ナノ粒子 (約 5 nm) を用いた。さらに, 2つの異なる PEG 鎖 (5K および 10K) を用いて金ナノ粒子の表面に結合させ, 評価を行った。

3.3.1 TEM による MPGs の観察

TEM を用いて核粒子である GNPs 及び金ナノ粒子 Au : PEG = 30 : 1 で調製し, 5 kDa PEG を結合した 5K MPGs, 10 kDa PEG を結合した 10K MPGs の外観をネガティブ染色法により観察した (Fig.3-1)。いずれの画像において直径約 5 nm の金ナノ粒子のコアが観察できた。また, MPGs 粒子は均一に分散されている様子も確認された。さらに, いずれの MPGs の画像においても金ナノ粒子コアの周りに白い領域が確認できた。これは PEG と Mab の結合によりネガティブ染色によるコントラストの変化により生じたものであることが推察され, 今回の調製方法により, MPGs の調製に成功したことが示唆された。

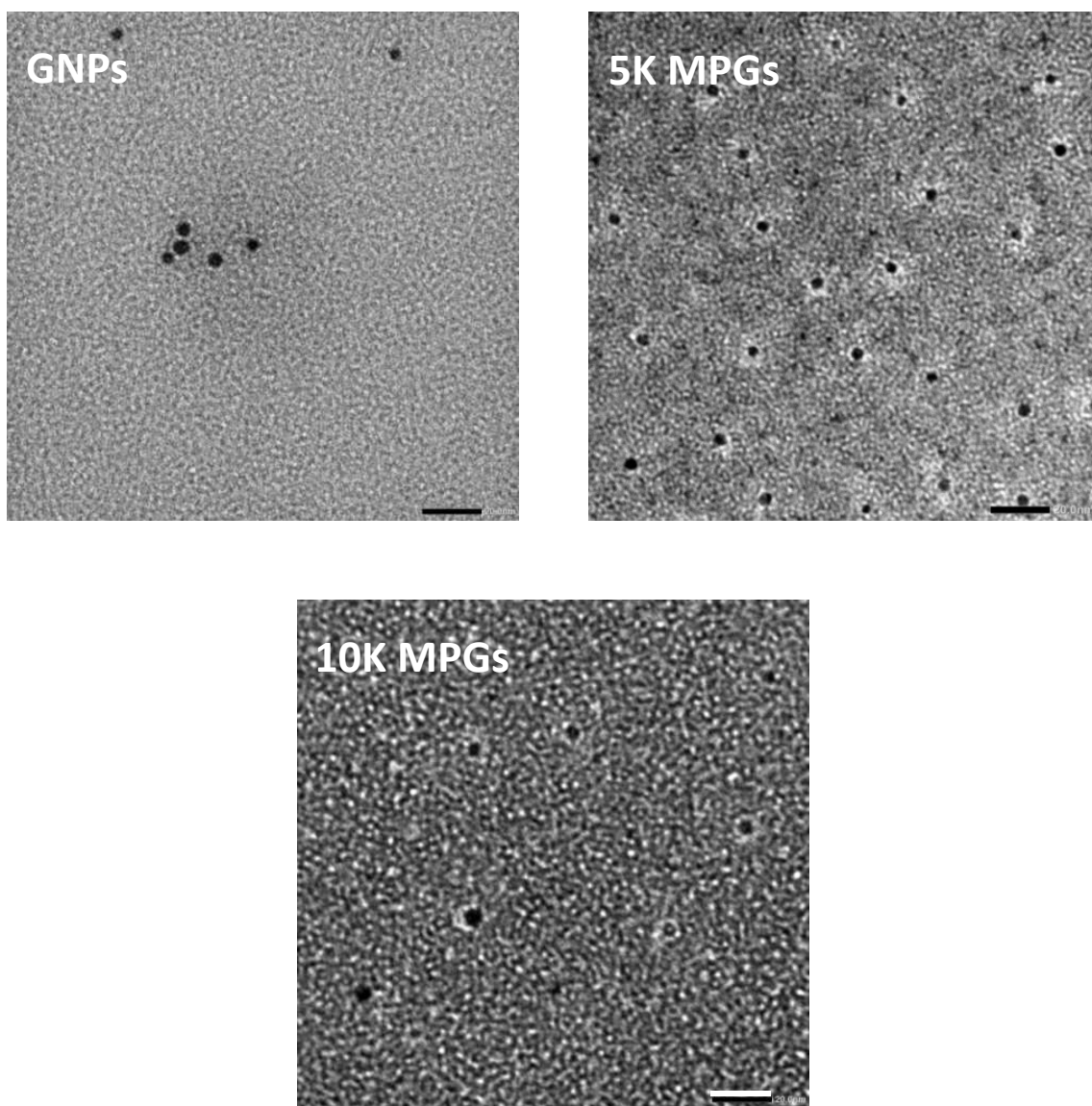


Fig. 3-1 Negatively stained TEM images. Scale bars, 20 nm. The molar ratio of Au and PEG in the preparation of 5 K MPGs and 10 K MPGs was set as 30:1

3.3.2 DLS による MPG_s の粒子径と PDI の評価

DLS を用いて MPG_s 調製段階ごとに粒子径と PDI を測定した (Table 3-1). GNPs, PGs, MPG_s と金ナノ粒子表面への結合を増加させるに伴い, 粒子径の増加が確認された. また, PEG 鎖の長さに粒子径は大きく依存し, 5 kDa の PEG を結合させた金ナノ粒子は約 20 nm, 10 kDa の PEG を結合させた粒子では約 30 nm であることが確認できた. さらに調製時に添加する PEG の量を増加させることで PDI は低下することが確認された. これらの結果は, 金ナノ粒子の表面に結合した PEG の量が少ないほど PDI 値が大きいことを示唆した.

また, DLS の粒子体積ピークを観察したところ, いずれの粒子においても単一のピークが観察できた. しかし, ピーク幅が広いことからタンパクの結合による若干の粒子の凝集が推察される. 凝集が生じていた場合, 以降の検討において, 単分散時と比較して薬理効果の減弱が予想される

Fig.3-2 では代表的な典型例として Au : PEG = 30 : 1 調製条件時における 10K MPG_s の粒子体積ピークを表している.

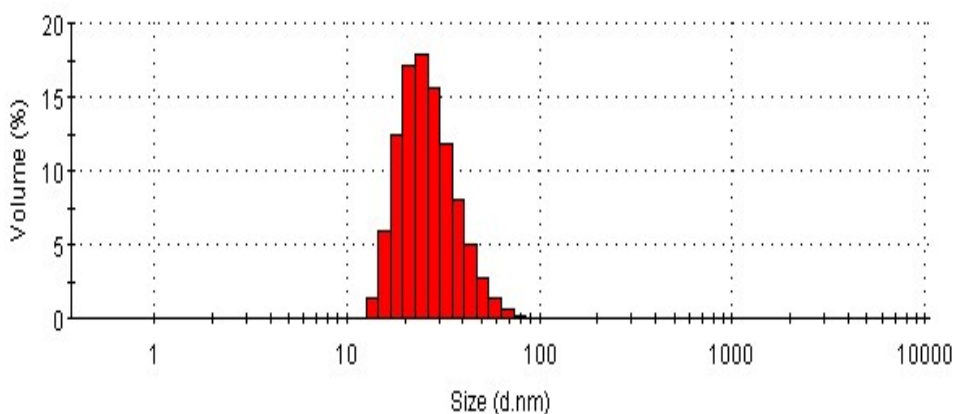


Fig. 3-2 Particle distribution of 10 K MPG_s measured by DLS

The molar ratio of Au and PEG in the preparation of 10 K MPG_s was set as 30:1

Table 3-2. Particle size and polydispersity index (PDI) of GNPs, 5 K and 10 K PGs, and 5 K and 10 K MPGs. Data are shown as mean \pm SD (n = 3)

Formulation	Au/PEG molar ratio	Particle size (nm)	PDI
GNPs	1:0	5.2 \pm 0.5	0.33 \pm 0.15
5K PGs	30:1	15.7 \pm 2.2	0.36 \pm 0.03
	10:1	16.0 \pm 2.0	0.25 \pm 0.02
	3:1	21.9 \pm 0.2	0.13 \pm 0.06
10K PGs	30:1	25.0 \pm 1.0	0.29 \pm 0.04
	10:1	29.1 \pm 2.2	0.23 \pm 0.04
	3:1	33.6 \pm 4.1	0.18 \pm 0.07
5K MPGs	30:1	21.6 \pm 2.9	0.40 \pm 0.12
	10:1	20.1 \pm 0.8	0.19 \pm 0.04
	3:1	23.2 \pm 0.9	0.09 \pm 0.01
10K MPGs	30:1	27.0 \pm 2.4	0.34 \pm 0.13
	10:1	29.0 \pm 1.9	0.19 \pm 0.03
	3:1	33.4 \pm 3.2	0.16 \pm 0.05

3.3.3 MPG_sの紫外可視吸収スペクトルの観察

第2章で記載した通り、金ナノ粒子には光学特性が知られている。この光学特性は金ナノ粒子表面の自由電子由来のLSPRによるものである。本実験のように金ナノ粒子表面に結合や修飾を施すことによってプラズモン共鳴波長などが変化することが報告されている¹⁵⁾。これは2.3.2での記載同様金ナノ粒子周囲媒体の変化により誘電率（もしくは屈折率等）が変化し高波長側にシフトしたためであると考察できる。

本実験では紫外可視吸光スペクトルをMPG_sの各調製段階で測定し、プラズモン共鳴のピークの変化を観察した（Fig.3-3）。PEG、Mabと金ナノ粒子表面の結合を増加させるに伴い、プラズモン共鳴波長のピークが高波長側にシフトすることが確認された。

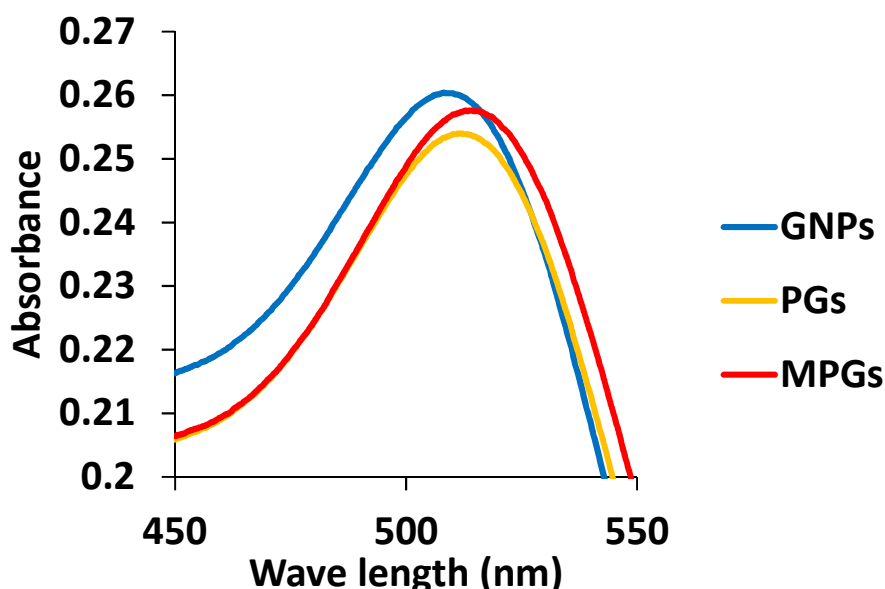


Fig.3-3 UV-vis spectrum

The molar ratio of Au and PEG in the preparation of 10 K MPG_s was set as 30:1.

3.3.4 調製時の PEG の添加量の変化が Mab の結合率に与える影響

PEG 及び Mab は構造中のチオール基やジスルフィドを介して金ナノ粒子表面に結合していると考えられる。したがって、PEG の添加量及び結合量の変化は Mab の結合率に影響を与えることが推察される。そこで、本実験では Mab の結合量を protein assay により定量し、調製時の PEG の添加量の変化が Mab の結合率に与える影響について調査した (Fig. 3-4)。Au/PEG 比 1 : 0, 30 : 1, 10 : 1, 3 : 1 の範囲で調査した結果、PEG の添加量の増加に伴い、Mab の結合率が低下することが確認できた。この結果は、金ナノ粒子 1 個あたりの PEG の量の増加に伴い、Mab の結合効率が低下したことを示唆している。これは、Mab によって結合される領域は既に PEG によって占有されているためだと考察している。より多量の PEG の使用では結合効率 (モル比 3 : 1、Au / PEG) を変化させなかった。これらの結果は、PEG と GNP との間の結合反応がほぼ完了し、分子量が PEG よりはるかに大きい Mab が GNP との結合に十分な空間を持たないためである。PEG 鎖の長さは Mab の結合効率に影響を与えず、統計学的に有意な差は認められなかった。これらの結果は、結合反応が適切に行われ、PEG 長がこの条件下で反応を妨げないことを示唆した。調製プロセスにおいて分散性がある程度確保されていれば、同様の量の Mab を GNP と結合させることができ、結合に十分に反応を行ったと推測される。Mab 結合効率は、Mab を PEG なしの GNP (88.8±3.3%) と反応させた場合に最も高かった。しかし、粒子はコロイド的に不安定であり、粒子の凝集物が目視で確認できた。本実験の結果より、30 : 1 (Au / PEG) のモル比は、Mab の結合率が 1 : 0 (Au / PEG) 条件 以外で最大であり (5 kDa : 79.8 ± 3.5 %, 10 kDa : 75.9 ± 0.17 %) MPG の調製に最適であると判断し、以降の実験に使用した。

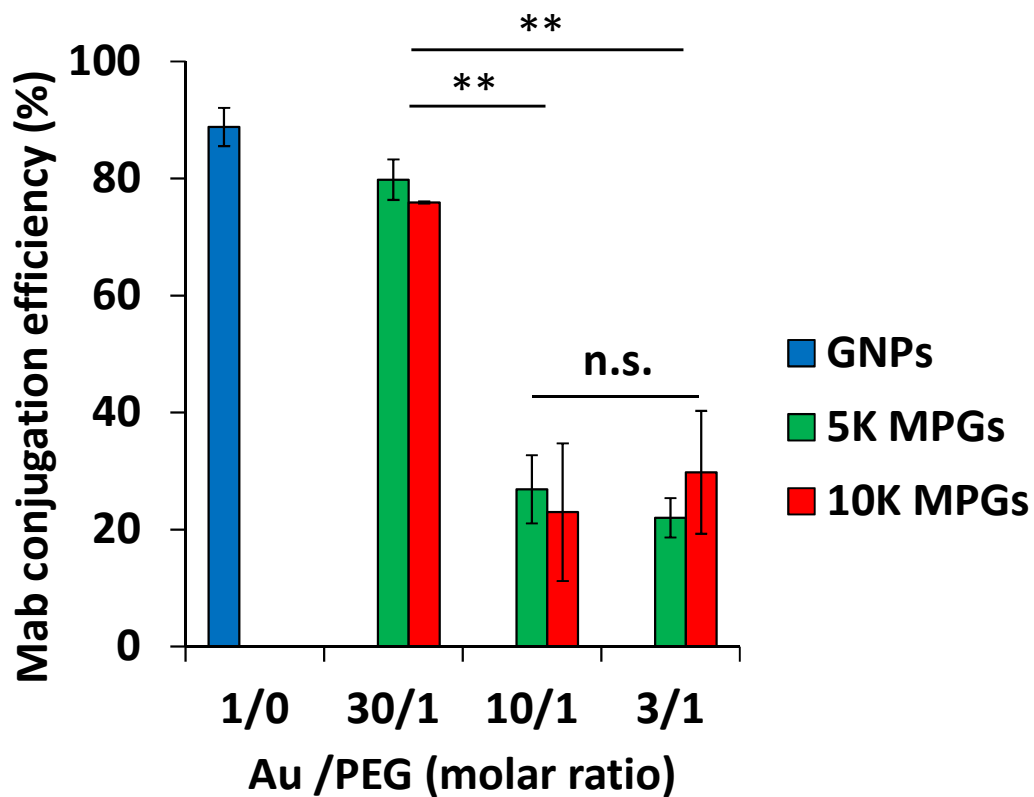


Fig. 3-4. Effect of PEG amount in the preparation of MPGs on the conjugation efficiency of Mab. Data are shown as mean \pm SD (n = 3).

**p<0.01, statistically significant; n.s., not significant.

3.3.5 *in vitro* における MPGs の血管形成阻害効果の検討

Matrigel[®] ベースのアッセイ系 (Tube formation assay) を用いて, VEGF / Mab モル比 1 / 4 反応条件で MPG および他の製剤の抗血管形成活性を評価した (Fig. 3-5A, B). VEGF 処理群は管の成長の増加を示したのに対し, 処理群は管形成の顕著な阻害を示した (Fig. 3-4A). 更に, 完全に連結したチューブの総数を数えることによって, チューブ形成能を定量した (Fig. 3-5B). MPG 製剤 (5K MPGs および 10K MPGs) による処理は, Mab 溶液または未処理細胞の場合と同程度の管形成の強力な阻害を示した (Fig. 3-5B). また, 意外にも PG 製剤は抗血管新生活性も示したが, MPG 製剤は PG と比較して顕著な抗血管形成活性を有することが示唆された. 金ナノ粒子単独による VEGF 機能の阻害はいくつか報告されている^{16,17}. 以上のことから, VEGF-A の効果は VEGF-A の金ナノ粒子への結合によって減弱する可能性があるかと推察できる.

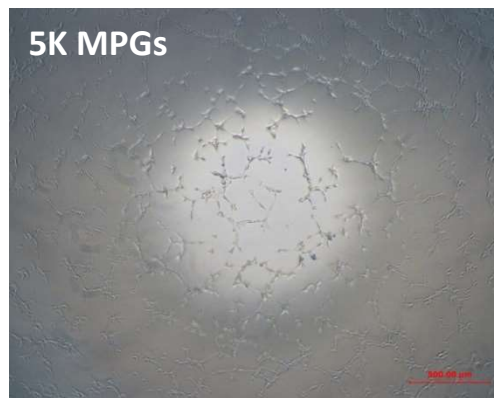
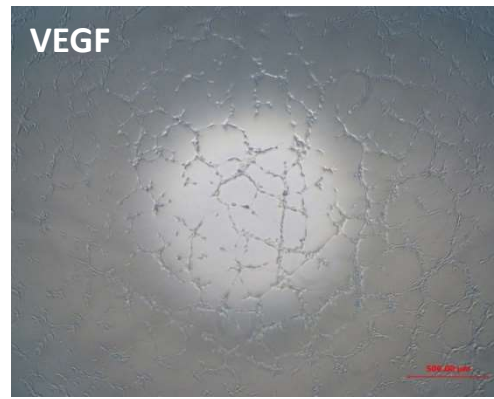


Fig.3-5A Tube formation assay.
The appearance of inhibition of neovascularization by MPG (VEGF/Mab = 1/4, VEGF concentration was set as 50 ng/mL).
Scale bar is shown as 500 µm.

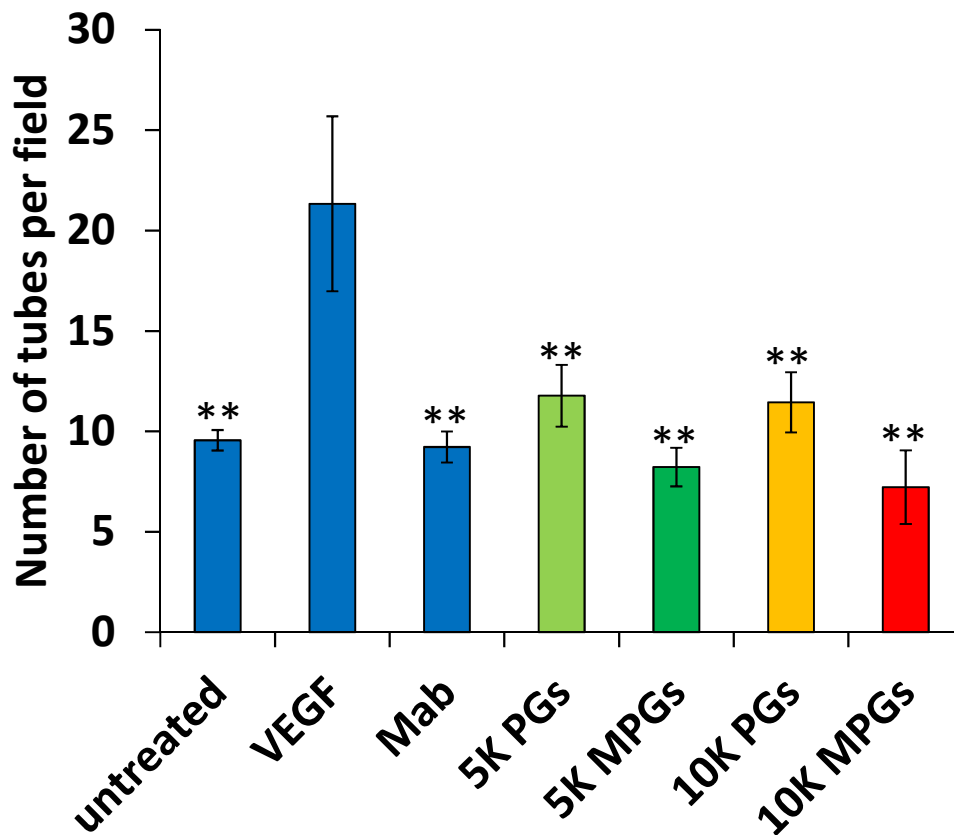


Fig. 3-5B. The anti-angiogenic effect of nanoparticles on tube formation *in vitro*. The number of tubes after the treatment with nanoparticles. The molar ratio of VEGF/Mab was set as 1:4. Data are shown as mean ± SEM (n = 3).

******, p<0.01 vs VEGF treatment group, statistically significant.

3.3.6 *in vitro* における MPGs の血管形成阻害効果の濃度依存性に関する検討

チューブ形成能力に対する MPGs 濃度の抗血管新生効果についても Tube formation assay を用いて異なる濃度のナノ粒子で評価した (Fig. 3-6). PGs は最も高い濃度で強い抗血管新生効果を示した. この実験条件では, MPGs, PGs の濃度依存性は確認できなかった. しかしながら, MPGs は低い MPGs 濃度 (VEGF / Mab = 1/1) で強力な阻害効果を示し, その効果は PGs による効果よりも高く, 他の比率でも同程度の強力な抗血管新生効果を示した.

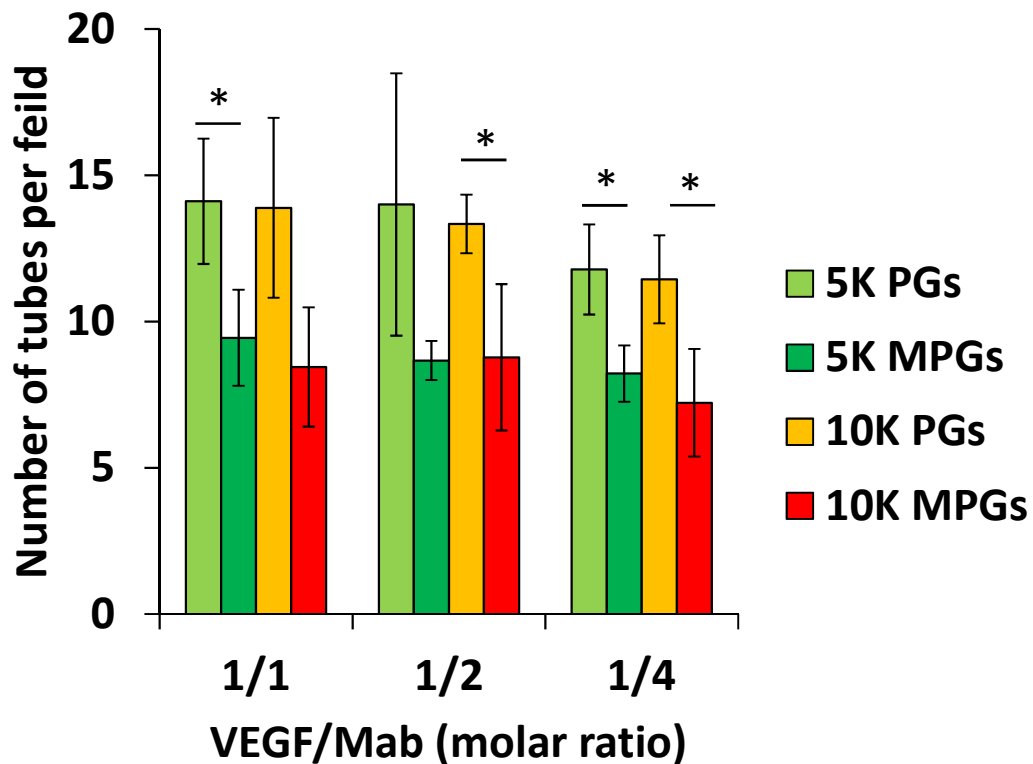


Fig. 3-6. Dose dependency of nanoparticles against the anti-angiogenic effect in vitro. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3), *p<0.05, statistically significant.

3.3.7 *in vitro* において MPGs が細胞増殖に与える影響

HUVECs の増殖に対する PGs および MPGs の影響を評価した (Fig. 3-7). この実験条件では, VEGF の添加およびナノ粒子による処理は細胞増殖に影響を与えず, 各群において有意差を見出すことができなかった. 10K MPG での処理が高濃度 (VEGF / Mab = 1/2 および 1/4) で細胞増殖を阻害する傾向があることが見出された.

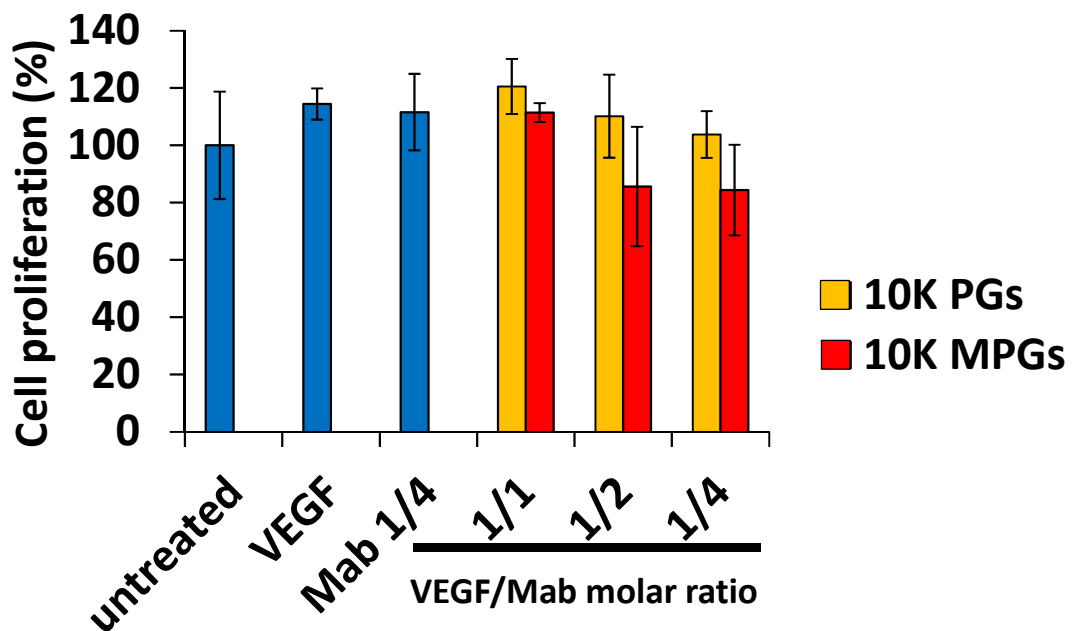


Fig. 3-7. Effect of nanoparticles on cell proliferation in HUVECs.
Data are shown as mean \pm SD (n = 3)

3.4 小括

本実験では新規製剤として Ranibizumab バイオシミラー搭載 PEG 化金ナノ粒子の開発に成功した。本粒子はインビトロで VEGF およびマトリゲルによって誘導された管形成の強力な阻害を示した。その抗血管新生効果は、Mab 溶液での効果と同等であることが明らかとなった。さらに、金ナノ粒子自体が抗血管形成活性を示すことも確認された。本ナノ粒子製剤は AMD の治療に有望である可能性が見いだされた。本実験の結果は、AMD および他の血管新生関連疾患である癌などに対する薬物送達系の研究に有用である。

3.5 引用文献

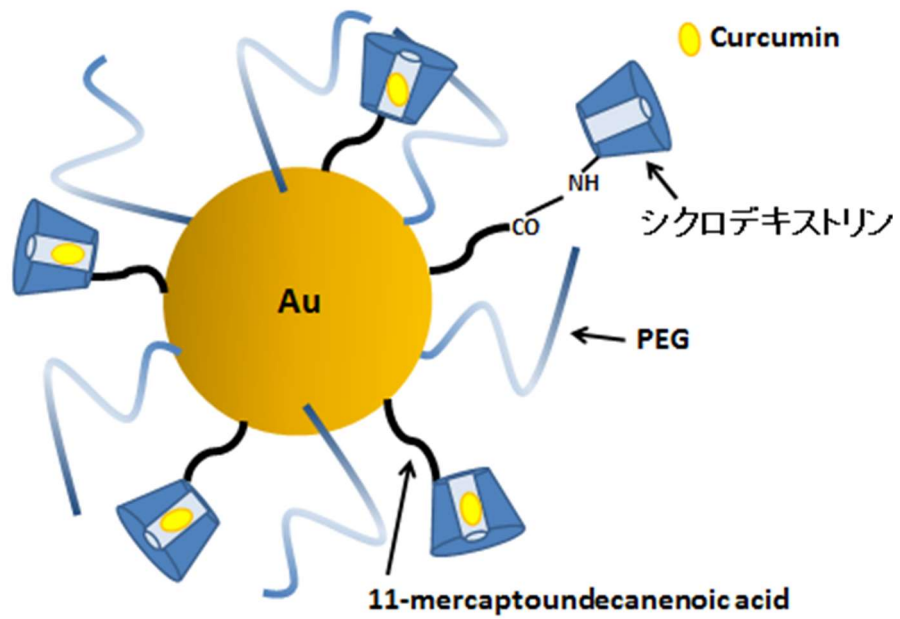
- 1) Pandya N.M., Dhalla N.S., Santani D.D., *Vasc. Pharmacol*, 44, 265 (2006)
- 2) Polverini P.J., *J. Dent Educ.*, 66, 962 (2002)
- 3) Battegay E.J., *J. Mol. Med. (Berl)*, 73, 333 (1995)
- 4) Kim K.J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H.S., Ferrara N., *Nature*, 362, 841 (1993)
- 5) Kovach J.L., Schwartz S.G., Flynn H.W., Jr., Scott I.U., *J. Ophthalmol.*, 2012, (2012)
- 6) Amoaku W.M., Chakravarthy U., Gale R., Gavin M., Ghanchi F., Gibson J., Harding S., Johnston R.L., Kelly S.P., Lotery A., Mahmood S., Menon G., Sivaprasad S., Talks J., Tufail A., Yang Y., *Eye (Lond)*, 29, (2015)
- 7) Pozarowska D., Pozarowski P., *Cent. Eur. J. Immunol.*, 41, (2016)
- 8) Libutti S.K., Paciotti G.F., Byrnes A.A., Alexander H.R., Jr., Gannon W.E., Walker M., Seidel G.D., Yuldasheva N., Tamarkin L., *Clin. Cancer Res.*, 16, 6139 (2010)
- 9) Turecek P.L., Bossard M.J., Schoetens F., Ivens I.A., *J. Pharm. Sci.*, 105, 460 (2016)
- 10) Bakri S.J., Snyder M.R., Reid J.M., Pulido J.S., Ezzat M.K., Singh R.J., *Ophthalmology*, 114, 2179 (2007)
- 11) Tanetsugu Y., Tagami T., Terukina T., Ogawa T., Ohta M., Ozeki T., *Biol. Pharm. Bull.*, 40(2), 1 (2016)
- 12) Mielke J., Jilma B., Koenig F., Jones B., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 82, 1444 (2016)
- 13) Alten R., Cronstein B.N., *Semin. Arthritis Rheum.*, 44, S2 (2015)
- 14) Zhang G., Yang Z., Lu W., Zhang R., Huang Q., Tian M., Li L., Liang D., Li C., *Biomaterials*, 30, 1928 (2009)
- 15) Lee H., Lee M.Y., Bhang S.H., Kim B.S., Kim Y.S., Ju J.H., Kim K.S., Hahn S.K., *ACS Nano*, 8, 4790 (2014)
- 16) Mukherjee P., Bhattacharya R., Wang P., Wang L., Basu S., Nagy J.A., Atala A., Mukhopadhyay D., Soker S., *Clin. Cancer Res.*, 11, 3530 (2005)
- 17) Pan Y., Wu Q., Qin L., Cai J., Du B., *Biomed. Res. Int.*, 2014, (2014)

4. Curcumin 包接シクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製と *in vitro* におけるがん細胞に対する殺細胞効果の評価

4.1 本章における背景と目的

医薬品候補化合物の約 40%は難水溶性薬物であり、医薬品開発の際にしばしば問題となる。Curcumin もその一つである。Curcumin はウコン(*Curcuma longa*) から抽出される天然の化合物であり、ターメリックとして食品としても一般に用いられる。薬学領域において Curcumin は様々な種類の癌に抗腫瘍活性効果を有することが報告されており¹⁾、の抗腫瘍活性効果は核内因子 κ B, 分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ, p53 などのシグナル伝達の関与が言われている²⁾。しかしながら、バイオアベイラビリティが低く³⁾、さらに生理的条件下における溶解性に乏しく、Curcumin の血中濃度が有効治療濃度まで到達できず⁵⁾、治療効果が得られないという問題が生じている。これまで、これらの問題を解決するために多くの Curcumin を搭載させたナノ粒子の報告がされており¹⁾、いずれの製剤においても高い治療効果を示している。当研究室の別グループの以前の研究においてフェムト秒レーザーを用いて微細化した Curcumin ナノ粒子はがん細胞に対し高い殺細胞効果を示している⁶⁾。

シクロデキストリンは環状オリゴ糖とも呼ばれ、オリゴ糖が環状の構造をとっている。シクロデキストリンは内部に疎水性薬物を包接させることにより、その溶解性改善させる機能を有した物質としてこれまで研究されてきた⁷⁾。本研究ではこのシクロデキストリンを搭載した金ナノ粒子を調製し、Curcumin を包接させ、がん細胞に対し高い殺細胞効果を有するナノ粒子製剤を開発することを目的とした。本研究における粒子調製戦略として EPR 効果を利用した腫瘍組織への高い蓄積を目指す。Cabral らの報告⁸⁾によれば、30~100 nm の PEG 化ミセル製剤において 30 nm の微細な粒子が最も高い腫瘍組織への蓄積が確認されている。そこで、微細な粒子径への調製・制御が容易である金ナノ粒子を適応した。本研究の金ナノ粒子へのシクロデキストリンの搭載方法として、11-mercaptoundecanoic acid を介してカップリング反応を利用して、amino 基を有するシクロデキストリンを結合させた。本研究では Curcumin を包接させたシクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子を調製し (Scheme 4-1), *in vitro* 実験系における殺細胞効果を評価した。



Scheme 4-1 Curcumin 包接シクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子の模式図

4.2 試料及び実験方法

4.2.1 試料

粒子の核となる金ナノ粒子は第2章における NaBH_4 還元 (調製時 6.30×10^{-5} mol) のものを使用した. Curcumin, Coumarin-6, 11-mercaptoundecanoic acid (MUA), O-(2mercaptoethyl)-O'-methylpolyethylene glycol (PEG-SH) (MW: 10 kDa) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した.

3A-Amino-3A-deoxy-(-2AS,3AS)-n-cyclodextrin Hydrate (amino-n-CD), ($n=\alpha, \beta, \gamma$), N-Hydroxysuccinimide (NHS) は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, hydrochloride (EDC) は株式会社 同仁化学研究所 (Kumamoto, Japan) から購入した. 試薬はすべて試薬グレードのものを使用した.

4.2.2 CD 搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製

第2章で調製した NaBH_4 還元金ナノ粒子分散液 6 mL に対し, 10 mM PEG-SH 水溶液を 21.1 μL 添加し, 1 h 攪拌条件下で反応させた. その後, Amicon[®] Ultra (100 kDa, Millipore, Billerica, MA, USA) を用いて未反応の PEG-SH を除去し, PEG 化金ナノ粒子分散液 (PEG-GNPs) を 4 mL に濃縮・精製した. PEG-GNPs に 10 $\mu\text{mol/mL}$ の 0.1M NaOH に溶解した MUA を 63.3 μL 添加し, 再度攪拌条件下で 1 h 反応させた, その後, Amicon[®] Ultra を用いて未反応の MUA を除去し, MUA 結合 PEG 化金ナノ粒子分散液 (MUA/PEG-GNPs) を 4.5 mL の 0.1M MES buffer (pH 4.6) に再分散させた. この MUA/PEG-GNPs 分散液 1.5 mL に 2 mg/mL の amino-n-CD ($n=\alpha, \beta, \gamma$) を 0.5 mL と EDC と NHS 溶液を加え, 一晩反応させた. Amicon[®] Ultra を用いて未反応の amino-n-CD を除去し, 全量 1 mL に調製した CD 搭載 PEG 化金ナノ粒子 (n-CD-GNPs) を得た.

4.2.3 Curcumin 包接 CD 搭載 PEG 化金ナノ粒子の調製

CD 搭載金ナノ粒子への Curcumin の包接は Heo らの方法を参考に調製した⁹⁾.

4.2.2 で調製した n-CD-GNPs 200 μL を 1 mL にメスアップした溶液に Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解した 2.5 mM curcumin 溶液を 20 μL 加え, ボルテックスミキサーを用いて混合させた. その後, 超音波照射器を用いて 10 min ソニケーションした. その後, 溶液中の DMSO を除去するため, Amicon[®] Ultra を用いて限外ろ過を行い, 水中に再分散させた. 析出した curcumin を除去するため 0.2 μm のフィルターを用いてろ過し, Curcumin 包接 CD 搭載 PEG 化金ナノ粒子 (cur-n-CD-GNPs, $n=\alpha, \beta, \gamma$) を精製した.

細胞内取り込み評価のための Coumarin-6 包接 CD-GNPs についても同様の方法で調製した.

4.2.4 粒子物性評価

調製した粒子の粒子は動的光散乱法により、Malvern Zetasizer Nano-S instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) を用いて測定した。Curcumin 濃度は UV-visible spectroscopy (UV1800, Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて 425 nm の吸光度を測定することで定量した¹⁰⁾。Z-potential は Malvern Zetasizer Nano-ZS instrument (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK) を用いて測定した。

4.2.5 TEM による粒子の観察

調製した粒子分散液をカーボンコート Cu グリッド上に適量加えた後に、室温で乾燥させた。その後 2% 酢酸ウラン溶液で試料を染色させたものをサンプルとし、JEOL JEM-1400 plus (JEOL Ltd., Japan) を用いて電圧条件として 100 kV にて粒子を観察した。

4.2.6 細胞培養

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 は ATCC (Manassas, VA, USA) より入手した。A549 は 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5% トリプシン/ストレプトマイシン含有 DMEM 培地 (Wako chemical Co. Ltd., Osaka, Japan) を用いて 37°C, 5% CO₂ 条件で培養した。

4.2.7 殺細胞効果の検討

96 ウェルプレートに 5,000 cells/well となるように細胞懸濁液を加え、24 h, 37°C, 5%CO₂ でインキュベートした。培養後、培地を取り除きサンプル溶液を加え更に同条件で 24 h インキュベートした。インキュベート後、3 回 PBS で洗浄した後、Cell Counting Kit (CCK-8; Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて生細胞数を評価した。

4.2.8 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内取り込みの観察

35 mm ガラスベースディッシュに細胞を 100,000 cells/dish となるように加え、24 h, 37°C, 5%CO₂ でインキュベートした。培養後、培地を取り除きサンプル溶液を加え更に同条件で 4 h インキュベートした。インキュベート後、3 回 PBS で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで 30 min, 室温でインキュベートし、細胞を固定した。その後共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510 META, Carl Zeiss Industrielle Messtechnik GmbH, Oberkochen, Germany) を用いて細胞内蛍光を観察した。撮影した画像は LSM 5 Image Examiner を用いて編集を行った。

4.2.9 有意差検定

GraphPad Prism software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いて One-way ANOVA による有意差検定を Bonferroni's multiple comparison test (Fig. 4-3) により行った.

4.3 結果及び考察

4.3.1 粒子物性の評価

DLS を用いて粒子径を測定した結果 (Table 4-1, Table 4-2), PEG 化由来の粒子径の増大がみられ, PEG-GNPs, MUA/PEG-GNPs, n-CD-GNPs の粒子径は約 30 nm であった. MUA 結合反応後の Zeta potential を測定した結果 (Fig.4-1) MUA の結合により Zeta potential の若干の減少がみられた. これは MUA 由来の carbonyl 基によるものであることが推察され, CD の結合により PEG-GNPs と同様の Zeta potential が確認されたことから, CD の結合が示唆された. また, PEG の結合により MUA が被覆され, MUA 由来の Zeta potential の減少が小さくなったことが推察される.

いずれの cur-n-CD-GNPs において Z-Average size は約 150 nm であったが, TEM による観察 (Fig. 4-2) からは粗大な粒子や粒子の凝集は観察されなかった. さらに 3 章同様にネガティブ染色により粒子周囲にコントラストに変化による白い領域が確認され, 粒子への種々物質の結合の可能性が示唆された. また, Z-Average size が TEM と相関しない理由として, 微量の粒子の凝集や CD の包接から外れた Curcumin が析出したもの, もしくは Curcumin の包接により, PEG 立体構造が変化した可能性があると考えられている. α -CD, β -CD 及び γ -CD を用いた場合の cur-n-CD-GNPs の Curcumin の封入率を定量した結果, それぞれ 13.8%, 11.6%, 8.8% であった.

Table 4-1. Particle size and polydispersity index (PDI) of GNPs, PEG-GNPs, MUA/PEG-GNPs, α -CD-GNPs, β -CD-GNPs and γ -CD-GNPs.

Data are shown as the mean \pm SD (n=3)

Formulation	Particle size (nm)	PDI
GNPs	5.3 \pm 0.9	0.39 \pm 0.20
PEG-GNPs	34.5 \pm 0.4	0.24 \pm 0.02
MUA/PEG-GNPs	31.3 \pm 1.1	0.42 \pm 0.07
α-CD-GNPs	26.5 \pm 4.0	0.36 \pm 0.17
β-CD-GNPs	26.3 \pm 0.3	0.45 \pm 0.10
γ-CD-GNPs	29.2 \pm 2.2	0.34 \pm 0.10

Table 4-2. Z-Average size of cur-n-GNPs (n= α , β , γ), (n=3)

	Z-Average size (nm)
cur- α -CD-GNPs	180.7 \pm 3.9
cur- β -CD-GNPs	148.4 \pm 2.8
cur- γ -CD-GNPs	108.7 \pm 3.0

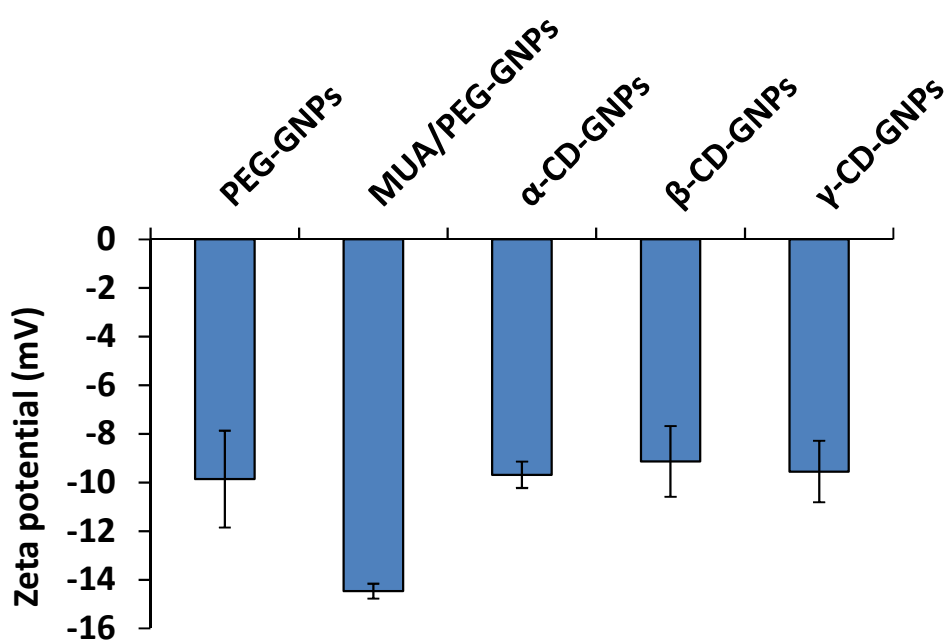


Fig. 4-1 Zeta potential of PEG-GNPs, MUA/PEG-GNPs and n-CD-GNPs (n= α , β , γ)

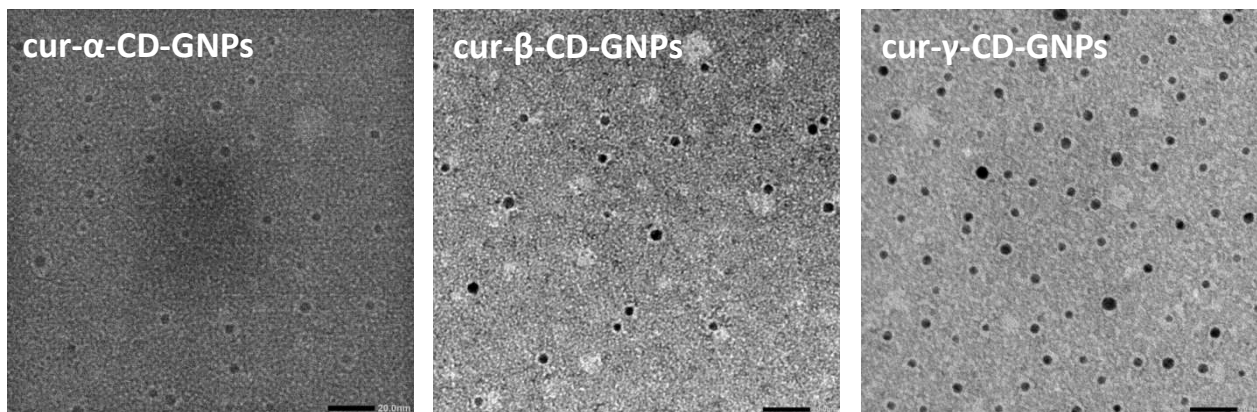


Fig. 4-2 Negativity stained TEM images of cur-n-CD-GNPs (n= α , β , γ).
Scale bars, 20 nm.

4.3.2 *in vitro* におけるがん細胞に対する cur-CD-GNPs の殺細胞効果の検討

A549 細胞を用いて cur-CD-GNPs の殺細胞効果を検討した (Fig.4-3). 本実験で調製した cur-CD-GNPs はいずれのものでも A549 細胞に対し, 高い殺細胞効果を有することが明らかとなり, DMSO と培地に溶解させた Curcumin 溶液の殺細胞効果に近づくものであった. これらの結果は本製剤化することによって, Curcumin 由来の殺細胞効果を高めることが可能であることを示している.

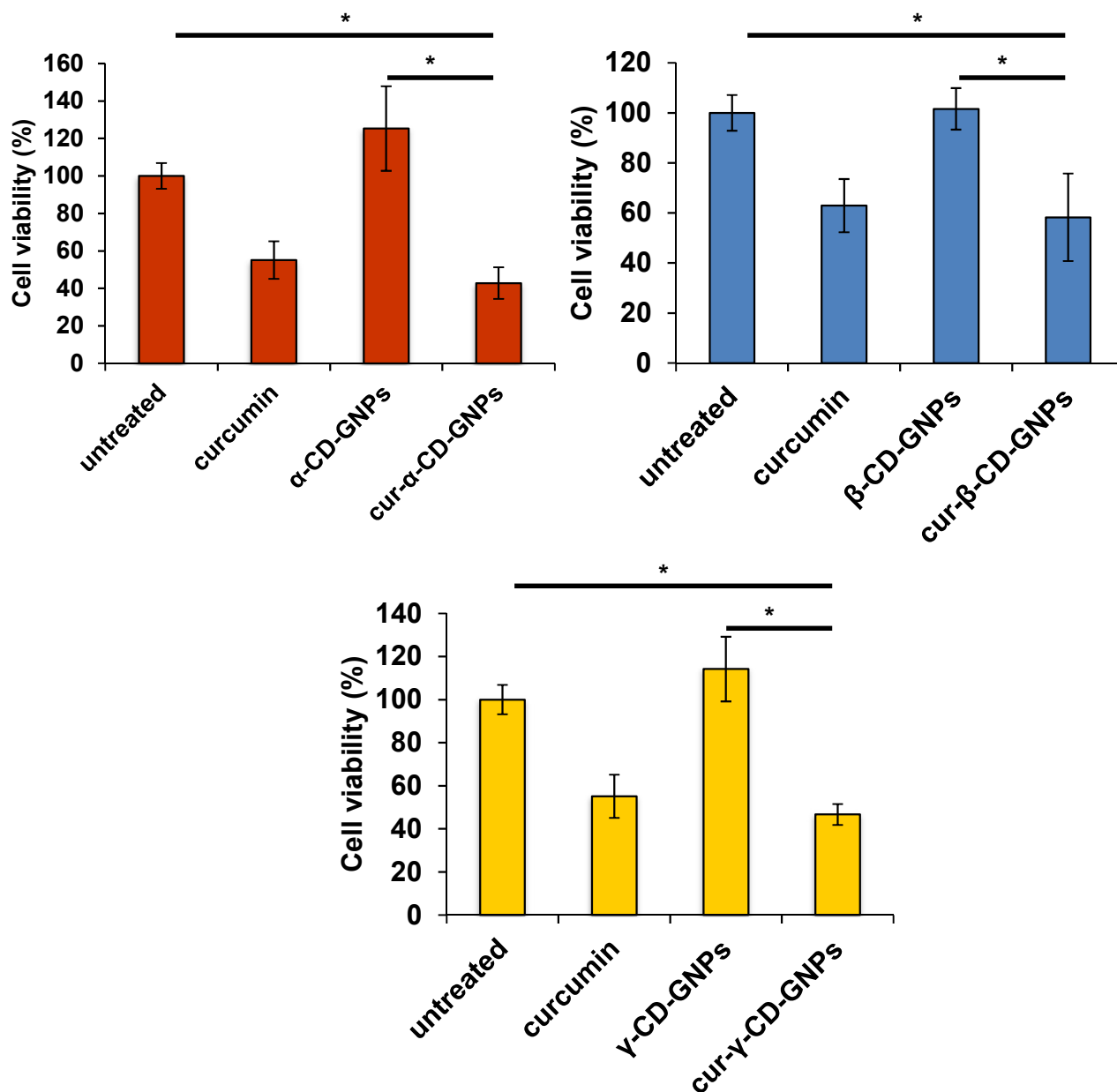


Fig.4-3 Cytotoxic effect of curcumin

Curcumin concentration is 50 μ M

*, $p < 0.05$, statistically significant.

4.3.3 共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞内取り込みの観察

Curcumin は蛍光物質としても知られているが、その蛍光は弱く細胞内取り込みなどを評価するのは困難である。そこで本実験においては Zhang¹⁰⁾らの方法を基に、モデル薬物として Coumarin-6 を包接した CD-GNPs を同サイズで調製し、A549 細胞に対する CD-GNPs の細胞内取り込みの様子を観察した (Fig.4-4)。観察の様子からは DMSO と培地に溶解させた Coumarin-6 が最も高い蛍光を示した。また、いずれの CD-GNPs においても投与後 4 h における蛍光が確認できたことから細胞内取り込みの関与が示唆された。

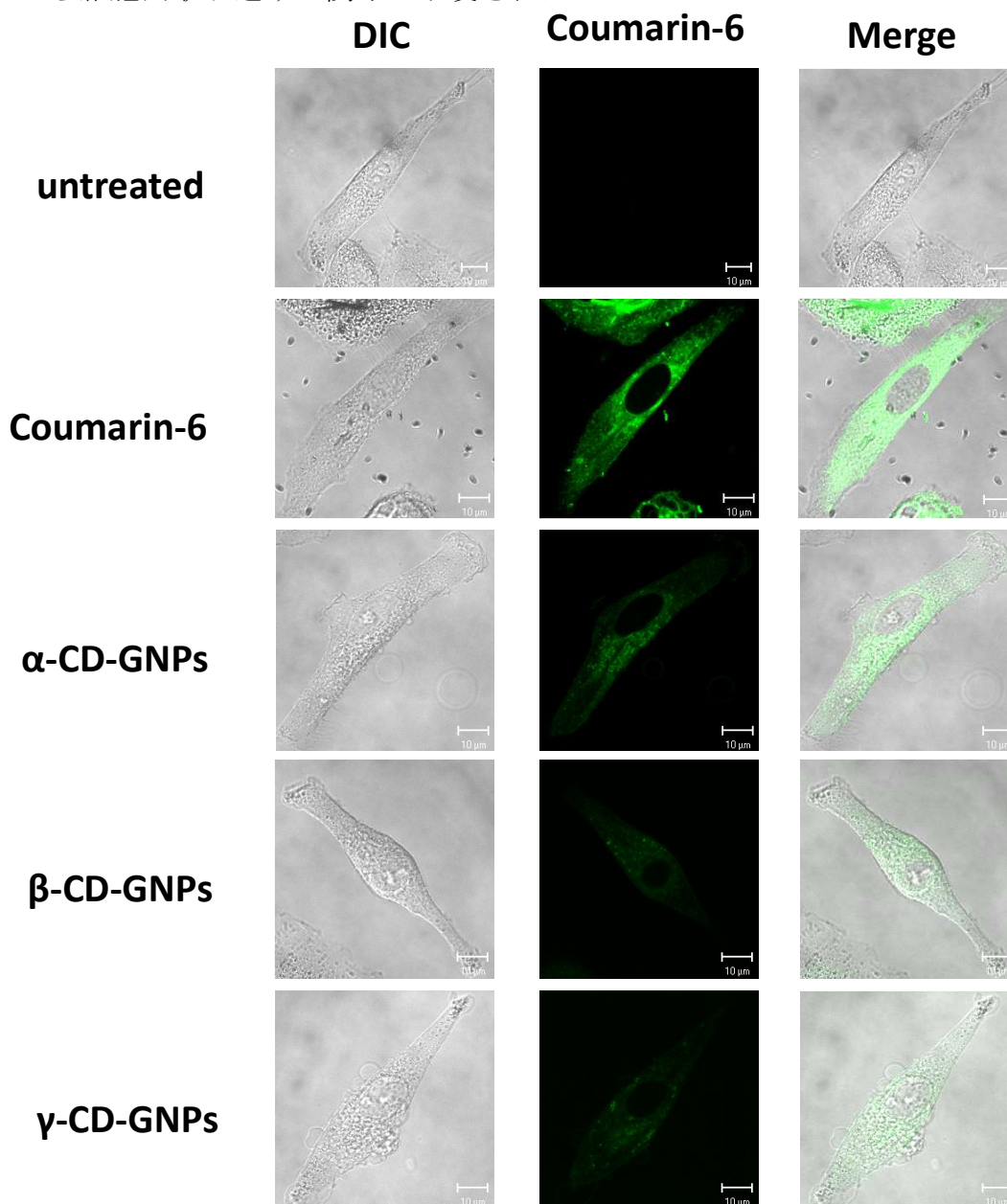


Fig.4-4 Confocal microscopy images showing cellular uptake of CD-GNPs
Scale bar is shown as 10 μ m. Coumarin-6 concentration was set as 20 μ M.

4.4 小括

本実験で調製した Curcumin 包接シクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子は水溶液中に分子レベルで Curcumin を分散・保持する能力を発揮できることが示唆された。これにより、難水溶性である Curcumin を癌細胞に効率よく投与出来、*in vitro* における評価系で A549 細胞に対し、殺細胞効果を有することが明らかとなった。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察で取り込まれている様子も確認することが出来た。さらに、本製剤はナノサイズであり、PEG 鎖を有していることから EPR 効果による効率的な腫瘍組織への集積も期待できる。

以上のことから本実験で開発した Cur-CD-GNPs 製剤はがん細胞に対するキャリアとして有用である可能性が示唆された。

4.5 引用文献

- 1) Murali M. Yallapu, Meena Jaggi, Subhash C. Chauhan *Drug Discovery Today*, 17, 71, (2012)
- 2) Hatcher H., Planalp R., Cho J., Torti F. M., Torti S. V. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65, 1631 (2008)
- 3) Goel A., Kunnumakkara A. B., Aggarwal, B. B. *Biochem. Pharmacol*, 75, 787 (2008)
- 4) Aggarwal B.B., Sundaram C., Malani N., and Ichikawa, H. *Adv. Exp. Med. Biol.* 595, 1 (2007)
- 5) Lao C. D., Ruffin M. T., Normolle D., Heath, D. D., Murray, S. I., Bailey, J. M., Boggs, M. E., Crowell, J., Rock, C. L., Brenner, D. E. *BMC complement. Altern. Med.*, 6, 10 (2006)
- 6) Tagami T., Imao Y., Ito S., Nakada A., Ozeki T., *Int. J. Pharm.*, 468, 91 (2014)
- 7) Marta R. A., Sylvie G., Davy G, Marion P, Damien J, Elisabeth R. M., Jean L.V., Robert G., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 95, 203(2015)
- 8) H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno, Q. Chen, M. Murakami, M. Kimura, Y. Terada, M. R. Kano, K. Miyazono, M. Uesaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, *nature nanotechnology*, 166,1 (2011)
- 9) Heo D. N., Ko W. K. Moon, H. J. Kim, H. J. Lee, S. J. Lee, J. B. Lee, M. S. Bae, J. K. Yi, Y. S. Hwang, J. B. Bang, E. C. Kim, S. H. Do, I. K. Kwon, *ACS Nano*, 8 (12), 12049 (2014)
- 10) Zhang L., Zhu W., Yang C., Guo H., Yu A., Ji J., Gao Y., Sun M., Zhang G., *Int. J. Nanomedicine* 7, 151 (2012)
- 11) Setua S., Ouberai M., Piccirillo S. G., Watts C., Welland M., *Nanoscale*, 6(18), 10865, (2014)

5. 結語

塩化金酸水溶液を様々な還元剤で還元させることで金ナノ粒子径を変化させることができた。さらに、還元剤の添加量 (濃度) を変化させ、還元速度を調節することで微細な粒子径範囲における粒子径の制御が可能であることが示唆された。特に、 NaBH_4 還元金ナノ粒子は約 5 nm に均一に調製可能であることが確認でき、ナノ粒子 DDS キャリアの核粒子として有用な可能性が示唆された。

金ナノ粒子を用いた応用研究に関して、Mab を搭載した PEG 化金ナノ粒子の調製に成功した。Mab の金ナノ粒子への結合量は PEG 化ナノ粒子調製時の PEG 添加量に依存し、PEG 化を調整することにより MPG の最適化をすることに成功した。また、PEG の分子量を変化させることで MPG の粒子径が変化可能であることも確認された。MPG は *in vitro* において高い血管形成阻害効果及び、細胞増殖抑制効果を示し、高い VEGF-A 阻害効果が示唆された。このことから本製剤は Ranibizumab 適応疾患である加齢黄斑変性症のみならず、VEGF-A 関連疾患に対しても期待できる製剤であることが示唆された。

また、Curcumin 包接しシクロデキストリン搭載 PEG 化金ナノ粒子を調製した。調製した粒子を用いることによって水中に難水溶性である Curcumin を高濃度に存在させることに成功した。本粒子を用いることで A549 細胞に対し、Curcumin 由来の高い殺細胞効果を示し、本粒子の細胞内移行も確認された。この結果から本粒子はがんに対する新規キャリアとして有用な可能性が示唆された。

以上より、金ナノ粒子は DDS キャリアを目指したドラッグプラットフォームとして有用である可能性が示唆され、今後の医療の発展に寄与するナノ粒子として期待できる。

6. 謝辞

本研究を遂行するにあたり，終始暖かい激励とご指導，ご鞭撻を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科 尾関 哲也 教授に心より感謝申し上げます。

また，研究生生活を常にサポートして下さり，親身なご指導を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科 田上 辰秋 講師に深謝致します。

本研究において実験サポートやご指示を賜りました，福重 香 特任助教に感謝いたします。

学位論文審査において，貴重なご指導とご助言を頂きました名古屋市立大学大学院薬学研究科 山中 淳平 教授，中川 秀彦 教授，田中 正彦 准教授に深く感謝致します。

本研究における TEM 撮影に関しまして，ご助力頂きました名古屋市立大学大学院 医学研究科 高瀬 博嗣 様に感謝致します。

更に，本研究におけるゼータ電位測定に関しましてご協力頂きました愛知学院大学 薬学部 製剤学講座 山本 浩充 教授，川島 嘉明 特任教授，小川 法子 講師，高橋 知里 助教に深く感謝申し上げます。

第 3 章の研究にあたり Ranibizumab バイオシミラーをご提供頂きました Meiji Seika ファルマ 株式会社に厚く御礼申し上げます。

共同実験者である 柳樂 美月さん，太根 将史くん，森村 知紗さんをはじめとする名古屋市立大学大学院薬学研究科 薬物送達学分野のメンバーには常に刺激的な議論を頂き，精神的にも支えられました。本当に，ありがとうございました。

本研究を遂行するにあたり共に励まし合い，時には有意義な議論を行ってきた学友である，名古屋市立大学大学院薬学研究科 生体超分子システム解析学分野の横川 慧くんに心からの感謝を申し上げます。

最後に，本研究に取り組むにあたり，嫌な顔一つしないで精神的にも経済的にも私を支え，応援し続けてくれた，亡き父をはじめとする家族に心から感謝申し上げます。