

ナノテクノロジー

大庭 誠¹ 片岡 一則^{2,3}

要 旨：広範な分野の基盤となる科学技術であるナノテクノロジーは、21世紀の根幹をなす技術として盛んに研究が行われ日々進化し続けている。このナノテクノロジーの実力が遺憾なく発揮されている分野の一つが医療分野である。ナノテクノロジーを駆使してナノスケールでデザイン・開発された医療用ナノデバイスは、21世紀の医療において強力なツールになりうると期待されている。(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 727-733)

Key words: nanotechnology, block copolymer, polymeric micelle, drug carrier

はじめに

ライフサイエンス、情報通信、環境、ナノテクノロジー・材料の4分野は、わが国の科学技術基本計画の中で重点分野に指定され、その研究は国を挙げて推進されている。特にナノテクノロジーは、広範な分野にわたる融合的かつ総合的な基盤となる科学技術であり、わが国の研究は欧米と比べても遜色ない水準に達している。物質をナノ(10億分の1)メートルのオーダーで操作・制御が可能なナノテクノロジーは、古くからバイオ・医療への応用に期待が寄せられてきた。実際に医療応用としては、薬物送達システム(drug delivery system: DDS)用キャリア創製において中心的な役割を担っており、いくつかのDDS製剤はすでに実用化されている。

本稿では、ナノテクノロジーを駆使してデザイン・開発された高分子材料の医療応用について、著者らの研究と併せて紹介する。

ナノテクノロジーと高分子

ナノテクノロジーは、ナノスケールで原子・分子の配列を操作・制御することにより、新しい性質および

新しい機能を発現する材料・デバイスを創製する科学技術である。ナノテクノロジーを駆使したデザインを行ううえで、参考とすべき手本は生体内に存在している。生体内の遺伝情報を司るDNAや、生体構造の形成および酵素・抗体などの機能を担うタンパク質は、それぞれ、4種類の核酸分子、20種類のアミノ酸の配列によって多様な情報および機能が決定される高分子化合物である。このようなDNAおよびタンパク質は、基本となる骨格構造が同じでありながら、塩基もしくは側鎖構造の違いによりその機能は多様化しており、ナノスケールでの高度な分子配列の制御が達成されている。

Fig. 1は、生体内の各種成分とナノテクノロジーにより開発されたデバイスの、数例の大きさについて示している。10 μ m前後の細胞を標的としたDDSのような医療用デバイスにとって、細胞へ到達するまでの過程において、また細胞内での分布を制御するうえでも、ナノスケールでのデザイン・開発が重要であることがうかがい知れる。人工的な合成高分子は、DNAやタンパク質などの天然の生体高分子のような単一でかつ規則正しい配列を持たせることは非常に困難であったが、昨今の著しい研究の進展により、分子量分布が狭く重合度が制御された高分子化合物の合成が可能になってきた。またナノテクノロジーの進歩により、高分子化合物へさまざまな機能を付与させる修飾法の開発や新しい機能を有する高分子の開発が達成され、天然の高

2006年8月8日受理

¹東京大学医学部附属病院血管再生医療講座

²東京大学工学系研究科マテリアル工学専攻

³東京大学工学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医学部門

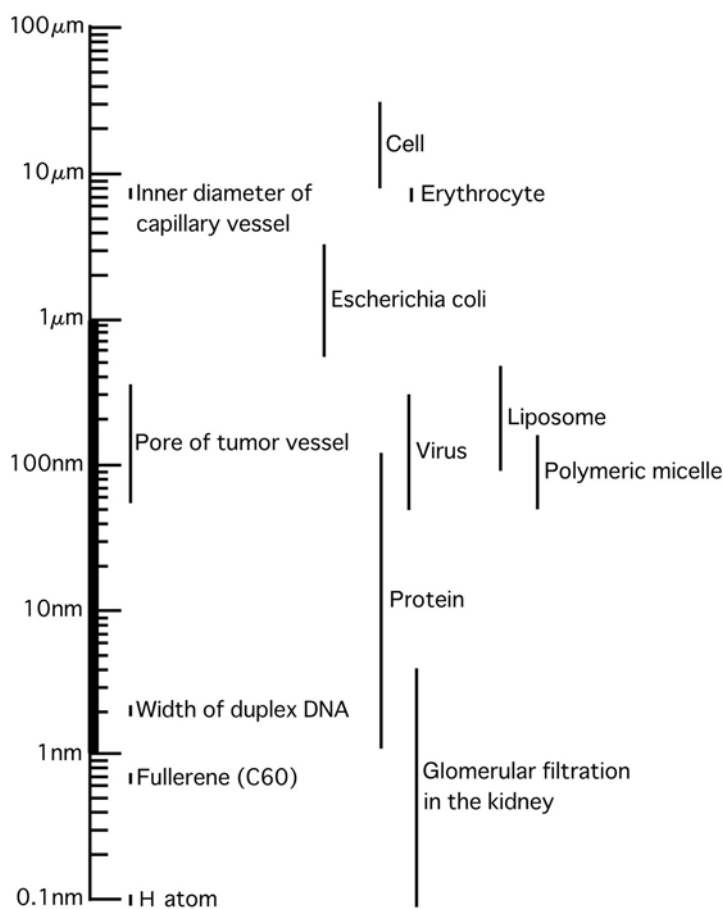


Figure 1 Scale of natural and synthetic components.

分子にはない新しい機能もしくは天然高分子の機能を
 超える合成高分子の開発も達成されつつある。

高分子ミセル

ポリエチレングリコール(polyethylene glycol: PEG)の
 ような親水性セグメントと疎水性セグメントから構成
 されるブロック共重合体は、水中で疎水性相互作用を
 駆動力に自発的な会合体、高分子ミセルを形成する
 (Fig. 2)¹⁾。この高分子ミセルは、数十nmのサイズの粒
 子であり、疎水性の内核の周りを親水性セグメントが
 覆った明確な二層構造をとっている。内核には疎水性
 の薬物を内包することが可能であり、また生体適合性
 のPEGで覆われた外殻はミセルの水に対する溶解性を
 高めるとともに、血中などの生理的条件下では血清タ
 ンパクや細胞表面との非特異的な相互作用を抑制す

る。このようにナノスケールでデザインされた高分子ミ
 セルは、薬物を運ぶキャリアとして注目されている²⁾。
 薬物キャリアに求められる資質として重要なのは、標
 的となる組織もしくは病変部位に効率よく薬物を送り
 届けられるということである。キャリアが標的部位に
 到達するためには血中を長期間滞留する必要があり、
 腎糸球体からのろ過と肝臓に代表される細網内皮系に
 よる処理を回避する必要があるが、高分子ミセルは数
 十nmの大きさに制御された粒子であり、また外殻が生
 体適合性のPEGで覆われていることから、これら諸問
 題を回避することが可能である。さらに癌組織は正常
 組織と比べ著しい透過性の昂進が認められ、かつ組織
 から高分子物質を選び出すリンパ系が未発達であり
 (enhanced permeability and retention effect: EPR効果)³⁾、
 数十nmの大きさの高分子ミセルは選択的に集積しやす

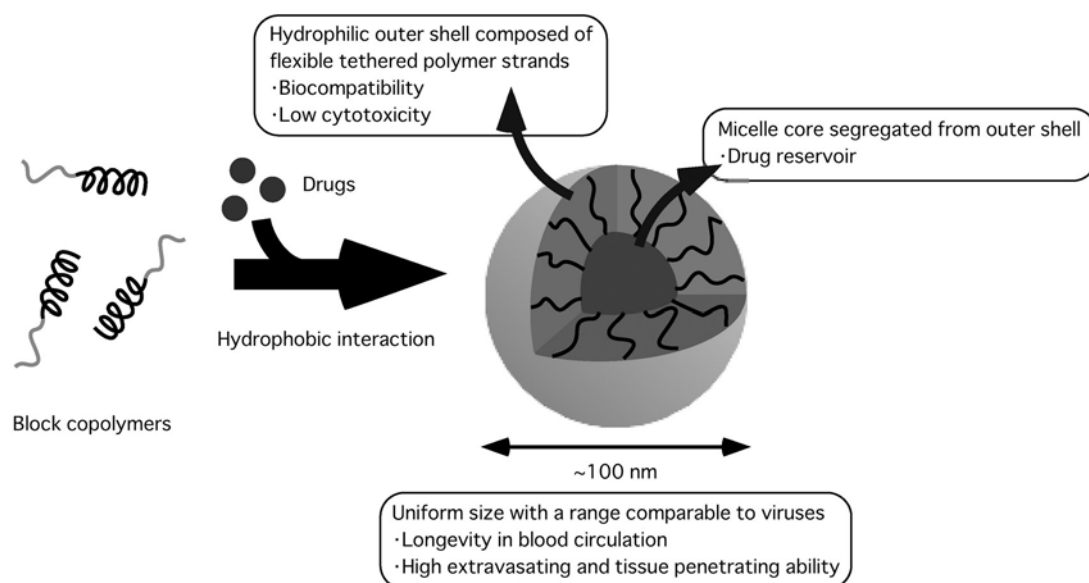


Figure 2 Formation of polymeric micelle.

く、制癌剤のデリバリーに適したキャリアである。このように薬物キャリアとして期待される高分子ミセルは合成高分子であるブロック共重合体により構成されており、ナノテクノロジー技術を駆使した修飾が容易なことから、その用途は多岐にわたっている。

制癌剤をデリバリーする高分子ミセル

前述のように高分子ミセルの内核には疎水性の薬物を内包することが可能である。実際に疎水性の制癌剤であるアドリアマイシンおよびパクリタキセルを内包した高分子ミセル製剤(NK911⁴⁾およびNK105⁵⁾が開発され、現在、国立がんセンター中央病院で第二相および第一相臨床試験が行われている。アドリアマイシンを血中に単独投与した場合、薬物が早々に血中から正常組織にも到達してしまい、投与直後でも血中には数%しか残らず強い副作用を発揮してしまう。これに対して高分子ミセル製剤として投与した場合、血中滞留性が著しく上昇し、癌に集積する薬物の濃度も単独投与と比べ10~20倍高くなっている。また分子量2~3万以下に設計された高分子の集合体からなる高分子ミセルは、薬物放出後は糸球体より排泄されるため体内への長期蓄積による副作用は回避される。さらに、このアドリアマイシン内包高分子ミセル製剤は、ラットを

用いた動物実験によりバルーン障害を受けた動脈壁に選択的に集積し、毒性を示すことなく有意に内膜肥厚を抑制することが見出された⁶⁾。これは癌組織と同様、炎症部位でも血管壁の透過性が昂進していることに起因しており、血管疾患への治療においても高分子ミセルが有用であることが示されている。

高分子ミセル形成の駆動力は疎水性相互作用のみならず金属錯体形成でも可能であり、金属錯体型の制癌剤であるシスプラチンを内包した高分子ミセル製剤(NC-6004)の開発も行われている^{7,8)}。シスプラチンは腎毒性や嘔吐などの重篤な副作用を有しているが、高分子ミセル製剤とすることで副作用が軽減され、抗腫瘍活性が増強されることが確認されている。実際にこのシスプラチン内包高分子ミセル製剤は、現在イギリスで第一相臨床試験が実施されている。

遺伝子をデリバリーする高分子ミセル

ヒトゲノムの全塩基配列の解読が完了し、疾患と遺伝情報の関係が明らかにされつつある現在、核酸医薬を用いた遺伝子治療が最先端医療として脚光を浴びている。しかしながら、DNAやRNAを直接体内に投与した場合、血中に存在する核酸分解酵素により速やかに分解されてしまうため標的部位に到達するのは困難で

ある。またDNAを用いた遺伝子治療ではDNAを核内まで輸送する必要がある、標的部位に到達するのみならず細胞内に取り込まれてからの細胞内動態の制御も重要となってくる。このような遺伝子キャリアとして、アデノウイルスやレトロウイルスに代表されるようなウイルス性の遺伝子キャリアがこれまで中心的な役割を演じてきた。ウイルス性のキャリアは遺伝子導入効率が高く臨床試験も多数行われてきたが、相次ぐ事故により抗原性や発癌性など安全面に関する問題が指摘されている。このような背景のもと、高機能でかつ安全性を具備した非ウイルス性の遺伝子キャリアの創製への期待が高まっている。

前述の高分子ミセルは反対電荷を持った高分子同士の間で静電相互作用からも形成され、その会合体はポリイオンコンプレックス (polyion complex: PIC) ミセルと呼ばれる⁹⁾。ポリアニオンであるDNAやRNAは、親水性セグメントとカチオン性セグメントから構成されるブロック共重合体と水中で混合することでDNAもしくはRNAを内包したPICミセルを形成する。実際に親水性セグメントとしてPEG、カチオン性セグメントとしてポリリシンからなるブロック共重合体とプラスミドDNA (pDNA) を混ぜ合わせると、外殻がPEGで覆われた100nm前後の大きさの粒子が自発的に形成される¹⁰⁾。このPICミセルは培養細胞系において良好な遺伝子導入効率を達成している。市販の遺伝子導入試薬であるカチオン性脂質やカチオン性高分子とpDNAとのコンプレックスでは、その表面電位が大きくプラスに転じてしまうため、マイナスのチャージを帯びている細胞表面と非特異的な相互作用を引き起こしてしまい細胞毒性を惹起してしまうが、外殻がPEGで覆われ表面電位を中性に保つことのできるPICミセルではそのような毒性は抑制される。またpDNAを血中に単独で投与した場合、5分後にそのほとんどが血中から消失してしまうのに対して、PICミセルとして投与すると、3時間後でも本来の状態を保ったまま滞留できることが確認されている¹¹⁾。このようにPICミセルは、遺伝子をデリバリーするキャリアとしての可能性も示唆されている。

進化する高分子ミセル

高分子ミセルの材料となるブロック共重合体は合成高分子であり容易に修飾が可能である。標的となる組織・疾患の違いや、内包する薬物の違いにより、高

分子ミセルの最適なデザインは異なり、付与すべき機能も異なってくる。これまで紹介してきた高分子ミセルがそれぞれの相互作用を駆動力に薬物を内包しただけの第一世代の高分子ミセルとするなら、最近、より洗練された理想的なデザインに基づく第二世代の高分子ミセルがナノテク技術を駆使して達成されつつある。

ナノスケールで制御された高分子ミセルは、血管透過性が昂進した癌組織や炎症部位に受動的に集積することが確認されているが、正常な組織に薬物をデリバリーする場合、また標的への輸送効率を上げて副作用を軽減させるためには、能動的な標的機能が必須となってくる。そこで考案されたのが、標的となる組織・疾患を特異的に認識できるパイロット分子の高分子ミセル表層への付与である。実際にパイロット分子として、癌細胞で過剰に発現している葉酸レセプターを特異的に認識する葉酸分子を表層に有するアドリマイシン内包高分子ミセルが報告されている¹²⁾。パイロット分子を装着することによって、癌細胞への取り込み効率が上昇し、制癌作用も著しく上昇している。また遺伝子をデリバリーする高分子ミセルとして、肝細胞で過剰に発現しているアシアロ糖タンパク受容体を選択的に認識するラクトースをパイロット分子として導入したPICミセルについても報告がある (Fig. 3A)¹³⁾。ヒト肝癌細胞に対する遺伝子導入実験において、ラクトースの導入により有意に遺伝子発現を上昇させることに成功している。

高分子ミセルに内包された薬物は標的部位に到達するまで安定に保持される一方で、作用を発現するためには適切な場所で放出される必要がある。このような安定性と薬物放出能という相反する性質を可能にするのが、高分子ミセル内核への細胞内環境応答機能の付与である。制癌剤のように非常に強い薬効を有する薬物はその副作用も甚大であり、患部への送達効率を高める設計のみならず、副作用を軽減させる設計も重要である。制癌剤をデリバリーする高分子ミセルにおいて、制癌剤とブロック共重合体を酸開裂型の結合で連結する方法が非常に有用であることが明らかになった¹⁴⁾。すなわち、pH7.4の生理的条件下では安定に薬物を保持できるが、細胞に取り込まれた後にpH5~6のエンドソーム・リソソーム内の酸性条件下に置かれると制癌剤とブロック共重合体を連結していた結合が切断され、内包されていた薬物が迅速に放出される。実際にこの設

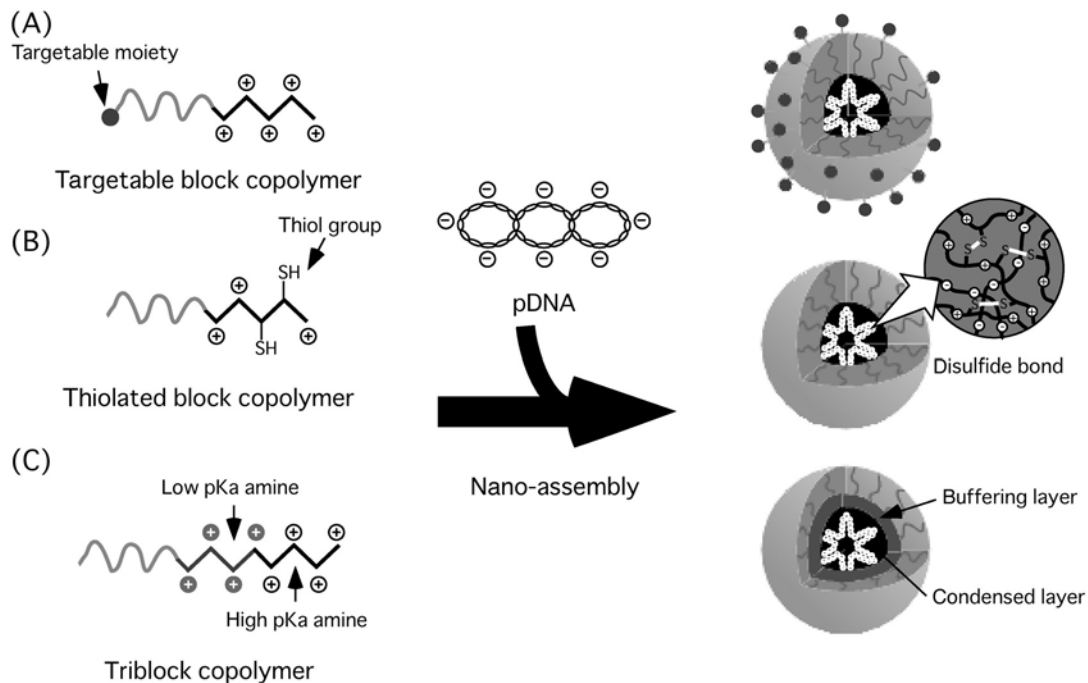


Figure 3 Functionalized polymeric micelle for gene delivery.

計指針に基づいて作製された高分子ミセルは、*in vitro* 実験のみならず*in vivo*実験においても、高い抗腫瘍活性と低い毒性を示している。

DNAやRNAなどの核酸分子をデリバリーする場合、血中に存在する酵素や血清タンパクなどから内包された核酸分子を強固に保護する一方で、細胞内に取り込まれた後に効率よく放出される必要がある。この解決策として考案されたのがミセル内核へのジスルフィド架橋の導入である (Fig. 3B)^{15, 16)}。ジスルフィド結合の特徴は、血中などの非還元環境では安定な結合であるが、細胞内の還元環境では開裂するという点である。実際にジスルフィド架橋を施したPICミセルは、非還元環境での高い安定性と還元環境での遺伝子放出挙動を示し、培養細胞系において遺伝子導入効率は上昇し、またマウスへの静脈内投与による肝臓への遺伝子導入にも成功している。このシステムは賦形剤を使わずに凍結乾燥が可能なることから、製剤化の観点から見ても優れたシステムである。

遺伝子キャリアがエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれた場合、エンドソームから細胞質への脱出が

一つの大きな障害になる。この場合遺伝子キャリアはエンドソームを経由してリソソーム内に局在してしまい、その低pH環境下で内包された遺伝子は酵素加水分解を受けてしまう。したがっていかに早い段階でエンドソームから細胞質へ移行できるかが重要になってくる。ポリエチレンイミンのような見かけのpKaが低いカチオン性高分子は、リソソーム内のpH低下を防ぐバッファーとして働いて効果的なエンドソームからの脱出が可能であり、高い遺伝子導入効率を達成している。著者らはこの知見をもとに、カチオンセグメントに遺伝子を安定に内包するための高pKaアミンと、バッファー効果を発揮するための低pKaアミンを分けて導入したトリブロック共重合体を設計した (Fig. 3C)¹⁷⁾。このトリブロック共重合体を用いた遺伝子導入実験では、高pKaのアミンのみを有するジブロック共重合体と比べ著しく遺伝子導入効率が上昇し、当初の設計指針に基づくPICミセルの効果的なエンドソーム脱出が確認された。カチオン性セグメントの最適な構造については現在も検討中であるが、低毒性でかつ高い遺伝子導入効率を達成できるカチオン構造についての知見も得られつつある¹⁸⁾。

おわりに

ブロック共重合体が形成する高分子ミセルは、天然のナノデバイスであるウイルスと類似のサイズ・構造を有しており、さまざまな薬物を運ぶ人工ウイルスとして期待されている。この高分子ミセルは、著者らのグループで世界に先駆けて独創的に開発を進めてきたものであり、わが国が誇るナノテクノロジーの一つである。本稿で紹介したようにブロック共重合体には容易に種々の機能を付与することが可能であり、ナノテク技術の進歩とともに高分子ミセルは進化し続けてきた。ナノスケールで緻密に設計され巧妙に機能を付与された高分子ミセルは、21世紀の医療において強力な武器となることが期待される。

文 献

- 1) Kataoka K, Kwon GS, Yokoyama M et al: Block copolymer micelles as vehicles for drug delivery. *J Control Release*, 1993, **24**: 119–132.
- 2) Kataoka K, Harada A, Nagasaki Y: Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **47**: 113–131.
- 3) Matsumura Y, Maeda H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*, 1986, **46**: 6387–6392.
- 4) Matsumura Y, Hamaguchi T, Ura T et al: Phase I clinical trial and pharmacokinetic evaluation of NK911, a micelle-encapsulated doxorubicin. *Br J Cancer*, 2004, **91**: 1775–1781.
- 5) Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M et al: NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formation, can extend *in vivo* antitumor activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer*, 2005, **92**: 1240–1246.
- 6) Uwatoku T, Shimokawa H, Abe K et al: Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats. *Circ Res*, 2003, **92**: e62–e69.
- 7) Nishiyama N, Okazaki S, Cabral H et al: Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res*, 2003, **63**: 8977–8983.
- 8) Uchino H, Matsumura Y, Negishi T et al: Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br J Cancer*, 2005, **93**: 678–687.
- 9) Kakizawa Y, Kataoka K: Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, **54**: 203–222.
- 10) Katayose S, Kataoka K: Water-soluble polyion complex associates of DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer. *Bioconjug Chem*, 1997, **8**: 702–707.
- 11) Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A et al: Polyion complex micelles as vectors in gene therapy—pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer. *Gene Ther*, 2002, **9**: 407–414.
- 12) Bae Y, Jang WD, Nishiyama N et al: Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Mol Biosyst*, 2005, **1**: 242–250.
- 13) Wakebayashi D, Nishiyama N, Yamasaki Y et al: Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells. *J Control Release*, 2004, **95**: 653–664.
- 14) Bae Y, Nishiyama N, Fukushima S et al: Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced *in vivo* antitumor efficacy. *Bioconjug Chem*, 2005, **16**: 122–130.
- 15) Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N et al: Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 2355–2361.
- 16) Miyata K, Kakizawa Y, Nishiyama N et al: Freeze-dried formulations for *in vivo* gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *J Control Release*, 2005, **109**: 15–23.
- 17) Fukushima S, Miyata K, Nishiyama N et al: PEGylated polyplex micelles from triblock cationic polymers with spatially ordered layering of condensed pDNA and buffering units for enhanced intracellular gene delivery. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**: 2810–2811.
- 18) Kanayama N, Fukushima S, Nishiyama N et al: A PEG-based biocompatible block cationic polymer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem*, 2006, **1**: 439–444.

Nanotechnology

Makoto Oba¹ and Kazunori Kataoka^{2,3}

¹Department of Clinical Vascular Regeneration, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

²Department of Materials Engineering, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

³Center for Disease Biology and Integrative Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

Key words: nanotechnology, block copolymer, polymeric micelle, drug carrier

Nanotechnology has attracted great attention because it creates new materials and devices on a nanometer scale by controlling the disposition of atoms and molecules. Polymeric micelles composed of synthetic polymers represent one of the nanodevices constructed through nanotechnology and can load a variety of drugs in their core. Advances in the polymeric chemistry have contributed to the development of polymeric micelles with integrated functions with sophistication. Polymeric micelles are expected to be promising nanotechnology-based drug carriers for clinical application.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 727–733)