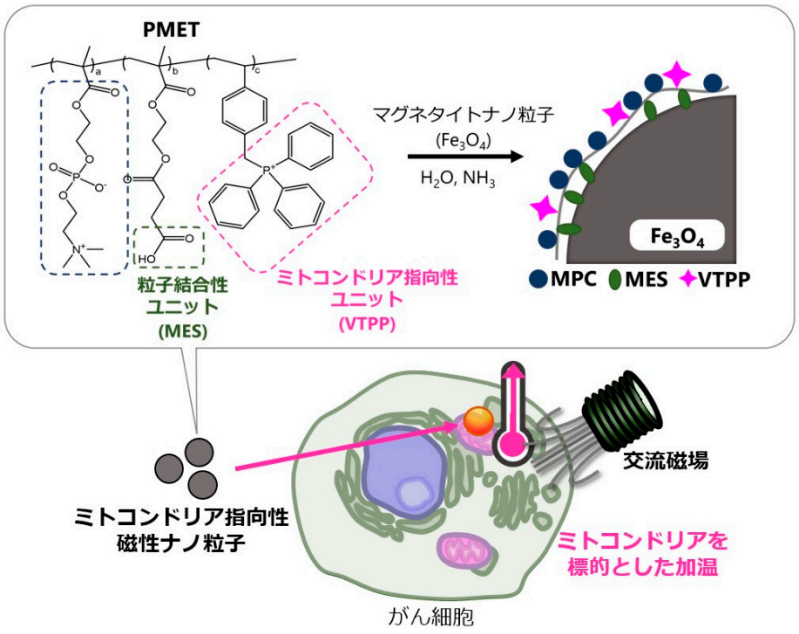
198　オルガネラ標的磁性ナノ粒子によるがん温熱治療	金子　真大

【目的】がん温熱療法は、腫瘍組織を 42.5℃以上に加熱して細胞死を誘導するがん治療法である。外部磁場や近赤外レーザーの照射により発熱するナノ粒子を利用し、ナノ粒子を腫瘍患部へ送達することで、腫瘍部位の局所的な加熱が可能である。ここで、温熱治療による治療効果を高めるには、腫瘍部位へのナノ粒子の送達量の向上、あるいは一定量のナノ粒子による殺細胞効果の向上といった方策が考えられる。本研究では、一定量のナノ粒子による殺細胞効果の向上を目指しオルガネラの一つであるミトコンドリアに注目した。ミトコンドリアは熱ストレスなどの外部刺激に対して敏感であり、刺激に応じて細胞死を誘導しうる。これを踏まえ、ナノ粒子によりミトコンドリアを局所的に加熱することで、温熱治療効果が向上するのではないかと考えた。高い親水性と細胞親和性を有する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine（MPC）ポリマーを基体とし、マグネタイト表面への結合能力を有する 2-methacryloyloxyethyl succinate（MES）ユニット、ミトコンドリア指向性を有する 4-vinylbenzyl triphenylphosphonium（VTPP）ユニットを用いて、poly(MPC-*co*-MES-*co*-VTPP)を合成した。PMET をマグネタイト表面に修飾することでミトコンドリア指向性マグネタイトを合成し、マウス結腸がん CT26 細胞に対する交流磁場照射による温熱治療効果を検討した。

【方法】MPC、MES および VTTP をモノマーとして、poly（MPC-*co*–MES）（PME）と PMET を原子移動ラジカル重合により合成した。鉄イオン水溶液とアンモニアを用いた共沈法によりマグネタイトナノ粒子を合成し、その反応液に PME または PMET を加えて撹拌することで、ポリマー被覆マグネタイトを調製した。CT26 細胞培地にポリマー被覆マグネタイトを加え 24 時間培養し、交流磁場を 15 分間照射した後、細胞生存率を評価した。

【結果】図に、合成したポリマー被覆マグネタイトナノ粒子の模式図を示す。FT-IR 測定と熱重量分析により、粒子表面に PME または PMET が存在することが確認された。CT26 細胞にポリマー被覆マグネタイトナノ粒子を添加し、24 時間培養することでマグネタイトを取り込ませた細胞に対して、交流磁場を照射した後の細胞生存率を評価した。その結果、PME を被覆したマグネタイトを添加した系に比べ、PMET を被覆したマグネタイトを添加した系において、細胞生存率がより大きく低下する傾向が認められた。この結果は、ミトコンドリア指向性を有する VTPP ユニットの利用により、温熱治療効果が向上可能であることを示している。

ミトコンドリア指向性マグネタイトを用いた温熱治療の模式図



198. オルガネラ標的磁性ナノ粒子によるがん温熱治療

金子　真大

名古屋大学 大学院工学研究科 化学システム工学専攻

Key words：がん温熱治療，マグネタイト，リン脂質ポリマー，ミトコンドリア

緒　言

がん温熱療法は、腫瘍組織を 42.5℃以上に加熱して細胞死を誘導するがん治療法である。外部磁場や近赤外レーザーの照射により発熱するナノ粒子を利用し、ナノ粒子を腫瘍患部へ送達することで、腫瘍部位の局所的な加熱が可能である。ここで、温熱治療による治療効果を高めるには、腫瘍部位へのナノ粒子の送達量の向上、あるいは一定量のナノ粒子による殺細胞効果の向上といった方策が考えられる。本研究では、一定量のナノ粒子による殺細胞効果の向上を目指し細胞の急所であるオルガネラに注目した。特に、オルガネラの一つであるミトコンドリアは熱ストレスなどの外部刺激に対して敏感であり、細胞死を誘導しうる［1〜3］。これを踏まえ、ナノ粒子によりミトコンドリアを局所的に加熱することで、温熱治療の効果が向上するのではないかと考えた。

本研究では、温熱治療のためのナノ粒子としてマグネタイトからなる磁性ナノ粒子を利用した。マグネタイトは生体に対する毒性が低く、交流磁場の照射により発熱する特性を有している。マグネタイトナノ粒子表面へ機能性ポリマーを修飾することでミトコンドリア指向性を付与し、温熱治療効果が向上するかを検討した。高い親水性と細胞親和性を有する 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine（MPC）ポリマー［4］を基体とし、マグネタイト表面への結合能力を有する 2-methacryloyloxyethyl succinate（MES）ユニット、ミトコンドリア指向性を有する triphenylphosphonium（TPP）［5］部位を有する 4-vinylbenzyl TPP（VTPP）ユニットを用いて、poly (MPC-*co*-MES-*co*-VTPP)（PMET）を合成した。PMET をマグネタイト表面に修飾することでミトコンドリア指向性マグネタイトナノ粒子を合成し、マウス結腸がん CT26 細胞に対する交流磁場照射下での温熱治療効果を評価した。本研究により、ミトコンドリア指向性 VTPP ユニットを含有したポリマー修飾により、マグネタイトナノ粒子による *in vitro* 温熱治療効果が向上することが明らかになった。

方　法

MPC、MES、VTPP をモノマー、ethyl 2-bromoisobutyrate を開始剤、Cu を触媒金属、tris(2-pyridylmethyl)amine を配位子、ascorbic acid を還元剤とする activator regenerated by electron transfer atom transfer radical polymerization（ARGET ATRP）により、異なるユニット組成比を有する poly（MPC-*co*-MES）（PME）、PMET を合成した（仕込み組成比は表 1 を参照）。マグネタイトナノ粒子は共沈法により合成した。二価及び三価の鉄イオン水溶液に対してアンモニアを添加し、80℃で加熱攪拌することでマグネタイトナノ粒子を得た。反応後のマグネタイト分散液に対して PME または PMET を添加し、さらに加熱攪拌することで、ポリマー被覆マグネタイトを調製した。

CT26 細胞に対してポリマー被覆マグネタイトを添加し、24 時間培養した後に Cell counting kit-8 を用いて細胞生存率を測定した。また、マグネタイトを添加し 24 時間培養した細胞を回収し、hydrochloric acid および trichloroacetic acid を用いて細胞を処理し、hydrogen peroxide と potassium thiocyanate を用いた呈色反応による鉄イオンの定量に基づきマグネタイト取り込み量を評価した。さらに、マグネタイトを取り込んだ CT26 細胞を回収し、交流磁場の出力を調節しながら細胞懸濁液の温度を 15 分間 43℃に保つことで温熱治療を行った。温熱処理された CT26 細胞を再度播種し 24 時間培養した後の細胞数を計測した。細胞生存率は、通常培養された CT26 細胞の細胞数に対する比率を求め

ることにより算出した。

結果および考察

1.　ミトコンドリア指向性マグネタイトの合成と評価

ARGET ATRP により、異なるユニット組成比を有する PME55T、PME73T を合成した（表 1）。また、比較のためミトコンドリア指向性の VTPP ユニットを持たない PME55、PME73 の合成も行った。合成したポリマーのユニット組成比を ^{1}H NMR により分析したところ、仕込み組成比に近い組成比を有するポリマーが得られたことが確認された。

表 1.　ポリマーの合成結果

	In feed MPC/MES/VTPP (mol%)[a]	In copolymer MPC/MES/VTPP (mol%)[b]
PME55	50 / 50 / 0	50 / 50 / 0
PME73	70 / 30 / 0	67 / 33 / 0
PME55T	45 / 50 / 5	42 / 53 / 5
PME73T	65 / 30 / 5	64 / 31 / 5

a)　MPC：2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine、MES：2-methacryloyloxyethyl succinate、VTPP：4-vinylbenzyl triphenylphosphonium.
b)　Determined by ^{1}H NMR.

鉄イオン溶液に対してアンモニアを添加し加熱することでマグネタイトナノ粒子を合成し、ポリマーを添加しさらに攪拌することでポリマー被覆マグネタイト（PME55-mag、PME73-mag、PME55T-mag、PME73T-mag）を合成した。熱重量分析によりポリマーの修飾量を分析したところ、粒子表面上に存在するポリマーは 5～10 wt%程度であった（図 1a）。PME55-mag と PME73-mag、PME55T-mag と PME73T-mag の修飾量を比較すると、それぞれ PME55-mag と PME55T-mag において修飾量が大きくなっていた。これは、マグネタイトへの結合性を有する MES ユニットの含有率が多かったことに起因したと考えられる。また、PME55-mag と PME55T-mag、PME73-mag と PME73T-mag との比較から、VTPP ユニットの導入により修飾量が小さくなることが示唆された。図 1b にポリマー被覆マグネタイトの赤外吸収スペクトルを示す。いずれのポリマー被覆マグネタイトの赤外吸収スペクトルにおいても 970 cm^{-1}、1,070 cm^{-1}、1,710 cm^{-1}付近にピークが検出された。970 cm^{-1}のピークは $N^+(CH_3)_3$ に、1,070 cm^{-1}のピークは P-O-C に、1,710 cm^{-1}のピークは C=O に由来するものであると考えられる。これらは MPC ユニットに含まれる官能基であることから、粒子表面に PME または PMET が存在することが示された。次いで、ポリマー修飾マグネタイトの水分散液のゼータ電位を測定したところ、カチオン性の VTPP ユニットを有する PME55T-mag、PME73T-mag において、電位が正方向にシフトしていた（図 2）。

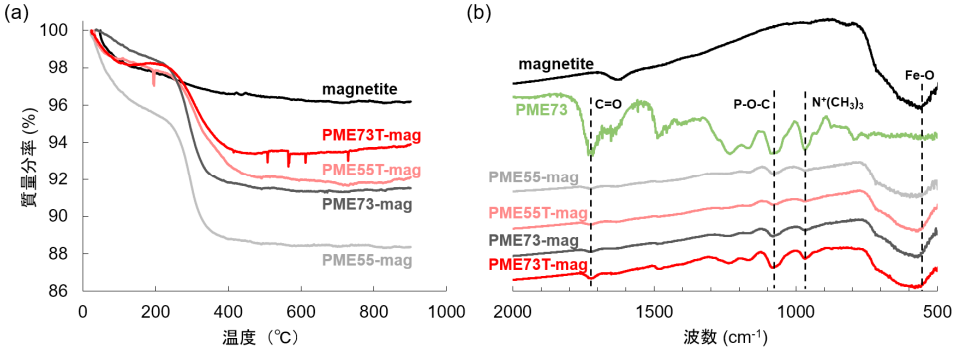


図 1.　合成したポリマー被覆マグネタイトの分析結果
a）マグネタイトおよびポリマー被覆マグネタイトの熱重量曲線。
b）マグネタイト、PME73 およびポリマー被覆マグネタイトの FT-IR スペクトル。

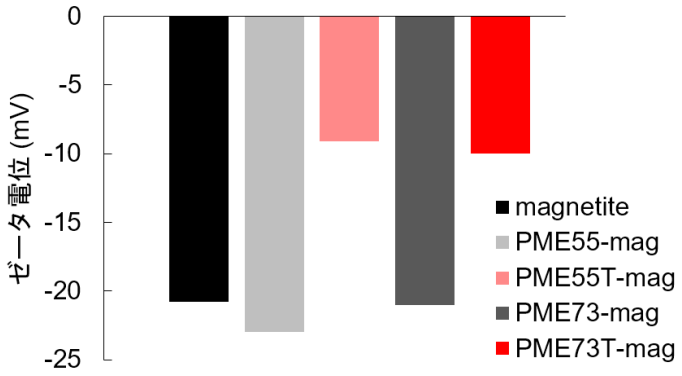


図 2. ポリマー被覆マグネタイト水分散液のゼータ電位

1,000 μg/mL のマグネタイトナノ粒子水分散液のゼータ電位を評価した。

2. ミトコンドリア指向性マグネタイトを用いた温熱治療

ポリマー被覆マグネタイトの生細胞への影響を検討するため、ポリマー被覆マグネタイトを種々の濃度で CT26 細胞培地に添加し、24 時間培養した後の細胞生存率を測定した。その結果、どの濃度でも顕著な細胞生存率の低下は認められなかった（図 3）。この結果は、10～1,000 μg/mL の濃度域ではポリマー被覆マグネタイト自体には毒性がないことを示している。この結果を踏まえ、1,000 μg/mL の濃度でポリマー被覆マグネタイトを用いた際の温熱治療効果を検討した。ポリマー被覆マグネタイトを添加し 24 時間培養した後に、細胞に取り込まれたマグネタイト量を分析したところ、いずれの群においても細胞に取り込まれたマグネタイト量は 4%前後であった。（図 4a）。次いで、マグネタイトを取り込んだ CT26 細胞に対して 15 分間交流磁場を照射し、その後の細胞生存率を評価した。それぞれの細胞生存率を比較すると、VTPP ユニットを含む PME55T-mag、PME73T-mag を添加した系において細胞生存率がより大きく低下する傾向が認められた（図 4b）。細胞に取り込まれたマグネタイト量が同程度であったことを踏まえると、ミトコンドリア指向性 VTPP ユニットの存在によりマグネタイトがミトコンドリアに蓄積することで、温熱治療効果が向上したと考えられる。

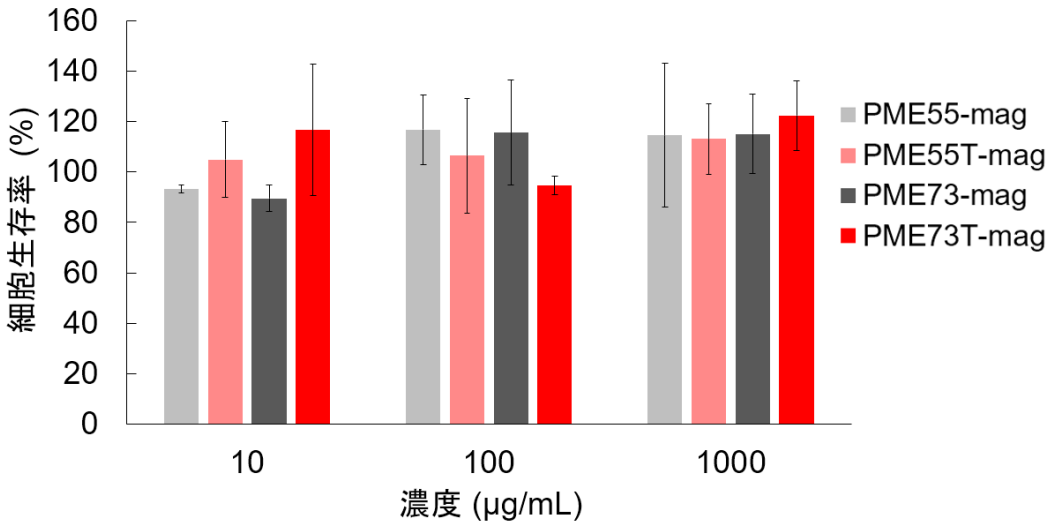


図 3. ポリマー被覆マグネタイトが CT26 細胞の生存率に与える影響

CT26 細胞培地に 10、100、1,000 μg/mL の濃度でポリマー被覆マグネタイトを添加し、24 時間培養した後の細胞生存率を評価した。

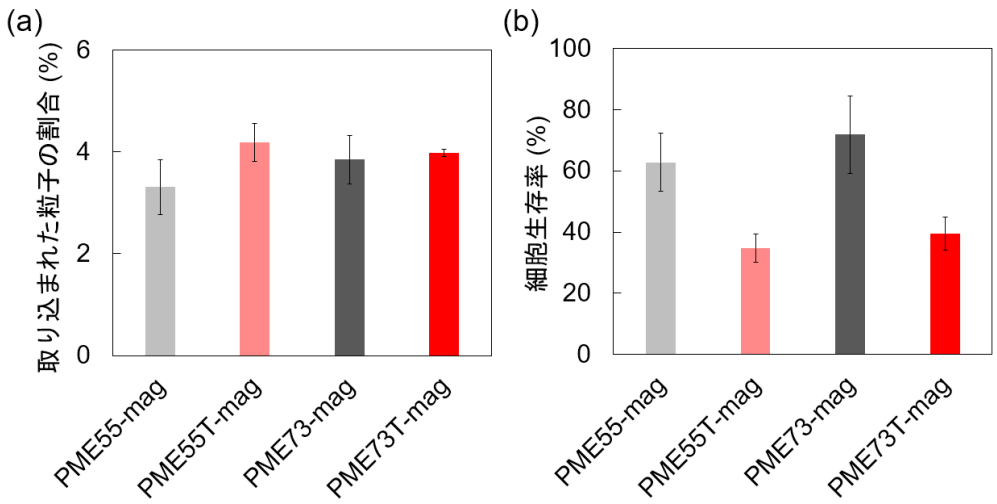


図 4. ポリマー被覆マグネタイトを用いた温熱治療の結果

a) CT26 細胞培地に 1,000 μg/mL の濃度でポリマー被覆マグネタイトを添加し、24 時間培養した後に細胞に取り込まれていたマグネタイトの割合。

b) マグネタイト被覆ポリマーを取り込んだ CT26 細胞に対して、15 分間交流磁場を照射した後の細胞生存率。

共同研究者・謝辞

本研究は、名古屋大学大学院工学研究科化学システム工学専攻の井藤彰教授と山﨑裕永氏と共同で遂行しました。また、ゼータ電位の測定にあたり、名古屋大学大学院工学研究科物質プロセス工学専攻の髙見誠一教授にお世話になりました。この場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1) Willis WT, Jackman MR, Bizeau ME, Pagliassotti MJ, Hazel JR. Hyperthermia impairs liver mitochondrial function in vitro. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000 May;278(5):R1240-6. doi: 10.1152/ajpregu.2000.278.5.R1240. PMID: 10801293.

2) Shah BP, Pasquale N, De G, Tan T, Ma J, Lee KB. Core-shell nanoparticle-based peptide therapeutics and combined hyperthermia for enhanced cancer cell apoptosis. ACS Nano. 2014 Sep 23;8(9):9379-87. doi: 10.1021/nn503431x. Epub 2014 Aug 21. PMID: 25133971; PMCID: PMC4174096.

3) Jung HS, Han J, Lee JH, Lee JH, Choi JM, Kweon HS, Han JH, Kim JH, Byun KM, Jung JH, Kang C, Kim JS. Enhanced NIR radiation-triggered hyperthermia by mitochondrial targeting. J Am Chem Soc. 2015 Mar 4;137(8):3017-23. doi: 10.1021/ja5122809. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25662739.

4) Ishihara K. Revolutionary advances in 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers as biomaterials. J Biomed Mater Res A. 2019 May;107(5):933-943. doi: 10.1002/jbm.a.36635. Epub 2019 Feb 13. PMID: 30701666.

5) Zielonka J, Joseph J, Sikora A, Hardy M, Ouari O, Vasquez-Vivar J, Cheng G, Lopez M, Kalyanaraman B. Mitochondria-Targeted Triphenylphosphonium-Based Compounds: Syntheses, Mechanisms of Action, and Therapeutic and Diagnostic Applications. Chem Rev. 2017 Aug 9;117(15):10043-10120. doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00042. Epub 2017 Jun 27. PMID: 28654243; PMCID: PMC5611849.