

[研究助成 (A)]

超音波エレクトロニクスと新規音響増感システムを融合させた
革新的音響力学療法の構築Innovative Acoustodynamic Therapy by Integrating Ultrasonic Electronics and
Novel Acoustic Sensitization System

2231027



研究代表者
(助成金受領者)
共同研究者

東京工業大学
科学技術創成研究院
東京農工大学
工学部機械システム工学科

助 教 本 田 雄 士
准教授 倉 科 佑 太

[研究の目的]

日本の死因第一位であるがん疾病の治療を患者さんの身体・経済両面から負担を軽減して行い、人々の QOL を向上させる技術開発は喫緊の課題である。その中で、音響力学療法に着目した。音響力学療法は、超音波を患部に照射することで投与した音響増感剤から活性酸素を発生させ、腫瘍疾患などの治療を行うものである。他の物理的治療方法（光線力学的療法など）と比較して、超音波は深部まで浸透するため、音響力学療法は様々な臓器に局在・転移した腫瘍に有効である。また、現在高い治療効果を示している抗体などのバイオ医薬品を用いたがん治療と比較して安価で実施できるため、音響力学療法が臨床化されることで機械による物理エネルギーで人々の QOL を身体・経済両面で向上できると考えられる。

その際、超音波増感剤によって効率的に活性酸素を生成するためには、組織内の溶存酸素などのガスを超音波照射によってキャビテーション（高圧空気の破裂や伸縮）を発生させることが重要である。そのため、バブルを内包したリポソームを音響増感剤と併用して効率的な活性酸素を産生させるアプローチが主流であり、一定の治療効果が確認されている（*Biomater. Sci.*, 2020, 8, 2526-2536）。しかしながら、バブルリポソームは粒子径が 300 nm 以上と大きい

ことから、腫瘍付近の血管隙間（～200 nm）を透過することが難しいため、腫瘍組織内に効率的に集積させることが困難である。また、活性酸素の自体が細胞膜を透過することが困難である上、寿命（半減期）が $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 秒と短いため、血管内に存在するバブルリポソームによって、効率的ながん治療を行うのは困難なのが現状であり、音響力学療法を確かなものにするためには、標的であるがん細胞内でキャビテーションを誘起できつつ音響増感剤を搭載できる新規音響増感システムの開発が求められている。

その中で、環境応答性相転移材料に着目した。環境応答相転移材料は特定環境に応答して、親水（伸展）状態と疎水（凝集）状態に相転移する材料である。疎水状態になることでその材料の表面に気泡をまとい、キャビテーションの発生を誘発できると考えた。そこで、環境応答性相転移材料を血管内で伸展（バブル発生なし）させ、腫瘍細胞内で凝集（バブル発生）させることで腫瘍選択的な音響力学療法を実現できると考えた（図 1）。また、この応用方法は、材料の相転移挙動を最大限に活用しており、未だに報告されていない相転移材料の生体内アプローチである。特に、今までの相転移材料は相転移によるコンフォメーションやサイズの変化に伴う薬物放出に利用するものが中心であった（*Colloids Surf. B* 2012, 99, 67-73）。一方、本研究は分子構造・親疎水性の変化によって生じる



図1 本申請課題のコンセプト

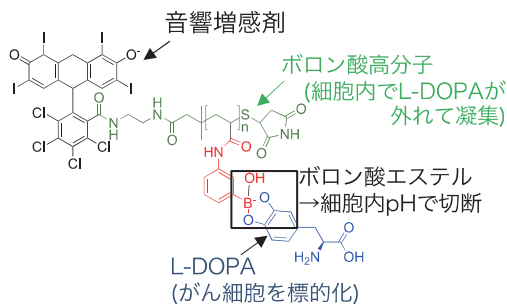


図2 腫瘍内環境応答性相転移材料の構造

ナノバブルの利用であり、今までの研究ではあまり注目されて来なかった性質である。

腫瘍内環境応答性相転移システムは、ボロン酸高分子とエステル結合を形成するカテコール構造を含んだ腫瘍標的分子 (L-DOPA) を組み合わせることで調製する (図2)。このシステムは、生理的 pH ではカテコールと高分子のボロン酸がエステル結合を形成すると伸展状態 (親水性) になり、腫瘍細胞内の酸性 pH (~ 5.5) でボロン酸エステルが解離してボロン酸高分子が凝集する性質を利用したものである。また、腫瘍で過剰発現しているアミノ酸トランスポーターを標的可能な L-DOPA を組み合わせることで腫瘍標的性を付与することが可能である (Nanomedicine: NBM, 2019 15 1-11, 申請者論文 1, 2)。本申請課題では、ボロン酸高分子をリビングラジカル重合によって合成し、相転移材料の形成および細胞内 pH に応答して凝集が起こるか、凝集に起因したキャビテーションの誘発と音響力学療法のプロープとして有効であるかについて、*in vitro* および *in vivo* にて評価した。

[研究の内容、成果]

(1) ボロン酸ポリマーの合成：ボロン酸高分子 [P(A-PBA), 図2] は、連鎖移動剤 (CTA) として DDMAT, モノマーである 3-acrylamido phenylboronic acid にラジカル剤である AIBN を脱気した DMF/水混合液中に 70°C で 6 時間攪拌させ、リビングラジカル重合させることで合成した。その合成は、 $^1\text{H-NMR}$ とゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) によって評価した。その結果、ボロン酸高分子の重合度 (DP) は 64 と 120 と算出された。その後、音響増感剤であるローズベンガルをボロン酸高分子のアミノ基末端に縮合反応で導入した。

(2) 相転移材料の形成および pH 応答性評価：合成したボロン酸高分子を水溶液中で、L-DOPA およびカテコールなどのポリオールと混合することで、ボロン酸高分子複合体を形成させた。ボロン酸高分子複合体の流体力学的直径を蛍光分光相関法にて測定したところ、 $[\text{L-DOPA}]/[\text{PBA}] \geq 2$, $[\text{Catechol}]/[\text{PBA}] \geq 10$ では約 10 nm の分散した複合体の形成を確認した (図3)。次に、この複合体の pH 応答性をゼータサイザーによって Derived count rate を測定することで評価した (図4)。pH 7.4, 6.8 では Derived count rate の増加は見られなかったが、pH 5.5 では Derived count rate が 100 倍に増加した。また、このボロン酸高分子/L-

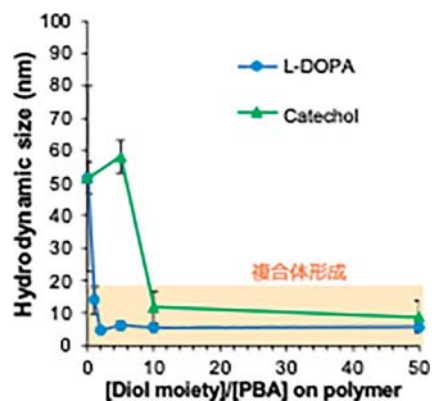


図3 ボロン酸高分子/ポリオール複合体の形成評価

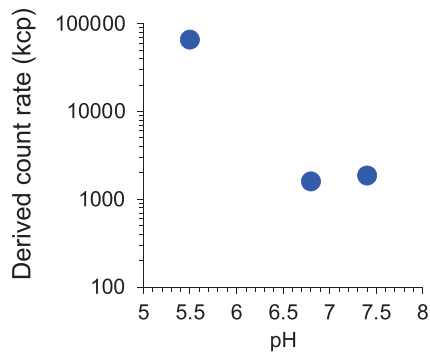


図4 ポロン酸高分子/L-DOPA 複合体の各 pH での Derived count rate 測定

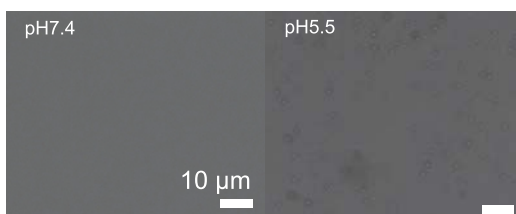


図5 ポロン酸高分子/L-DOPA 複合体の各 pH での光学顕微鏡観察

DOPA 複合体水溶液を光学顕微鏡で観察したところ、pH 7.4 では何も見られなかった一方、pH 5.5 では凝集物が観察された (図 5)。このことからポロン酸高分子複合体は酸性 pH に応答して相転移を起こして凝集することが確認された。

(3) 相転移材料の表面物性およびキャビテーションの評価：次に生理的 pH (～7.4) と細胞内 pH (～5.5) 中の相転移材料に超音波を照射した際のナノバブルおよびキャビテーションが発生する様子をハイスピードカメラにて観察した (図 6)。その結果、pH 7.4 ではキャビテーション由来のバブルは観察されなかったが、

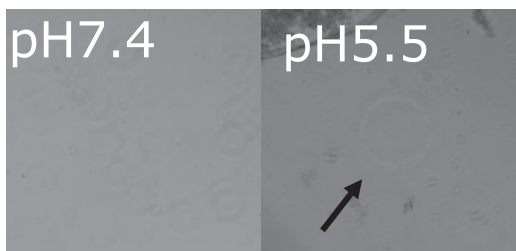


図6 ハイスピードカメラを用いたキャビテーション発生挙動観察

pH 5.5 ではキャビテーション由来のバブルが観察された。これより、高分子の凝集によって、キャビテーションが誘導されることが示唆された。

(4) 細胞実験：ポロン酸高分子複合体を人肺がん (A549) 細胞にインキュベーションさせ、細胞内取り込みおよびその挙動に関して評価した。細胞内取り込みを評価したところ、ポロン酸高分子/L-DOPA 複合体はポロン酸高分子/Catechol 複合体と比較して、高い細胞内取り込みを示した (図 7)。これは、L-DOPA ががん細胞を認識して取り込みが促進されたことを示すものである。また、ポロン酸高分子の重合度を上げることで、取り込み量が向上することが示された。これは、側鎖の L-DOPA の搭載量が増えることで、がん細胞認識能が上がるためであると示唆される。

次に、ポロン酸高分子/L-DOPA 複体の細胞内挙動を観察した (図 8)。37 度では、ポロ

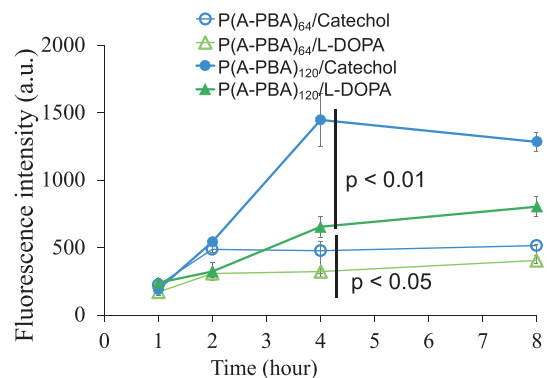
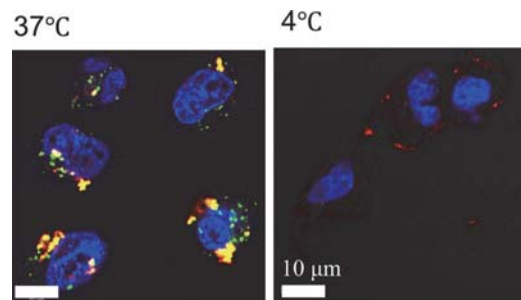


図7 ポロン酸高分子複合体の A549 細胞に対する取り込み



(赤) ポロン酸高分子, (緑) エンドソーム, (青) 細胞核

図8 ポロン酸高分子/L-DOPA 複体の細胞内局在観察

ン酸高分子/L-DOPA 複合体（赤）は細胞内に取り込まれ細胞内エンドソーム（緑）と共存している様子が観察された。一方、高分子の細胞内取り込みが抑制される 4℃でのインキュベーションでは、ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体は細胞膜上に局在していた。これによって、このボロン酸高分子/L-DOPA 複合体は高分子の取り込み経路であるエンドサイトーシスによって、細胞内のエンドソームに入っていることが確認された。エンドソームは pH が 5.5 付近であることから、このボロン酸高分子/L-DOPA 複合体は、細胞内に入って伸展状態から凝集状態に相転移していることが示唆された。

次に、ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体の細胞内滞留性を親水性生体適合性高分子である PEG と比較した（図 9）。PEG はサンプル外液交換してから 1 時間後には約 80% が細胞外に排出された一方、ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体はほとんど排出されず、サンプル外液を交換してから、4 時間後も 90% 近く細胞内に

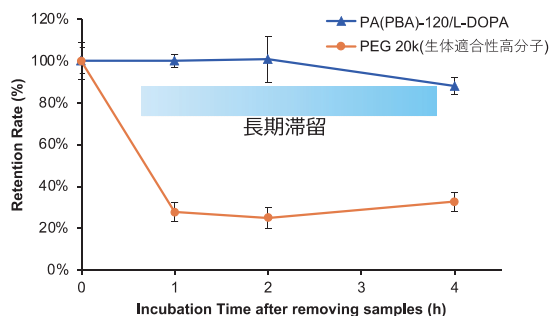


図 9 ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体の細胞内滞留性

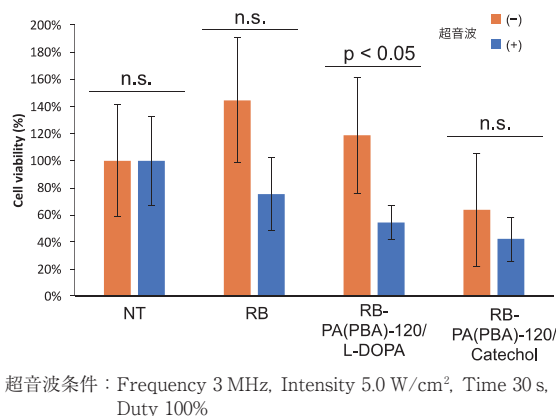
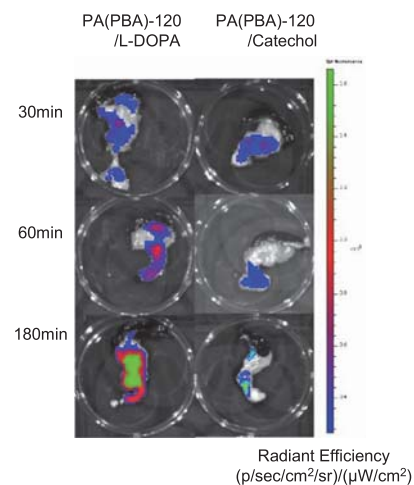


図 10 超音波照射による抗腫瘍効果の in vitro での評価

残っていた。これはボロン酸高分子/L-DOPA 複合体が細胞内で凝集したことで、細胞外排出が抑制されることが示唆される。

最後に、細胞内にボロン酸高分子/L-DOPA 複合体を取り込ませた後に、超音波を照射することでキャビテーションおよび活性酸素を発生させ、それによる抗腫瘍効果を評価した（図 10）。その結果、ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体は、音響増感剤（RB）単体およびボロン酸高分子/Catechol 複合体と比較して、超音波を照射したときに細胞生存率を下げることに成功した。これは、ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体が細胞に効率的に取り込まれていることに加えて、ボロン酸高分子の相転移によって、超音波によるキャビテーションが増強されているためであると考えられる。

(5) 動物実験: A549 細胞を腹膜播種させた腫瘍モデルマウスにボロン酸高分子複合体を腹腔内投与し腫瘍集積性について in vivo imaging system を用いた蛍光強度測定によって評価した（図 11, 12）。その結果、投与してから 180 分後に、ボロン酸高分子/L-DOPA 複合体はボロン酸高分子/Catechol 複合体と比較して、高い腫瘍集積性を示した。これは、L-DOPA が腫瘍細胞を認識したためであると考えられ、生体内においてもこのボロン酸高分子/L-DOPA



ボロン酸高分子由来の蛍光を測定

図 11 In vivo imaging system による腫瘍画像

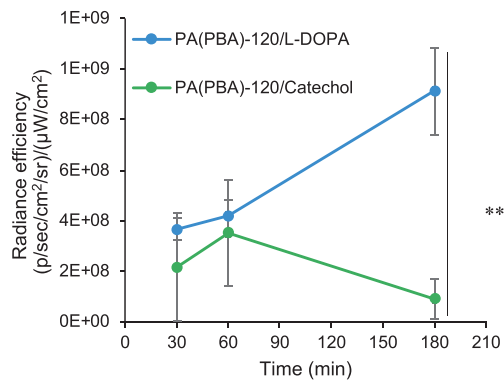


図 12 腫瘍部分におけるボロン酸高分子由来の蛍光強度の経時変化

複合体は機能することが示された。

(6) 総括：本研究では、腫瘍内環境応答性相転移材料と超音波エレクトロニクスを組み合わせた新規音響力学療法システムの構築を行った。

その結果、本相転移材料は腫瘍細胞を認識して取り込まれ後に、凝集状態に相転移し、超音波照射時のキャビテーションを増強できることが示された。さらに、この相転移材料は生体内でも腫瘍内に多量に取り込まれることから、今後は生体内の腫瘍においても本音響力学療法システムが機能するかについて評価する予定である。

[成果の発表，論文など]

学会発表

1. 本田雄士，シャイクリザル エル ムツタキン，西山伸宏，野本貴大，ボロン酸エステルを基盤とした細胞内相転移による高分子－細胞間相互作用制御および薬物送達キャリアとしての応用，第 39 回日本 DDS 学会学術集会，2023/7/27，Poster