

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：12608

研究種目：学術変革領域研究(B)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H05090

研究課題名（和文）脳分子を回収して帰還する「はやぶさ型ナノマシン」の開発

研究課題名（英文）Development of hayabusa-type nanomachines

研究代表者

安楽 泰孝（Anraku, Yasutaka）

東京工業大学・物質理工学院・准教授

研究者番号：60581585

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 37,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、血液脳関門を通過して脳分子を回収し、血液中に持ち帰るナノマシンの開発を行った。具体的には、脳内環境に反応して構造変化し脳分子を回収するナノマシン開発と脳内から血液中に戻るナノマシンの開発を検討した。まず所望の機能を有する新規ブロック共重合体を合成した。に関しては、血液環境では直径30 nmほどの高分子ミセルが、脳内環境において直径150 nm程の高分子ベシクルへと構造転移することを確認した。また構造転移によって神経伝達物質をサンプリングすることも確認した。またでは、ナノマシン表面にFcフラグメントを搭載することで、脳内から血液中に移行するナノマシンを開発することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「脳内で集合体の構造変化を惹起」することで「脳分子を回収」し、さらに「血液中に帰還する」ことで早期診断へ展開する「はやぶさ型ナノマシン」については、脳へ多量の高分子集合体を送達可能な申請者の技術なしでは着想もしない独創的な研究であり、脳内外の物質移動研究に新たな学術的視点をもたらすことが想定される。幅広い精神神経疾患や脳炎など広範な疾患についても大きく貢献することが確信される。また高分子/材料設計の観点からも、生体適合性・標的指向性・環境応答性という異なる機能を空間的に制御された形で構造内部に配置する仕掛けを創り込むなど、独創性に秀でた生体材料設計プロセスを当該分野にもたらす意義を有する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed nanomachines capable of passing the blood-brain barrier to collect brain molecules and transport them back into the bloodstream. Specifically, we investigated (1) the development of nanomachines that undergo structural changes in response to the brain environment to collect brain molecules, and (2) the development of nanomachines that return from the brain into the bloodstream. First, we synthesized novel block copolymers with the desired functions. Regarding (1), we confirmed that polymer micelles with a diameter of approximately 30 nm in the blood environment transform into polymer vesicles with a diameter of approximately 150 nm in the brain environment. We also confirmed that these structural changes enable the sampling of neurotransmitters. As for (2), we succeeded in developing nanomachines capable of moving the micelles from the brain into the bloodstream by incorporating Fc fragments on their surface.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：高分子 脳 高分子集合体 ナノマシン 抗体工学

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脳は血管内皮細胞(BCEC)間の結合が極めて強固なために、血管内腔から脳実質への物質輸送が著しく制限されている。そのためアルツハイマー病(AD)等の中枢神経系(CNS)疾患治療に十分な量の薬剤を送達できない事が大きな課題である。ADの臨床薬として使用されている Donepezil の脳集積は投与量の0.01%、BBB通過を指向したペプチド搭載ナノ粒子も0.05%、また近年注目を集めている抗体医薬も0.04%と低く、十分な治療効果が望めないのが現状である。また、脳内に局在するペプチドやタンパク質など幅広い物性を有する病因関連分子の同定は、CNS疾患の「早期発見・診断」にとって極めて重要である。

一方で、分子生理学的観点から「脳」という臓器を考えると、その仕組みや分子情報は未だブラックボックスの中にある。とりわけ脳分子とCNS疾患との相関に関して、分子情報を容易に採取可能な血液中への移行性が著しく低い、プローブを「局所的に」脳内に挿入し分子情報を回収する微小透析膜(MD)法が確立されているが、回収可能な分子に制限がある、などの事由から未解明な部分が多い。またMD法はその煩雑性により、臨床的に病因関連分子の早期発見・診断法へと展開するのが困難である。すなわち、「非侵襲的な手法によって脳分子を回収し、血液中に分子情報を持ち帰ることにより、脳内分子情報を取得することは可能か?」という「問い」はまさにCNS疾患の抜本的診断法が実現できるかどうかの核心であり、未だ達成されていない挑戦的な研究課題である。

その中で我々は、BCEC中で血糖濃度に応じて局在箇所が変化し、他のトランスポーターと比べ桁違いに局在するグルコーストランスポーター-1(GLUT1)に着目し、グルコース(Gluc)搭載高分子集合体を開発し、既存薬の約100倍の効率で脳へ集積させることに成功した¹。さらに核酸、抗体医薬の安定化に取り組み、AD発症に関連すると考えられる遺伝子発現を抑制^{2,3}、病因物質を効率的に除去する^{4,5}ことに成功した。

2. 研究の目的

上述の学術的「問い」に応える形で「BBBを越えて、脳分子を効率的に回収し、血液中に分子情報を持ち帰るといった一連の機能を組み込んだ「はやぶさ型ナノマシン」を創出する」事を目的とした。この目的を達成するために、これまでに確立したGluc搭載高分子集合体に、合目的々に各種機能を導入し解決する。ここで本システムは、BBBを効率的に通過する方法論を確立しているが、構造転移に伴う脳分子回収機能、分子情報を血液中に持ち帰る機能、を有していない。

そこでBBB通過用のGluc(1stリガンド)に加え、2ndリガンドとして血液中に帰還するためのリガンドを導入したデュアルリガンド搭載高分子集合体を構築する。ここで脳実質が還元環境(還元剤濃度:血液0.1mM,脳実質10mM)であることに着目し、Glucを導入したブロック共重合体の親水性/疎水性セグメント間に還元環境下で開裂する官能基を導入し、血液中ではBBBを通過するためのGlucが表層に露出し、BBB通過後脳実質中で1stリガンドが脱離し2ndリガンドが表層に露出する高分子集合体に展開する。

また高分子集合体の形状を規定するパラメータとして、親水性/疎水性セグメントの割合が重要であることを見出している⁶。ここで上記のように脳実質は還元環境であることから、還元環境下で親水性セグメントが脱離するブロック共重合体を用いることで、BBBを通過した高分子集合体が脳内で構造変化し、それに伴い脳内分子を回収するシステムを構築する。

また血液中に帰還する機能の賦与について、抗体のFcフラグメント(FcFr)に着目した。CNS疾患治療を標的とした抗体医薬の臨床試験が世界中で進行しているが、いずれも失敗に終わっている。その原因の一つとしてBCECの脳実質側にFc部位を認識し、血液中に汲み出す機能を有するFc受容体(FcRn)が過剰に局在していることが考えられている。そこで上記のデュアルリガンド搭載高分子集合体の2ndリガンドとしてFcFrを導入することで、脳実質から血液中へ汲み出されることが期待できる。FcFrに加えて、脳内から血管へペプチドを輸送する受容体であ

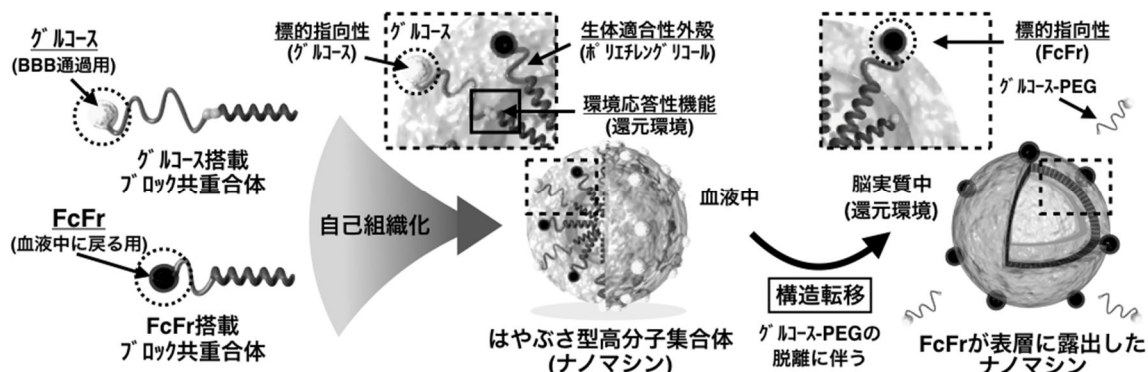


図1. ブロック共重合体/高分子集合体(ナノマシン)の機能化

る心房性ナトリウム利尿ペプチド受容体などに対する抗体を活用することにより、より高効率に血液中に帰還するシステムを構築する。

生体適合性・標的指向性・環境応答性という異なる機能を空間的に制御された形で構造内部に配置した『はやぶさ型ナノマシン』を構築し、CNS 疾患の革新的診断法へと展開し、脳内外の物質移動研究に新たな学術的視点をもたらすことを目的とした(図 1)。

3. 研究の方法

既に確立している BBB 通過型ナノマシン内に、脳内分子を回収(サンプリング)、血液中に脳内分子情報を持ち帰る(リエントリー)といった異なる機能を適材適所に組み込む必要がある。一方で、それぞれの要素技術がこれまでに報告例のないチャレンジングな機能であるが故に、始めから全ての機能を具備した「はやぶさ型ナノマシン」の開発を検討するのは困難である。そこでまずそれぞれの要素技術を最終的に搭載するためのプラットフォーム(デュアルリガンド搭載ナノマシン)の構築に加えて、それぞれの機能を分割して、サンプリング型ナノマシン、リエントリー型ナノマシンをそれぞれ単独で構築し、脳内情報を体外に発信する「はやぶさ型ナノマシン」に必要な要素技術の確立を目的とする大きく分けて 3 つの研究を実施した。

具体的には、生体への安全性が担保されたポリエチレングリコール(PEG)とポリアミノ酸をセグメントとするブロック共重合体を基盤高分子とし、1st リガンド(Gluc)を搭載した高分子のセグメント間には脳内環境に反応して Gluc-PEG が脱離するように所望の官能基を導入した高分子を合成した(2nd リガンドを搭載する高分子には環境応答性を付与しない)。合成した高分子は核磁気共鳴(NMR)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等でその構造・機能を評価した。また得られた高分子を用いてナノマシンを形成し、その粒径や形状といった基礎物性について動的光散乱測定(DLS)や透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、還元環境下(脳実質環境を模倣)における応答性(構造転移能、分子封入能)を蛍光相関分光法(FCS)を用いて評価した。また併せて、脳内分子のサンプリング能評価に関しては、代表的な 13 種類の神経伝達物質を含む標品を用いてサンプリング能について評価した。

脳内から血液中に戻る「リエントリー型ナノマシン」については、FcFr を搭載したナノマシンを構築した。取得した FcFr は表面プラズモン共鳴法により、活性を評価した。また FcFr を搭載したナノマシンは脳脊髄液(CSF)中に局所投与し、脳実質から血流中への移行を *in vivo* CLSM で評価した。また脳内から血液中へのリエントリーが確認されたナノマシンに関しては、リエントリー後の血中安定性についても評価した。

4. 研究成果

機能性ブロック共重合体の合成

まず、「サンプリング型ナノマシン」に必要な脳内の還元環境(グルタチオン濃度: 血液 0.1 mM, 脳実質 10 mM)を認識し、構造転移を惹起する機能を各ブロック間に導入したブロック共重合体を合成した(計 9 ステップ)。また「リエントリー型ナノマシン」を構成する高分子には親水性セグメントであるポリエチレングリコールの ω 末端にリエントリー用のリガンド分子を搭載するためのアジド(N3)基を有するブロック共重合体を合成した(計 2 ステップ)。それぞれ液体クロマトグラフィ、核磁気共鳴法で単峰性と重合度を算出した。

サンプリング型ナノマシンの開発

続いて、上記で合成した高分子を任意の割合で混合することで、血液中を模倣した環境では直径 30 nm の高分子ミセル状のナノマシンを形成し、脳内を模倣した環境において直径 150 nm で単分散な高分子ベシクル状のナノマシンへと構造変化することを動的光散乱測定(DLS)、透過型電子顕微鏡(TEM)観察より確認した。またブロック共重合体のブロック間の官能基(脳内環境に反応して開裂する官能基)と疎水性ブロックの側鎖構造を変えることで高分子ミセルから高分子ベシクルへの構造変化速度を制御することに成功した。加えて構造変化速度は媒体の粘度に依存して変化することが明らかとなった。ここで A03 グループより供給された 12 種類の神経伝達物質が含まれる標品を用いてサンプリング評価を行った。ナノマシンの単離・分解、封入物の単離を行なった後に、A03 川井グループに供給し、超好感度

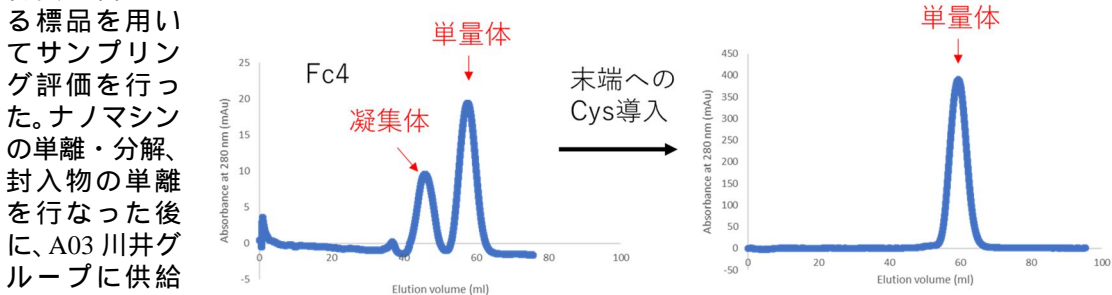


図 2. Fc の末端改変による凝集体形成の抑制

CE-MS による

評価によりサンプリング能を確認した。その結果、構築したサンプリング型ナノマシンによって、標品中 11 種類の化合物が封入されていることを確認した。

抗体工学による Fc の改変

はやぶさ型ナノマシンの開発のため、ナノマシン表層に搭載する Fc の改変を行った。抗体工学により、ヒト IgG1 および IgG4 由来の Fc 領域のみを切り出したコンストラクトを作製し、哺乳細胞発現系によって組換えタンパク質として調製したところ、特に IgG4 由来の Fc において凝集体の形成が確認された。そこで、Fc コンストラクトの N 末端領域に Cys を導入して末端を安定化することにより、凝集体の形成を抑制することに成功した(図 2)。これらのコンストラクトを用いて FcRn との相互作用を定量解析したところ、pH 依存的な結合が確認された。

リエントリー型ナノマシンの開発

上記で合成した高分子を用いて構造変化後の形状のナノマシンを構築した。ナノマシンの表層には調製した抗体の Fc フラグメント (FcFr) を導入するためにアジド基(N3)を導入し、FcFr には Dibenzylcyclooctyne 基 (DBCO) を導入した。これらの官能基を介して FcFr を導入したナノマシン(Fc-NM)は導入量に依らず、直径が 150 nm 程度で単分散な粒子を形成していることを DLS で確認した。ここで構築した Fc-NM、Fc を導入する前のナノマシン(N3-NM) (ナノマシンを蛍光で標識)を脳室中に投与し、血液中へのリエントリー能を評価した結果、N3-NM は脳内から血液中へ移行しないのに対し、Fc-NM は投与 15 分後から血液中への移行が確認された(図 3)。加えて、Fc-NM は血液中に移行後も高い血中循環性を示すことも明らかとなった。

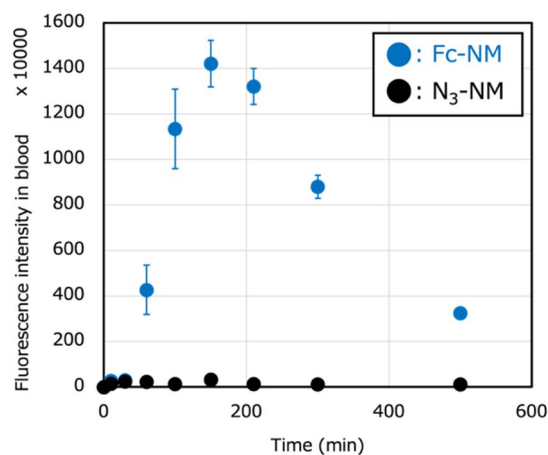


図 3. 脳室内投与した Fc ナノマシンと N3-ナノマシンの血液中への移行性(リエントリー)試験

本研究で主眼とする、脳内分子を採取するためのナノマシンの開発に加え、開発した高分子をビルディングブロックとして、mRNA と混合して調製した mRNA 封入ナノマシンを構築することにも成功しており⁷、脳内で持続的にタンパク質を発現するナノキャリアとして有用であることを実証した。これらの結果は、本システムが「脳内分子の自在な採取と分析を可能とする革新的技術システムの実現」だけでなく「薬剤送達システムのキャリア」としても高い有用性を有していることを示唆する。

<引用文献>

1. Y. Anraku, H. Kuwahara, Y. Fukusato, A. Mizoguchi, T. Ishii, K. Nitta, Y. Matsumoto, K. Toh, K. Miyata, S. Uchida, K. Nishina, K. Osada, K. Itaka, N. Nishiyama, H. Mizusawa, T. Yamasoba, T. Yokota, K. Kataoka, Crossing the BBB: Glycemic control boosts glycosylated nanocarrier transport into brain. *Nature Communications* 8, 1001 (2017).
2. HS. Min, HJ. Kim, M. Naito, S. Ogura, K. Toh, K. Hayashi, BS. Kim, S. Fukushima, Y. Anraku, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic Brain Delivery of Antisense Oligonucleotides across the Blood-Brain Barrier with a Glucose-Coated Polymeric Nanocarrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* 59, 8173-8180 (2020).
3. Y. Zhou, F. Zhu, Y. Liu, M. Zheng, Y. Wang, D. Zhang, Y. Anraku, Y. Zou, J. Li, H. Wu, X. Pang, W. Tao, O. Shimoni, A. I. Bush, X. Xue, B. Shi, Blood-Brain Barrier Penetrating siRNA Nanomedicine for Alzheimer's Disease Therapy, *Science Advances* 6, eabc7031 (2020).
4. J. Xie, D. Gonzalez-Carter, TA. Tockary, N. Nakamura, Y. Xue, M. Nakakido, H. Akiba, A. Dirisala, X. Liu, K. Tou, T. Ynag, Z. Wang, S. Fukushima, J. Li, S. Quader, K. Tsumoto, T. Yokota, Y. Anraku*, K. Kataoka, Dual-Sensitive Nanomicelles Enhancing Systemic Delivery of Therapeutically Active Antibodies Specifically into the Brain. *ACS Nano* 14, 6729-6742 (2020).
5. A. Amano, N. Sanjo, W. Araki, Y. Anraku, M. Nakakido, E. Matsubara, T. Tomiyama, T. Nagata, I. Aoki, K. Tsumoto, K. Kataoka, T. Yokota, Peripheral administration of nanomicelle-encapsulated anti-A β oligomer fragment antibody reduces various toxic A β species in the brain, *Journal of Nanobiotechnology* 21, 36 (2023).
6. W. -F. Dong, A. Kishimura, Y. Anraku, C. Sayan, K. Kataoka, Monodispersed polymeric nanocapsules: Spontaneous evolution and morphology transition from reducible hetero-PEG PICmicelles by controlled degradation, *J. Am. Chem. Soc.* 131, 3804-3805 (2009).
7. 安楽泰孝、乗松純平、水野隼斗、ホスホニウム基を有するカチオン性ポリマーおよび これを含むポリマー粒子または医薬組成物、PCT/JP2024/013965、2024 年 4 月 4 日

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kinoshita Seisho, Nakakido Makoto, Mori Chinatsu, Kuroda Daisuke, Caaveiro Jose M.M., Tsumoto Kouhei	4. 巻 31
2. 論文標題 Molecular basis for thermal stability and affinity in a VHH: Contribution of the framework region and its influence in the conformation of the CDR3	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Science	6. 最初と最後の頁 e4450
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pro.4450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yokoo Takanori, Tanabe Aki, Yoshida Yoko, Caaveiro Jose M.M., Nakakido Makoto, Ikeda Yoichiro, Fujimura Yoshihiro, Matsumoto Masaneori, Entzminger Kevin, Maruyama Toshiaki, Okumura C.J., Nangaku Masaomi, Tsumoto Kouhei	4. 巻 298
2. 論文標題 Antibody recognition of complement factor H reveals a flexible loop involved in atypical hemolytic uremic syndrome pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101962 ~ 101962
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.101962	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizuno Hayato L., Anraku Yasutaka, Sakuma Ichiro, Akagi Yuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Effect of PEGylation on the Drug Release Performance and Hemocompatibility of Photoresponsive Drug-Loading Platform	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6686 ~ 6686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23126686	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 血液脳関門を効率的に通過するナノマシンの開発
3. 学会等名 第41回躁うつ病の薬理・生化学的研究懇話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 横尾尚典、中木戸誠、松田恵子、柚崎通介、津本浩平
2. 発表標題 分子イメージングへの応用を指向したシナプス形成分子に対する新規VHH抗体の取得
3. 学会等名 Neuro2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安楽泰孝、Xie Jinbing, Gonzalez-Carter Daniel, 中村乃理子, 中木戸誠, 藤加珠子, 福島重人, 津本浩平, 横田隆徳, 片岡一則
2. 発表標題 脳内に抗体医薬を効率的に送達するDDSの開発
3. 学会等名 第38回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安楽泰孝、竹本さやか、川井隆之、中木戸誠、宮田茂雄、太田誠一
2. 発表標題 学術変革領域研究(B)「革新的ナノテクノロジーによる脳分子探査」
3. 学会等名 JAAS第1回総会・キックオフミーティング
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 高分子集合体を用いた脳神経系疾患の革新的治療技術の開発
3. 学会等名 キャピラリー電気泳動シンポジウム(SCE2021) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 ナノマシンが拓く革新的な脳神経系疾患治療法の開発
3. 学会等名 日本薬物動態学会 第36回年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳内に薬剤を効率的に送達するBBB通過型ナノマシンの基礎と応用
3. 学会等名 第117回日本精神神経学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安楽泰孝
2. 発表標題 脳神経系疾患の革新的治療技術開発
3. 学会等名 次世代医療技術研究会 第4回 情報交換会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小原巧、乗松純平、渡邊隆義、安楽泰孝
2. 発表標題 生体内のpH変化を可視化するPICsomeの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会(2022)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大貫達哉、中木戸誠、長門石曉、鷓飼由範、石井敬介、津本浩平
2. 発表標題 抗体認識における種間交差反応性を決定づける抗原蛋白質の物性評価
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住川太一、中木戸誠、黒田大祐、津本浩平
2. 発表標題 膜蛋白質Glut1の細胞外領域を認識する抗体取得法の提案
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

脳分子探査 ウェブサイト https://hayabusa-brain.org 脳分子探査 twitter https://twitter.com/Hayabusa_brain 脳分子探査 ウェブサイト https://hayabusa-brain.org 脳分子探査 twitter https://twitter.com/Hayabusa_brain
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中木戸 誠 (Makoto Nakakido) (80784511)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・講師 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------