

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17906

研究課題名(和文) 繊維状ウイルスを含む液晶性ハイドロゲルの調製と薬物徐放制御

研究課題名(英文) Construction of Liquid Crystalline Hydrogels Containing Filamentous Viruses for Controlled Release of Drug Molecules

研究代表者

澤田 敏樹 (Sawada, Toshiki)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：20581078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：様々な特性をもつ薬物の徐放を制御するためのハイドロゲル構築を目指し、繊維状ウイルスを含むハイドロゲルを構築した。物理架橋する生体高分子であるゼラチンと繊維状ウイルスを混合してハイドロゲル形成させた。遺伝子工学して抗体タンパク質に結合するよう機能改変された繊維状ウイルスを用い、ハイドロゲルを調製して抗体タンパク質の放出を検討した。その結果、遺伝子工学により繊維状ウイルス表層に導入した抗体タンパク質に結合するペプチドの量によって放出を制御することができ、また複数の遺伝子工学を組み合わせることで異種抗体の放出も制御できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of construction of hydrogels with a capability to control the release of drug molecules with various properties, hydrogels containing filamentous viruses were performed. Gelatin molecules, which have a capability to form physically cross-linked network structures, were mixed with the viruses to form hydrogels. Genetically engineered viruses with an affinity for antibody proteins were mixed with gelatin and the antibody proteins, and the release of the antibody proteins were quantitatively investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. As a result, it was found that the release of the antibody proteins were controlled by the amount of the peptide displayed on the viruses. Furthermore, release of two kinds of antibody proteins can be also controlled by using their specific peptide-displaying genetically engineered viruses.

研究分野：生体高分子

キーワード：ハイドロゲル 繊維状ウイルス 液晶 抗体 分子徐放 遺伝子工学

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会への移行が急速に進む現代社会において、生命科学や医療の更なる高度化は重要である。そのため、それを支える新たな医用材料の創製は重要な研究課題となっている。疾病の薬物治療では、薬物の血中濃度の急激な上昇による副作用を回避し、さらに適切な薬効を得ることができるよう、薬物を長期に渡って徐放することが求められている。

マイクロ～ナノメートルオーダーの繊維(網目)の集合体から形成されるハイドロゲルは、含水率が高く、内部での物質拡散や透過性に優れているため、薬物の封入や放出に有用である。従来、薬物には低分子化合物が用いられてきたが、現在では抗体医薬に代表される医薬の多様化に伴い、様々なサイズの薬物を精度良く徐放する必要がある。ハイドロゲルの網目のサイズを調節すれば、原理的には薬物の放出が制御できるが、分子量が大きな薬物を放出する場合は網目のサイズを大きくする必要があり、結果として、ゲルとしての強度や安定性が低下する。そのため、ゲルの強度を保持しながら、望みの分子量の薬物の放出を時空間的に制御できるシステムを構築する必要がある。

一方で、大腸菌に感染するウイルスの一種である M13 バクテリオファージ(ファージ)は、遺伝子工学により様々な機能性ペプチド(あるいはタンパク質)を人工的に付加することができる担体として利用されてきたが、近年ではマテリアル素材としてファージを利用する研究が展開されている。このファージは、直径 5 nm、長さ 1 μm と巨大で細長い構造をもつ。この自在に機能導入できるファージを素材としてハイドロゲルを構築できれば、遺伝子工学を利用した自在な機能化に基づく薬物徐放性ハイドロゲルが創製できると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ファージを構成要素として薬物徐放能をもつハイドロゲルを構築することを目的とする。ファージを含むハイドロゲルから効率良く薬物分子を放出させるためには、物理架橋する他の高分子と混合してハイドロゲル形成させ、さらに構築されるハイドロゲルの特性を制御して薬物分子徐放特性を付与する必要がある。そのため、ファージを含むハイドロゲルの特性を制御する手法を確立し、さらにハイドロゲルからの様々な分子の放出挙動を制御することを目的とした。

3. 研究の方法

繊維状ファージからなるハイドロゲルを構築するため、物理架橋してゲル形成する生体高分子であるゼラチンと混合した。ファージ濃度を変化させることにより、構築されるハイドロゲルの特性制御をねらった。ハイド

ロゲル化時間を定量し、差込み破断特性評価によりハイドロゲルの強度を定量した。また、偏光顕微鏡観察によりハイドロゲル内のファージの集合構造を評価した。さらに、遺伝子工学によりタグペプチドとして知られる HA ペプチドを提示したファージ(HA ファージ)を調製して同様にハイドロゲル形成に利用した。この際、抗 HA ペプチド抗体(抗 HA 抗体)を混合させてハイドロゲル化させ、緩衝液をハイドロゲルの上に重層してゲルから緩衝液へと放出される抗体を酵素結合免疫測定(ELISA)法により定量した。また、他の配列をもつタグペプチドである FLAG ならびに Myc ペプチドを提示したファージも遺伝子工学により調製し、同様に実験した。

4. 研究成果

ファージ濃度が上昇するとゲル化時間は明らかに低下し、ファージがゲル形成に寄与することがわかった。さらに、差込み破断特性評価により定量したゲルの強度はファージ濃度の上昇に伴い向上し、ファージによってハイドロゲルの特性を様々制御できることがわかった。

偏光顕微鏡観察の結果、使用したファージ濃度は液晶化濃度以下であるにもかかわらず、ハイドロゲルからは複屈折性が観察され、ゲル内でファージが液晶配向していることがわかった。コントロールとして観察した同濃度のゼラチンまたはファージ単独の場合には複屈折性は全くみられなかった。これまでに得られている知見と併せて考えると、ハイドロゲル内でファージとゼラチンは互いに相溶しているわけではなく偏析しており、おそらく見かけの濃度が向上することでファージが液晶配向したものと推察される。

HA ファージを用い、抗 HA ペプチド抗体を混合してハイドロゲル形成させ、ハイドロゲルから緩衝液へと放出される抗 HA 抗体の量を定量した。この際、ファージを含まないただのゼラチンゲルや、ペプチドをもたない野生型(WT)ファージならびに抗 HA ペプチド抗体とは相互作用しない FLAG ペプチドを提示したファージ(FLAG ファージ)を利用したコントロール実験も併せて実施した。その結果、WT ファージや FLAG ファージを用いた場合には、ただのゼラチンゲルからの放出挙動とほぼ同程度であり、48 時間後にはほぼ全ての抗 HA 抗体が放出され、ただファージを混合しても抗体の放出には何ら影響を及ぼさないことがわかった。一方で HA ファージを用いた場合には 7 日間経過後の抗 HA 抗体の放出率は 1%以下であり、放出がほとんど起こらなかった。すなわち、ファージ末端に提示された HA ペプチドと抗 HA 抗体が特異的に相互作用することで、その放出が効率良く抑制されることがわかった。

ファージ濃度を変化させた結果、ファージ濃度の減少に伴って抗 HA 抗体の放出量や速度が上昇し、確かに HA ファージ末端に提示

された HA ペプチドが効率良く相互作用していることがわかった。この際、抗 HA 抗体の放出がほぼ完全に抑制される際のペプチドと抗体のモル比に着目すると、抗 HA 抗体に対してペプチドが等量未満になると初めて放出が起こることがわかり、ハイドロゲル内では極めて効率良くペプチドと抗体が相互作用していることがわかった。同濃度の HA ファージ溶液と抗 HA 抗体を混合し、透析により溶液から放出される抗 HA 抗体を定量した結果、ファージが存在する場合には抗 HA 抗体の放出がある程度抑制されるもののハイドロゲルの場合ほど顕著ではなかった。偏光顕微鏡観察の結果と併せて考えると、ハイドロゲル内で液晶配向したファージは末端を効率良く提示しながらゲル内で配向しており、抗体のファージ末端のペプチドに対する見かけの解離速度定数が大幅に低下して放出が効率良く抑制されているものと推察される。

さらに、HA ファージと WT ファージを混合してハイドロゲル内の HA ファージに提示された HA ペプチドの濃度を調整することによっても放出挙動は制御できることもわかった。この際、HA ファージと FLAG ファージ、さらに WT ファージを様々な濃度で混合して用い、さらに抗 HA 抗体と抗 FLAG ペプチド抗体 (抗 FLAG 抗体) を同時に含むハイドロゲル調製して抗体それぞれの放出挙動を定量した。その結果、抗体の放出挙動はハイドロゲルに含まれる対応するファージの濃度 (すなわち、ペプチド濃度) にのみ依存しており、直交性をもつことがわかった。この結果は、ファージ末端に様々な分子に結合するペプチドを提示させて同時に利用することで、単一のハイドロゲルから様々な薬物分子の放出を制御できるハイドロゲルとして本ファージハイドロゲルが利用できることを示している。

また、WT ファージを含むハイドロゲルに様々な電荷や特性をもつ低分子色素を混合して低分子色素の放出挙動を定量した結果、アニオン性分子と比較してカチオン性分子の放出が抑制されることがわかった。これは、ファージ表層は負に帯電していることが知られており、ファージ表層とカチオン性分子が効率良く相互作用するためと推察され、低分子の場合はファージ表層と相互作用することがわかった。そこで、ファージ表層のカルボキシ基を介して光応答性分子であるアゾベンゼンを導入し、表層の疎水性を光によって変調できるファージを新たに調製して同様にゲルを調製した。ここの疎水性の高い抗ガン剤であるドキシソルピシンを混合し、その放出の制御を検討した。紫外線照射に応じてファージの液晶構造が変化し、表層に導入したアゾベンゼンが確かに機能していることがわかった。しなしながら、ドキシソルピシンの放出挙動はわずかな変化しか示さなかった。これは、光に応答したアゾベンゼンの

疎水性変化がわずかであるためと推察される。

以上のように、ファージの遺伝子工学や合成化学的な修飾を利用することで、様々な分子の放出を制御できる機能性ハイドロゲル素材としてファージが有用であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. T. Sawada, H. Otsuka, H. Yui, T. Serizawa "Preparation and Characterization of Hybrid Hydrogels Composed of Physically Cross-Linked Gelatin and Liquid-Crystalline Filamentous Viruses" *Polym. Bull.*, 72, 1487-1496, (2015). [査読有]
2. T. Sawada "Filamentous Virus-Based Soft Materials Based on Controlled Assembly through Liquid Crystalline Formation" *Polym. J.*, 49, 639-647, (2017). [査読有]
3. T. Sawada, M. Yanagimachi, T. Serizawa "Controlled Release of Antibody Proteins from Liquid Crystalline Hydrogels Composed of Genetically Engineered Filamentous Viruses" *Mater. Chem. Front.*, 1, 146-151, (2017). [査読有]
4. 野原崇稔, 澤田敏樹, 芹澤武 "光応答性分子を導入した繊維状ウイルスが示す液晶性の評価" *高分子論文集*, 74, 203-207, (2017). [査読有]
5. T. Sawada, T. Serizawa "Filamentous Viruses as Building Blocks for Hierarchical Self-Assembly toward Functional Soft Materials" *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 91, 455-466, (2018). [査読有]
6. T. Sawada, T. Serizawa "Antigen-Antibody Interaction-Based Self-Healing Capability of Hybrid Hydrogels Composed of Genetically Engineered Filamentous Viruses and Gold Nanoparticles" *Protein Pept. Lett.*, 25, 64-67, (2018). [査読有]

[学会発表] (計 17 件)

1. 澤田敏樹・村田裕太・柳町みゆき・丸林弘典・野島修一・森川淳子・芹澤武、繊維状ウイルスの組織化構造の制御と機能発現、第64回高分子学会年次大会、札幌コンベンションセンター、2015年5月27日
2. 柳町みゆき・澤田敏樹・芹澤武、液晶性ウイルスを含むゼラチンハイドロゲルからの分子放出、平成27年度繊維学会年次大会、タワーホール船堀、2015年6月10日
3. 柳町みゆき・澤田敏樹・芹澤武、液晶性ウイルスを含むゼラチンハイドロゲルからの分子放出の制御、第44回医用高分子シンポジウム、産業技術総合研究所臨海副都心センター、2015年7月28日

4. 澤田敏樹、繊維状ウイルスを利用したソフトマテリアルの創製、30th Summer University in Hokkaido、定山溪グランドホテル瑞苑、2015年8月28日（招待講演）
5. 澤田敏樹・柳町みゆき・芹澤 武、繊維状ウイルスを含むハイドロゲルからの分子放出の制御、第9回バイオ関連化学シンポジウム、熊本大学、2015年9月10日
6. 柳町みゆき・澤田敏樹・芹澤 武、液晶性ウイルスを含むハイドロゲルからの分子放出の制御、第64回高分子討論会、東北大学、2015年9月16日
7. 澤田敏樹、繊維状ウイルスからなるソフトマテリアルの構築、第16回高分子表面研究討論会、(株)島津製作所三条工場内本館セミナーホール、2015年11月18日（招待講演）
8. Toshiki Sawada・Takeshi Serizawa、Construction and Functionalization of Regularly Assembled Structures Composed of Liquid Crystalline Filamentous Viruses、The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Society、Hawaii Convention Center、2015年12月20日（国際学会）
9. 澤田敏樹・柳町みゆき・芹澤 武、液晶性繊維状ウイルスを含むハイドロゲルからの分子放出の制御、第65回高分子年次大会、神戸国際会議場、2016年5月25日
10. 澤田敏樹・柳町みゆき・芹澤 武、液晶性繊維状ウイルスを含む分子徐放性ハイドロゲルの構築、第26回バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学、2017年7月29日
11. 澤田敏樹・柳町みゆき・芹澤 武、液晶性繊維状ウイルスからなる分子徐放性ハイドロゲルの構築、第65回高分子討論会、神奈川大学、2016年9月16日
12. Toshiki Sawada・Takeshi Serizawa、Construction and Functionalization of Filamentous Virus-based Hydrogel、第26回日本MRS年次大会、横浜開港記念館、2016年12月19日（招待講演）（国際学会）
13. Toshiki Sawada・Yanagimachi Miyuki・Takeshi Serizawa、Construction of Liquid Crystalline Virus-based Hydrogels for Controlled Release of Antibody Proteins、日本化学会第97年次大会、慶應義塾大学、2017年3月17日
14. 澤田敏樹、繊維状ウイルスからなるソフトマテリアルの創製、平成29年度繊維学会年次大会、タワーホール船堀、2017年6月8日（招待講演）
15. 澤田敏樹、繊維状ウイルスを素材とするソフトマテリアルの構築、第2回ソフトマター工学分科会講演会、東洋大学、2017年7月14日（招待講演）
16. Toshiki Sawada、Molecular Recognition-Based Controlled Release of Drug Molecules and Antibodies from Hydrogels、18th International Union of Materials Research Societies International Conference in Asia、

World Trade Centre Nangang Exhibition Hall、2017年11月8日（招待講演）（国際学会）

17. 澤田敏樹、繊維状ウイルスを素材としたソフトマテリアルの構築、九州地区高分子若手研究会・冬の講演会2017、ホテルますの井、2017年11月18日（招待講演）

〔図書〕（計 1 件）

1. 澤田敏樹 他、ゲル化・増粘剤の使い方、選び方事例集、エヌ・ディー・エス、2018、691

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1) 研究代表者

澤田 敏樹 (SAWADA TOSHIKI)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：20581078

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

