

令和元年6月10日現在

機関番号：33803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16402

研究課題名(和文)肺炎治療の為に新規benzoxaborole誘導体専用ナノ粒子の開発

研究課題名(英文) Development of novel polymeric-nanoparticles of benzoxaborole-based drugs for pneumonia treatment

研究代表者

小土橋 陽平 (Kotsuchibashi, Yohei)

静岡理工科大学・理工学部・講師

研究者番号：60723179

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年ホウ素を含有した5員環の低分子化合物であるbenzoxaborole誘導体に、抗炎症性を含め様々な薬効があるとして注目されている。しかしながら、薬物であるbenzoxaborole誘導体をいかにして病巣に送達させるかといった報告は皆無であった。本研究ではbenzoxaborole誘導体専用の高分子ナノ材料の開発に成功した。また開発した技術を適用し、肺炎の原因微生物の増殖抑制にも成功している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国の肺炎による死者数は12万人を超え、死因の第3位となっている。原因微生物としては、細菌、真菌、ウイルスなどが挙げられる。本研究では、抗炎症性を含め様々な薬効があるとして近年急速に開発が進められているbenzoxaborole誘導体と特異的に結合することが可能な新規高分子材料を開発した。Benzoxaborole誘導体の内包と放出を制御することができ、またナノ粒子などに加工することにも成功した。開発した高分子材料により肺炎の原因微生物の増殖抑制が認められ、これまでに実用化のためのプロトタイプを作成した。今後は肺炎治療薬のキャリアとしての製品化を目指し医工連携のもと研究を進めていく。

研究成果の概要(英文)：Recently, the benzoxaborole and its boron-containing derivatives have attracted attention for their possible use as therapeutic drugs for various types of diseases. However, there is almost no report of the carriers of benzoxaborole-drugs based on drug delivery system. In this project, the polymeric nanocarriers were prepared for the benzoxaborole-drugs via a reversible covalent bonding. These polymeric materials also achieved the growth inhibition of the bacteria of pneumonia.

研究分野：高分子化学、バイオマテリアル

キーワード：機能性高分子 ドラッグデリバリーシステム バイオマテリアル ナノゲル ベンゾオキサボロール

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、我が国の肺炎による死者数は12万人を超え、死因の第3位となっている[厚生労働省]。原因微生物としては、細菌、真菌、ウイルスなどが挙げられ、特に免疫の弱い高齢者や小児において感染割合および死亡率が高い。近年、ホウ素を含有した5員環の低分子化合物であるbenzoxaborole誘導体に、様々な抗菌性があるとして注目されている。2014年、Anacor社から発表されたタバボロールは爪白癬の治療薬としてFDAに認可され(ホウ素を有する医薬品としては2番目)、また2015年、同社のAN2728(Crisaborole)は湿疹の治療薬としてphase IIIにて肯定的な結果を得ている(アトピー性皮膚炎外用剤として2016年にFDA認可)。現在、フッ素を別の置換基にすることで、抗gram-negative/positive細菌薬、抗HIV薬、抗炎症薬、マラリア治療薬などの薬品候補が報告され、今後さらに研究開発が活発になることが予測される。つまり、benzoxaborole誘導体は、その置換基を選択することで、肺炎の原因微生物によらずその活動を抑制することが期待される。しかしながら、benzoxaborole誘導体は、主にその薬効が注目され、どのように目的部位に送達させるかといった報告は皆無である。そのような中、申請者は、2013年にbenzoxaborole基を含有するポリマーを合成し、それが糖ポリマーと混合する事で、可逆的なbenzoxaborole-diol結合によりゲル化することを発見した。本研究では、この基盤研究とbenzoxaborole誘導体を組み合わせ、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の概念に基づいた、benzoxaborole誘導体専用の高分子ナノ粒子を開発する着想にいたった。

2. 研究の目的

本研究では、肺炎の原因微生物の増殖を抑制する為の新規な高分子ナノ粒子の開発に取り組む。肺炎の主な原因微生物である細菌および真菌の活動を抑制するbenzoxaborole誘導体を、可逆的な共有結合により含有するナノ粒子を調製することを優先課題とし、benzoxaborole誘導体専用の新規抗菌性高分子ナノ材料を開発する。近年注目されるbenzoxaborole誘導体であるが、低分子化合物としての薬効がもたら注目され、高分子材料としての報告は少ない。実際、論文検索エンジン(Scopus)にて、「benzoxaborole」or「boroxole」or「benzoboroxole」(タイトル/抄録/キーワード)で検索すると、2006年までは5報であった文献が、diolとの結合および抗菌性の発見とともに2015年には112報に急増している。この検索条件に[and「polymer」]を追加すると、2015年9月までにわずか11報(申請者の2報を含む)である。つまりは、benzoxaborole誘導体をターゲットとした高分子材料開発は皆無である。申請者はこれまでに、benzoxaborole基を有するポリマーを用い、cis-型diol基を有する糖ポリマーとpH7.4にて選択的にゲル化を起こす全く新しい概念のもと、癌やウイルス検出の為の高分子材料を開発してきた。また申請者はこれまでに、高分子材料(粒子、ゲル、フィルム、ファイバー)による薬物送達の最適化やスマートポリマーによる薬物放出のon-offシステムを開発してきた。これらの基盤技術をもとに、世界初のbenzoxaborole誘導体専用のナノ粒子の開発ができると考えた。本研究課題の位置づけは、肺炎の原因微生物である細菌および真菌に対し、抗菌性を有するbenzoxaborole誘導体を可逆的な共有結合により内包した、新規benzoxaborole誘導体専用ナノ粒子の提案である。ナノ粒子は、肺炎患部の低pHにより、結合したbenzoxaborole誘導体を放出する。

3. 研究の方法

本申請研究は、3年間を通して行う。ナノ粒子調製の為、benzoxaboroleを含有するモノマーおよびポリマーを合成する。次に、benzoxaborole誘導体を内包したナノ粒子の調製および物性評価を行う。調製したbenzoxaborole誘導体含有ナノ粒子と原因微生物(細菌および真菌)のターゲット分子との相互作用を評価する。さらに細菌、真菌にナノ粒子を播種し増殖性を評価する。これらの結果を検討し、肺炎の原因微生物の増殖を抑制する新規なbenzoxaborole誘導体専用ナノ粒子を開発する。

(1)Benzoxaboroleを含有するモノマーおよびポリマーの合成

Benzoxaborole誘導体は、置換基によって相互作用を起こす分子が異なり、結果として様々な抗菌性を示す。Benzoxaboroleモノマーに関しては、基盤研究としてメタクリルアミド型のものを合成しており、この手法を用いて合成する。合成したモノマー構造は、核磁気共鳴装置(NMR)により解析する。ポリマーが大量に必要な場合は、反応基を有するポリマーを合成後に、benzoxaborole誘導体を修飾する方法も検討する。Benzoxaborole基を含有するポリマーを可逆的付加開列連鎖移動(RAFT)法により重合する。ナノ粒子調製の際、diol基を有するポリマーとの相互作用を高める為、グリコクラスター効果に着目した。糖鎖とタンパク質の相互作用は単独では弱い為、糖鎖が集積することで強い相互作用を発揮する。つまり、benzoxaborole基を適切な親水性モノマーと共重合することで、水に可溶かつdiol基と高い相互作用をもつポリマーを合成することができる。基盤研究であるスマートポリマーの合成技術と組み合わせる事で、水に可溶、室温(pH7.4)にてdiol含有ポリマーとナノ粒子を形成するように精密設計する。ポリマーの物性は、NMR、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)により解析し、ナノ粒子を紫外可視分光光度計(UV-vis)、走査電子顕微鏡(SEM)、動的分散法(DLS)などにより評価する。

(2)Benzoxaborole誘導体を内包したナノ粒子の調製

高分子材料にとって、構成するモノマーユニットの位置は、その機能性を発揮する上で重要で

ある。これは生体分子である核酸やタンパク質の機能が、構成するヌクレオチドやアミノ酸の配列により支配されている事からも明らかである。申請者は基盤研究として、共通の温度応答性セグメントを有するブロック共重合体を複数種合成し、それらを混合する事で、多機能性を有するナノ粒子の開発に成功している。この手法を応用すれば、benzoxaborole含有ポリマー、diol含有ポリマー、薬物であるbenzoxaborole 誘導体の3種を水中にて混合する事のみで、可逆的なbenzoxaborole-diol 結合を駆動力とした、ナノ粒子を調製することができる。肺炎患部における低pHにより結合が切れ、薬物の放出を行えるため、拡散放出による一般的なナノ粒子と比較し、薬物放出の場所、時間、量を設計することができる。また、添加物を必要とせず、数秒にてナノ粒子を調製することができる。内包したbenzoxaborole誘導体の内包量や安定性を評価する。

(3)Benzoxaborole誘導体含有ナノ粒子の抗菌性評価

ターゲット分子との相互作用、細菌および真菌に対する増殖抑制を評価する。具体的には、各菌に対し、benzoxaborole 誘導体単独と比べ、高い増殖抑制が得られる事を目指す。細菌および真菌を各種条件にて培養した後、benzoxaborole誘導体を含有する高分子キャリアを添加し、増殖性について顕微鏡観察および検出キットにより評価する。取り扱いが難しい細菌/真菌に関しては、専門機関/企業を通し評価を行う。非特異的な吸着等の問題が生じた場合は、ナノ粒子中のエチレングリコールの量および鎖長を増加することで対応する。

4. 研究成果

(1)Benzoxaborole を含有するモノマーおよびポリマーの合成

Benzoxaboroleを含有するモノマーを合成し、このモノマーと共重合することで種々のbenzoxaboroleを含有するポリマーをRAFT重合により重合した。共重合するモノマーとして、一般的な(メタ)アクリルアミドおよび(メタ)アクリレートが適用することができ、幅広い材料設計を行うことができる。先行研究として、ジオール基を有するポリビニルアルコールと合成したbenzoxaborole含有ポリマーを混合することで、benzoxaborole-ジオール間の可逆的な共有結合に起因したゲル化およびフィルム化に成功した[雑誌論文①]。混合する各ポリマーの組成や比率を変化させることでマイクロ～ナノスケールの粒子を調製することにも成功している。

(2)Benzoxaborole誘導体を内包したナノ粒子の調製

基盤技術となるナノ粒子の調製方法について、簡便かつ迅速にナノ粒子をデザインおよび調製することが可能なナノ粒子調製キットの開発に成功した[雑誌論文④]。キットから用途に適した高分子を選択し水へ溶解、37℃にて15分程度保温することでナノ粒子が調製される。この手法は、本申請の目的であるbenzoxaborole 誘導体専用の高分子ナノ粒子の調製にそのまま適用することができる。また、この研究過程において6段階の温度応答性を有するブロック共重合体の合成と自己集合によるナノ粒子の開発にも成功している[雑誌論文③]。

Benzoxaborole 誘導体と結合するポリマーとしてジオール基を有することが条件になるが、これまでの研究においてモノマー/ポリマーの合成に多段階の有機反応を有するや十分な結合定数が得られないなどの問題があった。本プロジェクト中に、これらの問題を解決するpoly(glycerol methacrylate) (poly(GMA))を合成することに成功した(図1)。Poly(GMA)はモノマー合成およびポリマー合成を水系にて行える。さらにbenzoxaboroleとの結合定数はグルコースと同程度で、血中グルコース濃度の条件において安定に存在できることを確認している。Poly(GMA)をベースとしたナノ粒子はbenzoxaborole 誘導体を内包することができ、またその放出をpHによって制御することに成功した(図2)。低pHによりbenzoxaborole 誘導体の放出は、肺炎患部の低pHを想定している[雑誌論文 in preparation]。しかしながら、現在までのところジオール基含有ナノ粒子へのbenzoxaborole 誘導体の内包量は数%であり改良が必要である。具体的にはナノゲルの構造および組成を制御することで内包量の増加を行う。

また混合するポリマーの組成や濃度により、ゲルフィルムやインジェクタブルゲルなどへの形態制御も可能であり、今後販売されるbenzoxaborole系薬物の専門キャリアとして様々なニーズに対応することが期待される[雑誌論文 in preparation, 学会発表⑤]。

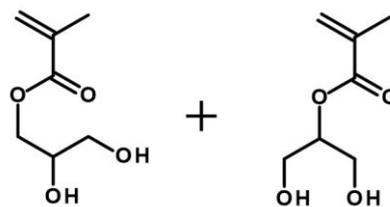


図1. Glycerol methacrylate.

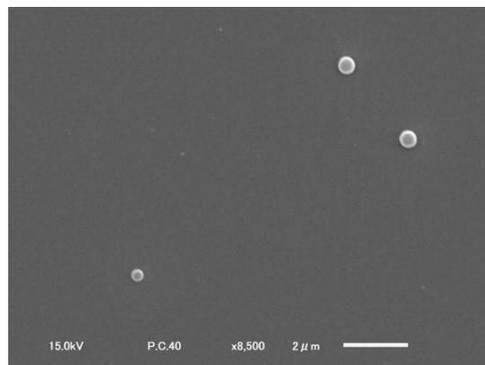


図2. SEM image of the glycerol methacrylate-based nanoparticles.

(3)Benzoxaborole誘導体含有ナノ粒子の抗菌性評価

Benzoxaborole 誘導体が単独で抗菌性(真菌や細菌)を示すことは、すでに報告されている

(F.L. Rock et al., Science, 2007, 316, 1759)。②で調製した benzoxaborole 誘導体を含むナノ粒子は、ポリマーの組成や pH により薬物の放出挙動を制御することができる。現在、黄色ブドウ球菌やその他の細菌・真菌への効果をまとめている[雑誌論文 in preparation]。

これらの研究過程で、ポリマーにカチオン性基を導入することで細菌・真菌に対する抗菌性を向上させることを発見した[雑誌論文②]。これらのポリマー材料に、上記の技術を応用することでフィルム化およびナノ粒子化することにも成功している。抗菌性は、高分子の構造により影響を受けることが明らかとなり、グラム陽性および陰性菌、真菌に対し効果を発揮した。また薬剤耐性菌のひとつであるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に対しても抗菌性を示すことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Y. Kudo, J. Ono, Y. Kotsuchibashi*, Controlled water-soluble properties of poly(vinyl alcohol) films via the benzoxaborole-containing temperature-responsive copolymers, *Polymer*, 査読有, 175, 2019, 1-7. (<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2019.04.074>), *Corresponding author
- ② T. Shiga, H. Mori, K. Uemura, R. Moriuchi, H. Dohra, A. Yamawaki-Ogata, Y. Narita, A. Saito, Y. Kotsuchibashi*, Evaluation of the bactericidal and fungicidal activities of poly([2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethyl ammonium chloride)(poly (METAC))-based materials, *Polymers*, 査読有, 10, 2018, 947. (<https://doi.org/10.3390/polym10090947>)
- ③ Y. Kudo, H. Mori, Y. Kotsuchibashi*, Preparation of an ethylene glycol-based block copolymer consisting of six different temperature-responsive blocks, *Polymer Journal*, 査読有, 50, 2018, 1013-1020. (<https://doi.org/10.1038/s41428-018-0091-1>)
- ④ Y. Kotsuchibashi*, C.M. Lee, I. Constantinescu, L.E. Takeuchi, S. Vappala, J.N. Kizhakkedathu, R. Narain, M. Ebara, T. Aoyagi, A nanoparticle-preparation kit using ethylene glycol-based block copolymers with a common temperature-responsive block, *Polymer Chemistry*, 査読有, 8, 2017, 7311-7315. (10.1039/C7PY01541K)

[学会発表] (計 18 件)

- ① 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基を含有する高分子による可逆的共有結合を伴うハイドロゲルの開発, 第 68 回高分子学会年次大会, 大阪, 2019 年, 口頭
- ② 小土橋 陽平, 工藤 遥子, 森 彦光, 6 種のエチレングリコール型温度応答性セグメントからなるブロック共重合体の自己集合について, 第 68 回高分子学会年次大会, 大阪, 2019 年, ポスター
- ③ 森 彦光, 志賀 駿貴, 上村 桂一, 緒方 藍歌, 成田 裕司, 齋藤 明広, 小土橋 陽平, ポリ[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムクロリド共重合体の構造制御と抗菌性評価, 第 68 回高分子学会年次大会, 大阪, 2019 年, ポスター
- ④ 工藤 遥子, 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基含有高分子によるポリビニルアルコールの機能化と溶解性制御, 第 68 回高分子学会年次大会, 大阪, 2019 年, ポスター
- ⑤ 勝部 皓太, 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール系薬剤の為の高分子キャリアの開発, 第 68 回高分子学会年次大会, 大阪, 2019 年, ポスター
- ⑥ Y. Kotsuchibashi, R. Yamashita, M. Kobayashi, Y. Yoshida, Analysis of polymeric gels cross-linked via iron ions by Mossbauer spectroscopy, IWMS2018(国際学会), 愛知, 2018 年, ポスター
- ⑦ 小土橋 陽平, 6 種のエチレングリコール型温度応答性セグメントからなるブロック共重合体の合成, 第 67 回高分子討論会, 北海道, 2018 年, ポスター
- ⑧ 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基を含有する高分子による可逆的共有結合を伴うソフトマターの開発, 第 67 回高分子討論会, 北海道, 2018 年, 口頭
- ⑨ 森 彦光, 志賀 駿貴, 上村 桂一, 緒方 藍歌, 成田 裕司, 齋藤 明広, 小土橋 陽平, ポリ[2-(メタクリロイルオキシ)エチル]トリメチルアンモニウムクロリド共重合体を用いた抗菌性高分子の開発, 第 67 回高分子討論会, 北海道, 2018 年, ポスター

- ⑩ 工藤 遥子, 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基含有高分子によるポリビニルアルコールの機能化と安定性評価について, 第 67 回高分子討論会, 北海道, 2018 年, ポスター
- ⑪ 小土橋 陽平, エチレングリコール系温度応答性高分子を用いたナノ粒子調製キットの開発, 第 67 回高分子学会年次大会, 名古屋, 2018 年, 口頭
- ⑫ 工藤 遥子, 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基含有高分子によるポリビニルアルコールの簡便な機能化について, 第 67 回高分子学会年次大会, 名古屋, 2018 年, ポスター
- ⑬ 小土橋 陽平, ナノ粒子キットの開発～自己集合ナノ材料による多機能性および高い薬物内包率の実現～, 地域創成フォーラム, 静岡, 2017 年, ポスター
- ⑭ 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基による機能性高分子ゲルの開発, 第 66 回高分子討論会, 愛媛, 2017 年, 口頭
- ⑮ 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基によるヒドロキシル基含有ポリマーへの機能性付与について, 第 21 回次世代医工学研究会, 仙台, 2017 年, 口頭
- ⑯ 小土橋 陽平, ベンゾオキサボロール基を含有する新規バイオマテリアルの開発, 第 20 回次世代医工学研究会, 鹿児島, 2017 年, 口頭
- ⑰ 小土橋 陽平, ヒドロキシル基を含有する高分子の機能化と医用高分子としての応用について, 地域創成フォーラム, 静岡, 2016 年, 口頭
- ⑱ 小土橋 陽平, 荏原充宏, ベンゾオキサボロール基含有ポリマーによるヒドロキシル基含有ポリマー材料の機能化について, 第 65 回高分子討論会, 神奈川, 2016 年, 口頭

〔図書〕 (計 1 件)

- ① Y. Kotsuchibashi, (Chapter title: Drug Delivery System), Wiley-VCH, Materials Nanoarchitectonics, 2018 年, 総ページ 336. (ISBN: 978-3-527-34290-7)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

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

○取得状況 (計 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

①

研究協力者氏名：荏原 充宏（物質・材料研究機構）

ローマ字氏名：EBARA Mitsuhiro

②

研究協力者氏名：李 千萬（大阪大学医学部）

ローマ字氏名：LEE Chun Man

③

研究協力者氏名：Ravin Narain（アルバータ大学，カナダ）

ローマ字氏名：NARAIN Ravin

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。