

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15344

研究課題名（和文）バイオ医薬品デリバリーシステムに向けた糖タンパク質と人工高分子の融合材料の開発

研究課題名（英文）Development of fusion materials based on glycoproteins and synthetic polymers for delivery system of biopharmaceuticals

研究代表者

中畑 雅樹（Nakahata, Masaki）

大阪大学・理学研究科・助教

研究者番号：40755641

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）：本研究では、バイオ医薬品に対する新しいドラッグキャリア材料の開発を見据えて、分子認識部位を有し高密度に糖鎖修飾された糖タンパク質ムチンを可逆的結合で架橋するという設計による高分子ハイブリッド材料の開発とその応用を提案し、研究に取り組んだ。材料の合成と力学特性の自在制御に成功し、生理的条件下での分解性をチューニング可能であった。in vitroでの評価も行き、材料の非毒性と種々の細胞等との相互作用について知見を得、論文として発表した。これにより、本研究の材料設計の有効性を実証することができた。また、計画の中で当初予想していた計画の範疇に止まらず、さらなる応用に向けた基盤を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バイオ医薬品は従来の低分子医薬品と比較して治療効果が高いが、その多くは化学的安定性が低いために、低分子医薬品と同様の製剤・投与方法では容易に失活してしまう。薬剤治療における患者のQOL向上のためには、必要な量を・必要な場所で・必要なタイミングでリリースする材料が有効であるが、バイオ医薬品の品質を担保し、温和な外部刺激のみを用いるという制約のもとでは、根本的にシステムを設計し直す必要がある。本研究の成果は、バイオ医薬品に対する新しい DDS キャリア候補となる材料を創出するものであり、バイオ医薬品のキャリアに求められる要素を同時に満たし、現状の課題を一挙に解決するための礎となるものである。

研究成果の概要（英文）：In this work, we proposed a polymeric hybrid material consisting of mucin cross-linked with polymers having molecular recognition sites by reversible bonds, with a view to developing a new drug carrier material for biopharmaceuticals. In vitro experiments indicated non-toxicity of the material, and its interaction with various cells were summarized and published as a paper. These findings demonstrated the effectiveness of the material design in this work. Furthermore, we were able to establish a foundation for further applications beyond the scope of the initial plan, which is ongoing.

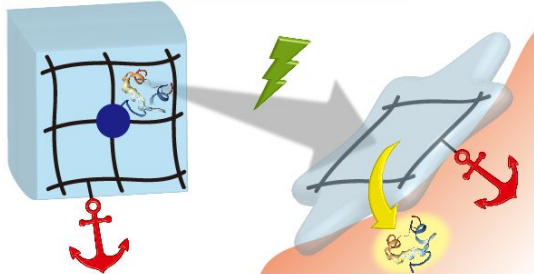
研究分野：高分子科学

キーワード：バイオ医薬品 ムチン ポロン酸 ハイブリッド材料 ヒドロゲル

1. 研究開始当初の背景

糖鎖・タンパク質・核酸や生体抽出物・細胞をも含む「バイオ医薬品」が近年次々と誕生している。バイオ医薬品は従来の低分子医薬品と比較して治療効果が高く、その生産量は増加の一途を辿り、市場規模は数十兆円、全医薬品に占める割合は 30%以上に達すると言われていた。しかし、バイオ医薬品の多くは化学的安定性が低いため、従来の低分子医薬品と同様の製剤・投与方法では容易に失活してしまうことが課題とされている。薬剤治療における患者の Quality of Life (QOL) 向上のためには、できる限り侵襲性が低くかつ投与回数の少ない手法が望ましいが、上記のような制約から、バイオ医薬品は注射投与のような侵襲性の高い投与方法を余儀なくされていた。投与回数の削減には、必要な量を・必要な場所で・必要なタイミングでリリースするシステムが有効であるが、バイオ医薬品の品質を担保し、温和な外部刺激のみを用いるという制約のもとでは、根本的にシステムを設計し直す必要があった。このように、バイオ医薬品に対する DDS のキャリアには必要とされる特性が非常に多く、開発が遅れていた。それぞれの解決に寄与する方法は個々に報告されていたが、全てを満たす方法は未だに報告されていなかった。「如何にして失活しやすいバイオ医薬品を保護しながら目的部位へ送達し、温和な刺激のみを用いて徐放するか」という問い(図1)に答えるブレイクスルーが求められていた。

1. バイオ医薬品の固定化・保護



2. 目的部位への標的化・送達

3. 温和な刺激による分解・徐放

図1. バイオ医薬品デリバリーシステムのキャリアに求められる要素。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの課題を解決するために、分子認識部位を有し高密度に糖鎖修飾された糖タンパク質を架橋点に組み込んだ設計(図2)による高分子ハイブリッド材料を提案した。これにより、バイオ医薬品をヒドロゲルの網目に可逆的結合を介して固定化することで物理的・化学的に保護し、分子認識能を利用して目的とする部位へ送達し、目的部位で温和な刺激によって徐放することが可能になる。このように、バイオ医薬品のキャリアに求められる要素を同時に満たし、現状の課題を一挙に解決することを目指した。

本研究のキーとなる化合物として、動物の粘膜や粘液の主成分であるムチン型糖タンパク質に着目した。ムチンはコアとなるタンパク質に高密度に糖鎖が修飾された基本骨格からなり(図3:分泌型)、側鎖の高い親水性と立体障害によりタンパク質分解酵素に対する耐性を有する。中でも、末端に細胞膜結合部位を有するタイプ(図3:膜結合型)は、糖鎖や細胞膜結合部位を介して多種多様なタンパク質と相互作用することが知られている[1]。これらの特徴を利用し、糖タンパク質を介してバイオ医薬品を材料に組み込めれば、本研究の目的を達成できると考えた。しかし、ムチンをバイオマテリアルの材料として積極的に利用する研究は未だ端緒に着いたばかりであり[2]、本研究の問いを解決するために

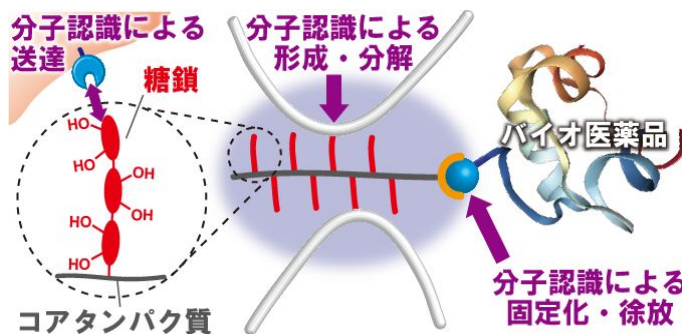


図2. 本研究の材料設計。

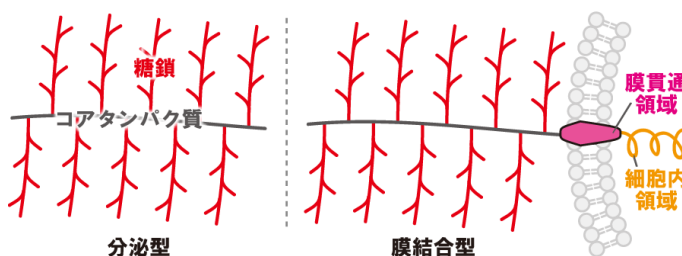


図3. ムチン型糖タンパク質の模式図。

に必要な「ムチン様糖タンパク質を骨格に組み込み、温和な条件で形成・分解可能な材料」は全く報告されていなかった。本研究は、研究代表者の技術である可逆的な分子認識により架橋された高分子材料に端を発しており、これまでにない独自の材料設計に基づいたドラッグキャリアを提案するものであった。これにより、応用が制限されていたバイオ医薬品の新たな可能性を創造することを目的としており、本研究期間内では、この材料設計に基づくハイブリッド材料の開発と in vivo 応用に向けた基盤を築くところまでを目的としていた。

3. 研究の方法

(1) 基盤材料の開発

本研究の基盤材料となる、ムチンを組み込んだ高分子材料を設計・合成した。糖類と可逆的な結合を形成することが知られているボロン酸(図4)に着目し、ボロン酸を含有する合成高分子とムチンとの可逆的な結合により高分子ネットワークの形成を試みた。(A)ムチンとボロン酸含有ポリマーの溶液中での混合、もしくは(B)ムチン共存下でのモノマーの重合、という二種類の方法によってそれぞれヒドロゲルの形成の可否を調査した。結合の可逆性を活かして、外部刺激として生体に無害な糖類などの温和な刺激を用いて架橋密度を制御し、生理的条件下で材料の力学物性や分解を自在にチューニング可能にすることを目標とした。

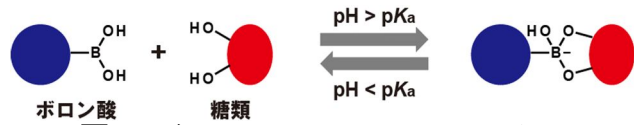


図4. ボロン酸と糖類の可逆的結合。

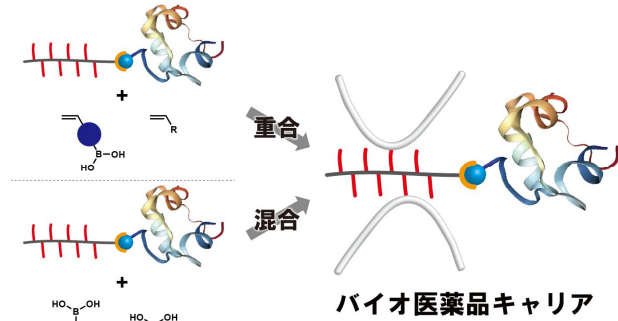


図5. バイオ医薬品共存下での材料形成戦略。

(2) 生物構成要素との相互作用、バイオ医薬品・プロバイオティクス等との相互作用検討

得られた高分子材料のバイオマテリアル方面への応用可能性を検討するため、手法Aで作製したヒドロゲルについては生理的条件下での安定性、およびムチンの機能の一つである細胞接着の抑制について種々の哺乳類細胞を用いて評価した。手法Bで作製したゲルについては、将来的に自在な形に成形したヒドロゲルを局所的に貼り付けてバイオ医薬品を局所投与することなどを見据えて、光造形3Dプリンティング技術への応用可能性を評価した。ムチンの粘液の主成分としての特徴を活かしてここでは、3Dプリントしたゲル上でプロバイオティクスとしての各種腸内細菌(乳酸菌、ピフィズス菌)の培養を試みた。

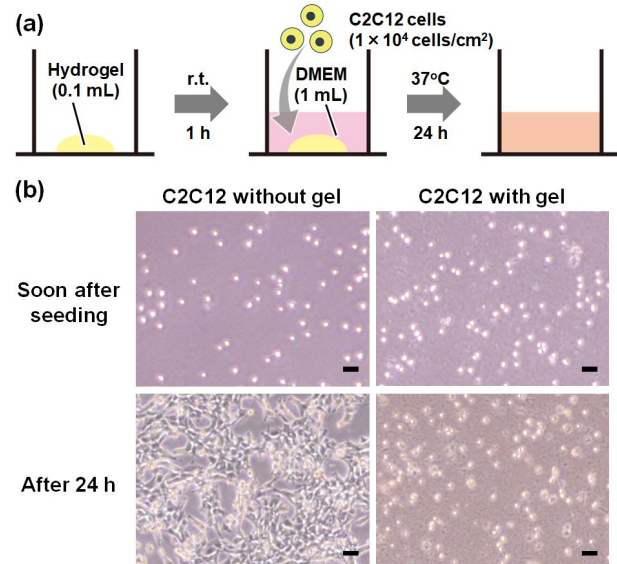


図6. 手法Aにて形成したヒドロゲルと細胞の相互作用。

4. 研究成果

(1) ムチン含有ヒドロゲルの形成

手法ABいずれも、ヒドロゲルを与える条件を見出し、レオロジー測定からもゲルであることが示された。合成高分子へのボロン酸部位の導入率に応じてゲルの弾性率が大きくなることより、ボロン酸エステルが架橋として機能していることが支持された。

2. ヒドロゲルの機能評価

手法Aで作製したゲルのうち、ボロン酸の導入率がある程度以下のものは細胞培養用培地中で速やかに溶解し、ある程度以上のものは溶解せずに形を保った。ゲルの共存下、培地中でC2C12細胞をはじめとする種々の動物細胞を培養したところ(図6a)、ゲル非共存下と比較して培養皿への細胞接着が抑制された(図6b)。ゲルやその分解物によって培養皿表面が覆われ、細胞の接着を抑制したと考えられる。本研究成果は、研究期間内に論文として投稿し、研究期間終了直後に掲載された[3]。

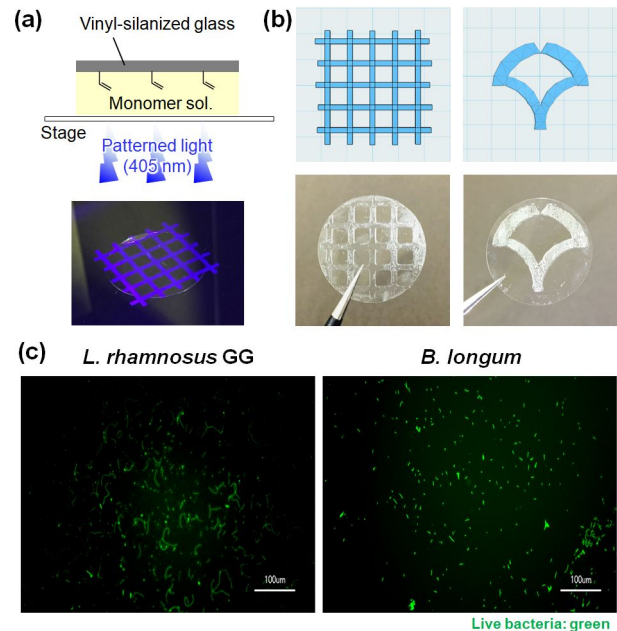


図7. 手法Bにて形成したヒドロゲルと細菌の相互作用。

手法 B で作製したゲルは生理的条件下でも溶解することなくその形状を維持した。光重合開始剤による重合と組み合わせることで、光造形型 3D プリンターを用いて任意の形にゲルを造形することに成功した(図 7ab)。ヒト腸内に棲息する腸内細菌の一種である乳酸菌 *L. rhamnosus* GG およびビフィズス菌 *B. longum* をゲル上に播種したところ、これらの細菌のゲル上での生存・接着を確認した(図 7c)。以上の結果は、材料に含まれたムチンおよびポロン酸の特性が反映されたものと考えている。以上の結果は、国内学会にて研究代表者が発表し[4]、論文発表に向けて準備中である。

以上のように、ムチンを、さらなる化学修飾を必要とせずに骨格に組み込んだ生物-合成ハイブリッドヒドロゲルの開発に成功し、細胞非接着性コーティングや腸内細菌培養基材をはじめとするバイオマテリアルへの応用可能性を示すことができた。今後はこれを応用して、本研究の中で見出された腸内細菌との相互作用を活かして、広い意味での DDS の基盤材料として、プロバイオティクスの培養場としての発展的な展開に向けて新たなプランを立ち上げ、引き続き研究に取り組んでいく。

< 引用文献 >

- [1] Senapati et al., *Trends Biochem. Sci.* **2009**, 35, 236-245.
- [2] Petrou et al., *Biomater. Sci.* **2018**, 6, 2282-2297.
- [3] Nakahata et al., *Macromol. Biosci.* **2022**, Early View. (DOI: 10.1002/mabi.202200055)
- [4] 第 70 回高分子討論会 2021, 2S02.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 中畑雅樹	4. 巻 76
2. 論文標題 “ 生きている ” 建築材料 - 光合成細菌を生きたまま埋め込んだ構造材料 ”	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 化学	6. 最初と最後の頁 64-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hayashi Kentaro, Matsuda Mami, Mitake Nodoka, Nakahata Masaki, Munding Natalie, Harada Akira, Kaufmann Stefan, Takashima Yoshinori, Tanaka Motomu	4. 巻 4
2. 論文標題 One-Step Synthesis of Gelatin-Conjugated Supramolecular Hydrogels for Dynamic Regulation of Adhesion Contact and Morphology of Myoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Applied Polymer Materials	6. 最初と最後の頁 2595 ~ 2603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsapm.1c01902	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakahata Masaki, Tominaga Naoki, Saito Keishi, Nishiyama Keita, Tanino Yuya, Saiki Kiyoshiro, Kojima Masaru, Sakai Shinji	4. 巻 22
2. 論文標題 A Bio synthetic Hybrid Hydrogel Formed under Physiological Conditions Consisting of Mucin and a Synthetic Polymer Carrying Boronic Acid	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Macromolecular Bioscience	6. 最初と最後の頁 2200055 ~ 2200055
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mabi.202200055	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中畑雅樹
2. 発表標題 生体分子認識を基盤とした生体構成要素と対話・融合する高分子材料の開発
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中畑雅樹
2. 発表標題 生物材料と人工材料を分子認識でつなぐ
3. 学会等名 「水圏機能材料」第2回若手スクール(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤圭史, 中畑雅樹, 小嶋 勝, 境 慎司
2. 発表標題 腸内細菌培養場への応用を目指したムチンとポロン酸との架橋により形成されるヒドロゲルの開発
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中畑雅樹, 齋藤圭史, 小嶋 勝, 境 慎司
2. 発表標題 ムチン-ポロン酸相互作用により形成されるヒドロゲルの開発と腸内細菌培養基材への応用
3. 学会等名 第86回化学工学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中畑雅樹, 齋藤圭史, 富永直樹, 小嶋 勝, 境 慎司
2. 発表標題 ムチン-ポロン酸相互作用により形成されるバイオ超分子マテリアルの開発と腸内細菌培養への応用
3. 学会等名 第70回高分子討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------