

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：34416

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21680043

研究課題名（和文）

骨疾患治療を指向した新規高分子医薬の開発

研究課題名（英文）

Preparation of bone-specific polymer biomaterials

研究代表者

岩崎 泰彦 (IWASAKI YASUHIKO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90280990

研究成果の概要（和文）：

本研究では、より安全な骨治療用高分子医薬の創出を目的として、側鎖に遊離のリン酸基を持つポリリン酸エステルアイオノマーを合成し、このポリマーの石灰化や骨芽細胞の機能におよぼす影響について調べた。ポリリン酸エステルアイオノマーの細胞毒性はビスホスホネートと比較して、著しく低かった。さらに、このポリマーがマウス骨芽細胞により産生したカルシウム沈着物に対し良好に吸着することが認められた。以上の結果からポリリン酸エステルアイオノマーが骨指向性医薬として有用な高分子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to prepare bone specific polymer biomaterials, we have synthesized polyphosphoester ionomers and compared their fundamental actions with bisphosphonates. The adsorption amount of polyphosphoester ionomers on hydroxy apatite (HAp) microparticles was increased with an increase in the ionized units in polyphosphoesters and the affinity of ionomers for HAp microparticles was enhanced by formation of sodium salt. Polyphosphoesters ionomers could significantly reduce HAp-formation compared with pamidronate. Moreover, the resorption of HAp was also reduced with addition of polyphosphoester ionomers as a similar to pamidronate. The cytotoxicity of polyphosphoester ionomers was significantly lower than that of pamidronate and cell compatibility of the ionomer further improved by sodium salt formation of the polyphosphoester ionomers. Furthermore, the increment in ALP activity and mineral deposition of mouse osteoblast cells in contact with ionomers was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	10,400,000	3,120,000	13,520,000
2010年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	19,100,000	5,730,000	24,830,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学、医用生体工学・生体材料学

キーワード：ポリリン酸エステル、ミネラルゼーション、有機触媒、生体適合性、生分解性、開環重合、骨粗鬆症、骨転移

1. 研究開始当初の背景

世界的に高齢化が進行している状況において、高齢者が活気ある自立した社会生活をおくるために、医療、健康に関わるバイオサイエンスの進歩は必至であり、とりわけ安全かつ確かな医療器具や医薬品の開発は重要な課題と言える。

加齢に伴い著しく増加するのが骨の疾患であり、特に骨粗鬆症は我が国の国民病と言っても過言ではない。骨量の低下は加齢とともに必然的に起こり、慢性化する。生活習慣の適正化により進行の程度は変わってくるものの、個人によってもその効果は異なる。そのため、過度の骨粗鬆症の患者には骨量の減少を遅延する医薬品“ビスホスホネート系化合物”が適用されている。ビスホスホネートは、ピロリン酸より想起された有機リン酸化合物であり、骨の吸収を抑制する。その作用機序は、ATPの基質化による破骨細胞への障害、あるいは細胞骨格タンパク質の産生経路を阻害することと考えられている。ビスホスホネートの性質に関する共通の理解は、リン酸カルシウムの結晶形成および凝集の阻害、また一度形成された結晶の融解を抑制することである。すなわち、カルシウムイオンと強固に結合することが、ビスホスホネートの薬理活性に関係している。ビスホスホネートは、骨粗鬆症の第一選択薬と位置づけられているが、食道内で炎症を引き起こすことや、消化管での吸収が極端に悪いことなどの欠点もある。そのため、経口投与の場合は薬物が食物に含まれる金属イオンとの塩形成を防ぐために空腹時に服用する必要がある、また服用後は食道内で留まることを防ぐため30分程度立位または座位を保たなければならないことなど不慣れた制限が強いられる。

2. 研究の目的

本研究ではビスホスホネートと同様な薬理活性を示し、従来の低分子化合物に比べ高い安全性と持続的効果を期待できる新たな高分子を提供することを目的とした。薬物を高分子化することにより、低分子特有の過度の炎症が抑制されることがまず期待される。また、高分子効果により、カルシウムイオンとの強固な結合が実現し、その強さは分子構造によって厳密に調節できる。ビスホスホネートの吸収性の低さはその親水性の高さに起因する。高分子医薬は低分子医薬に比べ吸収が低下することが懸念されるが、透過性を向上させるために両親媒的な性質を高分子鎖に導入することや、消化管特有の酵素で分解される構造を付与することにより、薬理活性を維持したまま従来の低分子医薬より高い透過性を実現する。さらに、他の薬物と化学的、物理的に複合化することも可能になり、治療効果を格段に高めることも期待できる。

多様な分子設計を可能にする高分子の強みを活かし、新規化合物の設計に着手した。

ビスホスホネートと同様な薬理活性を示す高分子医薬は国内外を通じてこれまで認められておらず、本研究は極めて新規性に富む重要な研究課題である。

我々は、これまで様々な環状リン酸エステルの合成に成功しており、これらを開環重合することにより、生分解性ナノ粒子(*Biomacromolecules* 2006;7:1433)やヒドロゲル(*Biomaterials* 2007;28:3121)の調製に成功した。さらに、ごく最近では温度応答性を示すポリリン酸エステルの構造も見出した(*Macromolecules* 2007;40:8136)。本研究では、薬理活性という新たな機能に重点をおき、高分子の分子設計に着手した。

3. 研究の方法

(1). ポリリン酸エステルアイオノマーの合成とキャラクタリゼーション

本研究ではポリリン酸エステルを環状リン酸エステルの開環重合により合成するが、側鎖に遊離のリン酸基を持つ高分子を開環重合で合成することは困難であるため、保護基のついたモノマーを重合し、脱保護して高分子を得た。具体的には、はじめにモノマーとして2-クロロ-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホランとベンジルアルコールを反応し、2-ベンジルオキシ-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン(BP)を合成した。BPを再結晶で精製した後、十分に乾燥した。BPをモノマーの2-エトキシ-2-オキソ-1,3,2-ジオキサホスホラン(EP)に所定の割合で混和、溶解後、この溶液に開始剤を添加し、バルク開環重合により高分子を合成した。重合の後、水素添加法によりベンジル基を脱保護して、遊離のリン酸基を持つ高分子を得た。

環状リン酸エステルの開環重合にはトリイソブチルアルミニウムやオクタン酸スズなどの金属触媒が使用されるが、これらは高分子中に残存し毒性を示す原因となることが懸念される。そこで、医薬品として使用する高分子を得るため、金属触媒を用いない新たな合成法について検討した。有機系重合触媒としてジアザビスクロウンデセン(DBU)などの含窒素複素環化合物を用いた。これらの重合触媒を用いた反応は、配位重合機構で進行し、水酸基を重合起点とした反応が可能になる。そこで、ベンジルアルコールとコレステロールを開始剤として使用した。高分子の組成および構造解析は ^1H , ^{31}P NMR (共通設備)、FT-IR(専用設備)を用いて行い、分子量測定には現有のゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)を用いた。

(2). 物理化学的評価

***HAp 形成阻害活性**

ポリリン酸エステルアイオノマーもしくはパミドロネートを 0.1mM 溶解したリン酸水素二カリウム溶液 ($[K_2HPO_4]=1.48\text{ mM}$) と塩化カルシウム溶液 ($[CaCl_2 \cdot 2H_2O]=1.35\text{ mM}$) をそれぞれ 0.05 M トリス緩衝液を用いて調製し、これらを 5 mL ずつ混合した。この溶液に、HAp の粒子を 10mg 添加し、一晩 37°C で震盪した。その後、析出物を遠心除去し、溶存しているカルシウムイオンの濃度を原子吸光分析により求めた。

*** HAp 粒子の溶解阻害**

所定量の HAp 粒子をトリス緩衝液中に分散させ、そこに終濃度が 24 μM になるようにポリリン酸エステルアイオノマーもしくはパミドロネートを添加した。8 時間 37°C で静置した後に、HAp 粒子をトリス緩衝液で洗浄し、pH5 に調製した酢酸緩衝液に移した。24 時間 37°C で震盪した後、不溶分を濾別し、濾液に溶存しているカルシウムイオンの濃度を原子吸光分析により求めた。

(3). 生物学的評価

*** 細胞毒性試験**

マウス骨芽細胞(MC3T3-E1)を組織培養シャーレ上に播種し一晩静置したのち、所定濃度のポリリン酸エステルアイオノマーもしくはパミドロネートを添加した。さらに 1 日培養した後、細胞数を WST-8 アッセイキットにより求めた。また、細胞の形態を走査型電子顕微鏡(購入設備)で観察した。

***骨芽細胞産生カルシウム沈着物への吸着**

蛍光修飾したポリリン酸エステルイオノマーを分化培地中で一ヶ月間培養したマウス骨芽細胞に接触させ、骨芽細胞が産生したカルシウム沈着物に体するポリリン酸エステルイオノマーの吸着性を蛍光顕微鏡で調べた。

4. 研究成果

本研究で合成したポリリン酸エステルイオノマーの構造を Fig.1 に示す。分子中のベンジルオキシ基とエトキシ基の組成比がそれぞれ 0.05:0.95(PH₅E₉₅), 0.09:0.91(PH₉E₉₁), 0.21:0.79(PH₂₁E₇₉)のポリリン酸エステルイオノマーを合成した。各ポリマーの分子量をゲル浸透クロマトグラフィーで測定したところ、それぞれ $M_n=9.50 \times 10^3$, 1.19×10^4 , 1.03×10^4 ($M_w/M_n=1.54, 1.53, 1.58$) となった。

本研究で合成したポリリン酸エステルイオノマーの細胞毒性の結果を Fig.2 に示した。各サンプルの IC₅₀(g/dl)はパミドロネート, PH₂₁E₇₉, PH₉E₉₁, PH₅E₉₅, PH₂₁E₇₉-Na, PEP の順に 3.77 $\times 10^{-3}$, 0.62, 0.97, 1.35, 2.41, 9.57 となり、PH₂₁E₇₉-Na の IC₅₀ はパ

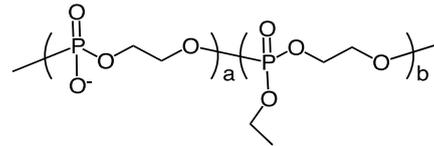


Fig. 1 Chemical structure of polyphosphoester ionomer

ミドロネートの約 640 倍、PH₂₁E₇₉ の約 4 倍高いことがわかった。毒性が認められない濃度において細胞は紡錘状の形態をしており、良好に伸展していた。

HAp に対するポリリン酸エステルイオノマーの親和性評価の結果を Fig.3 に示す。ポリリン酸エステルイオノマー側鎖の遊離のリン酸基の組成が増すにつれて HAp への吸着量の増加がみられた。また、側鎖の遊離のリン酸基の割合が 10mol%を超えると、ポリリン酸エステルイオノマーはパミドロネートよりも HAp に対する吸着量が多くなることも認められた。PH₂₁E₇₉-Na の吸着量が PH₂₁E₇₉ よりも高くなっている理由として酸型よりナトリウム塩の方がイオン化しやすいことがひとつの要因といえる。また、水中に存在するナトリウムイオンは HAp に取り込まれるので、ナトリウムイオンが存在していない場合よりも HAp の表面電位が上昇し、ポリリン酸エステルイオノマーが吸着しやすくなったことが考えられる。

ポリリン酸エステルイオノマーの HAp 形成阻害活性実験の結果を Fig. 4 に示す。分子内の遊離のリン酸基が 5mol%以上になる

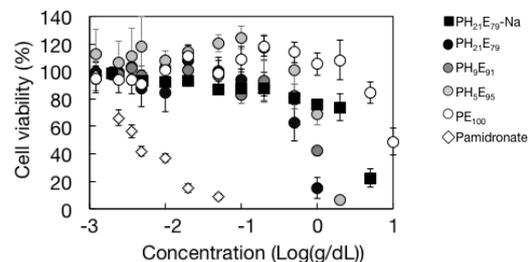


Fig. 2 Viability of MC3T3 cells in contact with polyphosphoester ionomers or pamidronate.

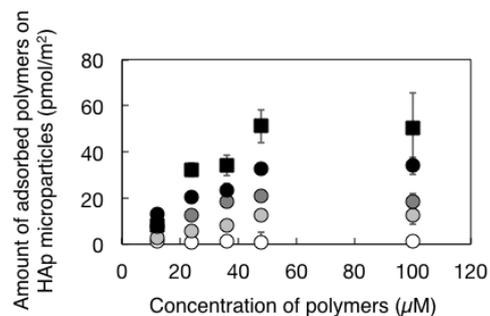


Fig. 3 Adsorption amount of polyphosphoesters ionomers on HAp microparticles. ■:PH₂₁E₇₉-Na; ●:PH₂₁E₇₉; ●:PH₉E₉₁; ●:PH₅E₉₅; ○:PE₁₀₀.

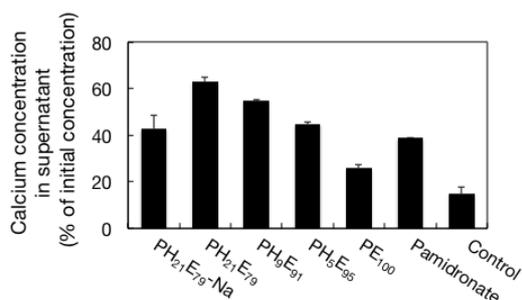


Fig. 4 Effect of additives on inhibition of HAp formation from mixing phosphate solution (K_2HPO_4 , 1.48 mM) and calcium solution ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.35 mM) in a 0.05 M Tris buffer (pH 7.4).

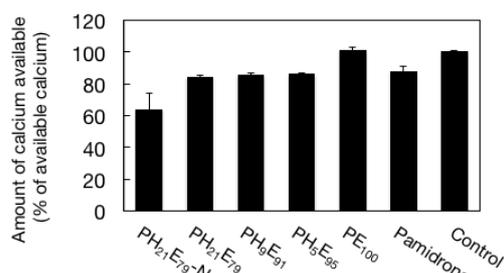


Fig. 5 Effect of additives on resorption of HAp microparticles in acetate buffer (pH 5).

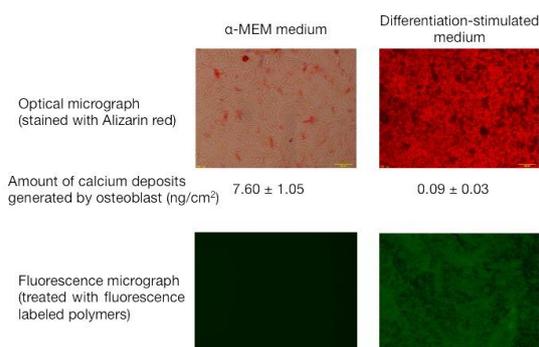


Fig. 6 Adsorption amount of polyphosphoesters ionomers on HAp microparticles. ■□PH₂₁E₇₉-Na; ●□PH₂₁E₇₉; ●:PH₉E₉₁; ●:PH₅E₉₅; ○:PE₁₀₀.

とポリリン酸エステルアイオノマーはパミドロンート以上の HAp 形成阻害活性を示すことがわかった。ポリリン酸エステルアイオノマー中の遊離のリン酸基の増加に伴い形成阻害効果が高くなったのは、溶液中のカルシウムイオンとの結合性が増したことにより HAp の形成に使用されるカルシウムがより減少したためである。また、ナトリウム塩にすることでポリリン酸エステルイオノマーの HAp 形成を阻害する活性が低下した原因は、ポリリン酸エステルイオノマーとカルシウムイオンとの相互作用がナトリウムイオンと競争的に起こるためである。

ポリリン酸エステルアイオノマーの HAp 溶解阻害活性実験の結果を Fig. 5 に示した。ポリリン酸エステルアイオノマーはパミド

ロネートと同等以上の HAp 溶解阻害活性を示すことがわかった。これは 37 °C, 8 時間という条件下でポリリン酸エステルアイオノマーが十分に HAp 表面を覆ったため、HAp に対するプロトンの接触が遮蔽されたためである。この効果はポリリン酸エステルイオノマーの吸着に依存し、PH₂₁E₇₉-Na において最も顕著に認められた。

Fig. 6 には α-MEM 培地と分化誘導培地中で一ヶ月培養した MC3T3-E1 細胞のアリザリン染色結果と蛍光修飾 PH₂₁E₇₉-Na を接触させた後の蛍光顕微鏡像を示す。この結果から、PH₂₁E₇₉-Na が細胞が産生したカルシウム沈着物に対して積極的に吸着することが認められた。

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 5 件)

1. Ikeuchi R, Iwasaki Y. Synthesis of amphiphilic polyphosphoester ionomers for surface modification of small unilamellar phospholipid vesicles. *Trans Mater Res Soc Jpn* **2012**, in press. (査読有り)
2. 岩崎泰彦. 生体適合性高分子による表面創製. *ファインケミカル*. **2011**;40:19-26. (査読無し)
3. 岩崎泰彦. 生体に学ぶリン含有ポリマーバイオマテリアルの創製. *バイオマテリアル-生体材料-* **2010**;28:27-33. (査読無し)
4. Iwasaki Y, Yamaguchi E. Synthesis of well-defined thermoresponsive polyphosphoester macroinitiators using organocatalysts. *Macromolecules* **2010**;43:2664-2666. (査読有り)
5. Iwasaki Y, Kawakita T, Yusa S. Thermoresponsive polyphosphoesters bearing enzyme-cleavable side chains. *Chem Lett* **2009**;38:1054-1055. (査読有り)

[学会発表] (計 22 件)

1. 池内亮太, 岩崎泰彦. 部分イオン化ポリリン酸エステルを修飾した骨親和性リポソーム. 第 21 回日本 MRS 学術シンポジウム 2011 年 12 月 19 日, 横浜開港記念会館 (横浜), 予稿集, P-26.
2. 片山晃一, 岩崎泰彦. ビスホスホネー

- ト様活性を示す低毒性ポリマーの合成と骨関連細胞との相互作用. 第33回バイオマテリアル学会2011年11月21日, 京都テルサ(京都), 予稿集, 413.
3. 池内亮太, 岩崎泰彦. ポリリン酸エステル修飾による HAP 親和性リポソームの創製. 第60回高分子討論会, 2011年9月28日, 岡山大学(岡山), 予稿集, 5093.
 4. Katayama K, Iwasaki Y. The effect of biocompatible ionized polymer on calcification, 3rd Asian Biomaterials Congress, BEXCO (Busan, Korea), September 2011, Abstract P0-S5-341.
 5. Ikeuchi R, Iwasaki Y., Yusa S. Preparation of bone affinity liposomes bearing ionized amphiphilic polyphosphoesters, 3rd Asian Biomaterials Congress, BEXCO (Busan, Korea), Sep. 15 2011, Abstract P0-S5-339.
 6. Iwasaki Y., Katayama K. Comparison of Mineral Affinity of Ionized Polyphosphoesters and Bisphosphonates, 24th European Conference on Biomaterials, Convention Centre Dublin (Ireland), Sep. 4 2011, Abstract 370.
 7. 池内亮太, 岩崎泰彦, 骨指向性ドラックキャリアに向けたリポソームの表面修飾, 第40回医用高分子シンポジウム. 2011年7月25日, 関西大学(大阪), 予稿集:35.
 8. 片山晃一, 岩崎泰彦, 田島脩平, 田畑泰彦. ビスホスホネート様活性を示すポリマーと骨芽細胞との相互作用, 第57回高分子研究発表会(神戸), 2011年7月15日, 兵庫県民会館(神戸), 予稿集:216.
 9. 澤田 彩, 岩崎泰彦, 西村 泰樹, 藤井秀司, 中村 吉伸. ピッカリングエマルションをテンプレートとした水酸アパタイト多孔質体の調製. 第60回高分子学会年次大会, 2011年5月25日, 大阪国際会議場(大阪), 予稿集:1835.
 10. 池内亮太, 岩崎泰彦. 骨親和性を志向したポリリン酸エステル修飾リポソームの調製. 第59回高分子討論会, 2010年9月15日, 北海道大学(札幌), 予稿集, 4823.
 11. Yamaguchi E, Iwasaki Y. Synthesis of biocompatible block copolymers using well-defined polyphosphoester macroinitiators, 240th ACS National Meeting, Boston Convention Center (USA), Aug. 22 2010, Symposium proceeding, PMSE 285.
 12. 片山晃一, 岩崎泰彦. 骨親和材料を指向したポリリン酸エステルの合成と石灰化に及ぼす影響, 日本バイオマテリアル学会 第5回 関西若手研究発表会, 2010年8月6日, 京都大学(京都), 予稿集:P-3-3.
 13. 脇篤史, 岩崎泰彦. ポリホスファイトを用いたラシカル重合制御. 第56回高分子研究発表会(神戸), 2010年7月16日, 兵庫県民会館(神戸), 予稿集:199.
 14. 池内亮太, 岩崎泰彦. 両親媒性ポリリン酸エステルを修飾したリポソームの Hap 親和性, 第56回高分子研究発表会(神戸), 2010年7月16日, 兵庫県民会館(神戸), 予稿集:186.
 15. Iwasaki Y. Preparation of phosphorus-containing polymer biomaterials, Chonbuk National University (Korea), Mar. 16 2010, Chonju.
 16. Iwasaki Y. Thermoresponsive polyphosphoesters, Sheffield University, Dec. 18 2009, Sheffield University (England).
 17. Iwasaki Y., E. Yamaguchi, H. Kamioka. Novel thermoresponsive polymers consisting of phosphoester backbones, GelSympo 2009 Polymer Gels: Science and Technology as Advanced Soft Materials, Dec. 2 2009, Kansai University (Osaka, Japan), Abstract:270-271.
 18. 山口恵津子, 岩崎泰彦. 生分解性ブロックコホリマーの精密合成と温度応答性, 第31回日本バイオマテリアル学会, 2009年11月16日, 京都テルサ(京都), 予稿集:423.
 19. 岩崎泰彦. 生体に学ぶリン含有ポリマーバイオマテリアルの創製, 第31回日本バイオマテリアル学会大会, 2009年11月16日, 京都テルサ(京都).

20. 山口 恵津子, 岩崎泰彦. 温度応答性を示す会合性ポリリン酸エステルブロックコポリマーの合成, 第 58 回高分子討論会, 2009 年 9 月 16 日, 熊本大学 (熊本), 予稿集: 4829.
21. Iwasaki Y, Kawakita T. Thermoresponsive polyphosphoesters bearing enzyme-cleavable side chains, 22nd European Conference on Biomaterials ESB 2009, Sep. 7 2009, Beaulieu Convention & Exhibition Centre Lausanne (Switzerland), Abstract:937.
22. 山口恵津子, 岩崎泰彦. 有機触媒を用いたポリリン酸エステルの合成と特性評価. 日本バイオマテリアル学会 第 4 回 関西若手研究発表会, 2009 年 8 月 7 日, 大阪大学 (大阪), 予稿集: 63.

[図書] (計 3 件)

1. 岩崎泰彦. リン原子含有ポリマーのバイオマテリアルへの応用. 先端バイオマテリアル, NTS, 印刷中 (2012).
2. Iwasaki Y, Ishihara K. Suppression of Inflammatory reactions on phospholipid polymer surfaces. *The Handbook of Intelligent Scaffold for Tissue Engineering and Regenerative Medicine* (Khang G Ed.). Pan Stanford Publishing Pte Ltd, Temasek Boulevard, in press (2012).
3. Iwasaki Y. Modern synthesis and thermoresponsivity of polyphosphoesters. in *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges* (Fazel R Ed.), In Tech, p1-24 (2011).

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 骨置換多孔質体形成用ペースト及びその製造方法
 発明者: 岩崎泰彦, 澤田彩, 藤井秀司
 権利者: 関西大学, 常翔学園
 種類: 特許
 番号: 特願 2011-027649
 出願年月日: 平成 23 年 2 月 10 日
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計 3 件)

1. 名称: 温度応答性を有するポリホスフェート化合物及びその製造方法
 発明者: 岩崎泰彦
 権利者: 関西大学
 種類: 特許
 番号: 特許第 4781332 号
 取得年月日: 平成 23 年 7 月 15 日
 国内外の別: 国内
2. 名称: リビングラジカル重合開始基を持つポリリン酸の製造方法および用途
 発明者: 岩崎泰彦, 石原一彦
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特許第 4727938 号
 取得年月日: 平成 23 年 4 月 22 日
 国内外の別: 国内
3. 名称: 生分解性重合体の製造方法および用途
 発明者: 岩崎泰彦, 石原一彦
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特許第 4727941 号
 取得年月日: 平成 23 年 4 月 22 日
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/biomat/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 泰彦 (IWASAKI YASUHIKO)
 関西大学・化学生命工学部・准教授
 研究者番号: 90280990