

## 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 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22700493

研究課題名（和文）

疎水性相互作用を利用したポリイオンコンプレックスナノ粒子の創製と機能評価

研究課題名（英文）

Preparation and characterization of polyion complex nanoparticles using hydrophobic interaction

研究代表者

赤木 隆美 (AKAGI TAKAMI)

大阪大学・大学院工学研究科・特任准教授

研究者番号：00527236

研究成果の概要（和文）：

疎水性アミノ酸を修飾したポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)とポリ(ε-リシン)(ε-PL)を用いて、高分子鎖間に働く静電的相互作用と疎水性相互作用を同時に利用することで、生理的環境下でも安定に機能する polyion complex (PIC) ナノ粒子を創製した。PIC ナノ粒子の安定化には、粒子内部での疎水性ドメインの形成に起因していることが明らかとなった。また、得られた PIC ナノ粒子の蛋白質キャリアとしての機能性を評価し、その有用性を実証した。

研究成果の概要（英文）：

Polyion complex (PIC) nanoparticles composed of anionic hydrophobically modified and cationic poly(amino acid) were prepared using electrostatic and hydrophobic interactions between the two polymers. The prepared PIC nanoparticles showed high stability for a prolonged period of time under physiological conditions. The improved stability of the PIC nanoparticles was attributed to the formation of hydrophobic domains in the core of the nanoparticles. Moreover, the function of the PIC nanoparticles as a protein carrier was demonstrated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：バイオマテリアル

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：ドラッグデリバリーシステム (DDS)、ナノ粒子、ポリイオンコンプレックス

## 1. 研究開始当初の背景

反対電荷（カチオンおよびアニオン）を有する高分子からなる polyion complex (PIC) ナノ粒子は、任意の割合で 2 種類の高分子を水溶液中で混合するのみで調製できる利点

を有しており、合成および天然由来高分子を用いた様々な PIC ナノ粒子が報告されている。しかし、これらのナノ粒子は、静電的相互作用（クーロン力）をナノ粒子形成の駆動力に用いているため、緩衝溶液中などの高

い塩濃度、pH 変化、希釈等に対する安定性が低く、生理的環境下での使用が制限される。そのため、生体内でも高い安定性と機能性を有する PIC ナノ粒子の開発が求められている。PIC ミセルの安定化に関する研究では、主にコア-シェル型 PIC ミセルのコア部もしくはミセル表面のシェル部を化学架橋することで、ミセルからのポリマーの解離を抑制する方法が用いられ、しかしながら化学架橋を用いる方法では、架橋後のミセルの物理化学的性質の変化や、ミセル間の架橋が起こりやすいといった問題があり、PIC の安定性を向上させる新たな手法の開発が求められる。

## 2. 研究の目的

本研究では、共有結合を介した PIC ナノ粒子の安定化とはまったく異なるアプローチとして、部分的に疎水修飾したアニオン性高分子とカチオン性高分子を混ぜることで、静電的相互作用と疎水性相互作用を粒子形成の駆動力として用いる新規なナノ粒子の調製と機能評価を行った。2 つの相互作用を粒子形成の駆動力として利用することで、生体環境下でも安定な PIC ナノ粒子が調製可能となり、多機能 DDS キャリアとしての応用展開が可能であると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、疎水修飾したポリアミノ酸（アニオン性）とカチオン性ポリアミノ酸を用いて、PIC ナノ粒子を調製、得られたナノ粒子の構造解析、機能評価を実施した。

(1) 疎水性相互作用を利用した PIC ナノ粒子の調製：疎水化ポリアミノ酸からなる PIC ナノ粒子の調製条件を確立し、緩衝液中での物性・安定性を評価すると共に、PIC ナノ粒子の新たな製造方法の構築を試みた。また、PIC 安定化のメカニズムを解析し、材料の分子設計指針について検討した。

(2) PIC ナノ粒子の機能評価：上記で得られた PIC ナノ粒子の蛋白質、ペプチド、核酸、低分子薬剤のキャリアとしての機能（担持能および徐放能）を評価し、薬物担体としての有用性を検討した。また、PIC ナノ粒子の疎水化度や表面電荷を制御することで、多機能性キャリアの創製を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 疎水化  $\gamma$ -PGA の合成：アニオン性のポリアミノ酸であるポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) ( $\gamma$ -PGA) (分子量 38 万) に疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe) を種々の割合で導入し、Phe 導入率が 16, 24, 40%の水に可溶性疎水化  $\gamma$ -PGA ( $\gamma$ -PGA-Phe-16, 24,

40)を合成した (図 1)。

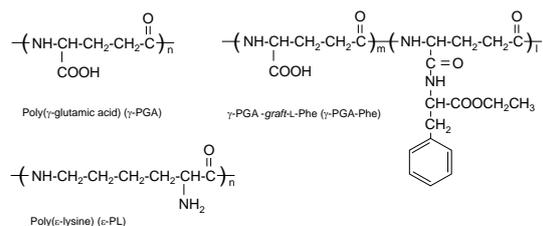


図 1. 疎水化  $\gamma$ -PGA の構造式

(2) 疎水化  $\gamma$ -PGA/ $\epsilon$ -PL ナノ粒子の調製：得られた疎水化  $\gamma$ -PGA とカチオン性ポリアミノ酸であるポリ ( $\epsilon$ -リシン) ( $\epsilon$ -PL) をリン酸緩衝液 (pH7.4) 中で混合し、経時的に動的散乱 (DLS) により粒径を測定し、ナノ粒子の安定性を評価した。 $\gamma$ -PGA-Phe と  $\epsilon$ -PL とを種々の濃度比で混合し粒径を測定した結果、調製直後にはすべてのサンプルでナノ粒子の形成が認められた。その後、経時的に粒径を測定すると、 $\gamma$ -PGA-Phe-16 では、時間の経過に伴い、粒子の崩壊および凝集が認められ、DLS 測定により単分散なピークは得られなかった。一方、Phe 導入率の高い  $\gamma$ -PGA-Phe-24 では、粒子の膨潤により粒径の増加がみられたが、単分散性を維持していた。また  $\gamma$ -PGA-Phe-40 は高い安定性を示し、長期保存により粒径の変化は認められなかった (図 2)。この高い安定性は、粒子内部での Phe による疎水性ドメインの形成に起因していた。疎水化 PIC ナノ粒子は、静電的相互作用に加え、導入した疎水化基の疎水性相互作用により、安定なナノ粒子が形成可能であった。また、2 種類のポリアミノ酸の混合比、Phe の導入を変化させることで、粒子サイズを 200~1000 nm 程度の範囲で制御するが可能であった。生理環境下で安定な PIC ナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステムの薬物担体としての応用が期待される。

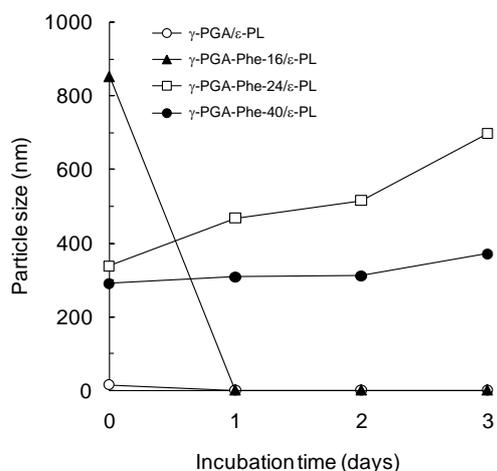


図 2. 疎水化  $\gamma$ -PGA/ $\epsilon$ -PL ナノ粒子の安定性。各 PIC ナノ粒子を所定時間保存後、DLS により粒径を測定した。

(3)PIC ナノ粒子の機能評価:疎水化 $\gamma$ -PGA/ $\epsilon$ -PL ナノ粒子の DDS キャリアとしての機能性および有用性を明らかにすることを目的に、薬物担持能およびワクチンキャリアとしての有効性を評価した。疎水化 $\gamma$ -PGA/ $\epsilon$ -PL からなる PIC ナノ粒子は、蛋白質、ペプチド、核酸を電荷に依存することなく内包することが可能であり、緩衝液中で長期間安定に薬物を担持できることが明らかとなった。また、薬物担持 PIC ナノ粒子は、免疫担当細胞である樹状細胞において効率的な取込みが認められた (図 3)。疎水化 $\gamma$ -PGA からなる PIC ナノ粒子は生体内において高い安定性を示し、抗原提示細胞に効率よく抗原をデリバリーできることから、新規なワクチンキャリアとして有用であると考えられる。

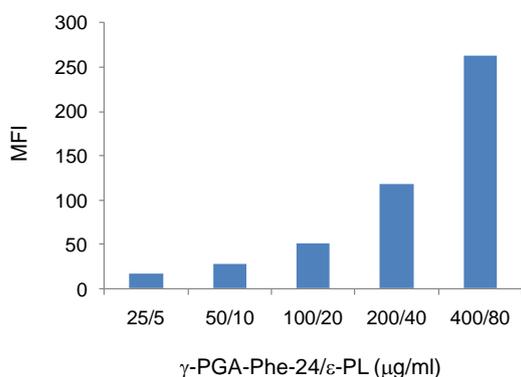


図 2. 樹状細胞による疎水化 $\gamma$ -PGA/ $\epsilon$ -PL ナノ粒子の取込み。マウス樹状細胞に各粒子濃度のサンプル (FITC ラベル化) を添加し、フローサイトメトリーで取込み量を評価した。

疎水性相互作用を利用した新たな PIC の分子設計により、PIC ナノ粒子の新たな製造方法及び、それを用いる新規な DDS 材料の提供が可能となるとともに、新たなナノパーティクルテクノロジーの創出に繋がると考えられる。また、疎水化 $\gamma$ -PGA とカチオン性高分子より形成される PIC は、その混合比により粒子の表面電荷やサイズを制御できる特長も有しており、多機能性キャリアの創製に繋がると期待される。

#### 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 3 件)

1. H. Shen, T. Akagi, M. Akashi, Polyampholyte nanoparticles prepared by self-complexation of cationized poly( $\gamma$ -glutamic acid). *Macromol. Biosci.* (査読有) in press
2. T. Akagi, P. Piyapakorn, M. Akashi, Formation of unimer nanoparticles by controlling the self-association of

hydrophobically modified poly(amino acid)s. *Langmuir* (査読有) 28, 5249-5256 (2012).

3. T. Akagi, M. Baba, M. Akashi, Biodegradable nanoparticles as vaccine adjuvants and delivery systems: Regulation of immune responses by nanoparticle-based vaccine. *Adv. Polymer Sci.* (査読有) 247, 31-64 (2012).

[学会発表] (計 15 件)

1. 申 鶴雲、赤木隆美、明石 満、カチオン化ポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) からなるナノ粒子の調製と蛋白質キャリアとしての機能、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会、2011 年 11 月 22 日、京都府民総合交流プラザ
2. ピヤパコーン パッサモン、赤木隆美、明石 満、疎水化ポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) からなるユニマーナノ粒子の蛋白質キャリアとしての機能、第 33 回日本バイオマテリアル学会大会 2011 年 11 月 22 日、京都府民総合交流プラザ
3. 申 鶴雲、赤木隆美、明石 満、カチオン化ポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) からなる両性電解質ナノ粒子の調製と機能、第 60 回高分子討論会、2011 年 9 月 28 日、岡山大学津島キャンパス
4. 赤木隆美、明石 満、両親媒性ポリアミノ酸からなるナノ構造体の調製と機能、第 60 回高分子討論会 2011 年 9 月 28 日、岡山大学津島キャンパス
5. 赤木隆美、明石 満、疎水化ポリアミノ酸からなるナノ粒子ワクチンの細胞内および体内動態の評価、第 40 回医用高分子シンポジウム、2011 年 7 月 26 日、関西大学千里山キャンパス
6. ピヤパコーン パッサモン、赤木隆美、明石 満、疎水修飾ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子の設計と評価、第 27 回日本 DDS 学会、2011 年 6 月 9 日、東京大学本郷キャンパス
7. 赤木隆美、渡辺一輝、明石 満、疎水修飾ポリアミノ酸からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子のワクチンキャリアとしての機能、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
8. 渡辺一輝、赤木隆美、明石 満、疎水化ポリ ( $\gamma$ -グルタミン酸) からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の免疫誘導効果、第 32 回日本バイオマテリアル学会大会、2010 年 11 月 30 日、グランドプリンスホテル広島
9. 渡辺一輝、赤木隆美、明石 満、疎水修飾ポリアミノ酸からなるポリイオンコ

ンプレックスナノ粒子の外部刺激応答性、第 59 回高分子討論会、2010 年 9 月 15 日、北海道大学

10. 渡辺一輝、赤木隆美、明石 満、疎水化ポリ(γ-グルタミン酸)からなるポリイオンコンプレックスナノ粒子の免疫誘導効果、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、京都大学医学部芝蘭会館
11. 赤木隆美、渡辺一輝、明石 満、疎水化ポリアミノ酸を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子の安定性と機能評価、第 39 回医用高分子シンポジウム、2010 年 7 月 27 日、東京大学先端科学技術研究センター
12. 渡辺一輝、赤木隆美、明石 満、生理環境中で安定なポリイオンコンプレックスナノ粒子の設計と機能、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
13. 渡辺一輝、赤木隆美、明石 満、疎水化ポリアミノ酸を用いたポリイオンコンプレックスナノ粒子の調製と DDS キャリアとしての機能評価、第 26 回日本 DDS 学会、2010 年 6 月 17 日、大阪国際交流センター
14. 赤木隆美、明石 満、高分子ナノ粒子を利用したワクチンアジュバントの開発と免疫応答制御、第 26 回日本 DDS 学会(招待講演)、2010 年 6 月 17 日、大阪国際交流センター
15. 渡辺一輝、赤木隆美、明石 満、疎水性相互作用を利用したポリイオンコンプレックスナノ粒子の安定化と DDS キャリアとしての機能、第 59 回高分子学会年次大会、2010 年 5 月 27 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

T. Akagi, M. Matsusaki, M. Akashi, Pharmaceutical and medical applications of poly-γ-glutamic acid (Chapter 7), Amino-acid homopolymers occurring in nature (Volume editor: Y. Hamano). Microbiology Monographs (Springer) 15, 119-153 (2010).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.eng.osaka-u.ac.jp/~akashi-lab/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤木 隆美 (AKAGI TAKAMI)

大阪大学・大学院工学研究科・特任准教授

研究者番号：00527236