

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 5 月 25 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：22760610

研究課題名（和文）酵素反応によりゲル化可能なゼラチン誘導体を用いた腹膜播種治療法の開発

研究課題名（英文）Application of enzymatically gellable gelatin derivative to peritoneal dissemination treatment

研究代表者

境 慎司（SAKAI SHINJI）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：20359938

研究成果の概要（和文）：西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの酵素反応により過酸化水素存在下でゲル化し、生体内ではタンパク質分解酵素によって徐々に分解するゼラチン誘導体を腹膜播種治療用の抗ガン剤徐放担体として評価した。その結果、このゼラチン誘導体ゲルに関して有益な知見を得るには至らなかった。一方で、新たな材料として、体液中に存在するアミラーゼにより分解可能なアミロペクチンにフェノール性水酸基を導入した新しいゲル材料の開発に成功した。このゲルは、アミラーゼを含む血清存在下で溶解することを見出した。また過酸化水素を直接添加しなくても、グルコースを添加することでゲル化が生じる新しいゲル化法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the possibility of gelatin derivative possessing phenolic hydroxyl moieties gellable via a horseradish peroxidase-catalyzed reaction as a candidate for controlled release of anti-cancer drugs for the treatment of peritoneal dissemination. Our studies revealed that the hydrogel was not suitable for the purpose. Therefore, we attempted to develop novel biodegradable and in situ gellable hydrogels. The promising hydrogel we developed in this study was the derivative of amylopectin. The aqueous solution of the amylopectin derivative possessing phenolic hydroxyl moieties could be gellable through the horseradish peroxidase-catalyzed reaction. An attractive property of the hydrogel was the degradability in the presence of serum. In addition, we could develop a novel hydrogelation process triggered by glucose using glucose oxidase for supplying hydrogen peroxide for the hydrogelation process.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物機能・バイオプロセス

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能・バイオプロセス

キーワード：酵素，ハイドロゲル，腹膜播種，ガン

1. 研究開始当初の背景

「腹膜播種」は、さまざまな臓器に発生し

たガンからガン細胞が内臓器をおさめている「腹腔」にこぼれ落ち、腹腔内壁や臓器表面の「腹膜」に転移するガンである。外科的な手術は不可能であり、腹膜播種判明後の余命は数ヶ月以内とされる。また、世界全体のガンによる死因の第2位を占める胃ガンでは、患者の半数以上は腹膜播種の悪化が死に至る原因とされる。

その新しい治療法として国内外の複数の施設で最近有望な成績が報告されているのが、抗ガン剤を分散させた水溶液を直接腹腔に注入する「腹腔内投与法」である。この方法では、副作用の問題から抗ガン剤を一度に大量投与することはできないため、薬剤を分散させた溶液を徐々にカテーテルを介して毎日もしくは数日おきに注入する方法が検討されている。しかし、患者の生活の質(QOL)を考慮すると、カテーテル挿入部位からの感染症罹患の危険性や、カテーテルの存在による日常生活動作の制限、投薬のために頻繁な通院が必要などの問題がある。

これに代わる方法として、薬剤を徐放するように設計されたゲルを腹腔に配置する方法が検討されている。Hyoudouらは、ゼラチンゲルシートに有効成分を吸着させ、これを腹膜播種モデルマウスの腹腔に配置することで優位に生存期間が延びたことを報告している(*J Control Release* vol. 122, p. 155, 2007)。しかし、この方法では、ゲルシートの形状が生体外で既に固定されていることから複雑な幾何形状の臓器間の腹膜に転移したガンを有効に攻撃することはできない。

このような背景に基づき、申請者はさらに有効な薬剤送達技術の開発を目指す。申請者はこれまでに、生体や細胞に対して穏和な西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)の酵素反応によりフェノール性水酸基同士が架橋される(図1)ことで水溶液が数十秒以内にゲル化する高分子材料の開発を行ってきた(*Acta Biomater* vol. 3, p. 495, 2007, *J Mater Chem* vol. 19, p. 230, 2008, *Biomaterials* vol. 30, p. 3371, 2009)。これらは、組織工学に利用するために開発したものであるが、特にゼラチン誘導体に関して得られた以下の知見から、この材料を利用する本研究の着想に至った。

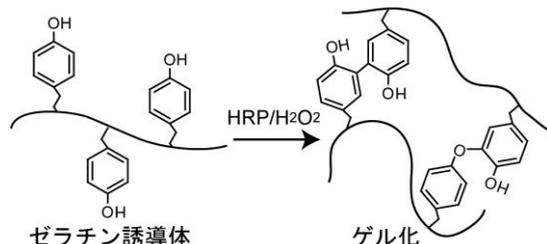


図1. HRPによる架橋形成反応模式図。

2. 研究の目的

2年間の研究期間内に、HRPの酵素反応を経て得られるフェノール性水酸基ゼラチン誘導体(Gelatin-Ph)ゲルの有効性を評価し、腹膜播種治療用材料として諸特性の制御を行うとともに、新たなゲル化材料開発を目的とした。具体的には以下を目的とした。

(1) Gelatin-Phゲルの抗ガン剤薬剤徐放担体としての有用性の評価

これまでに開発していたゼラチン誘導体ゲルに抗ガン剤を担持し、ゲルからの薬剤放出特性を測定することにより、徐放性の有無を評価する。

(2) 薬剤放出特性の制御

上記の検討にもとづいて、有用と考えられる薬剤放出機能を有してない場合には、架橋度や電荷の制御により、薬剤の徐放性を制御する。

(3) 生体内で in situ ゲル形成可能な新規ゲルおよびゲル化法の開発

Gelatin-Phを本研究のターゲットとした理由は、生体内での分解酵素による分解性に着目したためである。そこで、生体内の酵素で分解可能な新たなゲルの開発を行う。さらに、取り扱いに注意が必要な過酸化水素を直接添加せず、間接的に酵素反応によって供給する新たなゲル化法を開発する。

3. 研究の方法

(1) Gelatin-Phゲルの有用性評価

ゼラチンとチラミン塩酸塩を溶解させた水溶液に水溶性カルボジイミドを作用させることにより、Gelatin-Ph(5 w/v%)を作製した。凍結真空乾燥後、HRP(1 U/mL)とともに水溶液に溶解し、ここにジェムシタピン塩酸塩(1 mg/mL)をさらに溶解させた。この溶液に5 mMとなるように過酸化水素水を添加してゲル平板を作製した。得られたゲル平板をリン酸緩衝液(pH7.4)に浸し、37度で振盪し、ゲルから溶出してくるジェムシタピンを液体クロマトグラフィーにより定量した。また、同様の手法で、ヒト扁平上皮ガン細胞由来の腫瘍を形成させた免疫不全ヌードマウスの皮下にジェムシタピン含有 Gelatin-Phゲルを形成させ、腫瘍の体積変化を評価した。

(2) Gelatin-Phゲルの徐放特性制御

上記の検討結果に基づいて、より架橋度の高い Gelatin-Phゲルおよびマイナス電荷を有するゼラチンを用い、ゲルからのジェムシタピンの放出遅延を試みた。

(3) 生体内で in situ ゲル形成可能な新規ゲルおよびゲル化法の開発

生体内に存在する酵素で分解可能なゲル材料として、アミラーゼにより分解可能なデンプンの主成分であるアミノペクチンにフェノール性水酸基を導入した。具体的には、アミノペクチンをジメチルスルホキシドに

溶解した後、カルボニルジイミダゾールを用いてチラミンを水酸基に導入した (AP-Ph)。また、新しいゲル化法として、過酸化水素を直接添加せず、体液にも含まれるグルコースからグルコースオキシダーゼ (GOx) の酵素反応によって過酸化水素を生じさせることによるゲル化を試みた。

4. 研究成果

(1) Gelatin-Ph ゲルに関する検討

図 2 に通常のゼラチンより作製した Gelatin-Ph ゲル (Type A) から周囲の溶液へのジェムシタピンの放出挙動を示す。ゲルを溶液に浸してから 2 時間で約 40% の放出が確認され、この Gelatin-Ph ゲルはジェムシタピンの徐放担体としては適していないことが明らかとなった。そこで、これを改善するために、ジェムシタピンとの静電的な結合を形成することを期待して、酸性ゼラチンからの誘導体から作製したゲルを使用した検討を行った (図 2, Type B)。しかし、やはりジェムシタピンのゲルから拡散を有意に抑制することはできなかった。その他、拡散を抑制するためにいくつかの検討を行ったが、満足する成果を挙げるには至らなかった。そこで、以下に示す生体内の酵素で分解可能な新たなゲル材料の開発を行い、さらに過酸化水素を間接的に供給する新たなゲル化手法の開発を行った。

(2) AP-Ph ゲルに関する検討

アミロペクチンにフェノール性水酸基の導入を試みた結果、図 3 に示すように、調製条件を制御することにより、4, 14 および 23 $\times 10^{-6}$ mol-Ph/g-amylopectin (それぞれ図中には AP-Ph4, AP-Ph14, AP-Ph23 と記載) でフェノール性水酸基を含む誘導体を得ることに成功した。また、この誘導体の水溶液に HRP を溶解し、過酸化水素を作用させることで Gelatin-Ph と同じようにゲルを形成させることができた。さらにこの AP-Ph ゲルは、

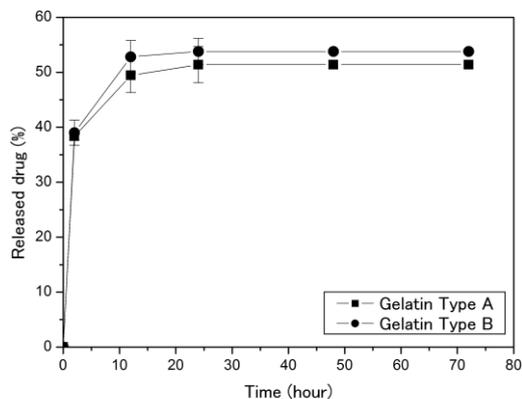


図 2. Gelatin-Ph ゲルからのジェムシタピンの拡散挙動。

リン酸緩衝液中では溶解しない (図 4c, d) もの、牛胎児血清 (FBS) に浸すと、分解することが明らかになった (図 4a, b)。この分解は、血清中に含まれる分解酵素であるアミラーゼによるものと考えられる。すなわち、生体に存在する酵素によって分解可能な新たなゲルの開発に成功した。なお、Ph 基の導入量が増加するにしたがって、同量の HRP、過酸化水素を添加した場合のゲル化に要する時間は短くなり、Ph 基の含有量が多い AP-Ph ゲルは FBS 中での分解速度が低下した。この AP-Ph ゲルにマウス繊維芽細胞を包括した後に、FBS を含む一般的な動物細胞培養液に浸したところ、ゲルの分解によって放出された細胞は、再度細胞培養皿に付着し、ゲルに一度も包括を行っていない細胞と同様の増殖挙動を示した。すなわち、AP-Ph のゲ

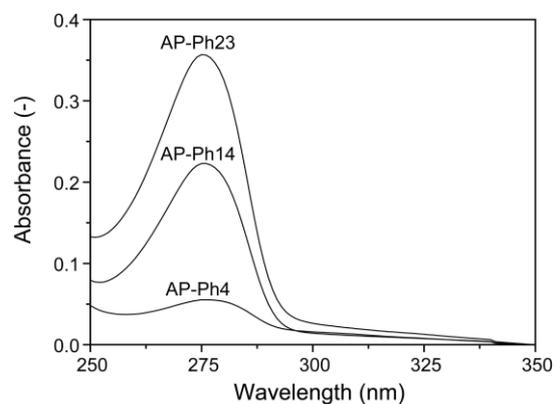


図 3. 異なる条件で作製した AP-Ph の 4% 水溶液の UV-Vis スペクトル。

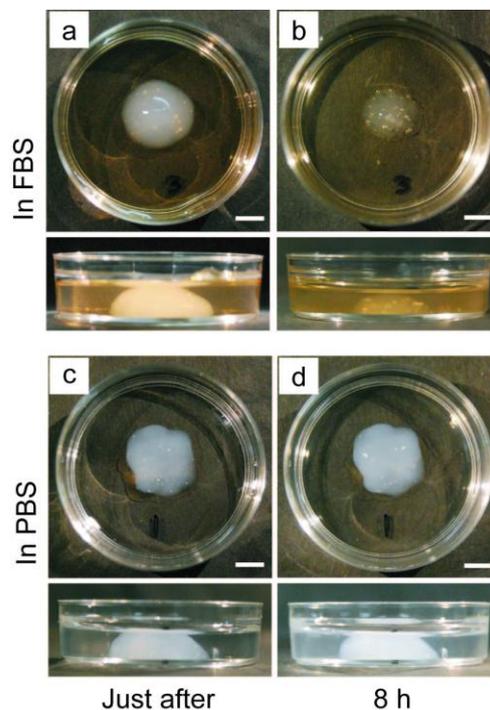


図 4. 牛胎児血清 (FBS) およびリン酸緩衝液 (PBS) に浸した AP-Ph ゲルの形態変化。

ル形成ならびにゲルの分解が生体に対しても非常に穏和に進行することが明らかになった。これらの成果に関しては、「5. 主な発表論文等の雑誌論文 4」で発表している。

(3) GOx を用いたゲル化に関する検討

生体内で薬物徐放担体となるゲルを形成させる場合にはできるだけ生体に負担をかけない方法の方が望ましい。また、過酸化水素の取り扱いには注意が必要である。そこで、グルコースをゲル化のトリガーとして利用する方法を試みた。

図5に示すように、このゲル化法では、HRPの濃度よりもGOxおよびグルコースの濃度にゲル化に要する時間が大きな影響を受け、グルコース濃度とGOx濃度が高いほどゲル化に要する時間は短くなった。興味深いことに、グルコース濃度とゲル化に要する時間の相関は、直接過酸化水素を添加した場合の過酸化水素の濃度とゲル化時間の関係と逆の傾向であった。これは、GOxの酵素反応によって徐々に過酸化水素が供給される場合には、逐次的に生成した過酸化水素がHRPの反応により消費されるため、過酸化水素濃度依存的に生じるHRPの失活が抑制されるためと考えられる。

過酸化水素が徐々にHRPによるPh基間架橋形成反応に供給されることは、形成したゲルの力学的特性にも影響を与えることが明

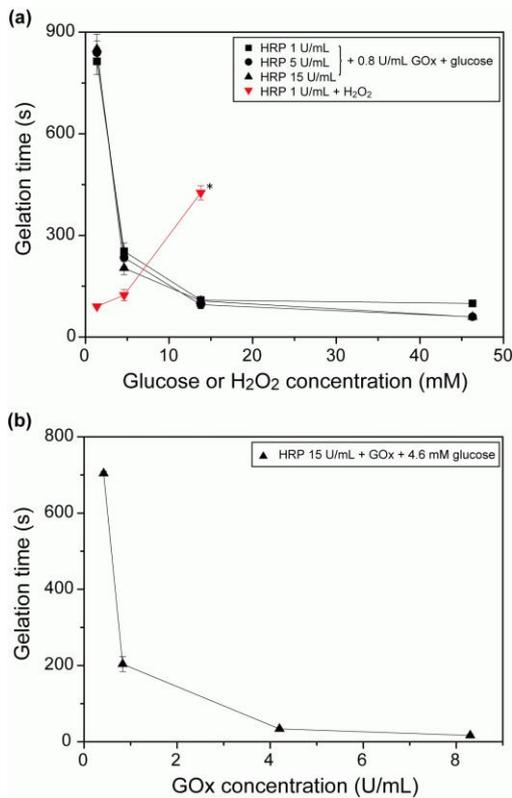


図5. a) HRP および b) GOx 濃度がゲル化時間に与える影響。

らかとなった。図6aに示すように、過酸化水素を直接添加した場合には、ゲル形成1時間と24時間目でゲルの力学的特性はほとんど変化しないのに対して、GOxを用いてグルコースから過酸化水素を発生させた場合には、24時間目のゲルの方が圧縮に対して顕著に大きな反発力を示した。グルコース濃度とゲル強度の相関に関しては、ヒトの血糖とほぼ同じ4.6 mMのグルコースを用いた場合のゲル強度が最も強く、グルコース濃度の増加と共に、圧縮に対する反発力は低下することを見出した(図6b)。HRPの濃度に関しても、濃度が最も低い条件で作製したゲルの圧縮に対する反発力が大きいことが明らかとなった。以上より、グルコースをトリガーとす

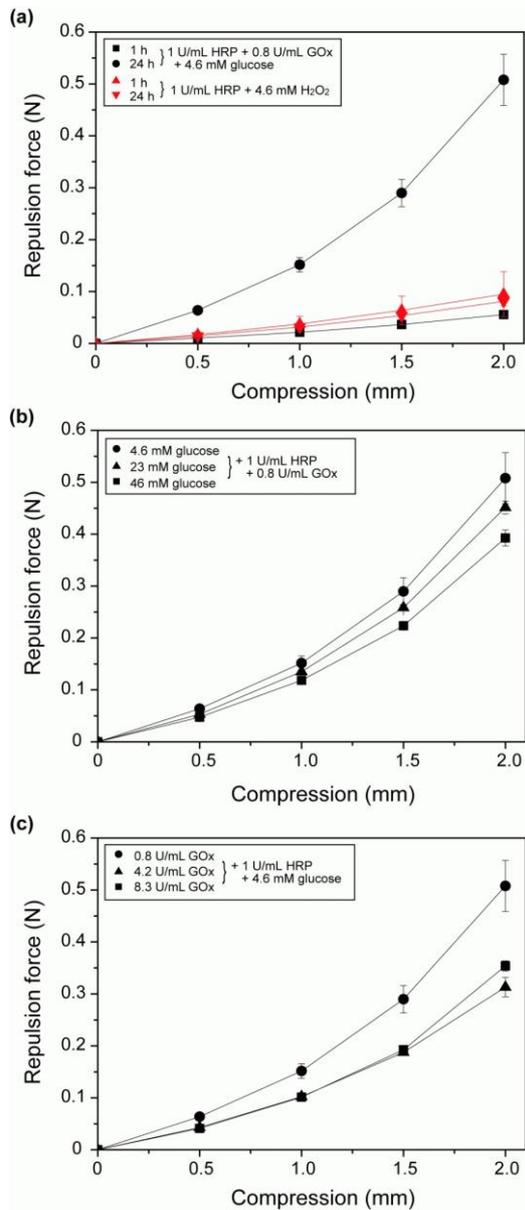


図6. a) ゲル形成からの経過時間, b) グルコース濃度および c) GOx 濃度を変化させて作製したゲルの圧縮に対する反発力変化。

る新たなヒドロゲルの開発に成功した。これらの成果に関しては、「5. 主な発表論文等の雑誌論文3」で発表している。

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 6 件)

1. Sakai S, Inagaki H, Liu Y, Matsuyama T, Kihara T, Miyake J, Kawakami K, Taya M; Rapidly serum-degradable hydrogel templating fabrication of spherical tissues and curved tubular structures, *Biotechnology and Bioengineering*, 印刷中。(査読有)
2. Sakai S, Inamoto K, Liu Y, Tanaka S, Arii S, Taya M; Multicellular tumor spheroid formation in duplex microcapsules for analysis of chemosensitivity, *Cancer Science* 103: 549-554, 2012. (査読有)
3. Sakai S, Komatani K, Taya M; Glucose-triggered co-enzymatic hydrogelation of aqueous polymer solutions, *RSC Advances* 2: 1502-1507, 2012. (査読有)
4. Sakai S, Liu Y, Matsuyama T, Kawakami K, Taya M; On-demand serum-degradable amylopectin-based in situ gellable hydrogel, *Journal of Materials Chemistry* 22: 1944-1949, 2012. (査読有)
5. Sakai S, Kawakami K; Development of porous alginate-based scaffolds covalently cross-linked through a peroxidase-catalyzed reaction, *Journal of Biomaterials Science* 22: 2407-2416, 2011. (査読有)
6. Sakai S, Moriyama K, Taguchi K, Kawakami K; Hematin is an alternative catalyst to horseradish peroxidase for in situ hydrogelation of polymers with phenolic hydroxyl groups in vivo, *Biomacromolecules* 11: 2179-2183, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

1. 境 慎司, 田谷 正仁, 川上 幸衛; 酵素による架橋と分解を利用する材料設計と足性医療技術への適用, 化学工学会 2010 年秋季大会, 同志社大学(京都), 2010 年 9 月 6 日.
2. 境 慎司, 劉 揚, 松山 智洋, 川上 幸衛, 田谷 正仁; 血清と接触すると速やかに溶解する酵素架橋ヒドロゲルの開発とその応用, 日本生物工学会 2011 年年会,

- 東京農工大学(東京), 2011 年 9 月 27 日.
3. Inagaki H, Sakai S, Matsuyama T, Liu Y, Kawakami K, Taya M, Development of in situ gellable and fast degradable hydrogel under the existence of serum for cell-enclosing microcapsule, XIX International Conference on Bioencapsulation, Amboise (France), 2011 年 10 月 6 日.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

境 慎司

(SAKAI SHINJI)

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号: 20359938