

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550199

研究課題名(和文) グルカンの生理作用と自己集合を利用した環境応答性高分子ミセルの創製と医療展開

研究課題名(英文) Development of Environmentally-responsive Polymer Micelles Comprising of Molecular Assembly beta-Glucans with Physiological Activities and Their Medical Evolution

研究代表者

矢島 博文(YAJIMA, Hirofumi)

東京理科大学・理学部・教授

研究者番号：10147506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：生理活性をもつが水難溶性の $\beta$ -グルカン、キトサンおよびカードランと、親水性ポリマーのポリエチレングリコールおよび温度応答性高分子ポリN-イソプロピルアクリルアミドを用い、それぞれの組み合わせからなる水溶性グラフト型およびブロック型共重合体を合成した。それぞれの共重合体は、抗腫瘍性薬物ヨウ素との錯形成により、生理条件下のpHおよび温度にตอบสนองするサイズ約100nmの分子集合性ナノゲルおよび高分子ミセルを形成することがわかった。本研究成果として、 $\beta$ -グルカン共重合体-ヨウ素錯体は薬物キャリアーとしての機能を有する新規環境応答型医用材料として十分に期待できると結論された。

研究成果の概要(英文)：Beta-glucans such as chitosan and curdlan have an effective physiological activity. However, a significant drawback of insolubility in neutral water exists for the practical use of their beta-glucans. In order to develop promising medical-nanomaterials working as drug carrier with their beta-glucans involved in overcoming the drawback, we have intended the graft (g) and block (b) type-copolymerization of their beta-glucans with hydrophilic and biocompatible polymers, polyethylene glycol and temperature-responsive poly(N-isopropylacrylamide). As a result, some g- and b-type copolymers soluble in neutral aqueous solution were succeeded to be synthesized, and then, the molecular assembly complexation of the copolymers with iodine gave rise to assume environmentally-responsive nano-particles with a size of ca. 50-100 nm, containing iodine in internal aggregated-core. Consequently, the nano-particles comprising of the beta-glucans and iodine was expected to be a promising drug-carrier.

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学・生体機能材料

キーワード： $\beta$ -グルカン キトサン カードラン ヨウ素錯体 高分子ミセル 環境応答性 薬物キャリアー

## 1. 研究開始時当初の背景

我々は永年にわたり「多糖類の構造と機能に関する研究」の関連から、殺菌性や抗腫瘍性等の高い生理活性を有するヨウ素をゲスト分子とする多糖類の錯形成能に着目してきた。そのなかで、抗菌性や創傷治癒効果等、高い生理活性をもつアミノ多糖のキトサン(Ch)に代表される 1,4-グルカン類のヨウ素との錯形成能に対する知見は、我々の結果が公表されるまでは得られてこなかった。我々は、Chの酸性ヨウ素溶液を凍結解凍することによりキトサン・ヨウ素錯体(ChI)が形成し、その構造が「多数のキトサン鎖が自己集合して、多ヨウ素鎖を左巻きに包接した円筒構造をとる」ことを解明した。ただし、Ch同様、強い免疫賦活作用や制癌作用等の高い生理活性を持つとして注目を集めているカードラン(Cd)に代表される 1,3-グルカン類のヨウ素錯形成能については未だ知見がほとんどない。ChやCdら  $\beta$ -グルカンの物理化学的特性に対する研究の妨げ、さらにそれらの潜在的生理作用を有効活用した生体医用材料が未だ充分に開発されるに至っていない起因は、これら多糖類の自己集合性による基づく中性の水に対する難溶性にある。

また、我々は、 $\beta$ -グルカンの自己集合性、それとヨウ素の生理作用を利用した新規生体医用材料の創製に向けた準備としてこれまでに、親水部にポリエチレングリコール(PEG)のほか、温度応答性高分子ポリN-イソプロピルアクリルアミド(PNIPAAm)を、また疎水部にフラーレン、ポリメタクリル酸、あるいはポリスチレンからなるブロックポリマーを新規に合成し、その高分子ミセルの環境応答分散挙動および薬物キャリアー特性を評価してきた。

以上を背景に、本研究は、水に難溶な  $\beta$ -グルカンの構造と機能の相関性を究明するとともに、その生理作用と自己集合を利用した新規環境応答性高分子ミセル医用材料の創製を目指し、 $\beta$ -グルカンの水溶化のため、 $\beta$ -グルカン共役両親媒性ブロックポリマーの合成を試みた。

## 2. 研究の目的

現在、再生医工学や医療材料開発において、主鎖骨格が  $\beta$ -結合からなる多糖類( $\beta$ -グルカン)の生理作用に注目が集まっている。 $\beta$ -グルカンとし、1,4-グルカンのChや 1,3-グルカンのCd 等が天然にバイオマスとして豊富に存在する。ただし、一般に  $\beta$ -グルカンはその分子特性から中性の水に難溶で、構造形態制御が困難であり、これが  $\beta$ -グルカンに関する基礎・応用研究のさらなる展開を妨げている。我々はこれまでに「多糖類の構造と機能に関する研究」より、1,4-グルカンがヨウ素等のゲスト分子との錯形成に基づき円筒状の分子集合体を形成することを発見した。本研究は、 $\beta$ -グルカンの基礎物性に対する知見を得るとともに、 $\beta$ -グルカンとヨウ素の生理作用を利用した環境応答性生体材料を創製し、それを医療応用へと展開するための研究基盤を確立することを目的とする。その研究項目は、

(1)  $\beta$ -グルカンとして、ChとCdを用い、それらの水溶化のため、PEGおよびPNIPAAmらの親水ポリマーとのグラフト(g)およびブロック(b)共重合体の合成

(2) それら共重合体の中性の水に対する分散および凝集特性の追究とその温度およびpH依存性

(3) それら共重合体のヨウ素錯形成能およびその分子集合特性の追究、

(4) 共重合体の親水部に特異的な細胞を認識する分子(葉酸)を結合させるとともに、水溶液中で形成される凝集粒子の内部の  $\beta$ -グルカン層に薬物(ヨウ素等)を内包させ、その生体内環境条件を視野にpHや熱の刺激によるヨウ素の徐放性およびその薬物キャリアーとしての特性を評価する。

## 3. 研究の方法

(1)  $\beta$ -グルカンとして、Ch には、分子量Mw 125,800 (キミカ)および Mw 5,800と11,000 (栗田工業)を、また Cd には、Mw 81,000 (和光純薬)のものを使用した。一方、PEGには、カルボキシル

基末端修飾PEG (cPEG) (Mw 3,900、和光純薬)、アミノ基末端修飾PEG (aPEG) (Mw 5,000、日油)、およびアミノ基末端葉酸修飾PEG (aPEGFA) (Mw 6,000、フナコシ)を、また PNIPAAmには、アミノ基末端修飾PNIPAAm (aPNIPAAm) (Mw 5,500、Aldrich)を使用した。

(2) Ch-PEG共重合体として、ChとcPEGとのアミノカップリングによりCh-g-PEGを、またChとaPEGおよびaPEGFAを用いて、2-ピコリンボランを還元剤として還元的アミノ化反応によりCh-b-PEGおよびCh-b-PEGFAを合成した。また、Ch-PNIPAAm共重合体として、Ch-b-PEGの合成法同様、ChとaPNIPAAmの還元的アミノ化反応によりCh-b-PNIPAAmを合成した。一方、Cd系に関しては、CdをTEMPO触媒酸化させてCurの6位炭素に選択的にカルボキシル基を導入した後、aPEGおよびaPNIPAAmとのアミノカップリングによりCd-g-PEGおよびCd-g-PNIPAAmを合成した。またCh-b-PEGの合成法同様、CdとaPEGあるいはCdとaPNIPAAmより、還元的アミノ化反応によりCd-b-PEGあるいはCd-b-PNIPAAmを合成した。

(3) 各共重合体の構造解析および合成確認を<sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMRおよびFT-IR測定により行った。

(4) 各共重合体の水分散特性を動的光散乱(DLS)測定により評価するとともに、生体内環境条件を視野に、ヨウ素との錯形成能およびその溶存構造特性を含む物理化学的特性に対するpHおよび温度依存性を、吸収/円偏光二色性(CD)/共鳴Raman等の分光測定およびDLS測定により追究した。

(5) ヨウ素との錯形成能が認められた共重合体に関して、MTTアッセイによる細胞毒性および生理活性として大腸菌に対する殺菌作用を評価した。

(6) 葉酸修飾したCh-b-PEGFAに関して、細胞への取り込み挙動を疎水性モデル薬物として蛍光物質FITCを封入した共重合体粒子を用いて、共焦点レーザー顕微鏡測定により評価した。ここで、対象細胞として、葉酸レセプターの発現量の高いKB細胞と

低いA549細胞を用いて比較した。

(7) これまでの研究期間に得られた研究成果の総括として、高分子ミセルの分子特性に及ぼす $\alpha$ -グルカンの結合様式の効果を考察し、 $\alpha$ -グルカンの構造と機能の相関性をまとめるとともに、薬物キャリアーとしての機能を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ch-g-PEGの物理化学的特性

Ch-g-PEGを水(pH7.0)に溶解した後、25℃下で種々の濃度のKI-I<sub>2</sub>溶液([I<sub>2</sub>]:[KI]=1:10)を混合した溶液は550nm近傍のUV-visスペクトルに、ChI錯体に帰属される特性吸収を示し、その強度はヨウ素濃度とともにシグモイド曲線をもって増加した。これによりヨウ素との錯形成に協同効果が関与していることが示唆された。また、これに対応して、高濃度のI<sub>2</sub>(>3mM)存在下において、ChI錯体と同様、550nm近傍に短波長側に正、長波長側に負のCD特性吸収が現れた。共鳴Raman測定の結果、109cm<sup>-1</sup>にI<sub>3</sub><sup>-</sup>、160cm<sup>-1</sup>にI<sub>5</sub><sup>-</sup>に帰属されるピークが観測され、錯体を構成するヨウ素種がI<sub>3</sub><sup>-</sup>とI<sub>5</sub><sup>-</sup>であることが明らかとなった。一方、DLS測定の結果、複合体の粒径はI<sub>2</sub>濃度の増加に伴い、粒径約30nm程度から約100nmに増加する傾向を示した。このことより、キトサンとヨウ素の分子集合錯体形成が分子内および分子間で起こることにより、ナノゲル粒子の凝集体を形成し、ヨウ素濃度の増加に伴い、その錯形成が成長していくものと示唆された。また、この複合体はpH変化に対し、酸性領域では錯体構造の崩壊による特性吸収の減少が見られた。これは、正電荷をもつキトサン鎖間の静電反発に基づくものと推察され、細胞内pH環境下で、ヨウ素が徐放されると示唆された。一方、塩基性領域で、特性吸収はpH8.0で急激な減少を示した。遊離ヨウ素のアルカリ劣化はpH7.2付近で観測されることから、抑制効果が認められた。さらにこの複合体の大腸菌に対する殺菌性は、生体温度(37℃)下で時間に対してヨウ素の徐放

効果による殺菌が 12 時間まで継続して殺菌率 70% まで上昇した。以上より、本研究で創製した Ch-g-PEG/ヨウ素複合体ナノゲル粒子は生体内環境下において安定性を維持しつつ、徐放効果によるヨウ素の殺菌特性を活かした新規薬物材料としての応用が期待される。

### (2) Ch-b-PEG の物理化学的特性

Ch-b-PEG のヨウ素溶液の UV-vis 吸収スペクトルを測定したところ、500nm 近傍に ChI 複合体に帰属される特性吸収帯が観測され、室温・中性条件下で簡便に複合体が形成できることが分かった。これは、Ch-b-PEG ミセル中にヨウ素が可溶化したためであると考えられる。次に、CD 測定を行ったところ、複合体を形成するヨウ素種は左巻き螺旋構造を形成することが分かった。これらは、葉酸修飾 Ch-b-PEG においても同様の結果が得られた。また、DLS 測定の結果、ヨウ素を内包することにより粒径が減少する結果が得られた。これは、Ch-b-PEG が Ch をコア、PEG をシェルとする高分子ミセルを形成し、コア部のキトサンとヨウ素の強い分子間相互作用により粒径が収縮したためであると考えられる。また、この粒径は 120nm で安定となり、Ch-b-PEG とヨウ素の複合体 (Ch-b-PEG/I) は、がん細胞に集積可能な新規薬物キャリアとしての応用化が期待される結果を得た。また、この複合体は生体温度 (37 °C) でも安定な構造を保持した。さらに pH3 ~ 11 の範囲における変化を評価したところ、pH7 で最も複合体形成能が高いことが分かった。酸性領域では、内包ヨウ素の放出制御が示唆され、塩基性領域では、pH10 まで複合体構造を保持し、Ch-b-PEG 高分子ミセルとの複合体形成による劣化抑制効果が認められた。

さらに葉酸修飾 Ch-b-PEG において腫瘍細胞への集積性評価を行い、葉酸レセプター陽性の細胞において、疎水性モデル薬物の特異的な集積を確認した。以上より、本研究で創製した Ch-b-PEG/I、葉酸修飾 Ch-b-PEG/I 複合体は生体内環境下において安定性を維持しつつ、ヨウ素の殺菌性、腫瘍組織への集積性

を活かした新規薬物キャリアとしての応用が期待された。

### (3) Ch-b-PNIPAAm の物理化学的特性

Ch-b-PNIPAAm を超純水に溶解した後、25 °C 下で種々の濃度の KI-I<sub>2</sub> 溶液を混合したところ、混合溶液は 500nm 近傍の UV-vis スペクトルに ChI 錯体に帰属される特性吸収を示した。この溶液はヨウ素濃度 2mM 以上において特に強い特性吸収を示した。またこれに対応して、2mM の I<sub>2</sub> 存在下において ChI 錯体と同様、550nm 近傍に短波長側に正、長波長側に負の CD 特性吸収が現れた。共鳴ラマン測定の結果、109 cm<sup>-1</sup> に I<sub>3</sub><sup>-</sup>、160 cm<sup>-1</sup> に I<sub>5</sub><sup>-</sup> に帰属されるピークが観測され、錯体を構成するヨウ素種が I<sub>3</sub><sup>-</sup> と I<sub>5</sub><sup>-</sup> であることが明らかとなった。DLS 測定の結果、複合体はヨウ素濃度増加に伴い粒径が約 20 nm から 100 nm に増大することが判明した。また、この複合体は温度変化に対して応答性を有しており、PNIPAAm 単体では下限臨界共溶温度(LCST) ~ 40 °C を超えると、粒径が 1000 nm まで増大するのに比べ、複合体の粒径は約 200 nm 程度の増加にとどまった。この増加は PNIPAAm の疎水化に伴い Ch-b-PNIPAAm 同士がミセル状に凝集するためであると考えられる。この時、UV-vis スペクトルでは温度上昇に伴い錯体の特性吸収が減少するとともに、290 nm 及び 360 nm における I<sub>3</sub><sup>-</sup> に起因する吸収が増加する様子が観測された。これは、Ch-b-PNIPAAm 同士の凝集による PNIPAAm 層の疎水化の進行に伴い、Ch との錯形成に關与していたヨウ素種 I<sub>5</sub><sup>-</sup> が I<sub>5</sub><sup>-</sup> → I<sub>2</sub> + I<sub>3</sub><sup>-</sup> の反応を起こし、ヨウ素が遊離したためと示唆された。さらに、温度上昇後、温度を再び 25 °C に戻すと粒径及び錯体の特性吸収が温度上昇前に近い状態まで戻ることから、この複合体は温度に対して可逆性があることが明らかとなった。以上より、本研究で創製したヨウ素と Ch-b-PNIPAAm の複合体ナノゲル粒子は生体内環境において安定性を維持しつつ、温度変化による放出制御を利用してヨウ素の殺菌特性を活かした新規薬物材料としての応用が期待された。

#### (4) Cd-g-PEG および Cd-b-PEG の物理化学的特性

Cd-g-PEG において、TEMPO 酸化によるカルボキシル基の導入および PEG のカップリングを、FT-IR 測定、<sup>1</sup>H-NMR および <sup>13</sup>C-NMR、測定によって確認した。Cd-g-PEG 水溶液にヨウ素溶液を添加した溶液 ([I<sub>2</sub>]=1.0mM) の UV-vis 吸収を測定した結果 (Fig.1)、450 nm 付近に KI/I<sub>2</sub> 溶液では見られない Cd/I 錯体に起因する特性吸収帯が観測された。この結果は、既往研究における塩化カルシウム存在下での Cd/I 錯体の吸収波長と一致することより、ヨウ素との錯体が形成されたと考えられる。また、Raman 測定においてもヨウ素錯体特有の I<sub>5</sub> に起因するピークが観察され、Cd/I 錯体の形成を支持する結果が得られた。さらに、この溶液の粒子径は約 100nm となり、Cd-g-PEG(150nm) よりもやや収縮する傾向が見られた。以上の結果から、PEG を導入することによって Cd を水溶媒中で安定して溶解することができ、ヨウ素との錯形成が可能となったと言える。ブロック共重合体についてもグラフト共重合体と類似した結果を得た。450nm にヨウ素錯体の特性吸収を持ち、Raman 測定から、ヨウ素錯体の作製が確認された。粒径は 50nm 前後とグラフト共重合体よりも小さな値となった。

更に、それぞれの Cd-PEG/I 錯体の生体条件下における錯形成能を追究したところ、pH7.4 および温度 37.0 での錯体形成が可能であることが分かった。以上の結果より、Cur-PEG はヨウ素と生体内にて錯体を形成し、ヨウ素の特性を付与した新規生体材料としての応用が期待された。

#### (5) Cd-g-PNIPAAm および Cd-b-PNIPAAm の物理化学的特性

合成された共重合体の LCST を 600nm における濁度測定により評価したところ、Cd-g-PNIPAAm は 46.0、Cd-b-PNIPAAm は 39.2 であった。なお、PNIPAAm 自身の LCST は 37.7 であった。温度変化に伴う粒径変化を DLS により測定し比較した。その結果、LCST 以下の温度において、Cd-g-PNIPAAm は約 280nm、Cd-b-PNIPAAm は約 60nm であるのに対し、LCST 以上では

Cd-g-PNIPAAm は 100~150nm に減少し、Cd-b-PNIPAAm は 1700nm に増大することが確認された。これらの結果より、グラフト体は温度変化により集合体の粒径が収縮するのに対し、ブロック体は集合体同士が凝集することが考えられる。

特にブロック共重合体においては、LCST が 39.2 であり、生体内温度においてミセルのような集合体を形成し薬物を内包、患部において局部的に加温することで凝集を起こし内包物を放出するという効果が期待できた。また、LCST 以下の温度での粒径は 60nm であり EPR 効果により細胞に取り込まれやすいサイズであることから薬物キャリアーとしての応用が期待された。

さらに、合成した Cd-g-PNIPAAm または Cd-b-PNIPAAm とヨウ素の複合体形成について、UV-vis 吸収測定および CD 測定、Raman 分光測定により評価した。Cd-g-PNIPAAm または Cd-b-PNIPAAm の濃度 0.2mg/ml 水溶液、ヨウ素濃度 0.025~15mM のヨウ素水溶液を混合させ、ヨウ素共重合体溶液を調製した。UV-vis 吸収測定および CD 測定、Raman 分光測定において、すべての濃度で複合体特性吸収は観察されなかった。その結果、Cd-g-PNIPAAm または Cd-b-PNIPAAm とヨウ素は複合体を形成しないことが示唆された。

#### (6) 総括

β-グルカン共重合体 - ヨウ素錯体は薬物キャリアーとしての機能を有する新規環境応答型医用材料として十分に期待できると結論された。

#### 5. 主な発表論文等

##### 【雑誌論文】 (計6件)

J. Kobayashi, M. Nishi, Y. Akiyama, M. Yamato, H. Yajima, and T. Okano, Selective Cell Adhesion and Detachment on Antibody-Immobilized Thermoresponsive Surfaces by Temperature Changes, **25**, 2013, 637-643. (査読あり)

A. Tamura, G. Ikeda, J. Seo, K. Tsuchiya, H.

Yajima, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, and N. Yui, Molecular logistics using cytoleavable polyrotaxanes for the reactivation of enzymes delivered in living cells, *Scientific reports*, **3** (2013) 2252. (査読あり)

A. Tamura, M. Nishi, J. Kobayashi, K. Nagase, H. Yajima, M. Yamato, and T. Okano, Simultaneous Enhancement of Cell Proliferation and Thermally Induced Harvest Efficiency Based on Temperature-Responsive Cationic Copolymer-Grafted Microcarriers, *Biomacromolecules*, **13**, 2012, 1765-1773. (査読あり)

K. Itagaki, T. Naito, R. Iwakiri, M. Haga, S. Miura, Y. Saito, T. Owaki, S. Kamiya, T. Iyoda, H. Yajima, S. Iwashita, S. Ejiri, and F. Fukai, Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A Induces Anoikis by Triggering Cell Detachment, *J. Biol. Chem.*, **287**, 2012, 16037-16046. (査読あり)

T. Tanaka, K. Tsuchiya, H. Yajima, Y. Suzuki, A. Fukutome, In Vitro Degradation Properties of Ion-beam Irradiated Poly(lactide-co-glycolic acid) Mesh, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **269**, 2011, 2130-2132. (査読あり)

K. Uchida, A. Tamura, N. Fukushima, H. Yajima, Dependence of the dispersion behavior of [60]fullerene in aqueous media on the chain length of poly(N-isopropylacrylamide) as a dispersing agent, *Colloid Polym. Sci.*, **289**, 2011, 73-78. (査読あり)

#### 【学会発表】 (計8件)

矢島博文、平成25年度ヨウ素学会受賞講演：分子集合性 1,4-グルカン・ヨウ素複合体を利用した環境応答性ナノバイオ材料の創製と医療展開、第16回ヨウ素学会シンポジウム、2013年9月18日、千葉大学けやき会館。

本田雄士、石井 萌、土屋好司、矢島博文、カードラン PEG 共重合体/ヨウ素複合体の調製とその物理化学的特性、第16回ヨウ素学会シンポジウム、

2013年9月18日、千葉大学けやき会館。

加藤正彦、横山 舞、土屋好司、矢島博文、カードラン-PNIPAAm共重合体/ヨウ素複合体の調製と物理化学的特性およびその生理活性、第16回ヨウ素学会シンポジウム、2013年9月18日、千葉大学けやき会館。

甲斐詢平、深堀理子、嵯峨しおり、土屋好司、矢島博文、キトサン-葉酸修飾ポリエチレングリコアルグラフト共重合体/ヨウ素複合体の調製及びその物理化学的特性評価、第16回ヨウ素学会シンポジウム、2013年9月18日、千葉大学けやき会館。

嵯峨しおり、上田新太郎、土屋好司、矢島博文、キトサン-PEG グラフト及びブロック共重合体/ヨウ素複合体の調製と物理化学的特性およびその生理活性、第16回ヨウ素学会シンポジウム、2013年9月18日、千葉大学けやき会館。

齋藤宏紀、土屋好司、矢島博文、環境応答性 PNIPAAm - キトサンブロック共重合体の合成とその物理化学的特性、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012年11月26日、仙台国際センター。

石井萌、横山舞、土屋好司、矢島博文、カードラン-水溶性高分子共重合体の合成とその物理化学的特性、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012年11月26日、仙台国際センター。

嵯峨しおり、上田新太郎、土屋好司、矢島博文、キトサン-PEG グラフトおよびブロック共重合体/ヨウ素複合体の物理化学的特性およびそれらの生理活性、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、2012年11月26日、仙台国際センター。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

矢島 博文 (YAJIMA, Hirofumi)  
東京理科大学・理学部・教授  
研究者番号：10147506