

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2016

課題番号：25560230

研究課題名(和文) 生体内の不安定余剰鉄イオンを除去する新材料創成

研究課題名(英文) Material design to remove unstable excess iron ions from body

研究代表者

青柳 隆夫 (AOYAGI, Takao)

日本大学・理工学部・教授

研究者番号：40277132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、鉄イオンの無制限な摂取が発ガンや様々な重篤な疾患の発症の危険性を高めていることが明らかとなっている。また骨髄不全性症候群の患者は、長期間にわたる輸血により、血液中の鉄イオンが過剰になることから、生体に安全な除去システムの開発が望まれていた。

本研究では、生体適合性の高いポリエチレングリコールを用いた新規のキレート材料の分子デザインと調製および鉄イオン除去効果の検証を行った。具体的には、4分岐と8分岐をしたポリエチレングリコールの末端にリン酸基を導入した材料は、鉄イオンと効果的に相互作用し、模擬実験においても透析膜を挟んで鉄イオンを効果的に除去できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has become clear that unlimited ingestion of iron ions enhances the risk of developing carcinogenesis and various serious diseases. In patients with myeloid dysfunction syndrome, it has been desired to develop a biologically safe removal system, because the blood contains excess iron ions due to long-term transfusion.

In this study, molecular design and preparation of novel chelating materials using polyethylene glycol with high biocompatibility, and verification of iron ion removal effect were carried out. As a result, phosphate-terminated polyethylene glycols with 4-branches and 8-branches structures effectively interact with iron ions and iron ions were effectively removed through dialysis membranes.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ポリエチレングリコール 鉄イオン 配位結合 透析 メタロアッセイ

1. 研究開始当初の背景

成人では、食事により平均 1~2mg/日の鉄を摂取しており、消化管での細胞脱落及び出血によりほぼ同量の鉄が排泄されバランスが保たれている。わが国では、特に若者の鉄不足への注意が喚起されていることから、様々な鉄イオン含有サプリメントが販売されているが、近年、鉄イオンの無制限な摂取が発ガンや様々な重篤な疾患の発症の危険性を高めていることも明らかとなっている[J. Biol. Inorg. Chem., 13, 57, 2008]。さらに、再生不良性貧血や髄異形性症候群などの骨髄不全性症候群の患者は、長期間にわたる輸血が必要とされる。そのために血液中の鉄イオンが過剰になり、体内の鉄イオンが飽和状態になることから、生体に安全な除去システムの開発が望まれていた。鉄は消化管より Fe(II)として吸収され、Fe(III)に酸化されたのちトランスフェリンと結合し、造血組織や各臓器へ輸送される。しかし、過剰な鉄の投与によって継続した鉄負荷がかかることで、細網内皮系マクロファージの貯蔵鉄が飽和し、その結果トランスフェリン飽和度が増加し、血中にトランスフェリン非結合鉄(以下、NTBI: nontransferrin bound iron)が増大する。(Fig. 1) NTBI は肝細胞に取り込まれるが、肝臓の貯蔵鉄の飽和に伴い、血中濃度が高いまま維持される。この過剰鉄により生じる酸化ストレスによって、肝臓・心臓・すい臓・甲状腺・下垂体・その他内分泌器官などの多臓器に広範な障害を引き起こし、心筋梗塞、脳卒中、糖尿病などの致死的な障害の原因となる(慢性鉄過剰症)。同様に、脳などの特定部位に大量の鉄イオンが蓄積すると、AGEs(最終糖化産物)の形成が促進され、アルツハイマー病やパーキンソン氏病などの原因になることが近年指摘されている。

2. 研究の目的

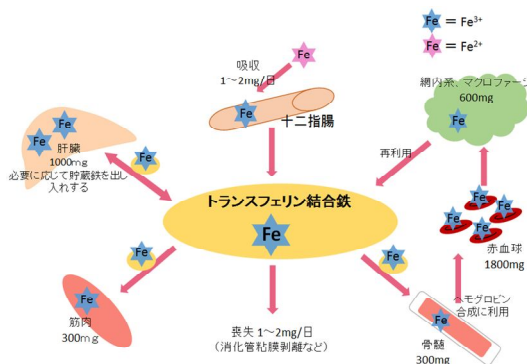


Fig. 1 鉄の体内動態

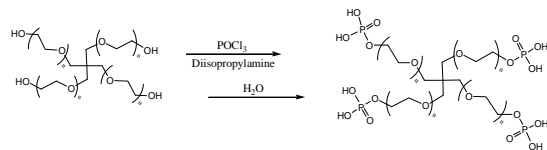
本研究では、生体適合性に優れたポリエチレングリコール(PEG)とリン酸基のみを用いることで、トランスフェリン結合型鉄は捕捉せず、NTBIのみを捕捉可能な新規キレート剤の開発を目指し、特に鉄キレート構造の精密な設計を行う。

3. 研究の方法

(1) 分岐ポリエチレングリコール末端への

リン酸基の導入

テトラヒドロフラン(THF)にポリエチレングリコール(4-PEG, 8-PEG)とPEG鎖に対して50mol 等倍となるように、ジイソプロピルアミン(DIPA)を加えた。溶解後、アルゴン雰囲気下、氷浴中で塩化ホスホリル(POCl_3)を滴下し、24時間攪拌した。攪拌後純水を加え、反応溶液を溶媒留去し、2日間透析を行った。透析し終わった水溶液を凍結乾燥をすることで4分岐末端にリン酸基が導入されたポリエチレングリコール(4-PEG-Phos)が得られた。同様の操作により、8分岐末端にリン酸基が導入されたポリエチレングリコール(8-PEG-Phos)も合成した。



Scheme 1 Preparation of 4-PEG-Phos.

(2) 鉄イオン存在下でのリン酸化PEGのゲル化の確認

リン酸基を導入すれば Fig. 2 に示すように鉄イオンと配位結合して錯体を形成し架橋するのでゲル化すると考え、その確認を行った。水 750 μL に 4-PEG-Phos もしくは 8-PEG-phos 0.050 g を加えたポリマー水溶液に 0.25 M の FeCl_3 水溶液 200 μL を加えゲル化の確認を行った。

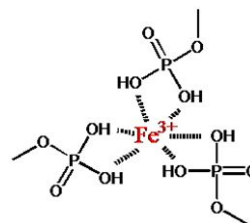


Fig.2 Reaction of PEG Terminal phosphate group.

(3) 鉄イオン捕捉実験

透析膜に水 5mL に溶解した 8-PEG-Phos 0.66 g を入れ、700 $\mu\text{g}/\text{dL}$ になるように鉄水溶液を調整したビーカーに入れた。ビーカー内で攪拌を行い、透析膜外の鉄水溶液を 0分、5分、15分、60分にサンプリングした。サンプリングした鉄水溶液を「メタロアッセイ 鉄測定 LS (フェロジン法)」のキットを用いて吸光度を測定した。吸光度から下記の式より鉄濃度 [$\mu\text{g}/\text{dL}$] を求めた。

$$\frac{\text{OD}_{\text{試料}} - \text{OD}_{\text{ブランク}}}{\text{OD}_{\text{標準}} - \text{OD}_{\text{ブランク}}} \times 200 = \text{鉄濃度}(\text{mg}/\text{dL})$$

標準液濃度

$\text{OD}_{\text{試料}}$: 試料の吸光度

$\text{OD}_{\text{標準}}$: 標準試料の吸光度

$\text{OD}_{\text{ブランク}}$: 試薬ブランクの吸光度

単位換算 $\text{mg}/\text{dL} \times 0.179 = \text{mmol}/\text{L}$

4. 研究成果

(1) リン酸基末端分岐ポリエチレングリコールの合成

上述の方法により、リン酸基末端を有する分岐型のポリエチレングリコールを調製した。¹H-NMR 測定により、合成に確認及び導入率の算出を試みたが、原料となるポリエチレングリコールの分子量が 40,000 と大きいので、末端基の濃度が大変薄くなり、ピークとしての検出ができなかった。そのため、後述の鉄イオン存在下でのゲル化挙動を追跡することで、リン酸基の導入を検証した。

(2) 鉄イオン存在下でのリン酸化 PEG のゲル化の確認

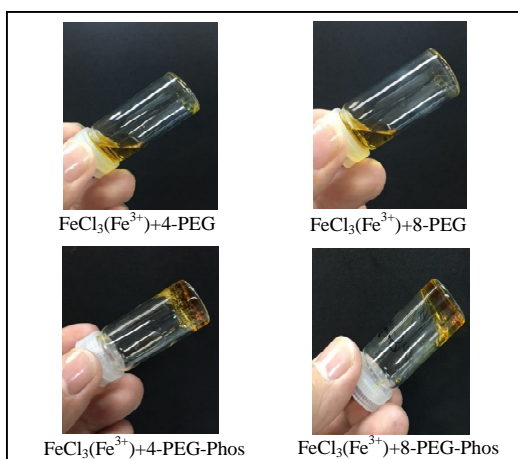


Fig.3 Image of 4-PEG and 8-PEG,4-PEG-Phos,8-PEG-Phos, solutions with and without metal ions(Fe^{3+}).

原料となる、8-PEG、4-PEG-およびリン酸基を導入した Phos、8-PEG-Phos のゲル化の確認を行った。その結果を Fig.3 に示す。図から明らかなように 4-PEG、8-PEG はゲル化の確認は出来なかったが、4-PEG-Phos、8-PEG-Phos はゲル化が確認出来た。この結果は、リン酸基の導入が成功していることと、このポリマーを用いることで Fe^{3+} の吸着が行えることを示唆している。

(3) 鉄イオン捕捉実験

今回、8-PEG-Phos の方が一分子当たりの末端のリン酸基数が多いために、鉄の補足能が高いと期待されたことから、8-PEG-Phos を用いて鉄の補足能を調べた。

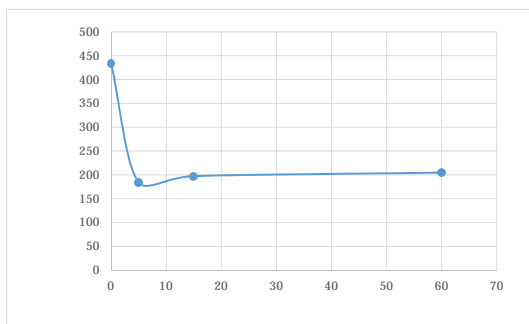


Fig.4 Fe^{3+} concentration as a function of time in the medium.

Fig. 4 から明らかなように、透析膜に封入されたリン酸基末端のポリエチレングリコールは、鉄を急激に吸着していることが示唆された。この透析膜では分画分子量が 1000 のものであり、鉄イオンは自由に通過できる。一方、ポリエチレングリコールは上述のように分子量が 40,000 であり、膜透過は不可能である。濃度勾配に従って鉄イオンが透析膜に浸透し、リン酸基と相互作用することにより、鉄イオンが捕捉されたものと考えている。この捕捉実験の終了後、透析膜を開放し、内液の性状を確認したところ、ゲルは生起していなかった。これは、(2)で確認したゲルでは、十分量の鉄イオンが存在したために、理想的な 6 配位が進行し、ゲル化したためである。捕捉実験の場合は、それに比べて低濃度であったためにゲル化は起こらなかったと考えられる。ゲル化を生起するほどの濃度でなくても、鉄イオンを捕捉できることから、微粒子表面あるいは、中空系表面にリン酸基生体適合性の高いポリエチレングリコールを介して導入すれば、鉄イオンの回収が期待できるデバイスとなると期待できる。

今回、純水中での鉄イオンの捕捉を検証できたが、最終的には血液中の捕捉が必要である。血漿タンパク質の存在下あるいは血液中での捕捉の可能性を今後検証する必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takeshi Sato, Koichiro Uto, Takao Aoyagi, Mitsuhiro Ebara, An Intriguing Method for Fabricating Arbitrarily Shaped “Matreshka” Hydrogels Using a Self-Healing Template, *Materials*, 2016, 9, 864, 査読あり

〔学会発表〕(計 5 件)

佐藤健、青柳隆夫、荏原充宏、“自己修復テンプレートを用いた生体適合性ハイドロゲルデバイスの構築法”、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 25 日～27 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

Takeshi Sato, Mitsuhiro Ebara, Akihiko Kikuchi, Takao Aoyagi, “A PEG-BASED SELF-HEALING TEMPLATE TO CREATE THREE-DEMENSIONAL ARBITRARILY-SHAPED HYDROGEL”, 22nd Polymer Networks Group Meeting (PNG) and 10th Gel Symposium, 2014 年 11 月 10 日～14 日、伊藤謝恩ホール（東京都文京区）

佐藤健、荏原充宏、田中信治、麻生隆彬、菊池明彦、青柳隆夫、“自己修復ゲルを鋳型とする三次元積層型傾斜材料”、第 63 回高分子学会年次大会、2014 年 5 月 28 日～30 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

佐藤健、麻生隆彬、菊池明彦、荏原充宏、青柳隆夫、“リン酸基 金属イオンを架橋口に有する自己修復ゲルの力学的特性評価”、

第 62 回高分子討論会、2013 年 9 月 11 日～13
日、金沢大学（石川県金沢市）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/bmc/group/smartbiomaterials/>

<http://aoyaginims.wixsite.com/mysite>

6．研究組織

(1)研究代表者

青柳 隆夫 (AOYAGI, Takao)

日本大学・理工学部・教授

研究者番号：40277132

(2)研究分担者

荻原 充宏 (EBARA, Mitsuhiro)

物質・材料研究機構・研究員

研究者番号：10452393

(3)研究協力者

佐藤 健 (SATO Takeshi)