

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：32403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860027

研究課題名(和文)分子ネックレス構造による人工膵臓分子マシン

研究課題名(英文) Sugar-responsive molecular necklaces and their application for an artificial pancreas

研究代表者

江川 祐哉 (Egawa, Yuya)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：90400267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：鎖状高分子が多数の環状分子を貫いた構造は分子ネックレスとよばれる。この分子ネックレス構造の環状分子に対し、糖センサー分子のフェニルボロン酸(PBA)を導入することで、糖により崩壊する分子マシンになることを既に報告している。本研究では、新たにニトロフェニルボロン酸(NPBA)を用いた検討を行った。NPBAを用いた場合、グルコースに対する応答が改善した。これはNPBAの糖への高い親和性に加え、分子ネックレス中でのNPBAの3次元的配置によるものと考えられた。鎖状高分子の先にインスリンを導入して分子ネックレスを調製し、糖に応答してインスリンを放出する、人工膵臓としても機能することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We have improved a sugar response of an artificial pancreas system based on a molecular necklace structure. Our previous system was composed of two materials. One was a bead-like molecule modified with a sugar sensor moiety, phenylboronic acid-modified  $\beta$ -cyclodextrin (PBA- $\beta$ -CyD). The other was a chain polymer modified with naphthalene and insulin at each terminal, naphthalene-polyethylene glycol-insulin (Naph-PEG-Ins). The Naph-PEG-Ins/PBA- $\beta$ -CyD molecular necklace was poorly water soluble at pH 7.4; however, sugar addition induced disintegration of the molecular necklace, and the release rate of Naph-PEG-Ins was accelerated. In this study, the sugar sensor moiety was replaced by nitrophenylboronic acid (NPBA). The molecular necklace containing NPBA showed a better sugar response due to its stronger sugar affinity and its three-dimensional arrangement in the molecular necklace.

研究分野：物理化学

キーワード：シクロデキストリン ボロン酸 糖応答性 インスリン 超分子 シュードポリロタキサン ポリシュードポリロタキサン 刺激応答性

### 1. 研究開始当初の背景

食事を摂ることで血糖値は上昇するが、血糖値を制御するために、膵臓から血糖値を下げるインスリンが分泌される。インスリン分泌機能が失われた場合、インスリンを自己注射により補充するが、血糖値に応じて必要な量、適切なタイミングで自己注射することは難しい。そのため、血糖値を自ら感知し、インスリンを必要なときに放出するシステムの開発が望まれている。このようなシステムは人工膵臓とよばれ、化学的なアプローチの一つとしてフェニルボロン酸 (PBA) の利用が試みられている。PBA は糖のジオール部位と可逆的に結合する特性をもつため、糖センサー分子として使われる。PBA は高分子ゲルなどに組み込まれて使われることが多いが、実用化には多くの課題が残されている。

研究代表者は、PBA を人工膵臓で利用するには、PBA とインスリンを分子マシンとして組み合わせることが有効と考え、本研究課題を提案する段階で、その分子マシンの動作原理の構築に成功していた。

その分子マシンは、 $\gamma$ -シクロデキストリン ( $\gamma$ -CyD) という環状分子を、直鎖高分子のポリエチレングリコール (PEG) に貫通させた分子ネックレスを基本構造とする。 $\gamma$ -CyD に PBA を修飾して PBA- $\gamma$ -CyD とし、PEG の先にはインスリンを修飾して PEG-Ins とする。これらを水中で共存させると、固体の分子ネックレス PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD が得られる。PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD は水中で安定に存在するが、糖を共存させることで、分子ネックレス構造が崩壊し PEG-Ins を溶液中に放出する (図 1)。

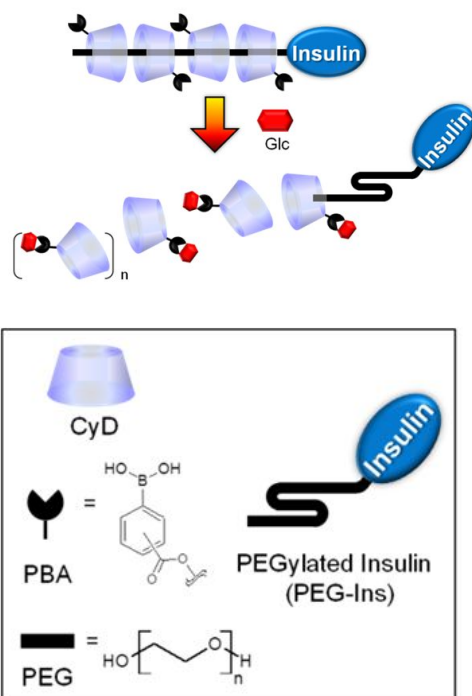


図 1. 人工膵臓分子マシン PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD の概念図

### 2. 研究の目的

本研究課題ではこの人工膵臓分子マシンを、より低い濃度のグルコース (Glc) に応答することを目的とし、 $\gamma$ -CyD に修飾する PBA 誘導体を変え、分子ネックレスの調製、糖応答性を調査した。

いくつかの PBA 誘導体を試した中で、ニトロ基を持つ PBA が修飾された  $\gamma$ -CyD (NPBA- $\gamma$ -CyD) で分子ネックレスを調製できた (図 2)。NPBA- $\gamma$ -CyD, PBA- $\gamma$ -CyD, それぞれを用いた場合を比較することにより、PBA 誘導体を分子ネックレスに組み込む際の詳細な情報を収集することとした。

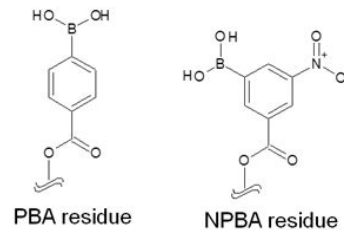


図 2. 糖センサー分子の化学構造

### 3. 研究の方法

分子ネックレスの構成材料として以下の物質を合成した。分子ネックレス形成能を上昇させるため、PEG 末端にはナフタレン (Naph) を導入した。

#### (1) PBA- $\gamma$ -CyD

4-カルボキシフェニルボロン酸のカルボン酸を活性化し、 $\gamma$ -CyD の一級水酸基とエステル結合を形成させた。

#### (2) NPBA- $\gamma$ -CyD

3-カルボキシ-5-ニトロフェニルボロン酸のカルボン酸を活性化し、 $\gamma$ -CyD の一級水酸基とエステル結合を形成させた。

#### (3) Naph-PEG

2-ナフトイルクロライドを PEG (分子量約 2,000) の末端の水酸基に反応させ、エステル結合を形成させた。

#### (4) Naph-PEG-Ins

片末端にアミノ基、もう一方にカルボキシ基を持つ PEG (分子量約 2,000) を原料とし、アミノ基にナフトイルクロライドを反応させ、もう片方のカルボキシ基を活性化しインスリンの一級アミノ基とアミド結合を形成させた。

これらの合成物を組み合わせ、分子ネックレスが形成される過程、得られた分子ネックレスの構造解析、糖応答性を調査した。

### 4. 研究成果

#### (1) 分子ネックレス形成過程の調査

CyD 誘導体を水溶液とし、ここに Naph-PEG を添加し、分子ネックレスができる様子を、濁度 ( $\tau$ ) を指標に評価した (図 3)。非修飾  $\gamma$ -CyD では速やかな濁度上昇が見られたのに対し、NPBA- $\gamma$ -CyD では緩やかな濁度

上昇, PBA- $\gamma$ -CyD にいたっては測定時間内での濁度上昇はごくわずかであった。この結果は PBA 誘導体が分子ネックレス形成を阻害することを示すものである。

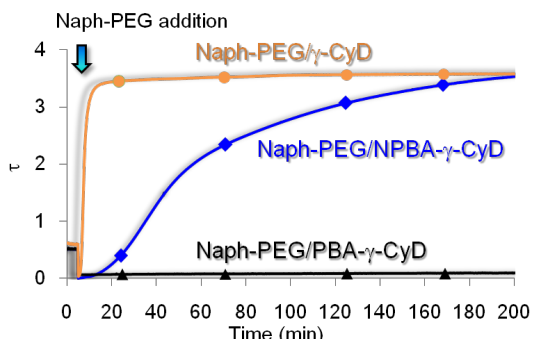


図 3. 分子ネックレス形成の濁度による評価

PBA 誘導体と  $\gamma$ -CyD との空間的な位置を把握するため、誘起円二色性 (ICD) スペクトル測定、量子化学計算によって遷移モーメントの算出を行った。その結果を解析すると、PBA- $\gamma$ -CyD においては PBA 部位が CyD 空孔を覆う様に傾いており、これが Naph-PEG の包接を阻害しているものと考えられた (図 4)。一方、NPBA 修飾基は倒れずに配向していた。これにより PEG 鎖が CyD 空孔へアクセスしやすい状態にあり、NPBA- $\gamma$ -CyD が比較的、速やかな分子ネックレス形成をしたと考えられた。

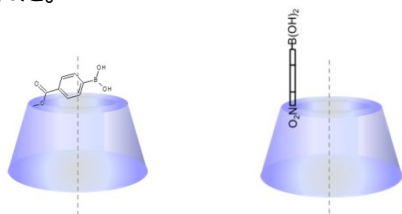


図 4. 修飾 CyD の水中での修飾基の空間的配置

この結果は、修飾基の空間的配置が分子ネックレス形成に大きな影響を与えることを、初めて示した例といえる。研究開始当初、数種類の PBA 誘導体修飾  $\gamma$ -CyD を合成し、Naph-PEG との分子ネックレスの調製を試みた。しかし、分子ネックレスが得られたものは、PBA- $\gamma$ -CyD と NPBA- $\gamma$ -CyD のみであった。過去の報告でも修飾 CyD による分子ネックレスの報告は非常に少ない。本検討では、数少ない成功例を比較したものであり、修飾 CyD を用いた分子ネックレスを調製する際の、修飾基選択の一つの指針となりうるであろう。

## (2) 分子ネックレスの構造解析

CyD 誘導体および Naph-PEG を水中で共存させて得られる沈殿について、 $^1\text{H-NMR}$  により化学量論比を調査した。PBA- $\gamma$ -CyD、NPBA- $\gamma$ -CyD のどちらを用いた場合でも Naph-PEG が一本貫通した分子ネックレスで

あった。非修飾  $\gamma$ -CyD と PEG 誘導体を組み合わせた分子ネックレスは、通常、二本鎖で得られる。そのため、本研究課題で得られた、 $\gamma$ -CyD 誘導体を用いながら一本鎖の分子ネックレスは超分子化学的にも興味深い知見といえる。

続いて、粉末 X 線回折測定により分子ネックレスの結晶構造を評価した。NPBA- $\gamma$ -CyD を用いた場合、非修飾  $\gamma$ -CyD を用いた場合と同様の Head-to-Head の正方晶チャネル型構造を示した。一方で PBA- $\gamma$ -CyD では全く異なるパターンを示した。溶液中の二次元 NMR の解析により PBA- $\gamma$ -CyD の PBA 修飾基は CyD に包接されて存在することが示された。これは自己包接によるものではなく、もう一つ別の PBA- $\gamma$ -CyD が近傍に存在し、CyD 空孔の広い口側から包接されているものと考えられた。結晶中においては Head-to-Tail の配列で結晶を形成したために、粉末 X 線回折測定のパターンが他のものと異なることと推測された。

以上の結果により、 $\gamma$ -CyD に修飾する PBA 誘導体によって、全く異なる結晶構造が得られることが示された。この結晶構造の違いは糖センサー分子の空間的位置も結晶中において大きく異なるものと推測された。

## (3) Naph-PEG を用いた分子ネックレスの糖応答性の評価

分子ネックレスの糖応答性に先立ち、CyD 誘導体のみでの Glc に対する結合定数を pH 7.4 の緩衝液中で評価した (表 1)。Glc に対する結合能は、PBA 誘導体により異なり、一般的に電子吸引基が導入されたもので結合力が高い。NPBA- $\gamma$ -CyD でもその傾向が見られた。

PBA- $\gamma$ -CyD	NPBA- $\gamma$ -CyD
8.0 M <sup>-1</sup>	50.1 M <sup>-1</sup>

表 1. 修飾 CyD の Glc に対する結合定数

次に分子ネックレスとした場合の Glc 応答性を評価した。各分子ネックレスを懸濁させ、Glc 溶液を添加し、濁度の減少を観察した。PBA- $\gamma$ -CyD に比べ、NPBA- $\gamma$ -CyD を用いた場合において、より低濃度で分子ネックレス崩壊し、濁度の減少が見られた。

糖応答性のもう一つの評価法として、Glc 溶液中に分子ネックレス固体を添加した後の Naph-PEG の放出パターンを蛍光測定により評価した。この評価法においても、PBA- $\gamma$ -CyD に比べ、NPBA- $\gamma$ -CyD を用いた場合において、Glc に対する高い応答が見られた (図 5)。これは NPBA 修飾基が PBA 修飾基よりも高い Glc 親和性を有することに起因すると考えられた。さらに、NPBA- $\gamma$ -CyD を用いた分子ネックレスでは、Naph-PEG 放出初期において鋭い Glc 応答が見られたことが

ら，放出メカニズムが異なる可能性が示唆された。

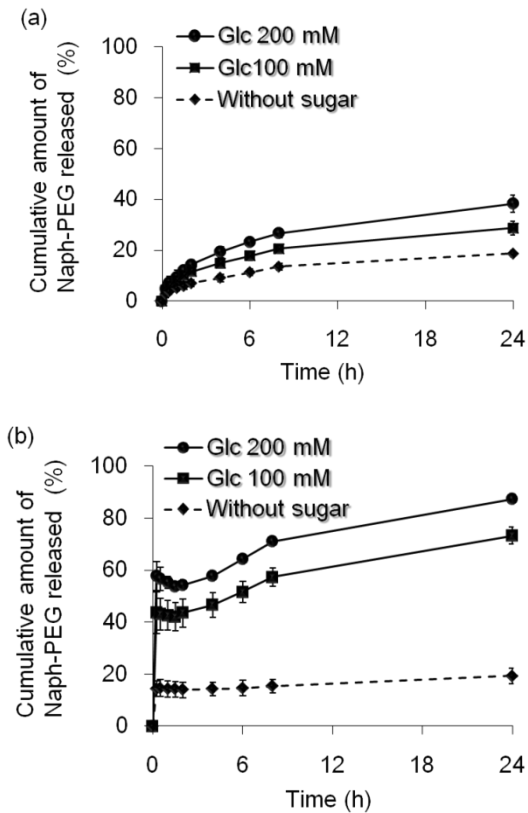


図 5. 分子ネックレスからの Naph-PEG 放出  
(a) Naph-PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD,  
(b) Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD

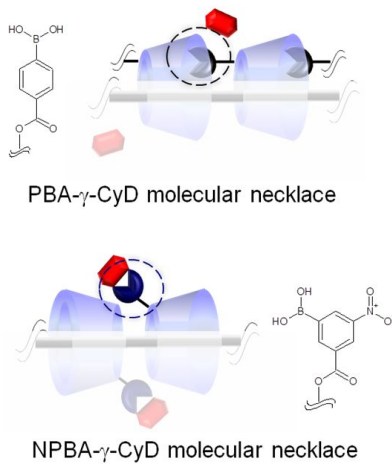


図 6. 修飾基の空間的配置と Glc との結合性

放出メカニズムの違いを示す理由として，PBA 誘導体修飾基の包接状態や，分子ネックレス構造の違いが考えられる（図 6）。Naph-PEG/PBA- $\gamma$ -CyD では PBA 修飾基が CyD 空孔に包接されて存在することを示唆する構造解析結果が得られている。これを考慮すると包接された分子ネックレス中の PBA 残基と Glc との直接結合できず，Glc と結合するのは，分子ネックレスから外れた遊

離の PBA- $\gamma$ -CyD と考えられる。そのため，分子ネックレスの崩壊は，比較的遅い放出パターンが得られたものと推測される。一方，Naph-PEG/NPBA- $\gamma$ -CyD は，分子ネックレス中で NPBA 修飾基が CyD 空孔に包接されずに存在し，Glc へ直接結合できるため，鋭い Glc 応答を示したものと考えられる。

#### (4) Naph-PEG-Ins を用いた分子ネックレス

Naph-PEG-Ins を合成し，<sup>1</sup>H NMR で評価したところ，平均 2.2 本の PEG 鎖が修飾されていた。得られた Naph-PEG-Ins の血糖降下作用を糖尿病モデルラットへの投与により調査すると，非修飾の Ins に対して約 70%の活性が保持されていた。

この Naph-PEG-Ins と修飾 CyD を用いて分子ネックレスを調製し，粉末 X 線構造解析を行ったところ，Naph-PEG を用いた場合と同様のパターンを示した。このことから PEG 鎖末端の Ins があっても，同様の分子ネックレスが得られることが確認された。

Naph-PEG-Ins を用いた分子ネックレスの糖応答性を Naph-PEG-Ins の放出実験により調査した。

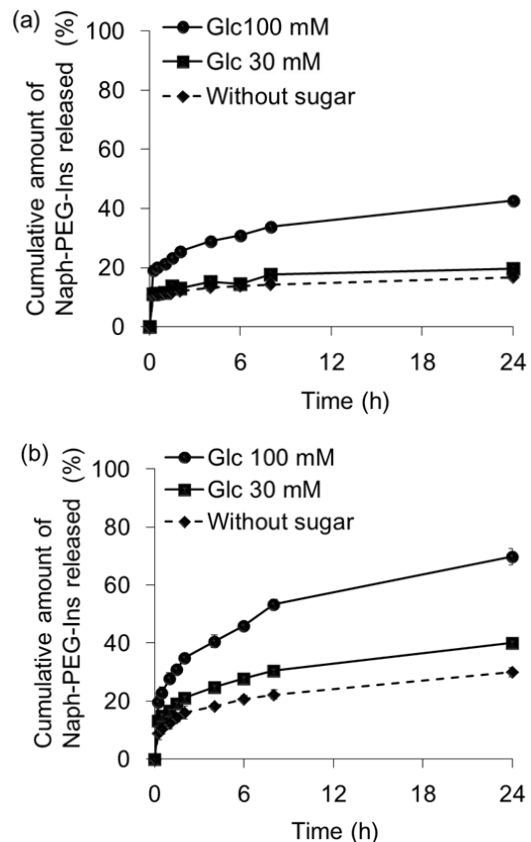


図 7 分子ネックレスからの Naph-PEG-Ins 放出 (a) Naph-PEG-Ins/PBA- $\gamma$ -CyD,  
(b) Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD

どちらの分子ネックレスも Glc を含まない緩衝液中に比べ，Glc 100 mM 溶液中で高い Naph-PEG-Ins 放出を示した（図 7）。臨床応用

の観点から行った Glc 30 mM でも糖非存在下に比べ有意に高い放出を示した。

以上の結果は Glc 30 mM 程の高い食後血糖値を示す患者に対しては Naph-PEG-Ins/NPBA- $\gamma$ -CyD 分子ネックレスの応答が得られる可能性を示すものである。Glc 非共存下の緩衝液中においても Naph-PEG-Ins が徐々に放出される。これは基礎分泌を補う持続放出型の製剤と同様の働きとして利用価値があるものと考えている。

#### (5) 結論

本研究課題では、分子ネックレスに導入する PBA 誘導体を NPBA にすることにより、より優れた Glc 応答性を持つ人工膵臓分子マシンの構築に成功した。PBA 誘導体の微細な違いが、分子ネックレスの形成過程、分子ネックレスの結晶構造、また人工膵臓で重要となる放出パターンにも大きく影響することが明らかとなった。

これらの知見は、製剤学、DDS の分野のみならず、分子マシンの発展に寄与する超分子化学的にも有用な情報になると考えられる。

#### 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 5 件)

江川 祐哉, 関 俊暢, “糖応答性インスリンリリースシステムを指向した超分子ナノマシン” **薬学雑誌**, 133: 1287-1295 (2013), 総説, 査読有.

<http://doi.org/10.1248/yakushi.13-00222-4>

Kiminobu Nakamura, Tomohiro Seki, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Yoshiki Oda, Takashi Yamanoi, Toshinobu Seki, “Sugar-sensitive supramolecular structures based on phenylboronic acid-modified cyclodextrins” **Chem. Pharm. Bull.**, 61: 1188-1191 (2013), 原著論文, 査読有.

<http://doi.org/10.1248/cpb.c13-00542>

Katsunori Shinohara, Miki Yamashita, Wataru Uchida, Chie Okabe, Shinji Oshima, Masahiro Sugino, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Osamu Hosoya, Takashi Fujihara Yoshihiro Ishimaru, Tohru Kishino, Toshinobu Seki, Kazuhiko Juni, “Preparation of polypseudorotaxanes composed of cyclodextrin and polymers in microspheres” **Chem. Pharm. Bull.**, 62: 962-966 (2014), 原著論文, 査読有.

<http://doi.org/10.1248/cpb.c14-00313>

Tomohiro Seki, Keigo Abe, Kiminobu Nakamura, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Kazuhiko Juni, Toshinobu Seki, “Sugar-responsive pseudopolyrotaxanes and

their application in sugar-induced release of PEGylated insulin” **J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.**, 82: 417-424 (2015), 原著論文, 査読有.

<http://doi.org/10.1007/s10847-015-0504-0>

Tomohiro Seki, Misato Namiki, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Kazuhiko Juni, Toshinobu Seki, “Pseudopolyrotaxane composed of phenylboronic acid-modified polyethylene glycol and  $\gamma$ -cyclodextrin” **Materials**, 8: 1341-1349 (2015), 原著論文, 査読有.

<http://doi.org/10.3390/ma8031341>

[学会発表](計 15 件)

関 智宏 江川 祐哉 三木 涼太郎, 関 俊暢, フェニルボロン酸修飾  $\gamma$ -シクロデキストリンを用いた一本鎖ポリシュードロタキサン調製の糖濃度に応じた PEG 鎖リリース挙動, 2013 年 9 月 12~13 日, 第 30 回シクロデキストリンシンポジウム, くまもと県民交流館パレア

阿部 圭吾, 関 智宏, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 修飾シクロデキストリンを用いた糖応答性超分子複合体の調製とインスリン放出制御への応用, 2013 年 10 月 26 日, 日本薬学会関東支部大会, 帝京大学板橋キャンパス

阿部 圭吾, 関 智宏, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, フェニルボロン酸修飾シクロデキストリンと末端修飾ポリエチレングリコールによるポリシュードロタキサンの形成過程の調査, 2014 年 3 月 27 日~30 日, 日本薬学会第 134 年会, 熊本大学他

阿部 圭吾, 関 智宏, 小林 由希, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖応答性ポリシュードロタキサンの崩壊特性への鎖長の影響, 2014 年 5 月 20 日~22 日, 日本薬剤学会第 29 年会, 大宮ソニックシティー

関 智宏 江川 祐哉 三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖センサー化学修飾分子ネックレスからの PEG 鎖放出の糖応答性改善の試み, 2014 年 5 月 20 日~22 日, 日本薬剤学会第 29 年会, 大宮ソニックシティー

江川 祐哉, 関 智宏, 阿部 圭吾, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖化学センサー修飾ポリシュードロタキサンのインスリンデリバリーへの応用, 2014 年 9 月 11~12 日, 第 31 回シクロデキストリンシンポジウム, 島根県民会館

関 智宏, 阿部 圭吾, 江川 祐哉,

三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖と直接結合可能なセンサー修飾基を有する糖応答 PEG鎖放出ポリシュードロタキサン, 2014年9月11~12日, 第31回会シクロデキストリンシンポジウム, 島根県民会館

並木 美仁, 関 智宏, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖センサー修飾ポリエチレングリコール鎖を軸成分に用いたシクロデキストリン分子ネックレスの調製, 2014年10月4日, 第58回日本薬学会関東支部大会, 昭和薬科大学

関 智宏, 鈴木 健太, 井上 知子, 並木 美仁, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖センサー分子修飾によるインスリンの糖応答性血中移行制御の試み, 2014年11月29日, 第20回創剤フォーラム若手研究会, 東京薬科大学

並木 美仁, 関 智宏, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 糖センサー修飾ポリエチレングリコールを用いて調製した分子ネックレスの糖応答性のメカニズムの調査, 2015年3月26~28日, 日本薬学会第135年会, 神戸学院大学, 兵庫医療大学

関 智宏, 並木 美仁, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, シクロデキストリンおよび高分子鎖への糖センサー二重修飾分子ネックレスの調製とその糖応答性, 2015年3月26~28日, 日本薬学会第135年会, 神戸学院大学, 兵庫医療大学

Tomohiro Seki, Misato Namiki, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Kazuhiko Juni, Toshinobu Seki, Complexation of phenylboronic acid-modified polyethylene glycol with native  $\gamma$ -cyclodextrin for sugar-responsive molecular necklace, 2015年5月14~16日, Joint Conference of the 8th Asian Cyclodextrin Conference and the 32nd Cyclodextrin Symposium, くまもと県民交流館パレア

Tomohiro Seki, Keigo Abe, Yuya Egawa, Ryotaro Miki, Kazuhiko Juni, and Toshinobu Seki, Preparation of a sugar-responsive polypseudorotaxane having a directly sugar-binding sensor, 2015年5月14~16日, Joint Conference of the 8th Asian Cyclodextrin Conference and the 32nd Cyclodextrin Symposium, くまもと県民交流館パレア

Yu Kojima, Yuya Egawa, Ryotaro Miki and Toshinobu Seki, Preparation of a sugar-responsive gel using rotaxane structures as cross-linkers, 2015年5月14~16日, Joint Conference of the 8th Asian Cyclodextrin Conference and the 32nd Cyclodextrin

Symposium, くまもと県民交流館パレア

小島 裕, 武井 千弥, 関 智宏, 江川 祐哉, 三木 涼太郎, 関 俊暢, 架橋点にロタキサン構造を持ち糖に繰り返し応答するゲルの調製, 2016年3月27~29日, 日本薬学会第136年会, パシフィコ横浜  
〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
○出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.josai.ac.jp/~butuyaku/achievement.html>

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
江川 祐哉(EGAWA Yuya)  
城西大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 90400267

(2)研究分担者 ( )  
研究者番号:

(3)連携研究者 ( )  
研究者番号: