

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820361

研究課題名(和文) ボトムアップ型プロセスによるナノゲル架橋マイクロスフェアの開発とDDS応用

研究課題名(英文) Developmet of nanogel-cross-linked microspheres by bottom-up aproach and application for drug delivery system

研究代表者

田原 義朗 (Tahara, Yoshiro)

京都大学・工学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30638383

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)：本研究の目的は、ナノメートルサイズのバイオマテリアルとして多くの成果を上げてきた疎水化多糖ナノゲルの機能を、ボトムアップ型プロセスによってマイクロメートル以上のサイズを必要とする研究分野へ発展させることである。本研究では分解性架橋剤を用いることで、生分解性の高いナノゲル架橋マイクロスフェアの調製に成功した。さらに薬物封入ナノゲル架橋マイクロスフェアは、薬物単独ではなく、薬物封入ナノゲルを放出することが確認された。これは従来の高分子架橋マイクロスフェアでは見られない現象であり、新しい徐放デリバリーシステムを生み出す可能性のある薬物キャリアであることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Bottom-up approach expanding attractive characters of nanometer-sized drug carriers into multifunctional drug delivery system is important for the next generation of biomaterials. Self-assembled nanogels have been known as one of the most beneficial nanometer-sized drug carriers. In this study, nanogel-cross-linked (NanoClik) microsphere was prepared through cross-linking of nanogels and demonstrated the application for drug delivery systems, in which micrometer-sized materials are needed. The most interesting characters of the NanoClik microspheres is that "drug-loaded nanogels" were released from the NanoClik microspheres following the hydrolysis of their cross-linker moieties. These system could be used to achieve the sustained delivery of drugs through the effective association of nanogels. These findings therefore suggest that NanoClik microspheres have high potential in terms of their application to the field of the nanocarrier-based material science.

研究分野：ドラッグデリバリーシステム

キーワード：ナノゲル マイクロスフェア DDS エマルション

1. 研究開始当初の背景

近年のナノテクノロジーの発展は目覚ましく、リポソームや高分子ミセルのようなナノサイズの材料はドラッグデリバリーシステム (DDS) における中心的なキャリアとして研究されてきた。現在ではこれらのナノテクノロジーを基盤として確立されてきた DDS キャリアを構成単位として、そのナノメートルサイズのキャリアの特性を生かしながら、より幅広いサイズ領域をカバーできるバイオマテリアルの創出が期待されている。

2. 研究の目的

本研究では、親水性多糖に疎水基を部分的に修飾した疎水化多糖をナノメートルサイズの材料として扱った。疎水化多糖は水中で疎水性相互作用によって、自発的に数分子が集合し、ナノサイズのゲル(ナノゲル)を形成する。この疎水化多糖ナノゲルは、タンパク質と容易に複合化し、ナノメートルサイズのバイオマテリアルとして、癌免疫療法など多くの成果を上げてきた。現在では、この性質をマイクロメートル以上のサイズを必要とする研究分野へ展開することが期待されている。そのため過去に疎水化多糖ナノゲル同士を架橋する試みがなされ、調製時の量論比を変化させる検討が行なわれていた [Colloid Surf. B-Biointerfaces 99(2012)38] しかしながら、この方法で形成・制御できるナノゲル架橋材料は、数 mm 以上のマクロなゲルであり、サブミクロンからマイクロメートル以上のサイズのナノゲル架橋材料の調製や、それらのサイズ制御には成功していなかった。

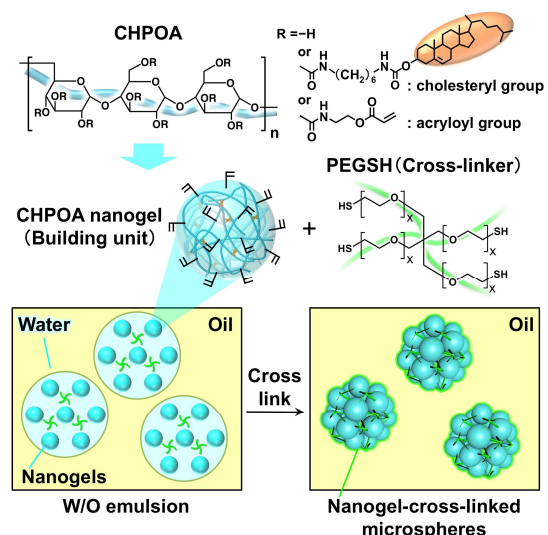
本研究では、疎水化多糖ナノゲルをエマルション中で架橋するというボトムアップ型プロセスによって、ナノゲル架橋マイクロスフェアを開発し、マイクロメートル以上のサイズを必要とする DDS へ発展させる検討を行った。ここで他の研究者らによってポリ乳酸-グリコール酸共重合体 (PLGA) マイクロスフェア等の研究によって、免疫療法では抗原単独よりもマイクロメートルサイズの粒子に封入・徐放したほうが、強い免疫が誘導されることが実証されている [Adv. Drug Deliv. Rev. 61 (2009) 205] これは抗原単独では直ちに消失するリンパ節への供給を、キャリアを使って連続的に行い効果を上げる“徐放”という典型的な DDS の概念によるものである。本研究では、それ単独でも免疫 DDS キャリアとして有効なナノゲルの特性を、マイクロメートルサイズのキャリアでも発揮させることによって、長期徐放性を与えることが主な目的である。

これまでの研究によってナノゲル架橋マイクロスフェアの調製方法については概ね確立していたが、その分解性が低く、DDS キ

ャリアとしての特性を評価することが難しかった。そこで本研究では最初に分解性架橋剤の検討を行い、免疫 DDS キャリアとしての特性について評価した。

3. 研究の方法

ナノメートルサイズのバイオマテリアルとして、アクリロイル基(OA)とコレステロール基(CH)とローダミンを修飾したプルラン(P)からなる疎水化多糖ナノゲル(CHPOA ナノゲル)を用いた。分解性架橋剤として、チオール基(SH)を含むペプチドや核酸を修飾したポリエステルグリコールを調製し、用いた。また従来より使用している末端がチオール化されたポリエステルグリコール(PEGSH)も比較のために用いた。ナノゲル架橋マイクロスフェアは、CHPOA ナノゲルと架橋剤を water-in-oil (W/O) エマルション中の水相で混合・架橋し、油相と界面活性剤を適切な方法で除去することによって調製した。分解性の確認はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)とマウス血清、マウス細胞とそれぞれ混合し、共焦点顕微鏡によって評価した。またマウス皮下での分解性も同様に評価した。DDS への応用では、モデル抗原タンパク質である ovalbumin (OVA) を封入したナノゲル架橋マイクロスフェアを調製し、マウスへの皮下投与後のリンパ節へのデリバリーを共焦点顕微鏡によって評価した。さらに OVA 封入ナノゲル架橋マイクロスフェアを皮下投与することによる血清中の抗体産生も評価した。最後に学術的に重要なナノゲル架橋マイクロスフェアの詳細な構造や特性について Stimulated emission depletion (STED) 顕微鏡と加水分解実験によって確認した。ここでナノゲルへの OVA の封入はサイズ排除クロマトグラフィーによって確認を行った。

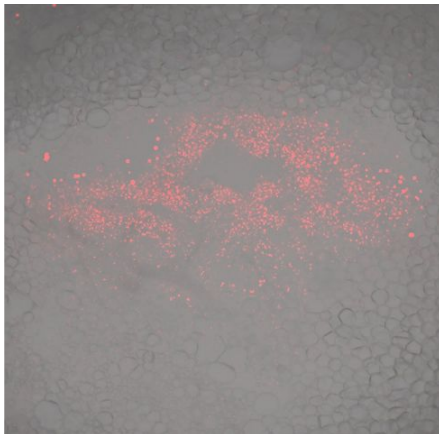


4. 研究成果

(1) 分解性架橋剤の検討

研究開始当初は核酸やペプチドを用いた分解性架橋剤を調製することを試みたが、これらの分解性架橋剤を用いた場合、ナノゲル架橋マイクロスフェアを調製することは困難であった。しかしながらこの過程で、ポリエステルグリコールの末端にシステインを導入した PEG-Cys を調製し、この PEG-Cys を用いると再現性よくナノゲル架橋マイクロスフェアを調製できることを見いだした。この PEG-Cys を用いて調製したナノゲル架橋マイクロスフェアは、従来の PEGSH を用いたナノゲル架橋マイクロスフェアと比べて、PBS 中での分解性は変化しないが、マウス血清と攪拌した場合、マイクロスフェアが容易に破壊されることが明らかとなった。さらマウス細胞（マウス由来マクロファージ）と共存させて培養した場合、細胞質中のナノゲル由来の蛍光が有意に上昇したことから、PEG-Cys を用いて調製したナノゲル架橋マイクロスフェアは、細胞によって分解可能であることが分かった。またこれらの現象はマウスの皮下でも同様に確認され、PEG-Cys を用いて調製したナノゲル架橋マイクロスフェアは、マクロファージをはじめとする細胞に分解され取り込まれている様子が確認された。

(2) DDS への応用



PEG-Cys を用いて調製したナノゲル架橋マイクロスフェアによるリンパ節への OVA のデリバリー

コレステロール修飾プルラン（CHP）は免疫 DDS キャリアとして有効であることは従来の研究より明らかとなっている。今回は OVA を封入した CHP ナノゲルとナノゲル架橋マイクロスフェアについて皮下投与後のリンパ節への OVA のデリバリーを評価した。結果より 1 日後では、従来の研究通り CHP ナノゲルにおいて最も高いリンパ節への送

達を確認された。一方で 2 週間後では、PEG-Cys を用いて調製したナノゲル架橋マイクロスフェアが最も高かった。以上の結果からナノゲル架橋マイクロスフェアは、ナノメートルサイズのナノゲルでは不可能であった、数週間以上の徐放デリバリーが可能であることが明らかとなった。また抗原封入ナノゲル架橋マイクロスフェアの免疫反応については、分解性の低い PEGSH よりも、PEG-Cys を用いた方が、より高い抗体産生が得られるということが明らかとなった。

(3) 詳細な構造

最後に本研究の成果を総括し、学術論文として発表するために、ナノゲル架橋マイクロスフェアの構造について詳細に検討を行った。このときナノゲル構造を持たないプルラン架橋マイクロスフェアを同時に調製し、比較を行った。STED 顕微鏡とは最大で 50 nm の解像度をもつ蛍光顕微鏡であり、従来の共焦点顕微鏡よりも高い分解能によって観察できる。本系では常温常圧の水中において、プルラン架橋マイクロスフェアでは見られなかったナノゲル架橋マイクロスフェア中のナノゲル構造の観察に成功した。さらに OVA 封入ナノゲル架橋マイクロスフェアについて加水分解実験を行い、その分解物について詳細に検討したところ、プルラン架橋マイクロスフェアでは、OVA が単独でリリースされるのに対し、ナノゲル架橋マイクロスフェアでは、OVA 封入ナノゲルがリリースされることが分かった。この特長によってマイクロスフェアからリリース後もナノゲルの免疫 DDS キャリアとしての特性が反映されることが考えられる。現在までに研究されてきた他のマイクロスフェアと比較しても、免疫 DDS キャリアとして有効であることが知られているナノメートルサイズの“DDS キャリアをリリース”しているという点で大変ユニークな材料であると考えられる。

(4) 結論

本研究によって分解性架橋剤を使用することによって、従来から調製されてきたものよりも分解性の高いナノゲル架橋マイクロスフェアを開発することに成功した。またナノゲル架橋マイクロスフェアは DDS キャリアを徐放できる点において今迄に無い材料であることが明らかとなった。本研究を基礎とした今後の発展によって、ナノゲル架橋マイクロスフェアは、インジェクタブルな薬物の長期徐放や、徐放速度の制御、多段階の徐放、ナノゲルの特性による体内分布の制御などの実現が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yoshiro Tahara, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Nanocarrier-integrated microspheres: Nanogel tectonic engineering for advanced drug delivery systems, *Advanced Materials*, 27(34) (2015) 5080–5088.

田原義朗, 秋吉一成, 物理架橋ナノゲルの調製とDDS応用, DDSキャリア作製プロトコル集, 第5章-2 (2015) 124-130.

〔学会発表〕(計10件)

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 秋吉一成, ナノゲル架橋マイクロスフェアの開発と応用, 第63回高分子学会年次大会, 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市), 平成26年5月28-30日(ポスター発表).

Yoshiro Tahara, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Preparation and characteristic of nanogel-cross-linked microsphere, The 41st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Chicago (Illinois, USA), July 13th-16th, 2014, poster presentation.

田原義朗, 犬塚佑希浩, 向井貞篤, 澤田晋一, 秋吉一成, ナノゲル架橋マイクロスフェアと多糖ナノゲルによるDDS, 第63回高分子討論会, 長崎大学(長崎県・長崎市), 平成26年9月24-26日(口頭発表).

Yoshiro Tahara, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, Bottom-up Approach for Micro-scale Drug Delivery Using Nanogel-cross-linked Microsphere, Polymer Networks Group Meeting & Gel Symposium 2014, Tokyo (Japan), November 10th-14th, 2014, poster presentation.

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, NanoClik microsphere のナノゲル構造の解明, 第64回高分子学会年次大会, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市), 平成27年5月27-29日(ポスター発表).

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, NanoClik microsphere の構造と徐放DDSへの応用, 第31回日本DDS学会, 京王プラザホテル(東京都・新宿区), 平成27年7月2-3日(ポスター発表).

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, NanoClik tectonic microsphere の開

発と次世代型 DDS キャリアとしての応用, 第9回バイオ関連化学シンポジウム2015, 熊本大学(熊本県・熊本市), 平成27年9月10-12日(口頭発表).

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, NanoClik microsphere の開発とバイオマテリアル応用, 第37回日本バイオマテリアル学会, 京都テルサ(京都府・京都市), 平成27年11月9-10日(ポスター発表).

Yoshiro Tahara, Sada-atsu Mukai, Shin-ichi Sawada, Yoshihiro Sasaki, Kazunari Akiyoshi, NanoClik microsphere and drug delivery system, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu (Hawaii, USA), December 15th-20th, 2015, poster presentation.

田原義朗, 向井貞篤, 澤田晋一, 佐々木善浩, 秋吉一成, ナノキャリアを構成単位とする新規マイクロスフェアの開発とDDS応用, 化学工学会第45回秋季大会, 関西大学(大阪府・吹田市), 平成28年3月13-15日(口頭発表).

〔その他〕

<http://www.jst.go.jp/erato/akiyoshi/index.html>

6. 研究組織

田原 義朗 (TAHARA, Yoshiro)
京都大学・大学院工学研究科・特定研究員
研究者番号: 30638383