

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21750166
 研究課題名（和文） 自律会合型中空粒子 Nano-PICsome の粒径制御とタンパク質
 キャリアへの応用
 研究課題名（英文） Size-tuning of self-assembled hollow particles Nano-PICsomes and
 application to protein delivery system
 研究代表者
 岸村 顕広 (KISHIMURA AKIHIRO)
 東京大学・大学院工学系研究科・助教
 研究者番号：70422326

研究成果の概要（和文）：

本研究では、水中で2液を混合する、という単純な手法で、100-400 nm で好みのサイズのナノカプセル Nano-PICsome を得る手法を開発した。また、得られたカプセルを生体内で用いるのに十分な安定性を付与することに成功した。Nano-PICsome には、タンパク質などをその生理活性を保ったまま封入することができた。また、十分に安定化処理した Nano-PICsome は、非常に優れた血中滞留性を示し、薬剤送達カプセルとしての応用が可能であることがわかった。今後のさらなる機能開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：

We have developed novel polyion complex (PIC) nano-architectures prepared by the simple mixing of a set of oppositely charged water-soluble polymers, mainly, block copolymers consisting of biocompatible poly(ethylene glycol) (PEG) and poly(amino acid)s in an aqueous medium. As a result, we established the preparation method of monodispersed hollow particles, Nano-PICsomes, which are characterized by facile tuning of vesicle size over 100-400 nm in diameter. Detailed biodistribution of the various sizes of Nano-PICsomes was examined in tumor-bearing mice. From pharmacokinetic analyses, PICsomes with the diameter of 150-200 nm showed much prolonged blood circulation. Critical size of nanocarriers (~150 nm) discriminating the permeability into normal and tumor tissues was determined by the use of long-circulating Nano-PICsome as a ruler.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：ベシクル、生体材料、ブロック共重合体、自己組織化、ナノバイオ、ポリイオンコンプレックス、ナノ構造体、ドラッグデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

近年、主に生体内での利用、特にドラッグデリバリー・遺伝子デリバリーキャリア、あるいはバイオイメージングを目的として高機能化ナノ粒子の開発が進んできた。これまで種々のナノ構造体が検討されてきたが、キャリア自身の材料設計において基礎科学的な視点・包括的な視点が不足しており、十分な知見の集積がなされているとは言い難い。バイオ系での応用や生体への負荷の低減を考えた場合、上記目的に使用されるナノ構造体は全く有機溶媒を含まない水系で調製されることが理想的と言える。そこで、申請者が最近世界に先駆けて開発したものが、生体適合性に優れたポリエチレングリコール (PEG) とポリアミノ酸由来のポリカチオン、あるいはポリアニオンブロックを有するブロックコポリマーの水中における静電相互作用による自己組織化、即ち、ポリイオンコンプレックス (PIC) 形成を利用したナノ/マイクロ中空微粒子 PICsome である。既に先行研究 (平成 18-19 年: 若手研究スタートアップ; 総額 280 万円) において、有機分子の自己組織化を、有機溶媒の助けを全く借りず純粋な水系で引き起こすことでこの PICsome の創製に成功しており、合わせて半透過性などの特徴的な物性を見出している (A. Kishimura, et al. J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, 5988-5989.; 特願 2005-134350)。また、発展的研究として、水中において水溶性タンパク質の直接的内包が可能であること、及び、PIC由来の半透過性に基づく水溶性物質透過を活かしたリアクターとしての機能を有する一方で、外部の消化酵素から内部のタンパク質を保護する機能を有することを世界で初めて見出している (A. Kishimura, et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2007, 46, 6085-6088; Fig. 1.)。そこで本研究では、ボトムアップ的アプローチにより、生体適合性を期待できるブロック共重合体の水中における自己組織化を基幹技術として、簡便にサイズ制御可能な中空微粒子 Nano-PICsome の開発を行った。また、得られた Nano-PICsome を用いて、汎用性の高いタンパク質デリバリーシステムを確立することを目的とした。最終的に、サイズ制御可能な粒子にタンパク質を搭載することで、サイズ自体を機能として活かす材料としての評価を行った。

2. 研究の目的

本研究では、水中での自律会合に基づく高分子集合体の構造の精密制御、特に 100 nm~サブミクロン程度の領域でのサイズの制御を行うことで、生体内での材料応用を目指す。特に、中空ナノカプセルに注目し、内部に機能性タンパク質をパッケージする箱として利用すると同時に、サイズ自体を機能として

活用できる材料としての機能評価を行うことを目的とした。最終的には、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の中であって、さらなる進展が期待されているタンパク質デリバリーシステムに新しい方法論を持ち込むことを目的とした。特に、最近申請者が開発したポリイオンコンプレックス型ベシクル PICsome (高分子電解質部位と生体適合性部位からなるブロック共重合体の自己組織化中空粒子) はタンパク質キャリアとして有利なポテンシャルを複数有しているため、この構造・物性を分子設計などの面から洗練させることで、ナノサイズ領域で高度にサイズが制御された Nano-PICsome のシステムを確立し、タンパク質封入用カプセルとしての汎用性・有用性について詳細に検討を計画した。

3. 研究の方法

本研究では、先行研究 (平成 18-19 年; 若手研究スタートアップ) で有用性が明らかになった PICsome を実用化にむけてさらに洗練させるべく、Nano-PICsome の開発とその機能評価を行った。実際には、生体内で機能を発揮する上で重要となるサイズ領域 (50-300 nm) を中心に、サブミクロン領域での精密制御を分子設計・調製条件の最適化を通じて行った。サイズ、構造の評価を、動的分散計、透過型電子顕微鏡を用いて行った。得られた Nano-PICsome の塩存在下での安定性評価を通じ、実用に耐えうる安定性獲得のための最適化を行った。続いて、Nano-PICsome へのタンパク質封入法と精製法を確立し、生物評価を行うことで、その有効性の評価を行った。

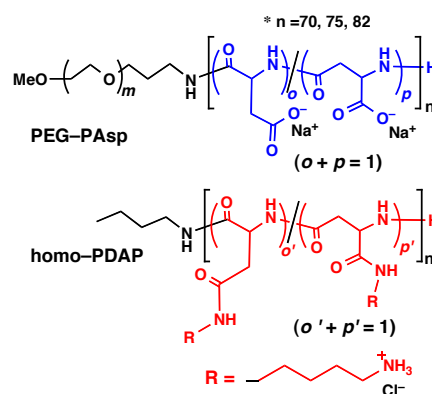


図 1. Nano-PICsome 用ポリマーの化学構造

4. 研究成果

これまでの PICsome の弱点を解決する以下の成果を上げた。

(1) サイズを制御するファクターを整理し、構造の最適化を行った (図 1)。この結果、

物理的パラメタ、特にポリマー濃度、温度、添加塩濃度がサイズと構造を制御するキーパラメタであることを見出し、ユニラメラベシクルとしての Nano-PICsome の粒径制御を 100–400 nm において実現した。この成果を記した論文は、化学領域で最も権威のある学術誌・アメリカ化学会誌に掲載された [J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 1631-1636.]。

(2) (1)の結果をふまえて、生理条件下での安定性を賦与する手法を開発した。具体的には、Nano-PICsome に EDC により架橋をかけることにより、濃縮や凍結乾燥に対する耐性や血液中での安定性を賦与することに成功した (図 2)。これらの成果を基に、ドラッグデリバリーの分野で権威あるシンポジウム NanoDDS に若手招待講演者として選ばれた (2010 年 10 月 5 日、米国・オマハ)。

サイズ可変ポリイオンコンプレックス型 ユニラメラベシクル

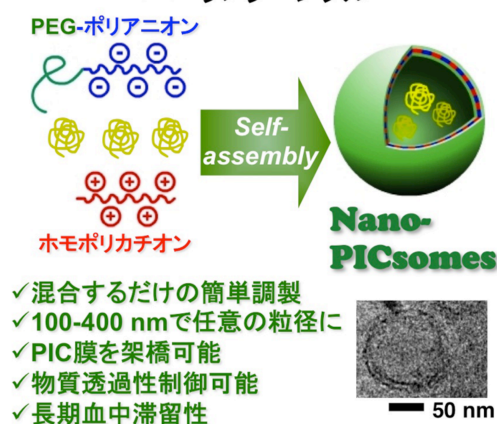


図 2. PICsome の形成概念図とその特徴。
右下: 代表的なクライオ位相差透過型電子顕微鏡像。

(3) モデル化合物としてデキストランなどの高分子物質を簡便に封入することも確認した。一方、Nano-PICsome に荷電密度の高い物質を封入することは初期に見出した手法では困難であったが、それを解決する手法として、先に空の Nano-PICsome を作製した後に、内部に物質を封入する『後入れ法』を開発した (特願 2010-117821)。特に、物質変換能を有する酵素を封入し、PICsome の安定化処理の後であっても酵素活性が維持されることを見出した。

(4) Nano-PICsome の鋭いサイズ制御と長期血中循環能を活かして、マウスにおける体内動態のサイズ依存性を明らかとした。その結果、EPR 効果による腫瘍集積だけでな

く、脾臓などに集積する閾値も明らかとし、ほとんど非特異的な集積を示さないサイズが存在することも示した。これらは、生体内で用いるナノ材料について、精緻な設計が重要であることを改めて認識させる結果と言える。この成果は、化学界のトップジャーナルである英国王立化学会誌に速報として掲載された (図 3; Chem. Commun.,

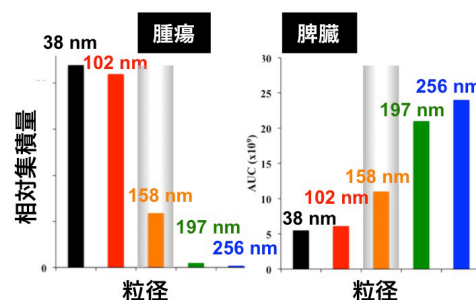


図 3. PICsome の体内動態のサイズ依存性。直径 150 nm が重要な閾値であることが示唆された。

2011, 47, 6054-6056.)。

(5) Nano-PICsome の知見を基に、その生理活性で次世代医薬として有望視される siRNA を構成成分とする PICsome も開発し、その有効性を細胞実験により実証した (特願 2010-117823)。これは、医薬品としてだけでなく、内部中空スペースにタンパク質をはじめとする機能性物質を封入することで、新しい細胞機能の制御技術としても期待できる。

(6) ポリマーに環境応答性を導入し、還元環境で崩壊する PICsome を開発した (特願 2010-168880)。これらの成果は、PICsome の細胞内導入が可能なこと、また、将来的に PICsome 体内から除去できると同時に内容物を放出できることを明瞭に示す結果であった。

以上より、タンパク質封入 PICsome を作成し、PICsome を生体内ナノリアクターや、人工オルガネラとして活用する準備は十分に整えられ、研究目的は首尾よく達成された。

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. Yasutaka Anraku, *Akihiro Kishimura, Atsushi Kobayashi, Makoto Oba, and *Kazunori Kataoka, Size-controlled long-circulating PICsome as ruler to measure critical cut-off disposition size into normal and tumor tissues.

Chem. Commun., **2011**, 47, 6054–6056.

2. Yasutaka Anraku, *Akihiro Kishimura, Makoto Oba, Yuichi Yamasaki, and *Kazunori Kataoka, Spontaneous Formation of Nanosized Unilamellar Polyion Complex Vesicles with Tunable Size and Properties.

J. Am. Chem. Soc., **2010**, 132, 1631-1636.

〔学会発表〕(計 48 件)

以下、依頼・招待講演のみ記載。

1. Akihiro Kishimura, PICsome Technology: Development of Novel Polymeric Nano-/Micro-capsules toward Biomedical Applications. 吉林大学名家講座 09024, Key Laboratory on Integrated Optoelectronics, College of Electronic Science and Engineering, Jilin University, Changchun, China, April 11th, 2009.

2. 岸村 顕広、水系における荷電性ポリアミノ酸の集合挙動の動的制御とその生体材料への応用、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム若手フォーラム、九州大学医学部百年講堂、福岡、2009 年 9 月 16 日。

3. 岸村 顕広、水中におけるポリマーの自己組織化を用いたソフトマター創製：基礎科学から医療応用まで、第 59 回錯体化学討論会・シンポジウム「ソフトマターとしての金属錯体」、長崎大学文教キャンパス、長崎、2009 年 9 月 25 日。

4. 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスの精緻な構造・物性制御とその動的挙動の解明、日本化学会第 90 春季年会 第 24 回若い世代の特別講演会、近畿大学本部キャンパス、東大阪、2010 年 3 月 26 日。

5. 岸村 顕広、生体材料を指向したポリイオンコンプレックス中空ナノカプセルの作製と機能、統合バイオナノシステム研究がもたらすイノベーション基盤の新展開、独立行政法人理化学研究所 大河内記念ホール(埼玉県和光市)、2010 年 8 月 6 日。

6. 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスを用いた分子集合体の構造・物性制御、錯体化学若手の会夏の学校 2010、国民宿舎 関ロジ、2010 年 8 月 10 日。

7. 岸村 顕広、ポリイオンコンプレックスを用いた水中におけるナノ空間の生成とその応用、日本化学会 第 4 回関東支部大会 シンポジウム S12「ナノ空間材料の科学」、筑波大学、2010 年 8 月 31 日。

8. Akihiro Kishimura, Novel polymeric hollow capsules “PICsomes”: Development of polyion complex vesicles possessing PEG palisade toward therapeutic/diagnostic nanodevices. NanoDDS'10, Omaha, Nebraska, USA, October 5th, 2010.

9. Akihiro Kishimura, Development of

Polymeric Nanomaterials toward Biomedical Applications. IBI Cross-Disciplinary Sandwich Seminar, EPFL, Lausanne, CH, October 25th, 2010.

10. 岸村 顕広、ソフト界面制御によるポリイオンコンプレックスナノ・マイクロ粒子の構造制御とその機能、日本化学会第 91 春季年会 特別企画・ソフト界面による材料化学の新潮流、神奈川大学、横浜、2011 年 3 月 26 日。

〔図書〕(計 2 件)

1. 岸村 顕広、小穴 英廣、分子コンポーネントの集合挙動制御に基づく巨視的ベシクル形成法の開発。

東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点・編、*医薬理工の異分野融合研究から見たナノバイオの未来*、株式会社エクスタレッジ(東京)、**2010**, 82-83.

2. 岸村 顕広、片岡 一則、超機能化高分子ナノ構造体の設計と医療応用 国武豊喜・監修、有賀克彦、秋吉一成、坂本一民、清水敏美、鍋島達弥・編、*超分子サイエンス&テクノロジー—基礎からイノベーションまで—*、エヌ・ティー・エス：東京、**2009**, 1168-1179.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 4 件)

1. 名称：泡状ポリマー中空微粒子及びその製造方法

発明者：片岡一則、岸村顕広、松田裕之

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2010-055021

出願年月日：2010.03.11

国内外の別：国内

2. 名称：核酸を膜内に含有するベシクル

発明者：片岡一則、岸村顕広、宮田完二郎、

大庭 誠、安楽泰孝、須磨知也、Sayan Chuanoi

権利者：東京大学

種類：特許

番号：特願 2010-117823

出願年月日：2010.05.21

国内外の別：国内

3. 名称：物質内包ベシクル及びその製造方法
発明者：片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝、宮田完二郎

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：特願 2010-117821

出願年月日：2010.05.21

国内外の別：国内

4. 名称：静電結合型ベシクル

発明者：片岡一則、岸村顕広、安楽泰孝、ステファニーリー、小出彩、酒井満
権利者：東京大学、帝人株式会社
種類：特許
番号：特願 2010-168880
出願年月日：2010.07.28
国内外の別：国内

[その他]
ホームページ等
<http://www.bmw.t.u-tokyo.ac.jp/member/kishimura.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸村 顕広 (KISHIMURA AKIHIRO)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：70422326

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし