

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790052

研究課題名(和文)インジェクタブル薬物送達システムのための新規プラットフォームの開発

研究課題名(英文)Development of novel platform for injectable in vivo drug delivery system

研究代表者

浅井 大輔(Asai, Daisuke)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10423485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者が目指す最終目標は、世界各国において国家レベルで精力的に進められているバイオ医薬品開発における新たな創薬手法の開拓、外科的手術をサポートできる生体適合性材料の開発、の2点である。本研究課題では、動物の弾性繊維の普遍的成分であるエラスチンに着目し、これをポリペプチドとして遺伝子レベルで合理的に分子設計し、生体に注射投与可能なゲル剤として仕立て上げた。その機能を解析したところ、注射前に薬物を混ぜて投与すると投与部位に薬物を留置でき、長期に渡り徐々に放出させることができ、その後は速やかに生分解される材料であった。今後、各種薬物の送達に最適化した生体適合材料としての展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：The final goal of our study is: (1) to discover the seeds of next-generation biomedicine for infectious disease and cancer therapy; (2) to develop biocompatible materials for supporting surgical treatment. In this study, we focused elastin protein which expresses universally as an elastic fiber of vertebrates. We carried out the rational design and recombinant synthesis of thermally responsive peptide polymer-based hydrogels composed of an elastin-like polypeptide that rapidly forms a reversibly cross-linked hydrogel by the formation of intermolecular mild oxidative cross-links. We showed the utility of the hydrogels for the sustained release of medicines and the ability as to be an injectable and biodegradable material. These materials will find useful application in drug delivery and tissue engineering.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学

キーワード：ドラッグデリバリー ハイドロゲル 生分解材料 ポリペプチド 薬物デポ インジェクタブルポリマー ペプチド 温度応答性高分子

1. 研究開始当初の背景

医学・医療技術はバイオテクノロジーの進歩にその発展を支えられている。バイオマテリアルはバイオテクノロジー分野に用いられる材料の総称であり、それを用いる患者の生活の質 (Quality of life: QOL) の向上に寄与することを最終目的とし、医・歯・薬・理・工・農学などの複合領域にまたがった先端技術を結集して発展し続けている。バイオマテリアルの重要な役割・基盤技術の1つに生体内寿命が短く、不安定な生体シグナル因子の投与手法が挙げられる。生体シグナル因子の生理活性を体内で効率よく発揮させるためには、その濃度を必要な場所で必要な期間にわたって有効値に保たねばならない。このための技術・方法論が DDS (Drug Delivery System) であり、優れた機能をもつバイオマテリアルは DDS 戦略に必要な不可欠な分子ツールである。生体シグナル因子とは生理活性物質や治療薬物、抗原あるいは診断薬を指し、例えば、不安定で体内半減期の短い薬物の寿命を延長することや抗原を徐放するという目的をもつ DDS を活用することで、治療・予防・診断の効率を上げることができる。莫大な時間と労力、資金を費やして見出された優れた活性をもつ薬物であっても、生体内での半減期が短いために上市されなかったものは数多い。例えば、多くのペプチド・タンパク質性の薬物が、その短い体内半減期のために薬効を発揮できる十分な濃度を維持できないという問題を抱えている。一方、望ましい薬物の徐放パターンは薬物の作用メカニズムや体内動態の特性によって異なり、例えばリュープリンのように、薬物受容体の down-regulation によるシグナル伝達の遮断により効力を発揮する薬物は、低濃度であっても長期間の持続的刺激を必要とする。このように個々の新規薬物の多様な特性に応じた DDS 戦略のニーズがあるために、バイオマテリアルを用いた継続的な新技術の提供が必要となる。

薬物徐放のためのバイオマテリアルとして多くのハイドロゲルが開発されてきた。徐放化担体であるハイドロゲルから薬物を適当な速度で供給し、作用部位における薬物濃度を制御することによって治療の最適化を図ることがその目的である。近年の臨床試験において、ゼラチンハイドロゲルにより bFGF

などの種々の細胞増殖因子を徐放できた結果、血管新生や骨再生の誘導が可能なが示され、バイオマテリアルを用いたテクノロジーが画期的な治療法に結びつくことが現実的に示された。外科的手術においても低侵襲性が強く要求される今日、メディカルゲルの開発研究はハイドロゲル留置 (インプラント) から注射可能な (インジェクタブル) ゲルへとその重要度が移行してきている。こうしたなか、申請者は最近、遺伝子工学的手法による人工エラスチンポリペプチド (Elastin-like polypeptide: ELP) を用い、温和な酸化条件下で迅速に自己ゲル化することで患部に留まり、さらに体温に应答した体積相転移によってゲルの微細構造を変化させることができるインジェクタブルバイオマテリアルの創成に成就した。

ペプチド科学者による構造活性相関研究により、天然のエラスチンタンパク質が正常な弾性機能を発現するために必要な最小配列候補の1つがペントペプチド: Val-Pro-Gly-Xaa-Gly (Xaa は Pro 以外のアミノ酸) であることが明らかとされて以来、多くの類縁体が化学合成され、その機能が解析されてきた。しかしながら、単純なペントペプチドの繰り返し配列であっても、100アミノ酸残基を超える長鎖ペプチドを化学合成により純度良く、かつ機能解析に十分な量を確保するのは一般的に難しいのが現状である。ELP は上述のペントペプチドユニットの繰り返し配列のみにより構成され、温度に応じた可逆的な相転移活性をもつユニークなりコンビナントポリペプチドである。これまでの研究の結果、ELP を担癌マウスの癌組織に投与すると、陰性コントロール (体温では相転移しない ELP) と比較して長期間に渡って癌組織内に局在できること、さらには¹³¹I で標識した ELP の癌組織内投与により癌の進行を著しく抑制できることを見出している。最近、より高い力学強度をもつバイオマテリアルを得るために、Lys や Cys、His をゲスト残基: Xaa に組み込んだ ELP を調製して機能解析し、これらを分子架橋点として利用するとゲル化する知見なども見出してきた。

2. 研究の目的

本研究では大腸菌を安定に大量培養することによりアミノ酸 800 酸残基から成る

ポリペプチドを調製して機能解析を実施する。(i)過酸化水素により瞬時にゲル化し、(ii)温度応答性体積相転移によりゲルの微細構造が変化する特性をもつ Cys 含有 ELP を用い、薬物徐放材料の新規プラットフォームを開発することを目的とし、最終的に薬物動態評価にまでもっていくことを目標とした。

3. 研究の方法

(1) ハイドロゲルバリエーションの分子設計・調製

ELP を人工遺伝子として分子設計してプラスミドを作製し、遺伝子工学的手法(Pre-RDL法; *Biomacromolecules*, 2010)により鎖状化 ELP の発現ベクターを構築した。大腸菌にこれを形質転換した後、培養して ELP を発現させ、ELP の温度応答性を利用した遠心分離法 (ITC 法; *Nat. Biotechnol.*, 1999)によって発現産物を回収・精製した。ELP の相転移温度は、ゲスト残基: Xaa の疎水性度、ELP の濃度、ペンタペプチドの繰り返し数: n の3つのパラメータにより調整できる。系統的な機能解析を展開するため、ゲルの架橋点の数を加えた計4つを系統的に変化させた人工遺伝子を設計・調製した。

(2) 温度応答性の解析・力学強度の評価

得られた ELP の温度応答性を、濁度を指標として解析して相転移温度を算出した。次いで一連の ELP 濃度、種々の温度・pH・酸性度の条件下においてゲル化能を評価し、ゲルの体積相転移温度について解析した。ハイドロゲルの力学強度は動的粘弾性を測定することにより調べた。この際、力学強度と相転移温度、ゲル架橋度との間にどのような相関があるのかに注目して解析を進めた。

(3) 注射投与型デポ剤を目指した薬物徐放解析

投与部位・形態によっては途中で分解されてしまうために標的部位には到達できない多くの薬物が存在し、ここに DDS 製剤開発のニーズが広く存在する。特にペプチド・タンパク質性の医薬品は容易に酵素分解を受けるために生体内での半減期が短く、これらを安定に送達し効率よく吸収させる技術の開発が求められている。しかしながら、全てのペプチド・タンパク質を網羅できる除放化技術の開発は困難を極め、現在では各々の製剤に対して最適な除放システムを適用する方向性で研究が進められている。一方、優れた除放材料を手にして、これに適する薬剤を探

す逆のアプローチも非常に重要な意味をもつ。ここでは異なる(i)ゲル架橋点数(ゲルの密度を規定)、(ii)ゲスト残基の疎水性度、(iii)鎖長 n を系統的に変化させたハイドロゲルが、どのような性質を兼ね備えたタイプの薬剤を効率よく貯留し徐放できるのかに着目して解析した。

4. 研究成果

(1) ハイドロゲルバリエーションの分子設計・調製

ゲスト残基: Xaa の疎水性度を規定しているのは Cys 残基数であるが、1分子あたりの Cys の数を 0、10、16、28 と変化させても収量・純度に影響は無かった。ELP の濃度およびペンタペプチドの繰り返し数: n については、親水性で短鎖のポリペプチドほど収率が低下する傾向にあったが、実験室レベルでの解析に必要な量を調製するには十分であった。2年間の研究期間を含め、これまでに前述の4つのパラメータの異なる計30種の ELP の設計・調製を終えた。

(2) 温度応答性の解析・力学強度の評価

各種の ELP について 350nm の吸光度を濁度と近似し、温度をスキャンして温度-吸光度曲線をプロットし、これを温度で微分して得られる極大値を求めることにより相転移温度を算出した。一例として30種類中6種についての結果を図1に示す。濃度一定溶液(25 μ M in PBS)で比較したところ、室温以下~80 までの相転移温度をもつ系統的な解析を可能にする ELP を調製できたことが判明した。

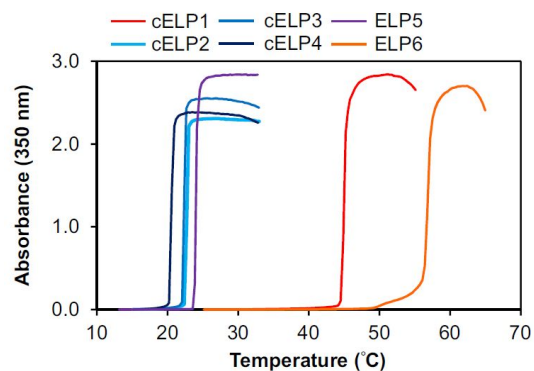


図1. 30種中6種の ELP の温度応答性

力学強度の解析は ARG2 レオメーターを用いて動的粘弾性を測定することにより実施した。ポリペプチド溶液を塩基性または酸性条件下にするとすみやかにゲル化することを発見した。その最小ゲル化濃度は 2.2wt% ときわめて低いものであり、極細針によるマ

ウスへの容易な注射投与を可能とした。ハイドロゲルの貯蔵弾性率： G' は周波数に依存せず常に損失弾性率： G'' よりも大きく、ポリペプチドのネットワーク構造形成を明らかとした。 G' のプラトー値： G_0 を算出して粘弾性の比較解析を行ったところ、 G_0 値は架橋開始剤である過酸化水素の濃度には大きくは依存せず(0.05%以上で G_0 はプラトー値に到達)ELPの濃度がその大小を規定する主なパラメータであることがわかった(図2)。また、 G_0 値はゲスト残基の種類や同鎖長内での架橋点数への影響は少なく(その差は数倍以内)(図3)、鎖長延長を伴った架橋点数の増加に大きく依存することを見出した(未発表データ; 論文準備中)。

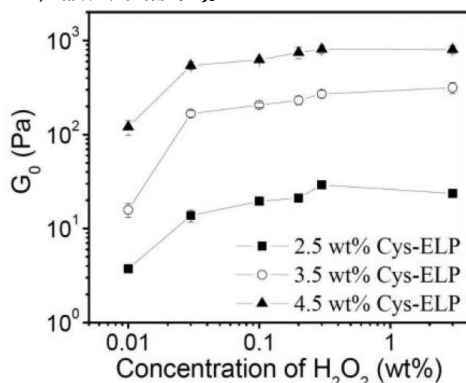


図2. G_0 値とcELP1・過酸化水素濃度との関係

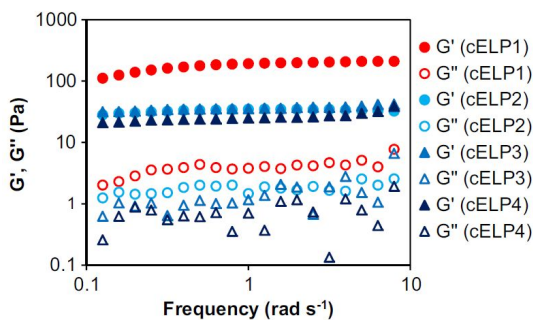


図3. ゲスト残基の異なるELPの粘弾性

(3) 注射投与型デポ剤を目指した機能解析

調製した各種のELPとアルブミン溶液とを酸化条件下で混ぜてゲル化させると、ゲル内に効率よくアルブミンを貯留できることを見出した。リン酸緩衝液中へのアルブミンの漏出を解析したところ、親水性ゲルでは初期バーストの後、4日~1週間かけて1次放出するプロファイルが得られた(図4. cELP1)。トキシイド抗原タンパク質(120~250 kDa)ではこのような1次放出は全く認められなかった。一方、体温以下の低い相転移温度をもつ疎水性ハイドロゲルでは、初期バースト

後半月以上にわたり高濃度のアルブミン貯留を持続できるというきわめて興味深い現象を発見した(図4. cELP2 & 3)。この現象

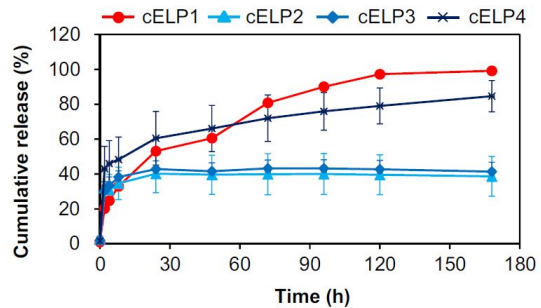


図4. FITC 標識アルブミンの徐放プロファイル

は小分子である抗 HIV ペプチド(5 kDa)でも認められた。 ^{125}I および近赤外蛍光プローブで標識したポリペプチドを担癌マウスに投与してハイドロゲルの生体内挙動を解析した結果、患部全体を覆うハイドロゲルを注射により留置でき(図5)投与後2週間にかつ炎症等の顕著な副作用なく完全に生分解されることがわかった(図6)。

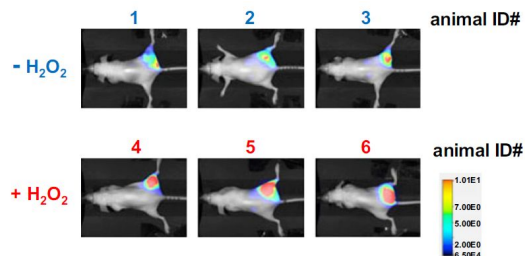


図5. 近赤外蛍光標識ELPによるイメージング

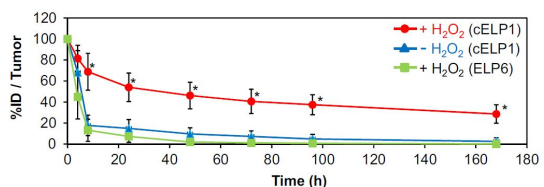


図6. 担癌組織内でのELPの良好な生分解性

鎖長一定の条件下で比較した場合、親水性ゲルとトキシイド抗原、疎水性ゲルとトキシイド抗原、同じく疎水性ゲルと抗 HIV ペプチドというゲル内貯留に優れた組み合わせを発見した。これらは研究申請時には全く予期していなかったきわめて興味深いものである。薬物候補として抗 HIV ペプチド Enfuvirtide および破傷風トキシイドの2つに焦点を当て、調製したELPをデポ型薬物として、薬物との相性、すなわち薬物貯留能・保護能・徐放能、そして薬効を *in vitro* および *in vivo* の両側面から検証した。その結果、最適な種類のELPと組み合わせで注射投

与により薬物を留置すると、薬物単独を投与した場合と比較して明らかに優れた生体応答・薬効が認められた(未発表データ; 論文準備中)。今後、これら2種の薬物に加えてさらに多種のバイオ医薬との組み合わせに関して幅広く解析を進めていきたい。また一方で本研究期間内に、肝細胞ターゲティングおよび循環器疾患細胞マーカーペプチドの開発にも成功した。新たなペプチド医薬モジュールとして人工エラスチンに融合したキメラ型ポリペプチドの分子設計へと繋げていく予定である。

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)

1. Asai, D., Toita, R., Murata, M., Katayama, Y., and Kang, J.H.; Peptide substrates for G protein-coupled receptor kinase 2. *FEBS Lett.*, 588, 2129-2132 (2014) (査読有)
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.04.038.
2. Kang, J.H., Toita, R., Asai, D., Yamaoka, T., and Murata, M.; Liver cell-specific peptides derived from the preS1 domain of human hepatitis B virus. *J. Virol. Methods*, 201, 20-23 (2014) (査読有)
DOI: 10.1016/j.jviromet.2014.02.013.
3. Asai, D., Xu, D., Liu, W., Garcia Quiroz, F., Callahan, D.J., Zalutsky, M.R., Craig, S.L., and Chilkoti, A.; Protein polymer hydrogels by *in situ*, rapid and reversible self-gelation. *Biomaterials*, 33, 5451-5458 (2012) (査読有)
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.03.083.
4. Xu, D., Asai, D., Chilkoti, A., and Craig, S.L.; Rheological properties of cysteine-containing elastin-like polypeptides solution and hydrogels. *Biomacromolecules*, 13, 2315-2321 (2012) (査読有)
DOI: 10.1021/bm300760s.
5. Liu, W., McDaniel, J.R., Li, X., Asai, D., Garcia Quiroz, F., Schaal, J., Park, J.S., Zalutsky, M.R., and Chilkoti, A.; Brachytherapy using injectable seeds that are self-assembled from genetically encoded polypeptide *in situ*. *Cancer Res.*, 72, 5956-5965 (2012) (査読有)
DOI: 10.1158/0008-5472

[学会発表](計10件)

1. 武永美津子、竹内智紀、都倉享恵、濱口明美、太田有紀、浅井大輔、大石真也、中島秀喜、藤井信孝; 新規合成 KSP 阻害

剤の抗腫瘍効果に関する研究, 第29回日本 DDS 学会学術集会、京都 (2013.7.3-4)

2. Funamoto, D., Mori, T., Asai, D., Niidome, T., and Katayama, Y.: Preparation of cancer-signal-responsive gene carrier via native chemical ligation, 4th Asian Biomaterials Congress, Hong Kong, China (2013.6.26-31)
3. 船本大起、森健、浅井大輔、新留琢郎、片山佳樹; ネイティブケミカルライゲーションによるがん増殖シグナル応答性遺伝子キャリアの作製, 第62回高分子学会年次大会、京都 (2013.5.29-31)
4. 浅井大輔、中島秀喜、Ashutosh Chilkoti; 薬物デポを指向した人工蛋白質性注射ゲルの合理的設計, 第85回日本生化学会大会、福岡 (2012.12.14-16)
5. 浅井大輔、中島秀喜、Ashutosh Chilkoti; 人工エラスチンポリペプチドゲルの薬物徐放性の解析, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012、仙台 (2012.11.26-27)
6. 浅井大輔、金本大成、福田靖、寺久保繁美、諸熊一則、柴山恵吾、中島秀喜; 次世代医用材料の開発: 薬物徐放のための生体吸収性注射ゲル, 第72回神奈川県感染症医学会、横浜 (2012.9.8)
7. 浅井大輔、中島秀喜、Ashutosh Chilkoti; インジェクタブルDDSを実現する人工エラスチンポリペプチドゲル, 第28回日本 DDS 学会学術集会、札幌 (2012.7.3-5)
8. Liu, W., McDaniel, J.R., Li, X., Asai, D., Zalutsky, M.R., and Chilkoti, A.; Thermally-responsive Elastin-like polypeptide engineered to locally deliver radionuclide payload leads to complete regression of solid tumor, 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China (2012.6.1-5)
9. 浅井大輔、中島秀喜、Ashutosh Chilkoti; 遺伝子工学を用いた人工プロテインポリマーハイドロゲル, 第61回高分子学会年次大会、横浜 (2012.5.29-31)
10. Liu, W., McDaniel, J.R., Li, X., Asai, D., Zalutsky, M.R., and Chilkoti, A.; Preclinical studies on tumor retention, antitumor efficacy and toxicity of thermally responsive polypeptide-based radionuclide intratumoral depot in nude mice, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2012, Chicago, IL, USA (2012.4.1-4)

[図書](計0件)

- ・該当なし
- [産業財産権]
- ・該当なし

〔その他〕

ホームページ等

教室ホームページ（生体材料学研究）

<http://www.marianna-u.ac.jp/microbiology/office/003334.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

浅井 大輔（ASAI, DAISUKE）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：10423485

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし