

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02296

研究課題名(和文)特異形状フレキシブルスマートハイブリッドの合成と評価

研究課題名(英文)Synthesis and characterization of flexible smart hybrid with specific shape

研究代表者

余語 利信 (Yogo, Toshinobu)

名古屋大学・未来材料・システム研究所・名誉教授

研究者番号：00135310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,100,000円

研究成果の概要(和文)：セルロースからなる、実物の赤血球と類似した赤血球状粒子(RBC-MPs)を作製した。RBC-MPsをマウスに静脈内投与し、蛍光イメージングにより体内動態を評価したところ、RBC-MPsは肺および脾臓への蓄積を回避し、肝臓に特異的に集積した。RBC-MPsの体内動態を活かし、線維症の原因を阻害する物質を肝臓のみに運搬することで肝硬変の治療を試みたところ、肺への副作用なく、肝機能を回復させることができた。また、磁性ナノ粒子を含有するRBC-MPsに分子インプリント法によりコルチゾール捕捉機能を賦与し、コルチゾールの選択的捕捉と磁石による粒子回収を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Red-blood-cell like micro particles (RBC-MPs) consisting of cellulose were successfully synthesized. RBC-MPs were intravenously administrated to mice, and their pharmacokinetics were investigated by fluorescence imaging. RBC-MPs avoided the accumulation in the lung and spleen, but accumulated specifically in the liver. Based on the pharmacokinetics of RBC-MPs, the drug to heal fibrosis was incorporated to RBC-MPs, and delivered specifically to the liver. The fibrous was successfully cured without any side effect. In addition, RBC-MPs dispersed with magnetic nanoparticles was molecularly imprinted with cortisol were found to trap cortisol selectively, and to be recovered by magnet.

研究分野：複合材料

キーワード：ハイブリッド材料 特異形状 赤血球状粒子 体内動態

### 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノサイズやミクロンサイズの微粒子の医療応用が注目を集めている。代表例としてドラッグデリバリーシステム (DDS) の薬剤輸送担体としての応用が挙げられる。ミクロンサイズの微粒子 (ミクロン粒子) を DDS キャリアとして用いた場合は、ナノ粒子を用いた場合に比べ、多種類かつより大きなサイズ (ナノ粒子など) の機能性物質を一度に大量に運搬することができるという利点がある。一方、ミクロン粒子を静脈内投与すると、肺や脾臓に蓄積しやすいという問題がある。そのため、肺や脾臓に蓄積しないミクロ粒子の開発が重要な課題であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、赤血球様の形状と変形能を有するミクロン粒子を作製し、その体内動態を調査した。さらに、作製した赤血球状粒子の体内動態を活用し、肝硬変治療への応用を試みた。また、血中に存在する分子としてコルチゾールの選択的捕捉を目的とし、分子インプリント法を用いて赤血球状粒子を合成し、選択的捕捉と磁気回収を検討した。

### 3. 研究の方法

セルロースからなる赤血球状粒子 (RBC-MPs) をエレクトロスプレー法により作製した。比較のために、同様の方法で、セルロースから成る球状粒子 (SPH-MPs) とシリカを含有する赤血球状粒子 (RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs) を作製した。各粒子の形状、弾性、粒子内弾性分布を評価し、これらの因子が体内動態へ与える影響を調査した。さらに、肝硬変マウスに投与することで、RBC-MPs を用いた肝硬変の治療効果および肺への副作用を調査した。

また、分子インプリント (MI) 法を用いて、コルチゾール捕捉能を有し、磁性ナノ粒子を含有する MI-RBC-MPs を合成し、コルチゾール捕捉や磁石による回収を検討した。

### 4. 研究成果

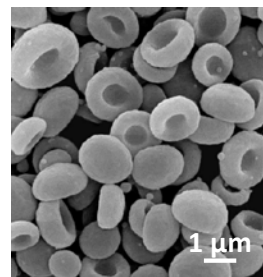
#### (1) 各種微粒子の作製と評価

エレクトロスプレー法で RBC-MPs を作製できることを確認した。ポリマー溶液の濃度、溶媒、エレクトロスプレーを行う際の印加電圧、電極間距離、湿度を調節することで粒子の形状を制御することができ、RBC-MPs と同程度の粒径を有する SPH-MPs を作製できた。さらに、テトラエトキシシランを含有したポリマー溶液のエレクトロスプレーとその後のアルコキシ基の加水分解・縮合により RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs を作製することができた (図1)。

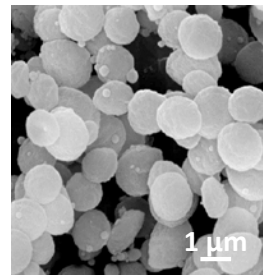
#### (2) 各種微粒子の諸特性

RBC-MPs は、その形状に起因する特異な粒子内弾性分布を示し、さらに、この粒子内弾性分布により変形能を有していた。さらに、RBC-MPs はこの変形能を活かし、一時的に変

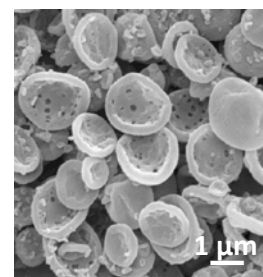
形することで直径よりも細い細孔を通過し、通過後は元の形状に復元した。一方で、SPH-MPs および RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs は特徴的な弾性分布を示さず、変形能を持たないことから細孔を通過できなかった。RBC-MPs は、粒子中央の凹部のヤング率が縁のヤング率に比べ低いことから、RBC-MPs は中央部のくぼみを中心として変形できると考えられる。一方で、SPH-MPs は、中央部に厚みを持つため中央部のヤング率が高く、変形しにくい。また、RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs は、ヤング率が ~20GPa で RBC-MPs の 100 倍程度のヤング率を有しており、3 種類の粒子中、最も変形しにくいと結論できる。



RBC-MPs



SPH-MPs



RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs

図1 各種形状粒子

#### (3) 各種微粒子の体内動態

インドシアニンググリーン (ICG) を含有した各微粒子および ICG をマウスに静脈内投与し、経時的に *in vivo* 蛍光イメージングを行った結果を図2に示す。SPH-MPs を投与したマウスにおいては、どの時間においても肺での蛍光が強く、24 時間後においても肺で蛍光が観察された。これは、ほとんどの SPH-MPs が投与してからすぐに肺に蓄積してしまい、そのまま残存したことを示している。また、SPH-MPs は、肝臓、胃、腸、肺への蓄積が多く、特定の臓器に対する指向性は有していなかった。RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs を投与したマウスにおいては、SPH-MPs を投与したマウスと同様に、どの時間においても肺での蛍光が観察された。さらに脾臓での蛍光も観察され、この蛍光は時間経過とともに増加した。この結果は、RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs は、投与後すぐに肺へ蓄積し、徐々に脾臓に移行したことを示唆している。また、RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs は SPH-MPs や後述する RBC-MPs に比べ、時間が経っても蛍光強度が減少せず、体内で分解されにくいことが分かる。これは、RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs はシリカを含有するためであると考えられる。一方、RBC-MPs を投与したマウスでは、肝臓以外の

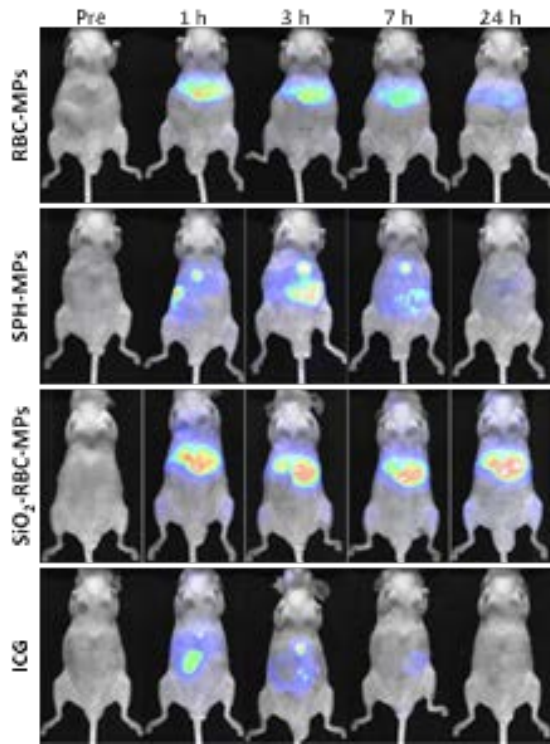


図2 各微粒子および ICG をマウスに静脈内投与後の in vivo 蛍光イメージングの経時変化

臓器でほとんど蛍光が観察されず、SPH-MPs や RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs の問題であった肺や脾臓への蓄積を回避し、肝臓に特異的に集積することが明らかとなった。

また、各微粒子をマウスに投与してから 24 時間後に肺、脾臓、肝臓を摘出し、これらの組織切片の蛍光イメージから肺、脾臓、肝臓における各微粒子の分布を調査した。RBC-MPs を投与したマウスの肺では蛍光は観察されなかったが、SPH-MPs および RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs を投与したマウスの肺では、肺全体に蛍光が観察された。脾臓では、RBC-MPs および SPH-MPs の蛍光は一部の領域だけで観察されたが、RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs では組織全体にわたって蛍光が観察された。肝臓では、RBC-MPs、SPH-MPs、RBC-SiO<sub>2</sub>-MPs の蛍光が血管周辺に観察された。以上より、RBC-MPs はその特異な形状と粒子内弾性分布により、肺の毛細血管や脾臓の網目構造での蓄積を回避することが明らかとなった。

#### (4)RBC-MPs を用いた肝硬変治療

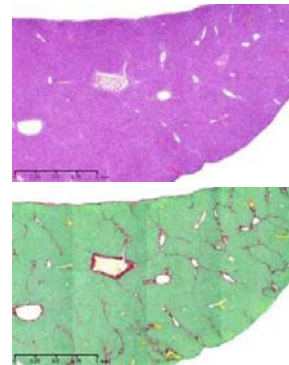
RBC-MPs は、肝線維化の原因となるクッパー細胞をターゲティングし、RBC-MPs はクッパー細胞内で内包物を放出した。さらに RBC-MPs 自体は細胞毒性がないことが確認できた。

肝線維症マウスへの transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、受容体阻害剤) 含有赤血球状粒子 (TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs) 投与による肝線維化組織修復効果を肝臓の免疫組織 (Sirius Red-Fast Green) 染色により評価し、肝機能回復効果を血清の使用による生化学

検査により評価した。TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs は単回投与であり、肝臓および血清は投与後 10 日目に採取した。

Sirius Red で染色した肝臓中の線維化部面積と Fast Green で染色した非線維化部面積の割合から線維化組織修復効果を評価した。正常な肝臓組織では、血管周囲のコラーゲン繊維のみが Sirius Red により赤く染色され、線維化が生じていないことを確認した。染色されたコラーゲン線維領域の割合は 0.9% であった。一方、肝線維症マウスの肝臓では、線維化が肝臓全体に及んでおり、線維化領域の割合は 5.8% であった(図 2 Untreated)。TGF- $\beta$ -RI-SPH-MPs を投与した場合には、線維化領域の割合は 4.2% に減少した。これに対し、TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs を投与した場合には、線維化領域の割合は 1.7% まで減少し、TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs が肝線維症を大きく改善することが明らかとなった(図 3 TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs)。また、TGF- $\beta$ -RI 単独投与および TGF- $\beta$ -RI 非担持 RBC-MPs 投与では、線維化領域の割合は減少しなかった。これらの結果は、TGF- $\beta$ -RI を RBC-MPs に担持し、肝臓に TGF- $\beta$ -RI を効率的に運搬することで線維化組織修復効果が得られること、さらに、RBC-MPs 自体は線維化修復能を持たないことが明らかになった。

#### (a) Untreated



#### (b) TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs

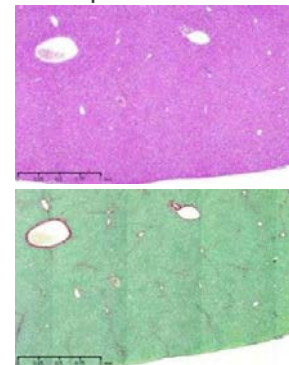


図2 Sirius Red で染色した肝臓中の線維化部と Fast Green で染色した非線維化部  
(a) 肝線維症マウスの肝臓組織 (TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs 投与前)  
(b) TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs 投与後

生化学検査により肝機能を評価する指標であるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アルカリホスファターゼ (ALP)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、および  $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ (GT) の血清中の値を測定することで肝機能回復効果を評価した。TGF- $\beta$ -RI を投与することで AST、ALT、ALP、LDH の値は若干正常マウスの値に近づいた。つまり、TGF- $\beta$ -RI 単独投与では線維化組織修復効果は得られないが、肝機能を若干改善することはできることが明らかになった。TGF- $\beta$ -RI-SPH-MPs および TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs の投与により、AST、ALT、ALP、LDH、 $\gamma$ -GT 値は、正常なマウスの値に近づいた。特に TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs 投与の効果は顕著であり、これらの値を正常マウスとほぼ同程度まで改善した。TGF- $\beta$ -RI 非担持 RBC-MPs 投与では肝機能の改善は観察されなかった。以上の二種類の評価より、TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs の静脈内注射が肝線維症を改善することが実証された。

また、TGF- $\beta$ -RI-SPH-MPs および TGF- $\beta$ -RI の投与は肺に副作用が生じたが、TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs 投与では副作用は確認されなかった。

以上の結果から、TGF- $\beta$ -RI-RBC-MPs を用いることで、肺へ副作用を引き起こさず肝線維症の治療を行えることが実証された。

#### (5) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs の作製と評価

コルチゾール (Cortisol) は、副腎皮質ホルモンの一種であり、炭水化物、脂肪、およびタンパク代謝を制御している。Cor は生体にとって必須のホルモンであるが、過剰分泌により、血圧や血糖レベルを高め、免疫機能の低下や不妊をもたらす。過剰なストレスにより多量に分泌された Cor は、記憶形態に深く関わる脳の海馬を萎縮させることが知られている。

配位モノマーとして 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)、架橋モノマーとしてメチレンビスアクリルアミド (MBA) を用いて、コルチゾール (Cor) 存在下、赤血球状粒子マトリクス中でラジカル重合を行い、Cor をインプリントした粒子 (MI-RBC-MPs) を合成した。また、Cor を加えずに作製した NI-RBC-MPs も合成した。ATR-IR により、重合が進行していることが確認でき、SEM 像によって粒子が赤血球状であることを確かめた。また、作製した MI-RBC-MPs を Cor 溶液、コール酸溶液、チロシン溶液、クレアチニン溶液、クレアチン溶液に分散させたところ、Cor 溶液にのみ濃度の減少が確認され、MI-RBC-MPs が Cor を選択的に吸着していることが確認できた (図 4)。一方、NI-RBC-MPs は Cor を吸着せず、MI-RBC-MPs には Cor 骨格の空洞が作製できていて、これが Cor の選択的吸着に寄与していることが示唆された。

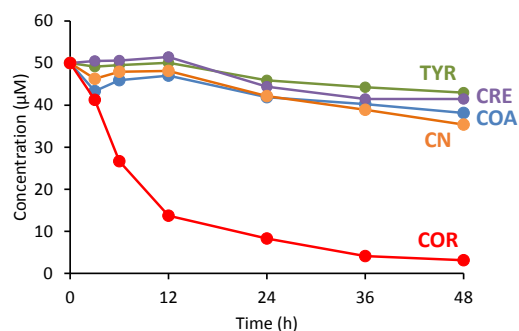


図 4 MI-RBC-MPs によるコルチゾールの選択的捕捉

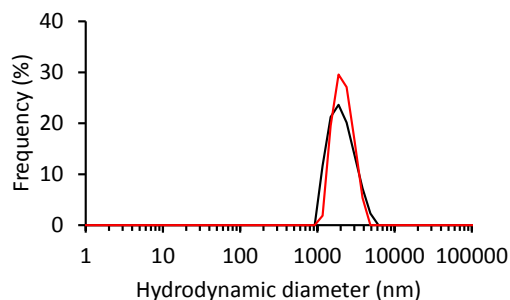


図 5 マイクロフィルター通過前後の MI-RBC-MPs のサイズ分布  
黒：通過前、赤：通過後

DLS 測定の結果、図 5 に示すように MI-RBC-MPs は 1  $\mu$ m のマイクロフィルターを通過していることを確認でき、柔軟性を示した。

この粒子中に磁性ナノ粒子を均一分散させ、Cor 捕捉機能を備えた Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs を合成することができた。図 6 に透過型電子顕微鏡で観察した微構造を示す。MI-RBC-MPs 中に粒径 15nm 程度の Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ナノ粒子が分散されていることがわかる。

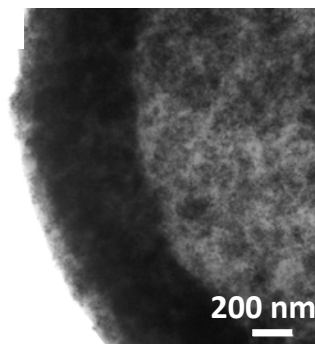


図 6 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs の TEM 写真

この Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs は、自径より小さなマイクロフィルターを通過した。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs は室温で磁化を示したが、保磁力は示さなかった。Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs は、類似構造を有する化合物に比較して、コルチゾールを選択的に捕捉した。この粒子の飽和磁化は 52 emu/g (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 換算) であり、

流水中から磁石で回収することができた。

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs により血液中に存在する過剰 Cor を吸着し、磁石により Cor 吸着 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs を回収する可能性が示された。

以上のように、本研究では、申請者らが独自に開発したエレクトロスプレー法により合成した RBC-MPs について、シリカや磁性粒子を含有させ、それらの新たな性質を明らかにした。分子設計などにより合成した RBC-MPs の特異的な性質を用いて、動物実験も行い医療用材料としての可能性の一端を明らかにすることができた。

今後、RBC-MPs および Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-MI-RBC-MPs の血中滞留時間をさらに増加させ、新機能の賦与により、種々の病気治療への応用が期待できる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① K. Hayashi, S. Yamada, W. Sakamoto, T. Yogo,  
Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis, *Biomaterials*, 156, (2018) 45-55. 査読有  
10.1016/j.biomaterials.2017.11.031
- ② K. Hayashi, H. Hayashi, S. Yamada, W. Sakamoto, T. Yogo,  
Cellulose-based molecularly imprinted red-blood-cell-like microparticles for the selective capture of cortisol, *Carbohydrate Polymers*, 193, (2018) 173-178. 査読有  
10.1016/j.carbpol.2018.03.095

[学会発表] (計 3 件)

- ① H. Hayashi, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo  
Synthesis of flexible hybrid particles with dual modality,  
International Symposium on EcoTopia Science 2015, 2015.11.28  
名古屋大学 IB 館 (愛知県)
- ② 山田翔太・林幸壱朗・坂本渉・余語利信  
Preparation of Red Blood Cell-like Particles with Ability to Avoid Accumulation in the Lung and Spleen for the Treatment of Liver Fibrosis,  
第 27 回日本 MRS 年次大会、2017.12.6、開港記念会館 (神奈川県)
- ③ 山田翔太・林幸壱朗・坂本渉・余語利信  
肺および脾臓における蓄積を回避する赤血球状ポリマー粒子の作製と肝硬変治療への応用、日本セラミックス協会東海支部 2017 年学術研究発表会、2017.12.9、名工大 (愛知県)

[その他]

- ① 新聞報道  
赤血球状粒子肝臓に薬物運搬、日経産業新聞、平成 29 年 12 月 8 日
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
余語 利信 (YOGO, Toshinobu)  
名古屋大学・未来材料システム研究所・教授  
研究者番号：00135310
- (3) 連携研究者  
坂本 渉 (SAKAMOTO, Wataru)  
名古屋大学・未来材料システム研究所・准教授  
研究者番号：50273264
- 林 幸壱朗 (HAYASHI, Koichiro)  
九州大学・大学院歯学研究院・准教授  
研究者番号：80580886
- (4) 研究協力者  
林 洸 (HAYASHI, Hikaru)  
山田 翔太 (YAMADA, Shota)