

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12536

研究課題名(和文) 血流中において機能する酵素封入PIC型ナノリアクターの構築と機能評価

研究課題名(英文) Development of enzyme-loaded PIC-nanoreactor working under the blood circulation

研究代表者

安楽 泰孝 (Anraku, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：60581585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：人工的に構築したベシクル中に酵素を封入し、生体内で有害物質を分解し続けることで治療効果を得る酵素補充療法は副作用の著しく低い薬剤送達システムとして注目を集めているが、血流中という厳しい環境で機能するシステム開発はチャレンジングなテーマである。本研究では、急性リンパ性白血病の治療薬であるL-アスパラギナーゼを、申請者らが開発したポリイオンコンプレックス型ベシクルに封入し(ASNase@PICsomes)、血流中における「酵素の反応場」としてASNase@PICsomesが有用であることを、詳細な物性評価及びin vivoにおける機能評価をとおして実証することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Enzyme-loaded synthetic vesicles have attracted great attention for their feasibility to exert the efficient and prolonged functionality of loaded enzymes in harsh environments. However, several issues remain regarding the optimization of their structures toward practical application. Herein, we fabricated polyion complex vesicles loaded with L-asparaginase (ASNase@PICsomes) and conducted a detailed characterization to ensure their utility as nanoreactors functioning under the harsh in vivo environment (bloodstream). ASNase@PICsomes showed 100 nm-sized monodispersed vesicular structures. Fluorescence cross-correlation spectroscopy revealed essentially no empty PICsome fraction in the product, indicating the quantitative formation of ASNase@PICsomes. Furthermore, ASNase@PICsomes exhibited significantly prolonged enzymatic reaction compared with free ASNase after systemic injection into mice, corroborating their functionality as in vivo nanoreactors working under the blood circulation.

研究分野：高分子化学、薬剤送達システム

キーワード：酵素 酵素補充療法 薬剤送達システム 高分子ベシクル 急性リンパ性白血病 高分子化学

### 1. 研究開始当初の背景

酵素補充療法(ERT)は、体内に足りない酵素を補充することで症状の改善を計る治療法で、疾患部位まで酵素を送り届け代謝を促すシステムを組み込んだ薬剤送達システム(DDS)はとりわけ副作用の低い革新的治療法として期待されている。一方で、血流中といった厳しい環境下で長期間にわたって酵素を機能させるDDS(ナノリアクタ)は皆無であり、未だにチャレンジングな課題である。

### 2. 研究の目的

本研究では、急性リンパ性白血病(ALL)の治療薬であるL-アスパラギナーゼを申請者らが開発したDDSに封入し、血流中で白血病細胞の栄養源であるL-アスパラギン分解し栄養欠乏状態にすることで抗腫瘍効果を発揮するナノリアクターを開発し、ALLの革新的治療法へと展開していくことを目的とした。

### 3. 研究の方法

ERTを効果的に達成する為にDDSキャリアには、酵素を失活することなく封入でき、疾患部位に的確に運搬し、標的物質がキャリアを透過し酵素と反応するといった一連の機能が必要不可欠である。近年申請者が開発した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荷電性セグメントからなる荷電性高分子の静電相互作用による自己組織化[ポリイオンコンプレックス(PIC)形成]を利用した一枚膜構造のPICsomeは、酵素を失活することなく封入可能、PIC膜に特徴的な物質の膜透過性を示す。さらにPICsomeを構成するPIC膜を架橋することで、透過する物質の分子量を制御可能であるのみでなく、マウス体内において高い血中循環性(半減期 30 時間)を示す。一連の体内動態は酵素を封入しても不変であることから材料学的視点から考えても、PICsomeの特徴が生体内において『酵素の反応場』として最適であることは想像に難くない。

そこで本研究では、L-アスパラギナーゼを封入したPICsome(ASNase@PICsome)を構築し、その詳細な物性評価および実験動物を用いた血流中での機能評価を検討した。

### 4. 研究成果

#### ASNase@PICsomeの構築および物性評価

PEG-b-Poly( $\alpha,\beta$ -aspartic acid) (PEG-PAsp)および Homo-Poly([5-aminopentyl]- $\alpha,\beta$ -asparatamide) (Homo-P(Asp-AP))をそれぞれ 10 mM リン酸緩衝液(pH7.4, 0mM NaCl)に溶解し、正負の荷電比が 1:1 となるように混合・攪拌してPICsomeを形成させた。ここにASNase溶液を添加・攪拌し、PICsomeの可逆的な解離・再生挙動を利用してASNaseをPICsomeに封入させた。続いて縮合剤(1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC))を加え、一晚反応させたのち限外ろ過(分画分子量 30 万)により精製し、ASNase @PICsomeを得た。粒

径・形態を動的光散乱(DLS)測定・透過型電子顕微鏡(TEM)観察により評価した。またベシクルへの酵素の担持を確認するため、DyLight 488 で蛍光標識化したASNase(Dy488-ASNase)を用いて同様の調製を行い、蛍光相関分光法(FCS)による分析を行った。DLS測定およびTEM観察により、形成した粒子が直径約 100 nm 程度で単分散なベシクル構造を有していることを確認した(図 1A, B)。また FCS 測定の結果、Dy488-ASNase@PICsomeの自己相関関数の曲線はフリーのDy488-ASNaseのそれに比べ拡散時間の長い領域へのシフトを示した(図 3C)。このことは既報で論じられている通り、蛍光標識化された分子がより大きなナノサイズの粒子内に封入されたことを示唆する結果である。

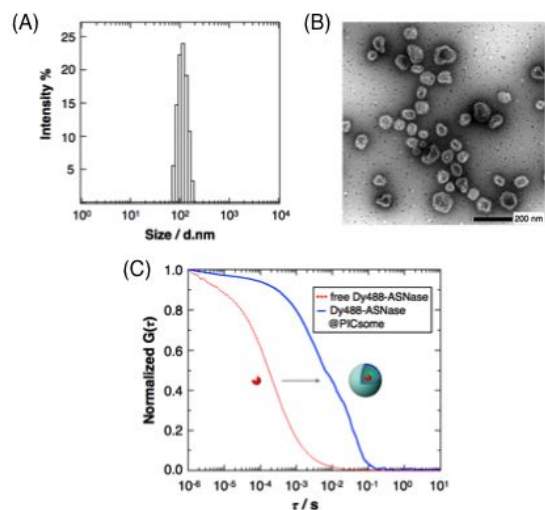


図 1. ASNase@PICsomeの(A) DLS測定結果、(B) TEM観察像、(C) FCS測定による free Dy488-ASNase、Dy488-ASNase@PICsomeの規格化自己相関関数の曲線。

一方 FCS の結果のみからでは、封入された酵素がベシクルの内水相中に存在するのか、あるいは膜に埋め込まれているのかの区別が困難である。また、これまでナノサイズのベシクル内での酵素の局在を明確に実証した例は報告されていなかった。そこでこの局在に関する知見を得るため、担持された酵素のベシクル中での局在に関する知見を得るため、蛍光分子の回転ブラウン運動を反映する蛍光異方性(FA)測定を行った。定常光励起により観測されるFA:  $\tau$ は、理論的な範囲として  $0 \leq \tau \leq 0.4$  を示し、この値が高いほど蛍光分子の回転ブラウン運動が遅い、もしくは制限されていることに対応する。フリーのDy488-ASNaseで0.122、Dy488-ASNase@PICsomeで0.198であった一方、蛍光標識化分子の回転運動が抑制された対照サンプルとして調製したDy488-PICsomeは0.342と、理論上限に近い値を示した(図 2)。このことは、ベシクルに封入後も回転運動が維持されている酵素が存在していることを示唆している。さらに、PIC膜を透過しうる低分子の

増粘剤 Glycerol を添加後に同様の測定を行ったところ、90% Glycerol 中での Dy488-ASNase @PICsome は  $\bar{r} = 0.245$  と、同条件下でのフリーの Dy488-ASNase ( $\bar{r} = 0.268$ ) と同程度の値を示した。このことは、ベシクル内水相中の局所粘度が上昇したことにより封入酵素の回転ブラウン運動が抑制されたことと矛盾しない結果であり、Dy488-ASNase@PICsome において酵素がベシクルの膜に担持されているのではなく主に内水相中に存在していることを示唆している。このことは、封入酵素の活性維持に加え、生体内に投与した際の封入酵素に対する免疫応答の回避という観点からも重要であると考えられる。

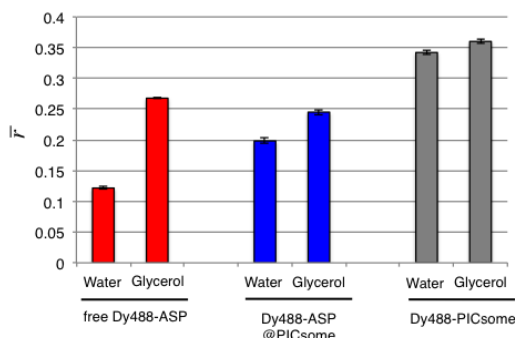


図 2. free Dy488-ASNase, Dy488-ASNase @PICsome, Dy488-PICsome の水中、および 90% Glycerol 中での各々の FA 測定結果。

### ASNase@PICsome の *in vitro*, *in vivo* における機能評価

次に、ASNase@PICsome が血流中でナノリアクターとして持続的に機能するという上記のコンセプトを実証するため、*in vitro*、*in vivo* における生物学的機能評価を行った。ASNase を介した分解により蛍光 (Ex/Em = 350/450 nm) を発する基質 L-aspartic acid  $\beta$ -(7-amido-4-methylcoumarin) (Asp-AMC) を 37°C で ASNase@PICsome と混合し、経時的に蛍光強度を測定し反応速度を算出することで *in vitro* での酵素活性に関する評価を行った。複数の基質濃度に対して反応速度を算出し、Michaelis-Menten の式に基づく解析を行った結果、ASNase@PICsome はフリーの ASNase と同程度の Michaelis-Menten 定数を示し ( $K_m = 194 \mu\text{M}$ )、封入前後での酵素活性の維持が示唆された。さらに、擬似生理環境下での活性の維持について検討するため、10% ウシ胎児血清 (FBS) 存在下で 37°C に静置した際の一定溶液量あたりの酵素ユニット数の変化を Asp-AMC を用いて評価した。その結果フリーの ASNase と同様に ASNase @PICsome は 24 h にわたり溶液一定量あたりの酵素 unit 数がほぼ変化せず、この間 ASNase @PICsome の粒径・多分散度はほぼ一定であった。このことから、ASNase@PICsome はタンパクの存在下であっても構造の凝集・崩壊が誘起されず、酵素活性が長時間維持されることが見出された。

また *in vivo* における機能評価として、

Cy5-ASNase(@PICsome)をマウス(Balb/c, ♀, 5 週齢)へ尾静脈投与し、一定時間後に血液を採取して血漿中での投与酵素の残存量を蛍光検出により評価した。マウスへの投与から 24 h 後、フリーの Cy5-ASNase はほぼ全てが血中から消失していたのに対し、Cy5-ASNase@PICsome は投与量の 35% 程度の残存が見られ、著しく高い血中滞留性を示した (図 3A)。さらに *in vivo* での酵素反応の評価のため、ASNase(@PICsome)を 100 unit/kg body weight 相当の投与量で同様のマウスに尾静脈投与し、一定時間後に血液を採取した。得られた血漿について、ASNase を介した反応により変動する血漿中化学成分濃度を、生化学自動分析装置もしくは液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)を用いて定量した。酵素投与から 24 h 後のマウス血漿中のアンモニア窒素濃度を測定した結果、フリーの ASNase 投与群では酵素未投与の対照群と比べ大きな変化が見られなかったのに対し、ASNase@PICsome 投与群では顕著な増加が見られた (図 3B)。さらに LC/MS 測定により、同様の条件で ASNase@PICsome を投与して 24 h 後の血漿アスパラギン濃度の有意な減少を認めた。これより、ASNase@PICsome を尾静脈投与したマウスにおいて長時間に渡り持続的な酵素反応が誘導されていることが示され、血流中で持続的に機能するナノリアクターとしての ASNase@PICsome の確立に成功した。

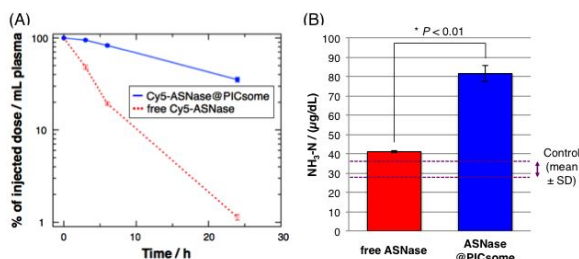


図 3. (A) Cy5-ASNase(@PICsome)をマウスに尾静脈投与後の血中滞留性。(B) ASNase (@PICsome)を尾静脈投与して 24 h 後のマウス血漿中アンモニア窒素濃度。

### まとめ

以上のように、酵素を失活することなく封入でき、長期に渡って血流中を循環し、標的物質がキャリアを透過し酵素と反応するといった一連の機能を併せ持ち、血流中において有害物質を分解し続けるナノリアクターシステムを構築することに成功した。

### 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 5 件)

1. J. Li, A. Dirisala, Z. Ge, Y. Wang, W. Ke, K. Toh, J. Xie, Y. Matsumoto, Y. Anraku, and K. Kataoka Therapeutic Vesicular Nanoreactors with Tumor-Specific Activation and Self-Destruction



for Synergistic Tumor Ablation. *Angew. Chem. Int. Ed.* 56, 14025-14030 (2017). (DOI: 10.1002/anie.201706964) 査読あり

2. A. Goto, H-C. Yen, Y. Anraku, S. Fukushima, P-S. Lai, M. Kato, A. Kishimura, K. Kataoka, Facile Preparation of Delivery Platform of Water-Soluble Low-Molecular-Weight Drugs Based on Polyion Complex Vesicle (PICsome) Encapsulating Mesoporous Silica Nanoparticle. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 3(5), 807-815 (2017). (DOI: 10.1021/acsbiomaterials.6b00562) 査読あり

3. D. Sueyoshi, Y. Anraku, K. Kataoka, Enzyme-loaded polyion complex vesicles as in vivo nanoreactors working sustainably under the blood circulation: Characterization and functional evaluation. *Biomacromolecules* 18(4), 1189-1196 (2017). (DOI: 10.1021/acs.biomac.6b01870) 査読あり

4. N. Sasaki, M. Tatanou, T. Suzuki, Y. Anraku, A. Kishimura, K. Kataoka, K. Sato, A membrane-integrated microfluidic device to study permeation of nanoparticles through straight micropores toward rational design of nanomeicines. *Analytical Sciences* 32, 1307-1314 (2016). (DOI: 10.2116/analsci.32.1307) 査読あり

5. R. Taniguchi, Y. Miura, H. Koyama, T. Chida, Y. Anraku, A. Kishimura, K. Shigematsu, K. Kataoka, T. Watanabe, Adequately-sized nanocarriers allow sustained targeted drug delivery to neointimal lesions in rat arteries. *Mol. Pharmaceutics* 13, 2108-2116 (2016). (DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.6b00219) 査読あり

〔学会発表〕(計37件)

1. (招待講演) 安楽泰孝、次世代医療技術開発に貢献する材料工学、第4回 COINS シンポジウム ナノテク→体内病院→スマートライフ～未来医療はナノマシンが創る～、2017年12月8日、川崎市産業振興会館 (神奈川県・川崎市)

2. (招待講演) Y. Anraku, Enzyme-loaded Polyion Complex Vesicles as In vivo Nanoreactors, The 34th International Conference of Photopolymer Science and Technology, June. 27, 2017, International Conference Hall, Makuhari Messe, Chiba (Japan),

3. (招待講演) Y. Anraku, Enzyme-loaded Polyion Complex Vesicles as In vivo Nanoreactors, The 11th Annual Symposium on Nanobiotechnology 2017, Feb. 27, 2017, Kawasaki City Industrial Promotion Hall, Kanagawa (Japan)

4. (招待講演) 安楽泰孝、生体内で機能する酵素封入ナノリアクターの構築～クスリを「つくる」、有害物質を「こわす」～、第32回日本 DDS 学会学術集会、静岡コンベンションセンター(静岡県・静岡市)、2016年6月30日

〔図書〕(計1件)

1. 安楽泰孝、片岡一則、CSJ Current Review 26、分子マシンの科学-分子の動きとその機能を見る、公益財団法人日本化学会、171-177 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：ポリイオンコンプレックス型ポリマーソームを用いたナノリアクターとその製造方法

発明者：安楽泰孝、片岡一則、末吉大輝

権利者：国立大学法人東京大学

種類：特許

番号：PCT/JP2016/063684

出願年月日：2016年5月6日

国内外の別：国内、国外

〔その他〕

ホームページ

東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻カブラル研究室

<http://www.bmc.t.u-tokyo.ac.jp>

報道関連

1. 2016年8月13日 発刊、日経新聞、「がん治療薬、体内で生成」

2. 2015年11月15日放送、TBS「未来の起源」

3. 2015年8月19日発刊、日経産業新聞、「カプセル応用 産学連携」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安楽 泰孝 (ANRAKU, Yasutaka)

東京大学・大学院工学系研究科・助教

研究者番号：60581585