

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08189

研究課題名(和文)LBLナノカプセルによる人工膵臓システムの開発

研究課題名(英文)Development of artificial pancreas system by LBL nanocapsule

研究代表者

佐藤 勝彦 (Sato, Katsuhiko)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80400266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：過酸化水素に応答して分化するナノ薄膜を、ボロン酸エステル結合に基づいて調製した。これらの薄膜は、生理条件下の水溶液中で調製することが可能であり、薄膜中のボロン酸エステル結合はH₂O₂の酸化反応によって開裂されるため容易に分解した。さらに、グルコースオキシダーゼはグルコースの酸化を触媒してH₂O₂を生成するので、この酵素を組み込んだ薄膜はグルコースの存在下で分解した。炭酸カルシウム微粒子の表面を、この薄膜で被覆しインスリンを吸着させた。これらの粒子は上記のメカニズムにより生理的条件下で10mMグルコース添加によってインスリンを放出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インスリン放出システムの設計は現時点での最先端の課題であり、世界中の研究者が競っている。これまで、フェニルボロン酸を用いたものが有用であるとされていたがグルコースとの競合反応では十分な応答性が得られなかった。対して、本申請の先行研究では、酵素反応により生成されるH₂O₂とPBAの反応を利用したものであり、グルコースに対して鋭敏に反応することが示された。本研究により作製されるインスリン含有ナノカプセルが臨床的に期待される性能を達成できるならば皮下留置型製剤として非侵襲的な人工膵臓システムが実現され、患者のQOLが向上する。

研究成果の概要(英文)：Hydrogen peroxide (H₂O₂)-sensitive layer-by-layer films were prepared based on combining phenyl boronic acid (PBA)-modified polymers with diol-modified polymers through boronate ester bonds. These multilayer films could be prepared in aqueous solutions at pH 7.4 in the presence of 150 mM NaCl. These films readily decomposed in the presence of H₂O₂ because the boronate ester bonds were cleaved by an oxidation reaction. In addition, multilayer films combined with glucose oxidase (GOx) were decomposed in the presence of glucose because GOx catalyzes the oxidation of D-glucose to generate H₂O₂. The surfaces of CaCO₃ microparticles were coated with this multilayer films that absorbed insulin. These particles released up to insulin in the presence 10 mM glucose under physiological conditions by the above mechanism.

研究分野：高分子化学

キーワード：機能性薄膜 機能性高分子 フェニルボロン酸 過酸化水素 インスリン ドラックデリバリーシステム

1. 研究開始当初の背景

国内の糖尿病人口は 1000 万人を越えるとされており、効果的な薬物治療は重要な課題である。現在は治療薬としてインスリンが用いられるが、日常的に患者自身で頻繁に注射剤として投与する必要があり、患者の QOL を向上させるためにインスリンの投与方法の改善が強く望まれている。しかし、注射剤以外のインスリン製剤の実現には、酵素による分解の抑制や吸収の促進など解決すべき課題が多く残っている。このような要求から、皮下留置型製剤としてブドウ糖の濃度が上昇したときにだけインスリンを放出する「人工膵臓」の開発が行われているがいまだ実用に達していない。

このような理由により、これまでグルコースに応答する薄膜、微粒子、ゲル、マイクロカプセル、などが国内外で検討されてきた。グルコースを特異的に認識する応答素子としては酵素、レクチン、およびフェニルボロン酸 (PBA) などが用いられている。特に低分子化合物である PBA は安定であり分子デザインが容易であることから広く研究が行われている。PBA はジオール構造と可逆的に結合する性質をもつことから、PBA を利用したインスリンの放出システムではグルコースと競合反応を利用している (図 1 左)。しかし、生理条件下においてグルコースと PBA の親和性は小さく十分な競合反応が進行しないために、現状ではある程度のグルコース応答を示すものの実用レベルには至っていない。申請者らも、薄膜、微粒子、カプセル等を担体としたインスリンの放出デバイスについて検討し、グルコースに応答する系も開発してきたが、性能をさらに向上させる必要がある。

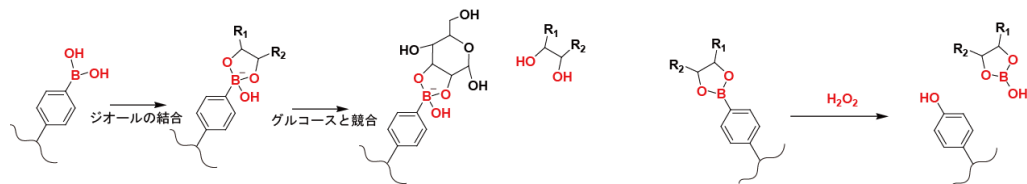


図 1 PBA とグルコースの競合反応と H_2O_2 の化学反応

2. 研究の目的

申請者はこれまで PBA が過酸化水素 (H_2O_2) によって酸化分解される反応に着目した新規のインスリン放出システムの開発を目的に研究を行ってきた (図 1 右)。この反応は生理条件下で速やかに進行し低濃度の H_2O_2 に対しても鋭敏に応答する。また、酵素反応と組み合わせることで生理条件下において糖尿病を示す血糖値 ($\sim 200 \text{ mg/dL}$) に対して特異的に分解するナノ薄膜の開発に成功している (図 2)。これは従来報告されているグルコース応答薄膜に比べてはるかに高性能であった。そこで、この研究では、この薄膜によりナノカプセルを作製し、インスリンドラッグデリバリーシステムに適用すること、および医療用デバイスと組み合わせた人工膵臓用材料へと発展させることを目的に研究を行った。

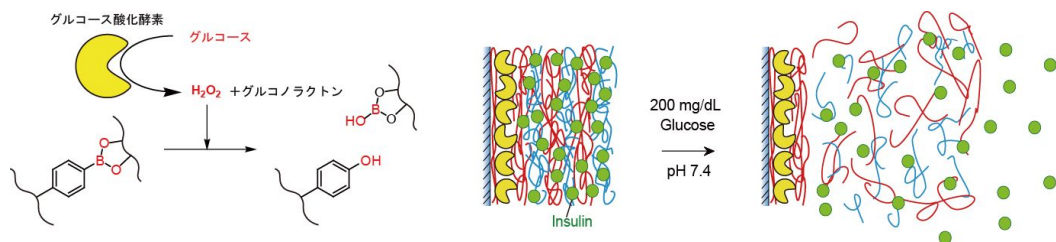


図 2 PBA と H_2O_2 の化学反応を利用したグルコース応答機構とナノ薄膜

3. 研究の方法

本研究では、これまで注目されてこなかった PBA と H_2O_2 の反応を利用して、グルコース濃度が 200 mg/dL 程度で自発的にインスリンを放出するナノ薄膜の性能を向上させ、この薄膜により微粒子およびナノカプセルを作製することを試みた。ナノ薄膜およびナノカプセルの作製には交互累積膜法を用い、以下の項目について研究を行った。

(1) 種々の PBA 誘導体と H_2O_2 の反応の化学量論的解析

予備的研究において PBA 分子内の置換基効果により分解速度に差異が生じることが分かっていた。また、ナノ膜形成の駆動力となる PBA とジオール誘導体とのエステル結合の強さ

も膜分解速度に大きく影響することが推測された。そこで、PBA やポリマーの化学構造を詳細に検討し H_2O_2 に対する応答の速度論的な解析を行った。

(2) 酵素およびインスリン固定化法の検討

酵素およびインスリンを効果的に固定化する方法を検討した。インスリンはタンパク質であるため、包括固定法、静電的相互作用による固定、および強固な結合を形成する PBA-ジオール誘導体を合成し単一のエステル結合での固定を試みた。膜中での部位および存在量について調査を行った。

(3) ナノカプセルのおよびナノ粒子の作製

(2) で得られた結果をもとに、インスリン放出微粒子およびナノカプセルを作製した。薄膜およびカプセルの調製には交互累積膜法を用いた。この方法は、相互に結合するポリマーを交互に被覆することで調製し、膜厚や膜透過性および機能性分子の量などを任意に操作することが可能である。種々の高分子材料を新たに合成しグルコース応答やインスリン放出の最適化を行った。

(4) インスリンドラッグデリバリーシステムのためナノポアピペットへの修飾

医療用デバイスの施策として、先に検討したインスリン放出ナノ薄膜を先端孔が数百ナノメートルサイズのピペット先端に対して被覆操作を行った。ピペット先端へのナノ薄膜の被覆および H_2O_2 応答はイオン電流変化より観察した。

4. 研究成果

(1) フェニルボロン酸ペンダント-デンドリマーの検討

先行研究において PBA を修飾するポリマーとして直鎖構造のポリアリルアミン (PAH) を用いてきたがグルコースに対する応答性を制御しにくいという問題があった。そこで、PAH に代わり新たにポリアミドアミンデンドリマー (PAMAM) について調査した。PAMAM は構造制御された球状高分子であり近年ドラッグキャリアーとして注目されている。この球状構造を利用することで直鎖構造の PAMAM を用いた場合に比べて応答性の向上がナノ薄膜の構造制御が期待できた。はじめに PBA-PAMAM と、ポリビニルアルコール (PVA) との間に形成されるボロン酸結合に基づいてナノ薄膜を作製し、この薄膜の H_2O_2 応答を検討した (図 3)。

末端アミノ基に対して 15%程度 PBA が修飾された PAMAM(G4)において良好なナノ薄膜の調製が確認できた。一方、修飾率が低い場合、および極端に高い場合では PBA と PVA との結合形成が阻害されるためナノ薄膜を得ることはできなかった。また、酸性条件での製膜操作を行った場合も安定な薄膜は形成されなかった。このナノ薄膜は数ミリモル以下の H_2O_2 に対しても分解応答がみられバルク溶液への PAMAM の放出を確認した。これは、 H_2O_2 により PBA 分子のホウ素 - 炭素結合が切断されるため薄膜形成の駆動力が消失するためである。次に、グルコースオキシダーゼ (GO_x) を膜内に組み込むことにより酵素反応を利用することでグルコース刺激により分解することを確認した。 GO_x は下記の反応を触媒する酵素であり、グルコースから H_2O_2 を生成する。



PAMAM は薬物キャリアーとして注目されており、この PBA-PAMAM からなるナノ薄膜インスリンドラッグデリバリーシステム以外にも、他の薬物送達システムへの応用が期待できる。

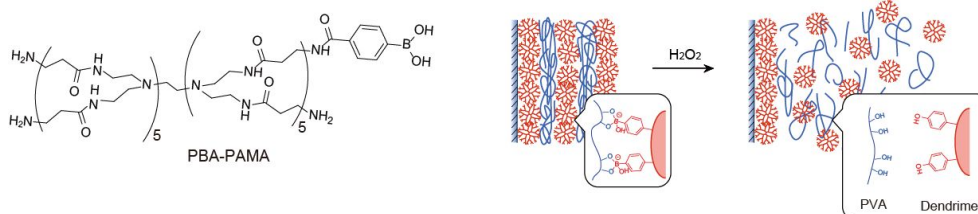


図 3 PBA-PAMAM を用いたナノ薄膜

(2) フェニルボロン酸ペンダント-ポリアクリルアミドの検討

これまでの PBA を用いた機能性材料は、ジオール構造との間に可逆的に形成するボロン酸エステル結合を利用してきた。しかし、これらのシステムではボロン酸部位を有するポリマーとともにジオール構造を有する高分子、例えば PVA やアルギン酸が必要となる。このため、ナノ薄膜を作製できる材料に制限があった。そこで、PBA の負電荷を利用しポリカチオンとの静電的相互作用を駆動力としたナノ薄膜の調製を試みた。上記の目的のため、*N*-3-アクリルアミド

フェニルボロン酸とアクリルアミドを重合することで、PBA 由来の負電荷以外を持たないコポリマー (PBA-PAA) を合成した。この PBA-PAA と種々の構造の異なるポリカチオン (PAH、PEI、PDDA、PAMAM) を用いてナノ薄膜の作製を試みたところ、調製時の pH、イオン強度、PBA の含有率により製膜特性が異なった。また、このナノ薄膜はエステル結合から形成された薄膜と同様に、pH、糖類、 H_2O_2 に対する応答性を持つことが示された。これらの処理によってナノ薄膜内の電荷のバランスが崩れる、もしくは H_2O_2 によりボロン酸の B-C 結合が分解するためである。これまで、ボロン酸とジオール構造をもつ高分子からなるナノ薄膜が多数開発されてきたが、このような機構でも同様の機能性を有することが明らかとなり、さらなる機能性薄膜の開発に役立つと考えられる。

(3) インスリン放出ナノ粒子の作製

インスリンは糖尿病の治療薬として用いられているタンパク質である。糖尿病患者の QOL を向上させるために、新たな投薬経路の開発や、インスリンの放出制御のための薄膜やマイクロカプセルの研究が世界中で行われてきた。しかし、直鎖のポリカチオンである PAH に PBA を修飾したポリマーと PVA の組み合わせで微粒子上へ製膜操作をおこなうと粒子同士が凝集してしまい被覆することができなかった。そこで、(1)(2)の材料について検討した。球状分子の PAMAM は PVA との相互作用の制御が容易であること、過剰な電荷を持たない PBA-PAA は、静電的相互作用の影響が小さいと考えた。しかし、種々条件検討を行っても微粒粒子状への被覆は成功しなかった。これらの結果から、積層操作中に微粒子の凝集を抑えるために材料として用いる 2 種の高分子間の同符号の電荷の反発が有用であることが明らかになった。

そこで、ポリカチオンである PAH にそれぞれフェニルボロン酸 (PBA-PAH) およびジオール構造を有するシキミ酸 (SA-PAH) を修飾したポリマーを合成し検討を行った。その結果、PAH 間の電荷の反発により粒子同士の凝集が抑制され、PAH と SA のエステル結合を駆動力として炭酸カルシウム微粒子上にナノ薄膜の被覆に成功した。また、これらのポリマーと GOx から構成されるナノ薄膜をインスリンとともに微粒粒子状に 5 層被覆させることで、生理条件下において数 mM のグルコースに反応する微粒子の開発に成功した (図 4)。さらに負電荷を有するインスリンを静電的相互作用によってナノ薄膜中に固定することで、ナノ薄膜の分解反応に伴うインスリンの放出が確認できた。この機構はこれまでのグルコースの競合作用を利用したものに比べて鋭敏な反応であり、生理条件下におけるグルコース刺激におけるインスリンの放出が達成できた。

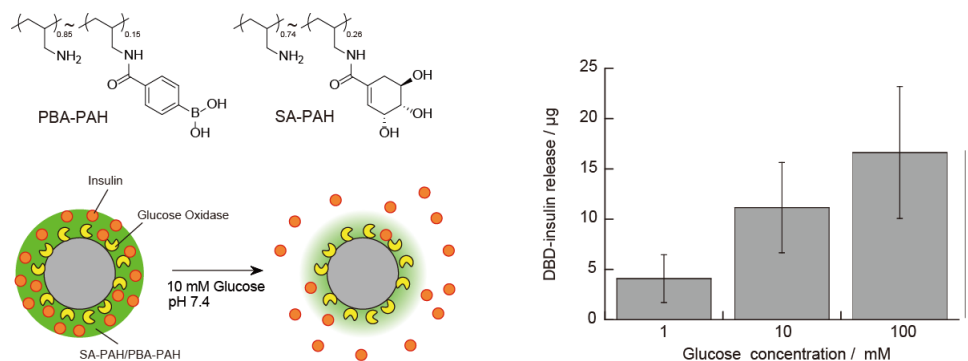


図 4 インスリン放出粒子とインスリン放出量

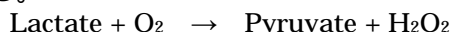
(4) ナノピペットへの交互累積膜の修飾

本研究では、これまでの成果を踏まえて、先端径がナノメートルサイズのナノポアピペットの先端に種々のインスリン放出ナノ薄膜の被覆操作を行った。ナノ薄膜の被覆およびインスリンの放出は、イオン電流変化を指標とした。イオン電流計測原理は以下の通りである。水溶液中に 2 本の金属線 (Ag/Ag/Cl) を浸して電位を印加すると、電位差に応じたイオンの移動が起こる (イオン電流が流れる)。このとき、片方の金属線をナノメートルサイズの空孔をもつピペット中に挿入しておくことイオンの移動が阻害され整流作用を受ける。この整流作用はピペット先端の状態に大きく依存するため、ピペット先端のナノ薄膜の状態を反映し過酸化水素およびグルコース応答を確認することが可能である。このナノピペットの先端にポリマーの被覆操作を行うことでイオン電流値の変化を確認することができた。また、この変化は pH により影響を受けたことから、上記のポリマーが被覆されていることが明らかになった。残念ながらインスリンの吸着および放出をイオン電流から確認することはできず今後の検討課題である。

(5) 乳酸およびクレアチニン刺激応答薄膜への応用

この研究では上記のポリマー材料に GOx にかわり、乳酸オキシダーゼ (LOx) を組み合わせる

ことで、乳酸分子に反応して分解するナノ薄膜の作製を試みた。乳酸は腫瘍組織内に 4 mM から 40 mM の濃度で含まれる一方、正常組織内には 1.8 mM から 2 mM しか存在しないため、高濃度の乳酸に反応する薄膜はがん治療薬の DDS に利用できると考えた。LOx は以下のような反応を触媒する酵素である。



すでに、乳酸反応粒子は報告されているが、これらの粒子の分解機構は、グルコースと同様に添加された乳酸によるボロン酸エステル結合の競合反応を利用している。しかし、ボロン酸と乳酸の親和性は非常に弱いため DDS のための現実的な濃度での反応は見られない。一方で、 H_2O_2 によるボロン酸の酸化反応は鋭敏に進行するため上記の濃度での反応が達成できることが期待できた。実際に、LOx を含有する PBA-PAH/PVA 交互累積膜の作製、および数ミリモルの乳酸に対する反応について水晶振動子マイクロバランス (QCM) による共振周波数変化の測定、原子間力顕微鏡 (AFM) による膜厚の観察、および紫外可視吸収スペクトル測定によって確認することができた (図 5)。このようにして作製した交互累積膜はがんに対する DDS として利用できると考えられる。

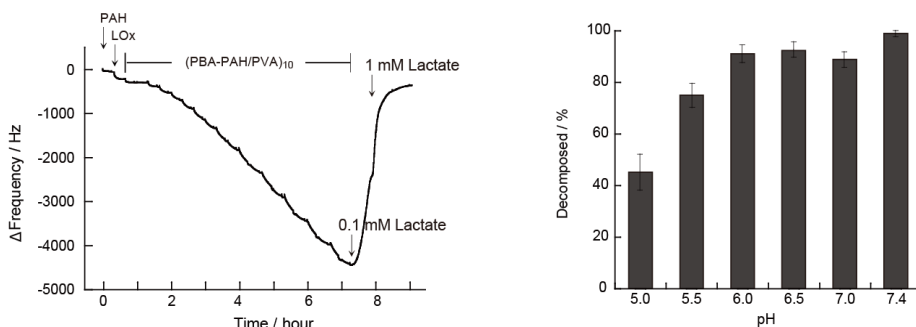


図 5 乳酸反応薄膜の分解反応

同様にクレアチニンにより分解するナノ薄膜について検討した。クレアチニンはクレアチンアミドヒドロラーゼ (CA)、クレアチンアミジノヒドロラーゼ (CI)、およびサルコシンオキシダーゼ (SO) の 3 種の酵素による連続反応を受けて代謝され、最終的に H_2O_2 を生成する。この 3 種の酵素を用いた H_2O_2 検出型のクレアチニン反応性センサーは既に開発されておりナノ薄膜の分解が予想されるが、最適な反応を得るための膜中の各酵素の固定化量を制御する必要がある。一方、交互累積膜法は、物質ごとの積層数を変えることで各物質の吸着量比率を変えられることから、複数の酵素によって基質を段階的に代謝する反応を効果的に利用できる。律速酵素によって膜分解が抑制されるような場合に、律速酵素の積層数を増やすことで膜分解を促進できる。その QCM 測定の結果、各酵素 1 層ではクレアチニンに反応、分解しなかったが、CI の積層数を増やし 3 層とすることで良好な反応が得られた。この酵素反応においては CI が律速酵素であると考えられた。また、紫外可視吸収スペクトルでも膜の調製および反応を確認できた。本研究では、 H_2O_2 を生成する GOx 以外の酵素を含有する基質反応性膜の作製と、酵素ごとの反応性の調節が可能であることが示唆された。今後は他の基質に反応して分解する交ナノ薄膜の検討や、粒子上に製膜することでのナノカプセルへの応用が課題である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

Preparation of hydrogen peroxide sensitive nanofilms by a layer-by-layer technique, Kentaro Yoshida, Tetsuya Ono, Takenori Dairaku, Yoshitomo Kashiwagi, Katsuhiko Sato, *Nanomaterials*, 2018, 8, 941-951. [査読有] DOI:10.3390/nano8110941

Preparation of microparticles capable of glucose-induced insulin release under physiological conditions, Kentaro Yoshida, Kazuma Awaji, Seira Shimizu, Miku Iwasaki, Yuki Oide, Megumi Ito, Takenori Dairaku, Tetsuya Ono, Yoshitomo Kashiwagi, Katsuhiko Sato, *Polymers*, 2018, 10, 1164-1178. [査読有] DOI:10.3390/polym10101164.

Preparation of Nafion/Polycation Layer-by-Layer Films for Adsorption and Release of Insulin, Kentaro Yoshida, Katsuhiko Sato, Tetsuya Ono, Takenori Dairaku, Yoshitomo Kashiwagi, *Polymers*, 10, 812-821 (2018). [査読有] DOI: 10.3390/polym10080812

Preparation of multilayer films using the negative charge of phenylboronic acid and its response to pH change, fructose, and hydrogen peroxide, Yuki Oide, Miku Iwasaki, Kentaro Yoshida, Katsuhiko Sato, *Colloid and Polymer Science*, 296(9), 1573-1580

(2018). [査読有] DOI: 10.1007/s00396-018-4380-1

Lactate-induced decomposition of layer-by-layer films composed of phenylboronic acid-modified poly(allylamine) and poly(vinyl alcohol) under extracellular tumor conditions, Katsuhiko Sato, Seira Shimizu, Kazuma Awaji, Oto Hitomi, Jun-ichi Anzai, Journal of Colloid and Interface Science, 510, 302-307 (2018). [査読有] DOI: 10.1016/j.jcis.2017.09.075

Preparation of a PVA/PBA dispersion and its response to glucose, fructose and hydrogen peroxide, Katsuhiko Sato, Miku Iwasaki, Yuki Oide, Jun-ichi Anzai, Colloid and Polymer Science, 295, 1521–1525 (2017). [査読有] DOI: 10.1007/s00396-017-4135-4

Preparation of H₂O₂-induced poly(amidoamine) dendrimer release multilayer films, Katsuhiko Sato, Kazuma Awaji, Megumi Ito, Jun-ichi Anzai, Colloid and Polymer Science, 295, 877–882, (2017). [査読有] DOI: 10.1007/s00396-017-4073-1

[学会発表](計 8件)

フェニルボロン酸修飾 dendrimer 累積膜を用いる自立累積膜の調製, 佐藤史也, 佐藤勝彦, 安斉順一, 第 57 回日本薬学会東北支部大会, 2018 年 10 月 20 日, 仙台.

グルコース応答性インスリン含有交互累積膜に関する研究, 伊藤愛望, 佐藤勝彦, 安斉順一, みちのく分析科学シンポジウム 2016, 2016 年 10 月 22 日, 仙台.

酵素反応を利用した乳酸またはクレアチニン分解膜の開発, 清水星来, 佐藤勝彦, 安斉順一, みちのく分析科学シンポジウム 2016, 2016 年 10 月 22 日, 仙台.

フェニルボロン酸と酵素反応を利用した刺激応答薄膜の開発, 佐藤勝彦, 大出侑季, 岩崎未来, 安斉順一, 日本分析化学第 65 年会, 2016 年 9 月 16 日, 札幌.

H₂O₂ およびグルコース分解ナノ薄膜の開発, 佐藤勝彦, 阿部瑛一, 安斉順一, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年 9 月 11 日, 福岡.

フェニルボロン酸の酸化反応を利用した H₂O₂ 応答薄膜の開発, 阿部瑛一, 佐藤勝彦, 安斉順一, 第 54 回日本薬学会東北支部大会, 2015 年 9 月 26 日, 盛岡.

インスリン放出交互累積膜の開発, 伊藤愛望, 佐藤勝彦, 安斉順一, 第 54 回日本薬学会東北支部大会, 2015 年 9 月 26 日, 盛岡, 口頭発表

フェニルボロン酸修飾ポリマーを用いた H₂O₂ 応答薄膜の調製, 淡路一真, 伊藤愛望, 佐藤勝彦, 安斉順一, 第 54 回日本薬学会東北支部大会, 2015 年 9 月 26 日, 盛岡.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。