

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710089

研究課題名（和文） 新規会合性因子を用いたナノゲルの設計、合成、特性評価

研究課題名（英文） Design of ion complex nanogels

研究代表者

澤田 晋一（SAWADA SHINICHI）

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号：50444104

研究成果の概要：

本研究では、ナノサイズのゲル微粒子（ナノゲル）形成因子としてイオン性相互作用を用いることで、動的に構造制御することができる新規高分子ナノ組織体を創製することを目的とした。会合性高分子としてイオン性分子を置換した水溶性多糖の設計を行い、合成手法を確立することが出来た。合成したカチオン性分子置換多糖およびアニオン性分子置換多糖水溶液を混合したところ、比較的単分散なナノサイズの微粒子（ナノゲル）を形成することが明らかとなり、イオン性相互作用を会合因子とした新規ナノゲルの開発に成功した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ化学，ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：ナノゲル・多糖・イオン性相互作用・動的な高分子ナノ組織体・イオンコンプレックス

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな分野においてポリマーゲルが幅広く利用されており、その中でもナノオーダーでサイズを制御された微粒子でありゲルの特性も合わせもつナノゲル微粒子は、医療や生命科学分野での利用が期待されている。しかしながら、ナノサイズのゲル微粒子においてゲルの構造・機能を自在に制御する研究、開発は困難なのが現状である。

我々は、会合性高分子の自己組織化を利用することで、タンパク質と相互作用しえるナノ空間を有する両親媒性のナノサイズのゲル（ナノゲル）を構築（自己組織化ナノゲル法）できることを明らかとしてきている（Nishikawa, T. et al., J. Am. Chem. Soc., 118, 6110, 1996；Nishikawa, T. et al., Macromolecules, 27, 7654, 1994）。生体系におけるタンパク質と同様に、高分子の会合

性因子として“のり”の役割を果たすコレステロール等の疎水性分子を水溶性高分子である多糖（プルラン）にわずかに導入した疎水化多糖は、水中で自己組織的に会合し、疎水基を架橋点としたヒドロゲル構造を有するナノサイズ（20～30 nm）の微粒子（ナノゲル）を形成することを見いだした（Akiyoshi, K. et al., *Macromolecules*, 30, 857, 1997）。このナノ微粒子は、疎水基の種類や導入率により、粒子サイズ、密度、等の特性を制御し得ることも明らかにしている。また、ナノゲル中の疎水性基と包接錯体を形成するシクロデキストリン（CD）によりナノゲルの構造を動的に制御する方法を開発している。この疎水化多糖ナノゲルはタンパク質と相互作用することが明らかとなっており、タンパク質のフォールディングを助ける人工分子シャペロンとして機能することも報告されている（Akiyoshi, K. et al., *Bioconjugate Chem.*, 10, 321, 1999；Nomura, Y. et al., *FEBS Lett.*, 553, 271, 2003）。さらには、ナノゲルはその内部に様々な物質を取り込めることから薬物運搬体として医療分野への応用も期待されている（X-G, Gu. Et al., *Cancer Research*, 58, 3385, 1998）。

本研究では、ナノゲルにおける会合性因子である疎水性相互作用に替わる、新たな自己会合、構造体形成の駆動力としてイオン性相互作用を利用することを考えた。このような新規会合性因子を利用することで、pH・イオン強度などの外部刺激に応答して動的に構造変換しえる新しい動的な高分子ナノ組織体を創製することを目的とした。また、前述した疎水化多糖のような疎水性相互作用を駆動力としたナノゲルでは困難であった、pH・イオン強度などの外部刺激によって構造を制御することが可能なナノゲルの開発はバイオテクノロジー分野のみならず医療分野等への展開も期待される。

2. 研究の目的

水溶性高分子である多糖（プルラン等）に、会合性因子としてイオン性（カチオン性またはアニオン性）分子を導入したイオン性分子置換多糖類を設計、合成する。合成条件を詳細に検討し、会合性因子の導入量を精密に制御し得る手法を確立する。合成したイオン性分子置換多糖類においては、水溶液中におけるイオンコンプレックス形成とそれともなう会合挙動について検討し、イオン性分子の種類や導入率、pH、イオン強度等の溶液環境が会合体形成に与える影響について解明する。また、イオン性分子置換多糖会合体の会合挙動を外部環境の変化とともに詳細に検討することで、外部からの刺激により会合挙動を動的に制御しえるかを明らかにする。さらには、これらの研究をもとにイオン性分

子置換多糖類会合体による新規人工分子シャペロンシステム、ドラッグデリバリーシステムへの応用を検討する。

3. 研究の方法

(1) イオン性オリゴペプチド置換多糖類の合成および構造解析、基礎特性の評価

①カチオン性およびアニオン性オリゴペプチドの合成

イオンコンプレックス形成分子として、アミノ酸の一つであるリシン（カチオン性）およびグルタミン酸（アニオン性）を選択した。各アミノ酸が4分子結合した末端プロモ化オリゴペプチドを固相合成法により合成した。得られたプロモ化オリゴペプチドをアジ化ナトリウムによりアジド化した後、逆相クロマトグラフィーにより精製し、末端アジド化オリゴペプチドを得た。得られたオリゴペプチドの構造を核磁気共鳴装置（¹H-NMR）、フーリエ変換赤外分光光度計（FT-IR）および質量分析計（MS-ESI）により解析した。

②プロパギル基置換プルランの合成と構造解析

水溶性高分子として多糖類の一つであるプルラン（Mw=100000）を用いた。DMSOに溶解させたプルランとプロパギルアミンをN,N'-Carbonyl-diimidazole (CDI) 活性化法により縮合させプロパギル基置換プルランを合成した。得られたプロパギル基置換プルランの構造を¹H-NMR、FT-IRにより解析した。

③クリック反応によるカチオン性およびアニオン性オリゴペプチド置換プルランの合成と構造解析

末端アジド化オリゴリジンおよびオリゴグルタミン酸ペプチドとプロパギル基置換プルランを水に溶解させ、L-アスコルビン酸ナトリウムおよびCuSO₄・5H₂Oを触媒としてクリック反応によりイオン性オリゴペプチド置換プルランを合成した（図1, 2）。

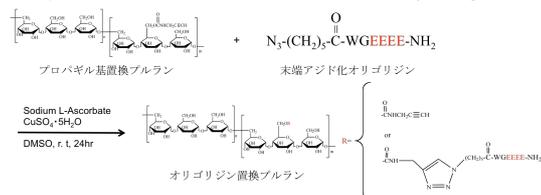


図1 オリゴリジン置換プルランの合成スキーム

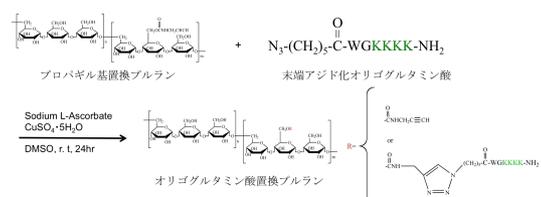


図2 オリゴグルタミン酸置換プルランの合成スキーム
得られたイオン性オリゴペプチド置換プルランの構造解析を¹H-NMR、FT-IRを用いて行い、各イオン性分子の導入率を¹H-NMRおよび紫外可視分光光度計（UV-VIS）解析結果より

算出した。

④イオン性オリゴペプチド置換プルランの特性解析

オリゴリジン（カチオン性）およびオリゴグルタミン酸（アニオン性）置換プルランを超純水に溶解させた後、オリゴペプチドのイオンコンプレックス形成による会合体の形成を動的光散乱 (DLS) 測定により評価した。また、NaCl 水溶液中での会合体の形成を DLS 測定により検討し、溶媒のイオン強度による会合体形成挙動の変化についても評価を行った。

(2) 多価イオン性分子置換多糖類の合成および構造解析、基礎特性の評価

①多価イオン性分子置換プルランの合成と構造解析

多価カチオン性分子として N,N' -bis(3-aminopropyl)butane-1,4-diamine(spermine) を、多価アニオン性分子として Di-*t*-butyl-4-[2-(*t*-butoxycarbonyl)ethyl-4-isocyanato-1,7-heptanededicarboxylate(weisocyanate) を選択した。これらのイオン性分子を導入する水溶性高分子としてプルラン ($M_w=100000$) を用いた。プルランおよび spermine を反応溶媒である DMSO に溶解させた後、 N,N' -Carbonyl-diimidazole(CDI) を縮合剤として用い spermine 置換プルラン (Spermine-pullulan) を合成した (図 3)。また、dibutyltin dilaurate (DBTDL) を触媒として、weisocyanate 置換プルラン (We-pullulan) を合成し、weisocyanate の保護基をアルカリ加水分解により脱保護した (図 4)。得られた多価イオン性分子置換プルランの構造を $^1\text{H-NMR}$ 、FT-IR により解析した。

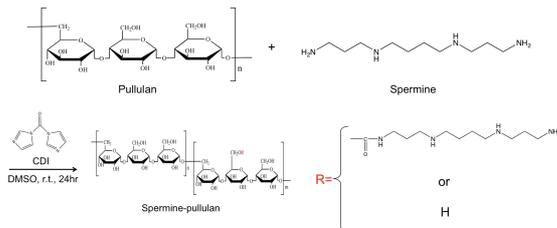


図 3 Spermine-pullulan の合成スキーム

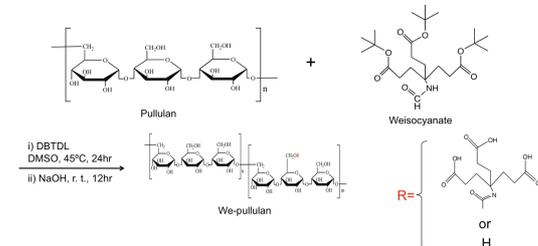


図 4 We-pullulan の合成スキーム

②多価イオン性分子置換プルランの特性解析

Spermine-pullulan (カチオン性) および We-pullulan (アニオン性) を超純水および

リン酸バッファー (pH7.0) に溶解させた後、多価イオン性分子のイオンコンプレックス形成による会合体の形成を DLS 測定により評価した。また、Spermine-pullulan および We-pullulan の混合時に多価イオン性分子のモル比を変化させた条件での会合体形成を DLS 測定で、会合体のゼータ電位をゼータ電位測定装置によって検討した。種々の濃度の NaCl 溶液中での会合体の形成を DLS 測定により検討し、溶媒のイオン強度による会合体形成挙動の変化についても評価を行った。さらには、pH 変化による会合挙動についても検討を行った。

4. 研究成果

(1) イオン性オリゴペプチド置換多糖類の合成および構造解析、基礎特性の評価

①クリック反応によるカチオン性およびアニオン性オリゴペプチド置換プルランの合成

末端アジド化オリゴリジンおよび末端アジド化オリゴグルタミン酸は固相合成法を用いることでオリゴペプチド中のリジンおよびグルタミン酸残基の数を容易に制御することが出来た。本研究ではリジンおよびグルタミン酸を 4 残基持つオリゴペプチドの合成を行った結果、エレクトロスプレイイオン化-質量分析法 (MS-ESI)、IR 測定により合成が確認された。また、それぞれのオリゴペプチドのアジド化を行った結果、 $^1\text{H-NMR}$ および FT-IR 測定よりアジド基の導入を確認できた。

クリック反応を利用してイオン性オリゴペプチドを水溶性多糖であるプルランに導入するため、プロパギル基置換プルランを合成した。その結果、 $^1\text{H-NMR}$ 測定より 100 単糖当り 15 個のプロパギル基が導入されたことが確認され、収率は 55% であった。

クリック反応を用いてプロパギル基置換プルランに末端アジド化オリゴペプチドを導入した結果、オリゴリジン置換プルラン (図 1) は $^1\text{H-NMR}$ 、UV 測定より 100 単糖当り 1 個のオリゴリジンを (図 5)、オリゴグルタ

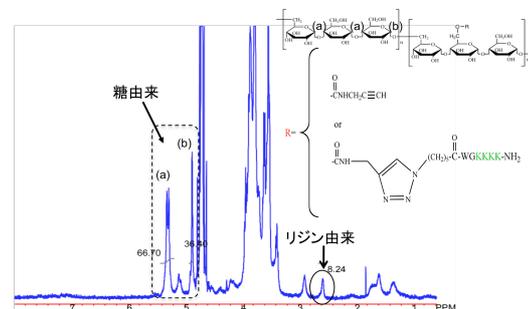


図 5 オリゴリジン置換プルランの $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

ミン酸置換プルラン (図 2) は 100 単糖あたり 6 個のオリゴグルタミン酸を導入することが出来た。これらの結果からクリック反応を

利用した水中などの穏和な条件における多糖へのペプチド導入方法の確立に成功した。
②イオン性オリゴペプチド置換プルランの特性解析

オリゴリジン置換プルランおよびオリゴグルタミン酸置換プルラン水溶液を混合した後、超音波照射を行い DLS 測定した結果、水中においてオリゴリジン置換プルランとオリゴグルタミン酸置換プルランはオリゴリジンとオリゴグルタミン酸のモル比が 1:6 の条件において粒径 114nm、多分散指数 (PDI) 0.24 の比較的単分散な微粒子を形成していることが明らかとなった。混合液はオリゴリジン置換プルラン水溶液およびオリゴグルタミン酸置換プルラン水溶液における粒径 (それぞれ 124nm、175nm) とは異なり、オリゴリジンおよびオリゴグルタミン酸分子間の相互作用により会合体が形成されていることが示唆された (図 6)。また、NaCl 水溶液 (50mM) を溶媒として用いたところ R_H は水中とほぼ同じ値となりイオン強度の高い条件 (~50mM) においても会合体は安定であることも明らかとなった。

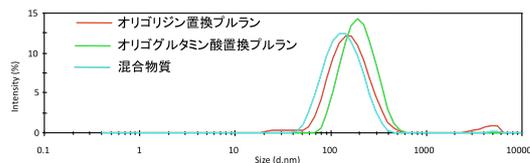


図 6 オリゴリジンおよびオリゴグルタミン酸置換プルラン混合液 (水溶液) の DLS 測定結果

(2) 多価イオン性分子置換多糖類の合成および構造解析、基礎特性の評価

①多価イオン性分子置換プルランの合成

DMSO を溶媒とし CDI を縮合剤として Spermine-pullulan を合成した結果、得られた合成物の $^1\text{H-NMR}$ 解析より 100 単糖あたり 6.2 個の spermine をプルランに導入することが出来、収率は 81%であった (図 7)。また、

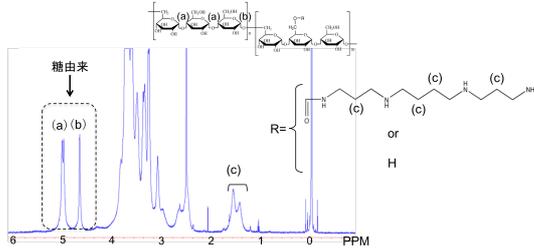


図 7 Spermine-pullulan の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

DBTDL を触媒として We-pullulan を合成した結果、100 単糖あたり約 6.6 個のが導入された事が確認された。アルカリ加水分解による行 weisocycabate からの脱保護の確認を $^1\text{H-NMR}$ 解析より行った結果、保護基由来のピークの消失を確認した。脱保護後の We-pullulan の収率は 44%であった (図 8)。

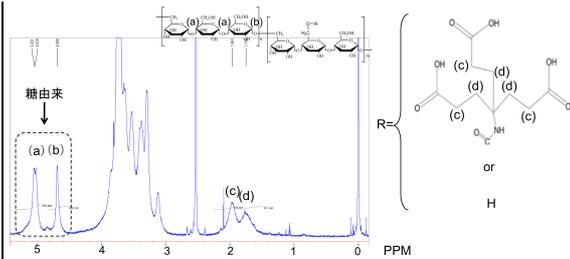


図 8 We-pullulan の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

②多価イオン性分子置換プルランの特性解析

DLS 測定結果より、それぞれの多価イオン性基が等 mol となる条件で混合した条件において、流体力学半径 (R_H) 31nm、多分散指数 (PDI) 0.22 の比較的単分散な微粒子が形成され (図 9)、ゼータ電位は -12 mV であった。

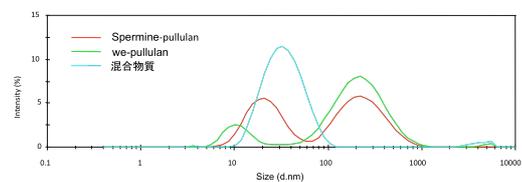


図 9 Spermine-pullulan および We-pullulan 混合液 (10 mM リン酸バッファー (pH 7)) の DLS 測定結果

Spermine-pullulan 水溶液および We-pullulan 水溶液における粒径はそれぞれ 41nm、96nm であり、混合液では多価カチオン性および多価アニオン性分子間の相互作用により会合体が形成されていることが明らかとなった (図 9)。

Ratio (spermine group : we group)	Z-Average (nm)	PdI	ζ potential (mV)
1 : 1	30.7 ± 0.2	0.22 ± 0.00	-11.8 ± 0.1
2 : 1	37.2 ± 0.2	0.27 ± 0.01	-2.3 ± 0.3
3 : 1	22.4 ± 0.2	0.16 ± 0.01	2.3 ± 0.4
4 : 1	34.5 ± 0.1	0.21 ± 0.01	2.8 ± 0.4

図 10 Spermine-pullulan および We-pullulan 混合液 (10 mM リン酸バッファー (pH 7)) の DLS およびゼータ電位測定結果

また、それぞれの多価イオン性基のモル比を変化させていく事で比較的単分散な粒径を保持したまま、カチオン性基およびアニオン性基のモル比に依存してゼータ電位が -12mV から 3mV へと変化していく事が明らかとなった (図 10)。

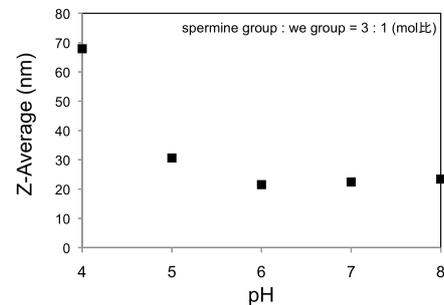


図 11 各 pH における会合体の DLS 測定

バッファーの pH を変化させ (pH4~8) DLS 測定を行った結果、pH6~8 の領域において粒径に変化は見られなかったが、pH 5 以下から徐々に粒径が大きくなり始め、pH 4 では粒径

が 70 nm (PdI 0.62) となった (図 11)。この結果より、Spermine-pullulan および We-pullulan からなる会合体は pH に応答して構造制御が可能である事が示された。

これまでに、ポリイオンコンプレックスによるマイクロ・ナノオーダーのミセルや微粒子の研究は数多く行われているが、ごくわずかなイオンコンプレックスを会合力としたゲル微粒子の調製に関してはほとんど行われていないことから、本研究のイオン性相互作用を会合力とした多糖会合体 (イオンコンプレックスナノゲル) は新規性と獨創性を有したマテリアルであるといえる。このイオン

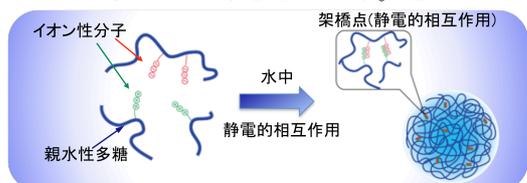


図 12 イオンコンプレックスナノゲルの模式図

コンプレックスナノゲルは、pH・イオン強度等に応答してその構造を変化させうることから、ナノ空間の動的、時間的制御を可能にする新規な会合性因子が必要不可欠であり、新規動的な高分子ナノ組織体においてこれらの会合体微粒子としてドラッグデリバリーシステムなど医療・バイオ分野への応用が期待できる。また、本研究結果から疎水性相互作用を会合力とした従来型ナノゲルに pH・イオン強度などの外部刺激応答性を付与すること可能となり複数の刺激に応答し得る複合機能型ナノゲルの創製にもつながるであろう。

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 0 件)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 澤田晋一, 菖蒲弘人, 長谷川麗, 秋吉一成. 多糖ナノゲルによる新規タンパク質・核酸デリバリーシステム. 第 23 回日本 DDS 学会, 熊本, 2007 年 6 月.
- ② 林純吾, 澤田晋一, 栗田公夫, 秋吉一成, ポリイオンコンプレックスナノゲルの設計, 日本化学会第 89 春季年会, 船橋, 2008 年 3 月
- ③ 林純吾, 澤田晋一, 栗田公夫, 秋吉一成, ポリイオンコンプレックスナノゲルの設計, 第 57 回高分子討論会, 大阪, 2008 年 9 月
- ④ 林純吾, 澤田晋一, 栗田公夫, 秋吉一成, イオンコンプレックスナノゲルの設計, 第 58 回高分子年次大会, 神戸, 2009 年 5 月

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 晋一 (SAWADA SHINICHI)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・助教

研究者番号 : 50444104

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :