

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20698

研究課題名（和文）骨疾患治療のための骨環境応答性ナノツールの開発

研究課題名（英文）Development of bone-responsive drug delivery system for the therapy of osteoporosis

研究代表者

福井 有香（Fukui, Yuuka）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・講師

研究者番号：50635836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：骨粗鬆症は、加齢とともに破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成のバランス（リモデリング）が崩れて、骨密度と骨質の低下が誘発される疾患である。そこで、本研究では、生体膜由来のカプセル素材であるリポソームをプラットフォームとして、骨環境に应答して、骨吸収と骨形成の同時コントロールを可能にするカプセル（骨環境応答性ナノツール）の開発に取り組んだ。（1）破骨細胞周辺の酸性環境に应答して、表面が骨結合性から細胞内移行性へと変化し、薬剤を放出するカプセルの作製に成功した。また、（2）骨形成素材であるリン酸カルシウム結晶を複合化したカプセルの作製を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨粗鬆症の治療薬の中でもビスホスホネート製剤が、最も多く使用されている。一方、骨と強固に結合し、長期に渡って骨組織に残留するため、骨代謝回転を過度に抑制して、骨強度の低下による骨折、顎骨壊死などの重篤な副作用を引き起こすといわれている。本方法は、カプセルの体内動態制御（骨標的指向性）に加えて、細胞内動態制御（破骨細胞内での薬剤放出）を実現することで、薬剤を破骨細胞にだけ作用させることが可能となり、副作用の低減が期待できる。さらに、カプセルを用いて骨形成素材をデリバリーし、骨形成を誘発することによって、骨粗鬆症の予防、進行の遅延、早期治療効果の発現が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the number of people who suffer from osteoporosis are increasing with the shift to an aging society and change in people's lifestyles. In this study, we developed therapeutic materials for osteoporosis. First, we produced a nanocapsule via deposition of biopolymers on the surface of liposome. The polymer wall was constructed with an inner layer with cell penetration activity and an outer layer with bone-targeting ability. The enzymatic degradation of the outer layer in response to the acidic environment provided by osteoclasts led to the surface display of inner layer. In addition, enzymatic degradation of the polymer wall facilitated the release of cargo. Therefore, it is expected that the nanocapsule will deliver drugs to osteoclasts to reduce bone resorption. Next, calcium phosphate, which is the main constituent of bone, was produced inside the liposome. We expect that delivery of nanosized calcium phosphate to bone tissue will promote the bone formation.

研究分野：高分子化学

キーワード：リポソーム ナノカプセル ドラッグデリバリーシステム 骨粗鬆症

## 1. 研究開始当初の背景

骨粗鬆症は、女性の閉経後に特有の疾患であり、また近年の高齢化社会への移行、生活習慣の変化などの影響により、国内で約 1300 万人が罹患していると言われている。骨欠損がある特定の大きさを超えると、骨損傷の自然治癒は不可能となるため、予防と早期治療が鍵となる。骨粗鬆症の治療薬の中でもビスホスホネート (BP) 製剤は、全ての骨粗鬆症 (原発性、続発性) に対して確実な骨折抑制効果を示すため、最も多く使用されている。BP 製剤は、破骨細胞内のシグナル伝達に作用し、アポトーシス誘導と破骨細胞の骨吸収能の直接的抑制により、骨吸収を強力に抑制する。一方、BP 製剤は骨と強固に結合し、長期に渡って骨組織に残留するため、骨代謝回転を過度に抑制して古い骨 (微小骨折) が蓄積してしまう。これが、骨質の低下を引き起こし、骨強度の低下による骨折、顎骨壊死などの重篤な副作用を引き起こすといわれている。したがって、効果的な BP 製剤の薬理効果の発現には、BP 製剤を破骨細胞にのみ作用させるドラッグデリバリーシステムの開発が強く望まれる。さらに、生体内では破骨細胞と骨芽細胞が連動して機能する (カップリング) ため、骨吸収の抑制と同時に骨形成も抑制されてしまう。したがって、従来の細胞に対する薬理作用以外の新たな治療戦略の開拓により、骨吸収抑制と骨形成促進を独立かつ同時にコントロールすることが重要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、骨粗鬆症に対する新たな治療戦略の開拓を目的として、骨環境に応答して、骨吸収と骨形成の同時コントロールを可能にするキャリア素材 (骨環境応答性ナノツール) の開発を試みた。具体的には、(1) 破骨細胞周辺において、薬剤を作用可能なカプセル (骨吸収抑制ツール) の作製と、(2) 骨の主無機成分であるリン酸カルシウム (CaP) 結晶の生成を促進するカプセル (骨形成促進ツール) の作製を試みた。これら両者をバランスよく作用させることで、骨疾患の予防・治療システムの開発を目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨吸収抑制ツールの作製

研究代表者は、リン脂質二重膜構造を有するナノカプセル (リポソーム) とポリマーを複合化することでカプセルの創出と機能発現に取り組んでいる。カプセル層を構築する方法として、高分子の薄膜作製技術である交互積層 (layer-by-layer, LbL) 法に着目し、リポソーム表面にバイオポリマーや無機物を交互積層化することで、膜安定性、物質保持能、刺激応答性、アフィニティの提示などの機能付与を行ってきた (高分子論文集, 74, 396-409 (2017))。本研究では、リポソームの表面に骨指向性を有するポリマーと細胞内移行性を有するポリマーの積層化を行った。破骨細胞周辺において、酵素分解により、ポリマーが剥離し、これらアフィニティ部位を提示することで、骨組織への集積化と破骨細胞内への移行が可能であると考えた。さらに、カプセル層の分解に伴う薬剤の放出を目指した。

#### カプセル層の分解に伴うアフィニティ部位の提示

骨結合部位として poly-L-glutamic acid ( $P_{Glu}$ ) と細胞内移行部位として polyarginine ( $P_{Arg}$ ) を選択し、リポソーム表面への提示を試みた。

まず、粒径が約 100 nm のカチオン性のリポソーム ( $Lipo(+)$ ) を作製し、その表面にアニオン性の  $P_{Glu}$  を吸着させた ( $Lipo(+)-P_{Glu}$ )。さらに、このカプセル表面にカチオン性の  $P_{Arg}$  とその分解酵素である trypsin ( $Try$ ) を吸着させた ( $Lipo(+)-P_{Glu}-Try/P_{Arg}$ )。

また、粒径が約 100 nm のアニオン性リポソーム ( $Lipo(-)$ ) を作製し、その表面に  $P_{Arg}$  の吸着を行った ( $Lipo(-)-P_{Arg}$ )。さらに、このカプセル表面に  $P_{Glu}$  とその分解酵素である pepsin ( $Pep$ ) を吸着させた ( $Lipo(-)-P_{Arg}-Pep/P_{Glu}$ )。

酵素によるカプセルウォールの分解性を評価するために、カプセル分散液を種々の pH や温度条件下において透析し、ポリペプチドの分解に伴うアミノ基の増加量を測定した。また、分解前後のカプセルについて、動的光散乱法 (DLS) による水中粒径測定、ゼータ電位測定および透過型電子顕微鏡 (TEM) による形状観察を行った。作製したカプセルの骨結合性を検討するために、骨のモデルであるハイドロキシアパタイト (HAp) 粉体にカプセルを加えてインキュベート (37°C, 24 時間) を行った。次に、HAp 粉体をリン酸緩衝液でリンスを行い、Nile Red によってカプセルを染色して蛍光顕微鏡観察を行った。

#### カプセル層の分解に伴う物質の放出制御

破骨細胞が形成するハウシップ窩の酸性環境に応答して、内封薬剤を放出するカプセル層の構築を行った。カプセル層の構成成分として、ハウシップ窩の pH 付近 (pH 4-5) に至適 pH を有するリゾチーム (Lyso) とその基質であるキトサン (CHI) を選択し、リポソーム表面に積層化を行った。

まず、カチオン性多糖である CHI に、骨指向部位としてリン酸基の導入を行った。これまでの研究において、リン酸基を表面に提示したナノカプセルが、骨モデルである HAp 粉体に集積

化することを確認している。メタンスルホン酸存在下で五酸化ニリンを反応させてリン酸化キトサンを合成した( $P_{CHI}$ )。この際、五酸化ニリンの濃度を变化させることで、リン酸化度の調節を行った。次に、Lipo(-)に、pH 3.0 において  $P_{CHI}$  の吸着を行った (Lipo(-)- $P_{CHI}$ )。  $P_{CHI}$  の吸着量は、アミノ基の定量法であるフルオレスカミン法を用いて測定した。次に、pH 7.4 において、Lipo(-)- $P_{CHI}$  の表面に Lyso の吸着を行った (Lipo(-)- $P_{CHI}$ -Lyso)。 Lyso の吸着量は蛍光ラベル化した Lyso によって定量した。次に、Lyso による  $P_{CHI}$  の分解性評価のため、Lipo(-)- $P_{CHI}$ -Lyso を pH 5.0 と pH 7.4 で 24 時間インキュベートした後、分解によって生じた  $P_{CHI}$  断片を回収し、その還元末端をフェリシアン化カリウムを用いて検出した。また、分解前後のカプセルについて、粒径測定、ゼータ電位測定、TEM による形状観察を行った。さらに、蛍光偏光消滅測定により脂質膜の流動性の評価を行った。次に、モデル薬物としてアニオン性の蛍光色素(Hydroxypyrene-3,6,8-trisulfonic acid (HPTS))を封入した Lipo(-)を  $P_{CHI}$  と Lyso で被覆し、種々の条件下で酵素分解を行い、その際の蛍光強度変化から放出性の検討を行った。

## (2) 骨形成促進ツールの作製

骨形成においては、ナノサイズの CaP が核となり、コラーゲンのようなバイオポリマーをテンプレートとして結晶成長が精密に制御されている。そこで、本研究では、リポソーム内に骨形成素材である CaP と結晶構造に対する調節物質を封入し、これらを骨組織にデリバリーするカプセル素材の作製を試みた。

### 骨形成促進ツールの作製に向けた基礎的検討

これまでに研究代表者は、リン酸基を有するナノカプセルが、CaP 結晶の成長を促進することを見出している (*Chemistry of Materials*, 23, 4701-4708 (2011))。本研究では、リン酸基を有するバイオポリマーとして、キトサンにリン酸基を導入した  $P_{CHI}$  とサケ白子由来デオキシリボ核酸 (DNA) を選択し、結晶生成への影響を検討した。

溶液中で、 $P_{CHI}$  または DNA の存在下において、 $CaCl_2$  水溶液とリン酸緩衝液 ( $NaH_2PO_4/Na_2HPO_4$ ) を混合し、種々の pH と温度条件下において、1 時間インキュベートすることで、CaP の析出を行った。遠心精製を行った後、凍結乾燥し、走査型電子顕微鏡(SEM)による形状観察と X 線回折 (XRD) により、結晶構造の解析を行った。

### 骨形成促進ツールの作製

骨組織に、CaP 結晶と結晶構造を調節する物質(結晶化調節剤)を運ぶナノツールの作製を行った。結晶化調節剤として DNA を選択し、リポソーム内部への封入を試みた。

まず、中性リン脂質を用いて脂質フィルムを作製し、DNA を溶かした溶液で水和することで、DNA 封入リポソームを作製した。DNA の封入を確認するために、界面活性剤を用いてリポソームの可溶化を行い、吸光度測定より、DNA の定量を行った。また、DNA の染色剤である Acridine orange を DNA 封入リポソームの分散液に添加して、蛍光顕微鏡による観察を行った。次に、このリポソーム分散液を  $Ca^{2+}$  含有水溶液と  $HPO_4^{2-}$  含有水溶液に対して交互に交換することで、リポソーム内部における CaP 形成を促した。Alizarin Red S により、CaP 部を染色し、光学顕微鏡 (OM) により観察を行った。塩酸処理により生成した CaP 部を溶解し、溶出した  $Ca^{2+}$  イオンと  $HPO_4^{2-}$  イオン濃度の定量を行った。さらに、TEM による形状観察と、電子線回折 (EDX) による元素分析を行った。

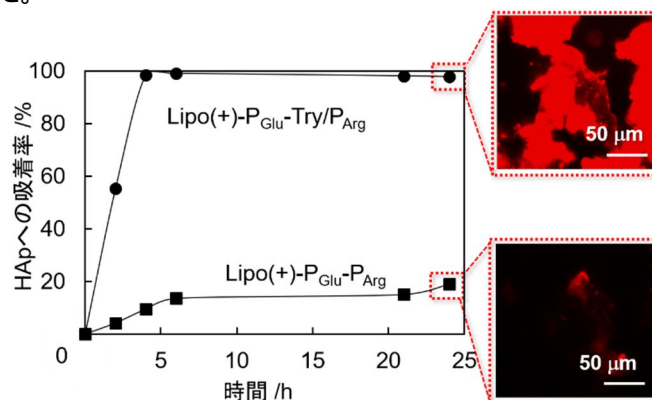


図 1 Lipo(+)- $P_{Glu}$ -Try/ $P_{Arg}$  と Lipo(+)- $P_{Glu}$ - $P_{Arg}$  の骨モデル (HAp) への吸着

## 4. 研究成果

### (1) 骨吸収抑制ツールの作製

#### カプセル層の分解に伴うアフィニティ部位の提示

まず、カプセル層の酵素分解により、骨結合性の  $P_{Glu}$  の表面提示を試みた。粒径約 100 nm のカチオン性のリポソーム(Lipo(+))に、アニオン性の  $P_{Glu}$  を吸着させると、表面電荷が正から負へと反転した (Lipo(+)- $P_{Glu}$ )。さらに、このカプセル表面に Try と  $P_{Arg}$  を順に吸着させると、表面電荷が正のカプセルが得られた (Lipo(+)- $P_{Glu}$ -Try/ $P_{Arg}$ )。このカプセルを 37°C で、種々の pH 条件下でインキュベートしたところ、pH 5.0 以上において時間依存的にアミノ基量が増大し、Try

の至適条件 (pH 10.0) において、最も高いアミノ基量が検出された。また、表面電荷が正から負へ反転したことから、酵素分解により断片化した  $P_{Arg}$  が剥離して、骨指向性を有する  $P_{Glu}$  からなる内層が表面に提示できたことが示唆された。

次に、カプセルの骨モデル (HAp) への付着性を調べたところ、分解酵素である Try を含まない  $Lipo(+)-P_{Glu}-P_{Arg}$  では、付着率が 20% であったが、 $Lipo(+)-P_{Glu}-Try/P_{Arg}$  ではすべてのカプセルが付着した結果となったことから、酵素分解によって  $P_{Glu}$  層が提示され、骨指向性が発現することが示唆された (図 1)。

次に、酵素分解により、カプセル表面が骨結合性から細胞内移行性へと変化するカプセル層の構築を試みた。粒径約 100 nm のアニオン性の  $Lipo(-)$  に  $P_{Arg}$  を吸着させると、表面電位が負から正へと反転した ( $Lipo(-)-P_{Arg}$ )。この  $Lipo(-)-P_{Arg}$  に pepsin と  $P_{Glu}$  を吸着させると、表面電位は負となった ( $Lipo(-)-P_{Arg}-Pep/P_{Glu}$ )。このカプセルについても、種々の条件下において酵素分解性を検討したところ、pH 5.0 以下において分解が促進し、Pep の至適条件 (pH 2.0) において、最も高い  $P_{Glu}$  層の分解性が見られた (図 2)。また、作製したカプセルについて、TEM 観察を行ったところ、カプセル層の分解後も球状を維持していたことがわかった。また、表面電位が負から正へと反転したことから、内相の  $P_{Arg}$  層が表面提示されたことがわかった。これまでの研究より、 $P_{Arg}$  を表面に有するナノカプセルが細胞内移行性を示すことを確認している (Langmuir, 27, 9576-9582 (2011))。以上より、作製したカプセルは、破骨細胞の形成するハウシッポ窩の pH 付近 (pH 4-5) において、カプセル層中に封入させた酵素の分解反応が促進し、カプセルの表面状態が骨結合性から細胞内移行性へと変換することがわかった。

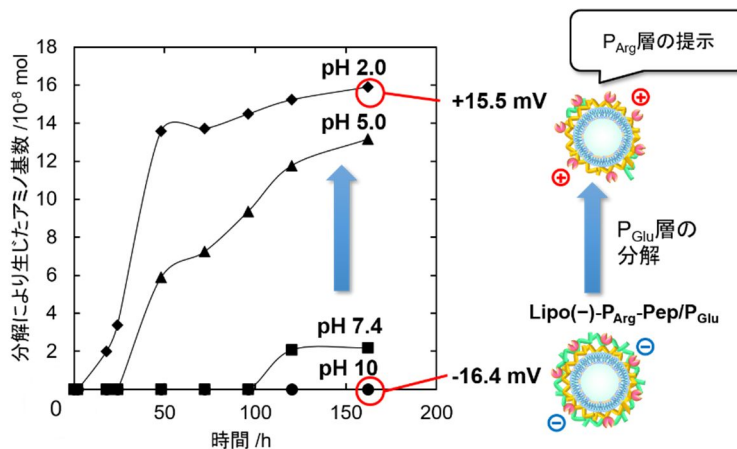


図 2 Lipo- $P_{Arg}$ -Pep/ $P_{Glu}$  の  $P_{Glu}$  層の分解による  $P_{Arg}$  層の表面提示

#### カプセル層の分解に伴う物質の放出制御

破骨細胞の形成するハウシッポ窩の酸性環境 (pH 4-5) に応答して、内封薬剤の放出が可能なカプセルの設計を行った。カプセル層として、pH 4-5 付近に至適 pH を有するリゾチーム (Lyso) とその基質である CHI を選択した。骨指向部位として骨結合能を有するリン酸基を CHI に導入し ( $P_{CHI}$ )、これを Lyso とともに粒径約 100 nm の  $Lipo(-)$  の表面に積層化させた ( $Lipo(-)-P_{CHI}-Lyso$ )。作製したカプセルについて、蛍光偏光消滅測定により脂質膜の流動性を評価した。結果として、 $Lipo(-)$  にポリマーを積層化することで膜の流動性は低下した。また、 $Lipo(-)-P_{CHI}-Lyso$  について、酵素分解を行ったところ、膜流動性の上昇が見られた。これは、酵素分解によってカプセル層が分解され、カプセル表面から剥離したためだと考えられる。

次に、モデル薬物の封入を行った後、カプセル層の酵素分解に伴う物質の放出について検討を行った。もとのリポソームの場合は外部にカプセル層がないため、物質の放出が見られた。一方、 $Lipo(-)-P_{CHI}$  ではカプセル層の存在により、放出が顕著に抑制されたが、 $Lipo(-)-P_{CHI}-Lyso$  では、リゾチームの至適 pH に近い条件で、 $P_{CHI}$  の分解と分解断片の剥離に伴って放出が促進されることを確認した。今後は、骨粗鬆症治療薬である BP 製剤について、カプセルからの放出と破骨細胞への薬効を評価する。

## (2) 骨形成促進ツールの作製

### 骨形成促進ツールの作製に向けた基礎的検討

溶液中で最安定相のヒドロキシアパタイト (HAp) が得られる条件 (pH 7.0, 37°C) において、CaP の生成を行ったところ、DNA 存在下では、HAp の結晶性が低下し、アモルファス成分が増大したことがわかった。また、 $P_{CHI}$  存在下では準安定相のブルシャイトが生成し、 $P_{CHI}$  のリン酸化度が高い場合にその傾向が強くなることを見出した。DNA あるいは  $P_{CHI}$  が、結晶面に吸着することで安定相への結晶転移を抑制したと考えている。CaP 結晶の中でも、アモルファス、ブルシャイトなどの準安定相は、骨の前駆体となり、骨形成を促進することが期待できる。

### 骨形成促進ツールの作製

骨組織に、CaP 結晶と結晶構造を調節する物質を運ぶナノツールの作製を行った。今回は、光学顕微鏡を用いた観察を行うために、リポソームの粒径を約 1 $\mu$ m 程度に調節し、DNA の封入を行った。DNA の濃度と分子量を調節することで、封入量を調節することが可能であった。また、光学顕微鏡による観察から、リポソームの中空部に DNA が存在することを確認した。次に、この DNA 封入リポソーム分散液を  $Ca^{2+}$  含有水溶液と  $HPO_4^{2-}$  含有水溶液に対して交互に交換し、

CaP 生成を試みた。温度、イオン濃度、浸漬回数などの反応条件を調節することで、溶液中の結晶生成を抑えて、リポソームを基点とした CaP 生成に成功した。また、生成した CaP を溶解し、溶出したイオン濃度を定量したところ、リポソームと比較して、DNA 封入リポソームからのイオンの検出量が顕著に高かったことから、DNA が結晶生成を促進することもわかった。今後は、骨形成能の評価として、カプセル存在下で骨芽細胞を培養し、石灰化能を評価する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fukui Yuuka, Otsuka Hikari, Fujimoto Keiji	4. 巻 51
2. 論文標題 Controlled release and targeting of polypeptide-deposited liposomes by enzymatic degradation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Polymer Journal	6. 最初と最後の頁 1223 ~ 1230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41428-019-0232-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奈須 万柚子、多部田 郁絵、福井 有香、藤本 啓二
2. 発表標題 リン酸化キトサンとリゾチームを積層させたりポナノカプセルの酵素分解による機能発現
3. 学会等名 第41回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------