

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2012

課題番号：20240047

研究課題名（和文） ナノゲルを基盤とした新規ドラッグデリバリーシステムの開発

研究課題名（英文） Development of new nanogel-based drug delivery systems

研究代表者

秋吉 一成（AKIYOSHI KAZUNARI）

京都大学・工学研究科・教授

研究者番号：90201285

研究成果の概要（和文）：我々（研究代表者ら）が独自に開発した自己組織化ナノゲル法をさらに発展させ、高機能性ヒドロゲルバイオマテリアルの開発と医療応用を目指した。具体的には、細胞内タンパク質デリバリーのための新規刺激応答性ナノゲルキャリアの設計、開発を行った。また、ナノゲルを集積した複合ナノ微粒子やマイクロ微粒子、多重の刺激でナノゲルが放出しえるようなナノゲル複合体架橋ヒドロゲルやナノゲルシート膜を設計し、再生医療、特に骨再生において、開発した新規ナノゲル基盤機能性バイオマテリアルが有用であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

We first reported new method of preparation of physically cross-linked nanogels by self-assembly of hydrophobized polysaccharides. In this project, we develop new polysaccharide nanogels by functional associating polymers and bottom-up nanogel engineering, in which nanogels are used as building blocks to control the nanostructure of macrogels, particles, sheets. Nanogel-based materials with functions of molecular chaperon are useful as protein delivery system and as scaffolds in regenerative medicine such as bone formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	17,300,000	5,190,000	22,490,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2012年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
総計	39,100,000	11,730,000	50,830,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノゲル、ヒドロゲル、タンパク質、ドラッグデリバリー、細胞機能

1. 研究開始当初の背景

ナノ微粒子とゲルの特性を合わせ持つナノメートルサイズ（特に 100nm 以下）の高分子ゲル微粒子（ナノゲル）は、特にドラッ

グデリバリーシステムやナノテクノロジー分野で注目されるようになってきた。一般に化学架橋ナノゲルは、マイクロエマルジョン重合法や高分子分子内での架橋反応により

合成されてきた。我々は、疎水化多糖の自己組織化により物理架橋ナノゲルの新規な調整法（自己組織化ナノゲル法）を開発した。すなわち、比較的疎水性の高い疎水基（コレステロール基）を部分的に導入した水溶性多糖類が、希薄水溶液中で自己組織的に会合し、疎水基の会合領域を架橋点とする単分散なナノゲルを形成することを見出した。

（*Macromolecules*, 26, 3062, 1993, *Macromolecules*, 30, 857, 1997）我々の知る限り、物理架橋点を有する 50nm 以下のサイズの揃ったナノゲルとしては、世界で初めての報告であった。また、ナノゲル濃度を上げるとナノゲルが集合したヒドロゲルが形成することもわかった。（*Langmuir*, 18, 3780, 2002）多糖の種類や疎水性基の違いにより、ナノゲルのサイズや会合特性を制御しえることを明らかにし（*Biomacromolecules*, 8, 2366, 2007）、会合性高分子による自己組織化法は物理架橋ナノゲル調製法として世界的にも利用されるにいたっている。

ナノゲルは、従来のナノ微粒子と比べて、その内部に様々な物質を取り込める 3次元空間を有している点が大きな特徴である。例えば、コレステロール置換プルラン(CHP)の多糖ナノゲルは、タンパク質と選択的に相互作用するホストとして機能した。（*Macromolecules*, 27, 7654, 1994, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6110, 1996）これまでに我々は、ナノゲルのナノキャリアとしての有用性を実証してきた。ナノゲルは抗癌剤であるアドレマイシン、シスプラチン誘導体、抗ステロイド薬あるいはペプチドなどの低分子薬剤からタンパク質も比較的容易に複合化することも可能で DDS での様々な利用が可能である。特に、コレステロール置換プルランからなるナノゲルを用いた癌免疫タンパクワクチンは、すでに臨床研究段階に入っている（*Blood*, 99, 3717, 2002, *Clinical Cancer Research*, 12, 7397, 2006）。また、ナノゲルをテンプレートとしたアパタイト微粒子の調製にも成功しており、新規有機-無機ナノハイブリッドマテリアルとしての利用の可能性を示した（*Macromol. Rapid Commun.*, 27, 441, 2006）。

一方、ポリマーゲルは、薬学・医療分野から分離テクノロジーや化粧品、食品の分野まで幅広く利用されている。近年、 dendrimer、微粒子を架橋点とする化学架橋ゲル、抗体、人工タンパク質モチーフを架橋点とする物理架橋ゲル、さらに架橋点が移動するトポロジカルゲルなど様々な架橋点を有する新しいゲルが報告されている。しかし、架橋点の構造やゲルの網目の構造制御は依然として大きな課題である。特に、ヒドロゲルは DDS や再生医療における足場材料として広く用いられている。しかし、例えば、タンパ

ク質の徐放担体として幅広く用いられているが、一般的にはゲル内への取り込みの際にタンパク質の変性やそれにとまらぬ不可逆的な凝集や吸着は避けられないなどの課題も多い。それはヒドロゲルマトリックス内のタンパク質の取り込みサイト（網目サイズや架橋サイト）の制御が十分に出来ないことに起因している。タンパク質の凝集を抑制するために、ナノサイズのゲルが有効であることを我々は提案してきた。天然の分子シャペロンが行っているように、凝集することなくタンパク質 1 分子を孤立したナノ空間に取り込み、必要なときに外部刺激により取り出すシステムがナノゲル（人工分子シャペロン）により実現されている。（*Bioconjugate Chem.*, 10, 321, 1999, *FEBS Lett.* 553, 271, 2003 *Biomacromolecules*, 6, 447, 2005）さらに、最近、反応性ナノゲルを設計し、ナノゲルを架橋点とするナノゲルの特性を保持した新規なヒドロゲル（ナノゲル架橋ゲル）を開発した（*Biomacromolecules*, 6, 1829, 2005）。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに開発してきた自己組織化ナノゲル法をさらに発展させ、高機能性ヒドロゲルバイオマテリアルの開発と医療応用を目指す。構造制御された新規刺激応答性ナノゲルの開発およびナノゲルをビルディングブロックやテンプレートとして活用し、ナノ構造制御された機能性ヒドロゲルの設計法（ナノゲル工学）を確立し、新規ナノ DDS、新規徐放制御マテリアルや組織工学等における新規人工細胞外マトリクスとしての応用展開を図る。具体的には、標的指向性を有するナノゲルの設計と細胞内タンパク質デリバリーのための新規刺激応答性ナノゲルキャリアの設計、開発を行う。また、ナノゲルを集積した複合ナノ微粒子やマイクロ微粒子、多重の刺激でナノゲルが放出しえるような徐放性ナノゲル架橋ヒドロゲルやナノゲルシート膜を設計し、再生医療での新規機能性徐放バイオマテリアルとしての応用を図る。

3. 研究の方法

まず、新規刺激応答性ナノゲルおよび、高機能性ヒドロゲルバイオマテリアルのビルディングブロックとして最適な新規反応性ナノゲルの設計および機能評価を進めた。具体的には、（1）新規多糖を基盤としたナノゲルの開発、（2）酸分解性分子や Schiff 塩基形成を利用した刺激（環境）応答性ナノゲルの設計と機能評価を行った。次に反応性ナノゲルを設計・機能評価するとともにその反応性ナノゲルを用いて、（3）マイケル付加反応を利用したマクロゲルの開発と機能評

価および再生医療材料としての応用、(4) ナノゲル架橋微粒子の設計と作成方法の確立および DDS キャリアへの応用、(5) 光重合法によるナノゲル架橋型材料の設計と機能評価を行った。さらには、開発した材料の DDS キャリアや再生医療用材料としての機能を細胞、動物実験により評価し、医療応用への足がかりとなる基礎データの収集、解析を行った。これらの知見を、新たなナノゲルおよびナノゲル基盤材料の設計にフィードバックすることで目的に応じた材料開発を進めた。

4. 研究成果

(1) 新規機能性ナノゲルの開発:

従来のプルラン多糖 (CHP) に変えて、分岐を有するクラスターデキストリンおよび酵素合成グリコーゲンを主鎖を持つ新規会合性ナノゲルを開発し、従来の CHP ナノゲルと比べて、タンパク質の保持能が高く、長期徐放性にも優れていることを見いだした。新規タンパク質キャリアとしての利用が期待される。

(2) 酸分解性ナノゲルの設計と機能評価:

タンパク質や遺伝子の細胞内デリバリーシステムの効率を向上するために、取り込まれたエンドソーム内の pH の低下を利用した酸分解性のナノゲルキャリアの設計を行った。酸性 pH で、分解しえるビニルエーテルをリンカーとした新規ナノゲルを合成した。ナノゲル形成の駆動力である疎水性コレステロール基と主鎖多糖とをつなぐリンカーとしてビニルエーテル基を導入した酸分解性ナノゲルを合成した。低 pH でタンパク質を放出しえる新規タンパク質ナノキャリアとして機能しえることが明らかになった。

(3) クリック反応を用いた機能性会合性高分子の設計、ナノゲル形成と機能:

クリック反応を用いた新規コレステロール置換多糖を合成する手法を確立し、これまでと同様のナノゲルを形成することを明らかにした。また、スベルミン基を導入した核酸キャリアーを合成し、従来のナノゲルよりも優れた遺伝子導入キャリアであることが明らかになった。

(4) ナノゲル架橋ヒドロゲルの開発:

アクリル基を有するナノゲルとチオール基を有する 4 本鎖ポリエチレングリコール誘導体とのマイケル付加反応により、ナノゲルを架橋点とするヒドロゲルが得られた。このゲルに BMP2 タンパク質を封入することで、骨再生のタンパク質徐放性足場材料として有用であることを動物実験で明らかとした。

(5) 光重合法を利用したナノゲル架橋材料の設計と機能:

アクリル基を有するナノゲルと重合性基を有する 2 官能性ポリエチレングリコール誘導体を光重合開始剤により共重合し、新規ナノゲル架橋ハイブリッドゲルを合成することに成功した。さらにゲルへのタンパク質の封入と徐放制御が可能であることを明らかにした。

(6) ナノゲル架橋ナノ微粒子の設計と利用:

4 で述べた反応を希釈条件下で行うことで、ナノゲルが集積された ~200nm のラズベリー型のナノゲル架橋微粒子を合成する手法を確立した。PEG 鎖架橋でナノゲルが安定化され、ナノゲルとの架橋点であるエステル結合が加水分解することで、ナノゲルが徐々に放出しえる新しいナノ微粒子である。IL12 を内包したナノゲルから架橋ナノ微粒子が得られ、マウス皮下注射により IL12 を血中に長期徐放しえることを明らかにした。

(7) ナノゲル-プロスタグランジン E1 (PGE2) 複合体の創傷治癒への応用:

CHP ナノゲルに創傷治癒を誘起しえる PGE2 を複合体化し、裂傷の患部に塗布することで創傷治癒効果が格段に向上した。ナノゲルにより PGE2 の局所徐放が可能になったことに起因することが明らかになった。

(8) ナノゲル-ペプチド複合体による骨減少の抑制:

CHP ナノゲルに TNF- α と RANKL アンタゴニストペプチドを複合体化させ、数回皮下投与することで、低カルシウムによる骨減少を効果的に抑制しえ、ペプチドキャリアとして有用であることが明らかになった。

(9) ナノゲル架橋ゲル材料の骨再生材料としての利用:

4 で報告した、BMP2 を封入した反応性ナノゲルとさらに別のサイトカインである FGF を反応性ナノゲルに封入した 2 種類のナノゲルを調整し、それらを混合したダブル架橋ナノゲルを調整したところ、マクロゲルを作成し得ることを確認した。このゲルによる骨形成促進効果をマウス頭頂骨モデル系で検討したところ、BMP のみおよび FGF のみの条件に比べ、顕著に骨形成を促進し得ることが明らかとなった。

(10) ビタミン B6 置換多糖によるタンパク質架橋ナノゲルの設計と機能評価:

クリック反応を用い、ビタミン B6 のプルランへの導入を検討し、ビタミン B6 置換プ

ルランの合成法を確立した。得られたビタミン B6 置換プルランとモデルタンパク質であるリゾチームとの Schiff 塩基形成を介した複合化を検討したところ、pH5-8 の条件に置いて pH が上昇するに従いビタミン B6 置換プルランとリゾチームとの結合数が増加することが明らかとなった。この複合体は動的光散乱測定、電子顕微鏡観察により粒径が 20-30nm であることも確認された。このビタミン B6 置換プルランと酵素（炭酸脱水素酵素）からナノゲルを形成させることで、その酵素が熱安定化される事が明らかになった。また、ビタミン B6 置換多糖に細胞親和性基を導入することで、細胞内タンパク質デリバリーキャリアとして機能しえることを明らかにした。

(11) リポソーム-ナノゲル複合体ヒドロゲルの設計と機能評価：

まず、反応性ナノゲルのリポソームへの被覆条件を検討し、反応性ナノゲルをリポソーム表面に被覆できることを明らかとした。この反応性ナノゲル被覆リポソームと、チオール基を有するポリエチレンオキサイド(PEO)誘導体を反応させたところ、マクロゲルを形成した。このゲルの構造を透過型電子顕微鏡で観察したところ、反応性ナノゲル被覆リポソームがその形状を維持していることが明らかとなった。また、マクロゲルの分解挙動を検討したところ、ゲルの分解に伴いリポソームが放出されることが確認された。

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 33 件)

- ① Morimoto N, Hirano S, Takahashi H, Loethen S, Thompson DH, Akiyoshi K, Self-assembled pHsensitive cholesteryl pullulan nanogel as a protein delivery vehicle, *Biomacromolecules*, 14, 56-63(2013), 査読有
DOI:10.1021/bm301286h
- ② Shimoda A, Sawada S, Kano A, Maruyama A, Moquin A, Winnik FM, Akiyoshi K, Dual crosslinked hydrogel nanoparticles by nanogel bottom-up method for sustained-release delivery, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 99, 38-44(2012), 査読有
DOI:10.1016/j.colsurfb.2011.09.025
- ③ Fujioka-Kobayashi M, Ota MS, Shimoda A, Nakahama K, Akiyoshi K, Miyamoto Y, Iseki S, Cholesteryl group- and acryloyl group-bearing pullulan nanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 33, 7613-7620(2012), 査読有
DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.06.075
- ④ Shimoda A, Yamamoto Y, Sawada S, Akiyoshi K, Biodegradable Nanogel-integrated Hydrogels for Sustained Protein Delivery, *Macromol Research*, 20, 266-270(2012), 査読有
DOI:10.1007/s13233-012-0054-x
- ⑤ Toita S, Sawada S, Akiyoshi K, Polysaccharide nanogel gene delivery system with endosome-escaping function: Co-delivery of plasmid DNA and phospholipase A2, *J Controlled Release*, 155, 54-59(2011), 査読有
DOI:10.1016/j.jconrel.2010.12.008
- ⑥ Shimoda A, Sawada S, Akiyoshi K, Cell specific peptide-conjugated polysaccharide nanogels for protein delivery, *Macromol Bioscience*, 11, 882-888(2011), 査読有
DOI:10.1002/mabi.201000491
- ⑦ Sasaki Y, Tsuchido Y, Sawada S, Akiyoshi K, Construction of protein-crosslinked nanogels with vitamin B6 bearing polysaccharide, *Polym Chem*, 2, 1267-1270(2011), 査読有
DOI:10.1039/c1py00100k
- ⑧ Sasaki Y, Asayama W, Niwa T, Sawada S, Ueda T, Taguchi H, Akiyoshi K, Amphiphilic Polysaccharide Nanogels as an Artificial Chaperone in Cell-Free Protein Synthesis, *Macromol Bioscience*, 11, 814-820(2011), 査読有
DOI:10.1002/mabi.201000457
- ⑨ Sawada S, Sasaki Y, Nomura Y, Akiyoshi K, Cyclodextrin-responsive nanogel as an artificial chaperone for horseradish peroxidase, *Colloid Polym Sci*, 289, 685-691(2011), 査読有
DOI:10.1007/s00396-010-2361-0
- ⑩ Takahashi H, Sawada S, Akiyoshi K, Amphiphilic Polysaccharide Nanoballs: A New Building Block for Nanogel Biomedical Engineering and Artificial Chaperones, *ACS Nano*, 5, 337-345(2011), 査読有
DOI:10.1021/nn101447m
- ⑪ Sawada S, Akiyoshi K, Nano-encapsulation of lipase by self-assembled nanogels: induction of high enzyme activity and thermal stabilization, *Macromol Biosci*, 10, 353-358(2010), 査読有
DOI:10.1002/mabi.200900304
- ⑫ Toita S, Morimoto N, Akiyoshi K,

Functional cycloamylose-based biomaterial: application in a gene delivery system, *Biomacromolecules*, 11, 397-401(2010), 査読有
DOI:10.1021/bm901109z

- ⑬ Toita S, Soma Y, Morimoto N, Akiyoshi K, Cycloamylose-based biomaterial: nanogel of cholesterol-bearing cationic cycloamylose for siRNA delivery, *Chem Lett*, 38, 1114-1115(2009), 査読有
DOI:10.1246/cl.2009.1114
- ⑭ Ayame H, Morimoto N, Akiyoshi K, Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery system, *Bioconjugate Chem*, 19, 882-890(2008), 査読有
DOI:10.1021/bc700422s

[学会発表] (計 28 件)

- ① 秋吉一成, 多糖ナノゲル工学によるタンパク質 DDS の開発, 第 4 回ナノバイオ創薬研究シンポジウム, 2013 年 3 月 9 日, 京都, 招待講演
- ② 秋吉一成, 多糖ナノゲルによるタンパク質, 核酸バイオ医薬 DDS の開発, 第 6 回 硬組織疾患ゲノムセンターシンポジウム, 2013 年 3 月 5 日, 東京, 招待講演
- ③ 秋吉一成, ナノゲル基盤有機-無機ハイブリッド材料の創製とバイオ応用, 公益社団法人日本セラミック協会 第 25 回秋季シンポジウム, 2012 年 9 月 19 日, 名古屋, 招待講演
- ④ 秋吉一成, ナノゲル工学による新規タンパク質 DDS の開発, ファーマテックジャパンセミナー, 2012 年 3 月 22 日, 東京, 招待講演
- ⑤ K. Akiyoshi, Nanogel engineering by associating polymers, 2011 年 11 月 28 日, Kyoto, Japan, 招待講演
- ⑥ K. Akiyoshi, Polysaccharide nanogel engineering for antigen delivery system, 2011 年 11 月 9 日, Florence, Italy, 招待講演
- ⑦ 秋吉一成, ナノゲル工学による新規材料設計, 第 63 回コロイドおよび界面化学討論会, 2011 年 9 月 8 日, 京都, 招待講演
- ⑧ 澤田晋二, 秋吉一成, 多糖ナノゲルと細胞との相互作用, 財団法人日本化学繊維研究所 第 10 回「高分子材料研究会」, 2011 年 6 月 24 日, 京都, 招待講演
- ⑨ 秋吉一成, ナノゲル工学のバイオマテリアルへの応用, 第 19 回ポリマー材料フォーラム, 2010 年 12 月 2 日, 名古屋, 招待講演
- ⑩ K. Akiyoshi, Nanogel Engineering for Protein Drug Delivery System, 6th

Sweden-Japan Workshop on BioNano Technology, 2010 年 5 月 11 日, shizuoka, Japan, 招待講演

- ⑪ K. Akiyoshi, Polysaccharide nanogel engineering for protein delivery system, KIFEE workshop on environment, Energy and Materials, 2009 年 9 月 8 日, Trondheim, Norway, 招待講演
- ⑫ 秋吉一成, ナノゲル工学による新規バイオマテリアルの設計と応用, 第 58 回高分子学会年次大会, 2009 年 5 月 29 日, 神戸, 招待講演
- ⑬ 秋吉一成, 分子シャペロン機能工学によるタンパク質の集積, 機能制御, 第 24 回日本 DDS 学会, 2008 年 6 月 30 日, 東京, 招待講演

[図書] (計 7 件)

- ① 佐々木善浩, 秋吉一成, 共立出版, 自己組織化と機能材料, 最先端材料システム **One Point 3**, 2012, 113-122
- ② 戸井田さやか, 秋吉一成, 西成勝好 監修, シーエムシー出版, 量子ドットデリバリーシステム, 蛍光イメージング/MRI プロローブの開発, 2011, 153-162
- ③ 戸井田さやか, 秋吉一成, 西成勝好 監修, シーエムシー出版, ナノゲル工学による DDS キャリアの開発と応用, 食品・化粧品・医療分野へのゲルの利用, 2010, 186-192
- ④ 高橋治子, 秋吉一成, 小宮山眞 監修, NTS, 人工分子シャペロンシステム, 酵素利用技術体系-基礎・解析から改変・高機能化・産業利用まで-, 2010, 213-219
- ⑤ 高橋治子, 秋吉一成, 三林浩二 監修, シーエムシー出版, DDS ナノデバイス, バイオ利用&健康デバイス, 2009, 158-167
- ⑥ 秋吉一成, 国武豊喜 監修, NTS, 分子シャペロン機能工学, 超分子サイエンス & テクノロジー, 2009, 1018-1024
- ⑦ 秋吉一成, 岸田晶夫 監修, シーエムシー出版, 次世代医療のための高分子材料工学, 2008, 238

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋吉 一成 (AKIYOSHI KAZUNARI)
京都大学・工学研究科・教授
研究者番号: 90201285

(2) 研究分担者

佐々木 善浩 (SASAKI YOSHIHIRO)
京都大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 90314541
(H22-H24: 研究分担者)

澤田 晋一 (SAWADA SHINICHI)
京都大学・工学研究科・助教
研究者番号：50444104
(H20-H24:研究分担者)

森田 育男 (MORITA IKUO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授
研究者番号：60100129
(H20-H24:研究分担者)

森本 展行 (MORIMOTO NOBUYUKI)
東北大学・工学研究科・准教授
研究者番号：00313263
(H20-H21:研究分担者)