

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月26日現在

機関番号：24403
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23650292
 研究課題名（和文） 物質依存性イオンチャネル様フィードバック機能を発現するナノカプセル設計
 研究課題名（英文） Design of nanocapsules exhibiting feedback function like substrate-dependence ion channel
 研究代表者
 原田 敦史 (HARADA ATSUSHI)
 大阪府立大学・工学研究科・准教授
 研究者番号：50302774

研究成果の概要（和文）：樹状高分子である polyamidoamine (PAMAM) dendron のフォーカルポイントからポリペプチドである poly(L-lysine) (PLL) を伸長したヘッドテイル型ポリカチオンから単分散ポリマーベシクルを得た。このポリマーベシクルへグリシジル基を両末端に有する架橋剤を添加し、PLL テイル鎖間での架橋によるベシクル構造の安定化を行い、さらに、4-carboxy-phenylboronic acid を PLL 側鎖アミノ基へ導入した。フェニルボロン酸基を導入したナノカプセルを酸性・塩基条件の両条件で膨潤し、中性条件では収縮状態となった。このようなナノカプセルのサイズ変化はフェニルボロン酸基の特性に寄与することから、フェニルボロン酸基がグルコースと結合することによる荷電状態変化によってもサイズ変化を示すナノカプセルが調製できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Monodisperse polymer vesicles were obtained from head-tail type polycations composed of polyamidoamine (PAMAM) dendron and poly(L-lysine) tail (PAMAM dendron-PLL) in the mixing solvent of methanol and water. The introduction of cross-linkages between PLL tails using cross-linker bearing glycidyl groups at both ends provided the stabilization of vesicular structure of PAMAM dendron-PLL vesicles. Also, 4-carboxy-phenylboronic acid were introduced to the remained Lys residues using condensation reagent. For thus obtained nanocapsules with and without phenylboronic acid moieties, the change in average diameter with pH was evaluated by dynamic light scattering measurement. The prepared nanocapsules could show the size change through the change of ionization state of phenylboronic acid moieties, and this expected that the nanocapsules could exhibit the size change synchronizing with the change in glucose concentration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：ポリマーバイオマテリアル

科研費の分科・細目：人間医工学・生体材料学

キーワード：ナノカプセル／フェニルボロン酸／グルコース

1. 研究開始当初の背景

生体細胞（特に神経細胞）は、シグナルを受け取り、運び、伝えるために、チャネルタンパクからなるさまざまなイオンチャネルを巧妙に使い特殊な機能を発揮している。チ

ャネルは、常に開放状態に置かれるのではなく、電位・機械刺激・リガンドなどにより、短時間だけ開きすぐに閉じるゲートを備えている（図1）。このような機能はフィードバック機能とも呼ばれ、生体系での種々物質

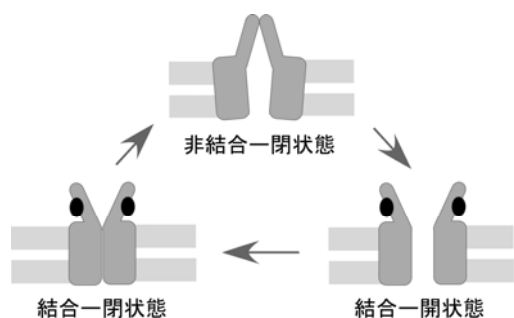


図1 イオンチャネルの機能発現イメージ

の濃度制御を司っている。一方、治療分野においては、がんをはじめとする難治性疾患の治療を目的としてドラッグデリバリーシステム (DDS) に関する研究が盛んに行われており、申請者自身も高分子ミセルやリポソームなどのナノ粒子を用いた DDS 開発に取り組んできた。DDS 開発では、特定部位での選択的薬効発現を目的とした材料設計がなされ、刺激応答等による選択的薬物放出が実現されている。このようなキャリア設計はがん治療においては有効であるが、がんと並んで患者が多い糖尿病治療においては有効ではない。糖尿病治療においては、インスリンやインスリン分泌を促すスルホニル尿素薬などの血糖降下薬の頻回投与が行われている。この頻回投与が患者の QOL を著しく低下させている。この問題を克服するためには、薬物キャリアにイオンチャネルのようなフィードバック機能を付与し、血糖値（グルコース濃度）に同期した血糖降下薬リリースを実現すれば投与回数を低下させ、糖尿病患者の QOL 向上につながると期待される。

2. 研究の目的

生体系での種々物質濃度調節を司っている物質依存性イオンチャネルは、特定物質の結合によりチャネル及びゲートが短時間開くことにより特殊な機能を発揮している。本研究では、物質依存性イオンチャネルの機能発現機序に啓発された薬物キャリア設計に取り組む。日本で 100 万人以上の患者がいる糖尿病治療では、血糖降下薬の頻回投与が行われている。これは、血糖値（グルコース濃度）に依存した薬剤投与が必要であるためである。グルコース依存性イオンチャネルともいべき機能を、樹状高分子でポリペプチドからなるヘッドテイル型ブロック共重合体自己組織体への架橋構造導入によって安定化された中空ナノカプセルを構成するナノ薄膜へフェニルボロン酸基を利用して組み込むことによって糖尿病治療に有用なナノキャリアを構築する。この開発により、治療薬の投与回数を減らすことが可能となり、患者の Quality of Life (QOL) 向上につながる

ると期待される。

3. 研究の方法

PAMAM dendron-PLL は、PAMAM dendron を合成した後に、そのフォーカルポイントより PLL 部を重合することによって、PAMAM dendron 部の世代数が 3.5、PLL 部の数平均重合度が 70 の PAMAM dendron-PLL を得た。構造の確認は ^1H NMR 測定、GPC 測定により行った。得られた PAMAM dendron-PLL を水/メタノール混合溶媒（体積比 1 : 1）に溶解させた後、メタノールと水の体積比が 4 : 1 となるまでメタノールを滴下することによりポリマーベシクルを調製した。ポリマーベシクル形成は、動的光散乱測定、透過型電子顕微鏡観察により確認した。ポリマーベシクル溶液へ両末端にエポキシ基をもつ架橋剤である nonaethyleneglycoldiglycidyl ether を Lys 残基数に対して 10 倍量加え、2 日間反応させた。次に、縮合剤 [N-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroquinoline (EEDQ)] によりカルボキシ基が活性エステル化された 4-carboxyphenylboronic acid を Lys 残基数と等モル量加え 1 日間反応させた。反応後、未反応物除去のために、水/メタノール混合溶媒（体積比 1 : 4）に対して透析を行い、その後、水への透析により溶媒からメタノールを除去した。得られたフェニルボロン酸基導入ナノカプセルの特性を動的光散乱測定により評価した。

4. 研究成果

表 1 にフェニルボロン酸基導入ナノカプセル調製過程での動的光散乱測定結果を示す。

表 1 動的光散乱測定結果

	平均粒径	多分散度
ポリマーベシクル*	235nm	0.05
ナノカプセル	278nm	0.04
フェニルボロン酸導入ナノカプセル	231nm	0.07

*水/メタノール混合溶媒中、他は水中

水/メタノール混合溶媒中でメタノール含率を増加させることにより、PLL 部のコンホメーションをランダムコイルから α -ヘリックスへと転移させることによりポリマーベシクルが形成された。このベシクルは、溶媒組成を変化させるだけの調製方法にも関わらず、多分散度が 0.1 以下の極めて粒径分布の狭い高分子集合体である。このポリマーベシクルを、架橋剤を用いて安定化させた結果、水への溶媒置換後においても中空構造を有するナノカプセルが確認された。また、このナノカプセル化過程においても多分散度

はほとんど変化せず極めて狭い粒径分布を維持していることが確認された。

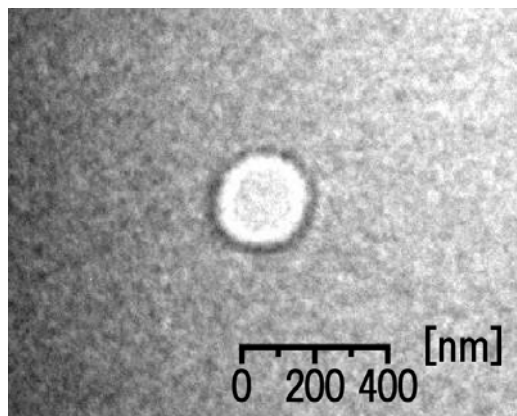


図2 フェニルボロン酸基導入ナノカプセルの透過型電子顕微鏡像

水/メタノール混合溶媒中で架橋剤との反応により安定化しナノカプセル化された後、グルコース認識能を有するフェニルボロン酸基を導入した後のナノカプセルも、単分散な粒径分布を維持したままで得られることが確認された。さらに、フェニルボロン酸基導入ナノカプセルは、架橋、フェニルボロン酸基導入反応後においても中空構造を維持していることが透過型電子顕微鏡観察によって確認された(図2)。未反応 Lys 残基数を定量した結果、架橋剤及びフェニルボロン酸基の導入率は、35% Lys 残基、22% Lys 残基であった。

フェニルボロン酸基導入がナノカプセル特性へ及ぼす影響として、ナノカプセル平均粒径の pH 依存性を評価した(図3)。

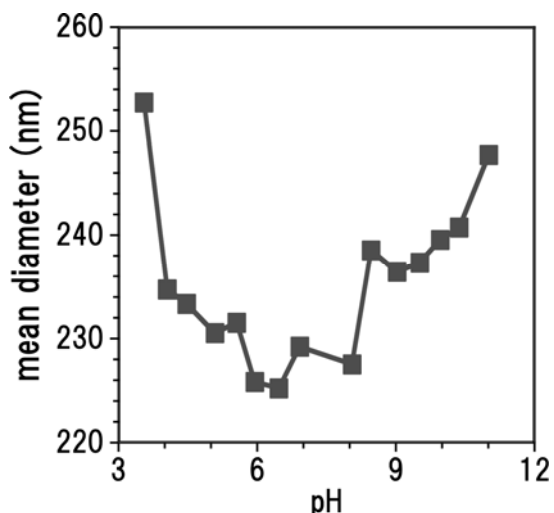


図3 フェニルボロン酸基導入ナノカプセル平均粒径の pH 依存性

ナノカプセルは、中性 pH (6<pH<8.5) では収縮状態で 225nm 程度のサイズであるが、酸性、塩基性 pH のいずれにおいても粒径の

増大が確認された。酸性 pH での粒径の増大は、未反応 Lys 残基側鎖のアミノ基及び PAMAM dendron 内部三級アミンのプロトン化によるものである。これに対して塩基性 pH では、アミンはすべて非プロトン化状態であるが、フェニルボロン酸基が荷電性四価となるためカウンターイオンが流入しナノカプセル膜内のイオン浸透圧増加によるものである。フェニルボロン酸の疎水性三価と荷電性四価の平衡は pH によって変化するだけでなく、荷電性四価はグルコースのような多価水酸化化合物と結合でき、その結果として平衡が疎水性三価から荷電性四価へとシフトする(図4)。このことはゼータ電位測定からも確認され、中性 pH からの pH の増加は、負ゼータ電位の絶対値の増加を伴っていた。図3に示した結果は、フェニルボロン酸基の平衡状態が変化することによってナノカプセルのサイズが変化することを示しており、図4に平衡を示すようなグルコースと荷電性四価のフェニルボロン酸の結合は、系全体として荷電性四価のフェニルボロン酸基の比率を高めることになる。その結果として、pH 変化だけでなく、一定 pH 条件下でのグルコース濃度変化によってもナノカプセルサイズが変化するを期待させるものである。

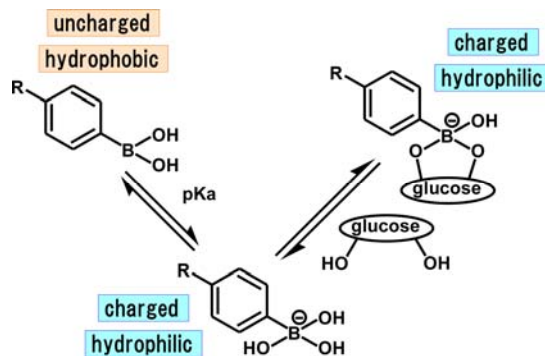


図4 フェニルボロン酸基の pH、グルコースに依存した平衡関係

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3件)

① 奥原淳史、弓場英司、原田敦史、河野健司、ヘッドテイル型ポリカチオンからなるナノカプセルへのグルコース応答能付与、第61回高分子学会年次大会、パシフィコ横浜、2012年5月29-31日

② 原田敦史、機能性デンドロンのバイオメディカル分野への応用、第61回高分子学会

年次大会、パシフィコ横浜、2012年5月29
-31日

③ Junshi Okuhara, Eiji Yuba, Atsushi Harada, Kenji Kono, Introduction of glucose-recognizable moieties to hollow nanocapsules formed from head-tail type polycation, 2nd International Conference on Biomaterials Science in Tsukuba, つくば国際会議場, 2013年03月19-22日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 敦史 (HARADA ATSUSHI)

大阪府立大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：50302774