

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390006

研究課題名(和文) インスリン含有ナノカプセルの開発：人工膵臓へのアプローチ

研究課題名(英文) Insulin-containing nanocapsules: an approach to artificial pancreas

研究代表者

安齋 順一 (Anzai, Jun-ichi)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：40159520

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：フェニルボロン酸修飾ポリマーを合成し、次に、適量のインスリンが封入された炭酸カルシウム粒子(粒子径は5～10ナノメートル程度でほぼ球形)の調製に成功した。粒子表面に交互累積膜を被覆するとインスリンの放出速度を制御することが可能であった。フェニルボロン酸修飾ポリアリルアミンおよびデンドリマーを用いて作製した薄膜は、インスリン放出系を作製するために有望な材料であることがわかった。酵素を組み合わせると交互累積膜を調製すると、グルコース共存下で薄膜の分解を誘発できることも見出した。以上の結果は、フェニルボロン酸修飾ポリマー薄膜が、インスリン放出装置を開発する上で有用な材料であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Phenylboronic acid-modified polymers and insulin-containing calcium carbonate particles (spherical particles of 5-10 nm in diameter) were prepared. The release of insulin from the particles could be regulated by coating layer-by-layer films on the particles. Phenylboronic acid-modified poly(allylamine) and dendrimers were found to be useful for constructing insulin-delivery systems. It was also found that layer-by-layer films combined with enzyme can be disintegrated in the presence of glucose. The results show that phenylboronic acid-modified thin film are useful materials for developing insulin delivery systems.

研究分野：機能薄膜

キーワード：交互累積膜

1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者の治療に際してインスリンは注射剤として投与されている。患者のQOLの向上という観点から、インスリン経口剤や経鼻剤の開発が活発に行われているが、解決すべき課題が多い。また、血糖値センサーとインスリンポンプを組み合わせた人工膵臓の開発研究も実施されているが、患者本位の装置の開発には至っていない。このような背景から、微粒子やゲルにインスリンを封入したインスリン製剤の開発が望まれている。

2. 研究の目的

本研究は、交互累積膜法によりインスリンを含有するナノ薄膜およびカプセルを作製し、将来の人工膵臓用材料へと発展させることを目的とする。すなわち、血糖値の上昇に応じて自動的にインスリンを放出するナノ薄膜およびナノカプセルを作製する。グルコース応答機能を実現するために、薄膜内、カプセル内部または被膜にフェニルボロン酸(PBA)ポリマーを封入する。薄膜の系では、pH変化やグルコースとの結合、カプセルにPBAポリマーを封入する系では、グルコースとPBAが結合して負電荷を発生するためにインスリン凝集体が分解してインスリンが放出される。また、PBAポリマーがカプセル被膜に存在する系では、PBAにグルコースが結合する際にカプセルが分解してインスリンが放出される。さらに、グルコースに特異的に作用する酵素と組み合わせる系の検討も実施する。

3. 研究の方法

はじめにインスリンを含有する交互累積膜の調製を行う。インスリン溶液およびインスリンと反対電荷を有する高分子電解質溶液に基板を交互に浸漬する方法により、インスリンを薄膜状に成型する。次に、炭酸カルシウム粒子にインスリンを含浸させて微粒子として、その微粒子表面を同様の手法により交互累積膜で被覆する。さらに、弱酸性溶液の中に交互累積膜被覆微粒子を分散させて炭酸カルシウムを溶解除去する。この操作により、内部にインスリンが封入された中空のマイクロカプセルを調製する。その際に、交互累積膜材料としてフェニルボロン酸で修飾したポリマーを用いて、pHおよびグルコースに対する特異応答を実現する。また、グルコース特異的な酵素、グルコースオキシダーゼ、を交互累積膜の一部に用いることにより、グルコース特異的な応答、すなわち薄膜の分解とインスリンの放出を実現する。

4. 研究成果

グルコース応答性薄膜とマイクロカプセルを作製する材料となるフェニルボロン酸修飾ポリマーを2種開発した。すなわち、ポリアリルアミンとポリアミドアミン dendrimer をフェニルボロン酸で修飾した。これらの合成反応は常法により良好な収率で達成することができた。次に、マイクロカプセルを調製する際の芯物質となる炭酸カルシウム

微粒子の調製とインスリンの封入を検討し、適量のインスリンが封入された炭酸カルシウム粒子の調製に成功した。粒子径は5~10ナノメートル程度でほぼ球形の粒子とすることができた。インスリン封入炭酸カルシウム粒子からのインスリンの放出挙動を検討した結果、この粒子の表面に交互累積膜を被覆するとインスリンの放出速度を制御することが可能であった。また、放出速度は累積膜の膜厚に依存することもわかった。フェニルボロン酸修飾ポリアリルアミンおよび dendrimer を用いて交互累積法により作製した薄膜は、グルコースが共存すると濃度に依って分解することが明らかになった。グルコースの生理的濃度付近で分解が観察され、実用上も有望な材料であることがわかった。一方、これらの材料はポリマー中のフェニルボロン酸置換率により、グルコース応答性が著しく変化することもわかった。すなわち、置換率が10%以下の場合にはグルコース応答性は高いが、グルコースの存在しないときも一部分解した。一方、置換率が20%以上では安定な薄膜が調製できたが、グルコースが共存してもほとんど分解しないことがわかった。このような安定な薄膜と酵素を組み合わせると交互累積膜を調製すると、グルコース共存下で薄膜の分解を誘発することも見出した。これは、酵素反応によりグルコースが酸化分解されて過酸化水素が発生し、薄膜中のボロン酸エステル結合を分解するためであることが判明した。以上の結果は、フェニルボロン酸修飾ポリマーを用いて調製した薄膜が、インスリン放出装置を開発する上で有用な材料であることを示している。

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10件)

Keisuke Suwa, Munenari Nagasaka, Satoshi Niina, Yuya Egawa, Toshinobu Seki, Jun-ichi Anzai, Sugar response of layer-by-layer films composed of poly(vinyl alcohol) and poly(aminoamine) dendrimer bearing 4-carboxyphenylboronic acid, *Colloid & Polymer Science*, 293, 1043-1048 (2015). 査読有、DOI 10.1007/s00396-014-3490-7

Ryota Watahiki, Katsuhiko Sato, Satoshi Niina, Keisuke Suwa, Yuya Egawa, Toshinobu Seki, Jun-ichi Anzai, Multilayer films composed of phenylboronic acid-modified dendrimers sensitive to glucose under physiological conditions, *Journal of Materials Chemistry B*, 2, 5809-5817 (2014). 査読有、DOI 10.1039/c4tb00676c

Katsuhiko Sato, Mao Takahashi, Megumi

Ito, Eiichi Abe, Jun-ichi Anzai, H₂O₂-induced decomposition of layer-by-layer films consisting of phenylboronic acid-bearing poly(allylamine) and poly(vinyl alcohol), *Langmuir*, 30, 9247-9250 (2014). 査読有、DOI 10.1021/la50175s

Katsuhiko Sato, Masaru Seno, Jun-ichi Anzai, Release of insulin from calcium carbonate microcapsules with and without layer-by-layer thin coatings, *Polymers*, 6, 2157-2165 (2014). 査読有、DOI 10.3390/polym6082157

Ryosuke Hashide, Kentaro Yoshida, Yasushi Hasebe, Masaru Seno, Shigehiro Takahashi, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, *Journal of Manoscience & Nanotechnology*, 14, 3100-3105 (2014). 査読有、DOI 10.1166/jnn.2014.8562

Kentaro Yoshida, Yasushi Hasebe, Shigehiro Takahashi, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Layer-by-layer deposited nano- and micro-assemblies for insulin delivery: A review, *Materials Science & Engineering C*, 34, 384-392 (2014). 査読有、DOI 10.1016/j.msec.2013.09.045

Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Dendrimers in layer-by-layer assemblies: synthesis and applications, *Molecules*, 18, 8440-8460 (2013). 査読有、DOI 10.3390/molecules18078440

Katsuhiko Sato, Takuto Shiba, Jun-ichi Anzai, Ion permeability of free-suspended layer-by-layer (LBL) films prepared using an alginate scaffold, *Polymers*, 5, 696-705 (2013). 査読有、DOI 10.3390/polym5020696

Yu Tokuda, Toshihide Miyagishima, Koji Tomida, Baozhen Wang, Shigehiro Takahashi, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Dual pH-sensitive layer-by-layer films containing amphoteric poly(diallylamine-co-maleic acid), *Journal of Colloid & Interface Sciences*, 399, 26-32 (2013). 査読有、DOI 10.1016/j.jcis.2013.02.039

Baozhen Wang, Yu Tokuda, Koji Tomida, Shigehiro Takahashi, Katsuhiko Sato, Jun-ichi Anzai, Use of amphoteric copolymer films as sacrificial layers for constructing free-standing layer-by-layer films, *Materials*, 6, 2351-2359 (2013). 査読有、DOI 10.3390/ma6062351

[学会発表](計20件)

佐藤 勝彦、生理条件下でグルコースに応答する多層薄膜の調製、日本薬学会第

135回年会、2015年3月28日、兵庫医療大学(兵庫県神戸市)

諏訪 佳祐、フェニルボロン酸 dendリマー累積膜のpH及び糖応答性、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

高橋 麻緒、フェニルボロン酸累積膜のグルコース応答、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

伊藤 愛望、フェニルボロン酸交互累積膜の過酸化水素応答、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

淡路 一真、フェニルボロン酸修飾 dendリマーを用いた交互累積膜の糖と過酸化水素応答、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

西山 智弘、フェニルボロン酸 dendリマー累積膜の応答性：修飾率および置換基の効果、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

瀬野 大、修飾率の異なるフェニルボロン酸ポリマー累積膜のpH及び糖応答性、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

阿部 鉄一、過酸化水素によるボロン酸エステルの酸化反応を利用した色素放出、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

皆木 大知、フェニルボロン酸ポリマー修飾電極の糖応答性、第53回日本薬学会東北支部大会、2014年10月5日、いわき明星大学(福島県いわき市)

佐藤 勝彦、過酸化水素に応答する交互累積膜の調製、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本大学(熊本県熊本市)

皆木 大知、フェニルボロン酸累積膜修飾電極の糖応答性、日本薬学会第134年会、2014年3月28日、熊本大学(熊本県熊本市)

綿引 遼太、ニトロフェニルボロン酸修飾 dendリマー累積膜の調製と糖応答性、第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日、東北大学(宮城県仙台市)

高橋 麻緒、フェニルボロン酸累積膜の過酸化水素応答、第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日、東北大学(宮城県仙台市)

諏訪 佳祐、異なるポリマーを用いたフェニルボロン酸修飾 dendリマー交互累積膜の調製、第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日、東北

大学（宮城県仙台市）

瀬野 大、インスリンを含有する炭酸カルシウム粒子の調製、第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日、東北大学（宮城県仙台市）

綿引 遼太、デンドリマーを用いた交互累積膜の調製、平成25年度日本分析化学会東北支部若手交流会、2013年7月20日、秋保温泉（宮城県仙台市）

橋出 良輔、インスリン累積膜を被覆したマイクロ粒子の調製、第51回日本薬学会東北支部大会、2012年10月7日、青森大学（青森県青森市）

綿引 遼太、フェニルボロン酸修飾デンドリマー累積膜の調製、第51回日本薬学会東北支部大会、2012年10月7日、青森大学（青森県青森市）

橋出 良輔、ポリカチオン-インスリン交互累積膜被覆マイクロ粒子の調製と放出制御、みちのく分析科学シンポジウム2012、2012年7月21日、山形大学（山形県米沢市）

綿引 遼太、フェニルボロン酸修飾デンドリマー累積膜の糖応答性、みちのく分析科学シンポジウム2012、2012年7月21日、山形大学（山形県米沢市）

〔図書〕（計1件）

Katsuhiko Sato, Shigehiro Takahashi, Jun-ichi Anzai, Wiley-VCH, Multilayer Thin Films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials, 2012, 765-776.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安齋 順一 (ANZAI, Jun-ichi)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：40159520

(2) 研究分担者

佐藤 勝彦 (SATO, Katsuhiko)
東北大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：80400266

(3) 連携研究者

江川 祐哉 (EGAWA, Yuya)
城西大学・薬学部・准教授
研究者番号：90400267