

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460031

研究課題名(和文)新規の応答機構によるインスリン放出ナノカプセルの開発

研究課題名(英文)Development of insulin-release nanocapsules based on novel response mechanism

研究代表者

佐藤 勝彦(Sato, Katsuhiko)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80400266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：グルコース刺激に応答分解するナノ薄膜を、あらかじめグルコースオキシダーゼ(GOx)層を被覆した石英板上にフェニルボロン酸(PBA)を修飾した高分子電解質とポリビニルアルコール(PVA)を交互に積層することで作製した。PBAとPVAはボロン酸エステル結合、GOxは静電的相互作用により固定化した。このナノ薄膜は生理条件下において安定であるがグルコース添加により速やかに分解した。これは、GOxの酵素反応によりグルコースから生成するH₂O₂が薄膜形成の駆動力であるPBAのC-B結合を切断するためである。このグルコースに応答して分解するナノ薄膜はインスリンドラッグデリバリーシステムに利用可能である。

研究成果の概要(英文)：Glucose-sensitive multilayer thin films were prepared by a layer-by-layer (LbL) deposition of phenylboronic acid (PBA)-bearing polyelectrolytes and poly(vinyl alcohol) (PVA) on the surface of glucose oxidase (GOx)-modified quartz slide. PBA and PVA layers were connected with each other through boronate ester bonds while GOx was immobilized electrostatically interactions. The films were stable in wide pH range from 3.0 to 9.0 in the absence of glucose. In contrast, the films decomposed in the presence of glucose. The glucose-induced decomposition of the film can be rationalized based on the scission of the carbon boron bond of PBA residues in PBA-polymer chains by hydrogen peroxide (H₂O₂) produced through the GOx-catalyzed oxidation reaction of glucose. The glucose-sensitive multilayer film may be useful for constructing insulin delivery systems.

研究分野：医歯薬系

キーワード：機能性薄膜 ドラッグデリバリーシステム カプセル インスリン フェニルボロン酸 過酸化水素

1. 研究開始当初の背景

国内の糖尿病人口は1067万人(2011年)を越えるとされており、効果的な薬物治療は重要な課題である。現在は治療薬としてインスリンが用いられるが、日常的に患者自身で頻りに注射剤として投与する必要があり、患者のQOLを向上させるためにインスリンの投与方法の改善が強く望まれる。しかし、注射剤以外のインスリン製剤の実現には、酵素による分解の抑制や吸収の促進など解決すべき課題が多く残っている。このような要求から、皮下留置型製剤としてブドウ糖の濃度が上昇したときにだけインスリンを放出する「人工膵臓」の開発が行われているが、いまだ実用に達していない。

このような理由により、これまでグルコースに応答する薄膜、微粒子、ゲル、ミクロカプセル、などが国内外で検討されてきた。グルコースを特異的に認識する応答素子としては酵素、レクチン、及びフェニルボロン酸(PBA)などが用いられている。特に低分子化合物であるPBAは安定であり分子デザインが容易であることから広く研究が行われている。

PBAはジオール構造と可逆的に結合する性質をもつことから、PBAを利用したインスリンの放出ではグルコースと競合反応を利用する(図1)。しかし、グルコースとPBAの親和性は小さく十分な競合反応が進行しないために、現状ではある程度のグルコース応答を示すものの、実用レベルには至っていない。即ち、糖尿病を示す血糖値(～200 mg/dL)への応答が低く、また生理的pHでの応答が不十分なケースも多い。申請者らも、薄膜、微粒子、カプセル等を担体としたインスリンの放出デバイスについて検討し、グルコースに反応する系も開発してきたが、性能をさらに向上させる必要がある。

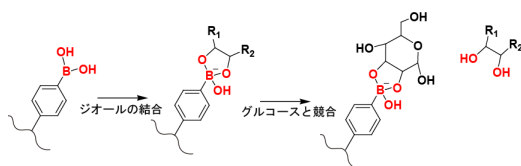


図1 PBAのグルコース競合反応

2. 研究の目的

本研究では、新たなグルコース応答機構としてフェニルボロン酸(PBA)が H_2O_2 によって酸化分解する反応と酵素反応を組み合わせることで、グルコースに反応して速やかにインスリンを放出する交互累積膜を調製することを目的に研究を行った(図2)。PBAが H_2O_2 により酸化分解される化学反応は鋭敏であり生理条件下の水溶液中においても進行する。一方、酵素は基質特異性および反応速度に優れた生体触媒であるため、グルコース応答性の大幅な改善が期待できる。また、

この薄膜で微粒子を被覆もしくはナノカプセルを作製し、血糖値の上昇に応じて自動的にインスリンを放出する人工膵臓用材料へと発展させる。つまり、薄膜に固定化された酵素がグルコースを酸化して生成する H_2O_2 によってPBAが分解しインスリンが放出される。

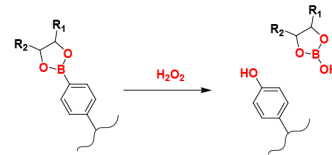


図2 PBAと H_2O_2 の化学反応

3. 研究の方法

本研究では、新しい反応を利用して、グルコース濃度が200 mg/dL程度で自動的にインスリンを放出するナノ薄膜を検討し、この薄膜で微粒子およびナノカプセルを作製する。ナノ薄膜およびナノカプセルの作製には交互累積膜法を用い、研究は以下の項目について行った。

1) H_2O_2 応答によるモデル色素放出

はじめに、PBAと H_2O_2 の反応性をモデル色素を用いて検討した。ジオール構造を含む交互累積膜を調製し、PBA部位を有する低分子化合物(モデル色素)を吸着後に、 H_2O_2 添加による放出挙動を調査した。

2) H_2O_2 応答による薄膜分解の検討

PBAとジオールとの結合を駆動力して交互累積膜を調製し H_2O_2 添加による膜の分解挙動を観察した。膜材料および構造の差異による分解条件の変化を調査した。

3) 酵素を加えたナノ薄膜の作製

グルコース酸化酵素(GOx)を1)および2)で検討した累積膜に固定化しグルコースに対する応答性を調査した。酵素の固定化量や薄膜中の存在位置などは交互累積膜法を用いることで容易に調製可能であるのでこれらの最適な条件を検討した。

4) インスリン放出ナノカプセルの作製

3)で得られた結果をもとに、インスリン放出微粒子およびナノカプセルを試作した。作製したナノ薄膜およびナノカプセルにインスリンを吸着させ、 H_2O_2 およびグルコース添加による放出挙動を調査した。

4. 研究成果

1) H_2O_2 応答によるモデル色素放出

はじめに、PBAと H_2O_2 の反応性をモデル色素(3-(Dansylamino)phenylboronic acid)を用いて調査を行った。ジオール構造を含む

交互累積膜を調製し、PBA 部位を有するモデル色素をボロン酸エステル結合を介して吸着後に、 H_2O_2 添加による放出挙動を調査した (図 3)。

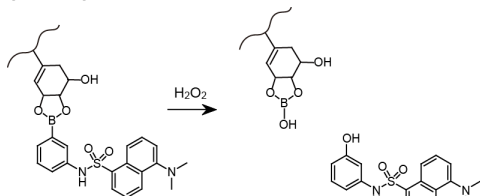


図 3 H_2O_2 添加による DPBA の放出機構

交互累積膜の形成およびモデル色素の吸着を水晶振動子マイクロバランス法および紫外可視分光法において確認した。シキミ酸を化学修飾したポリアリルアミンとポリスチレンスルホン酸を用いることで良好なナノ薄膜を得た。この薄膜を磁性粒子上に被覆しモデル色素を吸着させることで H_2O_2 応答粒子とした (図 4)。

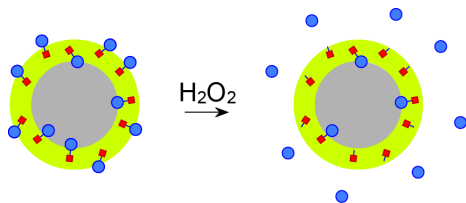


図 4 DPBA の放出

この微粒子の分散液に H_2O_2 を添加したところ濃度に依存した速やかなモデル色素の放出がみられた (図 4)。また放出した色素を分析したところ、フェノール誘導体であり期待した反応機構による放出であることが示された。また、このナノ薄膜をあらかじめグルコースオキシダーゼ (Glucose Oxidase: GOx) 層を被覆した磁性粒子上に被覆することで作成した粒子は、中性条件において数 mM のグルコースに対する応答を確認できた。これらの結果から、PBA が H_2O_2 により分解される機構と GOx の酵素反応を組み合わせたことで、生理条件下におけるインスリン放出システムが開発できる可能性が示唆された。

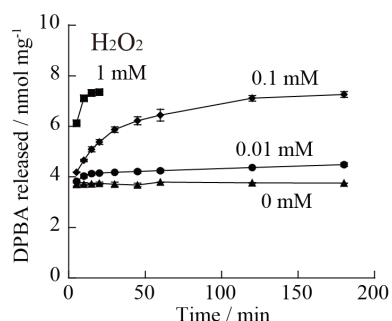


図 5 微粒子からの DPBA の放出

2) H_2O_2 応答による薄膜分解の検討

これまで検討が行われてきた、PBA とジオール化合物の競合作用を利用したグルコース応答薄膜は、中性水溶液において PBA とグルコースの親和性が小さいためインスリン放出システムに用いるためには十分な膜分解反応は起こらなかった。そこで、PBA が H_2O_2 によりフェノールへと酸化される化学反応に注目した。この反応は H_2O_2 に対して中性の水溶液中においても鋭敏に進行するため、活性酸素種の検出および薬物送達システムの開発などにも用いられている。はじめに、PBA とジオールとのボロン酸エステル結合を利用して交互累積膜を調製し、この薄膜が H_2O_2 添加によるボロン酸の酸化反応とそれに伴う薄膜の分解が起こるか確認した (図 6)。

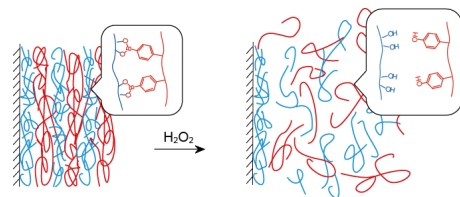


図 6 H_2O_2 添加による累積膜の分解

種々の薄膜材料を検討したところ、PBA が 25% 程度修飾されたポリアリルアミンとポリビニルアルコールにおいて非常に安定な累積膜が調製可能であった。このナノ薄膜を、0.1 mM 程度の H_2O_2 溶液に浸漬すると速やかな膜分解反応が認められた。分解溶液の吸収スペクトルなどの測定から期待したような反応機構により分解していることを確認した。

3) 酵素を加えたナノ薄膜の作製

先に検討した H_2O_2 応答薄膜にグルコースオキシダーゼ (Glucose Oxidase: GOx) の酵素反応を組み合わせたグルコース応答機構を検討した。図 7 に示すように、GOx の酵素反応によりグルコースから生成された H_2O_2 が累積膜形成の駆動力であるボロン酸エステル結合を開裂することにより膜が分解することを期待した。

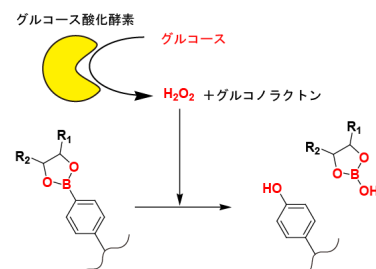


図 7 グルコースによるナノ薄膜の分解機構

あらかじめ GOx 層を被覆した石英基板上

に、2)で検討した薄膜を被覆することでグルコース応答薄膜とした。この薄膜は pH 変化やイオン強度、競合物質である糖類に対して安定であるが、0.1 mM 程度のグルコースに対して鋭敏な分解応答を示した。図 8 に GOx を含む H₂O₂ 応答薄膜の作成過程、および pH 7.4 緩衝溶液中でのグルコース添加時の水晶振動子マイクロバランス法測定結果を示す。共振周波数変化 (F) の減少は基板上への物質の吸着、増加は基板からの剥離を表す。初め、GOx の添加によって F の減少がみられ水晶振動子上への GOx の層の形成が確認できる。その後の PBA 修飾ポリアリルアミンとポリビニルアルコールの積層操作でも同様に F の減少し GOx を含む交互累積膜 (ナノ薄膜) が調製できていることが確認できた。ここに 0.1 mM のグルコースを添加すると F の上昇がみられ、1 mM グルコースでは F の急激な増加がみられ、グルコースの添加による膜の分解応答が確認できた。GOx 層と次の PBA-PAH 層は静電的相互作用により結合しているため H₂O₂ により崩壊しないことを考慮すると PBA とジオールのエステル結合を駆動力としているナノ薄膜は完全に分解しているの見積もられる。同様に AFM 観察からも生理条件下におけるグルコースに対する膜の分解挙動を確認することができた。このナノ薄膜の膜厚はおよそ 42 nm 程度であるが、グルコース処理により 4 nm まで減少した。

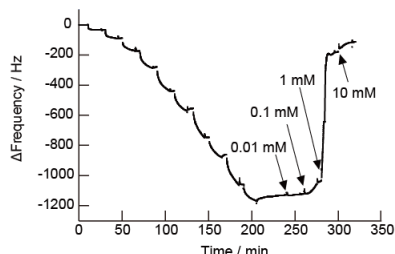


図 8 グルコース応答薄膜の作成過程、および pH 7.4 緩衝溶液中でのグルコース添加時の振動数変化

4) インスリン放出ナノカプセルの作製

これまで作製したグルコース応答ナノ薄膜を、製膜後にインスリン溶液に浸漬することで吸着させインスリン放出薄膜を作製した。このナノ薄膜のグルコース刺激におけるインスリン放出を検討した (図 9)。

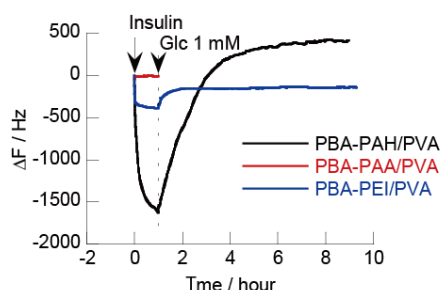


図 9 ナノ薄膜へのインスリン吸着と放出

正電荷を有する高分子電解質 (polyallylamine, PAH および polyethylenimine, PEI) より作成したナノ薄膜へのインスリンの吸着がみられた。一方、負電荷を有するポリアクリル酸 (polyacrylic acid, PAA) などを用いて作製したナノ薄膜には吸着しなかった。つまり、インスリンはナノ薄膜へ静電的引力により吸着していると考えられる。また、吸着したインスリン量により膜応答性が減弱することが確認できた。これはナノ薄膜の構成成分である PAH とインスリンの静電的相互作用の影響である、これらのことから膜材料を適切に選択することによりインスリン量や膜応答性をコントロールできる可能性が示唆された。

インスリン吸着および放出挙動を示した交互累積膜を炭酸カルシウム粒子に被覆しその後、EDTA 処理を行うことでカプセルを作製することを試みた。しかし、調製操作中に粒子が凝集してしまいカプセルの作製が困難であった。これは、PVA 層を微粒子上へ被覆時に粒子の電荷がなくなるため粒子同士が結合しやすくなるからである。そこで、カプセル作製には粒子間の電荷の反発が必要であると考え、これまで得られた知見をもとに適当な高分子電解質を選定し、PBA とジオール化合物をそれぞれ化学修飾したものを合成しカプセル材料として作製した。その結果、インスリンを内部に封入したカプセルを調製することに成功した (図 10)。

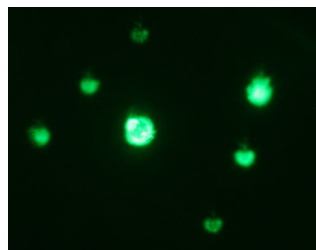


図 10 試作したカプセルの蛍光顕微鏡画像

PBA が H₂O₂ によってフェノールに酸化分解される反応とグルコースオキシダーゼの酵素反応を組み合わせることによって、生理条件下において数ミリモル程度のグルコース刺激によりインスリンを放出するナノ薄膜の開発に成功した。また、これらの薄膜を炭酸カルシウム粒子に被覆し、その後、粒子を溶解することでカプセルを作製した。しかし、糖尿病治療に用いるインスリン放出システムの構築のために応答性の向上や最適化をする必要がある。

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 3件)

1. Glucose-induced decomposition of layer-by-layer films composed of phenylboronic acid-bearing poly(allylamine) and poly(vinyl alcohol) under physiological conditions, Katsuhiko Sato, Mao Takahashi, Megumi Ito, Eiichi Abe, Jun-Ichi Anzai, Journal of Materials Chemistry B, 3, 7796-7802 (2015). doi: 10.1039/c5tb01006c [査読有り]
2. H₂O₂-Induced Decomposition of Layer-by-Layer Films Consisting of Phenylboronic Acid-Bearing Poly(allylamine) and Poly(vinyl alcohol), Katsuhiko Sato, Mao Takahashi, Megumi Ito, Eiichi Abe, Jun-ichi Anzai, Langmuir, 30, 9247-9250 (2014). doi: 10.1021/la501750s [査読有り]
3. Loading and release of fluorescent dye from layer-by-layer film-coated magnetic particles in response to hydrogen peroxide, Katsuhiko Sato, Eiichi Abe, Mao Takahashi, Jun-ichi Anzai, Journal of Colloid and Interface Science, 432, 92-97 (2014). doi: 10.1016/j.jcis.2014.06.039 [査読有り]

〔学会発表〕(計 4件)

1. Glucose-induced decomposition of multilayer film under physiological conditions, Katsuhiko Sato, Eiichi Abe, Jun-ichi Anzai, Pacificchem 2015, December 17, 2015, Honolulu, Hawaii.
2. 過酸化水素およびグルコース分解ナノ薄膜の開発, 佐藤勝彦, 阿部瑛一, 安斉順一, 日本分析化学会第 64 年会, 2015 年 9 月 11 日, 福岡
3. 生理条件下でグルコースに応答する多層薄膜の調製, 佐藤勝彦, 高橋麻緒, 安斉順一, 日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 28 日, 神戸
4. 過酸化水素に応答する交互累積膜の調製, 佐藤勝彦, 高橋麻緒, 阿部瑛一, 安斉順一, 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日, 熊本

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
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

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：