

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750174

研究課題名(和文)ポリ乳酸のホモ/ヘテロステレオコンプレックス形成を駆動力とするナノ粒子の創製

研究課題名(英文) Fabrication of self-assembled nanoparticles using homo/hetero-stereocomplex formation of poly(lactide)

研究代表者

赤木 隆美 (AKAGI, Takami)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任研究員(常勤)

研究者番号：00527236

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ポリ(-グルタミン酸)(-PGA)の側鎖カルボキシル基にポリ(L-乳酸)(PLLA)およびポリ(D-乳酸)(PDLA)をそれぞれ導入した -PGA-PLLAおよび -PGA-PDLAグラフト共重合体より、PLAのステレオコンプレックス(SC)形成を駆動力とするナノ粒子を調製した。得られたSCナノ粒子は、-PGA-PLLAのみからなるホモ粒子と比較して高い熱力学的安定性、加水分解耐性を示した。また、ワクチン抗原を内包したSCナノ粒子は優れた免疫誘導効果を示し、蛋白質やペプチドキャリアとしての有用性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Self-assembled nanoparticles (NPs) composed of poly(-glutamic acid) (-PGA) as a hydrophilic backbone and enantiomeric poly(lactide) (PLA) as a hydrophobic side chain were prepared using stereocomplex (SC) formation of PLA. The -PGA-PLA SC NPs exhibit a lower critical aggregation concentration (CAC) as well as stronger kinetic stability compared with the corresponding isomer NPs. Moreover, mouse immunization with ovalbumin (OVA)-encapsulated SC NPs predominantly induced OVA-specific cellular immunity. The findings suggest that the -PGA-PLA SC NPs are suitable for protein-based vaccines that are used to induce cellular immunity, such as for infectious diseases, cancer, allergies and autoimmune diseases.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノ粒子 ポリ乳酸 ステレオコンプレックス ドラッグデリバリーシステム ワクチン

1. 研究開始当初の背景

高分子系ナノ粒子の調製には、高分子鎖の分子間および分子内での相互作用による自発的会合が粒子形成の駆動力として利用されている。中でも、両親媒性高分子は、水溶液中において疎水性部の会合と親水性部の水への微視的な溶解に伴うミクロ相分離によって様々なナノ粒子(ミセル、ナノゲル粒子、ベシクル等)を形成し、疎水性薬剤、蛋白質、ペプチド、遺伝子等のドラッグデリバリーシステム(DDS)のキャリアとして応用されている。ナノ粒子を薬物の徐放、細胞内デリバリーおよび体内動態制御のキャリアとして用いるには、1) 安全性、2) 生理環境下での安定性、3) 薬物固定化のための反応性官能基(COOH, NH₂)の保持、4) 加水分解・酵素分解性および薬物の放出挙動の制御などのパラメーターを各薬物において精密に制御する必要がある。しかし、疎水性会合を架橋点としたミセル等においては、臨界会合濃度(CAC)以上では高い安定性を示すが、希釈条件下においてはポリマーの解離が起り、生理的環境下での使用が制限される。そのため、粒子の化学架橋による安定化が試みられているが、架橋後の粒子物性変化や、粒子間での架橋が問題となり、粒子の安定性を向上させる新たな手法の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、ポリ乳酸(PLA)のステレオコンプレックス(SC)形成に着目し、ポリアミン酸(親水性)とPLA(疎水性)からなる両親媒性高分子を用いて、SC形成を駆動力としたナノ粒子の形成と機能について評価を行った(図1)。光学異性体であるPLLAとPDLAは1:1のSC結晶(ラセミ結晶)を形成することが知られている。SCはPLLAおよびPDLA単独からなるホモ結晶と比較して物理的・化学的安定性に優れており、その物性や分解性はSCの結晶化度に大きく依存する。そのため、親水部として反応性官能基を有するポリアミノ酸を用い、コアの形成にPLA SCを利用することで、安定性、薬物担持、分解性を制御可能な新規DDSキャリアの創製が期待される。また、PDLAはL-配置ペプチドとhetero-SCを形成することが報告されており、ポリアミノ酸-PDLAとペプチド間で形成されるhetero-SCを粒子形成の駆動力とペプチド担持に利用した新規ペプチドキャリアを開発した。

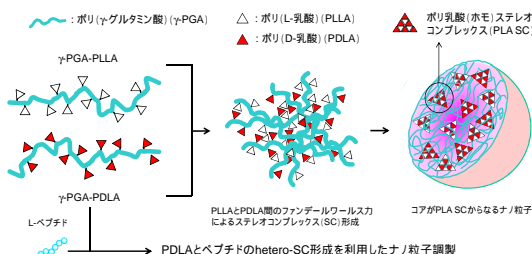


図1. PLA SC形成を駆動力としたナノ粒子形成の模式図

3. 研究の方法

ポリ乳酸のSCおよびhetero-SC形成を駆動力としたナノ粒子を調製し、安定性、薬物担持/放出、分解性等を解析し、薬物キャリアとしての機能を評価した。

(1) ポリ(γ-グルタミン酸) - ポリ乳酸(γ-PGA-PLA) グラフト共重合体(γ-PGA-PLLA および γ-PGA-PDLA)を合成し、PLA SCコアからなるγ-PGA-PLLA/PDLA ナノ粒子を調製した。

(2) γ-PGA-PLLA/PDLA ナノ粒子の物性(粒径、SC結晶化度、安定性、分解性、薬物担持能)を評価し、SC結晶化度の違いによる物性制御を行った。

(3) 得られた蛋白質内包ナノ粒子の細胞内取込みおよび動態を評価し、ワクチンキャリアとしての有効性をマウス免疫実験により評価した。

(4) γ-PGA-PDLAとペプチド間のhetero-SC形成を利用したナノ粒子を調製し、ペプチド担持/放出挙動を検討し、ペプチドキャリアとしての機能を評価した。

4. 研究成果

(1) γ-PGA-PLLA/PDLA ナノ粒子の調製と物性評価: γ-PGAの側鎖カルボキシル基に末端アミンのポリ(L-乳酸)(PLLA)およびポリ(D-乳酸)(PDLA)をそれぞれ導入したγ-PGA-PLLAおよびγ-PGA-PDLAグラフト共重合体を合成した。得られたγ-PGA-PLLAとγ-PGA-PDLAの混合溶液(溶媒:DMSO)を水に添加することでナノ粒子の形成が認められ(粒径100-300 nm)(図2)、X線回折(XRD)測定により、粒子内部にはPLLA/PDLAからなるSCが形成されていることが明らかとなった。得られたSCナノ粒子は、γ-PGA-PLLAのみからなるホモ粒子と比較して高い熱力学的安定性を示し、この安定性は粒子のSC結晶化度に依存していた。

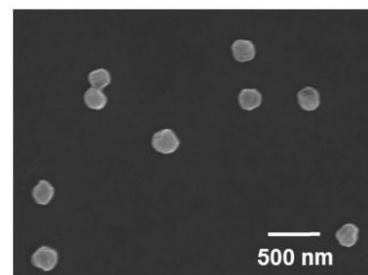


図2. γ-PGA-PLLA/PDLA ナノ粒子(PLA content 55-60 wt%のγ-PGA-PLLAおよびγ-PGA-PDLAを使用)の透過型電子顕微鏡写真。

(2) 蛋白質キャリアとしての機能評価: γ-PGA-PLLAとγ-PGA-PDLAからなるSCナノ粒子の蛋白質・ペプチドキャリアとして

の機能を評価した。SC ナノ粒子は、粒子内部に蛋白質を効率よく内包することができ、また粒子表面に存在するカルボキシル基を利用することで、ペプチドを化学固定により担持させることが可能であった。卵白アルブミン (OVA) を内包した SC ナノ粒子 (OVA-SC NPs) と γ -PGA-PLLA のみからなる OVA 内包粒子 (OVA-L NPs) の OVA 放出挙動を検討した結果、アルカリ条件 (pH10) において OVA 放出挙動に大きな違いが観察され、OVA-SC NPs では OVA 放出速度が遅い傾向を示した。OVA-SC NPs では、粒子内部に多くの SC が形成され、アルカリ加水分解が抑制されたためだと考えられる。

(3) 蛋白質内包ナノ粒子のワクチンアジュバント機能: γ -PGA-PLA SC ナノ粒子のワクチンキャリアとしての機能評価として、モデル抗原である OVA を内包したナノ粒子を調製し、樹状細胞によるナノ粒子の取込み、内包 OVA の細胞内分解挙動、マウス免疫実験による免疫応答を調べた。粒径 200 nm の OVA 内包 SC ナノ粒子は樹状細胞に効率よく取り込まれ、細胞内での内包蛋白質の分解を抑制することで、抗原特異的な細胞性免疫を優先的に誘導できることが明らかとなった (図 3)。PLLA の疎水性相互作用からなるナノ粒子に比べ、SC ナノ粒子では、高い安定性、細胞内での内包抗原の分解を抑制することが可能であり、細胞性免疫を優位に誘導できる特長を有していた。

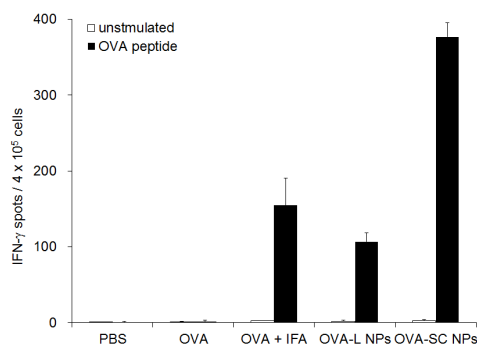


図 3. OVA-SC NPs のマウス皮下投与後の OVA 特異的な細胞性免疫の誘導効果。各サンプルをマウスに投与後、脾細胞中の OVA 特異的な IFN- γ 産生細胞を ELISPOT により検出した結果、OVA-SC NPs では、他のアジュバント (IFA) や OVA-L NPs よりも高いワクチン効果が認められた。

(4) Hetero-SC 形成を利用したナノ粒子の調製: PDLA と L-ペプチドの hetero-SC 形成を利用したナノ粒子調製を検討した結果、アセトニトリル中で γ -PGA-PDLA と L-ペプチド (9 mer) を混合することでナノ粒子の形成が確認され、新規ペプチドキャリアとしての有用性を実証した。

本研究では、PLA の SC 形成を会合体形成の駆動力とした新規な生分解性ナノ粒子を

創製し、DDS としての応用の可能性を示した。 γ -PGA-PLA SC ナノ粒子は、ワクチンキャリアとして細胞性免疫を優位に誘導できる特長を示した。このことより、がんや自己免疫疾患などの細胞性免疫の選択的な誘導が求められる免疫疾患に対する有用なキャリア開発に繋がると期待される。

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. 赤木隆美, 明石 満, ナノ粒子アジュバントを用いたワクチン開発, 最新医学 69, p81-89 (2014) (査読無).
2. T. Akagi, Y. Zhu, F. Shima, M. Akashi, Biodegradable nanoparticles composed of enantiomeric poly(γ -glutamic acid)-graft-poly(lactide) copolymers as vaccine carriers for dominant induction of cellular immunity. Biomaterials Sci. 2, 530-537 (2014) (査読有). DOI: 10.1039/C3BM60279F
3. Y. Zhu, T. Akagi, M. Akashi, Self-assembling stereocomplex nanoparticles enantiomeric poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) graft copolymers as a protein delivery carrier. Macromol. Biosci. 14, 576-587 (2014) (査読有). DOI: 10.1002/mabi.201300434

[学会発表](計 8 件)

1. Takami Akagi, Fumiaki Shima, Tomofumi Uto, Mitsuru Akashi, Manipulating the antigen-specific immune responses by particulate adjuvants consisting of amphiphilic poly(amino acid). The 10th SPSJ International Polymer Conference (IP 2014), 2014 年 12 月 2-5 日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市).
2. Mitsuru Akashi, Fumiaki Shima, Tomofumi Uto, Paninee Chetprayoon, Michiya Matsusaki, Takami Akagi, Masanori Baba, Design and Creation of Nanoparticles by Assembly of Amphiphilic Poly(amino acid) and Their DDS Applications. 11th France-Japan DDS Symposium, 2014 年 10 月 5-8 日, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市).
3. 赤木隆美, 朱 葉, 明石 満, ステレオコンプレックス形成を使用したポリ(γ -グルタミン酸) - ポリ乳酸グラフト共重

合体からなるナノ粒子の調製とワクチンキャリアとしての機能評価. 第 63 回高分子年次大会, 2014 年 5 月 28-30 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市).

4. Ye Zhu, Takami Akagi, Mitsuru Akahi, Self-assembling stereocomplex nanoparticles by enantiomeric poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) graft copolymers as a protein delivery carrier. The 12th US-Japan Symposium Drug Delivery System Conference, 2013 年 12 月 16-20 日, Lahaina (Maui, Hawaii).
5. 朱 葉, 赤木隆美, 明石 満, ポリ(γ -グルタミン酸) - ポリ乳酸グラフト共重合体のホモ / ヘテロステレオコンプレックス形成を利用した蛋白質 / ペプチド担持ナノ粒子の調製. 第 52 回高分子討論会, 2013 年 9 月 11-13 日, 金沢大学角間キャンパス (石川県金沢市).
6. 朱 葉, 赤木隆美, 明石 満, Self-assembling of peptide-conjugated heterostereocomplex nanoparticles by enantiomeric poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) graft copolymers, 日本バイオマテリアル学会 第 8 回関西若手発表会, 2013 年 8 月 31 日, 大阪大学銀杏会館 (大阪府吹田市).
7. 朱 葉, 赤木隆美, 明石 満, Stereocomplex formation between enantiomeric poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) graft copolymers: Characterization and application as protein delivery carriers. 第 59 回高分子発表会 (神戸), 2013 年 7 月 12 日, 兵庫県民会館 (兵庫県神戸市).
8. Ye Zhu, Takami Akagi, Mitsuru Akahi, Self-assembling stereocomplex nanoparticles by enantiomeric poly(γ -glutamic acid)-poly(lactide) graft copolymers as a protein delivery carrier. 第 62 回高分子年次大会, 2013 年 5 月 29-31 日, 京都国際会館 (京都府京都市).

〔図書〕(計 2 件)

1. 赤木隆美, 明石 満, 第 1 編 第 8 章 医療用材料としてのポリグルタミン酸, 進化する医療用バイオベースマテリアル, シーエムシー出版, p80-90 (2015).
2. T. Akagi, M. Akashi, Functional nanoparticles for vaccine delivery systems (Chapter 12), Engineered Cell Manipulation for Biomedical

Applications (Volume editor: M. Akashi, T. Akagi, M. Matsusaki). Nanomedicine and Nanotoxicology (Springer), 205-228 (2014).

〔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
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/akashi/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
赤木 隆美 (AKAGI, Takami)
大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任研究員 (常勤)
研究者番号: 00527236