

ナノゲル工学による新規DDSの開発

澤田晋一・秋吉一成*

京都大学 大学院工学研究科 高分子化学専攻
〒615-8510 京都市西京区京都大学桂

Nanogel Engineering for Development of New Drug Delivery System

Shin-ichi Sawada and Kazunari Akiyoshi*

Department of Polymer Chemistry, Graduate School of Engineering, Kyoto University,
Katsura, Nishikyo-ku, Kyoto 615-8510, Japan

Nanosize hydrogels (nanogels) are polymer nanoparticles with three-dimensional networks formed by chemical and/or physical cross-linking of polymer chains. We reported for the first time physically cross-linked nanogels by self-assembly of amphiphilic polysaccharides in water. Biomedical applications of nanogels have made rapid progress in the last 10 years. A current challenge is the development of strategies for the delivery of more fragile drugs such as proteins which are easily unfolded or inactivated under physiological conditions. To overcome this issue, the chaperone-like function of the polysaccharide nanogels is an important concept that can lead to breakthroughs in the effective delivery of proteins. Here, we report recent progress in polysaccharide nanogel engineering for protein delivery.

Key words : amphiphilic polysaccharide / self-assembly / nanogel / nanogel engineering / drug delivery system

1. はじめに

ナノゲルは、粒径が100ナノメートル以下でゲル構造を有するナノ粒子と定義されている。その空間内は架橋されたポリマー鎖の3次元網目構造を有しており、高含水率であることや体積相転移がマクロゲルに比べて非常に速く、外部刺激に対して素早く応答することなどが特徴である。さらには、ゲルの3次元網目サイズに応じた物質の透過が可能であることから、内部にタンパク質・核酸など比較的大きなサイズの物質を取り込める点も大きな特徴である。そこ

で、ナノゲルをキャリアとしたドラッグデリバリーシステム (DDS) 応用が注目されている。近年では、生分解性高分子鎖を架橋領域とするナノゲルの設計や、温度、pH、光などの外部刺激に応答し、ゲルの可逆的な形成・崩壊による薬物徐放制御が可能なインテリジェントナノゲルの設計も多く報告されている¹⁾。我々は、部分疎水化した水溶性高分子 (会合性高分子) の自己組織化により物理架橋ナノゲルを調製する方法を開発した (Fig. 1)^{1,2)}。本稿では、両親媒性多糖からなる物理架橋ナノゲルの特性とDDS応用について我々の研究を紹介する。

2. 多糖ナノゲルの分子シャペロン機能

近年、抗体、サイトカイン、成長因子、抗原タンパク質などの生理活性タンパク質が様々な疾患の治

* Corresponding author

Tel: 075-383-2589

Fax: 075-383-2590

E-mail: akiyoshi@bio.polym.kyoto-u.ac.jp

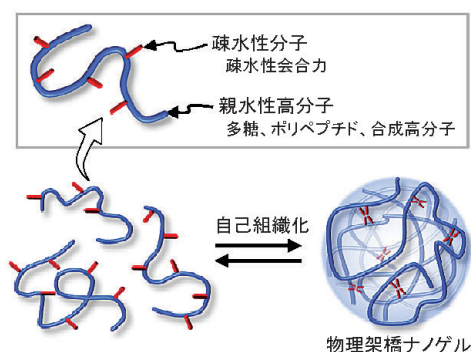


Fig. 1 Physically cross-linked nanogel.

療に用いられている。これら生理活性タンパク質の徐放制御と細胞内に効率よくデリバリーする技術の開発は益々重要となってきた。不安定なタンパク質の失活・凝集抑制は、タンパク質キャリア開発において解決すべき重要な課題のひとつである。生体系では、タンパク質のフォールディングやその機能を制御する分子シャペロンが存在している。我々は両親媒性多糖からなる自己組織化ナノゲルが分子シャペロン機能を発現することを見いだした³⁻⁵⁾。特に、コレステロール置換プルラン（CHP）ナノゲルは、天然の分子シャペロンと同様に、熱変性タンパク質や化学変性タンパク質の巻き戻り中間体を疎水的な会合力により選択的に捕まえることで、不可逆的な凝集を抑制する。ほとんどのタンパク質をそのゲルの内部空間に隔離した状態でトラップすることができる。さらに、ナノゲル内の物理架橋点を形成している疎水基がシクロデキストリンに包接、可溶化することでナノゲル構造を崩壊させる手法や過剰な他のタンパク質との交換反応により、複合化されたタンパク質をナノゲルから遊離しえることがわかった。

このような人工分子シャペロン機能を利用して、アミロイドβタンパク質の凝集とその細胞毒性を抑制することができた（Fig. 2）^{6,7)}。また、無細胞タンパク質発現系において、合成されたタンパク質の凝集をナノゲルは効果的に抑制し、そのフォールディング効率を促進しえることも明らかになった⁸⁾。これらのシャペロン機能を有する自己組織化多糖ナノゲルは、比較的安定性の低いタンパク質の凝集抑制機能や修復機能を有するDDSキャリアとして有用であることが明らかになってきた。

3. タンパク質の細胞内デリバリー

近年、遺伝子を介したタンパク質発現手法に代わって、タンパク質を直接細胞内に導入する研究も注目されている。その際、細胞内にタンパク質をデリ

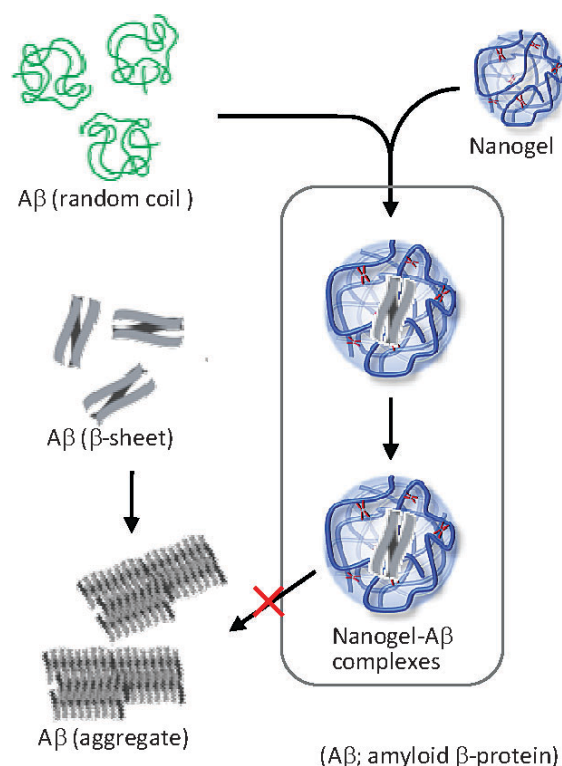


Fig. 2 Nanogels interact with amyloid β-protein (Aβ) to reduce the Aβ toxicity by preventing aggregation of Aβ.

バリーさせるタンパク透過ドメイン（Protein Transduction Domain: PTD）を用いるアプローチが広く用いられている⁹⁾。しかし、PTD融合タンパク質はその発現効率の低さやタンパク質そのものの凝集により、合成や精製が比較的困難であるなどの問題もある。また、カチオン性リポソーム、ポリマー微粒子やPTDを含む両親媒性ペプチドをキャリアとして用い、目的とするタンパク質を複合化し細胞内導入を行う手法も報告されているが、その効率は必ずしも高くない。

我々は、コレステロール置換プルラン（CHP）にカチオン性基としてエチレンジアミン基を導入したカチオン性CHPNH₂ナノゲル（～30 nm）を用いると細胞内へのタンパク質導入を効率よく行えることを明らかにした¹⁰⁾。その導入効率は、血清存在下、市販のカチオン性リポソーム、ペプチドキャリアを用いたシステムと比較しても高かった。細胞内に取り込まれたナノゲル複合体は細胞内で解離し、タンパク質を放出できることもわかった。また、ナノゲルは酵素（β-ガラクトシダーゼ）をその活性を保持したまま細胞内に導入でき、核内へのタンパク質導入も可能である。さらに、PTD融合タンパク質であるTAT導入蛍光タンパク質（TAT-GFP）を用いてもあまり細胞内導入が向上しない癌細胞系、免疫担当

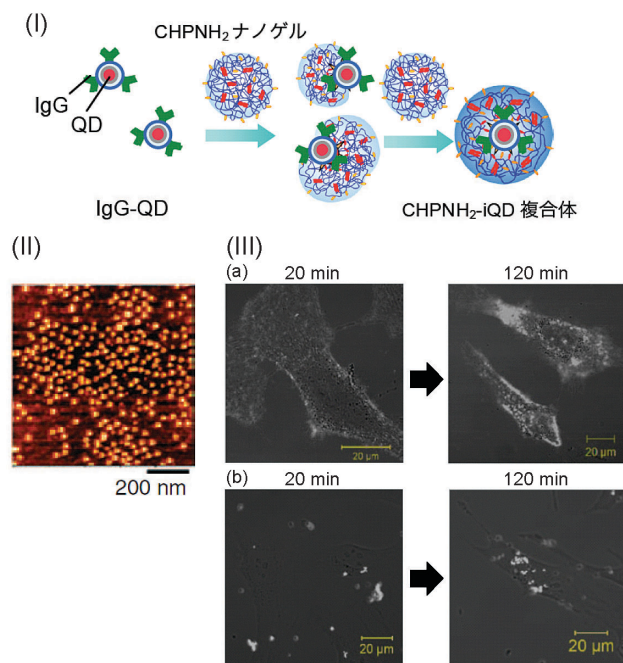


Fig. 3 (I) Schematic illustration of CHPNH₂-QD hybrid nanoparticle formation. (II) AFM image of CHPNH₂-QD hybrid nanoparticle. (III) Time course CLSM images of the cellular uptake of (a) CHPNH₂-iQD hybrid nanoparticle, (b) cationic liposome-iQD complex¹⁵⁾.

細胞 (B細胞, T細胞) においても, カチオン性ナノゲル系はキャリアとして高い細胞導入効率を示すことも明らかになった¹¹⁾.

カチオン性ナノゲルは導入したいタンパク質と混合するだけで, 細胞に取り込まれ易いナノサイズの複合体 (~50 nm) を自発的に形成しえること, さらに細胞内でシャペロン機能によりタンパク質を効率よく放出しえることが他のキャリアにはない大きな特徴である. 最近では, 核酸シャペロンとしての機能¹²⁾ や siRNA¹³⁾, プラスミド DNA¹⁴⁾ のデリバリーとしてもカチオン性ナノゲルが有用であることを報告している.

4. 量子ドットの細胞内デリバリー

近年, カチオン性ナノゲルと新しい蛍光色素として注目されている量子ドット (QD) のハイブリッドナノ粒子化によって, QD の細胞内への導入が簡便かつ高効率でおこなうことを見出した¹⁵⁾.

カチオン性 CHPNH₂ ナノゲルと IgG 標識 QD (1 粒子当たりの 2~3 分子の IgG を標識), およびプロテイン A 標識 QD (1 粒子当たりの 5~7 分子の protein A を標識) を混合するだけで, 複合体微粒子が形成した (Fig. 3 (I)). 原子間力顕微鏡 (AFM) による粒

子観察より, QD およびナノゲル単独の平均粒径はそれぞれ 14 nm, 25 nm であった. 一方, ナノゲルと QD との複合化により粒径が増加し, N/Q = 10 (N/Q 比; ナノゲル濃度/QD 濃度) における平均粒径は IgG-QD 複合体では 33 nm, protein A-QD 複合体では 38 nm であった (Fig. 3 (II)). また, タンパク質の種類や標識数に依らず, 単分散で球状の複合体粒子を形成した. これらのことから, 複合体はナノゲルと QD 標識のタンパク質とを介した自己組織化により複合化し, ナノサイズのハイブリッド粒子を形成することが明らかになった.

次に複合体と HeLa 細胞との相互作用を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察により調べたところ, ナノゲル-QD 複合体は添加直後より細胞表面に吸着され, 徐々に細胞内部へ導入された. 一方でカチオン性リポソーム-QD 複合体では細胞内外において凝集状態で存在していた (Fig. 3 (III)). さらに, ウサギ間葉系幹細胞 (MSC) に複合体を導入して長期培養を行ったところ, 培養 2 週間後においても QD の蛍光が観察でき, 産生されるコラーゲン量の大きな減少はみられなかった¹⁵⁾. 以上のことから, ナノゲル-QD 複合体は長期にわたる細胞トラッキング可能なナノマテリアルとして有用であることが示唆された.

5. ナノゲル DDS による免疫治療

5.1 サイトカインの徐放制御と癌治療

サイトカインを用いた免疫療法においては, 生体内での不安定性 (短い半減期) や, 大量・反復投与による副作用などが問題となっている. 我々は, インターロイキン 12 (IL-12) を用いたサイトカイン癌免疫療法において, CHP ナノゲルが皮下投与インジェクタブルゲルとして優れていることを明らかとした¹⁶⁾. IL-12 と CHP ナノゲルは混合するだけで容易に安定な複合体ナノゲルが得られ, マウス皮下投与によって IL-12 の血中濃度が比較的長期間維持された. 皮下繊維肉腫移植モデルマウスの治療効果も認められた¹⁷⁾.

CHP ナノゲルを高濃度条件下 (30 mg/mL 以上) にて調製すると流動性を失い, ナノゲルが集合したハイドロゲルが得られる¹⁸⁾. 流動性のあるナノゲルを皮下注射すると投与した部位で水は速やかに浸透し, 残されたナノゲルが集合してハイドロゲルが形成され, その結果比較的長期的なタンパク質徐放効果が得られたと考えられる. さらに, 長期徐放をめざして, アクリロイル基置換 CHP ナノゲルを末端にチオール基を有した 4 本鎖ポリエチレングリコール (PEGSH) で架橋することで, ナノゲルが数十から

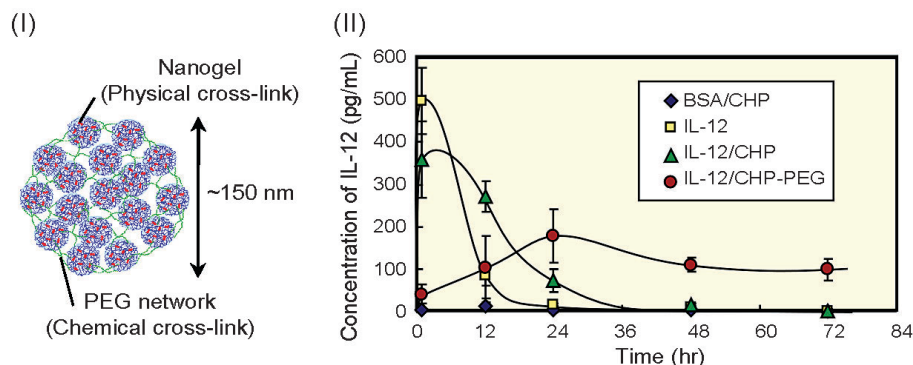


Fig. 4 (I) Illustration of chemical cross-linking CHP nanogel (CHP-PEG). (II) Release profiles of IL-12 after subcutaneous injection. Plasma concentration of IL-12 was monitored after subcutaneous injections of IL-12 alone (square), IL-12 encapsulated in CHP nanogel (triangle), IL-12 encapsulated in CHP-PEG (circle) and BSA encapsulated in CHP nanogel (rhombus)¹⁷⁾.

数百結合したラズベリー型のナノゲル架橋微粒子 (～150 nm) を開発した (Fig. 4 (I))¹⁷⁾. 物理架橋ナノゲルが化学架橋により安定化され、サイトカインなどのタンパク質を比較的長期に徐放しえるインジェクタブルキャリアとしての有用性が明らかになった (Fig. 4 (II)).

また、CHPナノゲルをトラップしたヒアルロン酸ゲルによるタンパク質徐放 DDS²⁰⁾ やペプチド (TNF- α のアンタゴニスト) の徐放 DDS²¹⁾ も開発した。

5.2 癌免疫タンパク質ワクチン

癌ワクチンによる癌免疫療法は、副作用が少ないこと、長期にわたり癌細胞の増殖、再発、転移の抑制が可能であることなど他の治療法にはない特長を有している。ワクチン療法では、癌細胞や感染細胞が特異的に発現する抗原タンパク質をマクロファージや樹状細胞に、いかに効率よくデリバリーするかが重要である。さらに、キラーT細胞を誘導するためには、運んだ抗原タンパク質が細胞質に放出されプロテアソームにより分解される必要がある。CHPナノゲルは抗原タンパク質を容易に内包しえ、50 nm 以下の安定な複合体ナノ微粒子を形成した。例えば、癌遺伝子産物としてのerbB2抗原タンパク質を内包したCHPナノゲルを胆癌マウスの皮下に投与すると、抗体を産生するヘルパーT細胞のみならず、抗腫瘍性のキラーT細胞が効率よく誘導されることが明らかになった^{19, 22)}。2004年から臨床試験も行われその有効性が実証されている^{23, 24)}。特に食道癌に対する治療効果は顕著にみられ、治験に進んでいる。

5.3 経鼻ワクチン

経鼻ワクチンは、抗原特異的免疫応答を全身組織

に加え、粘膜組織にも誘導可能であることから、インフルエンザなどの呼吸器感染症に対する予防ワクチンとして非常に効果的とされている。一方で、粘膜組織は、通常は上皮層によって強固に覆われており、経鼻ワクチンの効果を最大限に期待するためには、上気道粘膜免疫システムへの効果的なワクチンデリバリー技術の開発が必要不可欠とされてきた。

カチオン性のCHPナノゲルにワクチン抗原を内包し、それを経鼻投与することで、感染すると神経麻痺による致死性の高いボツリヌス菌や破傷風菌などのワクチン抗原を、効果的に上気道粘膜免疫システムにデリバリーさせ、高いレベルの防御免疫応答を、アジュバント非存在下でも誘導することに成功した²⁵⁾。カチオン性ナノゲルによるマウス上気道粘膜へのボツリヌス毒素抗原デリバリーでは、ナノゲルを用いることで抗原タンパク質を上気道粘膜に長時間保持できることがわかった (Fig. 5)。また、カチオン性ナノゲルを用いた条件では、マウスの血中において抗原タンパク質特異抗体の濃度が顕著に増加した。ボツリヌス毒素の暴露に対してもナノゲルでデリバリーした条件では全てのマウスに毒素耐性が見られたのに対し、毒素抗原のみを投与したマウスでは耐性は全く見られなかった (Fig. 6)。カチオン性ナノゲルは抗原タンパク質の経鼻ワクチンキャリアとして有効であり、他の感染性疾患に対しても応用を進めている。

6. おわりに

本稿では、多糖ナノゲルをDDSキャリアとして用いる研究について、主にタンパク質を用いた系に焦点をあて、分子シャペロン機能を有するキャリアの開発、ナノゲルによる効率的な細胞内導入から、免

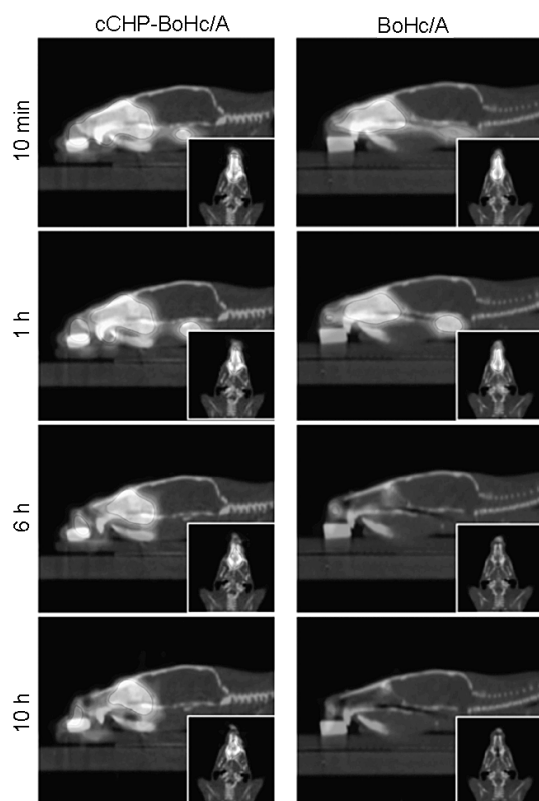


Fig. 5 PET images of [^{18}F]-labelled antigenic proteins (BoHc/A) were carried with cationic CHP nanogel (cCHP) to the nasal mucosa²⁵⁾.

疫療法としての臨床応用にいたる研究成果を紹介した。一方、我々は、このナノゲルの特性をバルクゲルバイオ材料としてさらに利用するために、ナノゲルをビルディングブロックとしてナノレベルで構造制御された新規機能性ヒドロゲルを創製する技術（ボトムアップゲル製造法）の開発も行っている（Fig. 7）。この手法によりナノレベルで構造制御されたマクロゲル材料が設計可能であり、特にシャペロン機能を有するナノゲル架橋ゲルは、再生医療用ヒドロゲルとして有用であることも明らかになってきた^{26~28)}。今後、様々な機能を有する異種のナノゲルをナノゲルエンジニアリングの手法により集積することで、機能の複合化、多彩な刺激応答性、経時的プログラム応答など、単一のナノゲルにはない機能を発現するナノゲル基盤バイオマテリアルの開発が期待される。ナノゲルを基盤とした材料設計はナノゲル工学と呼べるもので、さらに種々の分野への応用が期待される。

文 献

- 1) Sasaki Y, Akiyoshi K : *Chemical Record*, **10**, 366-376 (2010)
- 2) Kabanov AV, Vinogradov SV : *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**,

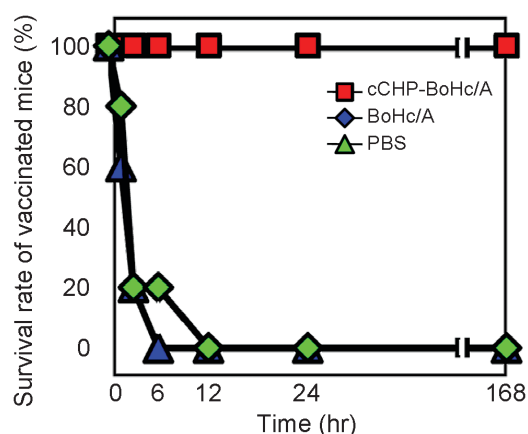


Fig. 6 Evaluation of protective immunity against botulinum toxin²⁵⁾.

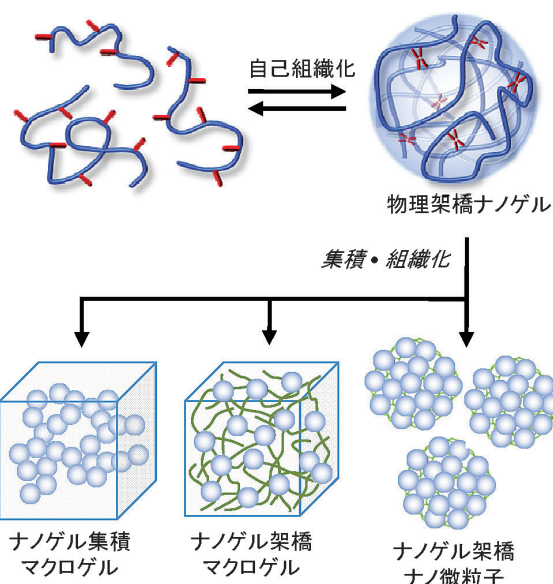


Fig. 7 Basic concept of novel gel materials based on building block consist of nanogels.

- 5418-5429 (2009)
- 3) Sasaki Y, Akiyoshi K : *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 300-305 (2010)
- 4) Nomura Y, Ikeda M, Yamaguchi N, Aoyama Y, Akiyoshi K : *FEBS Lett.*, **553**, 271-276 (2003)
- 5) Asayama W, Sawada S, Taguchi H, Akiyoshi K : *Int. J. Biol. Macromol.*, **42**, 241-246 (2008)
- 6) Ikeda K, Okada T, Sawada S, Akiyoshi K, Matsuzaki K : *FEBS Lett.*, **580**, 6587-6595 (2006)
- 7) Boridy S, Takahashi H, Akiyoshi K, Maysinger D : *Biomaterials*, **30**, 5583-5591 (2009)
- 8) Sasaki Y, Nomura Y, Sawada S, Akiyoshi K : *Polymer J.*, **42**, 823-828 (2010)
- 9) Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF : *Nat. Med.*, **10**, 310-315 (2004)
- 10) Ayame H, Morimoto N, Akiyoshi K : *Bioconjugate Chem.*, **19**, 882-890 (2008)

- 11) Watanabe K, Tsuchiya Y, Kawaguchi Y, Sawada S, Ayame H, Akiyoshi K, Tsubata T : *Biomaterials*, **32**, 5900-5905 (2011)
- 12) Morimoto N, Tamada J, Sawada S, Shimada N, Kano A, Maruyama A, Akiyoshi K : *Chem. Lett.*, **38**, 496-497 (2009)
- 13) Toita S, Soma Y, Morimoto N, Akiyoshi K : *Chem. Lett.*, **38**, 1114-1115 (2009)
- 14) Toita S, Sawada S, Akiyoshi K : *J. Control. Release*, in press
- 15) Toita S, Hasegawa U, Koga H, Sekiya I, Muneta T, Akiyoshi K : *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **8**, 2279-2285 (2008)
- 16) Kageyama S, Kitano S, Hirayama M, Nagata Y, Imai H, Shiraishi T, Akiyoshi K, Scott A, Murphy R, Hoffman E, Old L, Katayama N, Shiku H : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **367**, 330-335 (2008)
- 17) Hasegawa U, Sawada S, Shimizu T, Kishida T, Otsuji E, Mazda O, Akiyoshi K : *J. Control. Release*, **140**, 312-317 (2009)
- 18) Kuroda K, Fujimoto K, Sunamoto J, Akiyoshi K : *Langmuir*, **18**, 3780-3786 (2002)
- 19) Ikuta Y, Katayama N, Wang L, Okugawa T, Takahashi Y, Schmitt M, Gu X, Watanabe M, Akiyoshi K, Nakamura H, Kuribayashi K, Sunamoto J, Shiku, H : *Blood*, **99**, 3717-3724 (2002)
- 20) Hirakura T, Yasugi K, Nemoto T, Sato M, Shimoboji T, Aso Y, Morimoto N, Akiyoshi K : *J. Control. Release*, **142**, 483-489 (2010)
- 21) Alles N, Soysa NS, Hussain MDA, Tomomatsu N, Saito H, Baron Roland, Morimoto N, Aoki K, Akiyoshi K : *Eur. J. Pharm. Sci.*, **37**, 83-88 (2009)
- 22) Gu XG, Schmitt M, Hiasa A, Nagata Y, Ikeda H, Sasaki Y, Akiyoshi K, Sunamoto J, Nakamura H, Kuribayashi K, Shiku H : *Cancer Res.*, **58**, 3385-3390 (1998)
- 23) Kageyama S, Kitano S, Hirayama M, Nagata Y, Imai H, Shiraishi T, Akiyoshi K, Scott AM, Murphy R, Hoffman EW, Old LJ, Katayama N, Shiku H : *Cancer Sci.*, **99**, 601-607 (2008)
- 24) Uenaka A, Wada H, Isobe M, Saika T, Tsuji K, Sato E, Sato S, Noguchi Y, Kawabata R, Yasuda T, Doki Y, Kumon H, Iwatsuki K, Shiku H, Monden M, Jungbluth AA, Ritter G, Murphy R, Hoffman E, Old LJ, Nakayama E : *Cancer Immunity*, **7**, 9-19 (2007)
- 25) Nochi T, Yuki Y, Takahashi H, Sawada S, Mejima M, Kohda T, Harada N, Kong G, Sato A, Kataoka N, Tokuhara D, Kurokawa S, Takahashi Y, Tsukada H, Kozaki S, Akiyoshi K, Kiyono H : *Nat. Mat.*, **9**, 572-578 (2010)
- 26) Morimoto N, Endo T, Iwasaki Y, Akiyoshi K : *Biomacromolecules*, **6**, 1829-1834 (2005)
- 27) Kato N, Hasegawa U, Morimoto N, Saita Y, Nakashima K, Ezura Y, Kurosawa H, Akiyoshi K, Noda M : *J. Cell. Biochem.*, **101**, 1063-1070 (2007)
- 28) Hayashi C, Hasegawa U, Saita Y, Hemmi H, Hayata T,

Nakashima K, Ezura Y, Amagasa T, Akiyoshi K, Noda M : *J. Cell. Phys.*, **220**, 1-7 (2009)

(Received 21 June 2011 ;

Accepted 22 June 2011)

著者略歴

澤田 晋一 (さわだ しんいち)



- | | |
|----------|--------------------------|
| 2000年 3月 | 東邦大学大学院理学研究科博士前期課程修了 |
| 2000年 4月 | 東京医科歯科大学生体材料工学研究所研究支援推進員 |
| 2007年 4月 | 東京医科歯科大学生体材料工学研究所助教 |
| 2010年 3月 | 東京医科歯科大学生体材料工学研究所特任助教 |
| 2010年 9月 | 東京医科歯科大学博士(学術)取得 |
| 2011年 2月 | 京都大学大学院工学研究科 助教(現在に至る) |



秋吉 一成 (あきよし かずなり)

- | | |
|-----------|-----------------------------|
| 1985年 3月 | 九州大学大学院工学研究科合成化学専攻博士課程修了 |
| 1985年 9月 | 米国 Purdue 大学化学学科 博士研究員 |
| 1987年 10月 | 長崎大学工学部工業化学学科 講師 |
| 1989年 1月 | 京都大学工学部高分子化学学科 助手 |
| 1993年 8月 | 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻 助教授 |
| 1999年 12月 | JST さきがけ研究21「組織化と機能」研究員兼任 |
| 2002年 2月 | 東京医科歯科大学生体材料工学研究所教授 |
| 2005年 4月 | 東京工業大学精密工学研究所 客員教授(2007年まで) |
| 2010年 9月 | 京都大学工学研究科高分子化学専攻 教授(現在に至る) |