

令和元年5月25日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08202

研究課題名(和文)皮下動態制御可能なインスリン分子マシンの開発とハイブリッド人工膵臓への展開

研究課題名(英文) An insulin molecular machine whose pharmacokinetics is controllable in subcutaneous tissue and its possibility for hybrid artificial pancreas

研究代表者

江川 祐哉 (Egawa, Yuya)

城西大学・薬学部・准教授

研究者番号：90400267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では血糖降下作用を持つフェニルボロン酸修飾インスリン(PBA-Ins)を調製し、PBAと細胞表面糖鎖との結合を利用して、PBA-Insの薬物動態を制御することを試みた。糖鎖のモデルには、PBAと結合するポリビニルアルコール(pVA)を用いた。pVAをコートした水晶振動子マイクロバランス法(QCM)の電極をPBA-Ins溶液に浸すと、PBA-Insが吸着することが確認された。また、PBA-InsがPBAを複数持つことから、pVAとPBA-Insによる交互累積膜を調製することもできた。さらに、電極上に吸着したPBA-Insは、フルクトースの共存により脱着することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞表面モデルとして用いたpVA上でPBA-Insを吸着、脱着させることに成功した。このPBA-Insを皮下組織に投与した場合、PBA-Insは皮下組織の脂肪細胞などの糖鎖と結合すると予想される。ここに糖類を追加することにより、PBA-Insを脱着させ、血中に送り込むことができると考えられる。すなわち、PBA修飾薬物は糖類の有無により、行き先をコントロールできる分子マシン製剤になる可能性を持ち、その動作原理を本研究で構築できたといえる。

研究成果の概要(英文)：We have prepared phenylboronic acid-modified insulin (PBA-Ins) which has glucose-lowering effect and attempted to control its pharmacokinetics by utilizing the binding between PBA and sugar chains. As a model of sugar chains, poly(vinyl alcohol) (pVA) was used because it also binds with PBA. pVA was coated on the surface of an electrode of quartz crystal microbalance (QCM), and it was immersed in a solution of PBA-Ins. The QCM result confirmed adsorption of PBA-Ins on the pVA surface. In addition, a layer-by-layer (LbL) film composed of pVA and PBA-Ins was successfully prepared because there are two PBA moieties in one PBA-Ins molecules. By using the LbL film, we confirmed that the adsorbed PBA-Ins was released in the presence of fructose. These results show that PBA modified drugs have a potential to become a molecular machine whose destination can be controlled depending on the presence or absence of sugars. This study provides the working principle of the molecular machine.

研究分野：物理化学

キーワード：フェニルボロン酸 インスリン 血糖値 交互累積膜 糖鎖 DDS 分子マシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

血糖値が上昇したことを感知しインスリン (Ins) を放出する血糖値応答性製剤は、糖尿病患者にとって理想的な製剤である。このような製剤は、1990年代から提案されているが¹⁾、実用化には至っていない。このシステムの開発には、グルコース (Glc) のジオール部位と可逆的にボロン酸エステル結合を形成するフェニルボロン酸 (PBA) が多用されている (図1)。これまでに、PBA を用いた Glc 応答性マテリアルの例がいくつか報告されている。しかし、PBA の Glc に対する結合力は比較的弱く、標準的な血糖値の 5~10 mM 程度で Ins 放出のオン、オフを制御することは非常に難しい課題とされている。

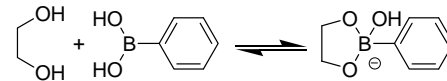


図1. ジオールとフェニルボロン酸による可逆的なボロン酸エステル結合形成

一方、PBA は Glc に比べ、シアル酸のジオール部位と強く結合する²⁾。シアル酸は細胞表面の糖鎖末端に存在し、PBA と細胞表面糖鎖との結合を利用したセンサーや³⁾、PBA を細胞内デリバリーのツールとして利用する研究が注目を集めている⁴⁾。

2. 研究の目的

本研究では PBA と Glc との結合ではなく、PBA と細胞糖鎖との結合を利用した新たなドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発を試みた (図2)。PBA を修飾した薬物を調製し、これを生体に投与する。すると、PBA 修飾薬物の PBA 部位と細胞表面糖鎖が結合し、PBA 修飾薬物はその場に滞留すると予想される。ここに、PBA と強く結合するフルクトース (Fru) などの糖類を併用すると、PBA 部位で糖鎖と Fru が競合し、細胞表面糖鎖との相互作用が弱まり、PBA 修飾薬物がある場から移動すると考えられる。すなわち、PBA 修飾薬物は、糖類の有無により行き先をコントロールできる分子マシン製剤になる可能性を持つ。

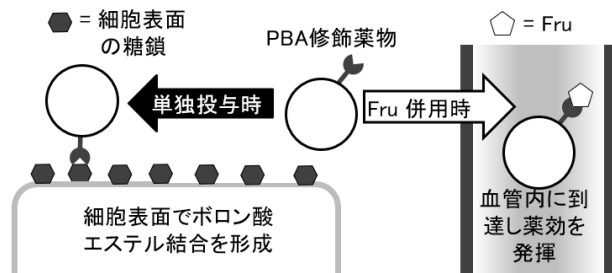


図2. 糖類 (Fru) の有無による行き先の変わる分子マシンの概念図

本研究では薬物として Ins を用い、PBA 修飾 Ins (PBA-Ins) を調製し、その血糖降下作用を調査した。次に、PBA-Ins と細胞表面糖鎖との結合を *in vitro* で再現するため、細胞表面糖鎖のモデルとしてポリビニルアルコール (pVA) を用いた。pVA は 1,3-ジオールの繰り返し構造とみなすことができ、PBA と結合する。pVA を固体基板上にコートし、そこへ PBA-Ins が吸着するかを水晶振動子マイクロバランス法 (QCM) により評価した (図3)。その発展例として PBA-Ins と pVA による交互累積膜の調製も試みた。PBA-Ins に複数の PBA が修飾されれば、pVA と PBA-Ins の繰り返しの吸着が期待でき、交互累積膜の調製が可能と考えられる。最後に、pVA との結合力で吸着した PBA-Ins が Fru との共存により、PBA-Ins を脱着できるかを QCM で評価した。

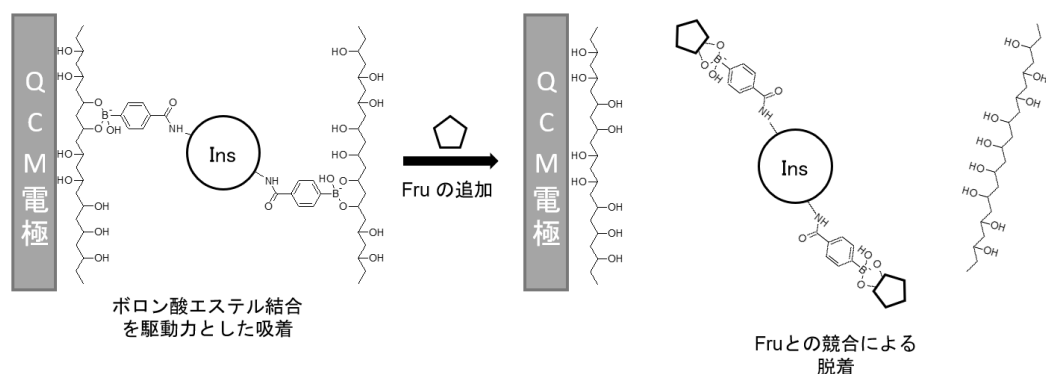


図3. QCM を利用した PBA-Ins の吸着、脱着の評価方法の模式図

3. 研究の方法

(1) PBA-Ins の調製

トリブチルアミン (300 μ L) とジメチルスルホキシド (超脱水, 60 mL) の混合溶液に、Ins (300 mg, 51.7 μ mol) を溶解した。これとは別に、トリブチルアミン (61.2 μ L)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (超脱水, 12 mL)、クロロギ酸イソブチル (33 μ L, 252.6 μ mol) の混合溶液に

4-カルボキシフェニルボロン酸 (43 mg, 259 μmol) を溶解した。この溶液を、先の Ins 溶液と混合し窒素気流下、室温で攪拌した。3 時間後、反応を止めるために水 (10 mL) を加えた。この溶液を透析チューブ (分画分子量 3500) に入れて水に対し透析し、その後、凍結乾燥を行い、PBA-Ins とした。

PBA の修飾数は、Ins に 3 つ存在する一級アミノ基に PBA が修飾されるという仮定のもと、残存アミノ基数から算出した。残存アミノ基は、2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) を用いる一級アミノ基の定量法に従った。

(2) 血糖降下作用の評価

本研究における動物実験は、城西大学実験動物規定に沿って計画し、全学実験動物管理委員会の承認を得て実施した。雄性ウイスターラット (220~270 g) にイソフルランを吸入させて麻酔し、経静脈にカニューレを行った。4~7 日を手術後の回復期とし、その後、20 時間の絶食後に血糖値測定に用いた。Ins および PBA-Ins は、頸動脈のカニューレから投与した。一定時間後、経静脈カニューレから血液をサンプリングし遠心分離 (2000 \times g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 min) を行った。その血漿をグルコースオキシダーゼ法 (グルコース CII-テストワコー、富士フィルム和光純薬株) により測定した。

(3) 交互累積膜の調製

白金 QCM 電極 (9 MHz) を用い、QCA922 (SEIKO, EG&G) で振動数変化を確認した。はじめに、白金 QCM 電極を pH 7.4 の緩衝液 (150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液) 中で安定させた。その後、0.10 mg/mL pVA 溶液 (150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) に 15 分間浸し、続いて緩衝液で 5 分間浸して、吸着していない pVA を洗い流した。pVA を吸着させた後、0.10 mg/mL PBA-Ins (150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) に 15 分間浸し、その後、緩衝液で 5 分間洗浄した。交互累積膜は、この操作を 5 回繰り返すことで調製し、得られた膜は (pVA/PBA-Ins)₅ と表記した。

(4) 糖応答性の評価

上記の (pVA/PBA-Ins)₅ を、10 mM Fru 溶液 (150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) に 1 時間浸したのち、pH 7.4 の緩衝液 (150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液) に 5 分間浸し洗浄した。続いて 100 mM Fru 溶液 (150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液, pH 7.4) に 1 時間浸したのち、pH 7.4 の緩衝液に 5 分間浸し洗浄した。同様に Glc に対する応答性も評価した。

4. 研究成果

(1) PBA-Ins の調製

クロロギ酸イソブチルを縮合剤として、4-カルボキシフェニルボロン酸を Ins のアミノ基へ修飾した。TNBS を用いた残存アミノ基の評価から、1 分子の PBA-Ins に対し、PBA が 2.2 個修飾されていることが確認された。PBA 部位を複数持つことから、pVA との交互累積膜の調製も可能と期待された。

(2) 血糖降下作用の評価

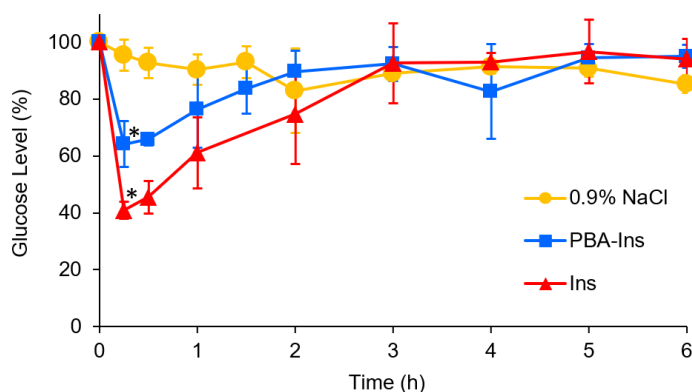


図 4. PBA-Ins および Ins の血糖降下作用。38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ で PBA-Ins または Ins を静脈投与、コントロールは 0.9% NaCl を静脈投与した ($n = 3$)。15 分後の血糖値について、複数群をコントロールと比較するため Dunnett 検定を用いた (* $p < 0.05$)。

薬物を化学修飾した際、その薬効が失われるおそれがある。そこで、PBA-Ins の血糖降下作用を評価することとした。経静脈のカニューレから PBA-Ins を投与し、血糖値を評価したものが図 4 である。PBA-Ins は同量の Ins と比べ、血糖降下作用は減弱しているものの、薬効を保持していることが確認され、PBA-Ins が DDS への利用価値があるものと考えられた。

(3) 交互累積膜の調製

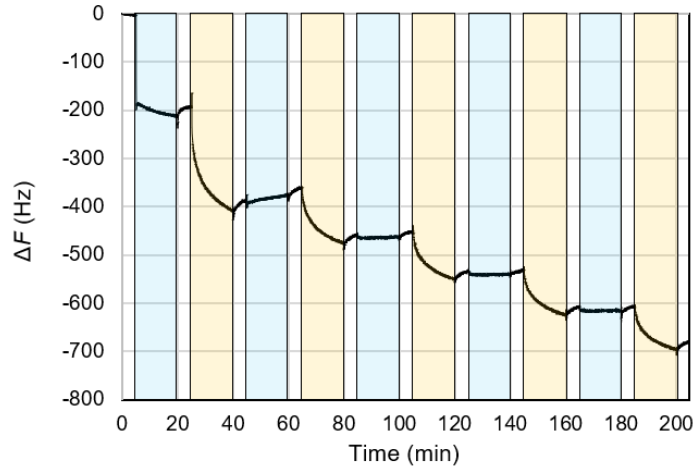


図5. pVA と PBA-Ins からなる交互累積膜作成時の QCM 電極の振動数変化。グラフエリアの色は QCM 電極が浸っている溶液の種類の違いを表す。pH 7.4 緩衝液(白), pVA 溶液(水色), PBA-Ins 溶液(黄)。

pVA がコートされた固体表面に PBA-Ins が吸着するか QCM を用いて評価した(図5)。まず、白金 QCM 電極を pVA 溶液に浸したところ、pVA の吸着に由来する振動数の変化(約 -200 Hz)が見られた。これを、PBA-Ins 溶液に浸したところ、振動数変化(約 -200 Hz)が得られ PBA-Ins が pVA 上に吸着することが確認された。続いて、この電極を緩衝液による洗浄を挟みながら、pVA 溶液、PBA-Ins 溶液に浸していくと振動数の減少が続いて起こり、交互累積膜の形成が可能であった。

以上の結果より、細胞表面糖鎖のモデルと考えられる pVA に、PBA-Ins が吸着することが確認できた。さらに、pVA と PBA-Ins の交互累積膜の形成が可能であり、これは PBA-Ins が 1 分子あたり 2.2 個の PBA を持ち、2 つの pVA と結合できたためと考えられた。

(4) 交互累積膜の糖応答性評価

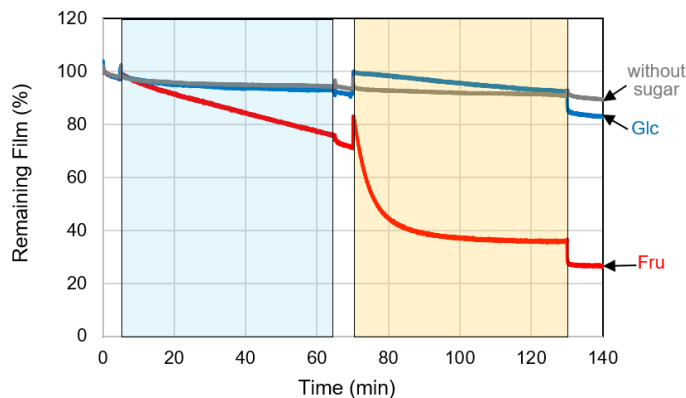


図6. 交互累積膜 (pVA/PBA-Ins)₅ の残存率に対する糖の影響。グラフエリアの色は糖濃度を示す、0 mM 糖(白), 10 mM 糖(水色), 100 mM 糖(黄色)。線の色は糖の種類を示す、Fru(赤), Glc(青)。比較のため糖不在下も同様の操作を行った(グレー)。

(pVA/PBA-Ins)₅ を調製して各溶液に浸した後の、交互累積膜の残存率を図6に示す。図5において、約 -700 Hz の振動数変化があったものを 100%として表示してあり、残存率が減少することは膜が崩壊することを示す。糖を含まない pH 7.4 の緩衝液中(150 mM NaCl を含む 10 mM HEPES 緩衝液)では、90%の膜が残っていることが確認された。一方、Fru が共存することで、残存率は著しく減少した。10 mM の Fru に 1 時間浸したところ残存率は 75%までに減少した。さらに 100 mM の Fru に 1 時間浸したところ 25%まで減少した。これは、白金 QCM 電極に初めに吸着した pVA を残し、ポロン酸エステル結合を駆動力として吸着していた PBA-Ins および pVA が全て脱着したことを意味する。Fru に対して、Glc では残存率の減少はほとんど見られなかった。これは、PBA 部位と Glc の結合が弱いためと考えられる。

(5) 結論

本研究では、PBA-Ins を調製して、血糖降下作用が失われていないことを確認した。修飾し

た PBA も結合能力を維持し、pVA 上に吸着することが確認できた。また、PBA-Ins が 2 つ程度の PBA 部位を持つことから、交互累積膜の形成も可能であった。これら吸着した PBA-Ins は Fru 存在下で脱着させることができた。これらの結果より、PBA 修飾薬物の行き先を糖類の有無により制御できる、分子マシンの可能性を示せたといえる。PBA は生体の様々な部位の糖鎖と結合することが可能であり、本研究の幅広い展開が期待される。

<引用文献>

- 1) 脇一 徳, 小山 義之, 片岡 一則, 横山 昌幸, 岡野 光夫, 桜井 靖久, 人工臓器, 22, 274-279 (1993).
- 2) Otsuka H., Uchimura E., Koshino H., Okano T., Kataoka K., J. Am. Chem. Soc., 125, 3493-3502 (2003).
- 3) Matsumoto A., Sato N., Kataoka K., Miyahara Y., J. Am. Chem. Soc., 131, 12022-12023 (2009).
- 4) Andersen K. A., Smith T. P., Lomax J. E., Raines R. T., ACS Chem. Biol., 11, 319-323 (2016).

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Chihiro Takei ,Yui Ohno ,Tomohiro Seki ,Ryotaro Miki ,Toshinobu Seki ,Yuya Egawa , Sugar-Responsive Layer-by-Layer Film Composed of Phenylboronic Acid-Appended Insulin and Poly(vinyl alcohol). Chemical and Pharmaceutical Bulletin , 査読有 , 66 巻 , 2018 , 368-374. <https://doi.org/10.1248/cpb.c17-00817>

[学会発表](計 10 件)

武井 千弥、江川 祐哉、三木 涼太郎、関 俊暢、ポロン酸修飾インスリンを用いた糖応答性交互累積膜、日本薬剤学会第 32 年会、2017 年 5 月
大野 由依、江川 祐哉、三木 涼太郎、関 俊暢、ポロン酸修飾インスリンと糖鎖の相互作用を利用した血管内徐放化の試み、日本薬剤学会第 32 年会、2017 年 5 月
大野 由依、江川 祐哉、三木 涼太郎、関 俊暢、糖鎖との相互作用に基づく持続作用を示すポロン酸修飾インスリン、第 61 回日本薬学会関東支部大会、2017 年 9 月
大野 由依、川村 知裕、三木 涼太郎、江川 祐哉、杉野 雅浩、細谷 治、関 俊暢、インスリン由来アミロイドーシスを回避可能な新規インスリン誘導体、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月
小山 結生、中村 優季、藤井 美帆、三木 涼太郎、関 俊暢、江川 祐哉グルコースで崩壊しインスリン誘導体を放出する交互累積膜の作製、日本薬学会第 139 年会、2019 年 3 月

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<https://www.josai.ac.jp/~butuyaku/achievement.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。