

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07015

研究課題名(和文) ボロン酸と細胞の動的共有結合を利用した新たなDDS概念の創出

研究課題名(英文) Development of new drug delivery systems utilizing covalent dynamic bonds between boronic acids and cell surfaces

研究代表者

江川 祐哉 (Egawa, Yuya)

城西大学・薬学部・教授

研究者番号：90400267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、細胞への動的共有結合を利用した、新たなDDSの概念の構築を試みた。細胞への動的共有結合を可能にするのはボロン酸である。ボロン酸は糖類と結合する特性を持ち、細胞表面糖鎖(シアル酸)とも強く結合する。ボロン酸を化学修飾した薬物を投与すると、赤血球表面糖鎖などに結合する。この結合は動的共有結合であるため、解離-再結合を繰り返しながら徐々に薬物が血中に放出されることで、薬効が持続化すると考えられる。本研究課題では、ボロン酸修飾インスリンの徐放化剤、また、ボロン酸と細胞表面糖鎖との結合を切断することを特徴とする血糖値応答性DDSを提案することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の意義は、細胞表面を薬物保持担体としてみなす「細胞製剤学」という新たなDDSの概念を提唱できた点にある。ボロン酸が細胞表面糖鎖に結合する特性を利用し、ボロン酸修飾インスリンを細胞表面に保持させることで、血糖降下作用が持続する例を示すことができた。また、グルコースオキシダーゼを併用することで血糖値応答性インスリン製剤へ展開する例も示せた。これらの研究成果は注射液を投与するだけのシンプルな方法で実施できたが、これは細胞を製剤の構成要素として捉えるユニークな「細胞製剤学」という概念が可能にしている。シンプルであるため制約が少なく、実現性の高い刺激応答性DDS研究が可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We utilized a dynamic covalent bond between boronic acids and sugar chains on cell surfaces for new drug delivery systems. We prepared phenylboronic acid-modified insulin (PBA-Ins) and confirmed its affinity to red blood cells. The PBA-Ins showed longer glucose-lowering activity when intravenously injected, which may be due to the affinity of PBA moiety to the cell surface. Additionally, we prepared p-boronophenylmethoxycarbonyl-modified insulin (BPmoc-Ins). Although the subcutaneous injection of BPmoc-Ins did not affect the glucose levels, the coinjection of BPmoc-Ins and glucose oxidase (GOx) resulted in reduced blood glucose levels. This glucose-lowering effect was attributed to the following reactions; first, to endogenous glucose oxidation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by GOx, and then, to removal of BPmoc groups by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to release insulin. The result indicates the potential of coinjecting BPmoc-Ins and GOx for a glucose-responsive insulin release system.

研究分野：物理系薬学

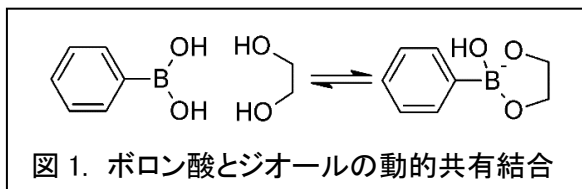
キーワード：ボロン酸 細胞製剤 過酸化水素 徐放性 刺激応答性 血糖値 糖尿病 インスリン

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

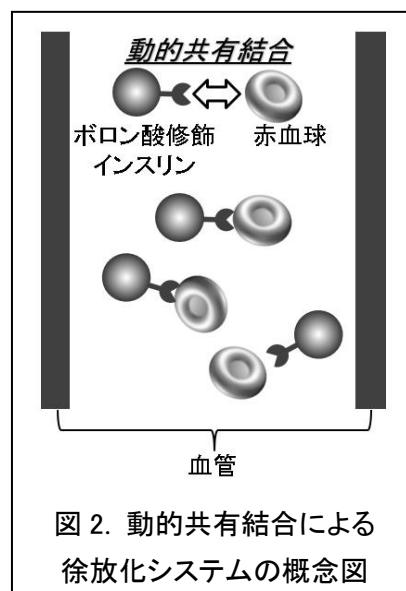
近年、共有結合でありながら速やかに解離および再結合する動的共有結合の利用に関心が寄せられている。その代表的な例としてボロン酸とジオールの結合が挙げられる (図 1)。ボロン酸は糖のジオール部位と結合を作るため、各種糖との結合について研究が行われている。なかでも、血糖値センサーの開発を目指すための、ボロン酸とグルコースとの結合に関するものが多い。しかし、ボロン酸-グルコースの結合力は弱く、結合力を改善する方法が探索されている。一方、ボロン酸との結合力が強い糖類として、シアル酸が挙げられる。シアル酸のボロン酸に対する結合定数は、グルコースに比べ十倍程度高い。

ボロン酸-シアル酸の強い結合力を利用した例として、ボロン酸を修飾した電極が、赤血球糖鎖のシアル酸量を測定するセンサーになるという分析化学的な報告がある。

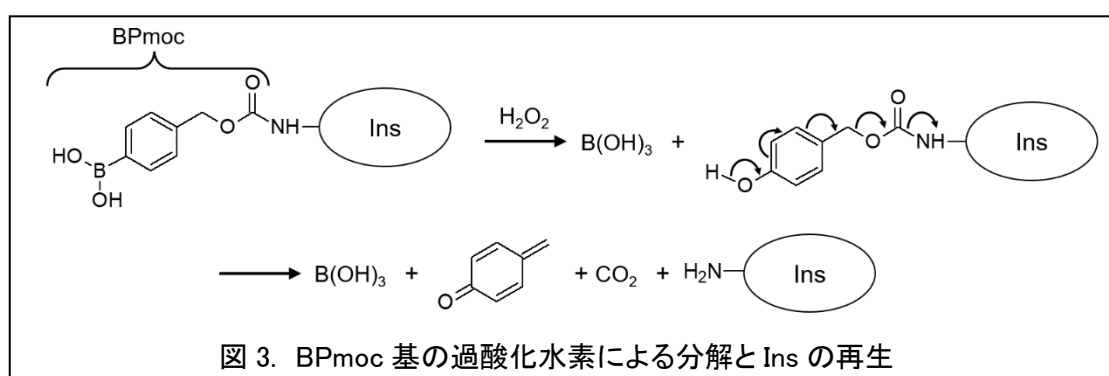


### 2. 研究の目的

本研究課題では物理化学や分析化学の分野で注目されてきたボロン酸-シアル酸の動的共有結合を薬剤学的に利用すべく、「ボロン酸の動的共有結合を利用した徐放性製剤」について検討を行った。図 2 に想定される機構を示す。赤血球などの細胞糖鎖末端にはシアル酸が存在する。フェニルボロン酸 (PBA) をインスリン (Ins) に化学修飾すると、シアル酸との動的共有結合の形成が可能になると予想される。PBA 修飾 Ins (PBA-Ins) は静脈注射では赤血球表面などに結合するが、ボロン酸-シアル酸の結合は動的共有結合であるため、解離-再結合を繰り返しながら徐々に PBA-Ins が放出され、持続的な薬効を示すと考えられる。この機構によって PBA-Ins が徐放性製剤として機能するか検討を行った。



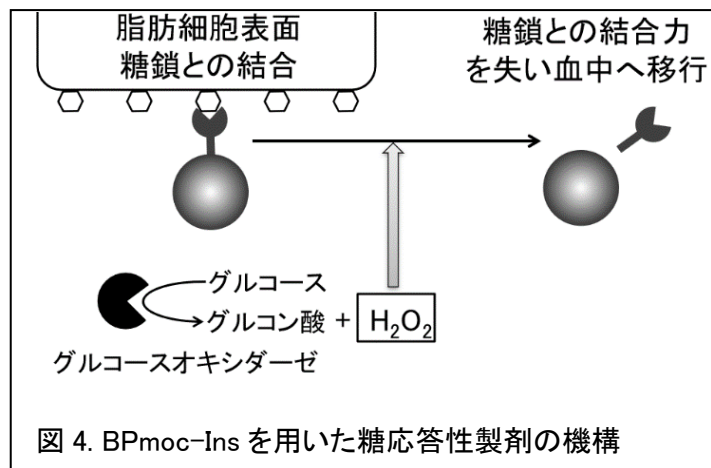
また、「ボロン酸の動的共有結合を切断する刺激応答性製剤」についても検討を行った。ボロン酸誘導体としては、ボロン酸フェニルメトキシカルボニル (BPmoc) 基を用いた。BPmoc 基はボロン酸が過酸化水素と反応することをきっかけに、修飾部位から脱離することが知られている (図 3)。この反応により BPmoc-Ins から Ins が再生されると考えられる。この BPmoc 基と過酸



化水素の反応を糖応答性製剤として利用する仕組みを図4に示す。BPmoc-Insを皮下投与し、皮下組織の脂肪細胞表面に結合させる。この結合を血糖値に応じて切断するために、グルコースオキシダーゼ (GOx) を BPmoc-Ins と同時に投与する。

GOx は体内のグルコースを酸化すると同時に過酸化水素を生成させる。過酸化水素は BPmoc 基の脱離を引き起こし、BPmoc-Ins は細胞との結合力を失い、再生された Ins が血中へ移行し血糖降下作用を示すと考えられる。

本研究課題では BPmoc-Ins を調製し GOx と組み合わせて糖応答性製剤としての可能性を調査した。



### 3. 研究の方法

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（承認番号：JU 19108、JU 21087）。

#### (1) PBA-Ins の調製と徐放性製剤への利用<sup>1)</sup>

クロロギ酸イソブチルを縮合剤として、Ins のアミノ基に 4-カルボキシフェニルボロン酸をアミド結合で修飾し PBA-Ins とした。PBA-Ins の細胞表面への結合力の有無は、赤血球の凝集の様子で評価した。PBA-Ins の徐放性製剤としての調査には、糖尿病モデルラットへの静脈投与、皮下投与した際の血糖降下作用により評価した。

#### (2) BPmoc-Ins の調製と糖応答性製剤への利用<sup>2)</sup>

BPmoc 基と *N*-ヒドロキシスクシンイミドからなる活性エステルを合成し、これを Ins と反応させて、BPmoc-Ins とした。BPmoc-Ins と GOx を含む注射液を糖尿病モデルラットに投与し、持続血糖測定器 (FreeStyle リブレ、Abbott 社) を用いて、血糖降下作用を評価した。また、*in vitro* の評価として、BPmoc-Ins と GOx を含む溶液にグルコースを共存させたとき、Ins への再生を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) PBA-Ins の調製と徐放性製剤への利用

調製した PBA-Ins は残存アミノ基数の評価から、1 分子の Ins に対し、PBA が 2 つ修飾されていることを確認した。緩衝液 (pH 7.4) 中にて、PBA-Ins と赤血球を共存させると、赤血球が凝集し沈降を防いだ (図 5、C 行)。また、PBA 部位と結合するフルクトースを共存させることで、PBA-Ins による赤血球凝集が抑制され、赤血球の沈降が見られた (図 5、G 行)。以上から、PBA-Ins はボロン酸部位を介して赤血球表面と結合する特性を持つことが示された。

PBA-Ins を静脈内投与すると、未修飾の Ins と比較して、血糖降下作用が持続することが確認された (図 6)。以上の結果は、PBA 修飾薬物による徐放性製剤の一例と考えられる。しかし、PBA-Ins を静脈投与ではなく皮下投与した場合、その血糖降下作用は著しく減弱した。一般的に Ins 製剤は皮下投与で用いられるため、実用化を目指すには皮下投与でも血糖降下作用が見られるような工夫が必要と思われた。

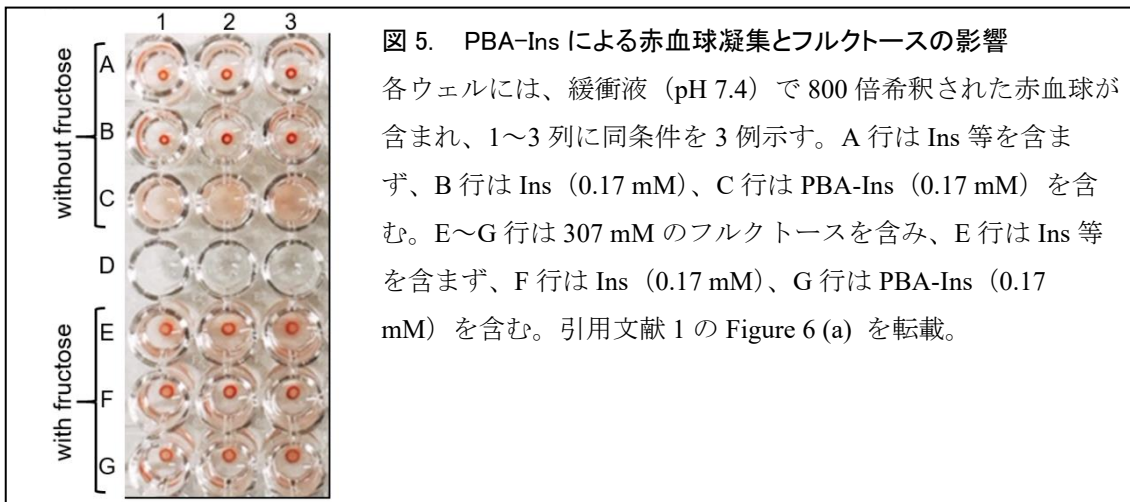


図 5. PBA-Ins による赤血球凝集とフルクトースの影響

各ウェルには、緩衝液 (pH 7.4) で 800 倍希釈された赤血球が含まれ、1~3 列に同条件を 3 例示す。A 行は Ins 等を含まず、B 行は Ins (0.17 mM)、C 行は PBA-Ins (0.17 mM) を含む。E~G 行は 307 mM のフルクトースを含み、E 行は Ins 等を含まず、F 行は Ins (0.17 mM)、G 行は PBA-Ins (0.17 mM) を含む。引用文献 1 の Figure 6 (a) を転載。

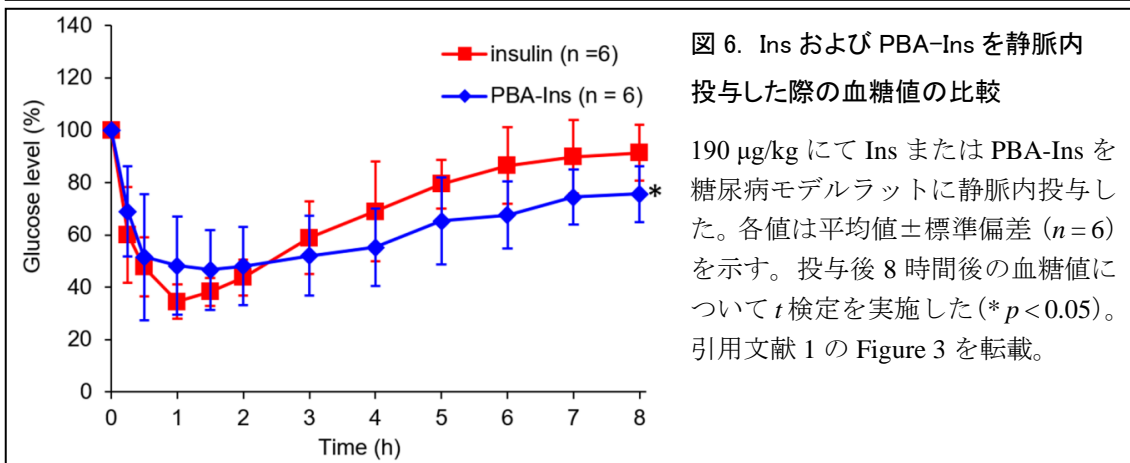


図 6. Ins および PBA-Ins を静脈内投与した際の血糖値の比較

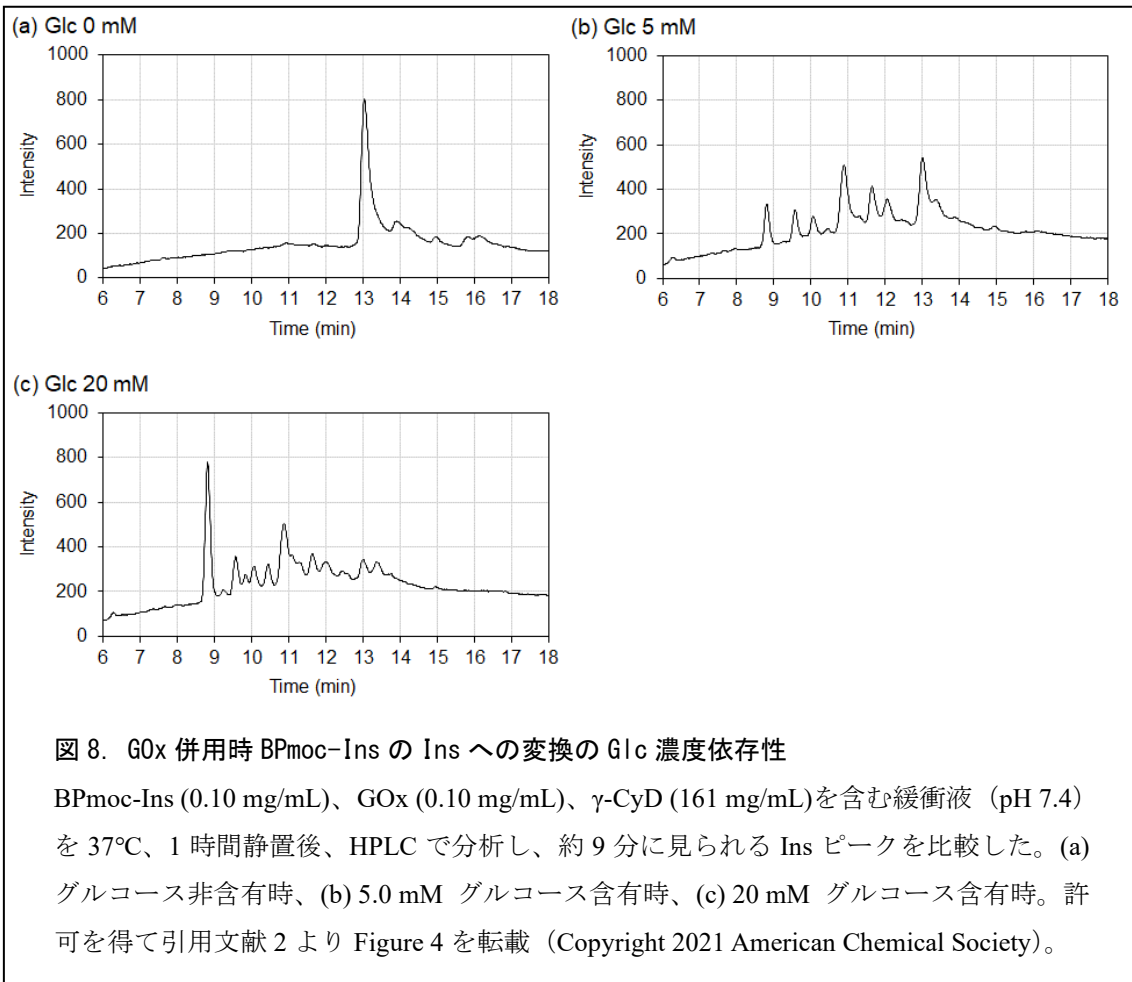
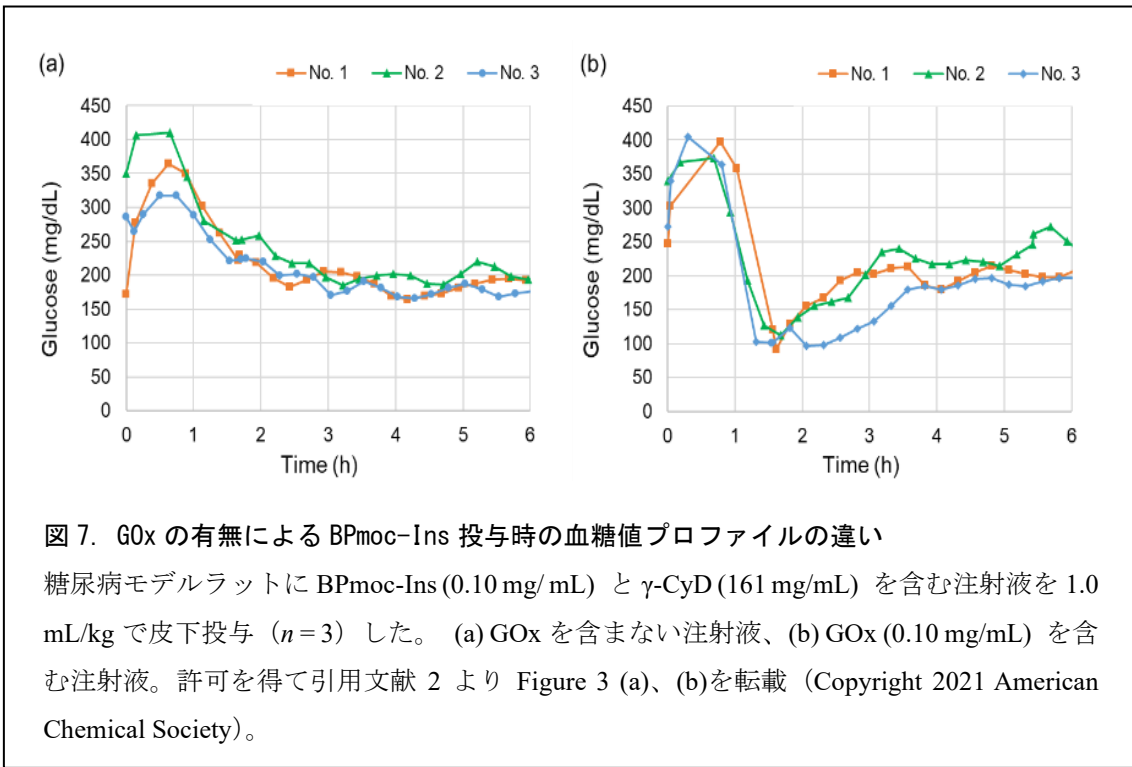
190  $\mu\text{g}/\text{kg}$  にて Ins または PBA-Ins を糖尿病モデルラットに静脈内投与した。各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 ( $n=6$ ) を示す。投与後 8 時間後の血糖値について  $t$  検定を実施した (\* $p<0.05$ )。引用文献 1 の Figure 3 を転載。

## (2) BPmoc-Ins の調製と糖応答性製剤への利用

調製した BPmoc-Ins の構造確認にはマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用い、1 分子の Ins に対し BPmoc 基が 3 つ修飾されていることを確認した。

得られた BPmoc-Ins は水への溶解性が低く注射液とすることが困難であった。種々検討の結果、環状オリゴ糖である  $\gamma$ -シクロデキストリン (CyD) が BPmoc-Ins の分散性の改善に有効であった。BPmoc-Ins および  $\gamma$ -CyD を含む水溶液を注射液とし、これを糖尿病モデルラットに皮下投与したところ、血糖値降下作用は見られなかった (図 7a)。これは BPmoc 基修飾によって Ins の活性が低下した、あるいは、BPmoc 基のボロン酸部位が細胞表面糖鎖と結合し、BPmoc-Ins の血中への移行が抑制されたものと考えられた。なお、投与後 1 時間程度の高血糖はイソフルラン処理によるものと推測される。BPmoc-Ins の糖応答性 Ins 製剤としての利用を試みるため、BPmoc-Ins、 $\gamma$ -CyD、GOx を含む注射液を糖尿病モデルラットに皮下投与したところ、血糖値降下作用が見られた (図 7b)。これは図 4 に示す機構が働いたものと考えられた。

GOx およびグルコース共存下、BPmoc-Ins の Ins への変換を *in vitro* で確認する方法として各条件のサンプルを 37°C、1 時間静置後、HPLC で分析し、約 9 分に見られる Ins ピークを比較した。糖尿病と診断される濃度の 20 mM グルコースに共存したサンプルでは BPmoc-Ins が Ins へ変換されることが観察された。これに比べ、正常血糖値の下限に相当する 5 mM のグルコース濃度では BPmoc-Ins から Ins への変換が遅いことが確認された。以上から、BPmoc-Ins から Ins への変換はグルコース濃度依存的であり、BPmoc-Ins と GOx の組み合わせが糖応答性製剤としての可能性を持つことを示せた。



引用文献

1) Y. Ohno, M. Kawakami, T. Seki, R. Miki, T. Seki, Y. Egawa, *Pharmaceuticals*, 12: 121 (2019).  
 2) H. Kikuchi, Y. Nakamura, C. Inoue, S. Nojiri, M. Koita, M. Kojima, H. Koyama, R. Miki, T. Seki, Y. Egawa, *Mol. Pharm.*, 18: 4224-4230 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yui Ohno, Momoko Kawakami, Tomohiro Seki, Ryotaro Miki, Toshinobu Seki, Yuya Egawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Cell Adhesive Character of Phenylboronic Acid-Modified Insulin and Its Potential as Long-Acting Insulin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceuticals	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ph12030121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Hinako, Nakamura Yuki, Inoue Chika, Nojiri Sayaka, Koita Miho, Kojima Minori, Koyama Hiroki, Miki Ryotaro, Seki Toshinobu, Egawa Yuya	4. 巻 18
2. 論文標題 Hydrogen Peroxide-Triggered Conversion of Boronic Acid-Appended Insulin into Insulin and Its Application as a Glucose-Responsive Insulin Formulation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 4224 ~ 4230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.molpharmaceut.1c00760	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江川 祐哉、中村 優季、三木 涼太郎、関 俊暢
2. 発表標題 フェニルボロン酸修飾インスリン、グルコースオキシダーゼ、 $\beta$ -シクロデキストリン混合系による血糖値応答性インスリン製剤
3. 学会等名 第36回シクロデキストリンシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊地 陽花子、中村 優季、三木 涼太郎、関 俊暢、江川 祐哉
2. 発表標題 過酸化水素で活性化するインスリン誘導体の開発と糖応答性インスリン製剤への可能性
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------