平成 20 年度
実績報告

「ナノ界面技術の基盤構築」
平成 20 年度採択研究代表者

櫻井 和朗

北九州市立大学　国際環境工学部・教授

DDS 粒子のナノ界面と鳥インフルエンザワクチン等への応用

1. 研究実施の概要

次世代の医薬品開発の要となる DDS ナノ粒子の溶液中での構造とその薬理効果に関して、世界で最も輝度が高い放射光 X 線を用いた測定と動物試験や生物的な評価を組み合わせて俯瞰的に研究を進めている。初年度は、超希薄溶液からの散乱測定が可能となる装置の開発と、X 線測定では従来難しかった絶対強度の測定から DDS 粒子を構成している分子の数を決定することに成功した。また、インフルエンザのワクチンとして、第一世代（CpGDNA+SPG）の2元複合体粒子を用いた動物試験に成功し、従来にない安全で高効率なアジュバントの開発が可能との感触を得た。

2. 研究実施内容（文中にある参照番号は 4.(1)に対応する）

1）超希薄溶液からの散乱装置の開発

希薄溶液からの散乱を正確に測定できる装置の開発を行った。装置の外観を下に示す。ノイズの原因となる空気と窓剤のカプトンを取り除いたのが特徴である。また、耐真空用の溶液セルとして、液漏れが起きないかつ窓剤の汚れが洗浄可能なセル（図１の右上写真）を作成した。窓剤である石英ガラスの厚さや溶液を入れる穴の形状の検討をおこない、通常の測定に耐えるところまで完成させた。図２に空のセルで比較した、従来のセットアップとの比較を示す。真空系において大幅なバックグランドの低下、ビームストッパー周りの強度の減少が見られる。

2）高分子ミセルの内部構造の決定

神奈川科技グループが開発した抗がん剤内包高分子ミセルに関して、ナノ界面の構造を上述した装置を用いて明らかにしてきた。その結果、今までの測定では見ることができなかった、高分子ミセルのコア内部での薬剤の分布の様子が観察できた。極めて興味深いのは、

薬剤の添加とともに、コアの高分子の結晶性（らせんの割合）が減少していくことである。図３に薬剤である LE540 を添加したときの小角領域と広角領域の散乱の様子を示す。LE540 の含有量が増加するにつれて、所謂ギニエ領域で低角シフトが起こり、また広角での結晶の長周期に由来するピークが消滅する。これらの現象は、図４で示した電子密度の変化によって極めて定量的に記述できた。この成果は論文に投稿中である。

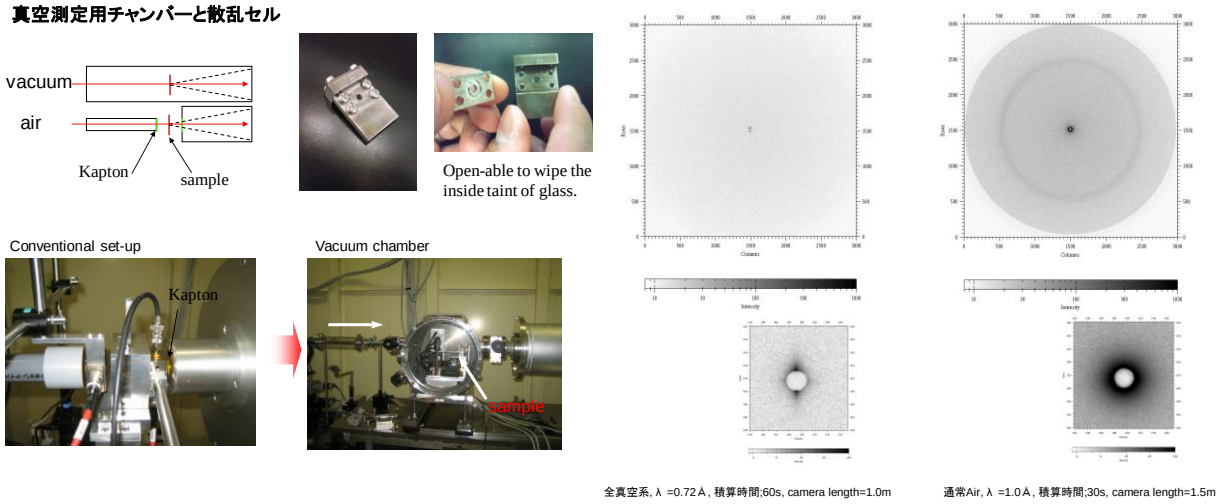

図1＆2　今回開発した真空セルとそれを用いた空のセルからのバックグランドを従来と比較した図。

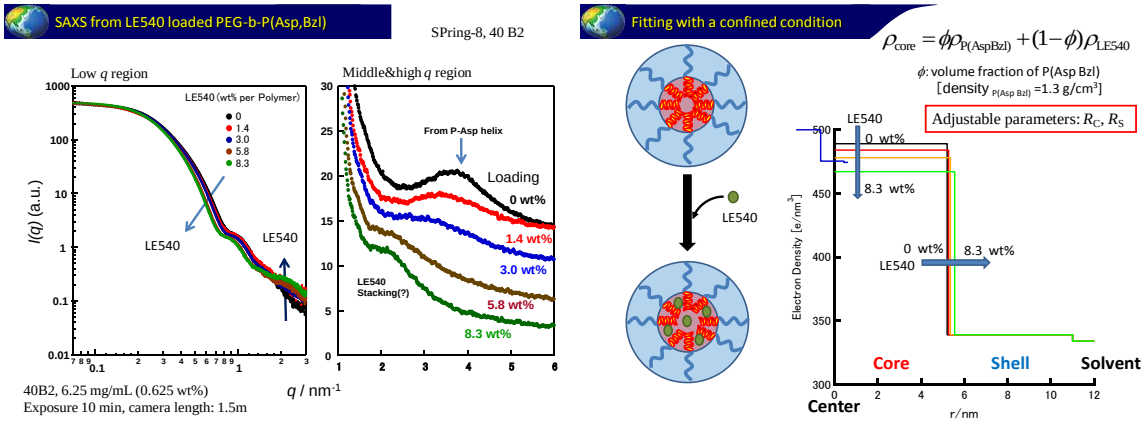

図3&4　抗癌剤 LE540 添加に伴う散乱プロファイルの変化と、それを記述する電子密度変化のプロファイル。

封入薬物として合成レチノイド Am80 と LE540 をミセル内核に内包させた高分子ミセルを作製した[f)]。両方の薬物とも、数十 nm の直径の高分子ミセル以外の2次凝集がほとんどなく、放射光X線によるSAXS測定に適したサンプルを得ることができた。また、Am80 については薬物封入量の異なる4種の高分子ミセルサンプルを作製した。

MRI造影剤の Gd イオンを封入した高分子ミセルについても、2次凝集がなく、SAXS測定に適したサンプルを作製した[b)]。また、Gd 導入前のブロックコポリマーが最もミセル構造形成のための会合力が強く、Gd 導入に従ってそれが弱くなって行くが、キレート基に対して少なくとも 40%まで

の Gd 導入率ならば、マウスの固形がんに効率よくターゲティングできるために充分なミセル会合性を示すことがわかった。さらに、この高分子ミセル造影剤がPEG修飾リポソーム製剤で問題となるABC現象（免疫的作用によって2回目の投与で急速に血流から排除される）を引き起こさないことがわかった。この発見は造影剤としての臨床使用で大変重要なことであると共に、高分子ミセルのどのような構造的特徴が免疫的な刺激に結びつくかという、基礎的な興味ある課題を提供した[e)]。

3）新規インフルエンザワクチンアジュバントの開発[8)]

マウスを用いたインフルエンザワクチン用アジュバント（ベータグルカン-CpG ODN 複合体）の最適化及び効果判定を行った。ベータグルカン-CpGODN の複合体はウイルススプリットワクチン溶液と混合し経鼻投与するのみで有意に抗ウイルス抗体価を全粒子ワクチンと同様のレベルまで上昇させ（抗体価 100-1000 倍）、また、2 回免疫後の致死量ウイルス感染に対しても全粒子ワクチンと同様の抵抗性を誘導した。その効果の作用機序として KO マウスを用いて検討した結果、前粒子ワクチンは TLR7 を介したウイルス RNA のアジュバント効果、スプリットワクチン＋ベータグルカン（SPG）-CpGODN の複合体の場合は TLR9 を介した CpGODN のアジュバント効果が重要な役割を担っていることが示された。この結果は、分子生物学的な傍証を確実にとったあとに投稿をした。

3. 研究実施体制

(1)「北九州市立大学」グループ
①研究分担グループ長：櫻井　和朗(北九州市立大学、教授)
②研究項目　「生体条件下での DDS 構造の解明と多糖核酸複合体の界面構造」

(2)「東京大学大学院」グループ
①研究分担グループ長：雨宮　慶幸(東京大学大学院、教授)
②研究項目　「X 線光子相関法を用いたゲル中でのナノ粒子ダイナミクスの解析」

(3)「(財)高輝度光科学研究センター」グループ
①研究分担グループ長：八木　直人(財団法人高輝度光科学研究センター、主席研究員)
②研究項目 「高精度の散乱測定技術の確立」

(4)「(財)神奈川科学技術アカデミー」グループ
①研究分担グループ長：横山　昌幸(財団法人神奈川科学技術アカデミー、プロジェクトリーダー)
②研究項目　「高分子ミセルの薬物・造影剤封入内核の構造解析」

(5)「大阪大学・微生物病研究所」グループ

①研究分担グループ長:石井　健(大阪大学、准教授)
②研究項目　「ナノ DDS 粒子を用いた新規ワクチン開発研究」)

4. 研究成果の発表等

（1）論文発表（原著論文）

1. Polysaccharide-Templated Twisted Assemble of 2-Anilinonaphthalene-6-Sulfonic Acid. Naohiko Shimada, Tadashi Okobira, Yoichi Takeda, Seiji Shinkai, Kazuo Sakurai. J. Polymer Science Part A;46,1440-1448 (2008).
2. Clustered CpG Sequences to Enhance Cytokine Secretion from Macrophages. Jusaku Minari, Naohiko Shimada, and Kazuo Sakurai Chemistry Letters;37(1), 92-93 (2008). Intramolecular Cation– π Interactions Control the Conformation of Nonrestricted (Phenylalkyl)Pyridinesw. Isabella Richter, Jusaku Minari, Philip Axe, John P. Lowe, Tony D. James, Kazuo Sakurai, Steven D. Bull and John S. Fossey. ChemComm. 1082 – 1084 (2008).
3. Molecular Dynamics Studies of Side Chain Effect on the β-1,3-D-Glucan Triple Helix in Aqueous Solution. Okobira, T.; Miyoshi, K.; Uezu, K.; Sakurai, K.; Shinkai, S. Biomacromolecules; 9(3); 783-788 (2008).
4. Entrapment of Immature Amyloid Protofilaments in the Hydrophobic Domain of Schizophyllan. Sakuragi, M.; Takeda, Y.; Shimada, N.; Sakurai, K.; Polymer Bulletin; 1(61); 107-117 (2008).
5. 3' Poly(dA)-Tailed Thrombin DNA Aptamer to Increase DNase-Resistance and Clotting Inhibitory Activity. Shuichiro Uehara1, Naohiko Shimada, Yoichi Takeda, Yoshikazu Koyama,Yoshifumi Takei, Hironori Ando, Susumu Satoh, Atsushi Uno, and Kazuo Sakurai; Bull. Chem. Soc. Jpn.;81(11) ;1485-1491 (2008).
6. Enhanced Cytokine Secretion Owing to Multiple CpG Side Chains of DNA Duplex. Jusaku Minari, Shinich Motizuki, and Kazuo Sakura. Oligonucleotides.; 18(4); 337-344 (2008)
7. Solid State Structures and Solution Analyses of a Phenylpropylpyridine N-Oxide and an N-Methyl Phenylpropylpyridine Isabella Richter, Mark R. Warren, Jusaku Minari, Souad A. Elfeky, Wenbo Chen, Mary F. Mahon, Paul R. Raithby, Tony D. James, Kazuo Sakurai, Simon J. Teat, Steven D. Bull and John S. Fossey Chemistry Asian Journal ;4,194-198(2008)
8. Ishii KJ, Akira S. Potential link between the immune system and metabolism of nucleic acids. Curr Opin Immunol. 2008 Oct;20(5):524-9. Epub 2008 Aug 6. Review.
9. Kobiyama K, Takeshita F, Ishii KJ, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. J Immunol. 2009 Feb 1;182(3):1593-601.
10. Masamichi Nishihara, Yoshihiko Murakami, Takashi Shinoda, Jun Yamamoto, Masayuki Yokoyama, Synthesis and Characterization of A Temperature-responsive Amphiphilic Block Copolymer Containing a Liquid Crystalline Unit, Chemistry Letters, 37（12）1214-1215（2008）

（未発行論文）

11. ａ.T. Inoue, Y. Yamashita, M. Nishihara, S. Sugiyama, Y. Sonoda, T. Kumabe, M. Yokoyama, T. Tominaga, Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models, Neuro-Oncology, in press
12. ｂ. Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano; Takuya Minowa, Yoshie Maitani, and Masayuki Yokoyama, Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents, Journal of Controlled Release, in press

13. ｃ.Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, Yuriko Higuchi, Taku Satoh, Yoshimi Oka, Masayuki Yokoyama, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida, Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles,International Journal of Pharmaceutics, in press
14. ｄ.Yoshihiko Murakami, Masayuki Yokoyama, Hiroshi Nishida, Yasuko, Tomizawa and Hiromi Kurosawa, In Vivo and In Vitro Evaluation of Gelation and Hemostatic Properties of a Novel Tissue-Adhesive Hydrogel Containing a Crosslinkable Polymeric Micelle, Journal of Biomedical Materials Research: Part B - Applied Biomaterials, in press
15. ｅ.Takanori Kawaguchi, Takashi Honda, Masamichi Nishihara, Tatsuhiro Yamamoto, and Masayuki Yokoyama, Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats,
Journal of Controlled Release, in press
16. ｆ.Taku Satoh, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida, Hiroyuki Kagechika, Koichi Shudo, Masayuki Yokoyama, Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control, Journal of Controlled Release, in press

（2）特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：1 件）