

整理番号	H27-J-096	報告者氏名	澤田 敏樹
------	-----------	-------	-------

研究課題名 繊維状ウイルスからなる液晶性ハイドロゲルからの薬物放出の制御

<代表研究者> 機関名： 東京工業大学 職名： 助教 氏名：澤田 敏樹

<共同研究者> 機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：
機関名： 職名： 氏名：

<研究内容・成果等の要約>

ハイドロゲルは高い含水率をもち、また内部への透過性も優れることから、薬剤分子の徐放を制御するためのスキャフォールドとして有用である。近年の薬剤分子の多様化に伴い、多様な薬剤分子の放出を制御できるユニバーサルなハイドロゲルスキャフォールドを構築することが求められている。

本研究では、分子の放出制御が可能なハイドロゲルの構築を目指し、液晶構造を形成する繊維状ウイルス（ファージ）がとゼラチンからなるハイドロゲルを用いた。モデル薬物に分子量の大きな抗体を用い、繊維状ウイルス末端に抗体と特異的に相互作用するタグペプチドを遺伝子工学的に提示させた。抗原ペプチド提示ファージと抗体とを所定時間相互作用させた後に 60 度でゼラチンと混合し、冷却することで抗体を担持したハイドロゲルを調製した。ハイドロゲル上に緩衝液（PBS）をマウントし、ゲルから緩衝液に放出される抗体を酵素結合免疫測定（ELISA）法により定量した。抗原として HA ペプチドを、抗体として抗 HA 抗体を用いた場合、抗体は緩衝液中にはほとんど放出されなかった。一方でペプチドを提示していない野生型（WT）ファージを用いた場合、数時間でほぼ全ての抗体が緩衝液中に放出されたことから、ゲルに含まれる抗体はファージ末端のペプチドと特異的に相互作用することで、放出が抑制されたものと考えられる。抗体が緩衝液中へと放出される速度は、ファージ濃度もしくは抗原ペプチド提示ファージと WT ファージとの混合によって制御できることを見出し、望みの速度で抗体を放出できることが明らかとなった。さらに、抗原抗体の結合特異性を組み合わせることにより、抗原抗体の組合せを同時に利用することで、一つのハイドロゲルから複数の抗体の放出を制御できることを明らかにした。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

論文発表

- (1) T. Sawada, *Polym. J.*, 49, 639 (2017) (**Selected as " Highlight Article"**).
- (2) Toshiki Sawada, Miyuki Yanagimachi, Takeshi Serizawa "Controlled Release of Antibody Proteins from Liquid Crystalline Hydrogels Composed of Genetically Engineered Filamentous Viruses" *Mater. Chem. Front.*, 1, 146-151 (2017).

学会発表（口頭）

- (3) 澤田 敏樹, " 繊維状ウイルスからなるソフトマテリアルの構築" 第 16 回高分子表面討論会, 京都, 2015 年 11 月 18 日 [招待講演]
- (4) 澤田 敏樹, 柳町 みゆき, 芹澤 武 " 液晶性繊維状ウイルスを含むハイドロゲルからの分子放出の制御" 第 65 回高分子年次大会, 神戸, 2016 年 5 月 25 日 [一般講演]
- (5) 澤田 敏樹, 柳町 みゆき, 芹澤 武 " 液晶性ウイルスを含む分子徐放性ハイドロゲルの構築" 第 26 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京 2016 年 7 月 29 日 [一般講演]
- (6) 澤田 敏樹, 柳町 みゆき, 芹澤 武 " 液晶性繊維状ウイルスからなる分子徐放性ハイドロゲルの構築" 第 65 回高分子討論会, 神奈川, 2016 年 9 月 16 日 [一般講演]
- (7) 澤田 敏樹, 芹澤 武 " 繊維状ウイルスからなるハイドロゲルの構築と機能化" 第 25 回日本 MRS 年次大会, 神奈川, 2016 年 12 月 19 日 [招待講演]
- (8) 澤田 敏樹, 柳町 みゆき, 芹澤 武 " 液晶性ウイルスを含むハイドロゲルの構築と分子放出の制御" 第 97 日本化学会春季年会, 神奈川, 2017 年 3 月 16 日 [一般講演]
- (9) 澤田 敏樹, " 繊維状ウイルスを素材とするソフトマテリアルの構築" 第 2 回ソフトマター工学分科会, 東京, 2017 年 7 月 21 日 [招待講演]
- (10) 澤田 敏樹, " 繊維状ウイルスを素材としたソフトマテリアルの構築" 平成 29 年度九州地区高分子若手研究会・冬の講演会, 東京, 2017 年 11 月 18 日 [招待講演]

学会発表（ポスター）

無し

<研究の目的、経過、結果、考察（5000字程度、中間報告は2000字程度）>

① 研究の目的

高齢化社会への移行が急速に進む現代社会において、生命科学や医療の更なる高度化は至上命題であり、それを支える新たな医用材料の創製は極めて重要な研究課題となっている。中でも疾病の薬物治療においては、薬物の血中濃度の急激な上昇による副作用を回避し、適切な薬効を得ることができるよう、薬物を長期に渡って徐放することが求められている。

マイクロ～ナノメートルオーダーの繊維（網目）の集合体から形成されるハイドロゲルは、含水率が高く、内部での物質拡散や透過性に優れているため、薬物の封入や放出に有用である。従来、薬物には低分子化合物が用いられてきたが、現在では医薬の多様化に伴い、ポリペプチド（インスリンなど）やワクチンタンパク質、抗体といった様々なサイズの薬物を精度良く徐放する必要がある。ハイドロゲルの網目のサイズを調節すれば、原理的には薬物の放出が制御できるが、分子量が大きな薬物を放出する場合は網目のサイズを大きくする必要があり、結果として、ゲルとしての強度や安定性が低下する。そのため、ゲルの強度や安定性を保持したまま、望みの分子量の薬物の放出を時空間的に制御できるシステムを構築する必要がある。

助成採択者は、遺伝子工学処理により、任意の機能性ペプチドで修飾できる繊維状ウイルスである M13ファージ（図1）を利用した研究を展開してきた（M13ファージは直径5 nm、長さ1 μm、分子量約1400万と極めて細長く巨大で柔軟な構造をもつ。大腸菌のみに感染するため、ほ乳類への毒性は低い。例えば、マウスに対して体重1 kg 当たり150 mg のファージを血中に投与しても全く影響は無いことが報告されている。また、ファージは濃厚溶液中では液晶形成する特性ももち、近年ではファージそのものを機能性高分子として利用する研究が始まりつつある。応募者も最近、緻密に分子設計されたファージと金ナノ粒子を用い、ファージが規則的に配向した液晶性ハイドロゲルを構築している。

つい最近、応募者は、ファージとゲル化能をもつ高分子（ここではゼラチン）をただ混合するだけで、ファージが液晶構造を形成した、安定な構造をもつ液晶性ハイドロゲルを簡単に構築できることを明らかにしている（論文投稿中）。ゲル内において、ファージとゼラチンは相溶しているわけではなく、それぞれがドメインを形成することがわかっている。これは、両者がエントロピー駆動により偏析し、ファージが形成する液晶構造の層の隙間にゼラチンが入り込み、構造制御されて集合化したものと推察している。この液晶性ハイドロゲル内に、蛍光基で修飾した抗体分子を封入し、緩衝液に浸漬させて抗体の放出を検討した結果、約十日間に渡って抗体が徐放される結果を得ている。今後放出の詳細を明らかにする必要はあるものの、この現象はゼラチン単独では起こりえず、液晶形成したファージが徐放に効果的に機能していると推察される。つまり、巨大なファージ分子が配列して形成する液晶構造を含むハイドロゲルを利用することで、柔軟な液晶部位を薬物分子が通過することが期待でき、分子量の大きな薬物であっても徐放が可能なハイドロゲルを創製できると考えられる。ファージは、濃度や溶媒といった様々な条件によって液晶構造の

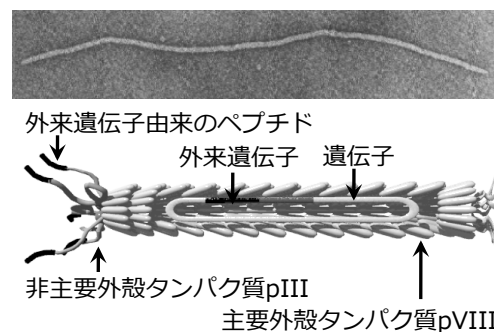


図1 M13ファージの
(上) TEM像、(下) 模式図

秩序性を変化させ、また遺伝子工学処理により、任意の薬物に特異的に結合させることもできる。そのため、ファージ分子やその集合構造を設計・制御することで、多様な薬剤の放出挙動を制御できる液晶性ハイドロゲル構築へと繋がるのが期待される。

② 研究経過・結果・考察

ファージのゲノムを制限酵素により切断し、タグペプチドとして知られる HA ペプチド（配列：Tyr-Pro-Tyr-Asp-Val-Pro-Asp-Tyr-Ala）をコードする DNA が geneIII の上流に組み込まれるようライゲーションし、ファージミド DNA を調製した。ヒートショック法によりファージミド DNA を大腸菌に形質転換することで、ファージ末端のタンパク質 pIII に HA ペプチドを提示したファージ（HA ファージ）を調製した。HA ファージをとゼラチンを所定温度で混合し、20度で一晩インキュベーションしてハイドロゲルを調製した。偏光顕微鏡による観察の結果、ペプチドを提示してもファージは規則的に配列して集合化できることがわかった。

HA ペプチドに特異的に結合する抗 HA ペプチド抗体（抗 HA 抗体）を混合したハイドロゲルを調製し、ハイドロゲル上にリン酸緩衝整理食塩水（PBS）をマウントし、PBS に放出される抗 HA 抗体を酵素結合免疫測定（ELISA）法により定量した。HA ペプチドをもたない野生型ファージを用いた場合は48時間程度で速やかに抗体が放出され、この放出挙動はファージを用いないただのゼラチンゲルと同様であったのに対し、HA ファージを用いた場合には抗体の放出が数日間に渡ってほぼ完全に抑制されることがわかった（図2、青線）。また、新たに遺伝子工学的に配列の異なる FLAG ペプチドを提示させたファージを用い、同様に実験した結果放出はほとんど抑制されず（図2、オレンジ）、ファージ末端とペプチドとの特異的な相互作用が抗体の放出抑制に重要であることがわかった。

放出される抗体の速度や量を制御するため、ファージ濃度を変えてハイドロゲルを調製し、それぞれのゲルから放出される抗体の量を定量した（図4）。その結果、ファージ末端に提示されたペプチドと抗体の分子数の比が1 : 1の場合までは抗体の放出がほぼ完全に抑制されており、抗体が過剰の条件下で初めて抗体が放出されることがわかった。このことは、極めて効率的にペプチドが機能していることを示している。

この効率的な放出抑制について検討するため、ファージ溶液と抗体を混合した溶液を MWCO 300 kDa の透析膜を用いて透析し、同様に透析される抗体の量を定量した。その結

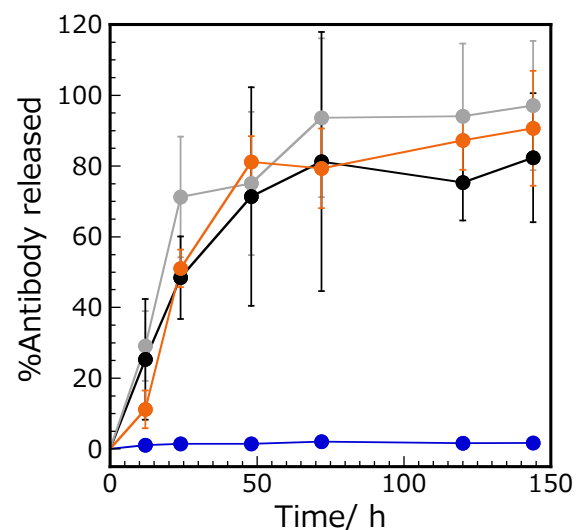


図2 抗HAペプチド抗体の放出挙動
色はそれぞれ、青：HA ファージ、オレンジ：FLAG ファージ、黒：WT ファージ、グレー：ファージ無し、のゼラチンハイブリッドゲルを用いた結果を示す。

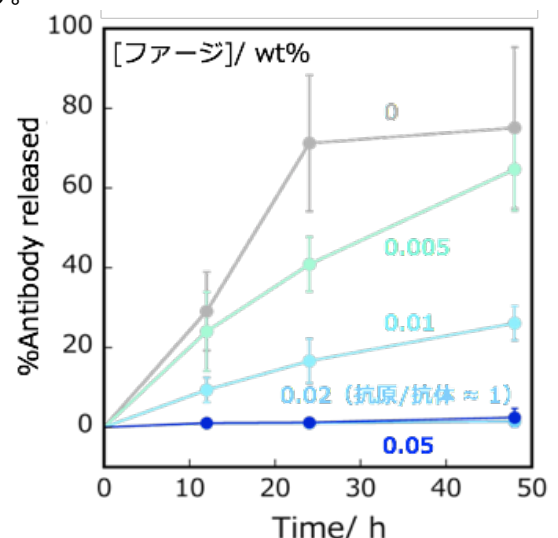


図3 抗HAペプチド抗体の放出挙動
色はそれぞれ、青：HA、オレンジ：FLAG、黒：WT ファージ、グレー：ファージ無しの結果を示す。

果、溶液からは抗体は速やかに放出され、ハイドロゲル形成した際に初めて抗体の放出は抑制されることがわかった（図4）。抗体を添加してもハイドロゲル内でのファージの規則的な集合構造が維持されていることと併せて考えると、ファージは片末端を揃えて配列しているため、多価効果により抗体とペプチドの見かけの解離速度定数が低下し、結果として効率的に放出が抑制されたものと推察される。

本システムの一般性を明らかにするため、抗原ペプチド-抗体の組合せを変えて同様に実験した。ここまで用いてきた HA ペプチドよりも結合定数の小さな、すなわち抗体との相互作用が弱くなる FLAG ペプチド（配列：Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys）ならびに Myc ペプチド（Glu-Gln-Lys-Leu-Ile-Ser-Glu-Glu-Asp-Leu）を提示したファージを新たに遺伝子工学処理により構築

し、それぞれの抗体の放出量を定量した。その結果、放出制御に必要な抗原ペプチド濃度は結合定数に応じてわずかに異なるものの、いずれも放出を抑制・制御できることがわかった。すなわち、ファージ末端に導入できる分子と特異的に相互作用することができる分子であれば、ハイドロゲルからの放出を制御できるものと考えられる。

ここまでは、一つのハイドロゲルから一種類の抗体の放出を定量してきたが、実際に薬剤徐放担体として利用することを考えると、結合部位や機構の異なる複数の薬剤を同時にかつそれぞれを適切量放出させることが必要となる。そこで、HA ペプチド提示ファージならびに FLAG ペプチド提示ファージを混合し、抗 HA ペプチド抗体ならびに抗 FLAG ペプチド抗体を同時に混合したハイドロゲルを調製した。この際、ファージ濃度の変化に伴う集合構造の変化を避けるため、野生型（WT）ファージを混合して合計ファージ濃度が一定になるよう調整した。その結果、それぞれの抗体の放出量は対応する抗原ペプチドの濃度のみ依存し、単独の放出挙動とほとんど変化は見られなかった（図5）。すなわち、構築した本ハイドロゲルからの複数分子の放出には直交性があり、望みの分子の放出挙動を緻密に制御できることが明らかとなった。

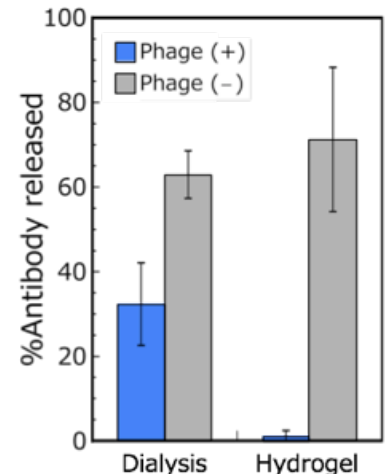


図4 透析もしくはハイドロゲルから放出される抗体量

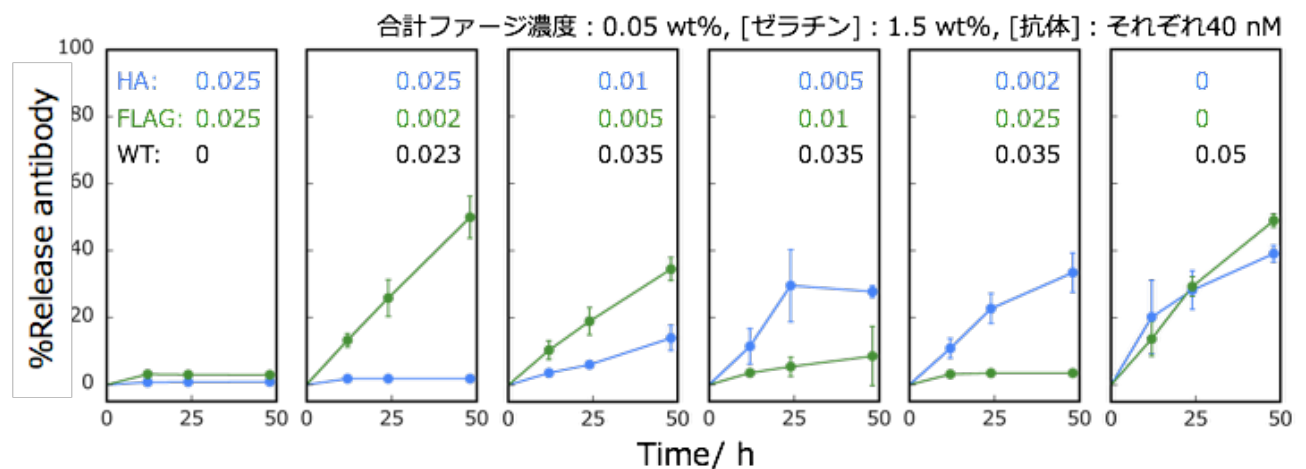


図5 HA・FLAG・WT ファージ混合ハイドロゲルから放出される抗 HA ペプチド抗体ならびに抗 FLAG ペプチド抗体の放出挙動

以上の結果は、遺伝子工学処理により簡便に様々な分子に結合するペプチド・タンパク質を提示することができる繊維状ウイルス M13 ファージを素材としたハイドロゲルを構築することで、望みの薬剤分子の放出を自在に制御できる新しいハイドロゲルを構築できることを示している。今後は、高分子薬剤の組合せ以外にも従来の低分子薬剤や新たに有用性が見出されている中分子薬剤などを組み合わせて利用することで、本ハイドロゲルシステムの有用性を明らかにしていきたいと考えている。元来、生体に固有の特性である高い分子認識能をマテリアル創製に積極的に利用することにより、これまでにない新しい高機能なマテリアルを創製できると考えられ、繊維状ウイルスの遺伝子工学による機能化と液晶特性を活かしながら新しいソフトマテリアル創製に繋げていきたいと考えている。