

整理番号	2020-J-055	報告者氏名	上沼 駿太郎
------	------------	-------	--------

研究課題名

シクロデキストリンから成る自己組織化ナノシートを用いた高接着性 DDS 材料の開発

<代表研究者> 機関名：東京大学 職名：助教 氏名：上沼 駿太郎

<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>

本研究では、環状オリゴ糖であるシクロデキストリン(CD)の自己組織化を利用したナノシート材料(擬ポリロタキサンナノシート: PPRNS)を用いて、PPRNS に薬剤分子を内包させることによる高付着性と生分解性を併せ持つ新規接着性 DDS 材料の開発を行っている。

これまでに行った PPRNS への分子導入実験では、PPRNS に低分子化合物(ここではカテキンやリモネン、ドルゾラミド塩酸塩など)を導入させることができたということが定性的にわかった。しかしその定量方法に困難があり、現時点ではまだ定量に至っていない。今後の研究を通してその導入量を定量的に明らかにし、その原理や制御方法を明らかにする予定である。

また、PPRNS の分散媒(ここでは重水)への加熱による溶解機構も調べた。PPRNS の溶解機構を調べることは、DDS 材料として利用する際に薬剤分子の徐放能に強く関係するため重要である。その結果、溶解初期において軸分子は溶解せず  $\beta$ -CD だけが脱包接して溶解し、さらに加熱すると軸分子と  $\beta$ -CD が同時に溶解することが分かった。初期段階において  $\beta$ -CD だけが軸分子から脱包接するという機構はトポロジカル超分子特有の挙動である。この結果から、軸分子末端基を化学修飾することによって  $\beta$ -CD の脱包接挙動を制御し、PPRNS の溶解性を制御できる可能性が示唆された。

最後に、有機溶媒中に PPRNS を投入したところ、多くの有機溶媒中で PPRNS は凝集した。PPRNS 中の軸分子が存在していれば、PPRNS の上下に存在する PEO 鎖の立体反発によって、PPRNS は分散するはずである。したがって有機溶媒中で凝集するという PPRNS の挙動から、有機溶媒中では PPRNS 中から軸分子が除去されたことが示唆される。軸分子が除去されていれば、その空孔には代わりに低分子化合物が導入されるはずであるから、より多くの種類・量の薬剤分子が導入されることが期待される。今後、軸分子を除いた CD のみからなるナノシートの創成や、そのナノシートが有する多数の空孔への低分子化合物の導入について研究を続ける予定である。

<研究発表（口頭、ポスター、誌上別）>

[口頭発表]

1. 上沼駿太郎、安藤直樹、横山英明、伊藤耕三、“Disassembly Mechanism of Pseudo-Polyrotaxane Nanosheet in Water”, 第 71 回高分子討論会、北海道、2022 年 9 月
2. Shuntaro Uenuma, Rina Maeda, Hideaki Yokoyama, Kohzo Ito, “Pseudo-Polyrotaxane Nanosheet Formed by Hierarchical Self-Assembly”, Pacificchem 2021, Online, 2021 年 12 月
3. 上沼駿太郎、前田利菜、横山英明、伊藤 耕三、“擬ポリロタキサンナノシートの形成における軸分子組成の影響”、第 70 回高分子討論会、オンライン、2021/9/7
4. 武田純真、遠藤季美香、上沼駿太郎、横山英明、伊藤耕三 “擬ポリロタキサンナノシートの付着挙動と分解性”、第 70 回高分子討論会、オンライン、2021/9/7
5. 遠藤季美香、上沼駿太郎、前田利菜、横山英明、伊藤耕三、“CD 自己組織化ナノシートの生体模倣表面への付着”、第 37 回シクロデキストリンシンポジウム、オンライン、2021/9/2
6. 安藤直樹、上沼駿太郎、横山英明、伊藤耕三、“擬ポリロタキサンナノシートの熱分解機構”、第 37 回シクロデキストリンシンポジウム、オンライン、2021/9/2
7. 上沼駿太郎、前田利菜、横山英明、伊藤 耕三、“PSEUDO-POLYROTAXANE NANOSHEET CONSTRUCTED BY HIERARCHICAL SUPRAMOLECULAR SELF-ASSEMBLY”、Federation of Asian Polymer Societies (FAPS) 2021、オンライン、2021/6/15

[ポスター発表]

1. 遠藤季美香、上沼駿太郎、前田利菜、横山英明、伊藤耕三、“擬ポリロタキサンナノシートの生体模倣表面への付着”、第 70 回高分子討論会、オンライン、2021/9/6
2. 武田純真、遠藤季美香、上沼駿太郎、横山英明、伊藤耕三、“擬ポリロタキサンナノシートの付着と分解”、第 37 回シクロデキストリンシンポジウム、オンライン、2021/9/2

[投稿論文]

1. N. Ando, S. Uenuma, H. Yokoyama, K. Ito, “Thermally induced disassembly mechanism of pseudo-polyrotaxane nanosheets consisting of  $\beta$ -CD and a poly(ethylene oxide)-*b*-poly(propylene oxide)-*b*-poly(ethylene oxide) triblock copolymer”, *Polym. Chem.*, 2022, **13**, 501.
2. S. Uenuma, K. Endo, N. L. Yamada, H. Yokoyama, K. Ito, “Polymer Brush Formation Assisted by the Hierarchical Self-Assembly of Topological Supramolecules”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2021, **13**, 60446.

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

[研究の目的]

シクロデキストリン (CyD) とは環状の分子構造を有するオリゴ糖であり、天然に豊富に存在する安価・安全な分子である(Figure 1)。また環構造を構成するグルコースユニットの数が 6、7、8 個のものはそれぞれ  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -CyD と呼ばれる。環状構造の外側は親水的であるのに対して内側は疎水的となっているため、CyD は環状構造の内側に分子を取り込み (分子吸着)、また放出 (分子脱着) することができる。CyD は分子吸着・脱着性を利用して吸着材や担体として利用される。例えば大気・海洋中の環境汚染物質の吸着 (環境汚染改善)、空気・溶液中の悪臭分子の吸着 (消臭) と芳香系分子の放出 (芳香剤)、溶液中の苦み分子の吸着 (味改善)、薬物輸送担体 (ドラッグデリバリーシステム: DDS) などに利用されている。

ドラッグデリバリーシステム(DDS)とは、薬物を体内の適切な箇所へ適切な量を輸送するシステムである。一般的な DDS 材料では、高分子ミセルやベシクルなど、会合体の形態は球状や球状に近い。球状の形態は標的物質に対する接触面積が小さく、引力相互作用は小さい(図 1 左)。DDS キャリアを大面積で接触させて標的箇所との相互作用を強めることができれば、遊離した非効率 DDS 材料が減少し、高価な薬剤分子の高効率吸収や副作用低減が期待できる。

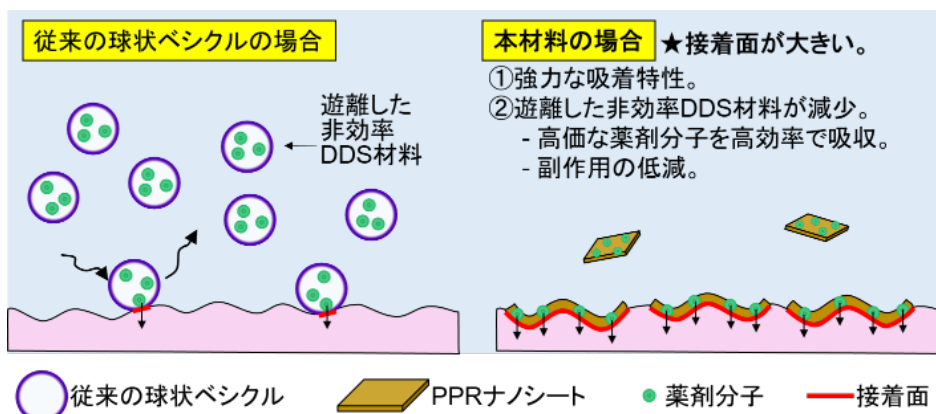


図 1. 球状ベシクルおよびナノシートの材料表面への付着と担持分子の徐放の模式図。

CyD は DDS キャリアとしての利用が展望されるため、CyD への分子吸着性能向上に関する様々な基礎研究がなされている。近年当研究室では、CyD と高分子の自己組織化を利用することで、厚さ 10 nm 程度のナノシートを作成することに世界で初めて成功した(図 2)。我々はこれを擬ポリロタキサナノシート (PPRNS) と呼んでいる。高分子には高生体適合性かつ安価なポリエーテル (主にポリエチレンオキシド (PEO)・ポリプロピレンオキシド (PPO)・これらのブロックコポリマー)

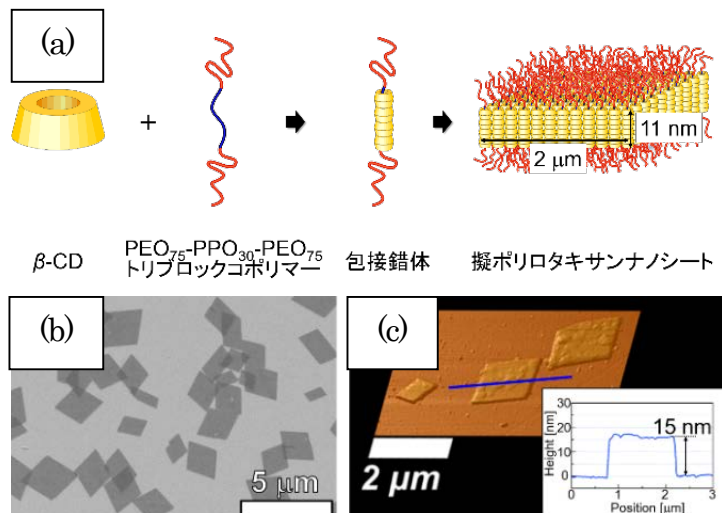


図 2. (a) PPRNS 形成の模式図。 (b) PPRNS の SEM 像。 (c) PPRNS の AFM 像および高さプロファイル。

を用いる。ポリエーテルと CyD を室温中の水中で混合して約一週間すると、複数の CyD の内孔にポリエーテルが貫通し擬ポリロタキサン (PPR) を形成し、PPR は自発的に集合してナノシート (PPRNS) を形成する (Chem. Commun. 2019, 52, 3881. 図 2)。本研究では、PPRNS に薬剤分子を内包させることによる高付着性と生分解性を併せ持つ新規接着性 DDS 材料 (図 1 右) の開発を目指し、PPRNS への分子担持や分解性、付着性について研究した。

### [経過・結果・考察]

#### 【分子導入実験】

まず PPRNS への分子導入量の測定を行った。PPRNS への低分子導入実験は次のように行った (図 3)。まず導入量定量には UV-vis 測定を用いるため、波長 200–900 nm に吸光を示す低分子化合物  $P$  を選択した。この低分子化合物  $P$  を PPRNS (濃度  $[NS]$ ) の分散水に添加 ( $P$  の濃度  $[P_i]$ ) すると、 $P$  は PPRNS に取り込まれる。PPRNS は 1–2  $\mu\text{m}$  程度の大きさを有しているため、遠心分離することで容易に沈降する。沈降させた後に残った上澄み液に対し紫外可視吸収スペクトル UV 測定 (UV 測定) を行うことで、上澄み液中の薬剤分子  $P$  の濃度  $[P_{free}]$  が得られる。濃度  $[P_i]$  から  $[P]$  を差し引くと、PPRNS に吸着した薬剤分子  $P$  の濃度  $[P_{abs}]$  が求まる、と考えた。

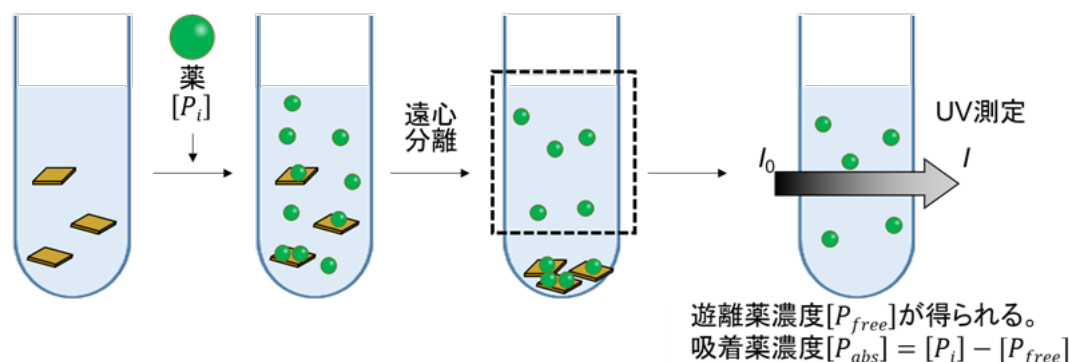


図 3. PPRNS への分子導入の方法と導入量定量方法の模式図。

今回の研究においては、ベタメタゾン (抗炎症薬)、スピロノラクトン (利尿薬)、カテキン (健康促進成分)、ドキソルビシン (抗がん剤) などの導入量を調べた。その結果、いずれの薬剤分子の場合も、PPRNS に導入されることが明らかになった。しかし、低分子化合物の加水分解や、水への溶解性が悪かったり分子凝集が生じることによって遠心分離の際に PPRNS に吸着していない分子の沈殿が生じたりして、正確な評価が容易ではなかった。

そこで現在は、透析法を使った実験を行っている。この場合には加水分解が有意に進行する低分子化合物には利用できないが、加水分解が進行しない分子に対しては、遠心分離法と比較してより正確な実験となることが判明した。各低分子化合物に対して適切な実験・評価方法を適用することが必要とされることわかったので、今後も各化合物の PPRNS への吸着量評価を行う計画である。

#### 【PPRNS の溶解機構】

PPRNS を DDS 材料として利用する場合、PPRNS の分解性は薬剤徐放能と強く関係すると考えられる。そのため本研究では、PPRNS 分散水を希釈することで誘起される PPRNS の分解の機構を調べた。

PPRNS 中の PEO-PPO-PEO と  $\beta$ -CD は固体であり運動性は極めて低いが、水中に溶解した  $\beta$ -CD と PEO-PPO-PEO は運動性が比較的高い。したがって溶液  $^1\text{H}$  NMR 測定によって、溶液中の  $\beta$ -CD と PEO-PPO-PEO 濃度を得ることができる。これらの値と仕込んだ各成分の濃度から、PPRNS を形成した  $\beta$ -CD と PEO-PPO-PEO の濃度を計算することができる。これを利用して、加熱に伴って溶解する PPRNS の組成変化について、温度に対するプロットとして得ることができる。この時、PEO-PPO-PEO と  $\beta$ -CD の  $^1\text{H}$  NMR スペクトルにおけるそれぞれのピークの ppm 値は異なるため、それぞれの濃度

を独立して求めることができる。図4はPPRNS 重水分散液を加熱したときの各温度における $\beta$ -CDの溶解率 $X_{CD}(T)[\%]$ とPEO-PPO-PEOの溶解率 $X_{axis}(T)[\%]$ のプロット(vs 温度)である(溶解率は、PPRNS が全く溶解していないときに0、PPRNS がすべて溶解すると100%となる)。50℃付近において、 $\beta$ -CDは溶解するが、PEO-PPO-PEOは溶解しないことが分かった。このことから、PPRNSの溶解の初期段階において、PEO-PPO-PEOは溶解せず、 $\beta$ -CDが脱包接して溶解することが示唆された。

原子間力顕微鏡や広角/小角X線散乱法などの構造解析によって、図5に示したモデルで分解が進行することが明らかになった。すなわち、重水中のPPRNSの加熱溶解の模式図。初期段階では $\beta$ -CDの脱包接が生じるため、 $\beta$ -CDは溶解するがPEO-PPO-PEOは溶解しない。そのためPPRNSの厚さは減少するが、面内方向のサイズは減少しない。さらに加熱すると $\beta$ -CDとともにPEO-PPO-PEOも溶解するため、面内方向の溶解が生じる。さらに加熱するとPPRNS中のすべての成分が重水中へ溶解する。本研究によりPPRNSの溶解の機構が明らかになった。まず $\beta$ -CDの脱包接が生じるという結果から、PPRNSの分解はPEO-PPO-PEOに末端基を付与することによって制御可能であることが期待される。

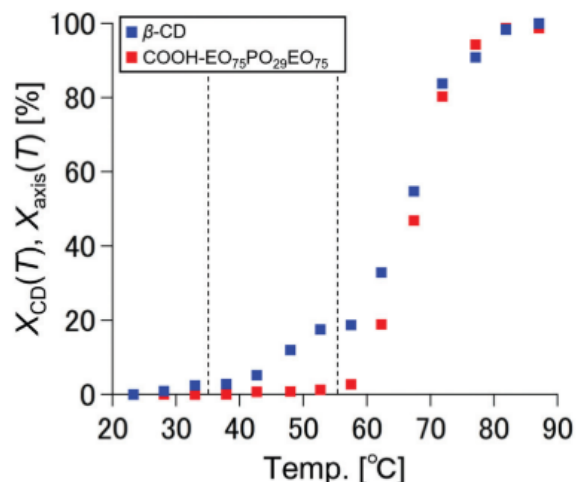


図4. 重水に分散したPPRNSの加熱溶解における $\beta$ -CDとPEO-PPO-PEOの溶解率。

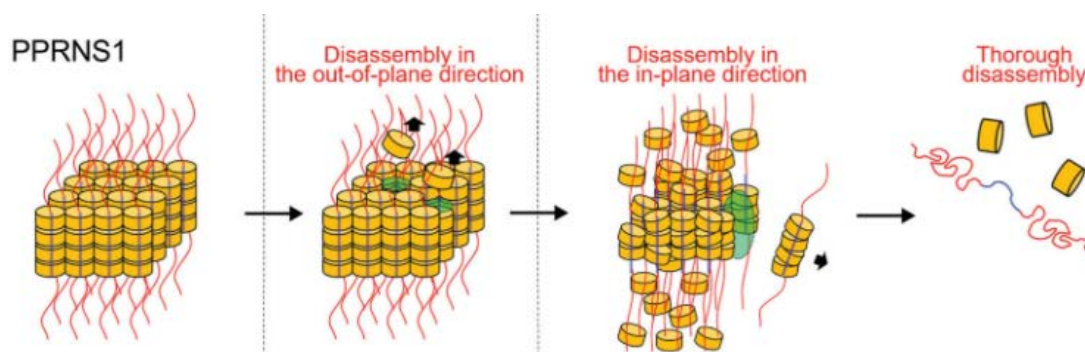


図5. 重水中のPPRNSの加熱溶解の模式図。初期段階では $\beta$ -CDの脱包接が生じるため、 $\beta$ -CDは溶解するがPEO-PPO-PEOは溶解しない。そのためPPRNSの厚さは減少するが、面内方向のサイズは減少しない。さらに加熱すると $\beta$ -CDとともにPEO-PPO-PEOも溶解するため、面内方向の溶解が生じる。さらに加熱するとPPRNS中のすべての成分が重水中へ溶解する。

### 【PPRNSの有機溶媒への分散】

PPRNSを有機溶媒に分散させることができれば、PPRNS中のCDに異なる種類の薬剤分子や蛍光分子などの機能性分子を導入させることができる可能性が広がる。そこで、作成したPPRNSを様々な有機溶媒に投入し、その分散状態を顕微鏡により観察した。すると、本研究にて試したすべての溶媒において、PPRNSは凝集してしまうことが明らかになった。PPRNSの上下にPEO鎖が存在すれば、PPRNSは分散状態を保つと考えられるため、この凝集は軸分子がPPRNS中から除去されたことを示唆する。

今後、PPRNS中から軸が除去されたことを確認する。もし軸が除去されていれば、そのCDカラム空孔には新たに低分子化合物を担持させることができると考えられる。このようなシクロデキストリンナノシートの作製と、その薬剤分子担持能に関する研究を、今後も続けていく計画である。