

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「超空間制御に基づく高度な特性を有する革新的機能素材等の創製」
研究課題「単分散プラトニックミセルを利用した細胞標的型DDSの基盤構築」

研究終了報告書

研究期間 2015年 10月～2021年 3月
(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

研究代表者：櫻井 和朗
(北九州市立大学環境技術研究所、教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

水溶液の中で単分散(会合する分子数や形に分布が存在しない)なミセルを作る新規な化合物を発見した。その会合数は2、6、8、12、20と不連続で飛び飛びの値であり、驚くことにプラトンの正多面体の面数と一致する。この化学現象は、球面上に点をできるだけ離して配置する数学上の未解決課題:テームス問題から説明ができると考えた。プラトンの正多面体から、このような性質を持つミセルを「プラトニックミセル」と呼ぶことにした。このミセルのプラトニック性:「不連続な会合数」&「プラトンの正多面体の数と一致」は、球状ミセルに成立する未知の一般法則であると考えられる。これが正しいならば、プラトニックミセルは我々が合成した化合物以外でも見られるはずである。このプラトニックミセルが一般的に成立する法則であること、トムソン問題に基づいて熱力学的に説明をする事が本申請の基礎的研究の大きな目標であった。これに関しては20報ちかい原著論文と1報の総説、5回のカバーのデザインに採用され、また最近出された自己組織化の本の表紙にもなったことから、プラトニックミセル＝一般的な法則であることは受け入れられたと考える。また、トムソン問題に基づく説明も理論家から支持されている。

また上記の過程で、SPRING8の強力な放射光を使った X 線小角散乱から得られるデータと分子動力学法を用いたプラトニックミセルの可視化を目指してきた(八木と大河平のグループ)。溶媒の水の扱いに苦労をしたが、計算化学により溶液中で揺らいでいるミセルの可視化に成功した。この結果は2報のScientific Report として論文化を行った。

このような中からプラトニック性を実現する化学構造の条件を明らかにして、得られた条件を、核酸医薬やペプチドなどの生理活性分子をコンジュゲートした脂質の分子設計に応用し、薬物送達用(Drug Delivery System)DDS ナノ粒子の設計基盤を目指した。計画当初に考えていたDNAの粒子は、西川らのグループで粒子の形状と免疫系の細胞への取り込みの関係などが明らかになったが、プラトニックミセルに組み込むまでは到達できなかった。DNA粒子では分子間での鎖交換反応が起きて一度組みあがった粒子が安定に存在できなかった。

計画の後半から方向性を見直し、今までの DDS 粒子では取扱いが困難であった超疎水性の生理活性低分子化合物を送達する方法の開発に切り替えた。プラトニックミセルは親水性の官能基が大きな界面活性剤で且つ、疎水性部分の凝集力が十分に大きな場合出現する。そこで、そのような分子を設計して、シクロデキストリン(CD)とエピクロロヒドリン(EP)からできるハイパーブランチ高分子の反応系をミセル内で束縛することにした。これにより、通常は水に不溶性の白いハイパーブランチ高分子の塊ができるところが、粒径が10から100ナノメートルの間で制御された粒子を作ることになった。CD は水に可溶であることから、反応過程においてミセル内に閉じ込められたEPと水層のCDがミセル表面で反応し、CDに表面が覆われた粒子ができるものと考えている。このようにして得られた粒子では疎水性化合物との結合定数が大きなもので 100 倍も増加することが判明した。モデル化合物として従来の技術では使用が困難であったアルファーマンゴスチンを内包させた粒子の抗癌作用を調べたところ、飛躍的な改善が見られた。

臓器や細胞は、我々の想像以上に、極めて正確にナノ粒子の大きさや形状を識別している。つまり、標的とする細胞が好む形や大きさに厳密に制御・設計した単分散な DDS 粒子の創成は、効率的な薬物送達のためには極めて重要である。我々が見出したCDのナノ粒子は、巡航ミサイルのように、生体の異物排除機能を回避して、搭載した化合物によって、目的の臓器、さらには細胞、細胞内の特定の器官に到達する能力を持つと思われる。これは、次世代の薬物送達システムの基盤技術となると考える。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、シクロデキストリン(CD)とエピクロロヒドリン(EP)からできるハイパーブランチ高分子(CDNP)に抗癌作用や活性酸素(ROS)をトラップする能力がある α マンゴスチン(aMG)の内包化の最適化と、その粒子(CDMP-aMG)を用いた動物試験を実施した。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. プラトニックミセルの概念が受け入れられたこと

概要:教科書に記載されているミセルの概念は、ミセルの会合数や脂質分子が水中に溶けた時のミセルの構造は、脂質分子を単純化した体積と形状だけに基づいて説明するパッキングパラメーター理論である。この定説によると、会合数には特定の値がなく、分布がある。多くの系ではこの理論が成立するが、会合数が30以下では成立しなくなり、我々のプラトニックミセルへと変わっていく。従って、今までの定説をさらに精密化を行ったことになる。これは、100年を超えるミセル科学の歴史に残る基礎的で大きな成果となる。事実、最近のミセルや自己組織化を総説した本の表紙として採択された(図1)。この結果はLangmuir や Soft Matter などの学術雑誌で20報を超える論文となり、平成30年の高分子学会賞を受けるとともに、コロイドやミセルに関する最も権威ある学術誌 Langmuir が主催する講演会のプレナリーに招待された。

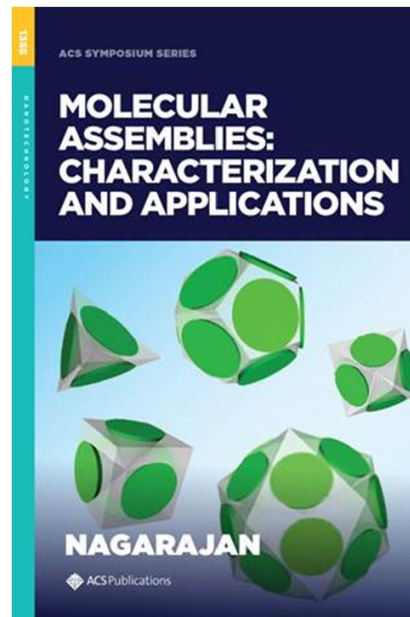


図1 ミセルの理論家である Nagrajan が編集した本の表紙絵にプラトニックミセルが採択された。

論文:別紙の論文リスト全体

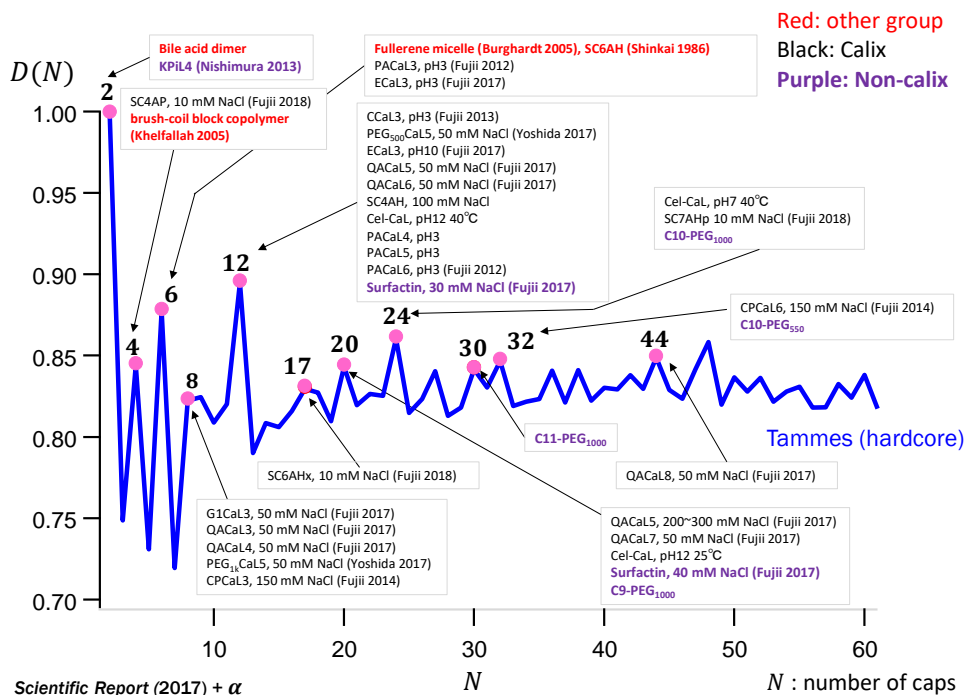


図2 球面上の細密充填問題である Tammes 問題の被覆率(D(N))と今までに見つかった会合数が小さい球状ミセルの例。赤字は文献調査してプラトニックミセルであると思われる先行研究。黒字はカリクサレン系、紫は本研究で見出したカリクサレン系以外の脂質でプラトニックミセルを示す系。

カリクサレン系ミセルの会合数がプラトンの正多面体の面数と一致する理由について、ミセルの疎水性コアが親水性基によって被覆される度合い(表面被覆率)を考慮してきた。球面上に同一円をできるだけ均等に配置するテーマス問題において、その円の数 N に対して、そのときの表面被覆率をプロットすると図2のようなプロファイルとなる。被覆率が高いということは、熱力学的に不利な疎水性相互作用からの自由エネルギーに対する寄与が小さくなる。このように、 N 数が20以下ではジグザグなプロファイルとなり、特定の N 数において極大値を示す。これらは、これまで我々が発見してきたミセルの会合数と一致している。図中の黒字はカリクサレン系、紫の字はカリクサレン以外の系、赤字は今までに他の研究者が「単分散ミセル」とか「形状固定ミセル」として奇妙なミセルの存在を報告してきた例である。被覆率の極大値に完全に対応して実際のミセルが観測されている。この表面被覆率が高い点で形成されるミセルの疎水性コアは効率よく水との接触を避けられており、熱力学的に安定な構造となっていると考えられる。このプラトニックミセル形成とテーマス問題との関連性については、一連の論文でようやく世界的にも認知されるようになった。この理論的な説明は高分子学会賞を受賞理由の一つである。

ミセルの形成理論の中で最も根本的な理論であるパッキングパラメーター理論によると、ミセル形成の自由エネルギーは式1で与えられる。2式目はそれを幾つかの近似の中で球状ミセルに当てはめたものである。

$$\begin{aligned} \left(\frac{\Delta\mu_N^\circ}{kT}\right) &= \left(\frac{\Delta\mu_N^\circ}{kT}\right)_{\text{transfer}} + \left(\frac{\Delta\mu_N^\circ}{kT}\right)_{\text{interface}} + \left(\frac{\Delta\mu_N^\circ}{kT}\right)_{\text{head-repulsion}} \\ &= \left(\frac{\Delta\mu_N^\circ}{kT}\right)_{\text{transfer}} + \left(\frac{\sigma}{kT}\right) \frac{1}{N_{agg}} + \left(\frac{\alpha}{kT}\right) N_{agg} \end{aligned} \quad (1)$$

我々は、第1式目の界面の自由エネルギーを表す項を以下のように被覆率 D を入れて改良することを提案している。

$$\left(\frac{\Delta\mu_N^\circ}{kT}\right)_{\text{interface}} = \left(\frac{\sigma}{kT}\right) \frac{4\pi R^2}{N_{agg}} [1 - D(N)] \quad (2)$$

2. ミセルの可視化が可能になった事

概要: 分子動力学法ではエネルギーの最小値になるように構造を安定化させる。しかし、分子間のポテンシャルに関するパラメータの選び方によって構造が異なる。また、計算の初期構造によって結果が異なる。これらの課題を解決するために、溶液中でのミセルの構造の平均値を反映している X 線小角散乱と比較して、初期構造やパラメータの選択することにより、計算が可能となった。この方法は、タンパク質のような単純な系では MD-SAXS として知られているが、本系のような複雑な系に適用したのは初めてである。

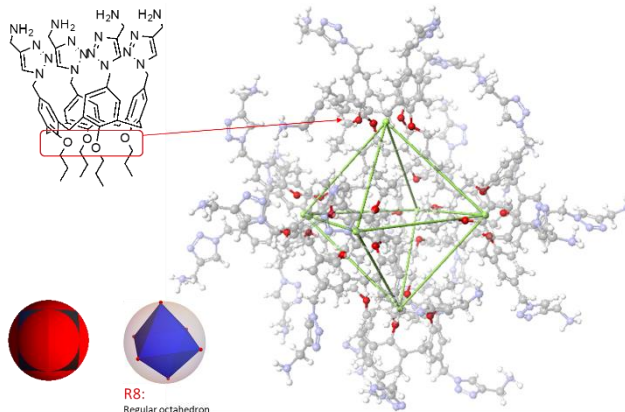


図3 MD 計算で求めた計算化学の SAXS との Jaccard 係数が高い点における構造。比較を容易にするために、カリクサレンの酸素原子を赤く示し、その中心を緑色の線で結んだ。緑の線は正八面体を示し、カバー率で予測されたように、分子が正八面体の頂点の方向を向いていることが計算化学からも判明した。

2019年度は、このプラトニックミセルに関する計算化学について Science 系の雑誌である Scientific Report に論文が受理された。計算化学によると、トムソン問題から予言される位置にミセルの中心が来た時がエネルギー的にも安定になることが判明した。

論文: Mylonas, E.; Yagi, N.; Fujii, S.; Ikesue, K.; Ueda, T.; Moriyama, H.; Sanada, Y.; Uezu, K.; Sakurai, K.; Okobira, T., Structural analysis of a calix [4] arene-based Platonic Micelle. *Scientific reports* **2019**, *9* (1), 1982.

3. シクロデキストリンの結合定数を100倍増加

概要: シクロデキストリン(CD)は包摂化合物として超分子化学が誕生した最初の頃から研究されて来ている。CD を粒子径がほぼ均一に揃ったナノサイズの球状粒子の表面と内部に配置することで、CD に内包される化合物との結合定数を飛躍的に(50倍から100倍)に増加することに成功した。この会合数が2桁増加する現象に関して、高分解能NMRの最新の技術であるDOSY (Diffusion Ordered SpectroscopY)を用いた手法により解析した(論文として投稿中)。

論文: Van, D. T. H.; Anh, D. T. N.; Fujii, S.; Sakurai, K., Enhanced Binding Constant of Cyclodextrin to Alpha-mangostin in Hyperbranched Polymers. *Chemistry Letters* **2020**, 49 on web.

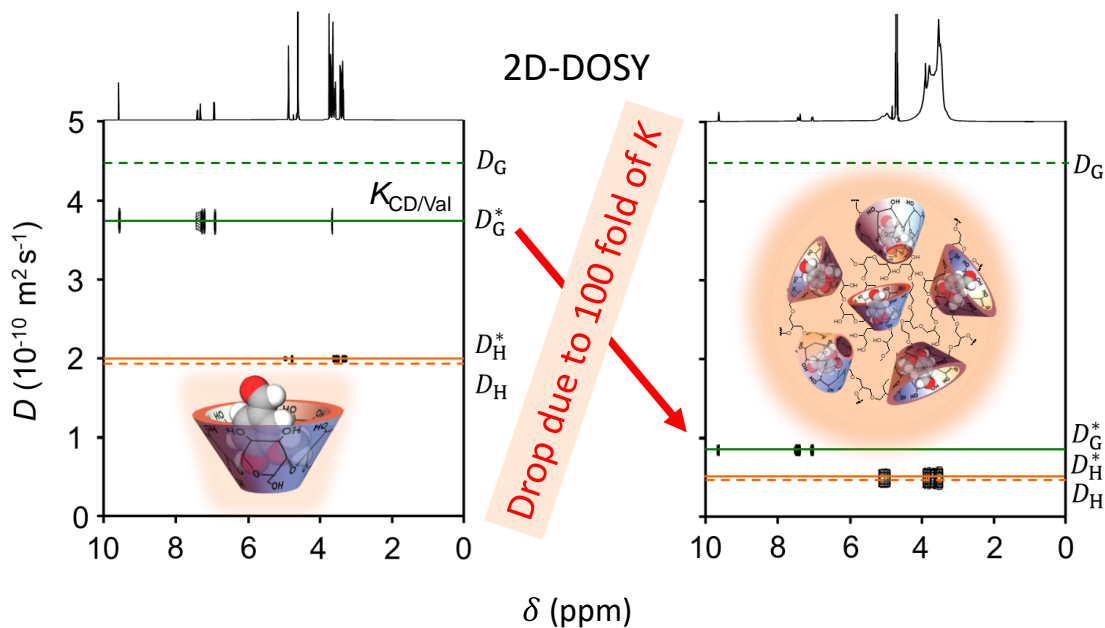


図4 2次元プロットした DOSY の結果。縦軸は NMR で測定した拡散係数、横軸はケミカルシフト。拡散係数は組成分率での平均値を観測するため、CD との結合定数が高いほどゲスト分子である aMG の拡散係数(図中ではゲストの拡散係数 D_G と表示)は CD の拡散係数(図中ではホストの拡散係数 D_H と表示)に近くなる。

4. 脳梗塞後の虚血還流症の治療剤の開発

概要: 脳虚血時に起こる活性酸素種産生は神経細胞死を誘導するため、酸化ストレスの低減が脳梗塞病態の改善につながる。マンゴスチンの果皮に含まれる α -マンゴスチンは、抗酸化作用を有し、認知機能改善作用等が報告されている。 α -マンゴスチンは水溶性が極めて低いためこの用途への利用が困難であったが、CDNP-aMGを用いて、in vitro-神経細胞障害及び in vivo-マウス脳梗塞モデルを用いて α -マンゴスチン及びナノ粒子化の作用を検討したところ、既存薬

より優れた特性が見られた。今後は、前臨床研究で効果と確認するとともに、企業への導出を模索する。

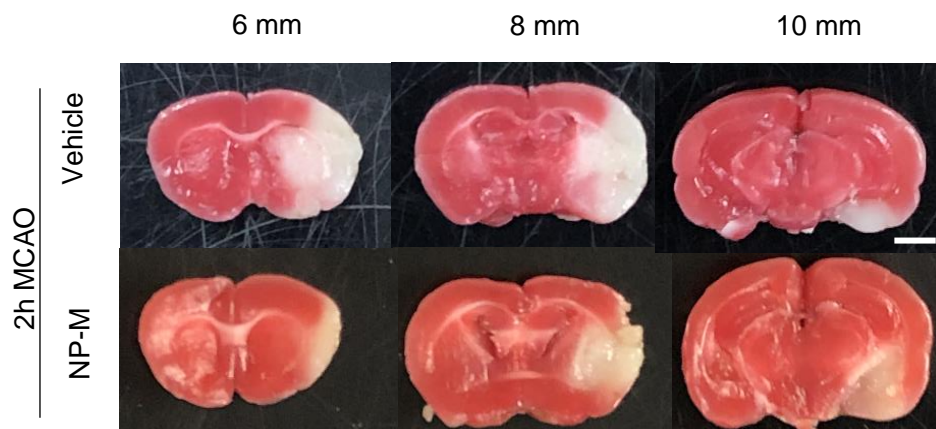


図5 中大脳動脈閉塞 2 時間後に再灌流を行い、一過性脳虚血を誘導した。閉塞前及び再灌流後にナノ粒子化 α -マンゴスチン (25 mg/kg) を尾静脈内投与し、閉塞 24 時間後に行動試験を行った。その後、脳を摘出し、2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride 染色を行い、未処置群 (図では Vehicle と記載) と比較した。白い部分が壊死した部分であり、 α -マンゴスチン処理群 (NP-M) では壊死部分がほとんどないことが分かる。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 感染症ワクチンの効果を飛躍的に高める可能性のある CpGDNA アジュバントの開発

概要: 本グループの西川らは天然に存在しない CpGDNA を含む高次構造を有した DNA 構造体が免疫細胞にあたる影響を調べてきた。本 CREST が開始した当初の研究目的は、構造体の形状と細胞応答の基礎研究であった。また、櫻井らも前の CREST の継続研究として多糖核酸複合体の DDS の応用研究として、免疫刺激性の CpG のデリバリーの研究をおこなってきた。COVID19 のパンデミックが 2020 年の 3 月から始まり、我々が研究してきた CpG がワクチンの性能を飛躍的に高める可能性が出てきた。この成果は、本 CREST で開発してきた溶液中のナノ構造体の形状を正確に測定する技術の応用である。

論文: Tan, M.; Takahashi, N.; Fujii, S.; Sakurai, K.; Kusamori, K.; Takahashi, Y.; Takakura, Y.; Nishikawa, M., Analysis of Tertiary Structural Features of Branched DNA Nanostructures with Partially Common Sequences Using Small-Angle X-ray Scattering. *ACS Applied Bio Materials* 2020, 3 (1), 308-314.

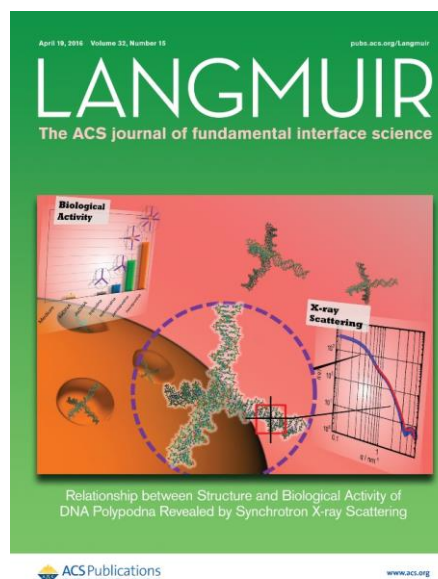


図 6 西川 G で進められているテトラポッド DNA の水溶液中での精密な形状を、小角散乱の散乱データで決定。Langmuir, 32, 3561-3802 (2016) 号の表紙となった。

特許出願:特許出願願書(特願 2019-235078) NapaJen Pharam より出願済み

2. 難溶性の疎水性生理活性低分子医薬の DDS キャリヤーの開発

概要:シクロデキストリンのハイパーブランチ粒子を用いた新規の DDS キャリヤーを開発した。モデル化合物であるアルファーマングスチンを用いた抗癌効果を確認し、医学部や低分子医薬を開発している会社と共同研究を進めている。標的化合物に関する特許を出願するまえなので、開示はしない。

論文:Doan, V. T. H.; Lee, J. H.; Takahashi, R.; Nguyen, P. T. M.; Nguyen, V. A. T.; Pham, H. T. T.; Fujii, S.; Sakurai, K., Cyclodextrin-based nanoparticles encapsulating α -mangostin and their drug release behavior: potential carriers of α -mangostin for cancer therapy. *Polymer Journal* **2020**, *52* (4), 457-466.

特許出願:特許出願願書(特願 2019-172063) 北九大 TLO から出願 PCT 出願済み

<代表的な論文>

1. Fujii, S.; Yamada, S.; Matsumoto, S.; Kubo, G.; Yoshida, K.; Tabata, E.; Miyake, R.; Sanada, Y.; Akiba, I.; Okobira, T., Platonic Micelles: Monodisperse Micelles with Discrete Aggregation Numbers Corresponding to Regular Polyhedra. *Scientific reports* **2017**, *7*, 44494.

概要: プラトニックミセルの発見とそれが一般的に拡張可能であることを主張した最初の論文。

2. Lee, J. H.; Fujii, S.; Takahashi, R.; Sakurai, K., Monodisperse Micelles with Aggregation Numbers Related to Platonic Solids. *Macromolecular Rapid Communications* **2020**.

概要: Feature Article として今までのプラトニックミセルのデータを総説した。

3. Doan, V. T. H.; Lee, J. H.; Takahashi, R.; Nguyen, P. T. M.; Nguyen, V. A. T.; Pham, H. T. T.; Fujii, S.; Sakurai, K., Cyclodextrin-based nanoparticles encapsulating α -mangostin and their drug release behavior: potential carriers of α -mangostin for cancer therapy. *Polymer Journal* **2020**, *52* (4), 457-466.

概要:シクロデキストリンをナノ粒子化して難溶性の低分子薬剤を送達する技術の論文。合成からマウスを用いた実験を含む。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 北九大グループ

研究代表者: 櫻井 和朗 (北九州市立大学環境技術研究所 教授)

研究項目

- ・プラトニックミセルの技術をつかった人工的なウイルス状形態の構築
- ・DNA折り紙の技術を利用したピラミッド型DNAの構築
- ・Pickering 粒子の固定化技術の開発
- ・プラトニックミセル構成材の合成と水中での自己集合

② 東京理科大グループ

主たる共同研究者: 西川 元也 (東京理科大学薬学部 教授)

研究項目

- ・DNA ナノ構造体の設計、構築
- ・DNA ナノ構造体の細胞取り込みの評価
- ・免疫刺激性 DNA を利用した DNA ナノ構造体と細胞との相互作用解析
- ・DNA ナノ構造体を認識する細胞表面分子の同定
- ・体内動態解析および in vivo におけるサイトカイン産生の評価

③ JASRI グループ

主たる共同研究者: 八木 直人 (高輝度光科学研究センター利用研究促進部門 特別研究員)

研究項目

- ・小角散乱測定技術の高度化と測定の効率化
- ・小角散乱データからプラトニックミセルの構造に関する詳細情報の取得
- ・プラトニックミセル形成過程のダイナミクスの検討

④ 有明高専グループ

主たる共同研究者: 大河平 紀司 (有明工業高等専門学校創造工学科 教授)

研究項目

- ・Jaccard 係数を利用する構造データと放射光小角 X 線散乱のデータフィッティング手法の開発
- ・分子動力学法の精度やパラメータの精緻化、初期構造等の影響評価
- ・プラトニックミセルの形成過程の可視化

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

2018 年に櫻井がドイツのイエナ大学(ドイツ高分子学会の副会長を務める *Prof. Dr. Ulrich S. Schubert*)から招待を受けてナノメディシンの物性評価とプラトニックミセルの集中講義のために3か月滞在した。また、これによって生まれた関係で、博士研究員の藤井を派遣して、高分子ミセルでのプラトニックミセルの創生の研究をした。イエナ大との共著はいままで、*Macromolecules* など5報ある。

また、博士研究員の高橋をフランスの放射光施設である ESRF の Narayan グループに派遣して、ミセルの会合挙動の動力学を測定し、共著で論文をだした。