

Title	リポソームから組み上げる骨疾患治療用バイオマテリアルの開発
Sub Title	Development of liposome-based biomaterials for bone therapeutics
Author	福井, 有香(Fukui, Yuka)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究では、骨疾患治療用バイオマテリアルの開発を目的とし、生体膜由来のベシクルであるリポソーム表面に多糖、DNAなどの生体由来高分子を交互に積層化し、さらにその表面へリン酸カルシウム(CaP)を析出することによって、有機・無機ハイブリッドリポナノカプセルを作製した。この際、反応条件を変化することにより、CaP結晶構造(結晶種、厚みなど)の調節を行い、ナノカプセルからの物質の放出とナノカプセルの骨組織内への取り込みについて制御を試みた。さらに、CaP層表面にDNAを骨標的リガンドとして提示させたところ、骨のモデルであるハイドロキシアパタイトに対して高い集積性を示すようになった。</p> <p>As an approach to create a bone therapeutic biomaterial, we created an organic-inorganic hybrid nanocapsule by utilizing polysaccharide-coated liposomes as a reaction site for the deposition of calcium phosphate (CaP). By tuning the reaction conditions and the surface chemical composition of nanocapsules, it was possible to control in mineralization, such as thickness and crystal structures, over the nanocapsules. Furthermore, DNA was selected as a bone-targeting moiety and it was adsorbed over the nanocapsules. DNA-coated nanocapsules exhibited a selective accumulation onto the powdery hydroxyapatite, which is the main constituent of bone and teeth.</p>
Notes	<p>研究種目：研究活動スタート支援 研究期間：2012～2013 課題番号：24800061 研究分野：化学 科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学</p>
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24800061seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

平成 2 6 年 6 月 1 1 日現在

機関番号： 3 2 6 1 2

研究種目： 研究活動スタート支援

研究期間： 2012 ～ 2013

課題番号： 2 4 8 0 0 0 6 1

研究課題名（和文）リポソームから組み上げる骨疾患治療用バイオマテリアルの開発

研究課題名（英文）Development of liposome-based biomaterials for bone therapeutics

研究代表者

福井 有香（Yuuka, Fukui）

慶應義塾大学・理工学部・助教

研究者番号： 5 0 6 3 5 8 3 6

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000 円、（間接経費） 690,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、骨疾患治療用バイオマテリアルの開発を目的とし、生体膜由来のベシクルであるリポソーム表面に多糖、DNAなどの生体由来高分子を交互に積層化し、さらにその表面へリン酸カルシウム(CaP)を析出することによって、有機・無機ハイブリッドリボナノカプセルを作製した。この際、反応条件を変化することにより、CaP結晶構造（結晶種、厚みなど）の調節を行い、ナノカプセルからの物質の放出とナノカプセルの骨組織内への取り込みについて制御を試みた。さらに、CaP層表面にDNAを骨標的リガンドとして提示させたところ、骨のモデルであるハイドロキシアパタイトに対して高い集積性を示すようになった。

研究成果の概要（英文）：As an approach to create a bone therapeutic biomaterial, we created an organic-inorganic hybrid nanocapsule by utilizing polysaccharide-coated liposomes as a reaction site for the deposition of calcium phosphate (CaP). By tuning the reaction conditions and the surface chemical composition of nanocapsules, it was possible to control in mineralization, such as thickness and crystal structures, over the nanocapsules. Furthermore, DNA was selected as a bone-targeting moiety and it was adsorbed over the nanocapsules. DNA-coated nanocapsules exhibited a selective accumulation onto the powdery hydroxyapatite, which is the main constituent of bone and teeth.

研究分野： 化学

科研費の分科・細目： 医用生体工学・生体材料学

キーワード： リポソーム ナノカプセル 多糖 DNA リン酸カルシウム 有機無機ハイブリッド 骨

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会への移行、生活習慣の変化などの影響により骨粗鬆症、それに伴う骨折、変形性関節症といった骨関連疾患は年々増加しており、効果的な治療薬剤や新規治療法が求められている。骨は、CaP から成る微結晶が有機高分子のコラーゲン繊維の伸長方向にナノレベルに強固に結合した有機・無機ナノハイブリッド構造を有しており、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が常にバランスを保ちながらリモデリングを繰り返している。この骨形成は、骨芽細胞によって分泌された細胞膜由来の基質小胞体が核となってリン酸カルシウム (CaP) 由来の無機結晶が析出し、コラーゲン繊維上に石灰化することで行われる。一方われわれは、生体膜由来のベシクルであるリポソーム表面に多糖や DNA といったバイオポリマーを積層化して、さらにその表面へリン酸カルシウム (CaP) を析出することによって生体適合性と生分解性を有する有機・無機ハイブリッドリポナノカプセルを作製してきた (Fukui et al., Chemistry of Materials, 23, 4701-4709 (2011))。このナノカプセルは、基質小胞体のように壁材として骨の無機成分である CaP を有しているため、カプセル自体が骨形成素材として骨再生を促進する効果が期待でき、さらにナノカプセル内部への薬剤の封入とその薬理効果など複数の機能を持たせた骨疾患治療用バイオマテリアルの開発へつなげることができないのではないかという発想に至った。

2. 研究の目的

(1) 骨標的指向性薬物送達ナノキャリアの開発

リポソーム表面を生体高分子と骨の主無機成分である CaP で被覆することにより、有機無機ハイブリッドリポナノカプセルを作製する。カプセル内部には薬物を封入し、表層には CaP のコーティングと骨標的リガンドの固定化を行うことで、骨疾患部において内包薬物と CaP 由来の骨形成素材が連動して骨疾患の治療と骨再生を促すようなキャリアの創製を行う。

(2) 骨修復能を有する骨補填材の開発

骨欠損部位にて、ハイブリッドナノカプセルの組織化を促して、*in situ* コロイドゲル化を施し、薬理効果と骨修復能を合わせ持つカプセル型骨補填材の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 骨標的指向性薬物送達ナノキャリアの開発

有機無機ハイブリッドリポナノカプセルの作製

リポソーム表面を、キトサン、DNA などの生体由来高分子で被覆し、リポナノカプセ

ルを形成した。さらに、リポソームまたはリポナノカプセルの内部へリン酸イオンを封入し、外液へカルシウムイオンを加えることで、カプセルウォールを介したイオンの相互拡散 (Counter-diffusion 法) により、ナノカプセル表面で CaP の析出を促した。CaP は結晶種、結晶構造および形態によって溶解性や生体内作用が異なる。そこで、ナノカプセルの放出挙動と骨組織内への取り込みを制御するために、反応条件 (イオン種、Ca/P、pH、温度) や反応場となる表面の生体由来高分子 (キトサン、デキストラン硫酸、DNA など) の種類を調節することにより、CaP 結晶構造の調節を試みた。

さらに、多様なリン酸カルシウム (CaP) 層の創製と骨疾患への最適化を目指して、カチオン性多糖であるキトサンのリン酸化を行い CaP 親和性の付与を行った。まず、 P_2O_5 をキトサンと反応させることで、リン酸化キトサン (P-CHI) を合成し、リポソーム表面へ積層化を行った。次に、Counter-diffusion 法により、リポナノカプセル表面で CaP の析出を行い、ハイブリッドリポナノカプセルの作製を行った。

得られたハイブリッドナノカプセルについて電子顕微鏡による形状観察を行い、さらに X 線回折および赤外分光法 (FT-IR) を用いて、CaP の結晶構造解析を行った。

ハイブリッドリポナノカプセルの薬物送達ナノキャリアとしての機能化

CaP は酸性にて容易に溶解する。骨吸収に深い関わりのある破骨細胞は、プロトンポンプによってその周囲を酸性 pH に維持している。従って、骨組織へ到達後に CaP 層の溶解により内封物が放出されると考えられる。CaP の溶解性はイオンクロマトグラフィーを用いて、溶出したカルシウムイオン濃度を定量することで検討を行った。

さらに、ナノハイブリッドカプセルを実際に生体内で応用する際には、体液中に含まれるイオンやタンパク質などによる溶解性への影響を検討する必要がある。血液中には様々なタンパク質が存在するが、その中でもアルブミンは分子量 66,000 の血漿中で最も多く存在するタンパクである。そこで、本実験では、牛血清アルブミン (BSA) 存在下においてハイブリッドリポナノカプセルの溶解性を検討した。

また、表層へターゲット能を付与するために、骨の無機成分であるハイドロキシアパタイト (HAp) と親和性の高い DNA をナノカプセルの表層へ提示して、骨のモデルである HAp 粉体への集積能を共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

(2) 骨修復能を有する骨補填材の開発

カプセル型骨補填材として、ナノカプセル

表層と架橋剤を反応させることで、リポナノカプセルの組織化を目指した。CaP とリン酸基は静電相互作用およびキレート形成により、強く相互作用することが知られている。そこで、多糖であるキトサンをリン酸化した P-CHI を、ハイブリッドナノカプセルの CaP 層表面へ吸着させる。破骨細胞周辺にみられるような低 pH 条件において CaP 層は溶解し、それに伴いナノカプセル内部の架橋剤が放出されると考えられる。この架橋剤が P-CHI 間を架橋することで、ナノカプセルからのゲル形成について検討を行う。コロイドゲル形成時の溶液の散乱強度変化について評価を行う。

4. 研究成果

(1) 骨標的指向性薬物送達ナノキャリアの開発

有機無機ハイブリッドリポナノカプセルの作製

CaCl₂ と NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ を用いて CaP 層の析出を試みたところ、反応条件に加え、反応場となるナノカプセルの種類によって生成する結晶構造が異なることがわかった。反応場がリポソーム表面または DNA であるときに表面に CaP 層を有するハイブリッドナノカプセルを作製することができた。さらに、DNA の場合には結晶化度が高い CaP が得られた。また、反応時間によって CaP 層の厚みの調節が可能であった。これらのことから、リポナノカプセル表面の多糖の種類や化学的改質を施すことにより析出する CaP の結晶質を制御することで、キャリアの骨再生能の最適化につながると考えている。

リポソームあるいは表面に DNA を有するリポナノカプセルを (liponano-CHI-DNA) 用いた場合にのみ、表面特異的に CaP が析出し、ハイブリッドリポナノカプセルを作製することができた。一方、表面にデキストラン硫酸あるいはキトサンを有するリポナノカプセルを用いた場合には、表面への CaP の析出は見られなかった。これは、ナノカプセル表面のリン酸基が、CaP との親和性が高かったためと考えられる。pH 7.0 において、liponano-CHI-DNA 表面での CaP 析出は見られなかったが、pH 10.0 では [PO₄³⁻] と [OH⁻] が高くなるため、熱力学的に安定な HAp が析出しやすくなり、表面での CaP 析出が起こったと考えられる。また、電子線回折像や FT-IR の結果より、リポソーム表面の CaP はアモルファスであったが、liponano-CHI-DNA 表面の CaP は HAp 様となり、表面層の違いによって結晶構造が異なることがわかった。これは、リポソームと比較して、liponano-CHI-DNA からのリン酸イオンの放出は遅く、ナノカプセル表面でカルシウムイオンとゆるやかに反応が進行したため、溶解度積の低い HAp が優先的に析出したため

と考えられる。また、DNA のリン酸基の配列が、HAp の結晶面に高い適合性を示し、エピタキシャル成長を促して HAp 様になったとも考えられる。さらに、リポソームの場合は CaP の析出が表面にのみ見られたが、liponano-CHI-DNA の場合はカプセルの内外に CaP 層の生成が見られた。このことからリポソームからのイオンの放出は内側から外側への方が優勢となるが、liponano-CHI-DNA からの放出はカプセルウォールを介した相互拡散であることがわかった。また、温度を高くすると、HAp の生成速度が高くなるため、針状結晶やカプセル内部にまで結晶の析出した中実構造が得られた。さらに liponano-CHI-DNA ではイオンの放出がゆるやかにすすむため、時間によって CaP 層の厚みを制御することができた。さらに、イオン種を変えて検討を行ったところ、Na イオンを除くことにより CaP の析出が起こりやすくなり、liponano-CHI 表面でも CaP を形成させることができた。また、外液にリン酸イオンを添加することで、CaP 層の厚みや形態を制御することができた。このようにリポソーム表面へポリマー層を構築することにより、イオンの拡散性や反応場を操作することができ、ナノカプセル表面の CaP 層の結晶構造および形態厚みの制御が可能となった。

ハイブリッドリポナノカプセルの薬物送達ナノキャリアとしての機能化

表面に CaP 層を有するリポナノカプセルについて pH 4.0、7.0 および 10.0 でのカルシウムイオン溶出量の経時変化を測定したところ、いずれの pH においても、CaP の溶解は 20 分後には飽和に達していることがわかった。また、pH が低くなるほど CaP の溶解量が多くなることがわかった。これは、pH が低いとリン酸イオンの解離が抑えられるため、[PO₄³⁻] が下がる。また、[OH⁻] も下がるため、過飽和度が小さくなり、溶解度が上昇したと考えられる。次に、牛血清アルブミン (BSA) 存在下においてハイブリッドリポナノカプセルの溶解性を検討した。HAp は、電荷を持つ結晶面を有することから、酸性タンパク質である BSA は静電相互作用により、CaP 表面へ吸着する。BSA が CaP 表面へ吸着することにより、CaP の溶解性に影響を与えることが考えられる。結果として、BSA 存在下においても CaP 層の溶解性はほとんど変化しなかった。本実験で用いたナノカプセルの CaP 層はアモルファスであるため、明確な結晶構造を示さず、BSA との吸着サイトが少なくなると、CaP の溶解には影響を与えなかったのではないかと考えている。

ハイブリッドリポナノカプセル表層の骨標的指向性を検討するため、内水相へ dextran-FITC を封入したハイブリッドリポナノカプセルを pH 7.0 にて HAp 粉体へ作用させ、集積能について検討したところ、CaP

層表面に DNA を標的リガンドとして提示させたりポナノカプセルが高い集積能を示すことを見出した。これは、DNA のリン酸基が静電相互作用に加えてキレート形成能を有するため、HAp 結晶面のカルシウムと強く相互作用したためと考えられる。このことより、DNA 提示による骨へのターゲティングの可能性が示唆された。今後は、CaP 層表面にポリアスパラギン酸(PAsp)などの骨標的リガンドあるいはRANKLといった破骨細胞に対する標的リガンドを提示させることを考えている。

(2) 骨修復能を有する骨補填材の開発
カプセル型骨補填材として、ナノカプセル層と架橋剤を反応させることで、リポナノカプセルの組織化を目指した。P-CHI を表面に有するリポナノカプセルに架橋剤を加えて、キトサン由来のアミノ基間の架橋を促したところ、散乱強度の増大がみられ、リポナノカプセルの会合が示唆された。このとき、pH や P-CHI のリン酸化度によって会合のサイズを調節することが可能であった。以上より、骨欠損部において、ハイブリッドリポナノカプセルを集積化および組織化させることが可能であり、骨形成を誘導する骨補填材の作製につながると考えている。

本研究は、薬物の標的部位への送達および徐放といった生命科学的観点からの研究と、骨の再生を促すために CaP 素材をデリバリーまたは骨充填材として用いるといった物質科学的観点からの研究を融合させることで、骨疾患治療用生体材料の構築を目指すことが特色である。カプセル素材自体が骨類似物質であるため、骨形成促進と薬理作用を合わせもち、その現場での環境に応じて骨再生を助けると考えられ、骨疾患のための効果的かつ低侵襲的な新規治療システムの構築において重要な素材となると期待できる。また、リポソーム表面への生体高分子と CaP の交互積層化による有機無機ハイブリッドナノカプセルの作製法は、マテリアルデザインの可能性をひろげ、生体内での骨再生メカニズムのさらなる生命科学的解明においても有用な知見を与えるものと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

藤本啓二、福井有香、微粒子材料とバイオ・化粧品素材との接点、日本接着学会誌、査読無、33 巻、2013、37-41

〔学会発表〕(計 4 件)

福井有香、亀山周平、藤本啓二、バイオ基材開発を指向したリポナノカプセル薄膜の構築、第 63 回高分子学会年次大会、2014

年 05 月 28 日～2014 年 05 月 30 日

亀山周平、福井有香、藤本啓二、リポナノカプセルの組織化による細胞足場材料の創製、第 35 回バイオマテリアル学会、2013 年 11 月 25 日～2013 年 11 月 26 日、タワーホール船堀

亀山周平、福井有香、藤本啓二、リポナノカプセルの組織化によるバイオ基材の開発および細胞足場材料への応用、第 61 回高分子討論会、2013 年 09 月 19 日～2013 年 09 月 21 日、金沢大学

亀山周平、福井有香、藤本啓二、リポナノカプセルの組織化による組織再生用バイオ基材の構築、第 61 回高分子討論会、2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日、名古屋工業大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福井 有香 (FUKUI, Yuuka)

慶應義塾大学、理工学部応用化学科、助教
(有期)

研究者番号：50635836