

ンがトリアゾール環やシクロオクチンを疎水性相互作用によって吸着することによって平衡反応のシフトが起こり、反応が加速するためと考えられる。

## C-2. HA-g-PAA の合成・分解挙動の定量とカルシウムイオン架橋の実証

図 2 3 に  $^1\text{H}$  NMR の測定結果を示す。合成法の検討を行い、HA-g-PAA の合成に成功した。FT-IR によっても確かに HA-g-PAA が合成されていることが確認された。

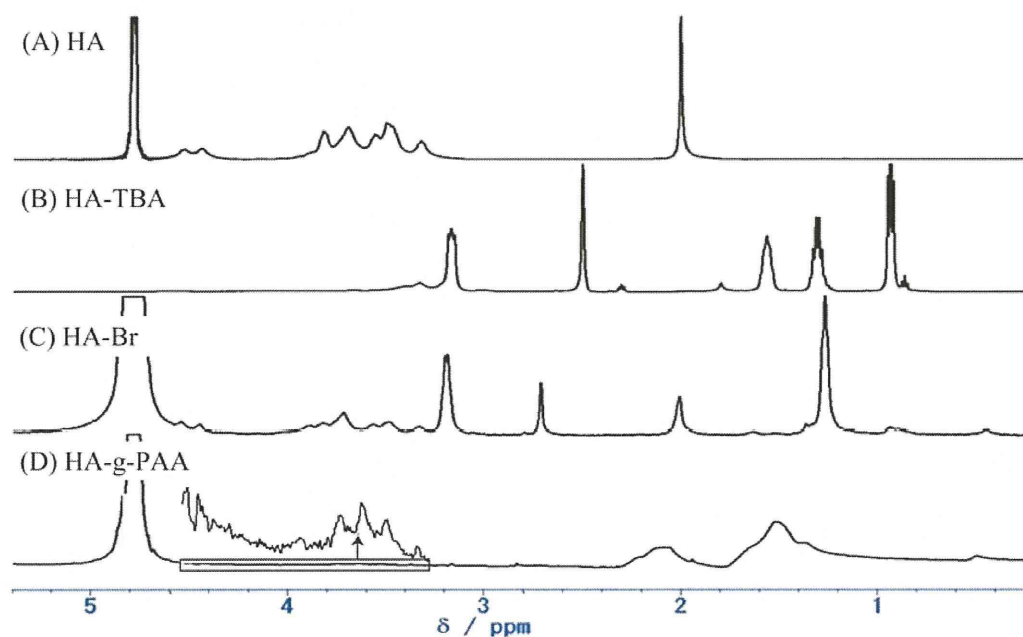


図 2 3  $^1\text{H}$  NMR (A)未修飾 HA (B)HA-TBA (C)HA-Br (D)HA-g-PAA

重合中のモノマー転化率を NMR 積分値より求め、PAA 分率は 80%、HA が 20%であり、PAA の分子量はモノマー転化率と Br 修飾率から重合度 80 程度、分子量は 10kDa 以下であると考えられる。これは HA と PAA のエステル結合が切断され、分解されれば PAA は腎臓から十分に排泄されることを意味する。

実際に HA-g-PAA が生理環境下で分解されるかを、GPC によって検証した(図 2 4)。PBS、10unit/mL の HAse、Lipase、HAse+Lipase の 4 種類のメディア中、 $37^\circ\text{C}$ 1 週間で分解実験を行い、GPC によって分子量測定を行った。未修飾の HA を腹腔に投与すると、速やかに腹腔液 HAse で分解することが報告さ

れている。しかしながら、HA-g-PAA は HAse によって分解がほとんど促進されず、腹腔中で 1 週間程度存在できることが期待される。さらに Lipase では分解が著しく加速された。またこの加水分解は PBS 中でもゆっくりと起こることが示された。

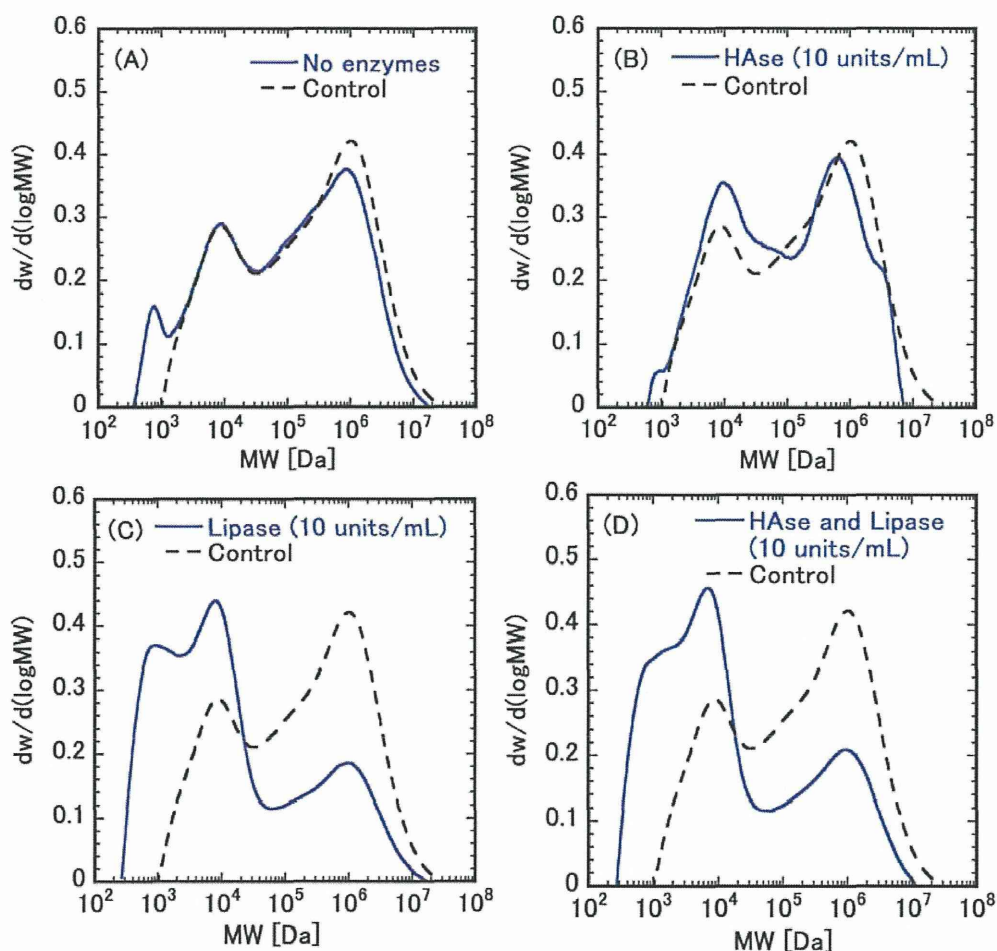


図 2 4 HA-g-PAA の分解実験、分子量分布測定 (A)PBS (B)HAse (C)Lipase (D)HAse and Lipase

さらに、図 2 5 に示すように、得られた HA-g-PAA を PBS+40mMCaCl<sub>2</sub> と混合すると一瞬でゲル化が起こった。

得られた HA-g-PAA のカルシウム塩は、PAA とカルシウムを混合して得られる含水率の低い沈殿物でなく、含水率が高く、手で押し広げることができるようなソフトな材料である。今後粘弾性の評価を行う必要があるが、組織適合性が良好であることが示唆された。

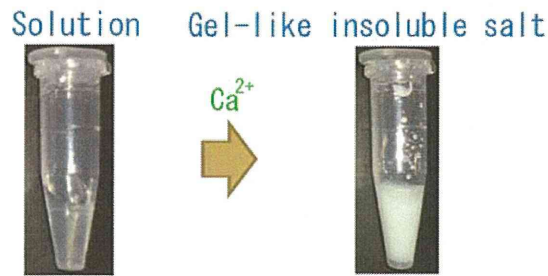


図 2 5 HA-g-PAA/CaCl<sub>2</sub> in situ 架橋ゲル

### C-3. ハイブリッドゲルからの CDDP 徐放速度の測定

HA-MA と HA-IDA より作製した CDDP 担持ナノゲルを HAX に封入して測定した徐放速度を図 2 6 に示す。HAX ゲルに CDDP を溶解させただけの系では 12 時間でほぼ徐放が完了するのに対して、ナノゲルを封入したハイブリッドゲルの系では 12 時間で 20%程度にとどまり、CDDP の徐放速度は著しく低減した。さらに最終的な CDDP 徐放率は 1 週間かけて 70%~80%程度となり、1 週間で徐放がほぼ完了することが明らかになった。

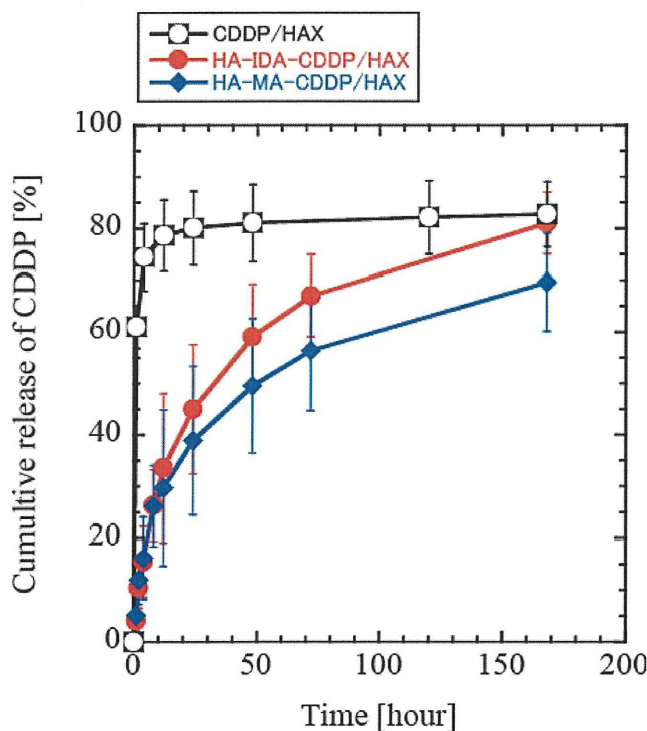


図 2 6 ハイブリッドゲルからの CDDP 徐放曲線

ナノゲル担体ポリマーである HA-IDA または HA-MA の徐放率を FTSC の蛍光強度で定量した結果と CDDP 徐放結果を図 2 7 に同時に示す。

HA-IDA-CDDP 及び HA-MA-CDDP のいずれの系でも、CDDP がナノゲル担体である HA-IDA や HA-MA よりもやや速く徐放しており、一部の CDDP はナノゲルから解離して、徐放されることが示唆される。しかし CDDP と HA-IDA (または MA) の徐放速度はおおむね一致しており、大半の CDDP はナノゲルに担持されたままハイブリッドポ

リマーから放出されていることが示唆された。

さらに HA-IDA-CDDP ナノゲルと HA-MA-CDDP ナノゲルを比較すると、HA-IDA-CDDPの方がやや速く徐放し、HA-MA-CDDPの方が、ゆっくりと徐放される傾向が見られるが、有意差があるとはまでは言えない。両者のサイズはほぼ同サイズであるが、サイズから言えばHA-MAナノゲル(10nm)の方がHA-IDAゲル(20nm)よりもやや小さい。このため配位子の違いが、ナノゲルとHAXポリマーとの相互作用に影響を与え、これが拡散係数に影響していることが示唆される。

なお研究期間中に問題となったHAXゲル中のナノゲルのHA-IDAとCDDPの解離は、最終的にナノゲルの調製条件を改善し、温度制御や反応雰囲気をも最適化することで、HA-IDA及びHA-MAのいずれを用いても安定なナノゲルを得る条件が確立した。

ハイブリッドゲル全体の重量変化を図28に示す。ナノゲルの封入によって、ゲルの膨潤速度に大きな変化は見られない。膨潤平衡へ達するための吸水と架橋点の加水分解による膨潤が同時に起こり、HAXは体積が一定値に達せず膨潤し続け、最終的に溶解する。HAXの膨潤は、ゲル網目の増加を伴うために、ナノ

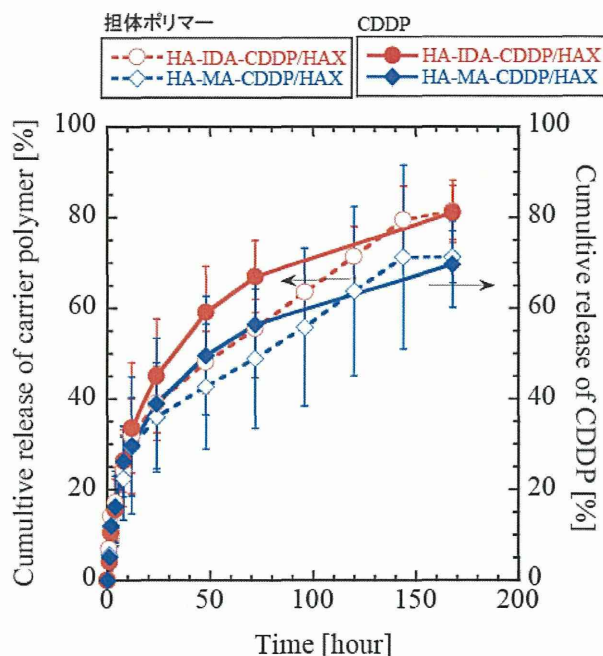


図27 ハイブリッドゲルからの担体ポリマー徐放速度とCDDP徐放速度の比較

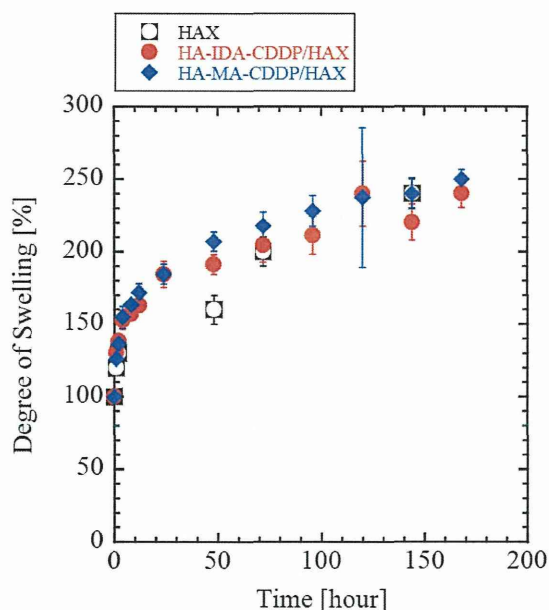


図28 ハイブリッドゲルの膨潤曲線



ゲルの徐放速度に大きな影響を与えていると考えられる。

#### C-4. ナノゲル標的性の評価

まずナノゲル担体ポリマーである HA-IDA が細胞に対して効率に取り込まれることを示すことを試みた。

37°C下での MKN45P に対する HA 及び HA-IDA (IDA 修飾率 11%) の取り込み量の時間変化を図 29 に示す。HA-IDA の取り込み量は、定量的に見ても HA より有意に小さくなるが、CD44 への十分な結合能を有している、と考えられる。一方で CMC、CMC-IDA は共に取り込み挙動はほぼ変わらず、HA や HA-IDA よりも小さな取り込み量となった。

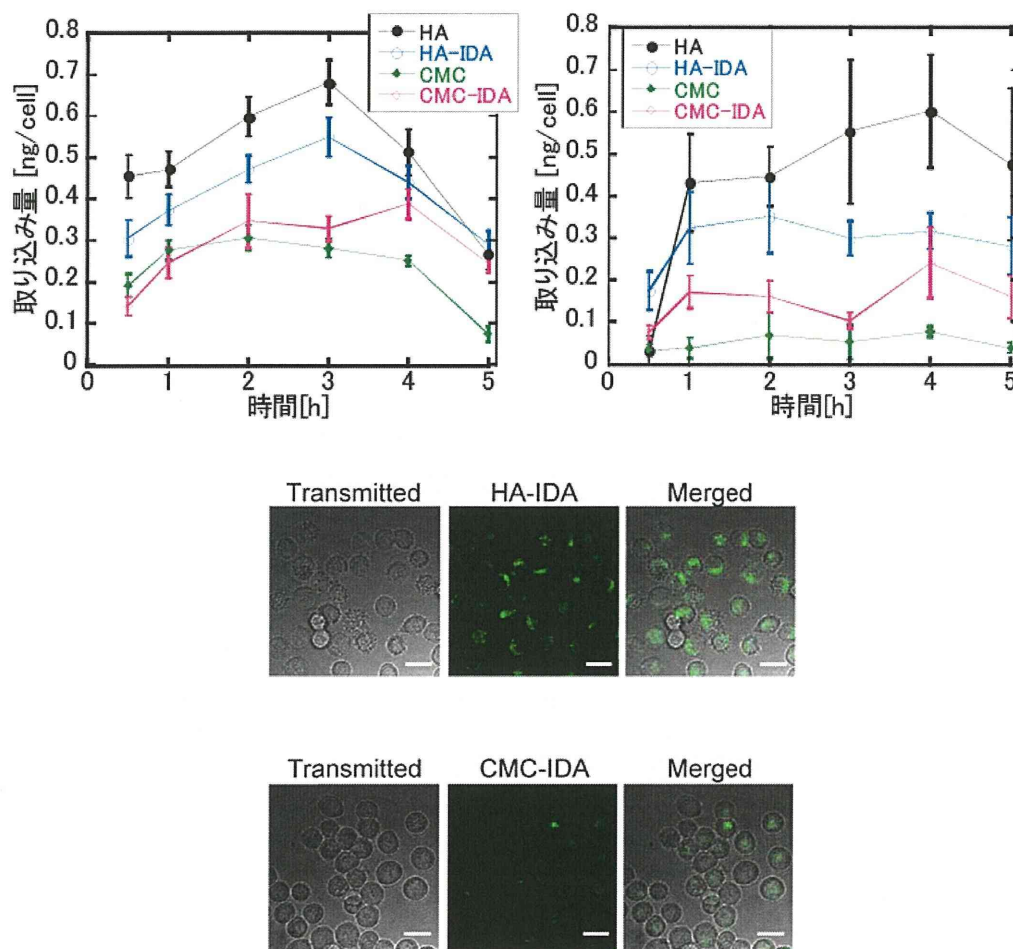


図 29 ナノゲル担体ポリマー：HA-IDA の細胞取り込み量時間変化  
 左上図：37°C 右上図：4°C 左下図：37°C共焦点 HA-IDA 右下図：37°C共焦点

さらに 4°C にすることによって、能動輸送であるエンドサイトーシス完全にストップする。同様の実験を 4°C で行くと、CMC の取り込み量はほぼ 0 になる。この時も HA や HA-IDA は高い値を示すが、これは細胞膜表面の CD44 に結合した HA や HA-IDA が洗浄によっても細胞膜表面からはがれないためと考えられる。

次に材料処置後の 3~4 時間後に観察される最大取り込み量に関して、細胞株間による取り込み量の比較を行った。HA-IDA の各細胞株に対するエンドサイ

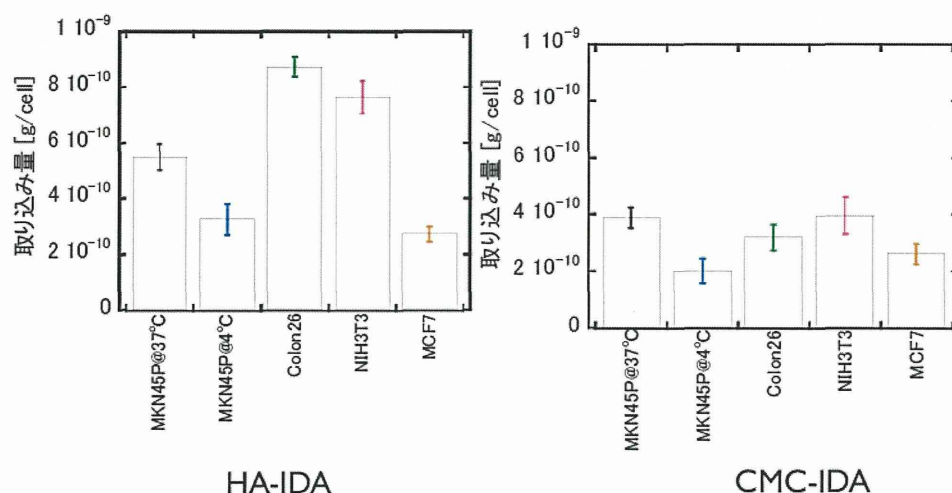


図 30 ナノゲル担体ポリマーの細胞取り込み能

トーシス量と、対照物質として合成した CMC-IDA のエンドサイトーシス量を図 30 に示す。CD44 発現量が高いことが報告されている MKN45P、Colon26 では CMC-IDA に比べて、HA-IDA の取り込み量が大きくなっている。またヒアルロン酸代謝が活発に起こることが知られている NIH-3T3 でも HA-IDA の取り込み量が多くなっている。

一方で、CD44 発現量が少ない MCF7 では取り込み量が、HA-IDA と CMC-IDA で大きな差が見られない。プレートリーダーを用いた定量でも、共焦点顕微鏡での観察と同様に、HA-IDA の CD44 陽性細胞への選択的な送達可能性が示された。

以上の結果に基づき、図 31 に示す様に、HA-IDA (IDA 修飾率 30%) から作製した HA-IDA-CDDP ナノゲルが細胞に取り込まれるかどうかを、共焦点顕微鏡によって検証した。

HA-IDA-CDDP ナノゲルは、HA-IDA は CDDP と錯体配位してナノゲル化しているにも関わらず、播種細胞株に効率的にエンドサイトーシスされているこ

とが初めて実証された。Lysotracker と共局在し、エンドサイトーシスされていることも確認された。

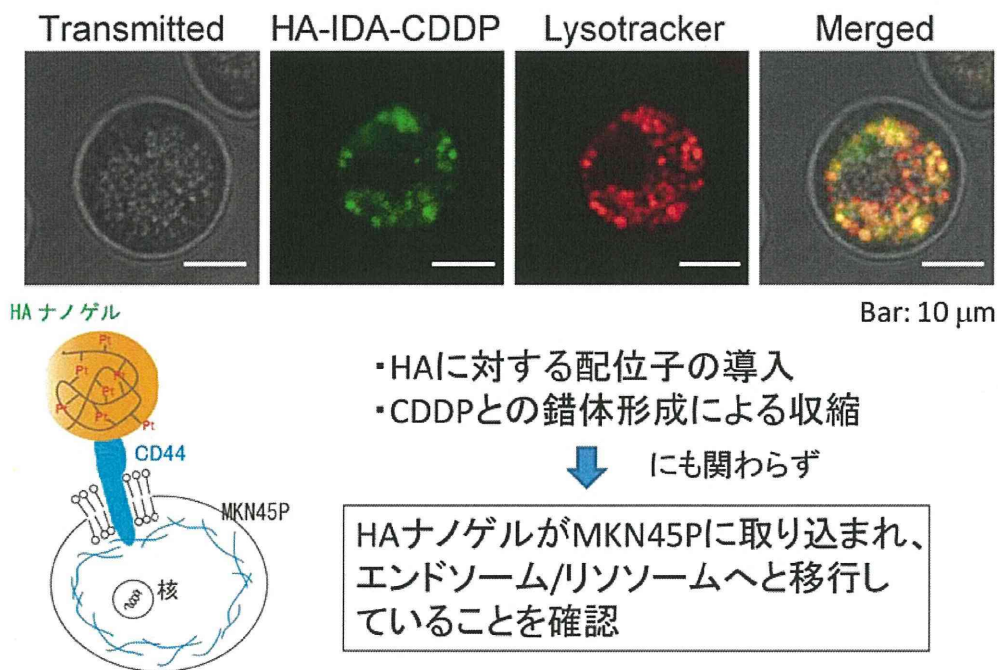


図 3 1 HA-IDA-CDDP ナノゲルの播種細胞取り込み挙動

そこで HA-IDA-CDDP ナノゲルを、ヒト中皮細胞株 CRL-9444 と播種細胞株

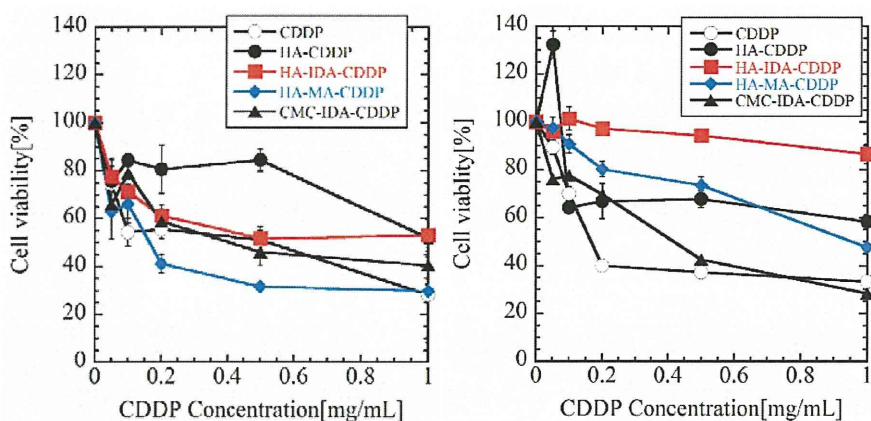


図 3 2 HA-IDA (または MA) -CDDP ナノゲルの用量作用曲線



MNK45P に処置し、2 日後の生存率を測定し、確かにがん細胞のみに選択的に作用するかを検討した。図 3 2 にナノゲル及びフリーの CDDP の用量・作用曲線を示す。HA-IDA (または MA) ·CDDP ナノゲルは、播種細胞に対しては CDDP とほぼ同様の用量依存性を示すのに対して、中皮細胞に対しては非常に毒性の低い結果となった。とくに HA-IDA·CDDP ナノゲルは中皮細胞の毒性を劇的に軽減する結果が得られた。

#### D. 考察

ハイブリッドゲルからの CDDP 徐放速度は、単純に CDDP を HAX に封入したシステムよりも、CDDP 徐放速度は遅延され、in vitro での当初の目的は達成できた。

図 3 3 に示すように、ハイブリッドゲルの徐放・膨潤挙動は、興味深いことに HAX の場合と大きく変わる。HAX に単純に HA-IDA を封入した場合 (HA-IDA in HAX、データは 3 年目総括報告書に記載) は、HAX と同様に 1 日目で最大体積まで膨潤し、その膨潤体積が HAX よりも大きくなった。イミノ二酢酸やマロン酸等の配位子修飾で、ゲルの荷電密度が増し、HAX ゲルよりも膨潤したと考えられる。また HA-IDA(orMA)-FTSC の拡散速度は、粘弾性測定から決定したゲルの平均網目サイズ (架橋点間分子量) と、HA-IDA のストークス径の比から、予想したよりも非常に速い。これは架橋点密度が低い部分を拡散していくためと考えられる。即ち担体ゲルの内部が、ゲルクロマトグラフィーにおける担体ゲルを充填したカラム内のような構造になっているためと推察され、今後は FCS を用いた拡散係数の測定や、スタティックミキサー等を用

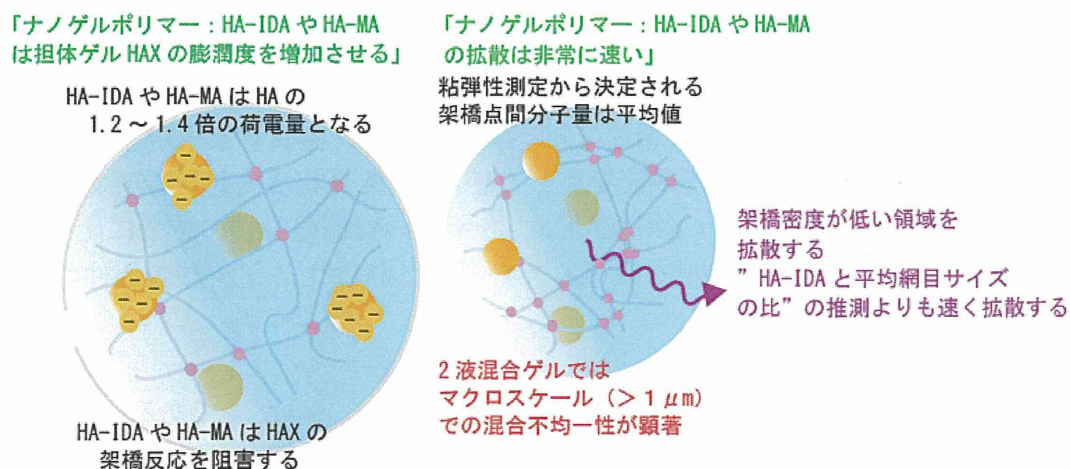


図 3 3 担体ポリマーの HAX への封入

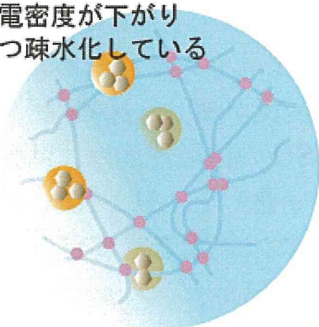


いたゲル構造の制御を試みて行く予定である。

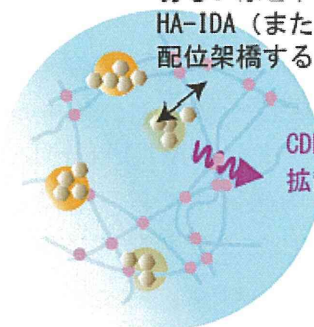
一方で、図3 4に示す様に、CDDP を担持したナノゲルを封入したハイブリッドゲルでは、本報告書に記述のように、膨潤挙動及び拡散挙動は大きく変化する。ハイブリッドゲル (HA-IDA-CDDP or HA-MA-CDDP in HAX) は、PBS 中で1週間にわたりゆっくりと膨潤していく。これは CDDP が HA-IDA や HA-MA にキレートすることによって荷電密度が減少していること、HA-IDA-CDDP ナノゲルや HA-MA-CDDP ナノゲルから一部徐放された遊離 CDDP が担体ポリマーである HAX 中のカルボキシル基や、プレカーサーポリマーである HA-ADH のヒドラジド基が CDDP と配位子交換をし、ナノゲルと HAX ゲルが CDDP を介してイオン架橋することによって、ゲルの膨潤が抑制されたと推測される。

「ナノゲル (HA-IDA/CDDP、HA-MA/CDDP)  
は担体ゲル HAX の膨潤を抑制する」

ナノゲルは CDDP の配位により  
荷電密度が下がり  
かつ疎水化している



遊離 CDDP が HAX 中のカルボキシル基  
あるいはヒドラジド基と  
HA-IDA (または HA-MA) の間を  
配位架橋する



CDDP とのナノゲル化により  
拡散が著しく遅延した

図3 4 ハイブリッドゲルにおける膨潤と拡散挙動の推測機構

ハイブリッド化した際の、HA-IDA-CDDP ナノゲルと HA-MA-CDDP ナノゲルの明確な差は期待したほど大きくない。既往の研究に基づけば、HA-IDA の CDDP キレート形成能は HA-MA に比べて小さいが、本目的を実現するうえで HA-IDA は十分なキレート形成能を有している。今後更なる検討が必要である。なおハイブリッド化した際の徐放速度は、3年目の総括報告書の結果に比べ、徐放速度が低減し、当初の目標を達成している。これはナノゲル調製条件の改善によるものである。

ナノゲルを封入担体として開発した、クリックハイドロゲルである cHA ハイドロゲルや cCMD ハイドロゲルを、HAX の代わりに用いることはこれからの継続課題である。本研究のハイブリッドゲルシステムに応用するためには、腹腔

中で1週間程度は残留し、徐々に分解していくことが望ましい。in vitro では血清含有培地中での分解速度を1~2週間で制御する必要がある。アジド基とシクロオクチン基が架橋して形成するトリアゾール架橋点は加水分解しないため、このゲルの分解はリンカー部であるエステルの加水分解と主鎖の酵素分解に依存する。現在の材料設計では、予想したよりも分解が速い。このため、ハイブリッドゲルに用いるためには、リンカーの設計を抑える必要がある。

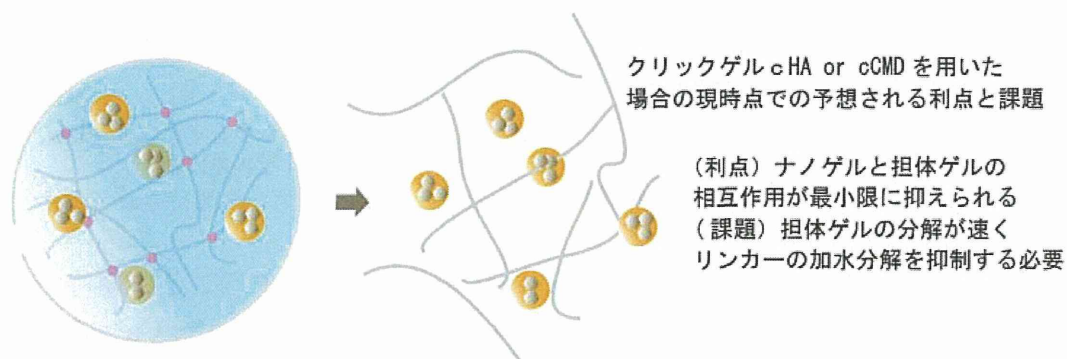


図35 クリックゲル (cHA ゲルまたは cCMD ゲル) を担体ゲルに用いたハイブリッドゲルの期待される挙動

同様にナノゲルを封入担体として開発した、HA-g-PAA も、HAX の代わりに用いることはこれからの継続課題である。HA-IDA/CDDP ナノゲルあるいは、HA-MA/CDDP ナノゲルを HA-g-PAA/Ca<sup>2+</sup>ゲルに封入する。後述のように HA-g-PAA ナノゲルは、腹腔に投与した場合に1週間かけて溶解していくことが示された。このため、HA-g-PAA とナノゲル (HA-IDA/CDDP または HA-MA/CDDP) の混合液とカルシウムイオンをダブルシリンジで混合しながら注入することによって、図36に示されるような挙動が期待できる。

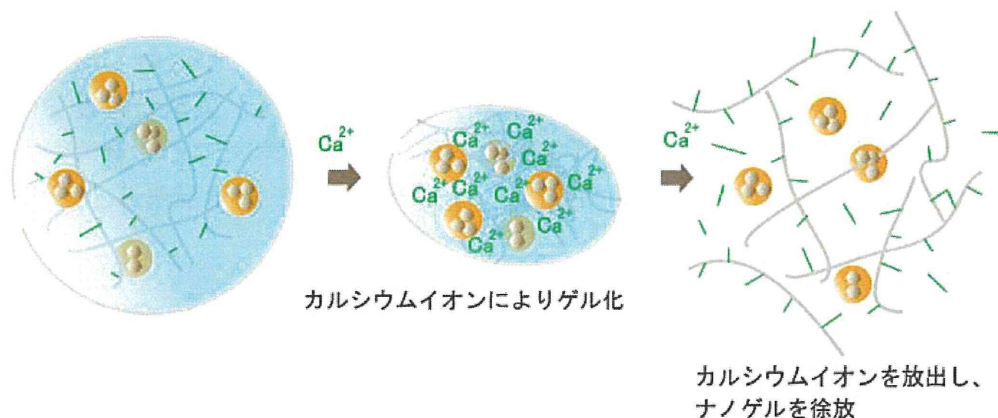


図36 HA-g-PAAゲルを担体ゲルに用いたハイブリッドゲルの期待される挙動

HA-g-PAAはPAAがCMCと同様にCDDPと二座配位することが期待できる。このため将来ハイブリッド化せずとも、2wt%相当のHA-g-PAAをCa<sup>2+</sup>で*in situ*架橋することによって、一体化ゲルともすることができる。後述の結果に示すように、HA-g-PAAゲルは腹腔内でCa<sup>2+</sup>の放出によるゆっくりとした可溶化が可能になるため、ナノゲル化を行わなくとも、一体化ゲルでの徐放も可能になると考えられる。

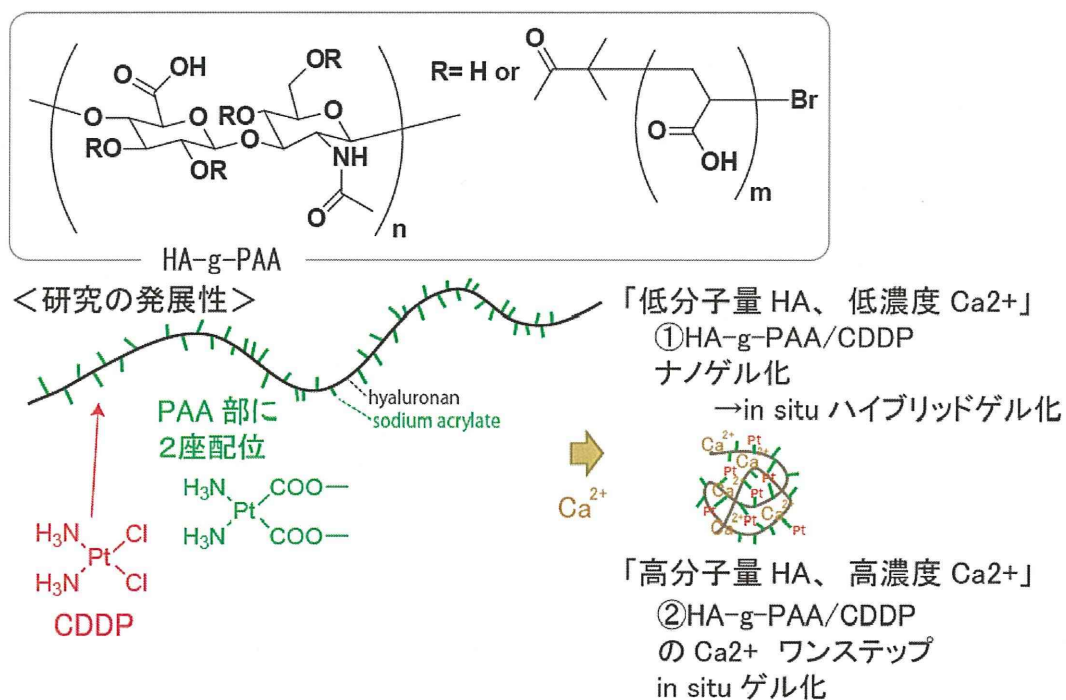


図37 HA-g-PAAを用いた将来展望

最後にナノゲルの標的性は非常に良好な結果が *in vitro* で得られた。中皮細胞株への毒性は劇的に低減し、播種細胞には CDDP と同様の作用を示した。HA にキレート修飾を入れた HA 誘導体の報告は、我々の知る限り近年の一例しかない。これは造影剤を目指した Gd 固定のためのものである。我々は修飾率や CDDP とのナノゲル化にも関わらず、明確に播種細胞への取り込みを示した。CMC-IDA や CMC-IDA-CDDP ナノゲルの結果と比較しても、HA と CD44 の相互作用が明確に示すことができたと考えている。今後、抗 CD44 抗体や FACS を用いた詳細な検討を継続していく予定である。

## E. 結論

1年目のクリック *in situ* ゲルとナノゲルの開発、2年目のナノゲルポリマーの標的性の実証に基づき、3年目にはハイブリッドゲル化の検討を行った。さらに3年目に放出ナノゲルの播種細胞への選択的送達効果を *in vitro* で示すことに成功した。

HA-IDA、HA-MA のナノゲル担体を開発し、CMC とあわせて、いずれのポリマーでも CDDP と加熱することによって、CDDP を担持したナノゲルが作製できることを示した。IDA に比べ MA の方が錯体形成定数は大きい、HAX ゲルを担体ゲルとして用い、ハイブリッドゲル化した場合に、CDDP 徐放速度の差はわずかであった。いずれにしても、ナノゲルの開発と、担体ゲルに HAX を用いることによって *in vitro* において当初の徐放速度の目標を達成している。

HAX に代わる担体ゲルとして、2種類の新規 *in situ* 架橋ゲルの開発を行った。クリック反応を用いる cHA ゲル・cCMD ゲルとともに、HA-g-PAA/Ca<sup>2+</sup>ゲルの開発に成功した。将来、HAX に代わる担体ゲルとしてハイブリッド化ゲルの作製が可能である。

最終目標の実現に対して引き続き研究を継続することにより、1~2年以内に目的を実現するとともに、付随的に新たなヒアルロン酸誘導体に関する多くの知見が社会に還元されていくと考える。

## F. 健康危険情報

特になし。



## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Akira Takahashi, Yukimitsu Suzuki, Takashi Suhara, Kiyohiko Omichi, Atsushi Shimizu, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, Seiichi Ohta, Taichi Ito

“An in situ cross-linkable hydrogel of hyaluronan produced via copper-free click chemistry”

Biomacromolecules 2013 (in press)

2) Shigenobu Emoto, Hironori Yamaguchi, Takao Kamei, Hironori Ishigami, Takashi Suhara, Yukimitsu Suzuki, Taichi Ito, Joji Kitayama, Toshiaki Watanabe

“Intraperitoneal administration of cisplatin via an in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogel for peritoneal dissemination of gastric cancer”

Surgery Today (in press)

3) Atsushi Shimizu, Takashi Suhara, Taichi Ito, Kiyohiko Omichi, Katsutoshi Naruse, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo

“A New Hepatectomy-Induced Postoperative Adhesion Model in Rats and Evaluation of Anti-adhesion Material Efficacy”

Surgery Today (in press)

4) Yuuki Sugawara, Hidenori Kuroki, Takanori Tamaki, Hidenori Ohashi, Taichi Ito, Takeo Yamaguchi,

“Conversion of a molecular signal into a visual color based on the permeation of nanoparticles through a biomolecule-recognition gating membrane”

Anal. Methods, 4(9), 2635-2637 (2012)

### 2. 学会発表

#### 国際学会

1) An ion-crosslinked hydrogel composed of dendritic copolymers Yoshiyuki Nakagawa, Satoshi Nakasako, Taichi Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of

Tokyo, 2012年12月10日 38

2) An in situ crosslinked hydrogel of hyaluronan produced via copper-free click chemistry, Akira Takahashi, Takashi Suhara, Yukimitsu Suzuki, Kiyohiko Omichi, Atsushi Shimizu, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, Taichi Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012年12月10日 37

3) Preparation of uniformly-sized microspheres of hemoglobin and albumin as oxygen carriers by the Shirasu porous glass membrane emulsification technique, Yao-Tong Lai, Mayu Sato, Yukimitsu Suzuki, Kazuki Akamatsu, Shin-ichi Nakao, Sakai Yasuyuki, Taichi Ito, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay, Ichijo Hall, Yayoi Auditorium, The University of Tokyo, 2012年12月10日 36

4) A New Hepatectomy-Induced Postoperative Adhesion Model in Rats and Effects of Anti-adhesion Materials Atsushi Shimizu Taichi Ito, Takashi Suhara, Kiyohiko Omichi, Kiyoshi Hasegawa, Norihiro Kokudo, American College of Surgeons the 98th Clinical Congress, マコーミックプレイス シカゴ 2012年10月1日

5) In situ crosslinkable hydrogel for rapid engineering of vascular-like structures by using electrochemical detachment of cells Tatsuto Kageyama, Taichi Ito, Hiroaki Suzuki, Junji Fukuda 2012 MRS FALL MEETING, Boston, Massachusetts, 2012年11月25-30日

国内学会

2012年度

1) Copper-free click chemistry を用いた再生医療用マイクロカプセルの創製  
高橋彬・酒井康行・伊藤大知 化学工学会 第78年会 大阪大学 豊中キャンパス 大阪 2013年3月17-19日 F207

2) キトサン / ポリアクリル酸グラフト樹状高分子を用いた新規 in situ 架橋

ポリイオンコンプレックスゲルの開発 迫田龍・中裕聡・伊藤大知・市村重俊  
化学工学会 第 78 年会 大阪大学 豊中キャンパス 大阪 2013 年 3 月 17-19  
日 D120

3) グラフト樹状高分子を用いた生体内イオン架橋ハイドロゲルの創製 中川慶  
之・中裕聡・伊藤大知 化学工学会 第 78 年会 大阪大学 豊中キャンパス 大  
阪 2013 年 3 月 17-19 日 D119

4) キトサン/ポリアクリル酸グラフト樹状高分子を用いた新規 *in situ* 架橋ゲ  
ルの開発 迫田龍・中裕聡・伊藤大知・市村重俊 第 15 回化学工学会学生発表  
会 (米沢大会) 山形大学工学部 山形 2013 年 3 月 2 日 A22

5) スタティックミキサーを用いた医療用 *in situ* 架橋ハイドロゲルの反応混合  
プロセスの研究 穂積卓朗・伊藤大知 東京大学先端医療シーズ開発フォーラム  
東京 2013 年 1 月 25 日 H3

6) 腹膜播種治療のための *in situ* ゲル-ナノゲルハイブリッドシステムの開発  
平本翔大・江本成伸・山口博紀・石上浩徳・北山丈二・伊藤大知 東京大学先端  
医療シーズ開発フォーラム 東京 2013 年 1 月 25 日 H1

7) 止血効果を有する癒着防止材料開発のためのヒアルロン酸/ポリリン酸 *in*  
*situ* 架橋ハイドロゲルの創製 青木照夫・大道清彦・清水篤志・長谷川潔・國土  
典宏・伊藤大知 東京大学先端医療シーズ開発フォーラム 東京 2013 年 1 月 25  
日 F7

8) *injectable* な医用ハイドロゲルの材料開発—腹膜癒着・腹膜播種・がん免疫  
療法・再生医療への応用 伊藤大知 情報協会招待講演 秋葉原 2012 年 12 月 18  
日

9) カルボキシメチルデキストランを用いたクリック反応架橋ゲルの開発 高橋  
彬・須原宜史・鈴木幸光・大道清彦・清水篤志・長谷川潔・國土典宏・伊藤大  
知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター 宮城  
2012 年 11 月 26-27 日 PH24

10) 肝臓切除癒着における *in situ* 架橋ヒアルロン酸ハイドロゲル癒着防止材  
の開発 須原宜史・青木照夫・大道清彦・清水篤志・長谷川潔・國土典宏・伊藤

大知 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 仙台国際センター 宮城  
2012年11月26-27日 PB14

11) カッパーフリークリックハイドロゲルの開発と *in vivo* 生体適合性の評価  
高橋彬・須原宜史・伊藤大知 膜シンポジウム 2012 神戸大学 六甲台第2キャンパス 兵庫 2012年11月6-7日 221

12) 腹膜播種に対するシスプラチン担持 *in situ* 架橋ゲルを用いた腹腔内化学療法  
江本成伸・山口博紀・亀井隆雄・須原宜史・鈴木幸光・伊藤大知・石神浩徳・北山丈二・渡邊聡明 日本癌治療学会 パシフィコ横浜 神奈川 2012年10月25-27日

13) 電気化学的細胞脱離とスマートバイオマテリアルを用いたティッシュエンジニアリング  
景山達斗・伊藤大知・鈴木博章・福田淳二 第64回日本生物工学会 第44回秋季大会 神戸国際会議場 兵庫 2012年10月24-26日 (口頭)

14) 電気化学的細胞脱離と *in situ* ゲル化スマートバイオマテリアルを用いた血管様構造の構築  
景山達斗・掛川貴弘・大崎達哉・伊藤大知・鈴木博章・福田淳二 化学工学会 第44回秋季大会 東北大学 川内北キャンパス 宮城 2012年9月19-21日 D206

15) ポリアクリル酸グラフトヒアルロン酸を用いた生体内イオン架橋ゲルの創製  
中裕聡・伊藤大知 化学工学会 第44回秋季大会 東北大学 川内北キャンパス 宮城 2012年9月19-21日 V303

16) ラット肝切除術後癒着モデルを用いた癒着防止材料の有効性の比較研究  
大道清彦・清水篤志・須原宜史・宮田陽一・青木琢・阪本良弘・菅原寧彦・伊藤大知・長谷川潔・国土典宏 第67回日本消化器外科学会総会 富山国際会議場 富山 2012年7月18-20日

17) Copper-free click chemistry を用いた医用 *in situ* 架橋ゲルの創製  
高橋彬・鈴木幸光・伊藤大知 第11回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 2012年6月14日 O-27-5

18) ダブル *in situ* 架橋を可能にするフィブリン-ヒアルロン酸クリックハイドロゲルの創製  
須原宜史・伊藤大知 第11回日本再生医療学会総会 パシフィコ横浜 2012年6月13日 A-7-37



19) ポリリン酸修飾ヒアルロン酸イオン架橋ゲルの創製 青木照夫・伊藤大知  
日本膜学会第34年会 早稲田大学西早稲田キャンパス 63号館 2012年5月9日

20) ラット肝切除による新たな腹腔内癒着モデルの開発と癒着防止材料の有効性に関する検討 清水篤志・伊藤大知・須原宜史・長谷川潔・国土典宏 第112回日本外科学会定期学術集会 幕張メッセホテルニューオータニ幕張 千葉 2012年4月12-14日

#### 2011年度

1) Copper-free click chemistry を用いた医用 in situ 架橋ゲルの創製 高橋彬・鈴木幸光・清水篤志・伊藤大知 第8回医工連携研究会 東京大学医学部教育研究棟13階 東京 2011年12月17日

2) in situ 架橋ゲルからのシスプラチン徐放挙動の解明と腹膜播種への応用 須原宜史・鈴木幸光・亀井隆雄・山口博紀・石神浩徳・北山丈二・伊藤大知 第8回医工連携研究会 東京大学医学部教育研究棟13階 東京 2011年12月17日

3) ラット肝切除術後癒着モデルを用いた癒着防止材料の有効性の比較研究 大道清彦・清水篤志・須原宜史・伊藤大知・長谷川潔・国土典宏 第8回医工連携研究会 東京大学医学部教育研究棟13階 東京 2011年12月17日  
東京大学 第7回医工連携研究会

4) 医療応用を目指した新規 in situ 架橋ハイドロゲルの開発  
鈴木幸光、高橋 彬、茂木祐大、清水篤志、長谷川潔、国土典宏、伊藤大知  
2011年2月2日

#### 2010年度

1) 癒着防止開発事例 ～癒着防止ゲル～ 伊藤大知  
情報技術協会・招待講演  
2010年8月27日

2) in situ 架橋ゲルからの水溶性抗がん剤徐放挙動の解明と腹膜播腫への応用  
須原 宜史、鈴木 幸光、亀井 隆雄、山口 博紀、石神 浩徳、北山 丈二、伊藤 大知  
化学工学会 第42回秋季大会 L209

2010年9月3日

3) 医療応用を目指した新規 *in situ* 架橋ハイドロゲルの開発  
鈴木幸光、高橋 彬、茂木祐大、清水篤志、長谷川潔、國土典宏、伊藤大知  
東京大学 第7回医工連携研究会  
2011年2月2日

H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)

1. 特許取得 出願 1 件、出願準備中 1 件

1-1. 本研究の新規クリック *in situ* 架橋ゲル  
PCT 出願へ移行

伊藤大知、鈴木幸光、高橋彬、清水篤志

発明の名称：ハイドロゲル及びその製造方法 特願 2011-122183

1-2. 本研究の HA-IDA-CDDP ナノゲルの標的性  
東大 TLO を介し、出願準備中

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし

分担研究報告書

ナノゲル担体用ヒアルロン酸誘導体 HA-IDAとHA-MAの開発

研究分担者： 鈴木 幸光 （東京大学大学院工学系研究科・助教）

**【研究要旨】**

本研究提案では、CDDPを二座配位した担持したヒアルロン酸ナノゲルを創製し、正常細胞よりもがん細胞に発現量が多いCD44を標的として、ヒアルロン酸とCD44の相互作用を利用して、腹膜播種細胞特異的にCDDPを送達することを目指している。

CDDPを配位する部位として、カルボプラチンやオキサリプラチンと同様のジカルボン酸配位子を選択した。すなわち、イミノ二酢酸 (IDA) とマロン酸 (MA) を、カルボジイミドケミストリーを用いて、HAのカルボキシル基に修飾率20%程度で修飾した、イミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸 (HA-IDA)、及びマロン酸修飾ヒアルロン酸 (HA-MA) を合成した。

初年度はヒアルロン酸ナノゲルの担体ポリマーとなるイミノ二酢酸修飾ヒアルロン酸 (HA-IDA) の合成に成功した。さらにこれにシスプラチン (CDDP) を担持して、直径が純水中で100nm程度のナノゲルを作製することに成功した。さらにこのナノゲルはPBS中で10~20nmまで収縮することを示した。本年度はHAに対照物質となるカルボキシメチルセルロース (CMC) に着目し、これにイミノ二酢酸修飾を施したCMC-IDAを合成することに成功した。さらに共焦点顕微鏡での可視化を行うために、カルボジイミド反応を用いて緑色蛍光プローブであるFTSC (Fluorescein-5-thiosemicarbazide) を修飾したHA-FTSC、HA-IDA-FTSC、CMC-FTSC、CMC-IDA-FTSCの合成に成功した。

またマロン酸を配位子としたHA-MAの合成を行い、ナノゲル化することを試み、成功した。HA-IDA-CDDP、HA-MA-CDDPのCDDP徐放速度を測定し、二座配位子の導入により、CDDP徐放速度が著しく遅延し、未修飾HAから作製したHA-CDDPナノゲルよりもはるかに安定なナノゲルの作製に成功した。

## A. 研究目的

がん細胞に特異的なレセプターは、がん細胞の種類によって異なる。胃腺がんの細胞である MKN45 を同期化すると、CD44 が多様な種類のスプライシングを受けてできる CD44v4、CD44v5、CD44v7 が多く発現することが分かっている。

このことから、胃がんの腹膜播種細胞株である MKN45P においても CD44 が多く発現することが期待される。よって、HA と CD44 の特異的な相互作用を用いたドラッグデリバリーシステムを考案することは有効であると考えられる。

胃がんの腹膜播種細胞に選択的に抗がん剤を送達するシステムを創製する。具体的には、HA と CDDP からなるナノゲルを作製して用いる。HA と同じく生態適合性に優れるが、CD44 と特異的に結合する性質を持たないカルボキシメチルセルロース (CMC) を対照実験として用いることで、胃がんの腹膜播種細胞に選択的に抗がん剤が送達されることを検証するため、CMC 誘導体の合成も必要である。

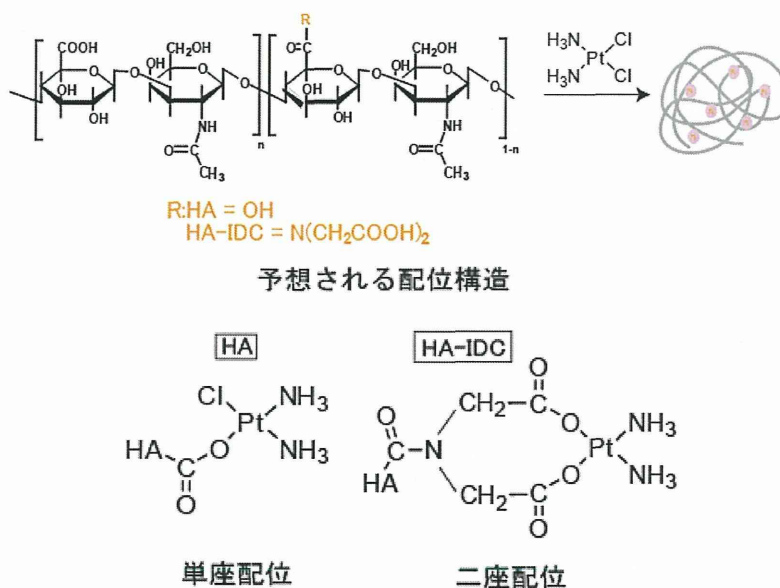


図1 HAおよびHA-IDAとCDDPの結合によるナノゲルの作製

また、図1に示すように、徐放挙動が緩やかになると考えられる新規の二座配位を形成する HA 誘導体を合成する。これを用いて CDDP を担持したナノゲルを作製し、徐放挙動を観察する。CDDP 配位高分子としては、図2に示すよ