グルコースに応答してインシュリンを放出する 分子システムの設計と作製

伊藤嘉浩・Mario Casolaro・鄭 東準・今西幸男*

Design and synthesis of glucose-sensitive insulin-releasing systems

Two kinds of glucose-sensitive insulin-releasing systems were developed. The first system is based on changes in pH, induced by an enzyme, in response of glucose. The other is based on redox reaction, catalyzed by an enzyme, in response to glucose.

1) Glucose oxidase (GOD) is immobilized on a poly(acrylic acid)-grafted porous cellulose membrane, which is prepared as a pH-sensitive membrane. In the absence of glucose, the chains of poly(acrylic acid)-grafts are rod-like, lowering the porosity of the membrane and suppressing insulin permeation. On the other hand, in the presence of glucose, gluconic acid, produced by GOD, protonates the poly(acrylic acid), making the graft chains coil-like and the pores open to enhance insulin permeation.

2) Insulin is immobilized on a membrane through disulfide bond. NAD and FAD are also co-immobilized on the membrane. When glucose is added, glucose dehydrogenase catalyzes oxidation of the glucose. Electrons, which are produced during the reaction, are transported, and subsequently they reduce the disulfide bonds. Consequently the immobilized insulin is released.

Yoshihiro Ito・Mario Casolaro・
Dong June Chung・Yukio Imanishi

key words : insulin-releasing system, bioresponsive system, immobilization, glucose-sensitivity

ドラッグデリバリーは、time-control と site-control に分類できる。time-control には、たんに薬効を持続させるためのスローリリースから、pH や熱に応答するもの、さらには物質に応答するものまである。site-control は、特定臓器、病変

部、特定レセプターへ薬剤を集中させることである。本研究では、time-control の中でもっとも高次の物質応答性の分子システムの設計と作製を行った。

物質応答ドラッグデリバリーとして、特に研究が行われているのは、糖尿病治療のための、グルコースに応答してインシュリンを放出するシステムである。この実現のために、大きくわけて三つのアプローチが行われている。

第一は、膵臓細胞をマイクロカプセルで被覆し、免疫反応から守り、機能させようとする方法。第二は、グルコースセンサーとインシュリン・インジェクターで機械的制御システムをつくる方法。第三は、ここで述べる分子システムによる方法である。

最初に考案されたのは、インシュリンに糖を結合し、レクチンと錯体を形成させておき、グルコースが加えられると、糖結合インシュリンと置換し、糖結合インシュリンが放出されるシステムである^{1,2)}。その後、バイオセンサーに用いられる酵素を利用することで、物質応答性分子システムの設計が一般化されるようになった。その最初の例がグルコースオキシダーゼ(GOD)のつぎの反応を利用し、pH に応答するヒドロゲルと組み合わせたものである^{3,4)}。

生成グルコン酸により、ヒドロゲル近傍の pH が低下し、ゲルの膨潤度が上昇し、インシュリンが透過できるようになる。しかしながら、ゲル中のインシュリンの拡散の遅さや、pH に対する応答時間の長さなど、不適当な点が多かった。そこで筆者らは、鋭敏に pH に応答する chemical gate システムを導入するとともに、生体内で大きな pH 変化が期待できない場合の、酸化還元シス

* Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University. 京都大学工学部高分子化学教室

図1 principle of controlled release system of insulin

GOD, glucose oxidase. Above; in the absence of glucose, the chains of poly (acrylic acid) grafts are rod-like, lowering the porosity of the membrane and suppressing insulin permeation. Below; in the presence of glucose, gluconic acid produced by GOD protonates the poly(acrylic acid), making the graft chains coil-like and the pores open to enhance insulin permeation.

テムについて検討した。

pH 変化を利用したグルコース応答性インシュリン放出システム

ポリアクリル酸を表面にグラフトした多孔性セルロース膜を pH 応答性膜として調製し、グルコースオキシダーゼ(GOD)を固定化し、膜がグルコースの濃度変化に特異的に応答するようにした(図1)。GOD は、グルコースをグルコン酸にし、グラフト鎖のカルボキシル基をプロトン化し、静電反発が減少し、高分子鎖はコイル状になり、孔が開く。

(1) 実験

① 材料: 再生セルロース膜はザルトリウスから購入した。孔径 $0.2\mu\text{m}$ 、厚みは 0.08mm 。アクリル酸は購入後、減圧蒸留して用いた。ウシ膵臓インシュリン(25.6IU/mg)はシグマから、GOD(484IU/mg)はオリエンタルイースト社からおの購入した。

② システム作製: ポリアクリル酸のグラフト

図2 apparatus for insulin permeation experiments

化は、プラズマ開始重合により行った。再生セルロース膜を、室温、減圧(0.2Torr)、放電電流 $4\sim6\text{mA}$ で、 $5\sim10$ 秒間グロー放電処理し、 $10\%\text{v/v}$ アクリル酸水溶液に浸漬し、窒素雰囲気下、 60°C で2時間放置した。重合後、膜を取り出し、洗液が酸性を示さなくなるまで洗浄し、グラフト化膜とした。グラフト化膜への GOD の固定化は、水溶性カルボジイミドを用いて行った。すなわち、グラフト化膜を $10\text{wt}\%$ 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩緩衝液(pH 4.75 に調製)に1時間 4°C で浸漬し、その後取り出し、蒸留水で洗浄した後、今度は $1\text{wt}\%$ GOD 緩衝液(pH 4.75 に調製)に24時間 4°C で浸漬した。緩衝液は 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸を用いて調製した。固定化後、遊離の GOD が洗液になくなるのを UV でチェックした。

③ グラフト量、GOD 固定化量定量法: グラフト量は、重量増加から求めた。サンプル名の P のあとの数字はグラフト量(wt%)を表す。固定化 GOD はフルオレスカミンで定量した。GOD 固定化膜を 6N 塩酸中に浸漬し、12時間還流した。分解された GOD を含むこの酸性水溶液を 6NNaOH で中和した。適当な濃度に希釈後、緩衝液で pH 9.25 とし、攪拌しながら、フルオレスカミン溶液(5.2mg フルオレスカミンを 25ml アセトンに溶解)を加え、蛍光強度を測定した。励起、発光波長はおおの 390 と 490nm とした。遊離の GOD 水溶液についても同様の測定を行い、検定直線とした。

④ インシュリン透過実験: セルロース膜試料を図2に示すように、小穴(15mm^2)を有するプラスチックキューベットで挟み、一方にインシュリン緩衝水溶液、他方に緩衝液を加えた。 30°C に保ち、マグネチックスターラーで攪拌し、一定時間ごと

図3 permeation of insulin through poly (acrylic acid)-grafted membranes P-7(a) and P-37(b) at 30°C in Tris-buffered solution

図4 change of pH on adding glucose in the presence of GOD immobilized on cellulose membranes P-20 (●) and P-9 (▲), and on adding glucose to GOD solution of 0.22 mg/m (○), 0.11 mg/m (△), and 0.01 mg/m (□)

図5 permeation of insulin through poly-(acrylic acid) graft 9 wt %, glucose concentration 0.2 M

に透過してくるインシュリン量を 274 nm の吸収から定量した。透過係数(P)は、次式により計算した。

$$P = Q \cdot l / \Delta c \cdot A \cdot t$$

ここで、A(cm²)とl(cm)は膜の表面積と厚みをおのおの示し、Q(g)は透過した溶質質量を、 Δc (gcm⁻³)は両サイドの濃度差を、t(s)は時間を示す。

(2) 結果と考察

インシュリンの透過は、本実験の測定時間内では、時間経過とともに直線的に増加した(図3)。

pH 2 でも 7 でも、グラフト化していない膜での

インシュリン透過性にはほとんど差はなかったが、グラフト化膜では、低 pH で高い透過性が観測された。また、グラフト化膜の透過性は、非グラフト化膜より低く、この傾向はグラフト化量の上昇とともに大きくなった。しかしながら、グラフト化量の多い(b)のほうが pH 7 と 2 での透過性の差は大きかった。

図4には、遊離あるいは固定化 GOD にグルコースを加えたときの水溶液の pH 変化を示す。直線の傾きから活性な固定化 GOD 量は 0.014 mgGOD/mg セルロースと見積ることができる。しかしながら、蛍光法で定量すると、0.33 mgGOD/mg セルロースとなった。この相違は、固定化により、GOD が変性したり、活性部位の配向が不利になったためと考えられる。

GOD 固定化グラフト膜のインシュリン透過性のグルコース添加による変化を、図5に示す。グ

表 1 permeation coefficients of insulin through cellulose membranes at 30°C in Tris-buffered solution

membrane	pH	permeation coefficient $P \times 10^7$ (cm ² /s)			Ref.
cellulose	7	10.0			this work
P-7	7	5.5			this work
	2	8.0			this work
P-37	7	4.5			this work
	2	8.0			this work
		addition of glucose after (A) before (B) A/B			
GOD-immobilized P-9	—	5.0	3.0	1.7	this work
copolymer of N, N-dimethyl-aminoethyl methacrylate and 2-hydroxyethyl methacrylate	—	1.5	1.3	1.4	10
copolymer of 3-carbamoyl-1-(p-vinylbenzyl) pyridinium chloride and 2-hydroxypropyl methacrylate	—	5.88	3.98	1.5	3

ルコース添加により透過係数は 1.7 倍になった。表 1 には、ヒドロゲルを用いたシステム^{3,4)}との比較を示した。当初の予想どおり、本研究のシステムは、グラフト鎖の微妙な動きで透過性を変化でき、応答性が速く、変化も大きくできた。

現在、筆者らは、孔径が厳密に定まった直孔性膜を用い、グラフト鎖長、グラフト密度により、どこまで pH による透過制御を厳密にできるかについて検討している⁹⁾。

さらに、岩田ら⁹⁾は、本研究で用いたポリアクリル酸を、両性電解質にかえ、より微妙な pH 変化に応答できるよう検討している。

最近、pH に応答して、物質の透過・放出を制御する分子システムが考案されており⁷⁾、それらを利用したドラッグデリバリーシステムも報告されている⁸⁾。インシュリンの溶解性の pH 依存性を利用する場合もある⁹⁾。しかしながら、このように、物質応答性を酵素に担わせ、pH 応答性システムと組み合わせる場合には、生体内の pH 緩衝作用のため、効果が弱められるおそれがある。そこで考えられたのが、つぎに示す酸化還元反応を利用するシステムである。

酸化還元反応を利用したグルコース応答性インシュリン放出システム

酸化還元により、ヒドロゲルの膨潤度を変化させるシステムがすでに報告されている¹⁰⁾が、前述

したように、ヒドロゲルでは、応答速度や物質の拡散速度が遅く、高効率な制御が期待できない。そこで、本研究ではグルコースの酵素による酸化反応に伴う電子移動を用いたインシュリン放出システムを考案した。図 6 に示すように、ポリアクリル酸グラフト化ポリメチルメタクリレート (PMMA) 膜にニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)、フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) とともにジスルフィド結合を介してインシュリンを固定化した。グルコースが酸化されると、図 6 の反応経路に従い、ジスルフィド結合が FADH₂ からの電子移動によって還元・切断され、インシュリンが放出される。

(1) 実験

① ジスルフィド結合の切断：まず、予備的にジスルフィド結合が、どのような条件下で切れやすいかについて検討した。ジスルフィド結合を有する化合物として、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸) (DTNB) を選び、分解生成物チオニトロフェノレートアニオンの 412 nm の吸収で切断の可否を調べた。図 7 に示したように、補酵素が存在しない場合には(○)、ジスルフィド結合の還元がほとんど起こらなかったが、NAD, FAD をともに加えると(●)、反応が加速されることがわかった。

② 固定化膜の作製：そこで、NAD, FAD も固定化したシステムを図 8 の方法に従って作製し

图 6 设计的葡萄糖敏感胰岛素释放系统使用氧化还原反应

当加入葡萄糖时，一种结合胰岛素和膜的硫化键被切断。因此胰岛素被释放。

图 7 在不同条件下二硫键的断裂
葡萄糖脱氢酶 (GDH) 225 mg/ml, 葡萄糖 1.0 mM, DTNB 0.6 mM, NAD 0.15 mM, FAD 0.1 mM.

図 8 synthetic route of the functionalized polymer membrane

た。直径 15 mm の PMMA 膜をグロー放電処理し(真空度 0.2 Torr, 放電電流 5mA, 時間 15 分), 過酸化物を形成させた後, アクリル酸を重合させた。水溶性カルボジイミド(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩, WSC)の溶液(10 mg/ml)を用いて, 膜表面のカルボキシル基を活性化し, 所定の濃度の NAD, FAD およびエチレンジアミン(ED)を反応, 固定化した。さらに, ED の未反応末端部に 10 mM の DTNB を結合し, さらにその未反応末端部にインシュリン(61.25 IU/ml)を固定化し, システムを完成了た。

③ 固定化量の定量: 固定化物を酸加水分解し, 遊離アミノ基量から固定化量を定量した。FAD, NAD, および ED の総固定化量は, DTNB を固定化する前に定量した。まず, 5N 塩酸 1 ml に膜 3 枚を入れ, オートクレープの中で(120°C, 1 時間)加水分解し, 固定化物を膜から遊離させた。同量の 5N 水酸化ナトリウムで中和した後, 1 ml ニンヒドリン-ヒドリンダンチン溶液を加え, オートクレープ中で(100°C, 3 min)処理し, 呈色反応を行った。冷却後 570 nm の吸光度を測定して, 固定化物の量を測定した。

④ インシュリンの放出実験: 図 9 に示したように, 栓付きの容器に 20 ml のリン酸緩衝液(pH 7.0)と調製した高分子膜 6 枚を入れ, 37°C の恒温

図 9 method of insulin-releasing experiment

- 1 : modified polymer film
- 2 : reaction solution
- 3 : stirrer chip
- 4 : magnetic stirrer
- 5 : water bath
- 6 : electric heater with controller

槽で十分攪拌した後, グルコースデヒドロゲナーゼ(9.1 IU/ml)を加え, 30 分にわたって 280 nm での UV 吸光度の変化を測定した。その後, 一定時間ごとにグルコースを添加し, 280 nm での吸光度の変化を測定し, インシュリンの放出を追跡した。

(2) 結果と考察

表 2 に固定化量の測定結果をまとめた。FAD の仕込み濃度 0.5 mg/ml を 1 とし, NAD, ED の仕込みモル比を調製した。仕込み量が異なっても総固定化量はあまり変化しなかった。これは,

表 2 immobilization of amines and insulin onto a treated PMMA film

feed of molar ratio of FAD/NAD/ED*	amount of immobilized FAD, NAD and ED on PMMA film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	amount of immobilized insulin on PMMA film ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
1/10/0.1	0.67 ± 0.01	0.05 ± 0.01
1/ 1/0.1	0.71 ± 0.03	0.13 ± 0.06
1/ 1/1	0.80 ± 0.19	0.18 ± 0.07

* ED : Ethylenediamine (Ethylene diamine)

図 10 release of insulin from various polymer membranes

本研究の仕込み濃度範囲では、膜上にあるカルボキシル基は、ほとんどアミノ化合物と反応しているためと考えられる。インシュリンの固定化量は、ED の仕込みモル比が上昇するほど高くなった。

このように、調製した膜からのグルコースに反応するインシュリンの放出を調べ、図 10 に示す。グルコース (1.5M) 添加により、どの膜からも、インシュリンが放出されるようになることがわかる。特にインシュリンが多く固定化されている膜

では、多くのインシュリンをなん度かにわたって放出した。

おわりに

物質応答性ドラッグデリバリー分子システムの研究においては、今後さらに応答速度を高めるために、刺激伝達を効率良く行うような分子の組織化が望まれる。そのために、たとえば、酵素に直接ジスルフィド結合を介してインシュリンを結合させた分子デバイスなども考えられる。また一方、実際に生体内で使用する場合には、為害性はもちろんあってはならないし、生体内安定性などについても、検討を加えなければならない。

文 献

- 1) Brownlee, M., Cerami, A.: Science 206: 1190, 1979.
- 2) Jeong, S. Y., Kim, S. W., Eenink, M. J. D., Feijen, J.: J. Controlled Release 1: 57, 1984.
- 3) Ishihara, K., Kobayashi, M., Ishihara, N., Shinohara, I.: Polym. J. 16: 625, 1984.
- 4) Kost, J., Horbett, T. A., Ratner, B. D., Singh, M.: J. Biomed. Mater. Res. 19: 1117, 1985.
- 5) 小寺省吾, 河野健司, 伊藤嘉浩, 今西幸男: 高分子研究発表会(神戸)抄録 34: 15, 1988.
- 6) 岩田博夫, 畑 善夫, 雨宮 浩, 松田武久, 高野久輝, 阿久津哲造: Polym. Prepr. Jpn. 37: 726, 1988.
- 7) 今西幸男, 伊藤嘉浩: 化学 43: 764, 1988.
- 8) 今西幸男, 木村俊作, 伊藤嘉浩: 化学と工業 41: 837, 1988.
- 9) Ghodsian, F. F., Brown, L., Mathiowitz, E., Brandenburg, D., Langer, R.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2403, 1988.
- 10) Ishihara, K., Shinohara, I.: Makromol. Chem. Rapid Commun. 4: 327, 1983.