

# 研究報告2022 目次 【研究開発部】

## 有望シーズ展開事業

### 「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

|   |    |
|---|----|
| ◆ 総括  | 68 |
| ◆ マイクロニードル融合型デバイスのリアルタイム機能評価と穿刺性評価法の確立  | 71 |
| ◆ 複数のすい臓がん幹細胞の標的化に向けたボロン酸リガンドによるpH依存的な糖鎖末端シアル酸認識  | 73 |
| ◆ Porous Microneedles filled with a Glucose-responsive Hydrogel for Self-Regulated Insulin Delivery | 76 |
| ◆ 業績  | 78 |

# 「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

プロジェクトリーダー 松元 亮

## 【基本構想】

糖尿病は、インスリンの絶対的あるいは相対的な作用不足に起因するため、これに対する最も有効かつ安全な治療法はインスリン療法である。これは、血糖値のモニタリングや個人の生活習慣等に基づいて、即効性から遅効性のインスリン製剤を組み合わせることで投与し、血糖値をできる限り正常域にコントロールするものである。一方、インスリン療法は患者の生活の質を著しく損なううえ、意識障害等の重篤な症状に繋がる低血糖の危険性がある。心筋梗塞等の心血管合併症を予防するためには、より精密な血糖コントロールが有効であるが、頻回の低血糖症状はむしろ予後を悪化させる可能性も指摘されている。この急性かつ重篤なリスク（低血糖発作）を避ける結果、実臨床上、十分な血糖コントロールが得られていない。最近では、マイクロコンピューター制御による装着型のインスリンポンプが欧米を中心に普及しつつあるが、あらかじめ設定されたアルゴリズムに従ってインスリンを投与するか基礎分泌相当を供給するに留まり、オーダーメイド医療とはほど遠いものである。従って、より正確かつ連続的にインスリン供給制御が可能な代替技術が強く要請されている。我々は、糖との結合能で知られるボロン酸をキーコンポーネントとし、これを導入した水溶性アクリルアミドゲル構造を最適化することで、生体由来材料やエレクトロニクスを一切用いない上記目的のインスリン供給機構を実証してきた。本プロジェクトでは、究極的な低侵襲性を志向したマイクロニードル融合型（「貼るだけ人工膵臓」）デバイスの開発を進めている。生活習慣病を中心とする非感染性疾患（non-communicable disease: NCD）は世界の医療費の43%を占め、2020年には60%に増加するとともに、全死亡の73%に関与すると予測されている。世界に類を見ない速度で高齢化が進行する本邦では、糖尿病等の生活習慣病が国民医療費の約15%、死亡数割合では約30%を占める。「貼るだけ人工膵臓」の技術は、糖尿病治療におけるアンメットメディカルニーズ（長期的な血糖管理、低血糖の回避、患者負担の軽減）を解決し、「健康寿命」と「平均寿命」の差“ゼロ”の実現を図る革新的な医療技術として期待される。

## 1. 2021年度の研究目的

### (1) 製造プロセスの最適化とプロトタイプの開発

共同研究先企業と協議の上、マイクロニードルの製造方法としては、量産性に優れた光重合方式にフォーカスしている。中心的な課題は、「刺入性」、「放出特性」、「製造効率」の全てを高次に満足する製造プロセスの開発である。この目的のため、ゲル重合時の反応条件を最適化するとともに、これまでに開発してきた被覆剤や添加材等を利用して取り組むこととした。

### (2) 次世代型徐放性マイクロニードル材料および製造プロセスの開発

デバイスからのインスリン放出性能を最大化することが、デバイスの小型化と持続性の延長につながる。ゲルマイクロニードルでは一般に、低密度化するほど薬物放出性能が向上するが、力学的特性の維持には不利となる。このような二律背反の命題を解決する一つのアプローチとして、スマートゲル内包多孔質 MNs を検討した。具体的には、マイクロニードル先端部でインスリン拡散制御を担うゲル成分と力学的強度を補強する成分との相分離構造を高次に制御することで目的の材料とし、その製造プロセスを最適化した。力学的に強固かつインスリンの拡散性を妨げない共連続構造のマトリックスを活用し、機能部位（ゲルニードル）との層構造とすることで、ニードル一本単位

で均一かつ十分な加圧が可能な構造とする。本検討は、インスリンデリバリーにとどまらず、ワクチン等他の薬剤の経皮的デリバリーにおけるアンメットニーズ解決を見据えたものである。

### (3) ボロン酸によるシアル酸認識を利用したがん幹細胞標的化のための分子技術の検討

シアル酸 (Neu5Ac) は、細胞糖鎖中に最も高頻度かつ糖鎖末端に多く存在し、その動態は、発生、分化、疾病等の細胞現象と関連している。特に、がん細胞、高転移性のがん細胞、がん幹細胞 (Cancer Stem Cells: CSCs) 表面においては、ほぼ普遍的に過剰発現することが知られる。シアル酸は正常組織にも存在するため、シアル酸ターゲティングを実現するためには、腫瘍内で特異的に活性化されるような戦略的設計が必要である。ボロン酸は、グルコースに限らず多様な生体分子と相互作用し、その強度と選択性は合成化学的に可変である。シアル酸に対する人工リガンドとして用いることもできる。我々は、ピリジル系ヘテロ環含有ボロン酸誘導体の一種 (5-boronopicolinic acid (5-BPA)) が、従来知られる水準と比べて数十倍強力かつ選択的にシアル酸と結合し、さらに、この挙動は腫瘍内低酸素環境に特徴的な弱酸性条件下においてのみ顕在化し、生理的条件下 (pH7.4) では完全に失効することを発見していた<sup>1,2)</sup>。そこで、膵臓がん幹細胞亜集団に対する並列的標的化を果

たす分子技術への展開妥当性について検討した。

## 2. 2021年度の研究成果

### (1) リアルタイム機能評価と穿刺性評価法の確立

2021年度までに、テレメトリーシステムを導入し、ラットの血糖値をストレスフリーに24時間リアルタイムにモニタリングできるシステムを確立していた。今年度は、血糖日内変動の把握に加え、日常診療で一般的に行われているインスリン間欠投与による糖尿病治療を再現し、テレメトリーシステムにより観測する手技を確立した。

本デバイスが十分な効果を発揮するには、表皮バリアを破って留置されるマイクロニードルの表面積が十分に確保される必要があり、穿刺性の向上が重要な課題である。そこで、種々形状のマイクロニードルを用いて皮膚の穿刺性や肉眼的な変化を比較検討した(図1)。SDラットの皮膚にデバイスを貼付し、すぐに剥がして1時間後まで観察した。その結果、いずれのデバイスも明確な穿刺痕が観察され、1時間後には概ね消失することが確認された。肉眼的所見に加えて、角質や上皮のバリア機能を反映する水分蒸散量 TEWL (transepidermal water loss) を計測することで、マイクロニードル穿刺性(数・深さ)の数値化を試みた<sup>3,4)</sup>。マウスに対してデバイスを貼付し、その前後で TEWL を測定した。その結果、穿刺の程度(数・深さ)に応じてこれが再現性良く上昇したことから、TEWL 計測系により、穿刺性を「面」として連続評価することの妥当性が示された。

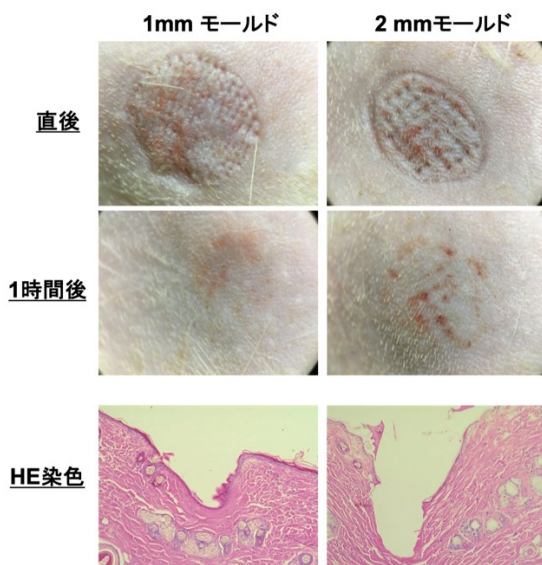


図1：針長による穿刺性の違い。

### (2) 次世代型徐放性マイクロニードル材料および製造プロセスの開発デバイス

我々の開発したマイクロニードル(MN)では、週レベルでの安定性およびインスリン放出持続性を確認しているが、ゲルマイクロニードル一般において、力学的強度と

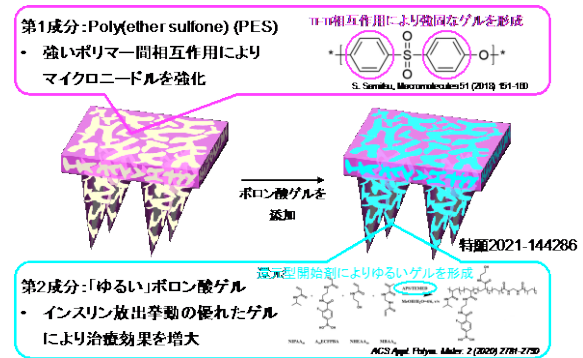


図2：PESハイブリッド型MN。

薬剤放出能の両立が課題である。また近年、インスリンデリバリーに関わらず、免疫治療の分野で除法型MNに対するニーズが高まっている。我々は、これらの課題に対し、いくつかのアプローチ(ボトムアップ及びトップダウン成型法)により多孔性MN製造技術の開発に取り組んでいる。ここでは、2021年度に特許出願を果たしたボトムアップ成型法の一例について述べる。貧溶媒中での相分離を介して多孔質構造を形成するポリエーテルスルホン(PES)を用いて力学的特性の優れた多孔質MN(PES MNs)を製し、薬剤放出能の高い低密度ボロン酸ゲルをPES MNsに添加し、皮膚刺入後にインスリン放出できるハイブリッド型MNs(Hybrid MNs)を検討した(図2)。調製したPES MNsの表面構造をSEM観察したところ、多数の空隙が確認され、ベンゼン中でのPESの相分離に伴う多孔質構造の形成が確認された。また、PESの相分離速度の制御に向けてPES濃度とベンゼン濃度を最適化することで、PES MNsのニードル部分の成形性が高まった。その後、PES MNs表面の親水化およびボロン酸モノマー含有プリゲル溶液の添加によりHybrid MNsを製し、最大応力をボンダテスターにより評価したところ、ボロン酸ゲルと多孔質PESのハイブリッド化により力学的特性が大幅に向上した。ここで、乾燥前後のHybrid MNsに関して最大応力が変化しなかったことから、内包したゲルの水和率に依存することなく力学的強度が維持されることを確認した。その結果、マウス皮膚に対して優れた刺入性を示した。さらに、異なるグルコース濃度におけるHybrid MNsからの蛍光標識インスリンの放出を共焦点顕微鏡により評価したところ、グルコース依存的なインスリン放出も確認された。以上より、力学的強度と薬剤放出能を両立したHybrid MNsの妥当性を示した。

### (3) 複数のすい臓がん幹細胞の標的化に向けたボロン酸リガンドによるpH依存的な糖鎖末端シアル酸認識の実証

ボロン酸リガンドの重要な利点の一つに、シアリル化に依存する複数タイプのエピトープ(CSCの亜集団)を並列的に標的可能なことが挙げられる。実際、このような複数のエピトープが発現する事象は、膵臓CSCにおいて知ら

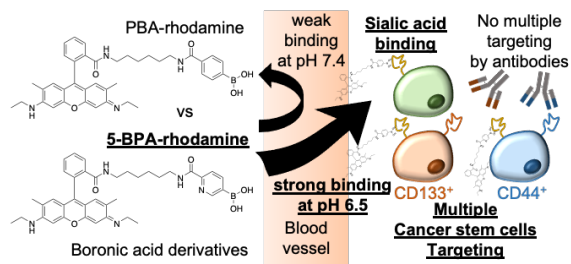


図3 ボロン酸による CSC ターゲティング。

れている。なお、抗体リガンドではこれらを独立に標的する必要はある。本研究では、まずフローサイトメトリーにより、すい臓がん CSCs のバイオマーカーである CD44 や CD133 と、糖鎖末端シアル酸との交差性を確認した。ついで、5-BPA と蛍光物質のコンジュゲートを合成し、すい臓がん細胞表面シアル酸の標的能および CD44 陽性細胞群および CD133 陽性細胞群への取り込み量を評価した。その結果、BPA コンジュゲートがすい臓がん細胞へ pH 依存的に取り込まれ、さらに、複数のすい臓がん CSCs を同時に標的化できることが明らかになった。さらにこの傾向は、弱酸性化条件下でより顕著となった<sup>5)</sup>。これらの結果は、低酸素および酸性の腫瘍微小環境に存在する複数の CSCs の標的化におけるボロン酸リガンドの化学構造制御の重要性を明らかにし、難治性すい臓がんの治療を目指した有効なアクティブターゲティングシステムの開発をさらに促進するものである。

#### 【参考文献】

- Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research techniques made simple: transepidermal water loss measurement as a research tool. *J Invest Dermatol* 138: 2295-2300, 2018.
- 太田広毅. 皮膚バリア機能評価の現状と最新型 TewameterTMHex. *COSMETIC STAGE* vol. 12, 2020.
- Matsumoto, A.; Stephenson-Brown, A. J.; Khan, T.; Miyazawa, T.; Cabral, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., Heterocyclic boronic acids display sialic acid selective binding in a hypoxic tumor relevant acidic environment. *Chemical Science* 2017, 8 (9), 6165-6170.
- Khan, T.; Igarashi, K.; Tanabe, A.; Miyazawa, T.; Fukushima, S.; Miura, Y.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Matsumoto, A.; Cabral, H.; Kataoka, K., Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells. *ACS Applied Bio Materials* 2020, 3 (8), 5030-5039.
- Miyazaki, T.; Khan, T.; Tachihara, Y.; Itoh, M.; Miyazawa, T.; Suganami, T.; Miyahara, Y.; Cabral, H.; Matsumoto, A., Boronic Acid Ligands Can Target Multiple Subpopulations of Pancreatic Cancer Stem Cells via pH-Dependent Glycan-Terminal Sialic Acid Recognition. *ACS Applied Bio Materials* 2021, 4 (9), 6647-6651.

# マイクロニードル融合型デバイスのリアルタイム機能評価 と穿刺性評価法の確立

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト  
伊藤 美智子

## 1. はじめに

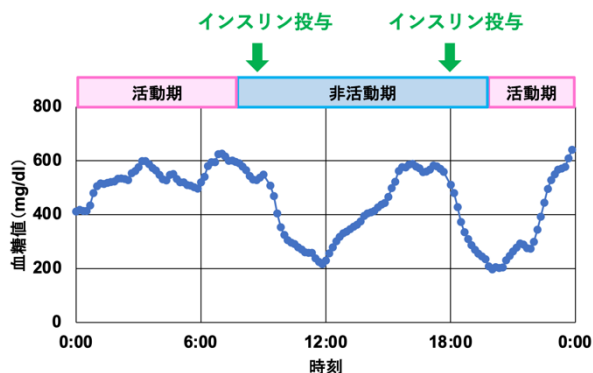
本プロジェクトで取り組んでいる「貼るだけ人工膵臓」は、マイクロニードルの針自体にグルコース応答性を持たせ、皮膚に貼付するだけでインスリンが分泌される画期的なデバイスである。これまでに開発されているマイクロニードルは皮膚に刺入後、溶解・吸収されるタイプのものであったが、本プロジェクトで目指すマイクロニードルは皮膚留置型で長期間にわたって効果を発揮するという挑戦的な取り組みである。生体内での効果を期待できるゲルの組成や基本的な構造が確立しつつあり、今年度は今後のスケールアップと安定性向上に必要な基礎データの取得に取り組んだ。

## 2. 実験と結果

### (1) テレメトリーシステムを用いた血糖モニタリング

昨年度テレメトリーシステムを導入し、ラットの血糖値をストレスフリーの状態でも24時間リアルタイムにモニタリングできるシステムを確立した。血糖日内変動の把握に有用であることは既に確認できているため、今年度はデバイスの機能評価に先立ち、日常診療で一般的に行われているインスリン間欠投与による糖尿病治療を再現し、テレメトリーシステムによる観察を行った。具体的には、ストレプトゾトシン (STZ) を用いて1型糖尿病モデルを作成し、テレメトリーを装着の上、即効型ヒトインスリン製剤 Humulin R を間欠的に皮下投与した。

STZ 投与によってラットの血糖値は 400 から 600 mg/dl に上昇していたが、Humulin R 投与後に血糖値が 200 mg/dl 程度まで低下し、その後の元に戻る過程が観察され



※9時、18時にHumulin R 8 Uを皮下投与

図1. STZラットへのインスリン間欠的投与による血糖値変化例

た (図 1)。また、STZ 投与ラットを絶食下におき、再摂食させると血糖上昇が認められ、再摂食前に Humulin R を投与することで血糖上昇が抑制されることを確認した (図 2)。今後、マイクロニードルデバイスを用いて同様の実験を実施し、ゲルから放出されたインスリンによる血糖コントロール効果を検討していく。

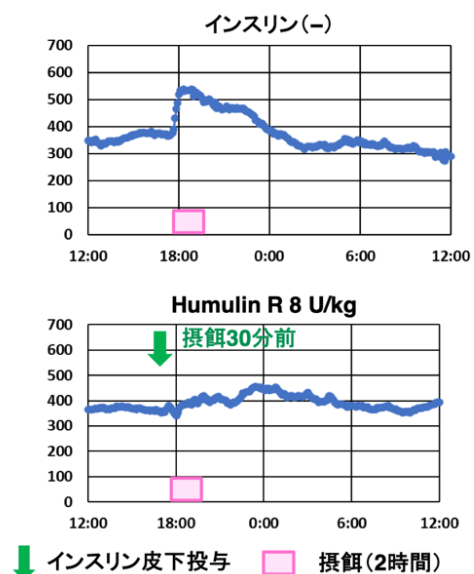


図2. STZラットへのインスリン単回投与のタイミングと血糖値変化

### (2) マイクロニードル皮膚穿刺性の評価

本デバイスが十分な効果を発揮するには、表皮バリアを破って留置されるマイクロニードルの表面積が十分に確保される必要があり、穿刺性の向上が重要な課題である。また、本デバイスは最大1週間の連続使用を予定しているため、かぶれや痒みなど皮膚の恒常性に及ぼす影響も考慮する必要がある。本年度は異なる形状のマイクロニードルを用いて皮膚の穿刺性や肉眼的な変化を比較検討した。マイクロニードルの針長はヒトにおいて痛みに届かないことを企図して、1 mm 長のモールドを使用していたが、マイクロニードル成形中に 20-30%程度短縮するため、2 mm 長のモールドについても評価を行った。SD ラットの皮膚にデバイスを貼付し、すぐに剥がして1時間後まで観察した。その結果、いずれのデバイスも明確な穿刺痕が観察され、1時間後には概ね消失すること

が分かった(図3)。病理組織像を観察すると、1mm モールドタイプでは表皮の陥凹はあるものの、必ずしも表皮を穿破していない部分が多く、2mm モールドタイプの方が真皮まで確実に穿刺されていることが明らかになった(図3)。針長が長くなることで強度が不十分になったり、皮膚に垂直に刺さりにくくなるといった問題があり、刺入性と有効面積のバランスを慎重に検討する必要がある。

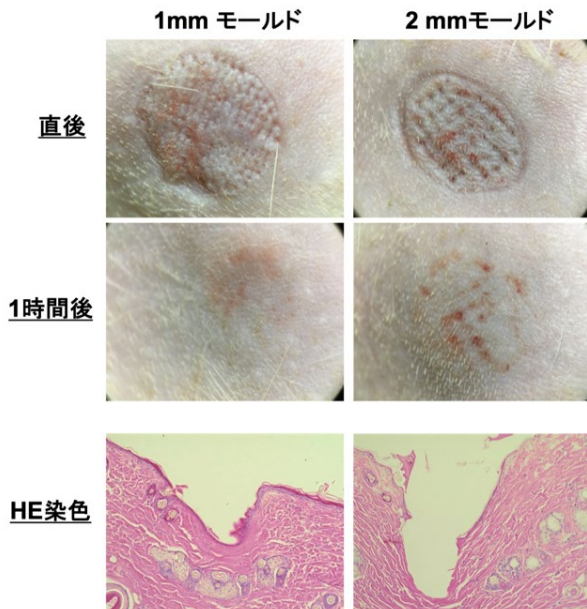


図3. 針長による穿刺性の違い

肉眼的所見では穿刺痕の数を根拠に判断するが、穿刺の深さについては評価できないこと、また病理組織像では切片上に捉えられる穿刺部位がごく限られることに加え、評価に時間がかかるという問題点がある。そこで、角質や上皮のバリア機能を反映する水分蒸散量 TEWL (transepidermal water loss) を計測することで、マイクロニードル穿刺性(数・深さ)の数値化を試みた<sup>1,2)</sup>。マウスに対してデバイスを貼付し、その前後で TEWL を測定した。正常な皮膚では 10-20 g/m<sup>2</sup>/h 程度が基礎値となるが、マイクロニードルの穿刺によってその数値が上昇し、ニ

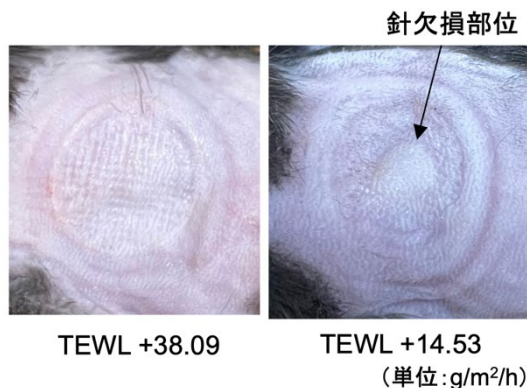


図4. マイクロニードル刺入効率と皮膚水分蒸散量(TEWL)の変化  
マイクロニードル貼付前後で比較

ードル欠損のために穿刺痕が少ない場合には上昇は軽度にとどまっていた(図4)。また、マイクロニードルを除去して1時間後には穿刺痕の消失とともに TEWL 値の低下が認められた(図5)。TEWL 計測計を用いることで、穿刺性を面として評価することが可能になると考えられた。一方で、マウスでは除毛によって皮膚の乾燥とバリア機能の破綻が誘導されてしまうため、除毛してから長時間経過後に健常部位と穿刺部位を比較することが難しく、短時間での貼付前後での比較が適していると考えられた。

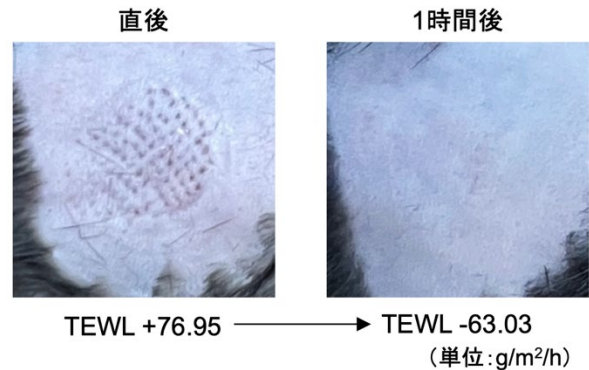


図5. マイクロニードル着脱後のTEWL変化

### 3. 考察及び今後の展望

これまでに基本的なゲル組成は検討が終了しており、現在はマイクロニードルデバイスの形状について、強度の確保、有効面積を確保するための針長の調整、インスリン浸透性の改善、微細な亀裂からのインスリン漏出防止といった改良に取り組んでいる。血糖値は摂食や運動によって大きな日内変動があるが、テレメトリーシステムの確立によって、デバイスの性能を詳細に評価できる準備が整った。血糖値あるいはインスリン値といったアウトプットに加えて、組織学的解析および TEWL によって局所の情報を得ることで、新規デバイスの性能を正確に捉え、生体において十分な治療効果を発揮できるデバイスの確立を加速化させたいと考えている。

#### 【参考文献】

1. Alexander H, Brown S, Danby S, Flohr C. Research techniques made simple: transepidermal water loss measurement as a research tool. *J Invest Dermatol* 138: 2295-2300, 2018.
2. 太田広毅. 皮膚バリア機能評価の現状と最新型 TewameterTMHex. *COSMETIC STAGE* vol. 12, 2020.

# 複数のすい臓がん幹細胞の標的化に向けた

## ボロン酸リガンドによる pH 依存的な糖鎖末端シアル酸認識

「貼るだけ人工臓腑」プロジェクト  
宮崎 拓也

### 1. はじめに

がん幹細胞 (CSCs) は、がんの発生や転移に関与していることから、がんの根治に向けては CSCs の標的化が必要である<sup>1,2</sup>。一方で、CD133 などの膜タンパク質が CSCs のバイオマーカーとして同定されており、抗 CD133 抗体に抗がん剤を導入した抗体薬物複合体による CSCs の標的化および治療効果の増大が確認されている<sup>3</sup>。しかしながら、CD133 などのバイオマーカーは正常組織においても発現しており、正常組織に対する毒性が課題である<sup>4</sup>。

一方で、細胞表面の糖鎖末端シアル酸の標的化に向けてボロン酸リガンドの開発が進められている<sup>5-8</sup>。これまでに、5-boronopicolinic acid (5-BPA) が pH 依存的にシアル酸に結合することを見出し、正常 pH (pH 7.4) においてはシアル酸に対する結合定数が低い一方で、腫瘍内 pH (pH 6.5) においてはシアル酸に強く結合することを確認している<sup>9</sup>。また、5-BPA をダハプラチン内包高分子ミセルの表面に搭載することで、ミセルの正常組織への集積を抑制しながら、乳がん腫瘍への集積性を高め、特に、CD44 発現 CSCs 標的能を向上させた<sup>10</sup>。しかしながら、すい臓がんなどの難治性がん CSCs においては CD44<sup>11</sup> や CD133<sup>12, 13</sup> などの複数の抗原を発現していることが知られており、5-BPA のすい臓がん CSCs の標的能は不明である。そこで、本研究では、すい臓がん CSCs のバイオマーカーである CD44 や CD133 と、糖鎖末端シアル酸との交差性を確認し、蛍光標識 5-BPA のすい臓がん細胞表面シアル酸の標的能および CD44 陽性細胞群および CD133 陽性細胞群への取り込み量を評価した (図 1)。

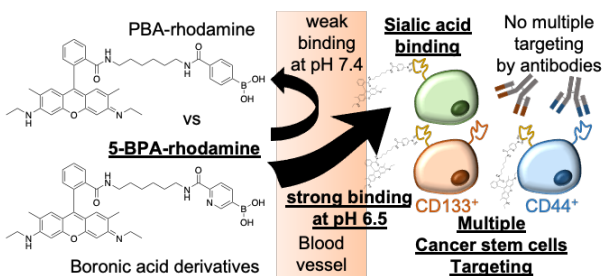


図 1: 本研究の概要。

### 2. 実験と結果

#### (1) シアル酸陽性すい臓がん細胞における CD44、CD133 の発現性の評価

すい臓がん CSCs のバイオマーカーである CD44 や CD133 と、糖鎖末端シアル酸との交差性を評価するために、すい臓がん BxPC-3 細胞に Alexa647 標識抗 CD44 抗体、Alexa647 標識抗 CD133 抗体および FITC 標識 Sambucus Nigra (SNA) を添加し、フローサイトメトリー法により Alexa647 および FITC を発現する細胞群を同定した。ここで、SNA は糖鎖末端シアル酸に結合することが知られており、シアル酸陽性細胞群の同定に用いた。その結果、CD44 陽性およびシアル酸陽性の細胞群が 12.5% である一方で、CD44 陽性およびシアル酸陰性の細胞群が 0.36% であることから、ほぼ全ての CD44 陽性細胞群がシアル酸を発現していることが明らかとなった (図 2)。また、CD133 についても CD44 と同様の傾向が確認され、ほぼ全ての CD133 陽性細胞群がシアル酸を発現していることが明らかとなった (図 2)。よって、シアル酸を標的化することにより、CD44 陽性すい臓がん細胞と CD133 陽性すい臓がん細胞を同時に標的化できることが示唆された。

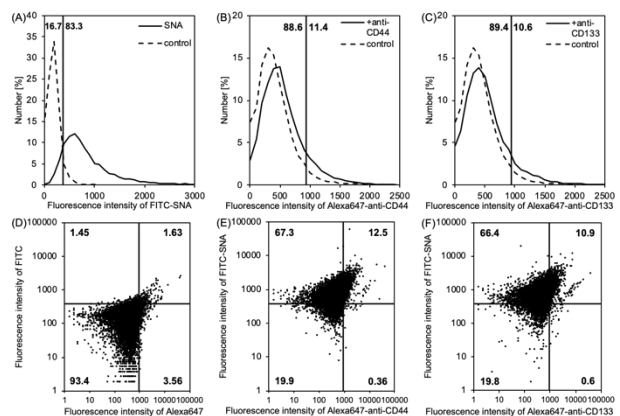


図 2: すい臓がん BxPC-3 細胞における CD44、CD133 およびシアル酸陽性細胞群の同定

#### (2) すい臓がん細胞における 5-BPA のシアル酸標的能の評価

5-BPA のすい臓がん細胞への pH 依存的な取り込みを評価するために、すい臓がん BxPC-3 細胞にローダミン標識 5-BPA を添加し、共焦点顕微鏡法により細胞内に取り込まれた 5-BPA を観察した。ここで、シアル酸標的能および pH 応答能の無い Phenylboronic acids (PBA) をコントロールとした。その結果、PBA が pH 7.4 および pH 6.5 におい

て低い取り込み量を示した一方で、5-BPA は pH 6.5 において pH 7.4 の約 4 倍の取り込み量を示した(図 3)。また、細胞表面のシアル酸を分解するシアリダーゼを添加したところ、5-BPA の取り込み量が減少したことから、5-BPA はシアル酸への結合を介して BxPC-3 細胞に取り込まれていることが示唆された(図 3)。このシアル酸を介した 5-BPA の細胞取り込みは、pH 6.5 において 5-BPA と SNA が共局在していることから示唆された(図 3)。よって、臨床での腫瘍を反映した細胞株である BxPC-3 細胞においても、5-BPA が細胞表面のシアル酸を pH 依存的に標的化できることが示された。

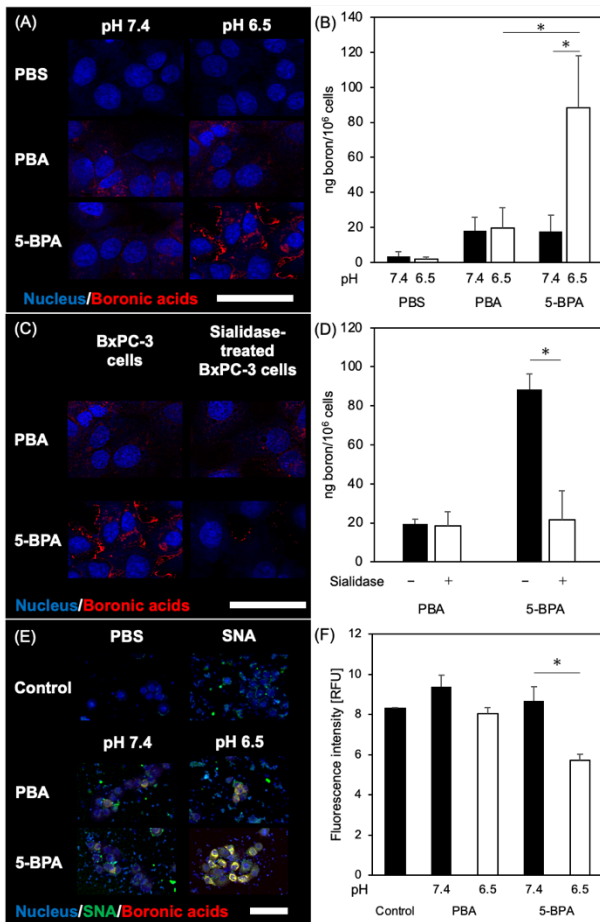


図 3 : すい臓がん BxPC-3 細胞に対する PBA、5-BPA の取り込みおよび SNA との局在

**(3) すい臓がん細胞における 5-BPA の CD44/CD133 陽性細胞群標的能の評価**

5-BPA の CD44/CD133 陽性すい臓がん細胞への pH 依存的な取り込みを評価するために、すい臓がん BxPC-3 細胞にローダミン標識 5-BPA、Alexa647 標識抗 CD44 抗体および Alexa647 標識抗 CD133 抗体添加し、フローサイトメトリ法によりローダミンおよび Alexa647 を発現する細胞群を同定した。その結果、PBA が pH 6.5 において低い取り込み量を示した一方で、5-BPA は pH 6.5 において CD44/CD133 陽性細胞群に対して高い取り込み量を示した(図 4)。また、5-BPA は pH 7.4 において CD44/CD133

陽性細胞群に対する取り込み量が減少したことから、pH 依存的にすい臓がん CSCs を標的化できることが示唆された(図 4)。

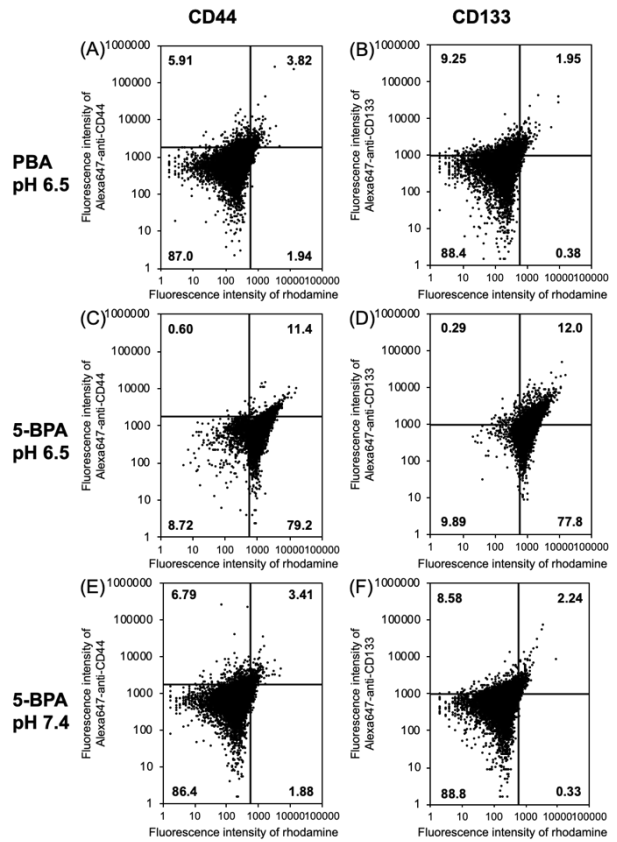


図 4 : CD44/CD133 陽性すい臓がん BxPC-3 細胞に対する PBA、5-BPA の取り込み。

**3. 考察及び今後の展望**

5-BPA を含む複素環式ボロン酸が芳香族窒素とシアル酸上のカルボキシル基との水素結合を介してシアル酸に強く結合するという独自の知見を基に、本研究では、標準的なボロン酸である PBA に比べて 5-BPA がすい臓がん細胞を pH 依存的に取り込まれ、さらに、複数のすい臓がん CSCs を同時に標的化できることを示した。これらの結果は、低酸素および酸性の腫瘍微小環境に存在する複数の CSCs の標的化におけるボロン酸リガンドの化学構造制御の重要性を明らかにし、難治性すい臓がんの治療を目指した有効なアクティブターゲティングシステムの開発をさらに促進するものである<sup>14</sup>。

**【参考文献】**

1. Battle, E.; Clevers, H., Cancer stem cells revisited. *Nat Med* 2017, 23 (10), 1124-1134.
2. Dean, M.; Fojo, T.; Bates, S., Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 2005, 5 (4), 275-84.
3. Swaminathan, S. K.; Roger, E.; Toti, U.; Niu, L.; Ohlfest, J. R.; Panyam, J., CD133-targeted paclitaxel



- delivery inhibits local tumor recurrence in a mouse model of breast cancer. *Journal of Controlled Release* 2013, 171 (3), 280-287.
4. Kim, W.-T.; Ryu, C. J., Cancer stem cell surface markers on normal stem cells. *BMB Rep* 2017, 50 (6), 285-298.
5. Djanashvili, K.; Frullano, L.; Peters, J. A., Molecular Recognition of Sialic Acid End Groups by Phenylboronates. *Chemistry – A European Journal* 2005, 11 (13), 4010-4018.
6. Peters, J. A., Interactions between boric acid derivatives and saccharides in aqueous media: Structures and stabilities of resulting esters. *Coordination Chemistry Reviews* 2014, 268, 1-22.
7. Uchimura, E.; Otsuka, H.; Okano, T.; Sakurai, Y.; Kataoka, K., Totally synthetic polymer with lectin-like function: Induction of killer cells by the copolymer of 3-acrylamidophenylboronic acid with N,N-dimethylacrylamide. *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 72 (3), 307-314.
8. Otsuka, H.; Uchimura, E.; Koshino, H.; Okano, T.; Kataoka, K., Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH. *J Am Chem Soc* 2003, 125 (12), 3493-502.
9. Matsumoto, A.; Stephenson-Brown, A. J.; Khan, T.; Miyazawa, T.; Cabral, H.; Kataoka, K.; Miyahara, Y., Heterocyclic boronic acids display sialic acid selective binding in a hypoxic tumor relevant acidic environment. *Chemical Science* 2017, 8 (9), 6165-6170.
10. Khan, T.; Igarashi, K.; Tanabe, A.; Miyazawa, T.; Fukushima, S.; Miura, Y.; Matsumoto, Y.; Yamasoba, T.; Matsumoto, A.; Cabral, H.; Kataoka, K., Structural Control of Boronic Acid Ligands Enhances Intratumoral Targeting of Sialic Acid To Eradicate Cancer Stem-like Cells. *ACS Applied Bio Materials* 2020, 3 (8), 5030-5039.
11. Li, C.; Lee, C. J.; Simeone, D. M., Identification of human pancreatic cancer stem cells. *Methods Mol Biol* 2009, 568, 161-73.
12. Maeda, S.; Shinci, H.; Kurahara, H.; Mataka, Y.; Maemura, K.; Sato, M.; Natsugoe, S.; Aikou, T.; Takao, S., CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008, 98 (8), 1389-1397.
13. Immervoll, H.; Hoem, D.; Sakariassen, P.; Steffensen, O. J.; Molven, A., Expression of the "stem cell marker" CD133 in pancreas and pancreatic ductal adenocarcinomas. *BMC Cancer* 2008, 8, 48.
14. Miyazaki, T.; Khan, T.; Tachihara, Y.; Itoh, M.; Miyazawa, T.; Suganami, T.; Miyahara, Y.; Cabral, H.; Matsumoto, A., Boronic Acid Ligands Can Target Multiple Subpopulations of Pancreatic Cancer Stem Cells via pH-Dependent Glycan-Terminal Sialic Acid Recognition. *ACS Applied Bio Materials* 2021, 4 (9), 6647-6651.

# Porous Microneedles filled with a Glucose-responsive Hydrogel for Self-Regulated Insulin Delivery

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

Barthelmes Kevin

## 1. Introduction

The microneedle (MN) array, a two-dimensional array has recently attracted increasing interest as minimally invasive tool for transdermal drug delivery. A MN patch, which contain sharp needles with length ranging from 25 to 2000  $\mu\text{m}$ , can penetrate skin to bypass the diffusion barrier of the stratum corneum, the outermost layer of skin, and transient microchannels without touching nerve fibers and blood vessels are formed. Therefore, macromolecules (e.g., vaccines or insulin) could be effectively transported across the skin barrier in a pain-free, risk-free and self-administered way.

### (1) Porous microneedles

Microneedles can be classified according to their morphology, and recently porous microneedles (PMN) became of interest as they are advantageous for fast liquid absorption and drug release. PMN containing a large network of interconnected pores, which enables efficient fluid transportation into and from inside the skin. They are, however, intrinsically fragile because of a large volume of the void, and usually hard materials, like metals or ceramics are used. Recently polymers have been applied as well and they possess several advantages e.g., good biocompatibility, increased permeability, tunable molecular weight, and facile fabrication processes like molding and UV-polymerization. Nonetheless, a sustain and long-term drug release through the microchannels of a PMN is still challenging. PMN pose the risk of breakage and leave the debris of needles underneath the skin and inflammation of the tissue can happen. Moreover, clogage of the pores by body fluid absorption could result in discontinuity of the drug flow.

### (2) Filling of pores

A denser network structure is one approach to increase the mechanical strength of PMNs; however, this usually result in less porosity and a reduced permeability of the material. On the other hand, increased permeability could be achieved by higher porosity resulting in a more fragile material.<sup>1</sup> One approach is to fill the interconnected pores with a hydrophilic and permeable polymer to further increase the mechanical stability.<sup>2</sup>

This new type of hybrid MNs structures could significantly improve the sustain and long-term drug release after skin penetration.

## 2. Results and discussion

At first PMN arrays consisting of a stable, non-biodegradable polymer material with high porosity (>50%) were produced and subsequently, the pores were filled by a glucose-responsive hydrogel.<sup>3</sup> The novel hybrid MNs were analyzed in vitro in terms of mechanical strength, skin punctuation and insulin release.

### (1) PES Microneedles

We have investigated polyether sulfone (PES) as a polymeric material for the PMN fabrication.<sup>4</sup> PDMS molds were filled with a PES solution in DMF and benzene was added on the backside of the solution. The benzene diffuses slowly into the solution and can interact with the aromatic rings of PES by pi stacking. The PES solution solidified overnight and was subsequently washed by methanol to remove the intercalated benzene (Figure 1A). By this method,  $\mu\text{m}$ -size pores (Figure 1B) remain in the polymer structure, whereby the PES and benzene concentration are crucial parameters for a good MN morphology (Figure 1C).

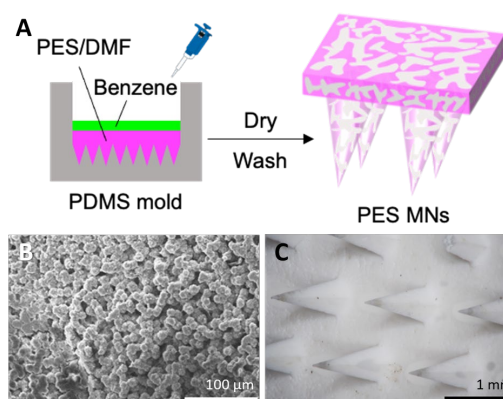


Figure 1: (A) Schematic representation of the PMN fabrication process. (B) Pore size characterized by SEM images. (C) Morphology of MNs characterized by optical microscopy.

Moreover, the porosity could be adjusted between 60-80% depending on the polymer concentration.

## (2) Hybrid Microneedles

Since PES is a hydrophobic polymer, plasma treatment and surface coating by poly(acrylic acids) was applied to facilitate pore filling process by the hydrophilic pre-gel solution (Figure 2). The pre-gel solution contains a mixture of various acrylate-based monomers, crosslinker and initiator in methanol and was added on the backside of the PES MNs. The solution was soaked in by capillary force and could be thermally polymerized afterwards (i.e., Gelation process).

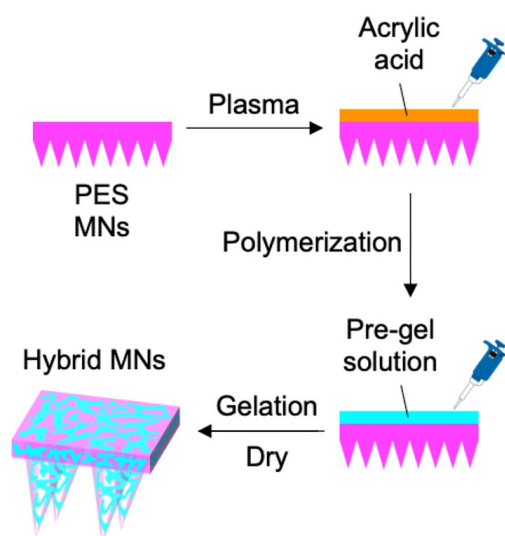


Figure 2: Schematic representation of the hybrid MN fabrication process.

The morphology of the novel hybrid MNs was confirmed by optical microscopy showing sharp and uniform needles (Figure 3A). The mechanical strength was investigated by shear stress-strain tests of a single microneedle. It was shown that the maximum stress in the PES MNs was significantly higher than the dry or wet MNs consisting of only hydrogel (i.e., naked MNs) (Figure 3B). Moreover, the mechanical strength increased from around 0.6 N (PES MNs) to 1 N (hybrid MNs) which clearly shows the reinforcement effect by the pore filling process.

The hybrid MNs were analyzed in vitro by skin punctation test. It was shown that the new material could efficiently penetrate the stratum corneum of mouse skin. A uniform microchannel formation was confirmed by trypan blue staining. The glucose-responsive insulin release was analyzed by immersing the hybrid MNs in a fluorescein isothiocyanate-labeled (FITC) insulin solution overnight, whereby the hydrogel absorbed the insulin. Subsequently, the insulin soaked MNs were immersed buffer solution with different amount of glucose. The hydrogel can interact with glucose and the resultant change in counterionic osmotic pressure translates into a change in the hydration state of the gel.

A localized dehydration of the gel surface occurs and forms a so-called “skin layer” which enables release of insulin from the gel. The released amount of FITC insulin in the buffer solution was estimated by fluorescence spectroscopy and it could be shown that the hybrid MNs still show the glucose concentration-dependent release profile (Figure 3D).

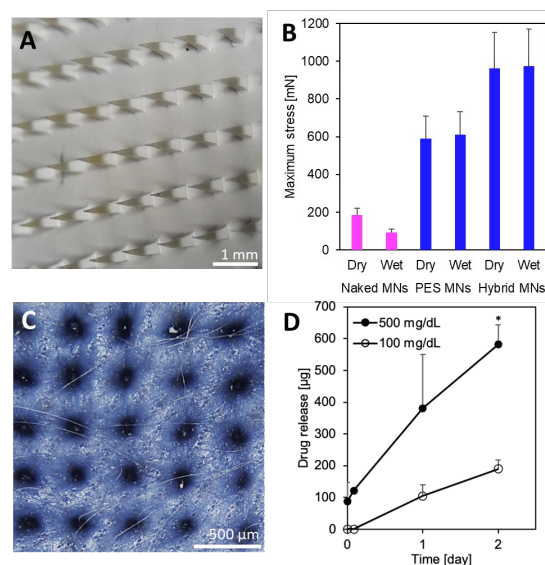


Figure 3: (A) Morphology of MNs characterized by optical microscopy. (B) Mechanical strength of MNs. (C) Trypan blue staining showing the formation of microchannels in mouse skin after MNs treatment. (D) Glucose-dependent FITC insulin release vs. time.

## 3. Conclusion and future plan

We could produce hybrid MNs comprising PES as a scaffolding polymer and a hydrogel as a permeable material. The combination of both materials further strengthened the stability of the microneedles and at the same time the drug release capability could be preserved. Nonetheless, a persistent diffusion-controlled insulin release remained challenging. Presumably surface detachment of PES and hydrogel caused small microchannels which result in leakage of the insulin soaked MNs. For this purpose, we are looking for other scaffolding materials which can interact with the hydrogel by covalent bonds.

## 【References】

1. H. Chang, M. Zheng, X. Yu, A. Than, R. Z. Seeni, R. Kang, J. Tian, D. P. Khanh, L. Liu, P. Chen, C. Xu, *Adv. Mater.*, **29**, 1702243 (2017).
2. S. Kusama, K. Sato, Y. Matsui, N. Kimura, H. Abe, S. Yoshida, M. Nishizawa, *Nat. Commun.*, **12**, 658 (2021).
3. S. Chen, H. Matsumoto, Y. Moro-oka, M. Tanaka, Y. Miyahara, T. Suganami, A. Matsumoto, *Adv. Funct. Mater.*, **29**, 1807369 (2019).
4. S. Samitsu, *Macromolecules*, **51**, 151-160 (2018).

## 業績

## 【原著論文】

1. Siyuan Chen (Takuya Miyazaki, Michiko Itoh, Hiroko Matsumoto, Yuki Morooka, Miyako Tanaka, Yuji Miyahara, Takayoshi Suganami, Akira Matsumoto), A porous reservoir-backed boronate gel microneedle for efficient skin penetration and sustained glucose-responsive insulin delivery" *Gels*, 8 (2), 74 (2022).
2. Hiroaki Hatano (Fanlu Meng, Momoko, Sakata, Akira Matsumoto, Kazuhiko Ishihara, Yuji Miyahara, Tatsuro Goda) Transepithelial Delivery of Insulin Conjugated with Phospholipid-Mimicking Polymers via Biomembrane Fusion-Mediated Transcellular Pathways, *Acta Biomaterialia*, accepted (2021).
3. Hideki Fujisaki (Aom Tongchatra, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara, Tatsuro Goda) In-situ chemical modification of printed conducting polymer films for specific glucose biosensing, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 349, 130829, (2021), [7.335]
4. Kazunori Igarashi (Horacio Cabral, Taehun Hong, Yasutaka Anraku, Fotios Mpekris, Triantafyllos Stylianopoulos, Thahomina Khan, Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba) Vascular Bursts Act as a Versatile Tumor Vessel Permeation Route for Blood-Borne Particles and Cells, *Small*, 17 2103751, (2021).
5. Miyuki Tabata (Chiho Kataoka-Hamai, Kozue Nogami, Daiju Tsuya, Tatsuro Goda, Akira Matsumoto, Yuji Miyahara) Organic and inorganic mixed phase modification of silver surface for functionalization with biomolecules and stabilization of electromotive force, *RSC Advances* (11) (2021).
6. Yoshioka N (Tanaka M, Ochi K, Watanabe A, Ono K, Sawada M, Ogi T, Itoh M, Ito A, Shiraki Y, Enomoto A, Ishigami M, Fujishiro M, Ogawa Y, Suganami T) The sodium-glucose cotransporter-2 inhibitor Tofogliflozin prevents the progression of nonalcoholic steatohepatitis-associated liver tumors in a novel murine model, *Biomed. Pharmacother.* (140), (2021).
7. Takuya Miyazaki (Thahomina Khan, Yoshihiro Tachihara, Michiko Itoh, Taiki Miyazawa, Takayoshi Suganami, Yuji Miyahara, Horacio Cabral, Akira Matsumoto) Boronic acid ligands can target multiple subpopulations of pancreatic cancer stem cells via pH-dependent glycan-terminal sialic acid recognition, *ACS Applied Bio Materials* (4, 9) (2021).
8. Taehun Hong (Takuya Miyazaki, Akira Matsumoto, Kyoko Koji, Yuji Miyahara, Yasutaka Anraku, Horacio Cabral) Phosphorylcholine-installed nanocarriers target pancreatic cancer cells through the phospholipid transfer protein, *ACS Biomaterials Science & Engineering* (7, 9) (2021).
9. Wenqian Yang (Takuya Miyazaki, Pengwen Chen, Taehun Hong, Mitsuru Naito, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Kazunori Kataoka, Kanjiro Miyata, Horacio Cabral) Block Cationer with Flexible Cationic Segment Enhances Complexation with siRNA and the Delivery Performance in Vitro, *Science and Technology of Advanced Materials* (2021).
10. Hiroko Oda (Takeshi Namagatsu, Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Takayuki Iriyama, Kei Kawana, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii) Thrombomodulin promotes Placental Function by Up-Regulating Placental Growth Factor via Inhibition of High-mobility-group box 1 and Hypoxia-inducible factor 1a, *Placenta* (111) (2021).
11. John D. Martin (Takuya Miyazaki, Horacio Cabral) Remodeling tumor micro-environment with nanomedicines, *WIREs Nanomedicine & Nanobiotechnology* (2021).
12. Hiroko Oda (Takeshi Namagatsu, Danny J. Schust, Horacio Cabral, Takuya Miyazaki, Keiichi Kumasawa, Takayuki Iriyama, Kei Kawana, Yutaka Osuga, Tomoyuki Fujii) Recombinant Thrombomodulin Attenuates Preecampic Symptoms by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 Mice, *Endocrinology* (162, 4), (2021).
13. Yukichi Horiguchi (Kevin Barthelmes, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto) pH-responsive Adsorption and Dissociation of Sialic Acid Expressed Protein on Boronic Acid Immobilized Surface, *Chem. Lett.* (50), (2021), [1.389]

14. Takuya Miyazaki, (Satoshi Uchida, Yuji Miyahara, Akira Matsumoto, Horacio Cabral)  
"Development of Flexible Polycation-Based mRNA Delivery Systems for In Vivo Applications",  
Mater. Proc., (4(1), 5) (2021).
15. 伊藤美智子、金井紗綾香、田村篤志、白川伊吹、金森耀平、田中都、松元亮、宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥  
マクロファージにおける脂質代謝障害に着目した NASH 発症機構の解明,  
日本内分泌学会雑誌, 97 (1), 282 (2021),
8. 伊藤美智子 (田村篤志、金井紗綾香、白川伊吹、田中都、金森耀平、小川佳宏、菅波孝祥) NASH 発症におけるマクロファージのコレステロール代謝障害と機能変容、  
第 94 回日本生化学会大会 (オンライン開催) 2021 年 11 月 3 日
9. 伊藤美智子 (小川佳宏、菅波孝祥) 死細胞を起点とする慢性炎症と非アルコール脂肪性肝炎、第 36 回日本糖尿病合併症学会 (オンライン開催) 2021 年 10 月 5 日
10. 伊藤美智子 (田中都、小川佳宏、菅波孝祥) NASH 発症における死細胞貪食・処理の病態生理的意義、日本 Cell Death 学会第 29 回学術集会 (オンライン開催) 2021 年 7 月 26 日
11. 伊藤美智子 (小川佳宏、菅波孝祥) NASH マウスモデルの確立を通じた病態解析・治療戦略開発への挑戦、第 64 回日本糖尿病学会学術集会、富山 (オンライン開催) 2021 年 5 月 20 日
12. 伊藤美智子 (金井紗綾香、田村篤志、白川伊吹、金森耀平、田中都、松元亮、宮原裕二、小川佳宏、菅波孝祥)  
マクロファージにおける脂質代謝障害に着目した NASH 発症機構の解明、第 94 回日本内分泌学会学術集会、(オンライン開催) 2021 年 4 月 22 日
13. 宮崎 拓也 (Barthelmes Kevin、池原 清、宮原 裕二、松元 亮)、力学的強度と薬剤放出能を両立させるスマートゲル内包多孔質マイクロニードルの設計と評価、第 33 回高分子ゲル研究討論会 (オンライン開催)、2022 年 1 月 21 日
14. 宮崎 拓也、炎症性サイトカインの安全性と有効性を高める pH 応答性プロドラッグの開発、第 28 回次世代医工学研究会、兵庫、2021 年 10 月 29 日
15. 松元 亮 (宮崎 拓也、Khan Thahomina、宮澤 大樹、Cabral Horacio、宮原 裕二)、ボロン酸を生体対話の基盤とした「はたらく高分子」、第 70 回高分子討論会 (オンライン開催)、2021 年 9 月 7 日
16. 松元 亮 (Chen Siyuan、宮崎 拓也、伊藤 美智子、Barthelmes Kevin、松本裕子、金井紗綾香、池原清、諸岡由佳、木村 真一郎、田中都、菅波孝祥、宮原裕二)、高分子ゲルの階層的エンジニアリングによる持続型マイクロニードルデバイスの開発、第 70 回高分子討論会 (オンライン開催)、2021 年 9 月 8 日
17. 宮崎拓也、妊娠期の化学療法に向けたナノ医薬の開発、Life Science Connect 2021 (オンライン開催)、2021 年 8 月 26 日

## 【総説】

1. 松元亮 (宮崎拓也、伊藤美智子、菅波孝祥、宮原裕二)  
ボロン酸ゲルを用いた糖尿病治療デバイスの社会実装、バイオマテリアル (2021).
2. Akira Matsumoto (Siyuan Chen)  
A boronate gel-based synthetic platform for closed-loop insulin delivery systems  
Polym. J. (53), (2021).

## 【口頭発表】

1. Akira Matsumoto, "Borono-lectin" based bioengineering, The  
8th Joint Symposium between IBB/TMDU and Chulalongkorn University on "Biomedical Materials and Engineering", January 25, 2022 (Online).
2. 松元亮、完全合成材料による「エレクトロニクスフリー」な人工臓腑の開発、令和 3 年度 生体医歯工学共同研究拠点 (第 1 期) 最終成果報告会、オンライン、2022 年 3 月 4 日
3. 松元亮、「貼るだけ人工臓腑」開発の最前線、東京都医工連携 HUB 機構 連携セミナー、2021 年 11 月 30 日
4. 松元亮、ボロノレクチンを駆使した次世代医工学、第 25 回次世代医工学研究会、2021 年 10 月 29 日
5. 松元亮、ボロン酸化学を駆使した医工学研究の最前線、高分子学会 2021 年度 Webinar (第 5 回)、2021 年 10 月 5 日
6. 松元亮、機能性高分子を応用した ドラッグデリバリーシステムの研究、MLS-IBB-DSC Collaborative Workshop、2021 年 8 月 17 日
7. 伊藤美智子 (松元亮)「貼るだけ人工臓腑」の開発、第 8 回 COINS シンポジウム (オンライン開催) 2022 年 1 月 21 日

- 18.宮崎拓也 (内田智士、カブラルオラシオ)、効率的な mRNA 送達に向けた柔軟性高分子の開発、第 31 回バイオ・高分子シンポジウム (オンライン開催)、2021 年 6 月 24 日
- 19.Wenqian Yang (Takuya Miyazaki, Pengwen Chen, Taehun Hong, Horacio Cabral), Influence of PEG-Polycation Chain Flexibility on the Assembly of siRNA into Polyion Complexes, The 12th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, July 6, 2021 (Online).
- 20.Taehun Hong (Takuya Miyazaki, Kazunori Igarashi, Pengwen Chen, Keita Masuda, Yasuhiro Nakagawa, Yu Matsumoto, Tatsuya Yamasoba, Horacio Cabral), Phosphorylcholine-installed polymers target pancreatic tumors through their exacerbated lipid metabolism, The 12th International Conference on the Science and Technology for Advanced Ceramics, July 6, 2021 (Online).

**【特許】**

- (1)国内特許出願 4 件
- (2)国際特許出願 1 件