

研究報告 2018 (KISTEC Annual Research Report, 2018)

【研究開発部】

戦略的研究シーズ育成事業

研究テーマ：「貼るだけ人工臓臓」の開発

◆総括・業績・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 213

研究代表者：東京医科歯科大学 松元 亮

「貼るだけ人工膵臓」の開発

研究代表者：東京医科歯科大学 松元 亮

【基本構想】

我々は、生体由来材料や機械（エレクトロニクス）を一切用いない水溶性高分子ゲルによる自律型のインスリン供給機構を実証している。グルコースと可逆的に結合するボロン酸を有する高分子ゲルネットワーク中に適当な割合で共有結合的に導入すると、グルコース濃度に応答した解離平衡シフトに伴うイオン浸透圧変化によるゲルの含水率変化が誘起される。これと同期してゲル表面に生成する「スキン層」と呼ばれる薄い脱水収縮層が、血糖値に応じたインスリン放出の制御機構として作用する。非天然分子であるが故の免疫毒性の回避、安定性（環境耐性、長期保存、滅菌処理耐性など）に加え、スキン層による拡散制御方式の特徴として、早い応答性（低血糖を避け正確な血糖値コントロールに有利）、表面局在性（ゲルの形状や大きさに依存しない投与量設定が可能）、静注針や埋め込みデバイスなどの既存技術との親和性が挙げられる。本研究では、マイクロニードル等の低侵襲皮下導入技術と融合し、丈夫で廉価、患者の使用負担を格段に軽減する「次世代型の人工膵臓」いわば「貼るだけ人工膵臓」の開発を目指す。今日、糖尿病は地球規模での健康に対する大きな脅威と認識されている。今後は先進国のみならず、中国、インド、アフリカ地域における患者数の爆発的増加が確実視されている。1型糖尿病患者を対象とするインスリンポンプの世界市場規模は、2010年時点では7.2億ドルであり、2017年には12億ドルに達する見込みである。2型糖尿病まで含めると2030年には4900億ドル（50兆円）まで拡大すると推定される（BCC・リサーチ、2010年）グローバルな巨大市場である。「貼るだけ人工膵臓」では、「アジア型」と呼ばれ日本人高齢者に多い2型糖尿病患者を当初のターゲットとしつつ、徐々に対象患者を拡大し、インスリン療法を必要とする全ての糖尿病患者を対象に獲得市場を拡大（1兆円規模）していくことを想定している。

1. 研究目的

Fig.1とFig.2に、「貼るだけ人工膵臓」デバイスの概念図と動作原理の模式図を示す。プロジェクト1年目となる平成29年度は、マイクロニードル融合型人工膵臓の設計と基本性能評価を実施した。具体的には、グルコース応答性ゲルと再生絹フィブローインとを融合した構造にフォーカスした。フィブローインは極めて優れた力学的特性、生体適合性および化学的に可変な生分解性を有し、手術糸や硬組織欠損部代替（埋め込み）材料として広く利用されている生体材料である。当該（ゲルとの）融合材料における化学構造の最適化、ミクロ相分離を制御した調製、内部ミクロ構造の制御、分解安定性、力学的特性、皮膚刺激性、血糖値変動に応答したインスリンリリース挙動、マウス皮膚への装着方法等について評価した。これらの検討を通じて、H30年度に本格的に着手する小・中動物での機能評価の準備を完了した。

2. 研究成果

(1) 再生絹フィブローイン融合型ハイブリッドゲルの調製条件の検討。

Fig.3に示すように、ゲルを構成する各モノマー、架橋剤、再生絹フィブローインの濃度、それらの混合比、溶媒、反応温度等を系統的に検討した。これらのパラメーターを最適化することで、均一でかつ再現性良く、ハイブリッド材料化するプロセスを開発した。Fig.4に各材料（ゲル単独、ハイブリッド材料、メタノール処理後のハイブリッド材料）



Fig. 1. Artificial on-skin pancreas this project aims to develop.

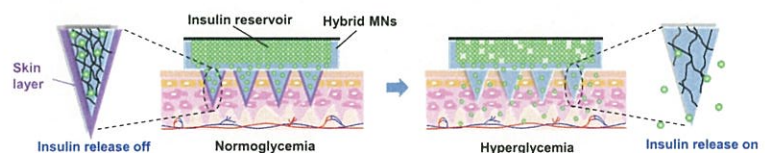


Fig.2. Schematic of glucose-responsive insulin release.

の断面 SEM 観察像を示す。ハイブリッド材料においては、多孔性でかつ連通孔様の微小構造が観測された。これは、選択した水-メタノール混合溶媒中において、ラジカル反

記入例：業績

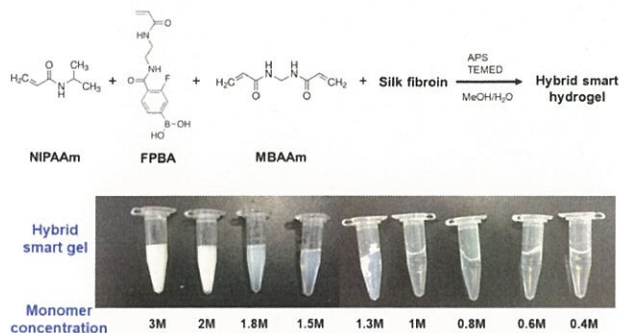


Fig. 3. Preparation of hybrid hydrogels.

応の進行に伴い誘起するミクロ相分離が寄与するものと考えられる（特願 2018-053817）。この特徴的なモフォロジーは（シルクのβシート結晶化を促進して強固な力学特性をもたらすために実施する）メタノール処理後も高度に保存された。当該連通孔様構造の獲得により、持続性の高いインスリン放出挙動（後述）が達成された。

Fig. 5 には、各材料形態の安定性（PBS 中、生理的条件下での分解性）評価の結果を示した。なお、本研究で指向する「貼るだけ人工臓器」の持続性としては 1 週間以上を目標としている。ゲル単独、ハイブリッド材料では、6 日間のインキュベーションによる質量損失がそれぞれ $12.4 \pm 6.4\%$ 、 $25.1 \pm 4.2\%$ であったのに対し、メタノール処理後のハイブリッド材料ではこれが 2%以下に抑制された。

(2) マイクロニードルの作製。

以上の検討結果を踏まえ、市販または共同研究先企業から提供されたシリコン製のモールドを用いたマイクロニードル作製を検討した。成形性と安定性（mechanical integrity）の観点から様々なプロトコルを検討した。その一例を Fig. 6 に示す。この例では、針の先端部（機能部位）のみを上記ハイブリッド材料により成形し、基底部分はシルクのみのもので構成としている。Fig. 7 には、機能部位の厚みを変えて調整したマイクロニードルの光学顕微鏡および共焦点顕微鏡画像を示す。さらに、Fig. 8 に示すように、蛍光修飾したインスリンをロードして蛍光顕微鏡により観察したところ、マイクロニードル構造全域にわたって均一にインスリンが分布する様子が確認された。Fig. 9 には、PBS 中で 7 日間インキュベートする前後でのマイクロニードル機能部位（先端微細

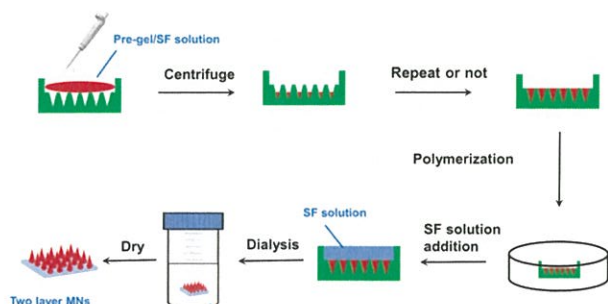


Fig. 6. Schematic of hybrid MNs fabrication using strategy 6 and APS/TEMED catalyzed polymerization.

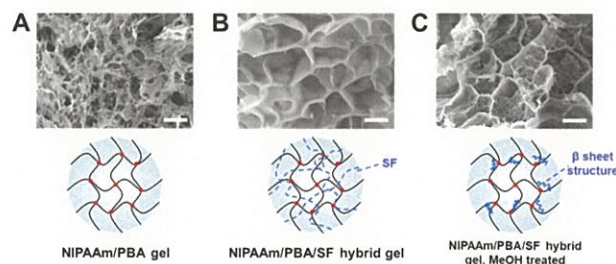


Fig. 4. SEM images of (A) hydrogel formed by NIPAAm/PBA, (B) hybrid hydrogel combining NIPAAm, PBA and SF, (C) hybrid hydrogel treated with MeOH. Scale bar: 20 μm.

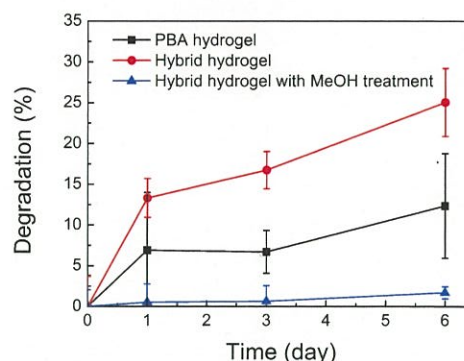


Fig. 5. Degradation study of PBA hydrogel, hybrid hydrogel and hybrid hydrogel treated with MeOH in pH 7.4 PBS at 37 °C.

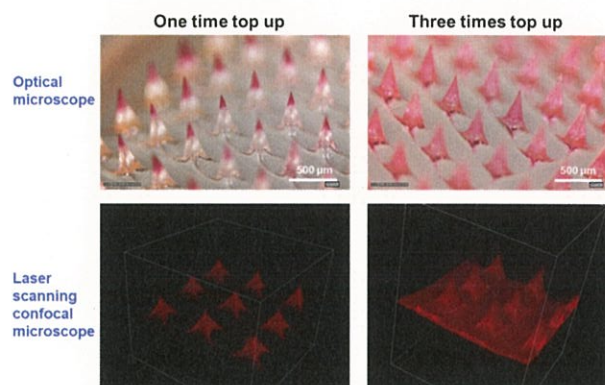


Fig. 7. Optical microscope and confocal microscope images of two layer MNs fabricated by strategy 6 and APS/TEMED catalyzed polymerization.

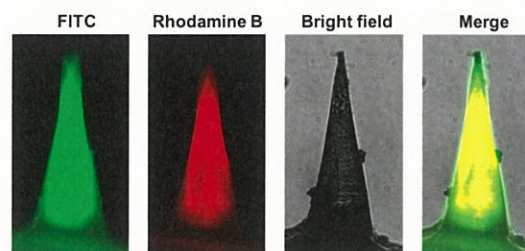


Fig. 8. Confocal microscope images of two layer MNs. Green: FITC-labelled bovine insulin, red: Rhodamine B chemically incorporated into gel.

記入例：業績

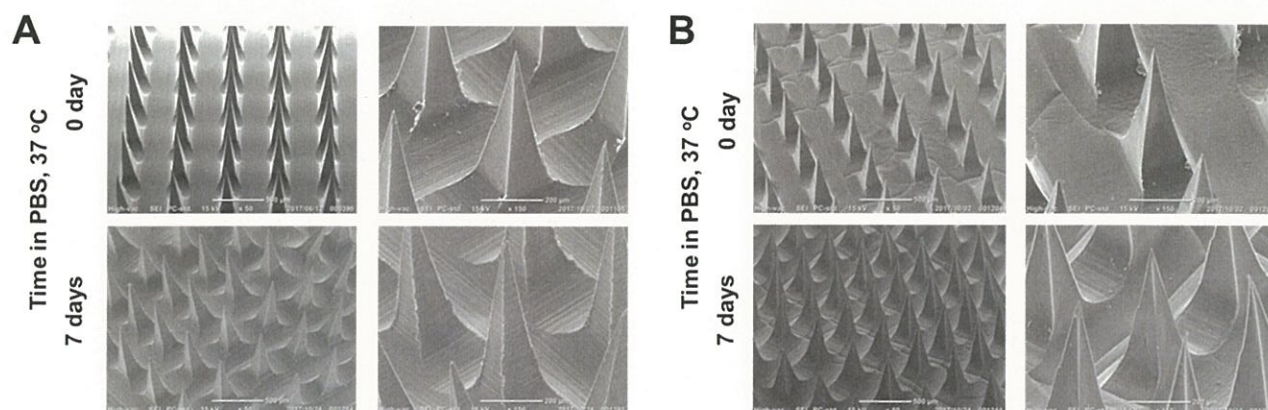


Fig. 9. SEM images of (A) pure SF MNs and (B) two layer hybrid MNs after incubation in PBS for 7 days at 37 °C.

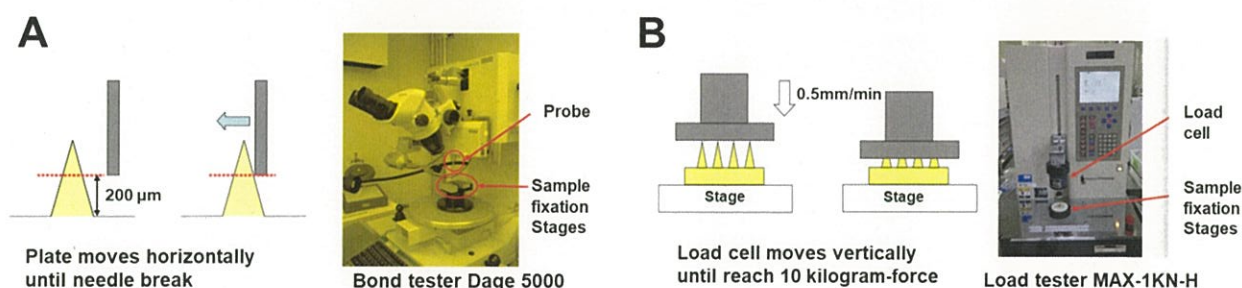


Fig. 10. Schematic of two mechanical strength test methods. (A) The plate moves horizontally until needle break. (B) Load cell moves vertically until reaching 10 kg force.

Table. 1. Mechanical strength of MNs tested by Method 1.

MNs	Mechanical strength (N/needle)
Pure SF MNs	0.94 ± 0.08
Hybrid MNs (monomer conc. 0.6M, 15% crosslinking)	0.72 ± 0.05

Table. 2. Mechanical strength of MNs tested by Method 2.

MNs	Mechanical strength (N/needle)
Pure SF MNs	0.685 ± 0.023
Hybrid MNs 0.6M monomer conc., 5% crosslinking	0.277 ± 0.037

構造)について、シルク単独でモールドしたものと比較した SEM 観測画像を示す。いずれの場合も質量損失が 1%以下に抑制され、高い安定性が確認された。Fig. 10 には、作製したマイクロニードルについて実施した力学的特性評価の方法、Table 1、2 にはその結果をまとめた。フィブローイン単独のもの比べて、ハイブリッドマイクロニードルでは、ポリマー濃度や架橋剤密度により多少の低下がみられるが、これらの値は典型的なマイクロニードル材料であるヒアルロン酸やポリ乳酸系材料と比べて 10 倍程度高いものである。Fig. 11 には、ブタ皮膚に対する刺入性試験の結果をまとめた。上記マイクロニードルの力学的特性と皮膚刺入性の間には相関性が知られており、我々が開発

したシルクハイブリッドマイクロニードルでは、その高い力学的特性を反映した優れた刺入性が確認された。なお、本実験は、マウスの皮膚試料や生体皮膚に対しても実施しており、いずれにおいても良好な刺入性が確認された。Fig. 12 には、作製したマイクロニードルの背面にインスリンリザーバーを搭載して実施したリリース実験結果の一例を示す。なお、この実験は、我々が以前に報告した高速液体クロマトグラフィー装置を用いる方法により実施した。Fig. 12 に観測されるように、人工的に与えられたグルコースのパターンを高度に追従したインスリン放出制御が達成された

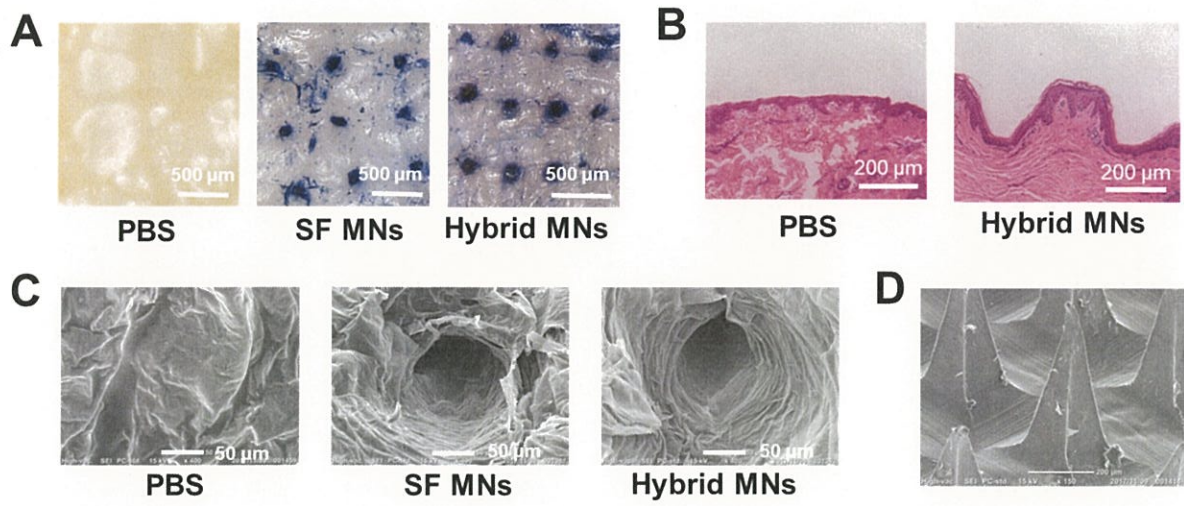


Fig. 11. Electrical microscope of porcine skin treated with PBS, SF MNs or hybrid MNs and stained with trypan blue to indicate the formation of micropores. (B) Cross-sectional image of H&E-stained porcine skin treated with PBS or hybrid MNs. (C) SEM image of porcine skin treated with PBS, SF MNs or hybrid MNs. (D) SEM image of hybrid MNs after skin insertion.

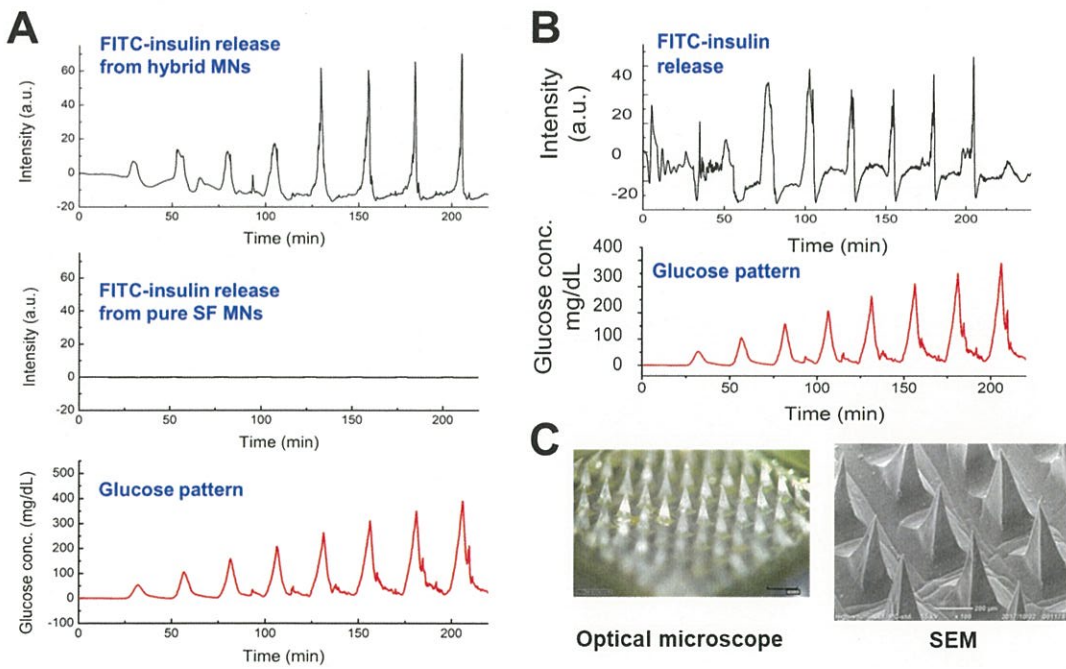


Fig. 12. In vitro glucose responsive release of MNs attached with reservoir at (A) 37 °C and (B) 32 °C. (C) Optical microscope and SEM images of hybrid MNs after in vitro release experiment.

業 績

【原著論文】

1. Akira Matsumoto, Miyako Tanaka, Hiroko Matsumoto, Kozue Ochi, Yuki Moro-oka, Hirohito Kuwata, Hironori Yamada, Ibuki Shirakawa, Taiki Miyazawa, Hitoshi Ishii, Kazunori Kataoka, Yoshihiro Ogawa, Yuji Miyahara, Takayoshi Suganami
Synthetic “smart-gel” provides glucose-responsive insulin delivery in diabetic mice
Sci. Adv. eaaq0723, 2017.
2. Akira Matsumoto, Yuji Miyahara
Borono-lectin" based Engineering as a Versatile Platform for Biomedical Applications
Sci. Technol. Adv. Mater. 19, 18-30, 2017

【総説】

1. 松元亮
困難な人工膵臓を実現した、研究者の好奇心とは
NHK 出版「今日の健康」2月号.

【口頭発表】

1. 田中 都 他、スマートインスリンデバイスによる新しい糖尿病治療戦略の開発、第 90 回日本糖尿病学会年次学術総会、2017.4.20-22.
2. 栗田博仁 他、エレクトロニクスフリーなスマートインスリンデバイスによる新規糖尿病治療戦略の開発、第 60 回日本糖尿病学会年次学術集会、2017.5.18-20.
3. 松元 亮、生体分子との相性が抜群な‘ボロン酸工学’の発展を目指して、第 10 回ナノバイオ若手ネットワークシンポジウム、2017.6.9-10.
4. 松元 亮 他、貼るだけ人工膵臓の開発、KISTEC 研究報告会、2017.7.18.
5. 松元 亮、菅波孝祥、糖応答性高分子ゲルによるインテリジェント型インスリンポンプの開発、第 6 回「産業基盤の創生」研究成果報告会、2017.8.08.
6. 松元 亮、スマートゲルと皮下挿入技術を融合した人工膵臓デバイスの検討、第 66 回高分子討論会、2017.9.20-22.
7. 田中 都 他、グルコース応答性ゲルを用いた自律的インスリンデバイスの開発、38 回日本肥満学会、2017.10.7-8.
8. 松元 亮、「貼るだけ人工膵臓の実用化を目指して」、Innovation Leaders Summit 2017、2017.10.25.
9. 松元 亮、「ボロノレクチン」を利用したバイオエンジニアリング、第 5 回レクチン利用技術研究会・ワークショップ、2018.1.15.
10. 松元 亮、Synthetic “smart-gel” based approach toward “electronics-free” artificial pancreas、The 11th international conference on advanced technologies and treatment for diabetes、2018.2.13-17.

11. 栗田博仁 他、グルコース応答性ゲルを用いたエレクトロニクスフリーな新規インスリンデバイスの開発、第 32 回日本糖尿病・肥満動物学会年次学術集会、2018.2.23-24.
12. 松元 亮、’ ’ ボロノレクチン’ ’ を基盤とする生態計測とドラッグデリバリーシステム、第 36 回機器分析講座高分子による生体関連センサーの開発と IoT 社会への展開、2018.3.2.
13. 菅波孝祥 他、スマートインスリンデバイスによる革新的な糖尿病治療機器の開発、生体医歯工学共同研究拠点研究成果報告会、2018.3.9.

【特許】

- (1) 国内特許出願 1 件
- (2) 国外特許出願 0 件

