

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト

リーダー 松元 亮

【基本構想】

糖尿病の治療においては、インスリン療法が重要な位置を占めているが、投与量調整の難しさ（長期的な血糖管理・低血糖の回避等）や煩雑さが問題となる。本プロジェクトは、高分子ゲルを応用した自律型のインスリン供給機構とマイクロニードル等の低侵襲な経皮的薬剤送達技術とを融合することで、より正確に、患者負担を抑え、かつ経済的なインスリン療法を実現する「貼るだけで自律型の次世代人工膵臓」を開発する。これにより、糖尿病のインスリン療法におけるアンメットメディカルニーズの克服を目指す。2023年3月、ニプロ社をPLとしてAMED（医工連携イノベーション）事業に採択された。提案内容は、「マイクロニードル+リザーバー+アプリケーション」ヒト用システムの開発とPOC確認のための探索的臨床試験の実施。3億円/3年間規模の予算のうち1/3をニプロ社が負担する内容である。ニプロ社の協力会社であるエムダップ社が本AMED事業から新たに参画し、プロジェクトプロジェクト開始に伴い、KISTEC等を含めた5者による共同研究契約を締結して推進中である。

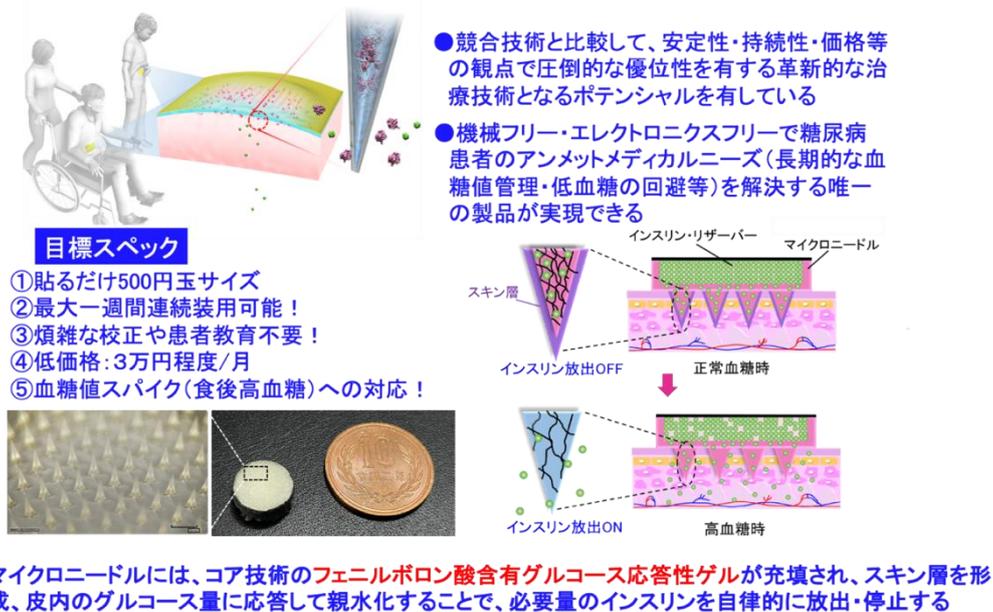


図1. 「貼るだけ人工膵臓」の製品イメージ

1. 2023年度の研究目的

①製造歩留まり向上の検討

共同研究先であるニプロ株式会社と共同で、量産開発へ向けた課題抽出と解決に取り組んでいる。現時点で歩留まりを支配する課題は、モールドからの離型時の変形や「針残り」である。これを解決するための離型剤およびその洗浄プロセスの最適化を進める。

②洗浄プロセスの高効率化のための検討

量産化へ向けた製造工程の課題として、洗浄プロセスを高効率化する必要がある。超音波洗浄プロセスの導入等を予定している。ニプロ社の協力会社にて取り組んだ実績があり、解決可能な範囲と考えられる。

2. 2023年度の研究成果

現在、エムダップ社と東京医科歯科大学を中心に試作開発に取り組んでいる。製造部分に関わるマイルストーンは「歩留まり向上へ向けた各プロ

セスの最適化」である。具体的には、1. プレゲル組成の最適化、2. 離型剤の最適化、3. 洗浄プロセスの高効率化の3項目であり、前者2項目についてはほぼ目処が立った。「3. 洗浄プロセスの高効率化」については、現在、東京医科歯科大学で評価を進めており、改善効果を示すデータが得られ始めている。

「1. プレゲル組成の最適化」について；

エムダップ側での歩留まり改善のため、モノマー濃度が比較的高い条件で検討を開始したが、それではインスリン放出速度が小さくなることが課題となった。低密度化を進める中で、モールドへの「針残り」が顕著となったが、光重合時のUV照射条件の変更や、シリコン系オイルによる離型剤を使用する事でこれを解決した。

図2に、離型剤及び引き剥がし条件の検討内容についてまとめた。プレゲル溶液が低硬度の状態で行き剥がしを行うため、離型性の向上を目的にシリコンオイルの塗布を検討した。PDMSモールドへ直接塗布した場合（案1）、針の先端にオイルが溜まり、成形不良になることが問題となった。案2では、先に金属オス型に塗布し、PDMS型へ転写させている。均一かつ薄膜コーティングが可能で、針先端へのオイル溜まりも回避されており、この方法を採用した。

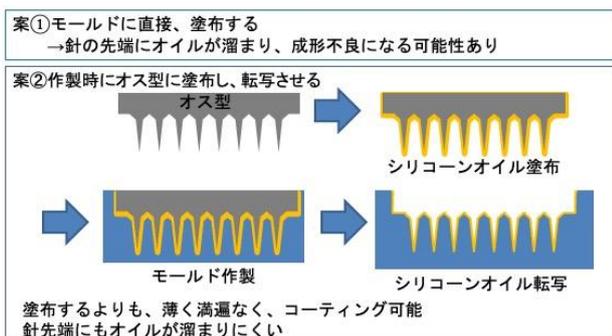


図2. 離型剤及び引き剥がし条件の検討。

針裏部分での欠陥発生の原因究明と対応

製造時歩留まり向上が依然課題である。一部のサンプルでは良好なインスリン放出がみられたが、リーケージ事象が頻発し、CTスキャンで確認する

と、針の裏側部分に多数の欠陥（気泡状の空洞形成）が生じていることが明らかになった。年度後半では、その詳細メカニズムの解明と改善プロセスを多岐に検討した。その結果、空洞・亀裂形成の原因を突き止めた。これに対し、対応するプロセスの検討を現在進めている。

マイクロニードルの穿刺性および皮膚炎症の評価

従来、皮膚への穿刺性や炎症評価は色素塗布による針穴の確認や組織学的評価が中心であったが、いずれも表皮を確実に穿破できているか確認することは容易ではなかった。そのため、経皮水分蒸散量（TEWL；transepidermal water loss）の Mexameter（Courage+Khazaka）を用いた皮膚色調評価の併用を試みた。Mexameterは異なる波長の光を照射し、その反射光の比率を測定することで、ヘモグロビン量を定量化できる。Oxazoloneを用いた接触性皮膚炎モデルを作成し、定量性を確認したところ、病変形成に伴って赤みの増強が認められた（図4）。皮膚炎によって上皮バリアが障害されるため、TEWLも並行して上昇した。次に、マイクロニードルをマウスの側腹部に1時間装着し、その前後のTEWLおよび赤みを測定した（図5）。マイクロニードルの刺入効率に応じてTEWLの増加が認められ、いずれも炎症性変化（赤み）は認められなかった。今後、マイクロニードルの仕様が決定次第、皮膚刺入性および炎症性変化の評価を進めていく。

接触性皮膚炎モデル

Oxazolone感作 → 0.1-0.5% oxazolone反復塗布

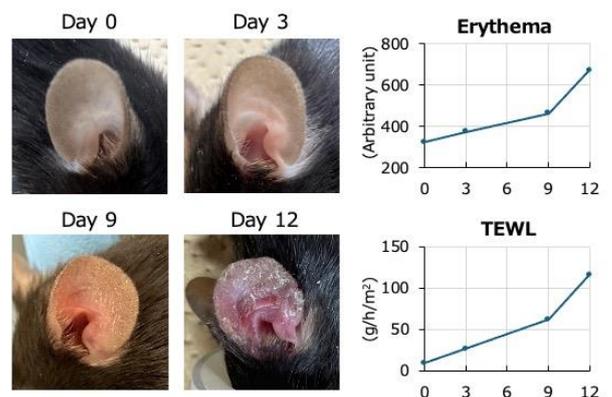


図 4. Mexameter を用いた皮膚炎症の評価.

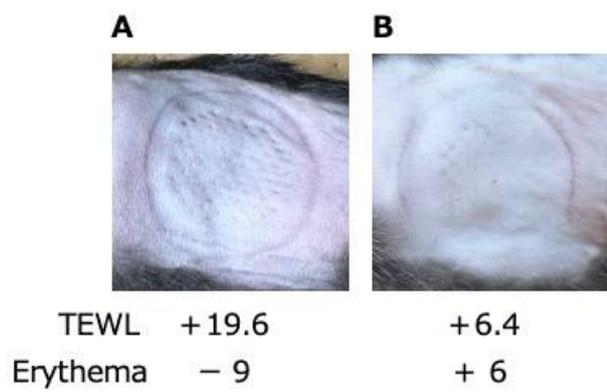


図 5. MN デバイスの皮膚穿刺性と炎症の評価.

マイクロニードルの生体応用に向けた安全性の確認

「貼るだけ人工膵臓」プロジェクト
伊藤 美智子

1. はじめに

本プロジェクトではグルコース応答性の高分子ゲルを用いてマイクロニードルを作成し、皮膚に留置することで血糖応答性にインスリンを供給する「貼るだけ人工膵臓」の開発に取り組んできた。本技術が確立されることによって、自律的なインスリン分泌による血糖コントロールが可能となるが、そのためには良好な皮膚刺入状態の維持による十分な有効面積の確保が必須となる。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。そのためには、高分子ゲルそのものの機能向上や構造的な強度の確保、生体において十分な血糖降下作用を得るためのスケールアップに加え、適切な機能・副作用の評価系が必要である。

2. 刺入性・皮膚炎症評価の問題点

マイクロニードルの刺入性評価には穿刺後の皮膚をトリパンブルーなどの色素で染色する方法が広く用いられているが、マイクロニードルを押し付けたことによる皮膚の陥凹と穿破を見分けることは困難である（図1A）。一方、病理組織学的評価ではHE染色などによって穿刺状態を確認することになるが（図1B）、皮膚は弾性に富む組織であるため、マイクロニードルを除去した際に穿刺によってできた皮膚の断裂が不明瞭になってしまう場

合がある（図1C）。また、固定標本をマイクロニードルの並びに合わせて薄切することは困難であり（図1D）、マイクロニードルデバイスとしての正確な穿刺効率を算出することは大きな困難を伴う。また、炎症を評価する方法として、皮膚反応をスコアリングして評価するシステム（表）や、皮膚組織への白血球浸潤を免疫染色で評価する方法が考えられるが、検出感度や定量性に問題がある。デバイスとしての機能を評価する場合、個々の穿刺部位のみだけでなく、マイクロニードルの本数や長さの違いがもたらす皮膚への影響を「面」として捉え、高感度かつ定量的に評価する必要があると考えられる。

紅斑及び痂皮の形成	
紅斑なし	0
非常に軽度の紅斑（かろうじて識別できる）	1
はっきりした紅斑	2
中等度ないし高度紅斑	3
高度紅斑からわずかな痂皮の形成（深部損傷まで）	4
【最高点4点】	
浮腫の形成	
浮腫なし	0
非常に軽度の浮腫（かろうじて識別できる）	1
軽度浮腫（はっきりした膨隆による明確な縁が識別できる）	2
中等度浮腫（約1mmの膨隆）	3
高度浮腫（1mm以上の膨隆と暴露範囲を超えた広がり）	4
【最高点4点】	
【紅斑・痂皮及び浮腫の合計点数の最高点8点】	

表. 皮膚反応の評価付けシステム

3. 実験と結果

昨年度までに、角質や上皮のバリア機能を反映する指標として経皮水分蒸散量（TEWL：trans epidermal water loss）計（Courage+Khazaka, Germany）を用いてマイクロニードル穿刺性の評価を試みてきた^{1,2)}。TEWLは正常な皮膚において10-20 g/m²/h程度が基礎値となるが、炎症や物理的な障害に伴うバリア機能低下に伴って、水分蒸散量が増加することを利用している。一方、皮膚に異なる波長の光を照射し、反射の程度によってヘモグロビン量を定量化する Mexameter（Courage+Khazaka, Germany）は皮膚の紅斑（赤み）インデックスを測定することができる³⁾。この2つを組み合わせることでマイクロニードルによる皮膚穿刺性と炎症性変化の定量化に取り組んだ。

まず、皮膚炎のポジティブコントロールとしてオキサゾロン反復塗布によるアレルギー性皮膚炎モデルを作成した。背部に5%オキサゾロンを塗布して感作し、5日後から耳介に0.5%オキサゾロンを隔日で塗布した。耳介へのオキサゾロン塗布前から経時的に耳介皮膚の紅斑イン

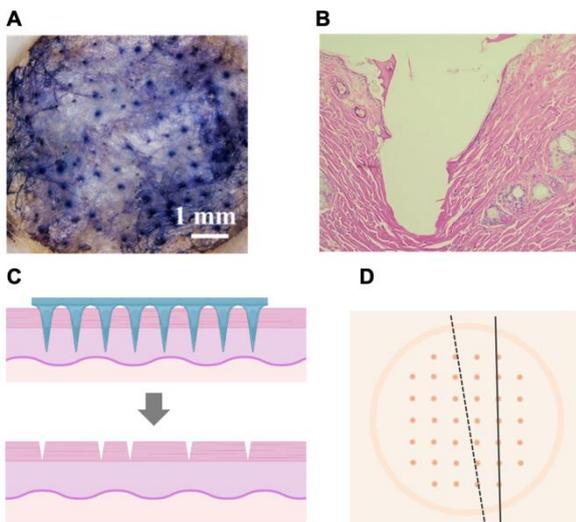


図1. 皮膚の穿刺性評価

A. トリパンブルー染色による穿刺の評価。B. 皮膚のHE染色。C. サンプル採取に伴う穿刺部の変化。D. 薄切方向によって穿刺部位の検出効率。実線、点線の切れ方によって穿刺効率は異なって見える。

デックスおよび TEWL を測定したところ、肉眼的な変化の乏しい3日から軽度紅斑インデックスの上昇と ($p = 0.06$)、TEWL の優位な上昇が認められた (図2)。その後、肉眼的所見と一致して紅斑インデックスの増加と TEWL のさらなる増加が確認できた (図2)。

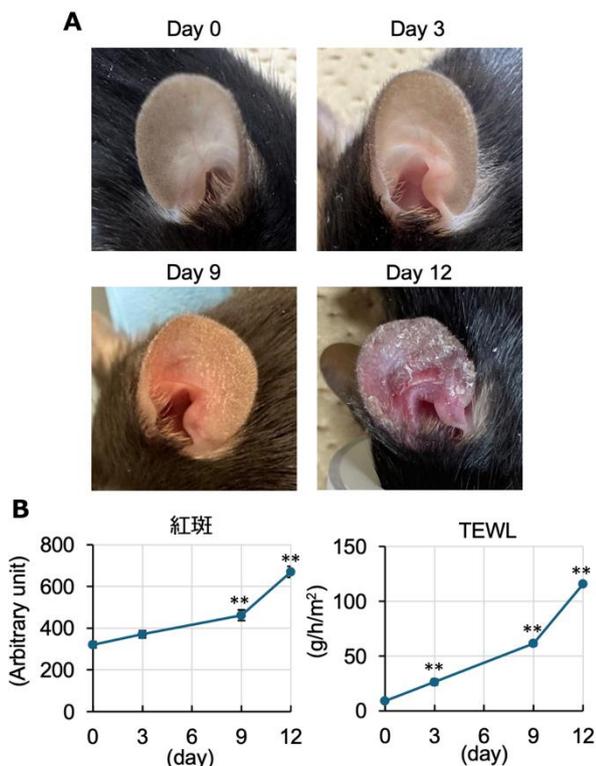


図2. Mexameter・TEWL計を用いた皮膚炎症の評価
 A. マウスの耳介に0.1-0.5% オキサゾン反復投与し、経時的に観察した際の肉眼所見。B. Mexameterを用いた皮膚の発赤および、TEWLの経時変化。** $P < 0.01$ vs. day 0, $n = 4$ 。

次に、マイクロニードルの刺入性および炎症性変化を評価するため、マウスの側腹部を剃毛し、マイクロニードルを1時間貼付した。その前後で Mexameter および TEWL 計を用いてそれぞれの変化量を評価したところ、穿刺痕の数に応じて TEWL の増加が認められた (図3)。一方、紅斑インデックスの増加は認められず、この観察期間では穿刺あるいはマイクロニードルの接触による炎症性変化はないと考えられた。

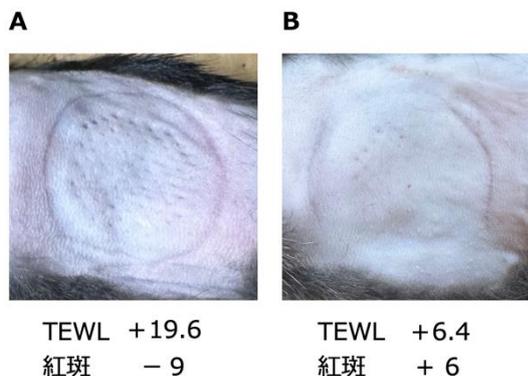


図3. MNデバイスの皮膚穿刺性と炎症の評価
 穿刺痕の多い個体 (A) と少ない個体 (B)

4. 考察および今後の展望

本年度の検討から皮膚の炎症が起きている際には角質のバリアが障害されているため、紅斑インデックスとともに TEWL の増加が高感度かつ定量的に評価できることが明らかになった。マイクロニードルの皮膚に対する影響を考える上では、紅斑インデックスの増加を伴わず、TEWL が十分に増加することが望ましいと考えられる。現在、マイクロニードルの構造およびアプリケーターの開発、固定方法などが検討段階にあるため、今回は試作品を用いて1時間の留置で検討した。今後は針の長さによる TEWL 変化量の比較、日から週でデバイスを留置した際の炎症性変化、デバイスを除去した後の刺入痕の回復過程などを評価していく予定である。

【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.
- Matias AR, Ferreira M, Costa P, Neto P. Skin colour, skin redness and melanin biometric measurements: comparison study between Antera 3D, Mexameter and Colorimeter. *Skin Res Technol* 21: 346-362, 2015.

業績

【原著論文】

1. Wenqian Yang, Takuya Miyazaki, Yasuhiro Nakagawa, Eger Boonstra, Keita Masuda, Yuki Nakashima, Pengwen Chen, Lucas Mixich, Kevin Barthelmes, Akira Matsumoto, Peng Mi, Satoshi Uchida & Horacio Cabral (2023) Block cationomers with flanking hydrolyzable tyrosinate groups enhance in vivo mRNA delivery via π - π stacking-assisted micellar assembly, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 24, 1, DOI: [10.1080/14686996.2023.2170164](https://doi.org/10.1080/14686996.2023.2170164) [IF 7.662]
2. Michiko Itoh, Atsushi Tamura, Sayaka Kanai, Miyako Tanaka, Yohei Kanamori, Ibuki Shirakawa, Ayaka Ito, Yasuyoshi Oka, Isao Hidaka, Taro Takami, Yasushi Honda, Mitsuyo Maeda, Yasuyuki Saito, Yoji Murata, Takashi Matozaki, Atsushi Nakajima, Yosky Kataoka, Tomoo Ogi, Yoshihiro Ogawa, Takayoshi Suganami. (2023) Lysosomal cholesterol overload in macrophages promotes liver fibrosis in a mouse model of NASH. *J. Exp. Med.* 220(11), e20220681, DOI: 10.1084/jem.20220681 [IF 17.579]
3. Hatano M, Akiyama Y, Shimada S, Yagi K, Akahoshi K, Itoh M, Tanabe M, Ogawa Y, Tanaka S (2023) Loss of KDM6B epigenetically confers resistance to lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease-related HCC, *Hepatol. Commun.* 7: e0277, Doi: 10.1097/HC9.000000000000277 [IF 5.703]
4. Barthelmes, K.; Sathitaphiwan, K.; Janwimaluang, N.; Ikehara, K.; Matsumoto, A., Increased mechanical stability and permeability by filling the interconnected pores of porous microneedles, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2024, 63(2). [IF 1.5]

【総説】

1. ボロン酸高分子ネットワークバイオ材料の設計と医療応用 (Design and medical application of boronic acid polymer network biomaterials) 松元 亮., ネットワークポリマー論文集 (*Network Polymer Papers*) 2024, 45(1), 44-54.
2. "Borono-lectin"-mediated Crosstalk and Its Application to Bioengineering, Matsumoto, A., *Yakugaku Zasshi-J. Pharm. Soc. Jpn.* 2023, 143(5), 435-441.
3. 'ボロノレクチン'を応用した糖鎖シアル酸検出と腫瘍ターゲティング (Sugar chain sialic acid detection and tumor targeting using 'boronorectin'), 松元 亮. *バイオマテリアル (Journal of Japanese Society for Biomaterials)* 2023, 42(1), 92-93.

【書籍】

1. 菅波孝祥、田中都、伊藤美智子 編、実験医学別冊「もっとよくわかる！線維化と疾患」2023年9月20日発行

2. Wearable Artificial Pancreas Device Technology

Matsumoto, A.
Wearable Biosensing in Medicine and Healthcare 2024, 249-266 (Springer).

【口頭発表】

1. Akira Matsumoto, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS", Seminar at Dept. of Chemical Eng. & Biotechnology, Taipei-TECH, March 13, 2024, Taipei, Taiwan
2. Akira Matsumoto, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS" Seminar at Institute of Biomedical Sciences, Academia Sinica, March 14, 2024, Taipei, Taiwan
3. Akira Matsumoto, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS" Seminar at Graduate Institute of Biomedical Engineering, Chang Gung University, March 15, 2024, Taipei, Taiwan
4. Akira Matsumoto, "Borono-lectin-inspired chemistry platform for bio-interactive DDS" The 10th Joint Symposium between IBB/TMDU and Chulalongkorn University on Biomedical Materials and Engineering, January 19, 2024, Bangkok, Thailand
5. Akira Matsumoto, "Borono-lectin"-inspired platform for bio-interactive material designs" 3rd International Symposium on Design & Engineering by Joint Inverse Innovation for Materials Architecture (DEJ2MA-3), October 20, 2023, International Conference Center/WASEDA
6. Akira Matsumoto, "Borono-lectin"-inspired bioengineering for bio-interactive applications" John S. Fossey Memorial Symposium, April 1, 2023, Birmingham University, UK
7. Akira Matsumoto, "Borono-lectin"-inspired bioengineering for bio-interactive applications" Institute colloquium, February 22, 2023, Friedrich Schiller University Jena, Germany
8. Kevin Barthelmes, Kittipat Sathitaphiwan, Nuttawut Janwimaluang, Kiyoshi Ikehara, Akira Matsumoto, "Increased Mechanical Stability by Filling the Interconnected Pores of Porous Microneedles" 36th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2023), November 15, 2023, Keio Plaza Hotel, Sapporo
9. 松元 亮, "Designer Lectins -設定自在な'ボロノレクチン'で愉しむ高分子バイオエンジニアリング-" 神戸大学大学院医学研究科医療創成工学専攻と生材研との合同セミナー, 2023年11月16日, 神戸大学大学院医

学研究科医療創成工学専攻

10. 松元 亮, Kevin Barthelmes, 柳沼 慶一郎, “実用化実証事業「貼るだけ人工臓腑」プロジェクト”

KISTEC Innovation Hub 2023, 2023年11月16日, オンライン

11. 松元 亮, “ボロノレクチンで展開する生体対話型バイオエンジニアリング”

第45回日本バイオマテリアル学会大会 MEET THE DOCTORS: 画期的モダリティ・新時代医療機器, 2023年11月7日, 神戸国際会議場

12. 松元 亮, “ボロノレクチン’工学—「貼るだけ技術」への展開—”

文部科学省と国立大学附置研究所・センター 個別定例ランチミーティング, 2023年10月20日, オンライン

13. 松元亮

ボロン酸の分子認識を駆使した DDS

39回日本 DDS 学会学術集会シンポジウム3『新素材で拓くスマート DDS』

2023年7月27日

幕張メッセ国際会議場

14. 松元亮

Designer Lectins -設定自在な“ボロノレクチン”で愉しむ高分子バイオエンジニアリング-

第25回高分子ゲル研究会講座

2023年9月7日

メニコンシアターAoi

15. 柳沼 慶一郎, Kevin Barthelmes, 片島 拓弥, 松元 亮, “ボロン酸含有保護基を応用した新規開裂反応系の開拓とハイドロゲルへの応用”

第45回日本バイオマテリアル学会大会, 2023年11月7日, 神戸国際会議場

16. 松元 亮, Kevin Barthelmes, 柳沼 慶一郎, “ボロン酸含有保護基を応用した環境応答的な開裂反応化学の開拓とSDGs ゲルサイエンスへの展開”

第72回高分子討論会, 2023年9月28日, 香川大学 幸町キャンパス

17. 伊藤美智子

NASH 病態形成における脂肪毒性の理解と医学応用

第9回肝臓と糖尿病・代謝研究会

2023年5月13日

鹿児島城山ホテル

18. 伊藤美智子

NASH におけるマクロファージの脂質代謝変容とリソソームストレス

第96回日本生化学会大会

2023年11月2日

福岡国際会議場

19. 伊藤美智子

胞死を起点とする NASH の病態理解と医学応用—医工連携を通して—

第44回日本肥満学会

2023年11月26日

仙台国際センター

【特許】

(1)国内特許出願 2件

1. 特願 2023-076968

出願日: 2023/5/8

発明の名称: ジオキサザボロカン誘導体

発明者: 松元亮、バーテルメス ケヴィン

出願人: KISTEC (50%)、国立大学法人東京医科歯科大学 (50%)

2. 特願 2023-085727

出願日: 2023/5/24

発明の名称: マイクロニードルの製造方法

発明者: 松元亮、バーテルメス ケヴィン、松本裕子

出願人: KISTEC (80%)、国立大学法人東京医科歯科大学 (20%)

(2)国際特許出願 1件

3. PCT/JP2024/002308

出願日: 2024/1/25

発明の名称: 糖応答性ゲル

発明者: 松元亮、伊藤美智子、松本裕子、金井紗綾香

出願人: KISTEC (85%)、国立大学法人東京医科歯科大学 (15%)