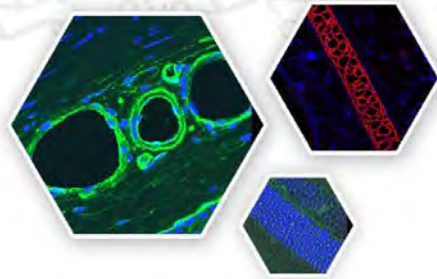


Glycoforum

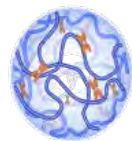
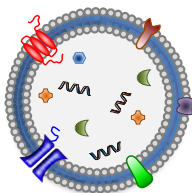
Glycoscience for human well-being



バイオ医療応用に向けた ナノゲル工学とエクソソーム工学

京都大学大学院
工学研究科高分子化学専攻

秋吉 一成



Akiyoshi ERATO
Bionanotransporter

Outline

1. 多糖ナノゲル工学

ナノゲルとは

自己組織化多糖ナノゲルの開発と機能

医療応用

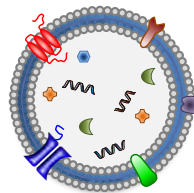
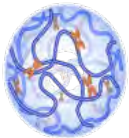
免疫療法(がんワクチン、経鼻ワクチン)、再生医療

2. エクソソーム工学

細胞外小胞 エクソソームとは

エクソソームの機能

エクソソームと糖鎖

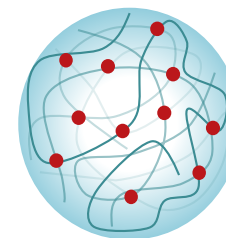




高分子ナノゲル

ナノメーターサイズのゲル微粒子

- 表面の特性 + 3次元網目内部への物質の取り込みと放出
- 相転移を利用した膨潤-収縮制御(刺激応答性)

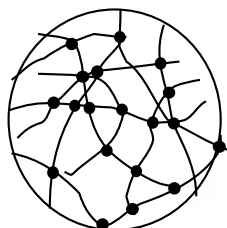


Definition of nanogel:
Pure Appl. Chem., 2007

化学架橋ナノゲル

● : 架橋点

架橋点が共有結合



架橋剤存在下
エマルジョン重合

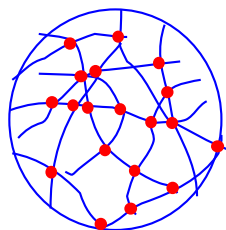
Nanogels and microgels: The new polymeric materials playground

N. B. Graham, A. Cameron,
Pure. & Appl. Chem., 70, 1271-(1998)

物理架橋ナノゲル

● : 架橋点

架橋点が疎水的会合力などの
分子間力により形成



会合性高分子により
自発的に形成

自己組織化ナノゲル

K. Akiyoshi, et al., *Macromolecules*, 26, 3062(1993),
Macromolecules, 30, 857(1997)

論文数

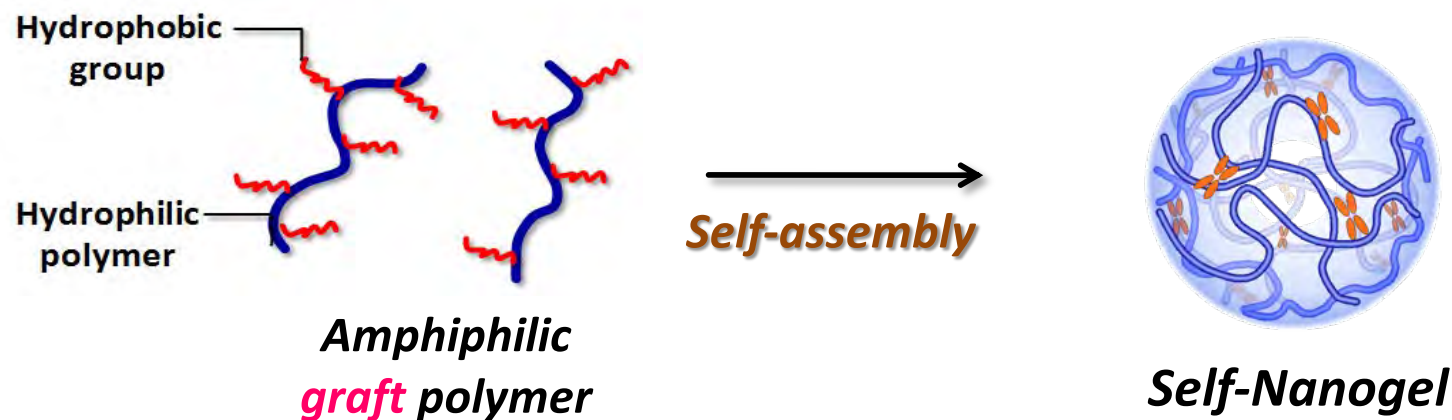
検索ワード“nanogel”によりヒットする論文数
(ISI Web of Scienceによる)





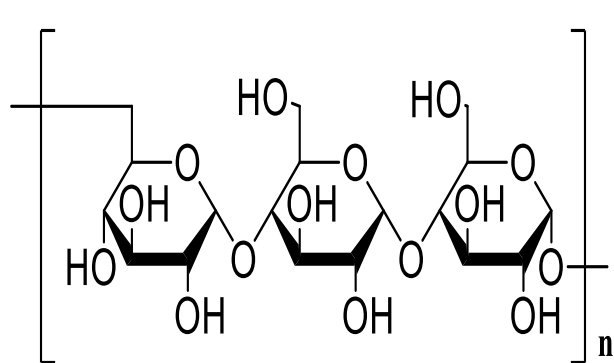
自己組織化ナノゲルの発見: Self-assembled Nanogels

会合性高分子の自己組織化研究から
物理架橋ナノゲルの発見





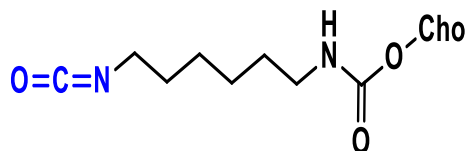
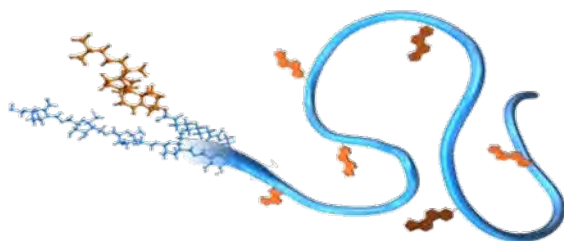
疎水化多糖 (グラフト型両親媒性高分子)



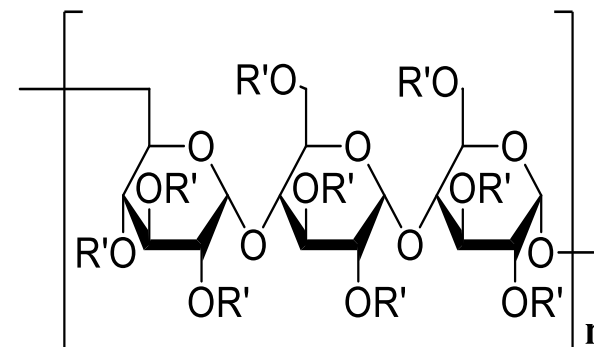
Pullulan

Mw 50,000, 100,000

Fungal polysaccharide
consisting of maltotriose units,
 α -1,4- ; α -1,6-glucan



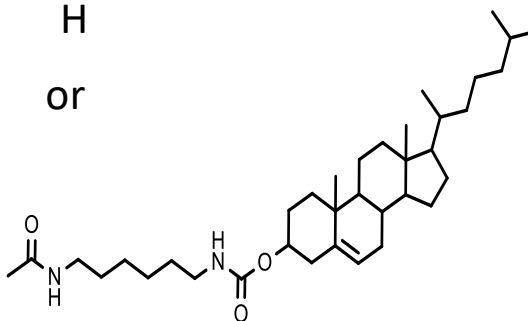
Cholesteryl isocyanate



CHP

1-3 cholestery group
per 100 glucose units

R' = H
or



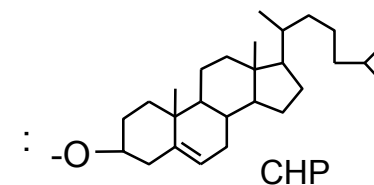
R = $\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCO-R}'$

R' : $-\text{OC}_{12}\text{H}_{25}$; C12P

: $-\text{OC}_{16}\text{H}_{33}$; C16P

: $-\text{OC}_{20}\text{H}_{41}$; C20P

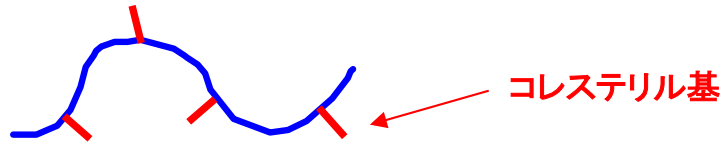
: $-\text{OCH}(\text{CHO C}_{12}\text{H}_{25})_2$; 2C12P



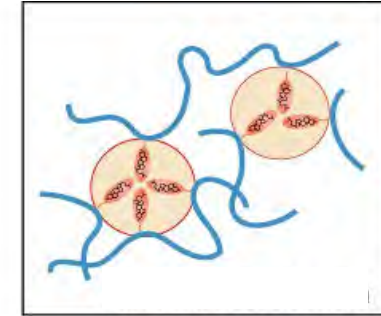


ナノゲルのキャラクタリゼーション

CHP-55-1.1 (分子量5.5万のプルランにコレステロール基1.1個置換/100単糖)

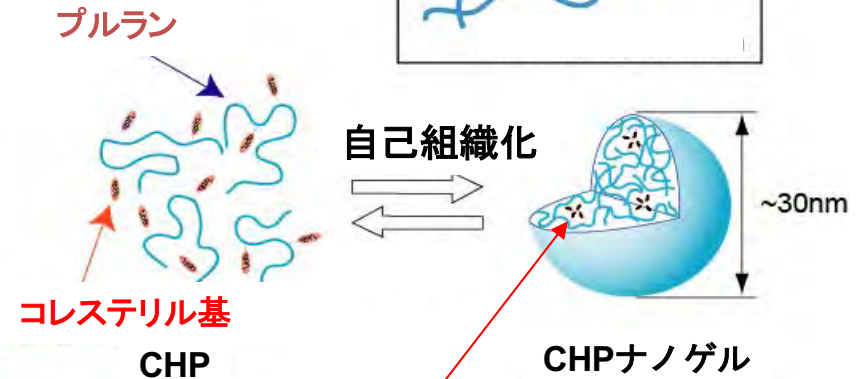
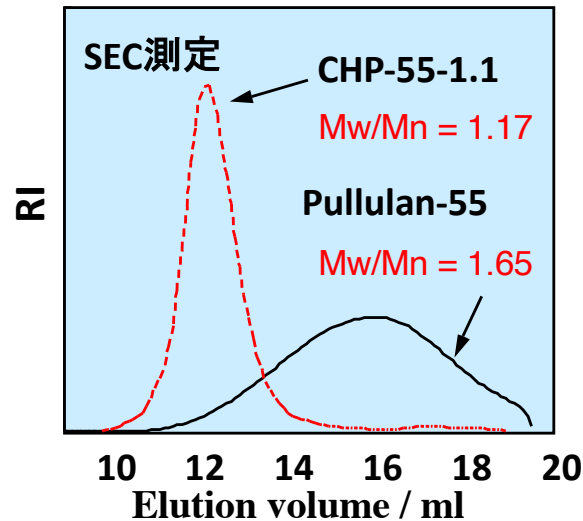


コレステリル基同士
の疎水性相互作用
糖鎖の立体障害で
会合数が制限



サンプル調製法
(5mg/mL 以下の
希薄水溶液系)

- 1.懸濁一超音波処理法
- 2.DMSO溶液一水透析法



希薄水溶液中でユニモーダルで安定な会合体の形成!

微粒子の半径(DLS) $R_H = 11.6 \text{ nm}$
 微粒子の分子量(SLS) $M_w = 62 \text{ 万}$ **会合数11**

ひとつの微粒子密度 Φ_H
 $\Phi_H = M_w / N_A (4/3\pi R_H^3)^{-1}$
 80-90wt% 水
 10-20wt% 多糖 \rightarrow **ヒドロゲル**

ゲル架橋点：疎水基の会合領域

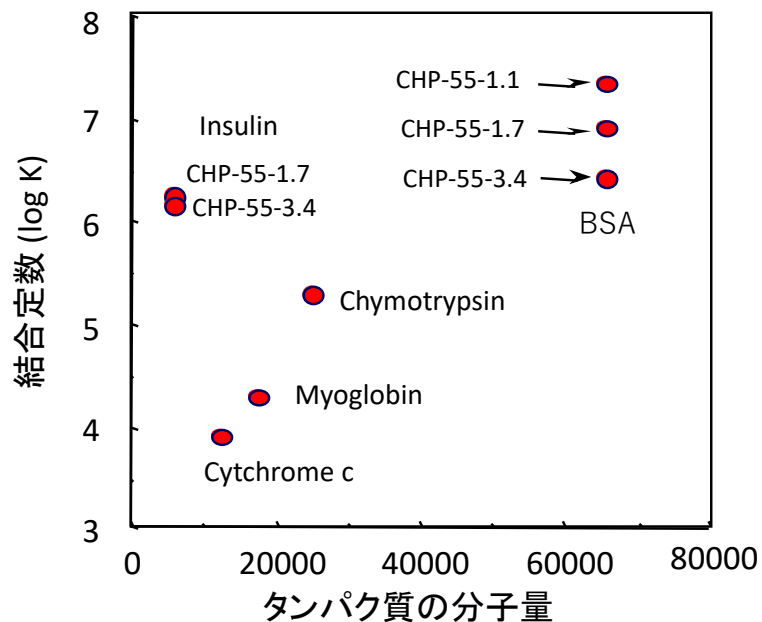
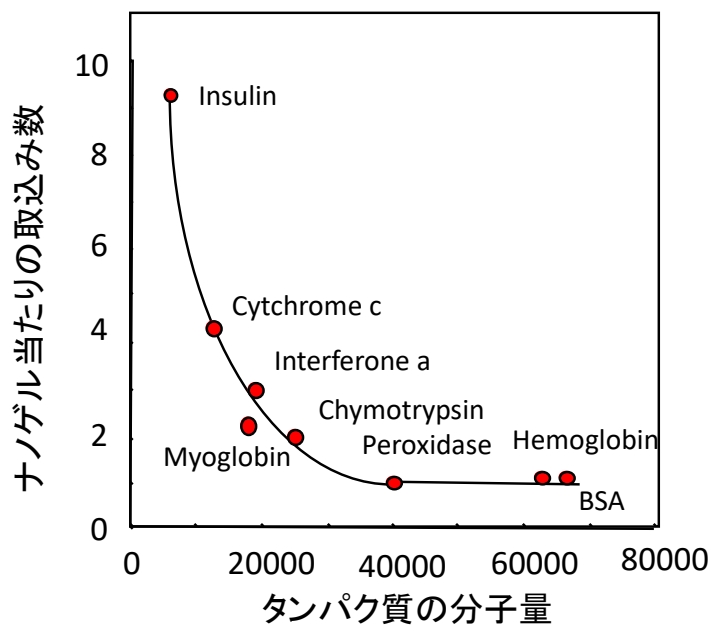
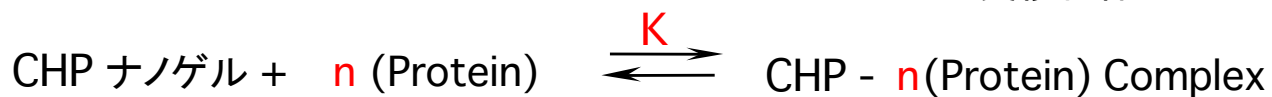
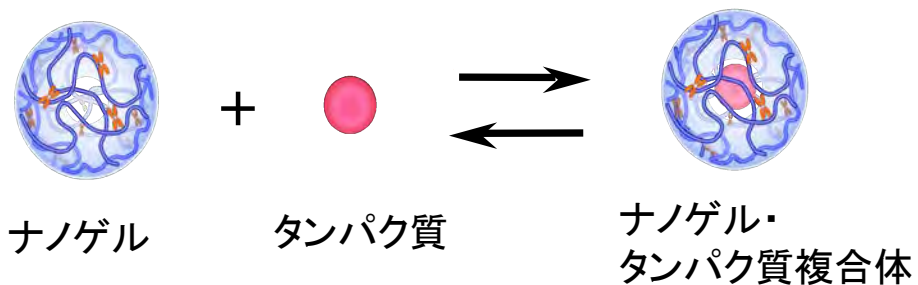
コレステロール基の会合数 **- 4個**
(蛍光プローブ法)

微粒子中の全コレステロール数 40個
コレステロールの会合ドメインの数
(架橋点の数) **- 10個**

疎水化多糖の自己会合により、疎水基の会合領域を架橋点とするゲル構造を有するサイズの揃ったナノサイズのゲルが形成することを世界に先駆けて発見



ナノゲルとタンパク質の相互作用: -高分子のホスト-ゲスト相互作用-





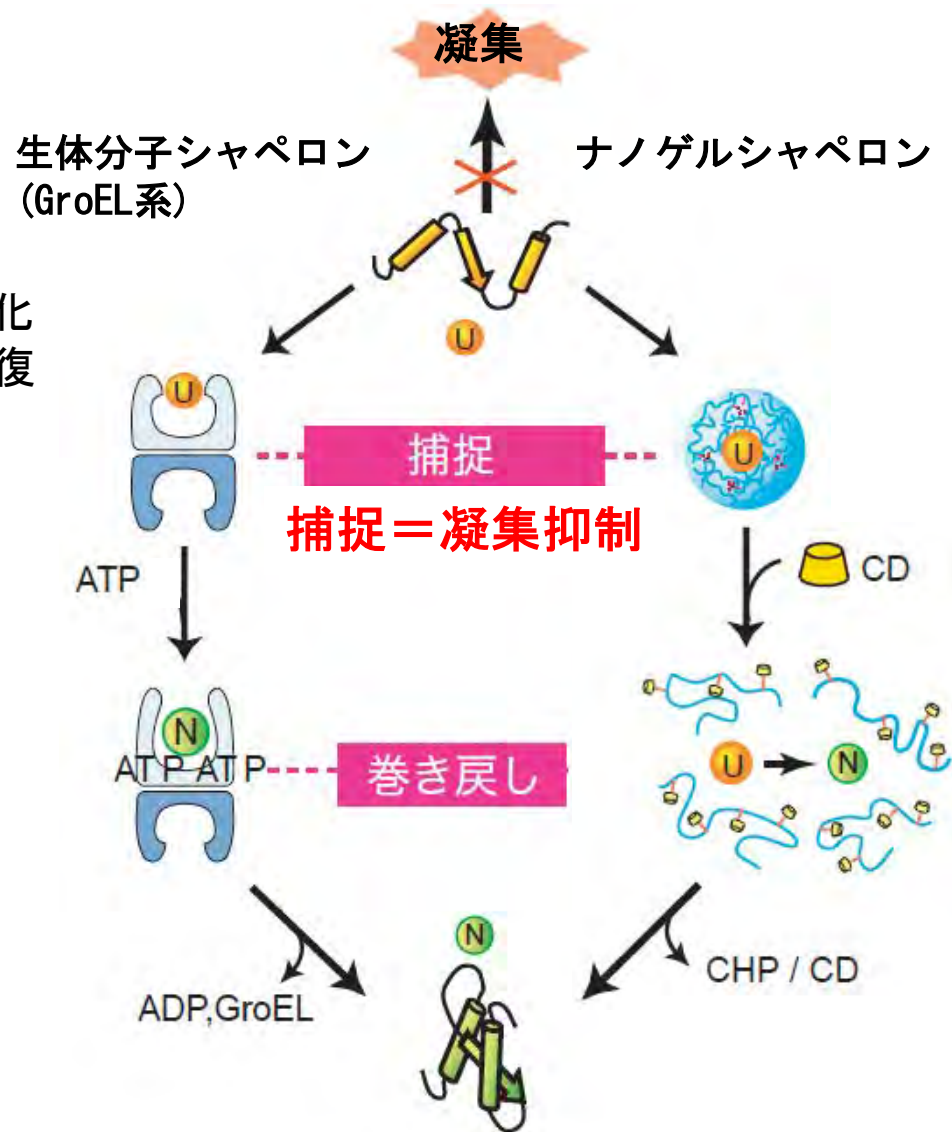
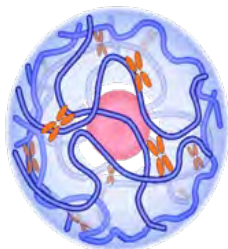
人工分子シャペロンシステム

動的ナノゲルで発現する新機能

分子シャペロン機能

- # 凝集しやすいタンパク質を取込み安定化
ナノゲルから放出され、元の活性を回復
- # ナノサイズのゲルネットワークが有効：
タンパク質分子をナノ空間に隔離可能
生体分子シャペロンの戦略

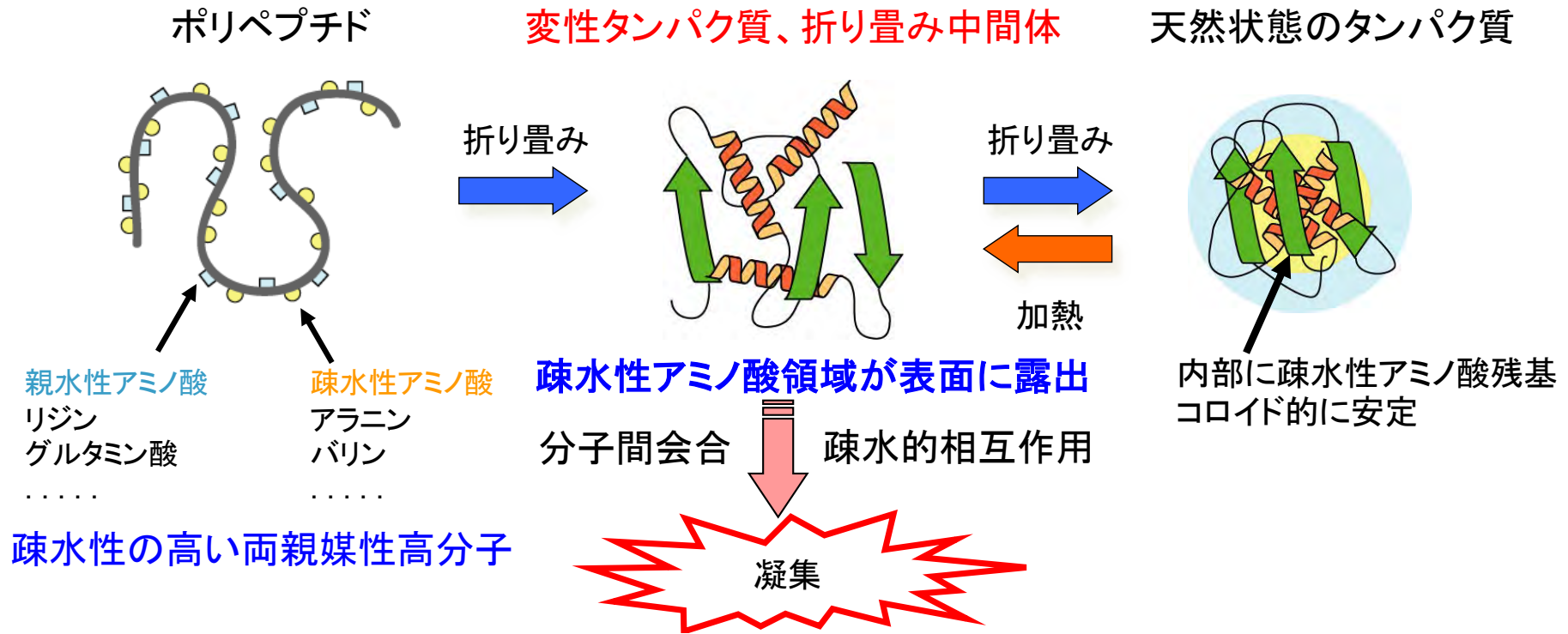
タンパク質の
ナノエンカプシュレーション



分子シャペロンにインスパイアードされた新規な人工分子システムの開発に成功



タンパク質の折り畳みと凝集



タンパク質の凝集から生じる問題

バイオテクノロジー分野

- ・未知タンパク質の機能解明: 発現タンパク質の50%以上は凝集
- ・酵素、生理活性タンパク質の失活

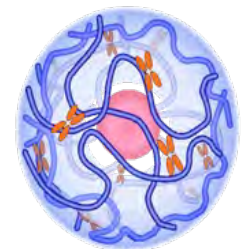
医療分野

- ・タンパク質のデリバリーシステム設計
- ・タンパク質コンフォメーション異常による疾患(アルツハイマー病、プリオン病)



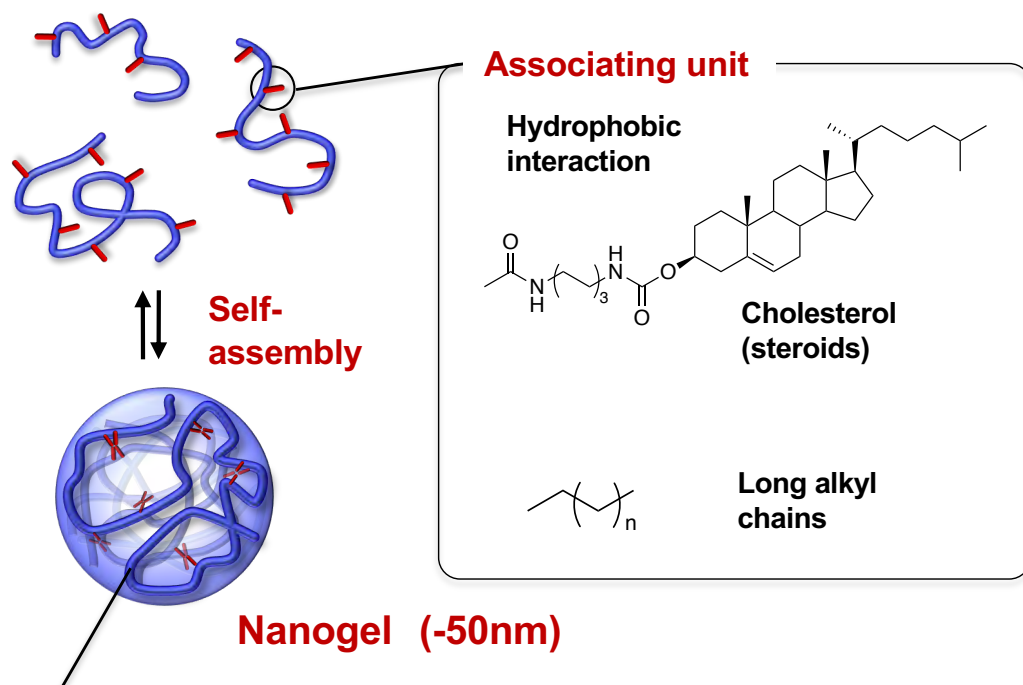
人工分子シャペロンの機能(ナノゲル シャペロン)

1. Inhibition of protein aggregation
 2. Thermal stabilization of enzyme
 3. Assistance of protein refolding
 4. Protein delivery system
- Biomedical applications

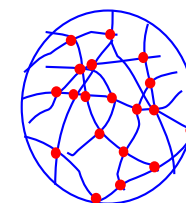




両親媒性グラフトポリマー(会合性高分子) による自己組織化ナノゲルの設計



物理架橋ナノゲル:
ナノサイズのゲル微粒子

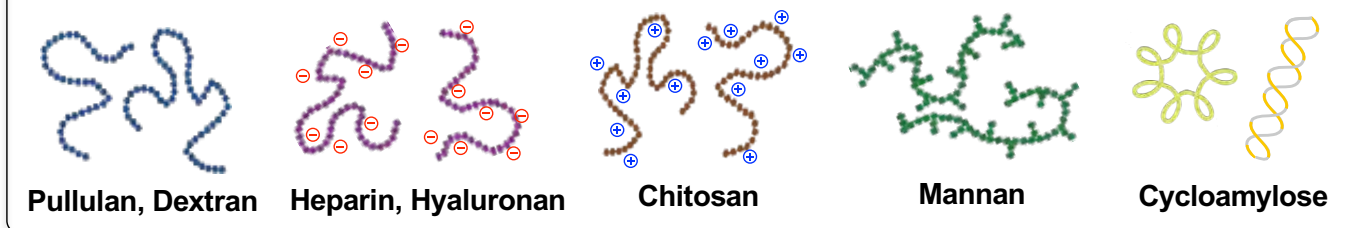


架橋点が疎水的会合力などの
分子間力により形成

● : 架橋点

- 表面の特性 + 3次元網目内部への物質の取り込みと放出
- 相転移を利用した膨潤-収縮制御 (刺激応答性)

Polysaccharides

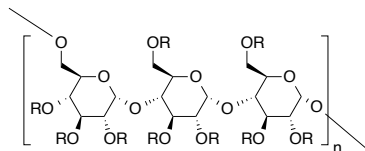




疎水化多糖ナノゲルのライブラリー

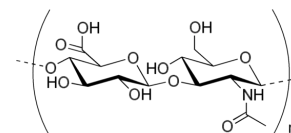
Pullulan

For example, H. Sasaki, K. Akiyoshi, *Chemical Record*, **10**, 366 (2010), *Chem. Lett.* Highlight review, **41**, 202 (2012)



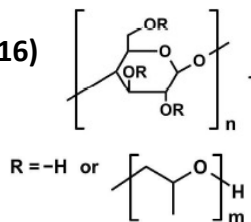
Hyaluronic Acid

T. Nakai, et al., *Macromol. Biosci.*, **12**, 475(2012)



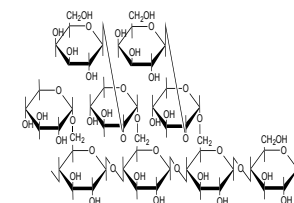
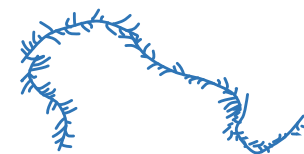
Hydroxypropyl cellulose

Y. Tahara, et al., *Langmuir*, **32**, 12283(2016)



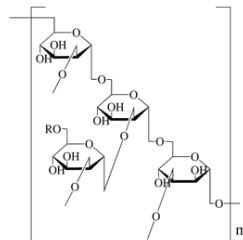
Xyloglucan

S. Sawada, et al., *J. Biomat. Sci., Polym. Edit.*, **28**, 1183(2017)



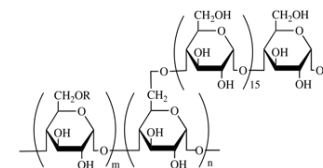
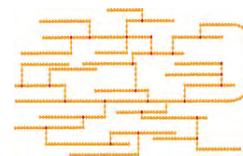
Mannan

E. Akiyama, et al., *Biomacromolecules*, **8**, 2366 (2007)



Dextrin

H. Takahashi, et al., *Macromol. Biosci.*, **9**, 694(2009)



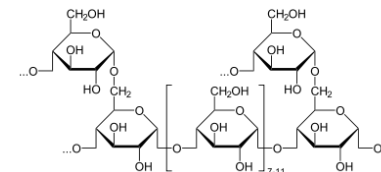
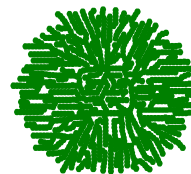
Cycloamylose

S. Toita, et al., *Chem. Lett.*, **38**, 1114(2009)
Biomacromolecules, **11**, 397(2010)
J. Control. Release, **155**, 54(2011)
Y. Tahara, et al., *Biomaterials Sci.*, **3**, 256(2015)



Glucan dendrimers

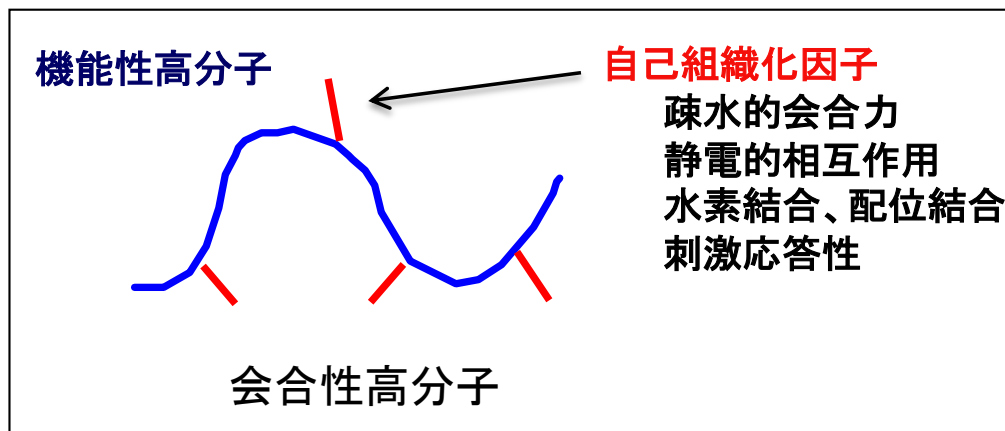
H. Takahashi, et al., *ACS nano*, **5**, 337(2011)
H. Takahashi, et al., *Biomaterials Sci.*, **1**, 842(2013)
S. Takeda, et al., *Biomaterials Sci.*, **7**, 1617(2019)





自己組織化ナノゲル法

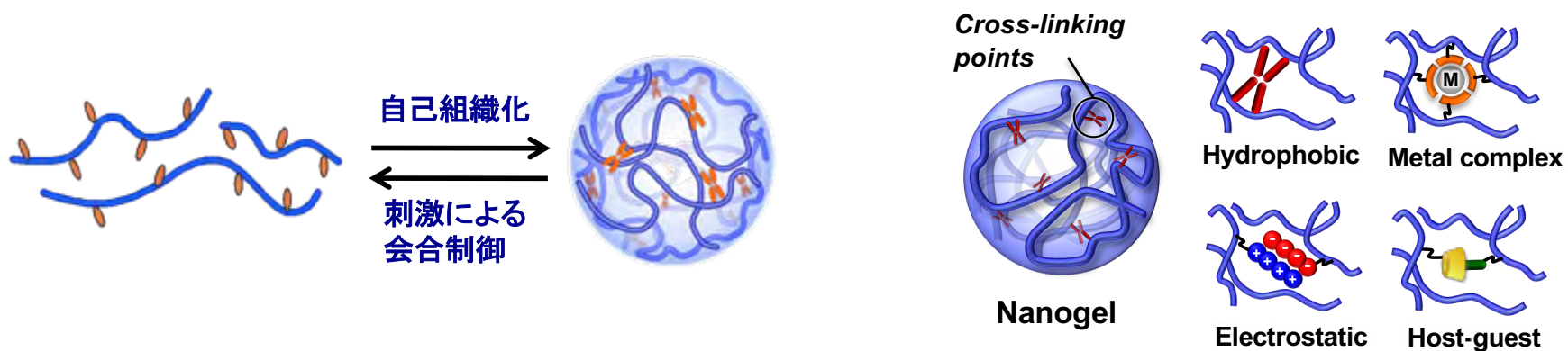
スマートナノゲルの設計



Building blocks of nanogels

ポリイオンコンプレックスナノゲル
金属イオンキレートナノゲル
熱応答性ナノゲル
pH応答性ナノゲル
pH分解性ナノゲル
酸化還元応答性ナノゲル
光応答性ナノゲル
光分解性ナノゲル

“機能性会合性高分子によるテラーメイドナノゲル”

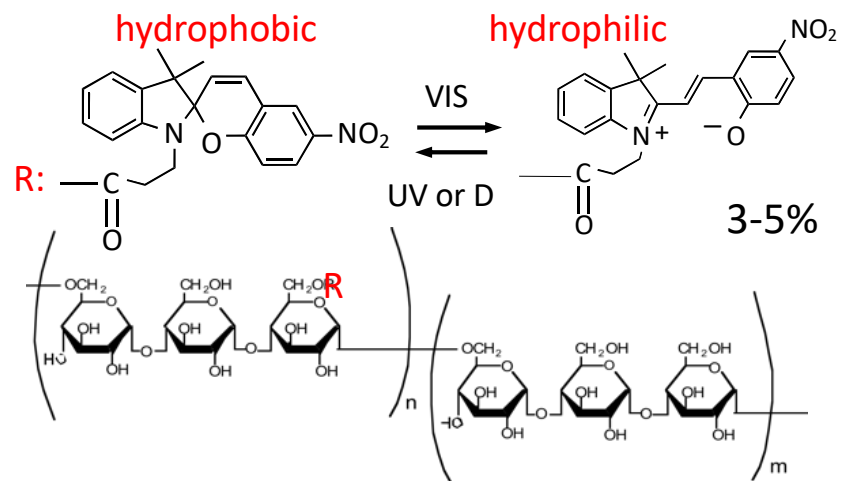


Chemical Record, 10, 366 (2010), *Chem. Lett.* Highlight review, 41, 202 (2012)
Angew. Chem. Int. Eds. 55, 11377 (2016), *Adv. Health. Materials*, 23, 1800729 (2018)



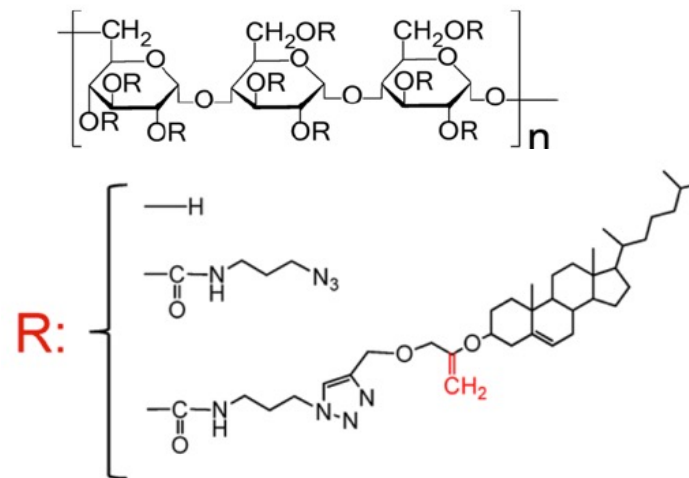
刺激応答性ナノゲル

Photo-responsive nanogel



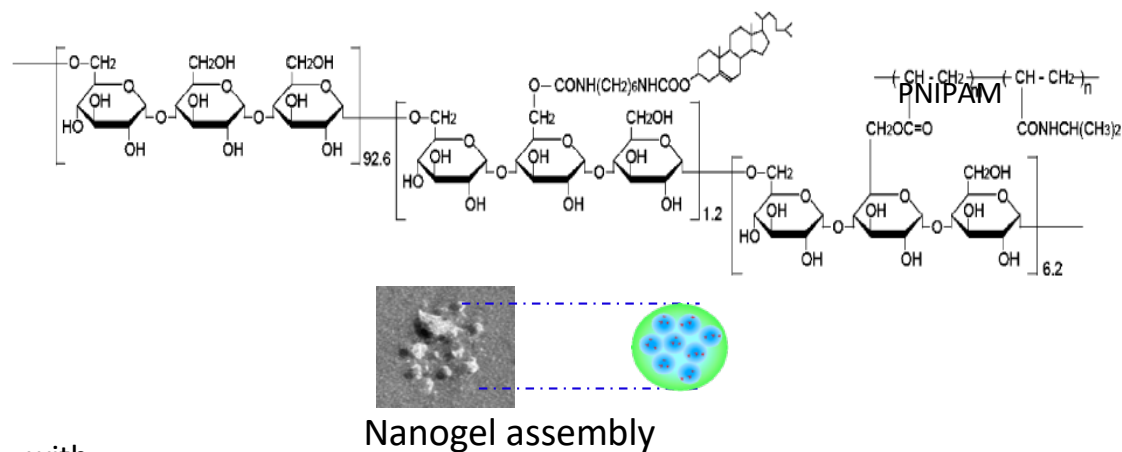
T. Hirakura et al., *Biomacromolecules*, 5, 1804(2004)

Acid-degradable nanogel With Prof. D. Thompson



N. Morimoto, et al., *Biomacromolecules*, 14, 56 (2013)

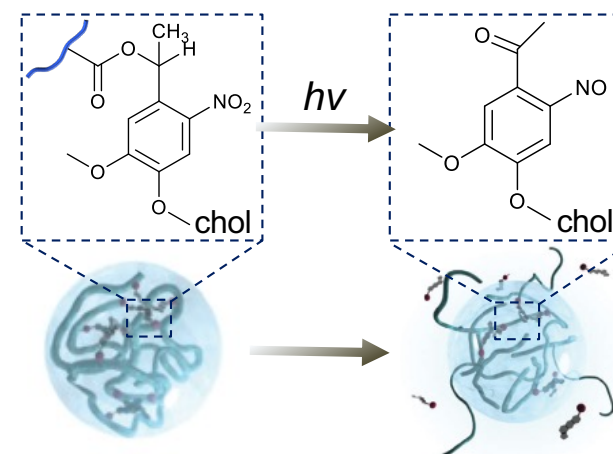
Thermo-responsive nanogel



with Prof. F. Winnik

N. Morimoto et al., *Langmuir*, 23, 217(2007)

Photo-degradable nanogel

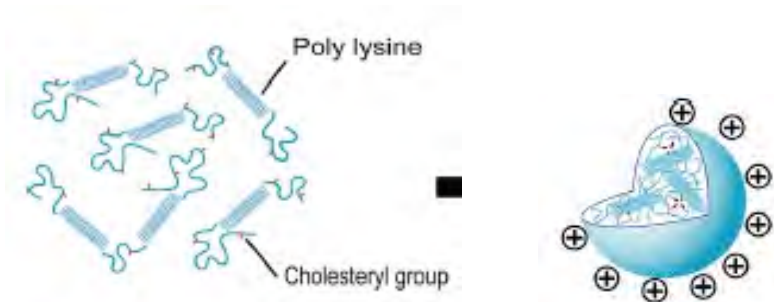
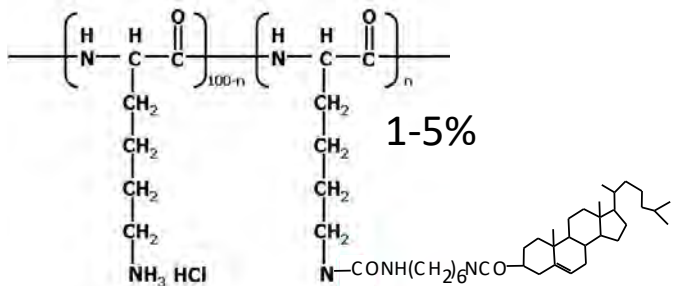


T. Nishimura, et al., *Chem. Commun.*, 52, 1222 (2016)



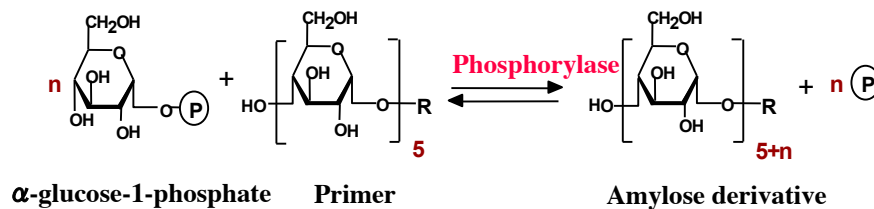
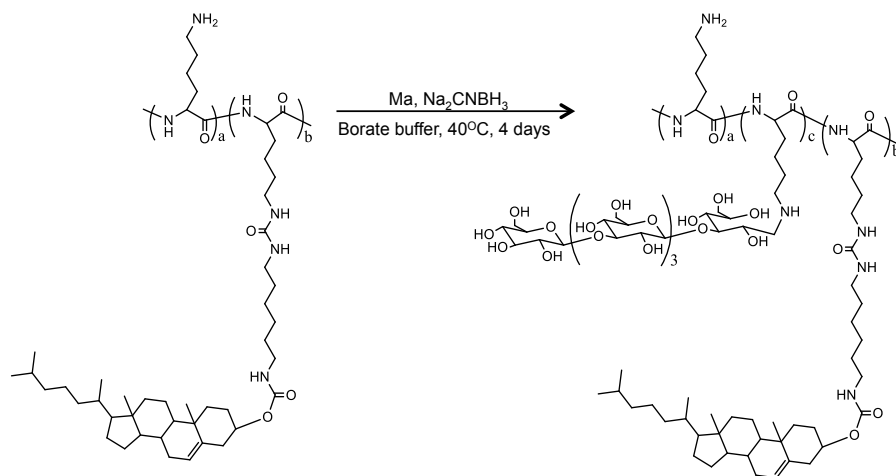
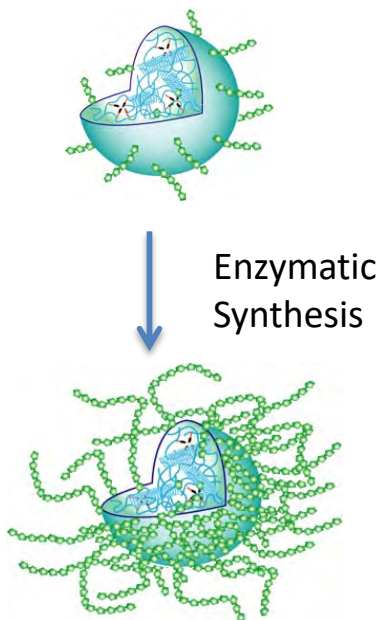
自己組織化ポリアミノ酸ナノゲル

Poly-L-Lysine nanogel



A. Ueminami, et al., *Macromolecules*, 33, 6750(2000)

Sugar polypeptide nanogel



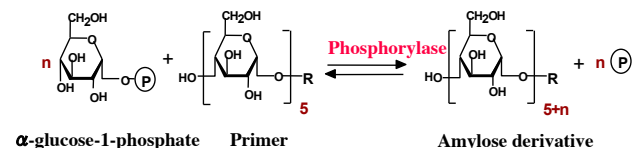
Amylose polypeptide hybrid nanogel

Protein, DNA, RNA carrier,
Artificial chaperone

N. Morimoto, et al., *Langmuir*, 29, 7509 (2013),
T. Nishimura, et al., *Biomacromolecules*, 18, 3913(2017)



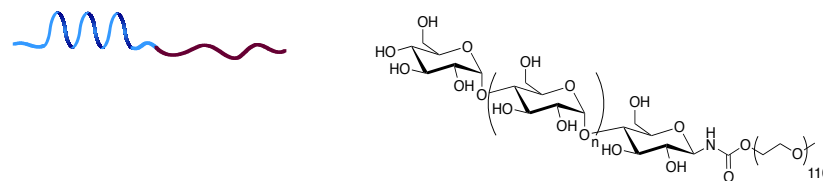
アミロース工学 Amylose Engineering: Phosphorylase-catalyzed polymerization of functional saccharide primers for glycobiomaterials



T. Nishimura, K. Akiyoshi, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, 9, e1423 (2017)

Amylose-*b*-PEO A-B Block copolymer

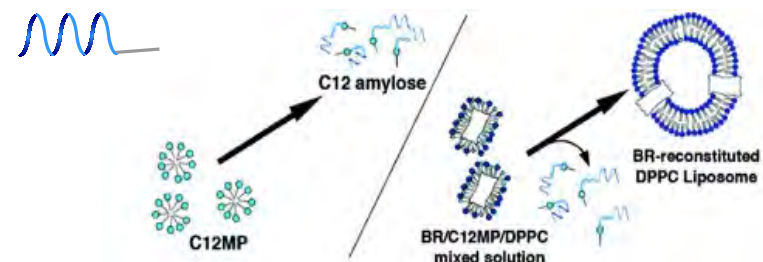
K. Akiyoshi, et al.,
Macromol. Rapid Commun, 20, 112(1999)
Biomacromolecules, 3, 280 (2002)



Amylose primer surfactant Alkyl amylose

Enzyme-responsive Molecular Assembly Systems
as Reconstitution of membrane protein and
Artificial Chaperone

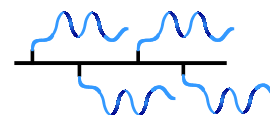
N. Morimoto, et al.,
Am. Chem. Soc., 129, 458 (2007)
J. Biotechnol. 25, 246(2009)



Amylose-*g*-poly-(L-lysine) Graft copolymer

Polysaccharide-graft Cationic Polypeptide Nanogels

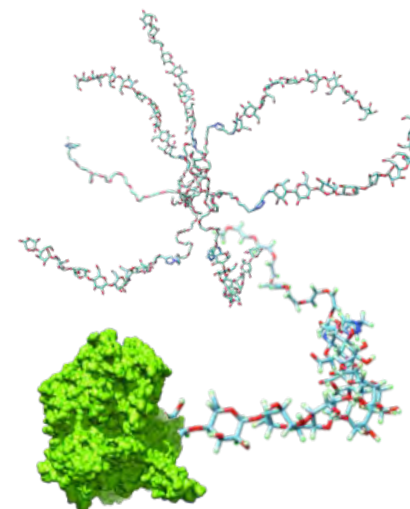
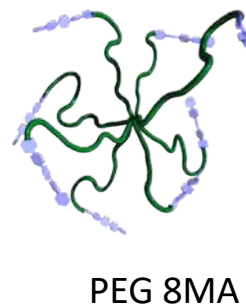
N. Morimoto, et al., *Langmuir*, 29, 7509 (2013)



Amylose-based Star Copolymers

Macromolecular host for hydrophobic molecules
siRNA delivery

T. Nishimura, et al.,
ACS Macro Lett., 4, 367-371(2015)
BioMed Res. International, 962941, 6 (2015)

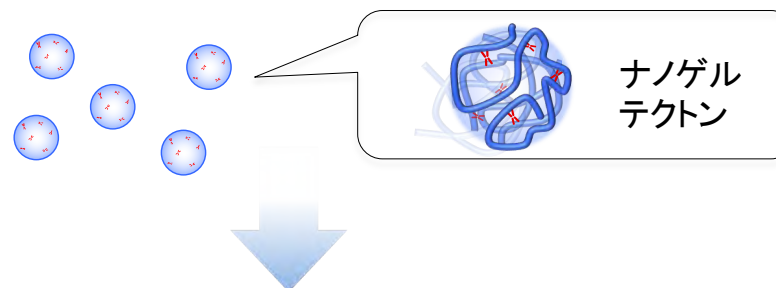




ナノゲルテクトニクス

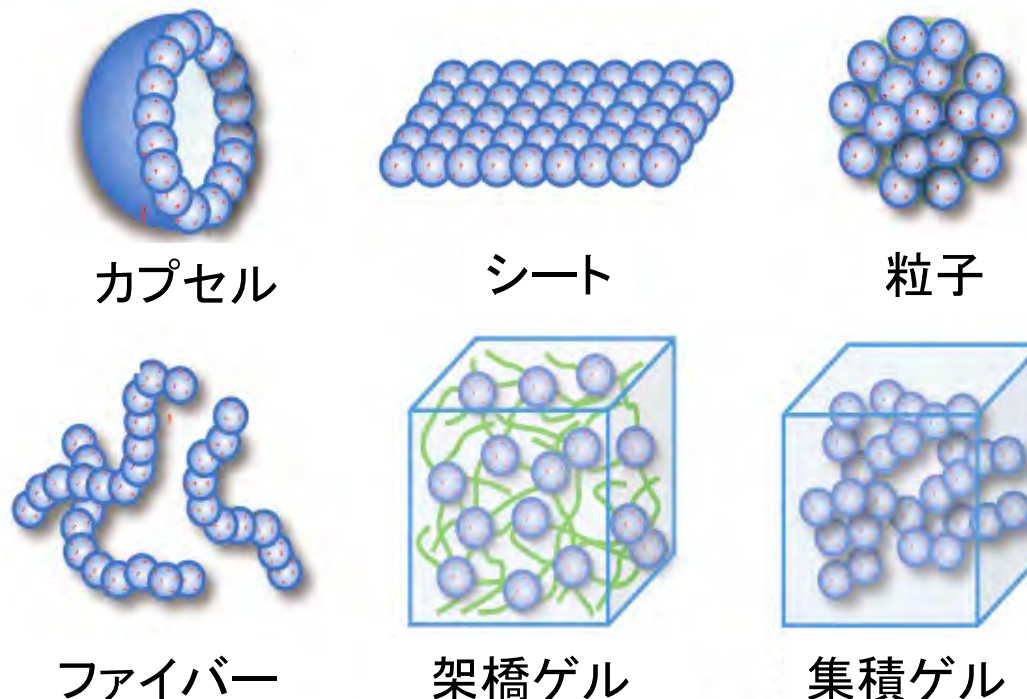
- # ナノゲルテクトンの設計
- # ナノゲル集積材料の設計
- # 新規ゲルバイオマテリアルの開発

ナノゲルテクトン (<100nm)



ナノゲルテクトンの集積制御

- 3次元構造の制御
- 多機能性の付与
- プログラム制御された応答性

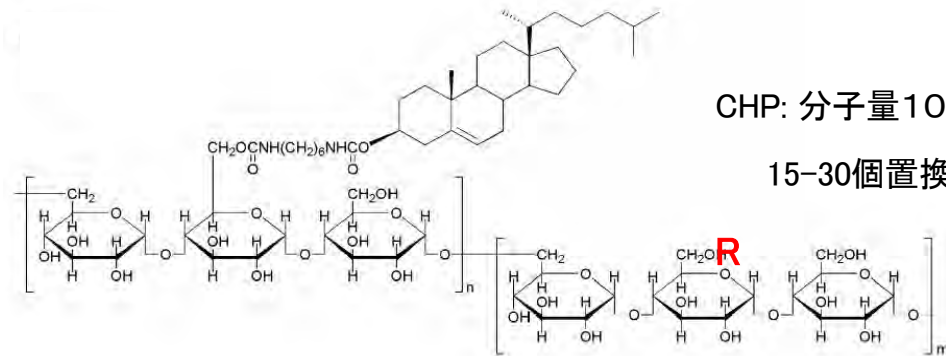


- テーラーメイド医療
- ナノメディシン
- DDS
- 再生医療

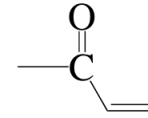


ナノゲル架橋による機能性ヒドロゲルの設計: ナノからマクロへ

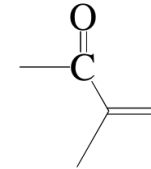
ナノゲルをビルディングブロックとしてナノレベルで構造制御された新規機能性ヒドロゲルを創製する新手法(ナノゲルボトムアップ法)



R :



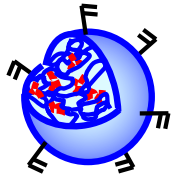
or



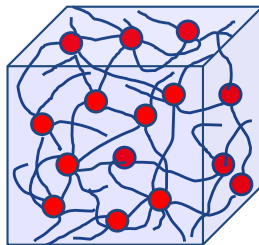
アクリロイル基

メタクリロイル基

自己集合

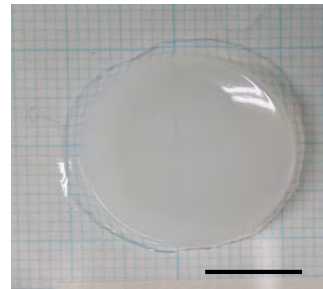


重合性ナノゲル

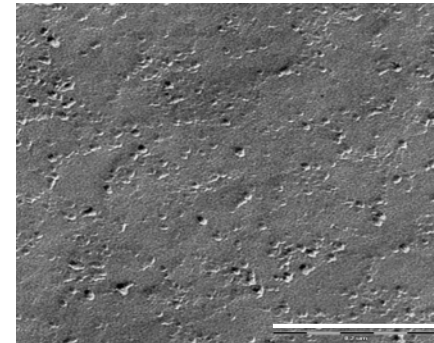


ナノゲル架橋ゲル

水中で水溶性モノマーと重合
MPC, NIPAMなど



1 cm

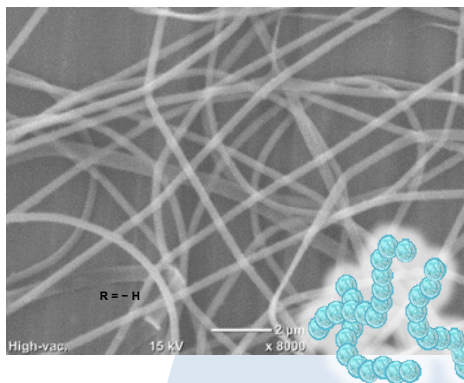


TEM像 200nm



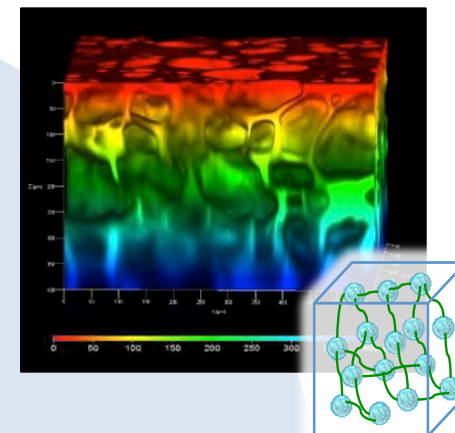
ナノゲルテクトニック材料

ファイバー

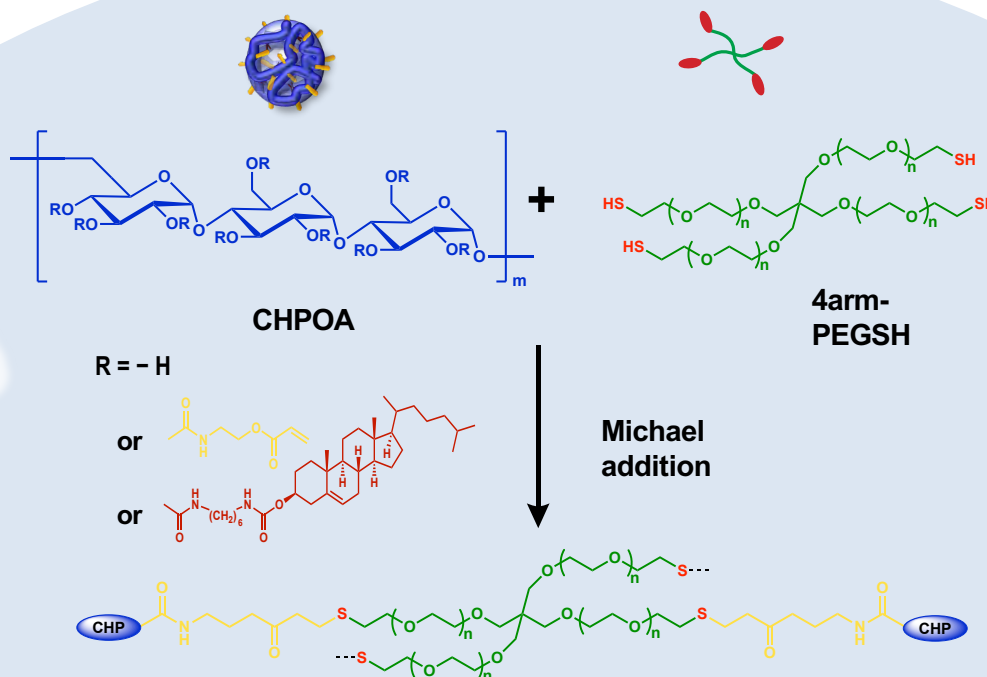


A. Shimoda, et al.,
RSC Advance, 6, 40811(2016)

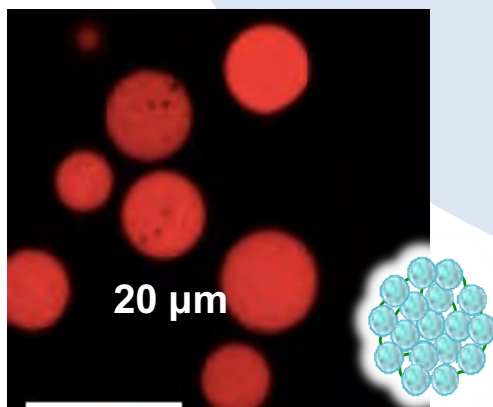
多孔質ゲル



Y. Hashimoto, et al.,
Biomaterials, 37, 107(2015)

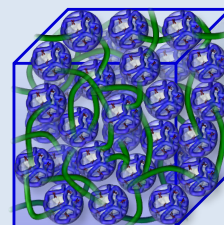


マイクロスフェア

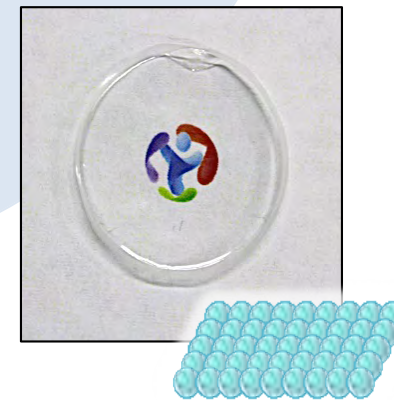


Y. Tahara, et al.,
Adv. Materials, 27, 5080(2015)

ナノゲル架橋ゲル (Nano Klik gel)

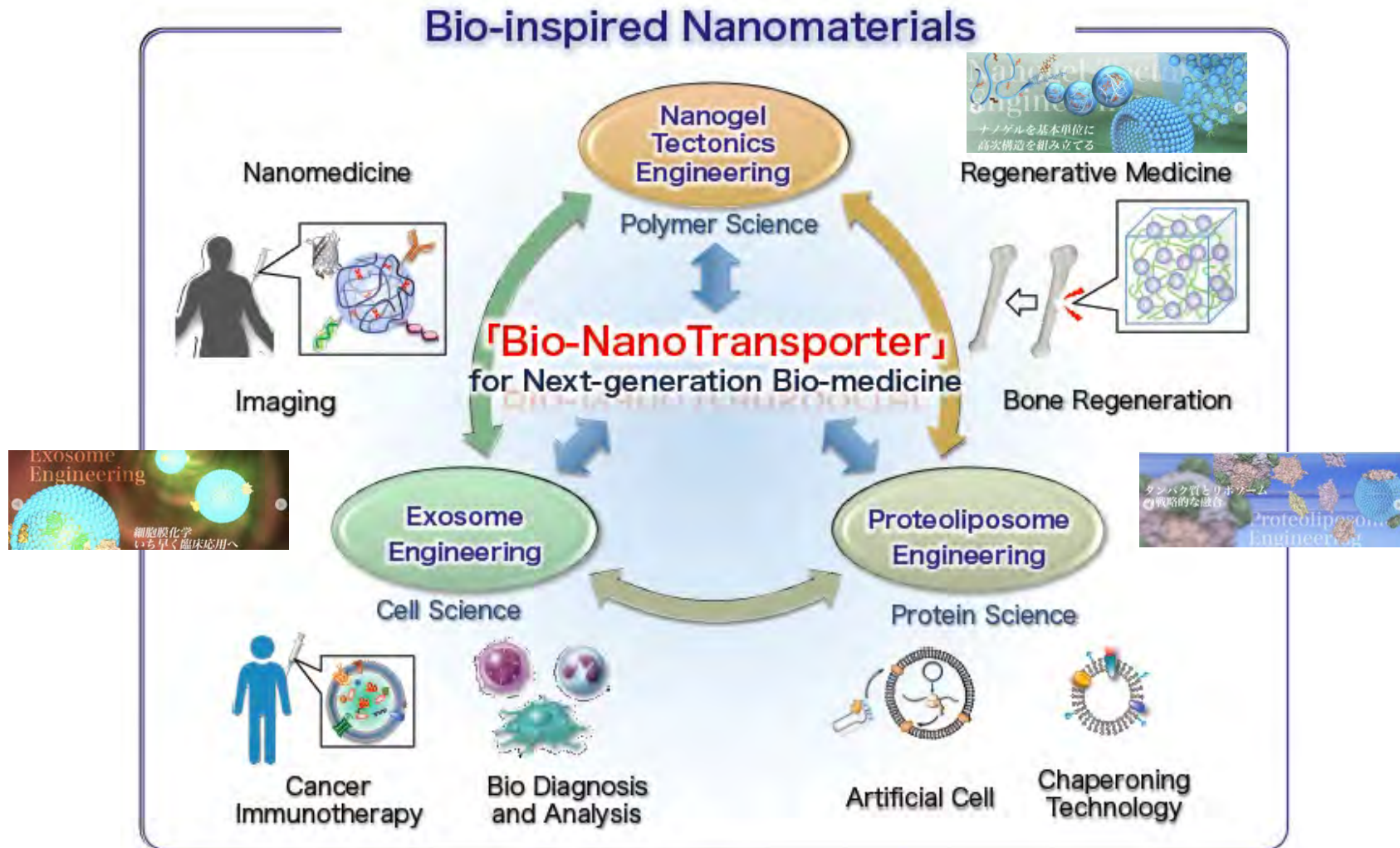


フィルム



Y. Hashimoto, et al.,
ACS Biomater. Sci. & Engineering, 2, 375 (2016)

分子システムを規範として、種々のバイオ医薬品や分子マーカーの徐放制御や選択的輸送を行える機能性ナノ微粒子(バイオナノトランスポーター)を創製し、医療応用を図る。





CHPナノゲルがんワクチンによるがん治療

疎水化多糖(CHP)ナノゲルとの複合化によりがん抗原タンパク質の安定化と製剤化
ナノゲルキャリアによる効率的キラーT細胞誘導と抗体産生増強

三重大学医学部
珠玖洋教授Gとの共同研究

動物実験

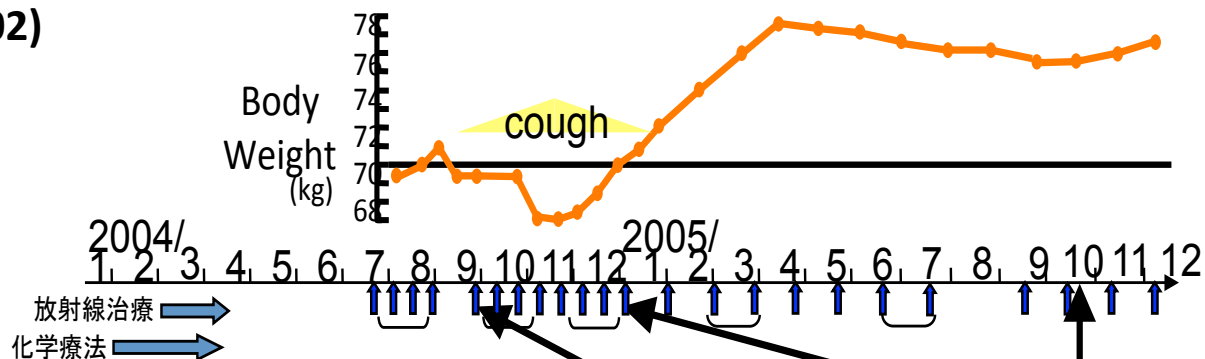
Cancer Res., 58, 3385 (1998)
Int. J. Oncl., 14, 695(1999),
Blood 99(10), 3717-3124 (2002)

2009年臨床治験開始
(日本 & 米国)

臨床研究

Clin Cancer Res. 12(24): 7397 (2006)
Cancer Immunity 7: 9 (2007)
Cancer Science 99:601 (2008)

2004年臨床研究開始

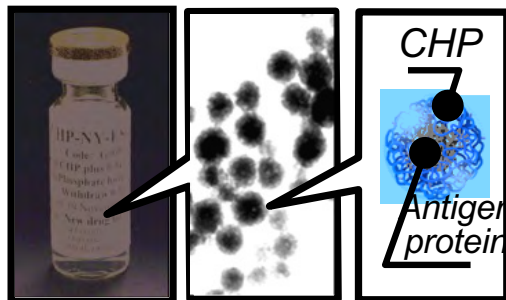


皮下注射

癌

マイクロスコープによる患者の食道画像

株式会社イミュノフロンティア
ImmunoFrontier, Inc.
from 2004



CHP-NY-ESO-1がんワクチン

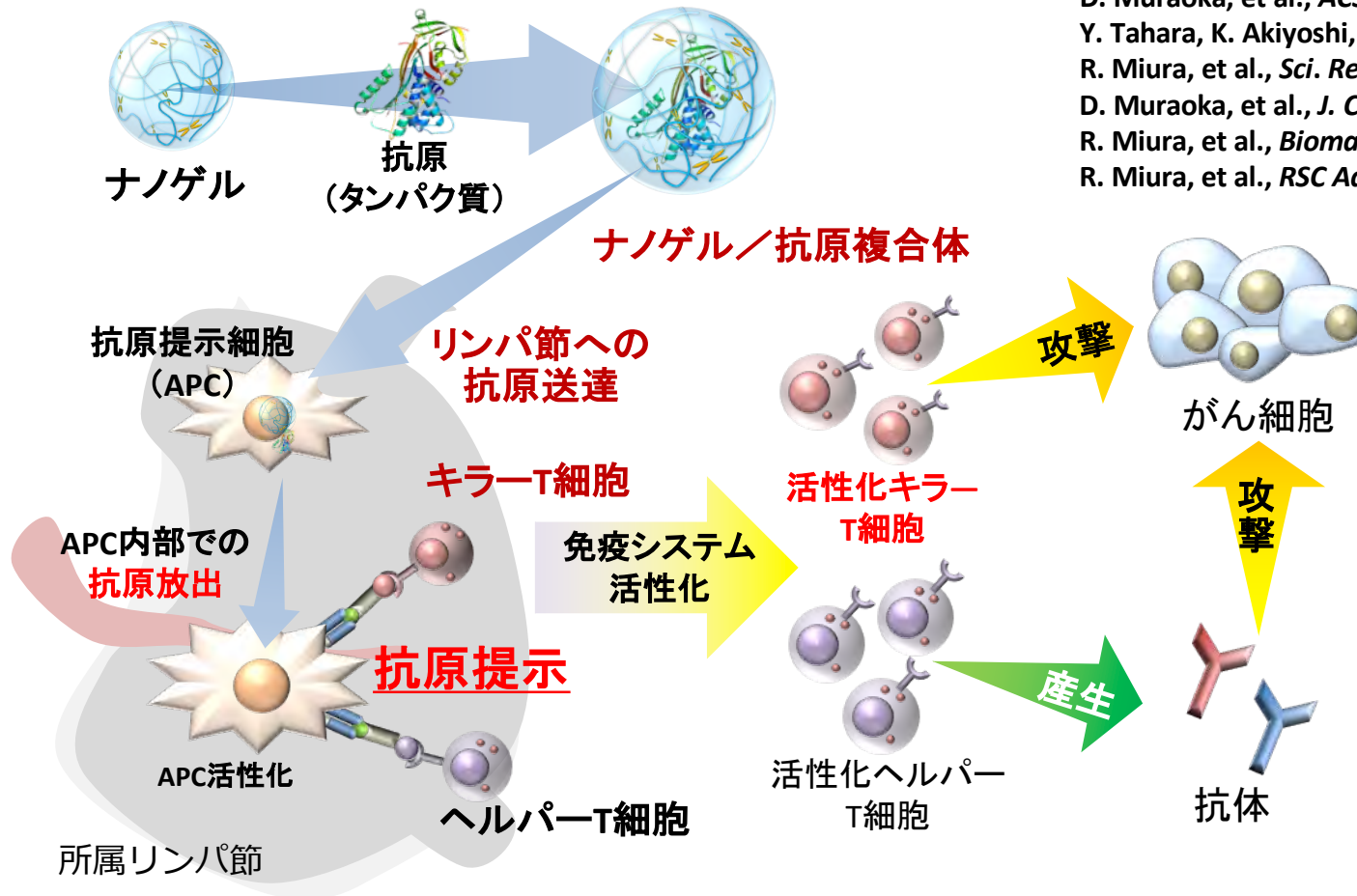


がんワクチンによるがん免疫治療：抗原キャリアの機能

Self-assembled polysaccharide nanogels delivery system for overcoming tumor immune resistance

D. Muraoka, N. Harada, H. Shiku, K. Akiyoshi, *J. Control. Release*, 347, 175(2022)

CHPナノゲルは効率的にリンパ節へ抗原を送達し、免疫システムを活性化し、がんワクチン治療の効果高める機能を有する



D. Muraoka, et al., *ACS nano*, 8(9), 9209-9218 (2014)
 Y. Tahara, K. Akiyoshi, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 95,65 (2015)
 R. Miura, et al., *Sci. Rep.*, 8, 2-10 (2018)
 D. Muraoka, et al., *J. Clin. Invest.*, 129(3),1278-1294 (2019)
 R. Miura, et al., *Biomacromolecules*, 21, 621-629 (2020)
 R. Miura, et al., *RSC Advance*, 10, 8074-8079 (2020)



United Immunity, Co., Ltd
From 2017

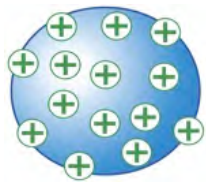


ナノゲル経鼻ワクチン

A Novel Nanogel-based Delivery System for Adjuvant-free Intranasal Vaccines

T. Nochi, et al., *Nature Materials*, 9, 572 (2010)

東大清野宏教授Gとの共同研究



カチオン性CHPナノゲル
(- 50nm)

ナノゲル経鼻ワクチンは粘膜感染病の予防において非常に有効な手段

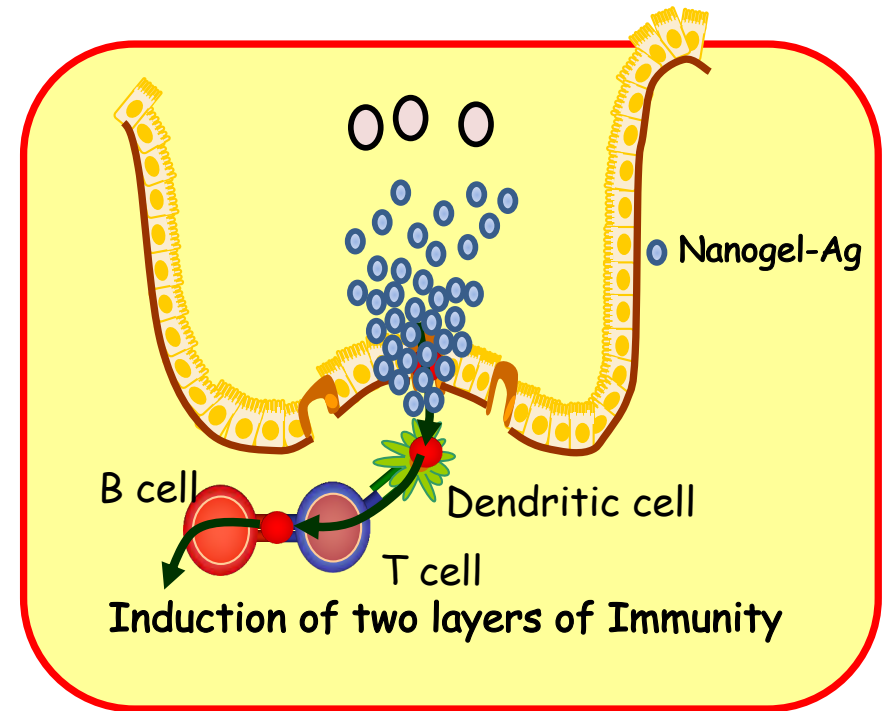
肺炎球菌ワクチンなどの開発

清野教授G

J. Immunol., 185, 5436 (2010)
Infect. Immun., 81, 1625 (2013)
Mucosal Immunol., 8, 1144 (2015)

Mucosal Immunology, 10, 1351 (2017)
Mol. Pharmaceutics, 18, 4, 1582 (2021)
Vaccine, 39, 3353 (2021)

経鼻ワクチン



Nasal tissue



HanaVax, Inc. From 2016

ナノゲル経鼻ワクチン開発ベンチャー

Outline

1. 多糖ナノゲル工学

ナノゲルとは

自己組織化多糖ナノゲルの開発と機能

医療応用

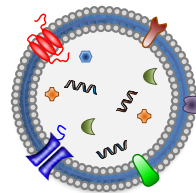
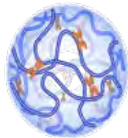
免疫療法(がんワクチン、経鼻ワクチン)、再生医療

2. エクソソーム工学

細胞外小胞 エクソソームとは

エクソソームの機能

エクソソームと糖鎖





Journal of Extracellular Vesicles



細胞外小胞研究のガイドライン

ISSN: (Print) 2001-3078 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/zjev20>

Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines

Extracellular vesicles (EVs):

“細胞から放出される核を持たない(複製できない)脂質二重膜で囲まれた粒子”

明記すべき項目

a) サイズや密度

“small EVs” (sEVs) や “medium/large EVs”(m/IEVs)など

- < 100nm or < 200nm [small]
- > 200nm [large and/or medium]

b) マーカータンパク質などの組成

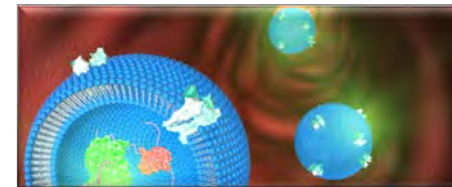
(CD63+/CD81+ -EVs, Annexin A5-stained EVs, etc.)

c) 由来細胞や条件

(podocyte EVs, hypoxic EVs, large oncosomes, apoptotic bodies)



エクソソーム工学

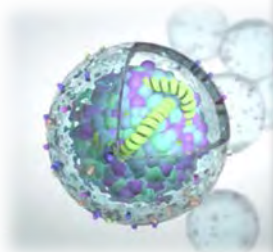


ドラッグキャリアとしての利点

- バイオ情報分子(タンパク質、核酸、脂質)の輸送
- 膜融合による細胞質への物質輸送

課題

- 単離精製法の確立
- 内封物質の制御
- 細胞への取り込み効率、組織指向性



エクソソーム医薬の基盤テクノロジー開発

- 1) エクソソームの単離・精製評価技術
- 2) エクソソームの機能改変技術

リポソーム／エクソソームハイブリッド **融合性**

Sci. Rep., 6, 21933 (2016), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 526, 967 (2020)

ナノゲル／エクソソームハイブリッド **表層工学、磁気誘導性**

Bioconjugate Chem. 30, 2150 (2019), *Biomater. Sci.*, 8, 619 (2020)

タンパク質デリバリーと疾患

Sci. Rep., 6, 18346 (2016)

統合的がん免疫療法への応用 (三重大G)

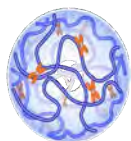
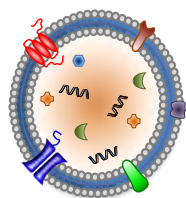
PLOS ONE, 4, e0154134 (2016), *Nature Commun.*, 9, 435 (2018)

J. Extracellular Vesicles, 11, e12205 (2022)

エクソソーム膜糖鎖のプロファイリングと機能

Biochem. Biophys. Res. Commun., 491, 701 (2017), *Sci. Rep.*, 9, 11497(2019),

FEBS Open Bio., 11, 741 (2021), *Small Methods*, 2100785 (2022)

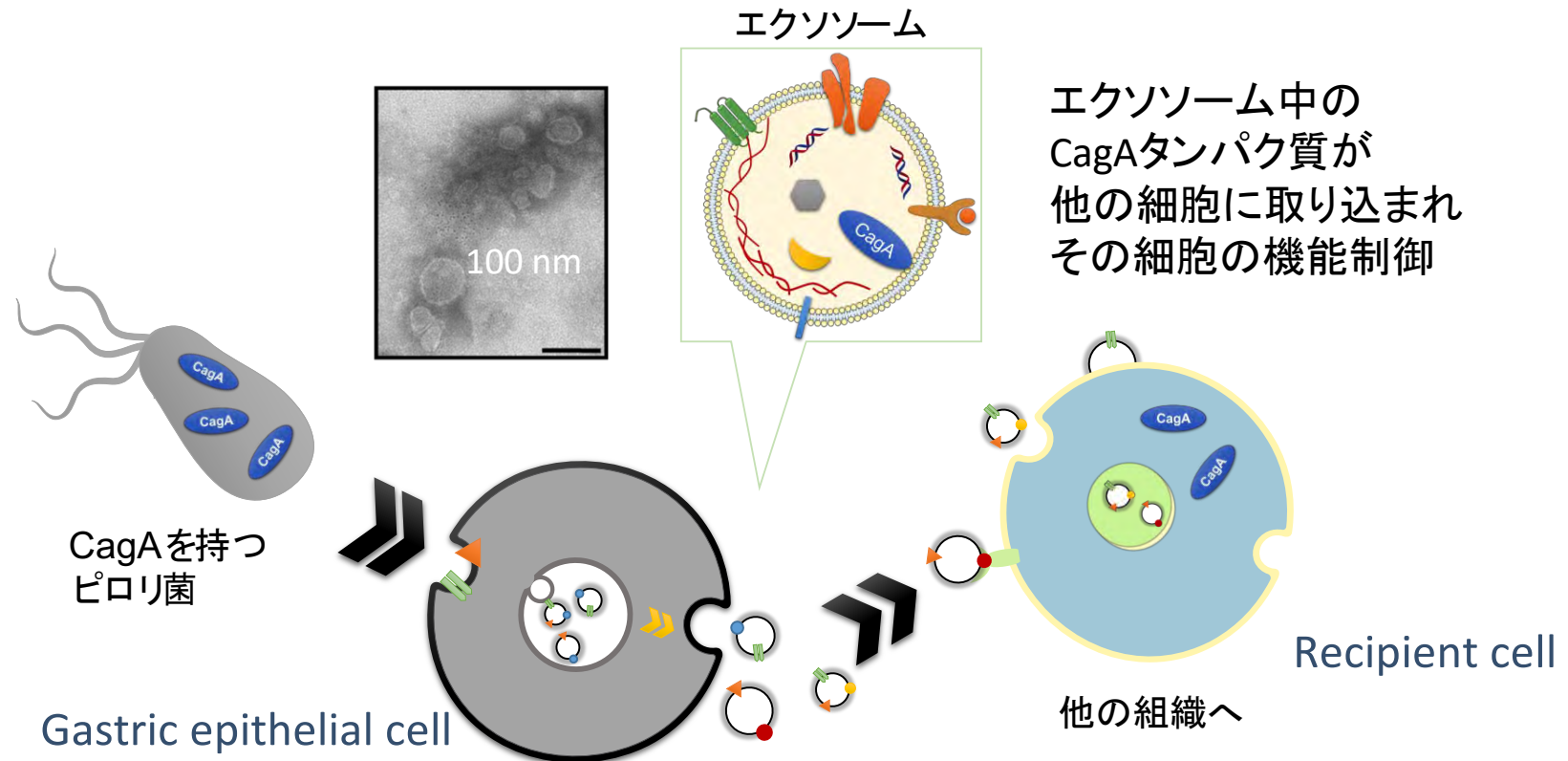




エクソソームによるピロリ菌病原タンパク質の 輸送と細胞機能制御

タンパク質デリバリー

胃の粘膜に感染し、胃潰瘍や胃がんを引き起こすピロリ菌の病原タンパク質CagAが
エクソソームに内包され、血中により全身に運ばれ疾患を誘発する可能性



東京大学 畠山昌則教授との共同研究

感染細胞

Exosome is nanocarrier for CagA protein

JST ERATO, 京都大学 プレスリリース
日本経済新聞 (1/12/2016)、京都新聞 (1/26/2016)などに掲載

A. Shimoda, et al., *Sci. Rep.*, 6, 18346 (2016)

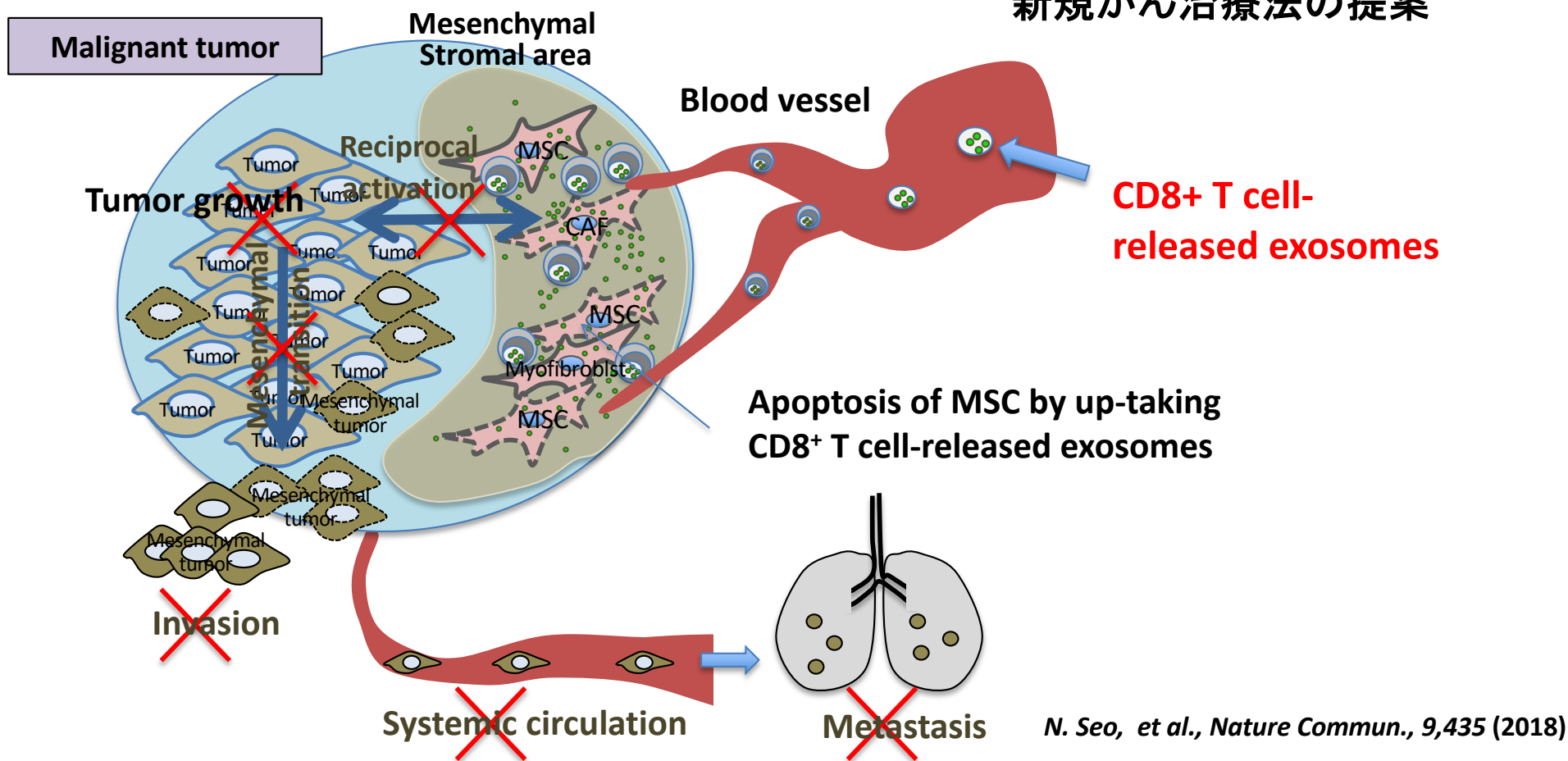


Activated CD8⁺ T cell extracellular vesicles prevent tumor progression by targeting of lesional mesenchymal cells

Prevent Tumor Invasion and Metastasis :
Destruction of Mesenchymal Tumor Stroma
by CD8⁺ T cell exosomes

三重大医学部
瀬尾尚宏講師、珠玖洋教授との共同研究

キラーT細胞エクソソーム：
間葉系がん間質を標的とした
新規がん治療法の提案

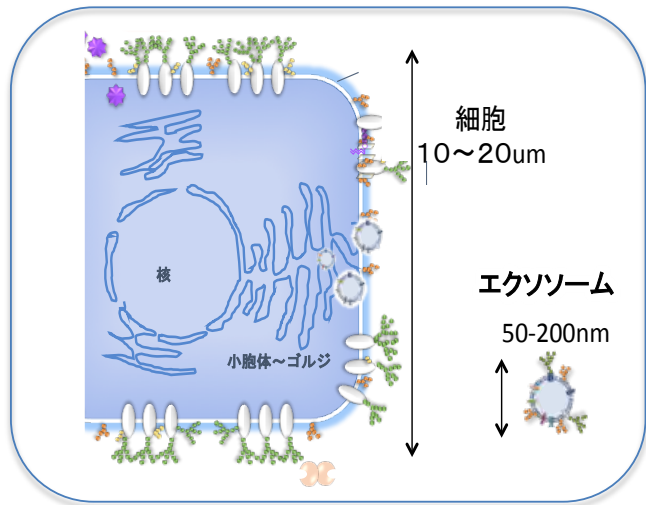




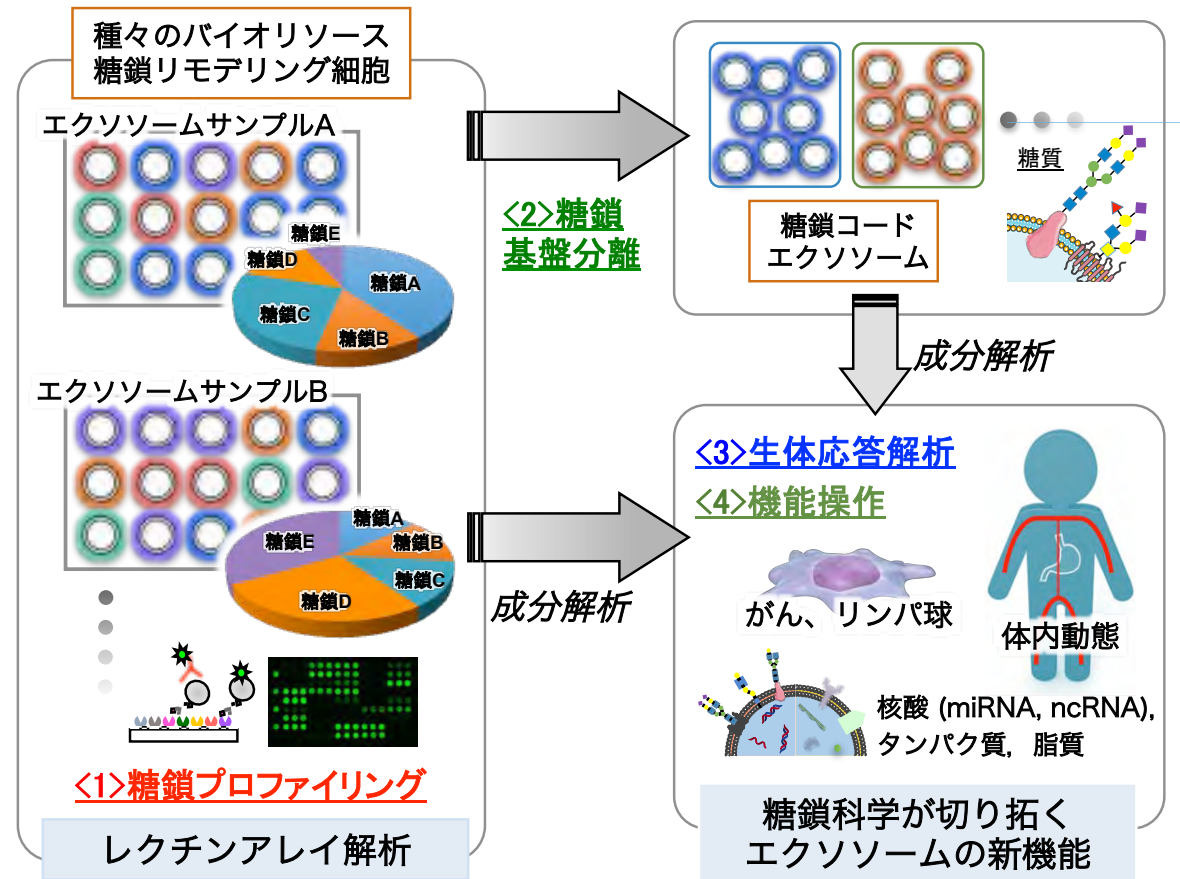
エクソソームの誕生からその組織、細胞内輸送における糖質の役割と機能 エクソソーム工学による新規バイオナノ微粒子の創製とDDS応用

エクソソーム糖鎖機能の可能性

- 発生、分化、増殖
- 免疫応答、感染、がん化
- 細胞間認識
- 細胞間シグナリング
- 組織指向性



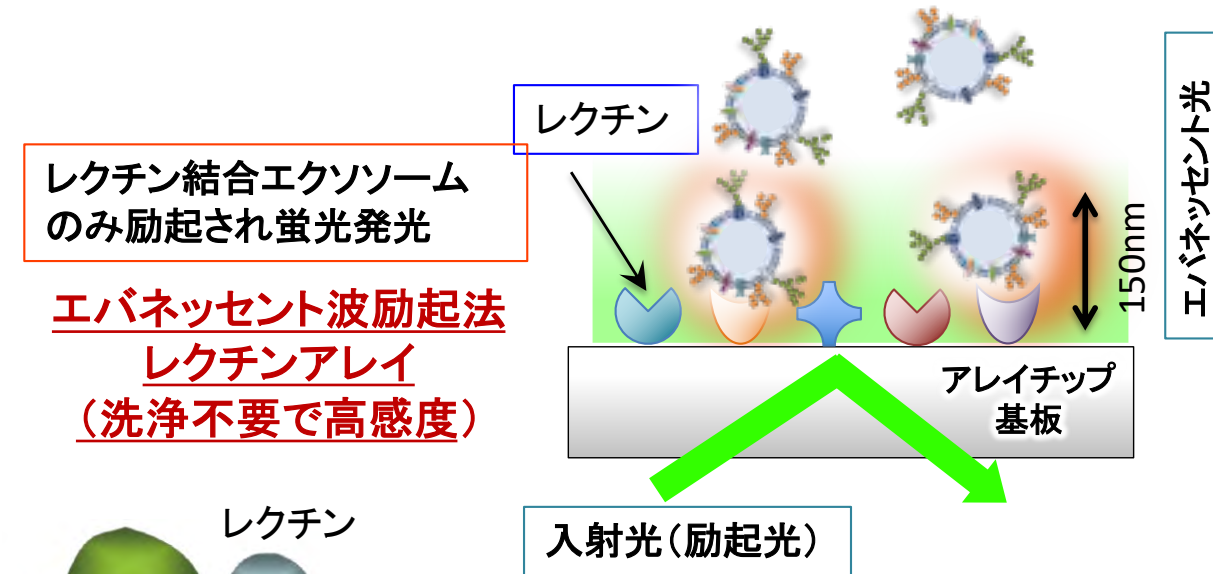
エクソソームの顔としての表層糖鎖





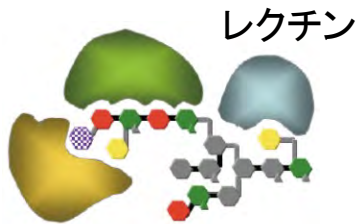
エクソソームの糖鎖プロファイリング手法の確立と活用

世界初インタクトなエクソソーム表層糖鎖の情報を高感度で検出



Evanescent-field fluorescence-assisted lectin microarray: a new strategy for glycan profiling, A. Kuno, et al., *Nat. Methods*, 2, 851(2005)

産総研平林淳博士Gが開発



レクチンへの結合の仕方
で糖鎖構造を推定

糖鎖解析の必要量

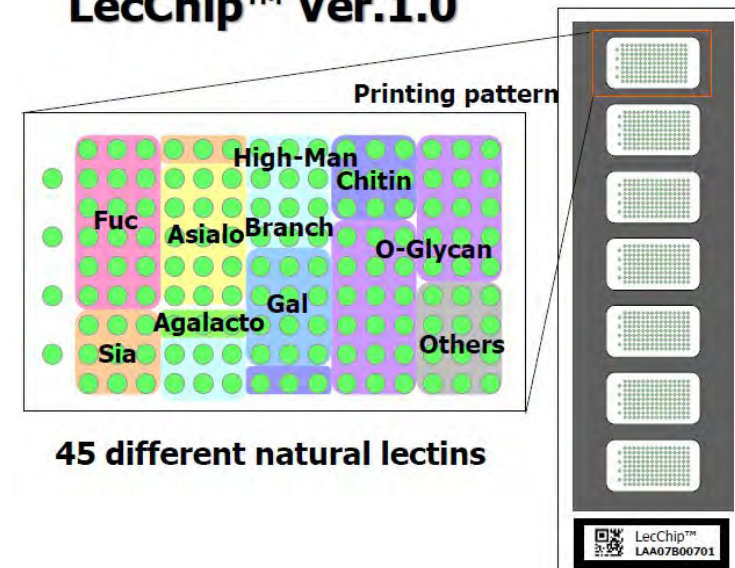
Amount of sample:

MS 100 μ g

HPLC 100 μ g

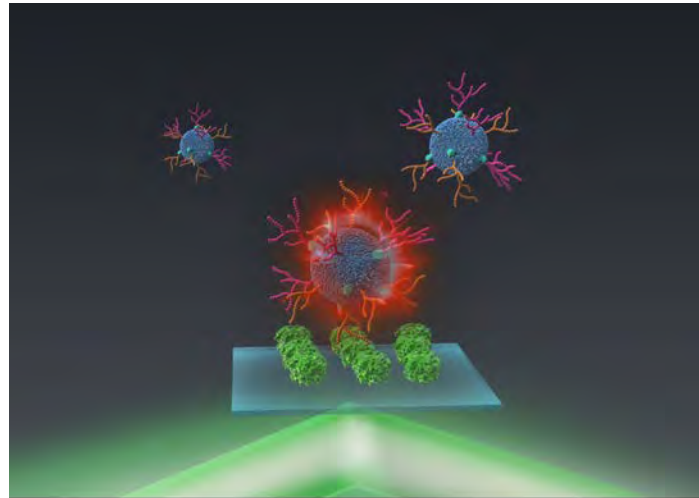
Lectin array 10ng - 1 μ g

LecChip™ Ver.1.0





エクソソームの糖鎖プロファイリングによる機能解析



1. 種々の細胞由来エクソソームのレクチンアレイ解析 (京大秋吉G)

A. Shimoda, et al. *Small Methods*, 2100785 (2021)

2. 間葉系幹細胞由来エクソソーム

- ・ 分化過程(骨、軟骨、神経)での糖鎖プロファイリング (京大秋吉G)

A. Shimoda, et al. *Sci Rep.*, 9, 11497 (2019)

- ・ 分化能と糖鎖プロファイリング (産総研館野G)

S. Saito, et al. *Sci. Rep.*, 8, 3997 (2018)

3. アルツハイマー患者血清由来エクソソームの解析 (産総研館野G)

H. Odaka, et al. *FEBS Open Bio.*, 11, 741-752 (2021)

4. 膵がん患者血清由来エクソソームの解析 (産総研館野G)

H. Odaka, et al. *BMC Gastroenterology*, 22, 153 (2022)