

学 位 論 文 題 名

Synthesis and characterization
of cyclodextrin-based amphiphiles(シクロデキストリンを基盤とする
両親媒性化合物の合成と性質に関する研究)

学位論文内容の要旨

本来、生体必須成分には、体内で必要とされるところへ選択的に運ばれて行く仕組みが備わっている。しかし、生体異物である薬物はそのような機構を持ち合わせていないため、吸収された薬物は必要とされるところばかりでなく、体内の至るところに分布し多かれ少なかれ副作用を引き起こし、制ガン剤や抗 HIV 薬の場合、強い副作用が治療の上で大きな問題となっている。従って、薬物治療を有効かつ安全に行うためには、選択的に作用部位へ（空間的制御）、望ましい濃度－時間パターンのもとに（時間的制御）、送達しなくてはならない。この考えはドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれ、病巣組織のみに必要な量の薬剤を送達し、生物薬剤学的な諸要件に合致した副作用の少ない送達方法の開発が強く望まれている。その中でも、DDSは薬物に生体内で標的部位を指向するターゲッティング能を与えることが最も基本的な概念として考えられている。その一つの方法として、合成化学的手法を用いて低分子薬物から蛋白質医薬品まで幅広い薬物を対象として分子構造の修飾に基づく開発が行われているが、薬物が個別に化学修飾の対象となるため分子構造等に関して制約が多く、その誘導体は制度上新規医薬品として扱われるため、開発にかかる手間とコストは非常に大きいという欠点がある。もう一つの方法は、分子キャリアーや微粒子キャリアーを用いて薬物を選択的に輸送する方法である。これは薬物の制約がほとんどなく直ちに利用が可能であり、応用性が広いという特徴がある。微粒子キャリアーには脂質二分子膜からなるリポソームがあり、DDSの薬物の担体として用いる試みが数多く成され、進展するにつれその臨床応用性が大いに注目されている。リポソームは生体膜の構成要素であるリン脂質を基本とする脂質二重層からなる閉鎖型小胞で、脂質の部分と内水層の部分から成り立っているため、脂溶性薬物と水溶性薬物を共に含包することができる。その利点は生体構成成分であるリン脂質から成るため生体適合性に優れていることが挙げられる。通常、リポソームはその粒子径により受動的ターゲッティング機構で薬物を輸送する。これに病巣部位と親和性のあるリガンドとして糖鎖等で膜表面を修飾し能動的なターゲッティング機構を備えることでより選択に標的部位へ薬物を送達できると期待される。シクロデキストリン(CD)は自然界で微生物が生産する環状オリゴ糖で、以前から食品や薬品等において添加剤として使用されている生体適合性化合物である。底の抜けたバケツの様なその特徴的な形状を利用し、その片側に標的部位と親和性のある糖鎖や官能基をクラスター状に配し、リポソームに組み込むことでターゲッティング能を持たせ、クラスター効果を持って標的部位に接着することが可能になると期待できる。しかし、CDは一級、二級水酸基が多数存在するために化学修飾する上でその制御が難しい化合物である。CDは構成するグルコースの数が6,7,8個となるにつれそれぞれ α 、 β 、 γ CDと呼ばれており、その全てに関してそれぞれの

一級水酸基を位置選択的に TBDMS 基で保護し、パルミチン酸無水物を用いて二級水酸基にパルミトイル基を導入した後に、一級水酸基をケイ素と親和性のあるフッ素含有ルイス酸により選択的に脱保護することで両親媒性の CD を調整することに成功し、その親水性部位の水酸基を $\text{SO}_3 \cdot (\text{CH}_3)_3\text{N}$ complex を用いて硫酸化することで新規アニオン性両親媒性 CD の合成に成功した。この新規両親媒性 CD の膜形成能は単分子膜の膜表面圧(π)と分子占有面積(A)を測定し、その π - A 曲線から安定な膜の形勢を確認した。また新規両親媒性 CD リポソームの純水中での形成を確認するために透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いてリポソームの形状やサイズをネガティブ染色法によって調査した。 α -CD 誘導体は $100\mu\text{m}$ 前後であり、 β 誘導体から形成したリポソームは $100\sim 400\mu\text{m}$ と大きめのサイズが確認され、 γ 誘導体に関しては $200\sim 500\mu\text{m}$ のサイズが確認された。しかし、ドラッグキャリアーを目指す上で更なる膜安定性を得るために、新規硫酸化両親媒性誘導体を生体構成要素であるホスファチジルコリンとコレステロール (モル比 10:1) からなるリポソームに組み込むことで達成しようと考えた。その混合膜の安定性、形成能または混和性を確認するために 3 種の両親媒性物質のクロロホルム混合溶液を純水上に撒き、その単分子膜の π - A 曲線から評価した。合成した α 、 β 、 γ それぞれの新規両親媒性 CD をモル比で 2~27%まで振り、崩壊圧とある一定表面圧での分子占有面積を評価することで検討した。 α 誘導体はモル比 4~8%、 β 誘導体はモル比 2~8%、 γ 誘導体はモル比 2~4%の範囲で高い膜崩壊圧が確認され、この相違は CD の分子の大きさに由来している。一定表面膜圧の分子占有面積からの評価では完全な混和性は確認できなかったが、崩壊圧等から安定した単分子膜の形成を確認することができた。 α 、 β 、 γ 誘導体それぞれにおいて十分な膜安定性を示したモル比 4%に関してドラッグキャリアーを目指したリポソームの形成を試み、それぞれの α 、 β 、 γ 誘導体含有リポソームのサイズや形状を TEM を用いて検討した。それぞれ $100\sim 300\mu\text{m}$ 、 $100\sim 400\mu\text{m}$ 、 $150\sim 400\mu\text{m}$ のサイズの球状であり、これらはドラッグキャリアーとして十分な大きさであると考えられうる。またキャリアー分子としての性能の評価として内水層中にドラッグを模した蛍光物質カルセインを含抱させ、 4°C 、 37°C でそれぞれを培養した一定時間毎におけるリポソームからリリースされたカルセインの量を測定した。 4°C ではリポソーム膜の流動性が低いため内在カルセインのリリース量はほとんど見られず、 37°C で培養したリポソームは α 、 β 、 γ の順にリリース量が減少している。このことから CD の種類を変えることでリリース量をコントロールできることが示唆される。この様に有用な DDS 用キャリアーの構築に成功した。

また両親媒性 CD の親水性部位へ糖鎖を導入することを試みた。両親媒性 CD の水酸基に脱離基であるトシル基を導入し、エチレンジアミンを SN_2 反応によって親水性部位へ導入した。また、シアル酸の 2 位にスパーサーを介してカルボキシ基を導入した誘導体を合成した。CD の親水性部位のアミン基とカップリングし、シアル酸を有する両親媒性 CD の合成に成功した。さらに、脱離基としてヨウ素を導入した両親媒性 CD 中間体を合成し、ガラクトースのアノマー位にスパーサーを介してチオール基を導入した誘導体をカップリングしてガラクトースを有する両親媒性 CD の合成にも成功した。これら糖鎖を有する両親媒性 CD をホスファチジルコリンとコレステロールから成るリポソーム膜内に導入することで様々な標的部位へドラッグを輸送できるキャリアー分子を構築することが可能となる。

以上の研究により、申請者は効率的な新規両親媒性 CD の合成に成功し、またドラッグキャリアーとしてのターゲッティング能を有する CD 含有リポソームの開発に成功した。今後、この新規ドラッグキャリアーは薬剤学において大きな貢献をもたらすと期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 紳一郎

副 査 教 授 山 岸 皓 彦

副 査 教 授 坂 入 信 夫 (大学院地球環境科学研究科)

副 査 助 教 授 門 出 健 次

学 位 論 文 題 名

Synthesis and characterization of cyclodextrin-based amphiphiles

(シクロデキストリンを基盤とする
両親媒性化合物の合成と性質に関する研究)

シクロデキストリン (CD) は天然に微生物が産生する環状オリゴ糖である。一般的にはホスト-ゲスト化学におけるホスト分子として広く知られ、化粧品や食料品等の添加剤としても知られた分子である。しかし、本研究においては機能性分子の集積するための土台として利用した。この CD に脂質を導入して集積した機能性分子を生体膜やリポソーム等に添加することで、膜上でのクラスター化した機能性分子の機能の評価や、新規のドラッグキャリアーが構築できると期待される。リポソームはドラッグデリバリーシステムのドラッグキャリアーとして注目を集めている。しかし、リポソーム膜表面をターゲティング能を付加させるために糖脂質等を導入しようと試みられているが、リン脂質膜から成るリポソーム中に 25 モル%以上導入したものは不安定で構築が困難である。本研究で合成した新規両親媒性 CD は低濃度でも局所的に高密度で機能性分子をリポソーム膜に組み込むことが可能であり、ターゲティング能の向上ばかりでなく標的のレセプターとリポソームのリガンドとの接着においてクラスター効果も期待される新規の高性能なドラッグキャリアーの構築が可能である。

このような背景にあって申請者は、効率的に新規両親媒性 CD を構築する方法を開発し、またその単分子膜形成能とリポソーム形成能について評価した。本論文は 6 章からなりその内容は以下のように要約できる。

第 1 章では、一般的な CD の利用法と新規両親媒性 CD の有用性について述べている。

第 2 章では、硫酸化両親媒性 CD の合成方法について述べている。全ての一級水酸基を位置選択的に TBDMS 基で保護し、パルミチン酸無水物を用いて、二級水酸基一個あたり約 5 倍等量の試薬を連続的に反応中に投与し、また反応溶液中の脂質の濃度を希薄にする

ことでパルミトイル基を均一に導入した。その後、一級水酸基をケイ素と親和性のあるフッ素含有ルイス酸により選択的に脱保護することで両親媒性 CD を調整した。その親水性部位に存在するフリーの水酸基全てに $\text{SO}_3 \cdot (\text{CH}_3)_3\text{N}$ complex を用いて硫酸基を導入することで新規アニオン性両親媒性 CD の合成に成功した。

第3章では、シアル酸を有する両親媒性 CD の合成について述べている。第2章で述べた両親媒性 CD の水酸基に脱離基であるトシル基を導入し、エチレンジアミンを SN_2 反応によって親水性部位へ付加し、CD 誘導体とした。また、シアル酸は末端にカルボン酸を持ったスペーサーを付加させて、シアル酸中間体とした。これらの CD 誘導体の親水性部位のアミノ基とシアル酸中間体のカルボン酸をカップリングし、シアル酸を有する両親媒性 CD の合成に成功した。

第4章では、ガラクトースを有する両親媒性 CD の合成について述べている。CD 誘導体はまず脱離基としてヨウ素を導入し、二級水酸基に脂質を付加させて合成した。ガラクトース中間体はアノマー位に末端にチオアセチル基を持ったスペーサーを付加させてガラクトース中間体とした。これらの CD 誘導体とガラクトース中間体をカップリングしてガラクトースを有する両親媒性 CD の合成に成功した。

第5章では、第2, 3, 4章で合成した両親媒性 CD の単分子膜形成能やリポソーム形成能について述べている。硫酸化両親媒性 CD は単独で単分子膜を形成するだけでなく、一般的に糖脂質単独では形成することが難しいとされるリポソームをも形成することがわかった。その大きさは α -CD 誘導体リポソームのサイズは 100nm 前後であり、 β 誘導体から形成したものは 100~400nm と大きめであることが確認され、 γ 誘導体に関しては 200~500nm のサイズであることがわかった。また、ドラッグキャリアーが期待されるような両親媒性 CD 含有リン脂質リポソームを構築した。まず単分子膜を用いて成分の混和性と成分比の変化による膜の安定性について検討した。その結果、両親媒性 CD が 4 モル%含有するときに最も良い混和性と膜安定性があるとわかった。これに従い、両親媒性 CD を 4 モル%含有するリン脂質でリポソームを構築した。さらにこのリポソームのドラッグキャリアーとしての性能を簡潔に検討するためにリポソームに内包させたドラッグと見立てた蛍光分子の除放性について評価した。両親媒性 CD 含有リポソームは良い除放性を有し、また CD の種類を変える事によってその除放性を制御できることがわかった。これはドラッグキャリアーとして良好な性能であり、高性能なキャリアーの構築が期待できるものと考ええる。

第6章では、本文を総括している。

以上のように、申請者は両親媒性 CD の効果的な合成に成功した。これらは汎用性に富む有用なリポソームを構築することができ、ドラッグキャリアーの研究等に大きく貢献できるものと考えられる。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有する者と認定した。