

論文の内容の要旨

論文題目 Ligand-Installed Micelles Based on Acetal-Poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) Block Copolymers.

Preparation, Characterization and Biomedical Significance.

(末端反応性ポリエチレングリコール-ポリラクチドブロック共重合体から形成される表層に糖を有する高分子ミセルの調製とその生医学方面における重要性。)

氏名 ジュール・エドワード・エンリケ

疎水性・親水性など異なった性質のブロック構造からなるブロックコポリマーは、ポリマーミセルと呼ばれるコロイド状粒子を自発的に形成する事が知られている。そして形作られる core-shell 構造では、疎水性鎖で形成される密なコア部が親水性鎖による外殻によって覆われることで、難溶性薬物の高濃度での封入や薬物の効果的な運搬が可能である。ポリマーミセルの有するこのような利点によって、癌治療などにおいて、病的部位への効果的な薬物集積が可能となり、治療効率の向上が得られる。高分子ミセルの重要な特徴は、100nm を越えない数十ナノスケールの微小粒子であること、また低い臨界会合濃度 (c.a.c.) を有し、非常に安定なことである。これらの因子は、血流中での long circulation、またそれによる標的部位への効率的な集積を可能ならしめており、本質的に重要である。

ガン細胞は非常に早く増殖するため、癌治療においては継続的な薬物投与が必要となる。このことが、癌治療における化学療法を煩雑化させ、好ましくない副作用を引き起こす原因となる。このような観点から、キャリアーとしての高分子ミセルに対し、標的部位の認識において重要となる分子を組み合わせることで、そのキャリアーの標的部位への効率的な集積と標的部位との接触時間を延長させ、治療効率の向上が可能となる。

本研究では、表層に糖鎖を配した高分子ミセルの調製、物性評価、並びにその多岐にわたる生理学的重要性について論じる。ミセル表層の糖鎖修飾によって、糖を特異的に認識する肝臓への active targeting の獲得の可能性を探る。レセプター介在型エンドサイトーシスの誘発によって、そのような標的デバイスを有さないキャリアーに対する優位性を期待する。

Acetal-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) (Ac-PEG-PLA) ブロック共重合体をワ

ン・ポット開環アニオン重合により合成した。PEG と PLA のブロック比率を変えて合成されたポリマーから調製されたミセルは、その組成比に支配された粒径依存を示した。ラクトース分子のミセル表層への導入は還元アミノ化プロセスによって行われ、粒径や組成に変化は与えなかった。

高分子ミセルは安定な微小分子会合体であるが、溶液中において、ミセル内でのポリマー鎖の交換反応が起こる。これに関しても基礎的な理解が必要であり、その性質を明らかにするべきである。この高分子ミセルの溶液中における交換反応は、これら微小分子会合体である高分子ミセルのコアに、環境応答性の蛍光標識を施すことで評価され、ドラッグデリバリーシステム (DDS) の設計に向けて興味深い特性を示した。

レクチンは有機タンパク質と結合し、細胞の接着、糖分子の不溶化、また特に糖を認識し、多くの生物学的プロセスに関与する。そこで、細胞表面の糖レセプターのシミュレーションとして、また同様の糖レセプターを有する細胞存在下でのラクトース導入 PEG-PLA 高分子ミセル (Lac-micelles) の挙動を再現する手法として、レクチンを用いた。このような評価を行う意味深い手法として、表面プラズモン共鳴を適用した。この技術を用いることで、レクチンの金表面への固定化と、構築されたタンパク質層へ、高分子ミセルをパルスパターンで注入する事が可能である。ミセル表面のラクトースとレクチン上の糖レセプター間の特異的な相互作用によって、Lac-micelles は、このタンパク質に対してごく特異的に結合すると思われる。さらに、そのコンプレックス形成の強度は、糖修飾されていないミセルで起こる非特異的な吸着に比べて、数オーダー高いものである。一方で、高分子ミセルは、高いポリマー濃度においては、明らかにノイズとは区別される強い応答が得られるものの、臨界会合濃度 (c.a.c.) 域では、わずかな結合能を示した。したがって、溶液中の高分子ミセルの構造や結合能は、それ以下においてミセルが解離してしまう濃度である c.a.c.と関連づけられる。Lac-micelles のレクチン層への結合は多価結合で順次起こり、その強い応答が平衡状態において得られる。そして、この強い結合はその表面における臨界のリガンド濃度と考えられる部分において得られるものである。

観測されたデータをシミュレーション・ソフトウェアと fitting しながら、動的な評価も SPR によって行われた。その結果、多価結合による Lac-micelles のレクチン層との結合は、理論的には低い解離定数を呈した。80%のリガンド濃度を有するミセル (Lac-micelles 80% 100 ポリマー鎖当たり 80 のラクトース) は迅速な結合を示した ($k_{\text{on}}=3.2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)。しかしながら、一方で極めて遅い解離も呈した ($k_{\text{off}}=1.3 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$)。計測されたセンサーグラムはトリバレントな結合モデルと fitting され、その平衡解離

定数 ($K_{D1} = k_{d1} / k_{a1}$) は、一般的なウイルスの値と近い 4nM となった。この協同的な結合の重要性についても、異なるリガンド密度を有する Lac-micelles を調製することで、またそれらについて後者の動的定数を議論することで、検討を行った。興味深いことに、Lac-micelles80 では、タンパク質層に対してトリバレントに結合するのに対し、Lac-micelles20%では、わずかにではあるが ($K_{D1}=1360$ nM) 同じタンパク質層に対してバイバレントな結合能を有した。したがって、各場合において有利な結合によって向上する動的定数であるが、分子的レベルでは低いリガンド密度であるほどより効果的であると思われる。

最後に、株化ヒト肝ガン細胞の培養において Lac-micelles をインキュベートし、その前後での取り込みを評価した。ラクトース・リガンドの、レセプター介在型エンドサイトーシスによる取り込みに対する影響を調べるため、Ac-PEG-PLA micelles (Ac-micelles) をコントロールとして用いた。ここで述べる結果は、未だ予備的段階であり、現在継続して行っている最初の実験結果を反映するものでしかないが、Lac-micelles による取り込みの促進が示唆されている。この取り込みの促進は、ミセル表面のラクトース分子と、細胞表面に存在するアジアロ糖タンパク質レセプター間での特異的な認識、それに追従するコンプレックス形成によるものであると考えられる。前述のシュミレーションを信頼する限り、このコンプレックス形成は非常に急激に起こり、ナノ濃度域において極めて強いコンプレックスを生み出している。