



Title	Studies on Unimer Nanoparticles Composed of Hydrophobized Poly(γ - glutamic acid) as Drug Carriers for Cancer Therapeutics
Author(s)	Piyapakorn, Phassamon
Citation	大阪大学, 2014, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/34448
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Phassamon Piyapakorn)	
Title	Studies on Unimer Nanoparticles Composed of Hydrophobized Poly(γ -glutamic acid) as Drug Carriers for Cancer Therapeutics (抗がん剤キャリアとしての疎水化ポリ (γ -グルタミン酸) ユニマーナノ粒子に関する研究)
<p>Abstract of Thesis: Various types of synthetic carriers as well as biocompatible/biodegradable molecules have been widely employed as anti-cancer agent in cancer therapeutics. One of the unique properties of amphiphilic random copolymers is their ability to form unimolecular (unimer) nanoparticles with intra-polymer associations. Recently, there has been growing research on the methods to control the single chain state, but a few studies have focused on their applications as carriers for cancer therapy. In a previous study, nanoparticles composed of hydrophobic moieties of L-phenylalanine (Phe) grafted onto poly(γ-glutamic acid) (γ-PGA) main chains were prepared. Recently, it has been demonstrated that the size of the nanoparticles plays a critical role in controlling immune responses. Therefore, the fabrication of unimer nanoparticles consisting of the amphiphilic graft copolymer (γ-PGA-Phe) is one of the major challenges. The objective of this thesis is to fabricate "unimer nanoparticles" by controlling the aggregation number of γ-PGA-Phe. This thesis includes the following 3 Chapters.</p> <p>In Chapter 1, the formation of γ-PGA-Phe unimer nanoparticles was studied by focusing on the physical factors that control the intrapolymer hydrophobic interactions of Phe for single chain state, such as the molecular weight of the initial polymers balanced against their hydrophobicity of side chain. γ-PGA-Phe unimer nanoparticles were prepared by tuning the hydrophilic-hydrophobic balance of the graft copolymers. A key step in controlling the aggregation number for the formation of unimer nanoparticles is to balance the hydrophobic-hydrophilic moieties in the polymer chain with the help of preparative methods in dilute conditions.</p> <p>In Chapter 2, as the stability of drug incorporation, the drug loading efficiency as well as the release behaviors can be affected by the structure of inner particles. Therefore, the morphologies and the inner structures of the obtained γ-PGA-Phe unimer nanoparticles are further investigated. A structural analysis of unimer nanoparticles measured by small-angle neutron scattering confirmed the existence of this unimer state forming spherical core-shell structures. Interestingly, inner core of 10 nm unimer nanoparticles estimated by means of fluorescence quenching techniques showed their density (the total number of hydrophobic domain per volume) higher than large-sized nanoparticles. Moreover, the stability of the unimer nanoparticles against pH revealed that the hydrophobic domains were formed at pH values ranging from pH 3-10.</p> <p>In Chapter 3, in order to enhance the abilities to control the intra-molecular associations for effective drug control release, unimer nanoparticles having stimuli-responsive properties were prepared by introducing L-cysteine (Cys) onto γ-PGA-Phe copolymers. The unique side chains provide self-assembly of unimer nanoparticles by hydrophobic interactions and disulfide bonds in aqueous solution. For the potential application as drug carriers for cancer treatment, two types of anti-cancer drugs; cisplatin and irinotecan were employed as model drugs. It was observed that 10-nm γ-PGA-Phe unimer nanoparticles showed higher drug absorption than large-sized nanoparticles due to the higher surface per volume ratio and the optimal inner particles. The amount of drug-loading for stimuli-responsive γ-PGA-Phe-Cys unimer nanoparticles was comparable to non-stimuli-responsive γ-PGA-Phe unimer nanoparticles. However, after treatment with reducing agent, the release of drug was observed only from stimuli-responsive types due to the reduction of disulfide bonds affected the formation of hydrophobic domains formed by low grafting degree of Phe.</p> <p>Finally, it is expected that biodegradable unimer nanoparticles as well as stimuli-responsive unimer nanoparticles possessing several advantages associated with their specific size and structure, for example, large surface to volume ratio relative to larger-sized particles which is possible to more efficiently entrap target molecules, and be capable of control their release behavior of entrapped therapeutic drugs, can be an interesting candidate as a solubilizer and carrier for hydrophobic drugs, especially targeted cancer therapies.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Phassamon Piyapakorn)			
論文審査担当者	(職)		氏 名
	主 査	教 授	明石 満
	副 査	教 授	井上 佳久
	副 査	教 授	安蘇 芳雄
	副 査	教 授	三浦 雅博
	副 査	教 授	茶谷 直人
	副 査	准 教 授	安田 誠
	副 査	教 授	神戸 宣明
	副 査	教 授	生越 専介
	副 査	教 授	関 修平
	副 査	教 授	真嶋 哲朗
	副 査	教 授	芝田 育也

論文審査の結果の要旨

両親媒性のランダム共重合体のユニークな特徴として、高分子鎖内での疎水性相互作用により、1本の高分子鎖からなるユニマーナノ粒子の形成が報告されている。ユニマーナノ粒子はその構造やサイズの特徴から、ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用が期待されており、低分子薬剤等のキャリアとしての機能化されたナノ粒子の設計が注目されている。本学位論文では、親水性ポリアミノ酸であるポリ (γ -グルタミン酸) (γ -PGA) に疎水性アミノ酸の L-フェニルアラニンエチルエステル (Phe) を導入した疎水性 γ -PGA (γ -PGA-Phe) からなる生分解性のユニマーナノ粒子を調製し、得られたユニマーナノ粒子の物性評価、構造解析を行い、疎水性薬物に対するキャリアとしての機能評価を目的としたものであり、主な成果を要約すると以下の通りである。

一章では、Phe 導入率の異なる疎水性 γ -PGA を合成し、ユニマーナノ粒子形成に対する γ -PGA の分子量および Phe 導入率の効果を明らかにしている。その中で、Phe 導入率が 30-40% 程度の γ -PGA-Phe において粒径 10 nm 程度のユニマーナノ粒子の調製が可能であり、粒子内部での Phe 会合による疎水性ドメインの形成を見出している。

二章では、 γ -PGA-Phe からユニマーナノ粒子の構造解析に関して、粒子内の疎水性ドメインの分布と数を Steady-state fluorescence quenching 法により算出し、電子顕微鏡観察および小角中性子散乱 (SANS) 測定によるユニマーの形態を評価している。ユニマーナノ粒子の内部構造は、 γ -PGA-Phe 1 本鎖内の Phe が 100-200 程度会合することで 1 つの疎水性ドメインを形成し、粒子内部には 3-7 個のドメイン形成により粒子が安定化されていることが明らかにされている。

三章では、前章で得られた γ -PGA-Phe ユニマーナノ粒子に加え、細胞内環境に応答する刺激応答性ユニマーナノ粒子を合成し、疎水性薬剤である抗がん剤のキャリアとしての機能を評価している。細胞内の還元環境下に応答する部位として、 γ -PGA-Phe に L-システイン (Cys) を導入した γ -PGA-Phe-Cys を合成し、疎水性相互作用とジスルフィド結合を介したユニマーナノ粒子の調製に成功している。また、 γ -PGA-Phe および γ -PGA-Phe-Cys ユニマーナノ粒子は抗がん剤であるイリノテカン効率よく吸着することが可能であり、 γ -PGA-Phe-Cys ナノ粒子においては、還元環境下に応答した薬物放出挙動を明らかにし、抗がん剤キャリアとしての有用性を実証している。

以上のように、本論文は疎水性 γ -PGA の会合制御に基づいたユニマーナノ粒子の創製と薬物キャリアとしての有効性を明らかにしている。ポリアミノ酸からなるユニマーナノ粒子は、そのサイズ・構造・機能的観点から、人工蛋白質として捉えることができ、抗がん剤などの難溶性薬剤に対する可溶化剤や放出徐放担体として有用であり、新規な機能性抗がん剤キャリアの開発に向けて重要な知見を与えるものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。