



Title	シアリルオリゴ糖修飾高分子多糖を利用した能動的薬物送達に関する研究
Author(s)	阪上, 昌浩
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42818
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	坂上昌浩
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 15794 号
学位授与年月日	平成12年12月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	シリアルオリゴ糖修飾高分子多糖を利用した能動的薬物送達に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正 (副査) 教授 北 泰行 教授 今西 武 教授 真弓 忠範

論文内容の要旨

E-セレクチンは炎症局所で産生された $IL1\beta$ 、 $TNF\alpha$ などのサイトカインの刺激により血管内皮細胞に特異的に発現するセレクチンファミリーに属する接着分子で、白血球の炎症部位への特異的な浸潤・遊走、炎症状態の増悪に関与している。

このE-セレクチンのリガンドとしては、シアリルルイスX (Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4 (Fuc α 1 \rightarrow 3) GlcNAc、以下、SLe^xと略す。) と呼ばれる糖鎖が知られているが、生体内では白血球上に発現しているSLe^xとE-セレクチンが相互作用することにより、血流中の白血球が血管内皮細胞に転がる「ローリング」と呼ばれる現象を引き起こし、これが引き金となり、白血球の炎症部位への浸潤・遊走を引き起こすことが明らかにされている。

著者は、E-セレクチンが炎症性刺激を受けた血管内皮細胞に特異的に発現することから、E-セレクチンを標的にすることにより炎症部位などの病巣への薬物送達システム (Drug Delivery System, 略してDDS) を構築できる可能性があると考え、本研究を開始した。

E-セレクチンへのターゲティングDDSのための認識素子としては、そのリガンドであるSLe^xが候補であるが、以下の2点 [i] SLe^xは低分子、高水溶性であるため速やかに糸球体ろ過されてしまう。ii) 一般にオリゴ糖は生体内のグリコシダーゼに対し不安定。] から、SLe^x単独を認識素子として利用することは困難であることが予想された。

一方、分子量が7万を超えるカルボキシメチル化キトサン (CMキトサン)、カルボキシメチル化プルラン (CMプルラン) などの高分子多糖が腫瘍へのDDSに有用であることが報告されている。例えば、抗がん剤であるドキソルビシンをCMプルランに導入した複合体はドキソルビシン単独に比較して、約5倍の治療係数の向上が認められている。この効果は、以下の2点 [i] 薬物を高分子担体に導入することにより血中滞留性が向上し、腎排泄を受けにくくなったこと。ii) 固形腫瘍の血管系においては、高分子物質の透過性と滞留性が向上すること。] の理由で腫瘍へ薬物が集積したためであると説明されるが、炎症部位においても血管透過性が向上しているため、SLe^xを高分子担体に導入することにより、E-セレクチンとの相互作用、血中滞留性の向上の他に、抗がん剤の薬物送達で見られた同様な効果も期待できると思われる。

以上のことから、著者は3種の高分子多糖 (CMキトサン、CMプルラン及びN-脱硫酸化ヘパリン) にSLe^xを修飾した化合物を合成し、それらの炎症部位を標的としたDDS担体としての有用性を評価することとした。

まず、著者はシリアルオリゴ糖修飾高分子多糖の合成法を確立することにより、SLe^xならびシアル酸 (Neu5Ac)、

シアリル-N-アセチラクトサミン (SLN, Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc β 1、E-セレクトチンと結合しないと報告されている。)、シアリル α 2-6ルイスX (Neu5Ac α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4 (Fuc α 1 \rightarrow 3)GlcNAc) を高分子多糖に修飾した化合物を合成することができた。なお、この合成法の検討の過程で、トリアルキシルシランと酸の種類を適切に選択することにより、4, 6位水酸基がベンジリデン環で保護されたピラノース型糖誘導体を6-O-ベンジル体 (反応条件; Et₃SiH (or PS-DES™/TfOH) あるいは4-O-ベンジル体 (反応条件; Et₃SiH (or PS-DES™/PhBCl₂)) に位置選択的に効率よく変換できることを明らかにした。糖鎖の化学合成においては、保護基の脱着を効率的に行うことは重要であるが、本反応は種々のオリゴ糖の合成において有効な反応であると考えている。

続いて、SLe^x修飾高分子多糖の炎症部位への移行性を急性炎症モデルの一つであるマウスアラキドン酸耳介浮腫モデルを用いて評価したところ、SLe^x修飾CMキトサン、SLe^x修飾CMプルラン、SLe^x修飾脱硫酸化ヘパリンのAUC0-24hは、それぞれSLe^x単体 (高分子多糖に導入していない化合物) の60倍、25倍、300倍と著しく向上することが明らかとなった。また、SLe^x修飾CMプルランはSLN修飾CMプルランとの比較においても、炎症部位への移行量 (AUC0-24h) が約2.5倍増大することが明らかとなり、これらの結果より、SLe^x修飾高分子多糖が炎症部位への薬物送達において有用なDDS担体であること、およびE-セレクトチンとそのリガンドであるSLe^xとの認識機構がターゲティングDDSに利用できることを示すことができた。

さらに新知見として、上記の体内分布実験の過程で非修飾のCMプルランも含めていずれの糖修飾CMプルランも脾臓ならびに各種リンパ節に著しく集積することが明らかとなった (特にSLe^x修飾CMプルランは他の修飾体 비해約2倍もの高い集積性を示した。) が、次に糖修飾CMプルランが脾臓およびリンパ節へのDDS担体として応用できるか否かを評価すると共に、免疫抑制剤を脾臓およびリンパ節へ集積させることによる治療係数が向上するか否かを検討する目的で、新規免疫抑制剤であるPA-48153CをCMプルランに導入した化合物を合成し、その薬効をラットアジュバンド関節炎モデルにて評価したところ、PA-48153Cと比較して、治療係数が向上することが明らかとなった。

以上の検討からSLe^xのならびにSLe^x修飾高分子多糖の有用性を示すことができたが、SLe^xは大量合成することが困難であることから、安価で入手容易なアミノ酸 (グルタミン酸) を利用したSLe^xミミックの合成を行ったところ、SLe^xよりも大幅に簡略化した化合物でも *in vitro* 活性があることが明らかとなり、さらにラットカラゲニン胸膜炎モデルにて好中球の浸潤を抑制することが明らかとなった。本研究は糖鎖簡略化の一手法を提示することができた研究であると考えている。

論文審査の結果の要旨

E-セレクトチンは炎症局所で生産されたサイトカインの刺激により血管内皮細胞に特異的に発現する接着分子で、白血球上に発現しているリガンドのシアリルルイスX (SLe^x) と相互作用することにより、白血球の炎症部位への浸潤・遊走を引き起こすことが明らかにされている。また、高分子多糖が血中滞留性を向上し腎排泄を受けにくいことから、申請者はSLe^xを高分子多糖に導入することによりE-セレクトチンとの相互作用、血中滞留性の向上が期待できると考えた。そこで、3種の高分子多糖 (CMキトサン、CMプルラン及びN-脱硫酸ヘパリン) にSLe^xを修飾した化合物を合成し、炎症部位を標的としたDDS担体としての有用性を評価している。

本論文では、まず、シアル酸、SLe^xやそのアナログをリンカーを介してCMキトサン、CMプルラン及びN-脱硫酸ヘパリンに修飾した種々の高分子多糖を合成している。また、合成手法の確立の段階で糖の4, 6ベンジリデン基の位置選択的開環反応を見出している。さらに、これらのシアリルオリゴ糖修飾高分子多糖の体内分布を調べる目的でそれぞれのトリチウムラベル体を合成している。そして、マウスアラキドン酸耳介浮腫モデルを用いて炎症部位移行性を検討した結果、SLe^x修飾高分子多糖が他の修飾体 비해移行性、特異性の両面で優れていることを明らかにしている。また、SLe^x修飾CMプルランが糖鎖特異的に脾臓に集積することを見出した。さらに、ラットアジュバンド関節炎モデルでも検討した結果、炎症部位への移行性は認められなかったが、糖修飾CMプルランが脾臓、リンパ節に著しく集積することを見出している。また、SLe^xは大量合成が困難であることから、SLe^xを簡略化した化

化合物の合成も行っている。その結果、2個のフコースをリンカーを介してグルタミン酸に結合させた化合物でも E-セレクトインとの結合能を有することを見出している。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。