

令和元年6月7日現在

機関番号：53203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14495

研究課題名(和文) マイコバクテリアを標的とする両親媒性糖鎖高分子型DDSキャリアの開発

研究課題名(英文) Preparation of glycopolymer micelle for DDS carrier against mycobacterium

研究代表者

福田 知博 (Fukuda, Tomohiro)

富山高等専門学校・その他部局等・助教

研究者番号：30611917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：マイコバクテリウム属細菌に対する新たな治療法開発を目的とし、本研究では新規糖鎖高分子型DDSキャリアの開発を行った。

マイコバクテリアに対する分子認識特性を有するトレハロースを導入した両親媒性糖鎖高分子をワンポットで合成した。合成した糖鎖高分子は水溶液中で数百nmサイズの微粒子を形成し、疎水性分子を内包することが可能であった。また、糖鎖高分子に由来する糖多価性に基づいた分子認識特性を示し、マイコバクテリウム属細菌に対する標的指向性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、多剤耐性菌の出現等により再び注視されている結核菌は、マイコバクテリウム属を代表する細菌である。本研究で開発した標的指向性および分子内包性を有する両親媒性糖鎖高分子によるミセル状キャリアは、モノマー濃度の調節により粒子径(分子内包空間)や分子認識性を容易に調節されることが示されており、目標とする菌体に対して選択的かつ適量の薬剤を送達することができるDDSキャリアとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this research, nanosized carrier which composed of amphiphilic glycopolymer was developed for drug delivery system against various mycobacteria.

Amphiphilic glycopolymer with trehalose ligands which is known to interact with mycobacterium specifically was synthesized through one-pot reaction. The amphiphilic glycopolymer formed micellar nanoparticle with a diameter of 200-400 nm in aqueous media, and the particle was capable of inclusion for hydrophobic molecules. The recognition assay implied that micellar nanoparticles had the recognition capability to lectin and even mycobacterium.

研究分野：高分子化学

キーワード：糖鎖高分子 ポリマーミセル トレハロース ワンポット合成 マイコバクテリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞表面の糖鎖は特異的な分子認識能を持ち、細胞と種々の外部生体分子との生体情報伝達を仲介している。認識される生体分子には毒素やウイルスなどの病原性のもも含まれており、多くの疾病の発症に糖鎖は関係している。そのため糖鎖を利用した創薬や診断法の開発も試みられているが、その分子認識は一般的に多価集合化により向上することから(糖多価効果)特に糖鎖高分子などの糖クラスターを利用した研究が進んでいる。

多剤耐性菌の出現や副作用低減を目的に、結核菌に代表されるマイコバクテリウム属細菌が引き起こす疾病に対する新たな治療法開発が望まれている。マイコバクテリウム属細菌の表面は、トレハロースが結合したミコール酸からなる糖脂質膜で覆われている、しかし、その菌体自身ではトレハロースを合成できず、膜外からトレハロースを輸送するためのトランスポーターが膜表面に存在する。近年、このトランスポーターがトレハロースによる分子認識ターゲットとなりうることが報告されたが、その詳細は未解明であり、それを応用した機能性材料を設計するまでには至っていない。

2. 研究の目的

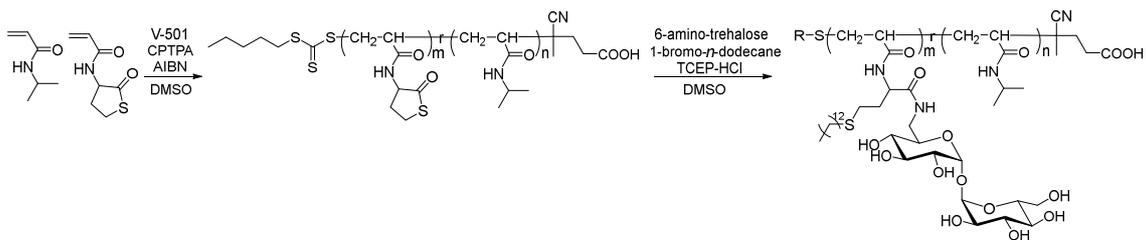
先に述べたようにマイコバクテリア属細菌の新たな治療法開発のためにトレハローストランスポーターは1つのターゲットとなる。このトランスポーターに対する高い標的指向性を持たせるためには、トレハロースを含む糖クラスターを設計し、多価効果がどのように分子認識に反映されるか調べるのが重要である。また、設計した糖クラスターがどのような分子輸送能力を有するかを調べることも薬剤送達機能を評価する上で必須となる。よって、本研究では両親媒性トレハロースを糖鎖高分子化の手法と組み合わせることにより、Drug delivery system(DDS)に利用可能な分子輸送キャリアを簡便な手法により開発すること、および糖多価効果に基づいた高い標的指向性を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) チオラクトン高分子の合成と重合後修飾反応による分子導入反応の検討

はじめにチオラクトン環を持つアクリルアミド型モノマー(TIa)、および逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)剤 4-cyano-4-[(pentylsulfanylthiocarbonyl)sulfanyl]pentanoic acid (CPTPA)を合成した。CPTPA に対して併せて 100 当量となる TIa および NIPAm モノマー(TIa / NIPAm = 1/8 (12.5%), 1/4 (25%), 1/2 (50%))、およびラジカル開始剤 V-501 を加え、脱気条件下、DMSO 中 70°C で 1 日間攪拌し、ランダム共重合を行った(Scheme1)。

続いてこのプレポリマーに対して、別途合成した 6-アミノトレハロース(4.5 eq.)、トリエチルアミン(NE₃ 1.5 eq.)、Tris(2-carboxyethyl)phosphine 塩酸塩 (TCEP;1.5 eq.)を加えて 70°C で 24 時間攪拌した。続いて、この反応液に種々のプロモアルカン (6 eq.)、NE₃ 1.5 eq、TCEP 3 eq.を加えて更に 70°C で 24 時間攪拌するワンポット反応を行った。



Scheme 1 チオラクトンポリマーを経由する両親媒性糖鎖高分子の合成

(2) 両親媒性糖鎖高分子の集合微粒子形成能に係る検討

得られたトレハロース含有両親媒性糖鎖高分子を水中に分散し、集合体形成能に係る評価を行った。分子集合体の粒子径について、動的光散乱光度計(DLS)を用いて 25°C および 45°C で温度変化させつつ評価した。また、水中における分子集合体の内包機能については疎水性蛍光分子 8-anilino-naphthalene-1-sulfonic acid (ANS)を用いて蛍光分光光度計で評価した。

(3) 両親媒性糖鎖高分子の分子認識能に係る検討

水中に分散したミセル状のトレハロース含有両親媒性糖鎖高分子の基礎的な分子認識能について、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識されたタチナタマメレクチン Concanavalin A (Con A)を用いることで調べることとした。キュベットセルに入れた 0.1 μM FITC-Con A 水溶液 3mL にミセル状の両親媒性糖鎖高分子 1 mM (糖濃度) 水溶液を順次滴下し、励起波長 490 nm で 520 nm における蛍光強度の変化を調べた。

また、蛍光分子を内包した両親媒性糖鎖高分子を調製し、マイコバクテリウム属 *Mycobacterium Smegmatis* に対する分子認識能を蛍光光度分光分析によって調べた。(2) で疎水性蛍光分子を内包させたミセル状の両親媒性糖鎖高分子を暗所で純水を用いて透析した後、凍結乾燥した。糖濃度を 1 μM とした ANS 内包両親媒性糖鎖高分子 PBS 水溶液 3 mL をキュ

ベットセルに入れ、希釈した *Mycobacterium Smegmatis* (NBRC3157 株) を含む PBS 水溶液を順次滴下し、ANS の蛍光強度の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) チオラクトン高分子の合成と重合後修飾反応による分子導入反応の検討

T1a/NIPAm のランダム共重合反応後、ジエチルエーテルを用いた遠沈精製により、僅かに黄色がかった粉末状のチオラクトン高分子をプレポリマーとして得た。反応はほぼ定量的に進み、また ¹H-NMR および GPC 測定評価により重合度はほぼ目標値通りで分散度は低く、T1a の導入率もほぼ仕込み比に近い値で重合が完了したことが確認された。

また、続く重合後修飾反応後では、プロモアルカンとして、1-bromo-*n*-dodecane、1-bromo-*n*-octane、1-bromo-*n*-butane を用いた。いずれも透析膜に移し、DMSO、メタノール、純水の順にそれぞれ浸漬、透析処理を行うことにより精製した後に凍結乾燥し、白色粉末を得た。¹H-NMR で測定評価したところ、導入されたチオラクトン環が反応により全て開環し、トレハロースおよびアルキル鎖がチオラクトン環の導入率に基づいて定量的に導入されたことが確認された。

(2) 両親媒性糖鎖高分子の集合微粒子形成能に係る検討

(1) で得られた化合物のうち、ドデシル基を導入したのについて以下に結果を述べる。両親媒性糖鎖高分子について、水溶液中において形成されるミセル状集合微粒子について 1 mg/mL で DLS にて評価したところ、T1a 導入率が高い程大きな微粒子を形成することがわかった。また、温度応答性の NIPAm を導入しているものの、温度上昇による粒子径の減少はわずかであり、明確な相転移温度を示さないことがわかった (Table 1)。

また、ミセル状微粒子の分子内包性を評価するため、50 μM ANS を 500 μg/mL 糖鎖高分子ミセル存在下で蛍光光度測定を行った。375 nm の光で励起した場合、ANS 単体では 520 nm の蛍光波長が得られるが、ミセル共存下では 467-470 nm の極大蛍光波長および著しい蛍光強度の上昇が示された (Figure 1)。また、ブルーシフトの割合および蛍光強度上昇は T1a 導入率増加に従って大きくなり、DLS 測定の結果と相関していた。

Table 1 糖鎖高分子ミセルの DLS 測定結果

	diameter (nm)	
	at 25°C	at 45°C
13%	239	219
25%	279	268
50%	383	378

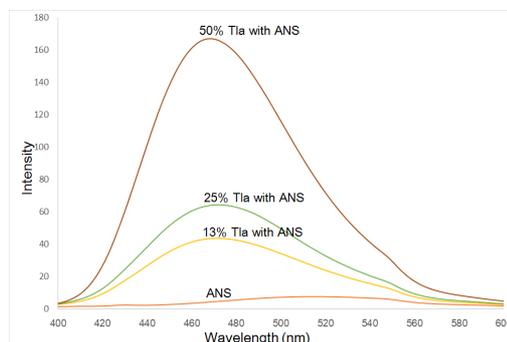


Figure 1 各ミセル共存下における ANS 蛍光強度変化

(3) 両親媒性糖鎖高分子の分子認識能に係る検討

Con A はトレハロース構造の一部であるグルコースを強く認識するレクチンとして知られる。水溶液として PBS+溶液中でミセル状のトレハロース含有両親媒性糖鎖高分子の FITC-Con A の蛍光測定評価を行った所、いずれも分子認識を示した。また、その蛍光強度変化は T1a の含有率増加に比例し、特に 25%と 50%では強く明確な分子認識を示していた。この分子認識能について、Langmuir 型の結合をしているとして Scatchard plot から結合定数を算出すると、25%では $K_a=1.69 \times 10^5$ (M^{-1})、50%では $K_a=5.33 \times 10^5$ (M^{-1})であった。

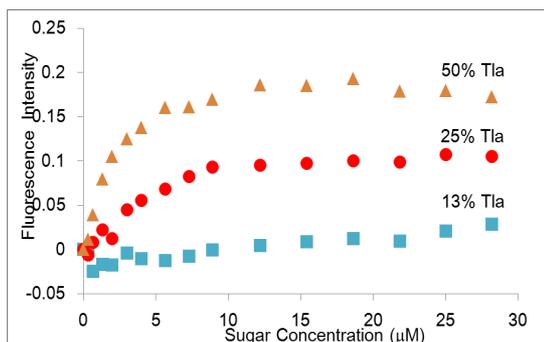


Figure 2 ミセル状両親媒性糖鎖高分子のレクチン結合評価

また、ANS を内包した両親媒性糖鎖高分子を透析後に蛍光測定したところ、463 nm 付近に ANS 内包に基づく蛍光が観測された。続いて、*Mycobacterium Smegmatis* 水溶液を順次滴下したところ、いずれの ANS 内包両親媒性糖鎖高分子においても蛍光強度が変化し、その変化量は T1a の導入率の違いにより異なることが示され、トレハローストランスポーターを標的とした場合でも一般的な糖クラスター効果が働くことが示唆された。しかしながら、菌体のみで蛍光測定を行った所、*Mycobacterium Smegmatis* は ANS 励起に使われる 375 nm の励起光により弱い自家蛍光を発することが明らかとなった。そのため、本測定結果は若干の自家蛍光の影響を受けているため、現在再度 *Mycobacterium Smegmatis* の励起波長および蛍光波長と被らない蛍光分子を用いて分子内包性および分子認識能に関わる評価を進めている。また今後菌体への分子送達性について現在評価を進めている新たな蛍光物質を用いた解析評価を進める。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Tomohiro Fukuda, Sotaro Tsuji, Yoshiko Miura, Glycopolymer Preparation via Post-Polymerization Modification using *N*-succinimidyl Monomers, Polymer Journal, 査読有, vol. 51, pp.617–625 (2019), DOI: 10.1038/s41428-019-0170-y.

Tomohiro Fukuda, Biological recognition at interfaces involving dendritic molecules, Polymer Journal, 査読有, vol. 51, pp. 535–546 (2019), DOI: 10.1038/s41428-018-0168-x.

〔学会発表〕(計6件)

福田 知博、辻 爽太郎、トレハロース含有糖鎖高分子の調製、第 67 回高分子討論会、北海道大学(北海道) 2018 年 9 月

辻 爽太郎、野口 夢乃、福田 知博、トレハロース高分子のタンパク質変性抑制機能と分子認識機能、日本化学会第 98 春季年会、日本大学(千葉) 2018 年 3 月

辻 爽太郎、野口 夢乃、福田 知博、トレハロース高分子のアミラーゼに対する相互作用評価、平成 29 年度北陸地区講演会と研究発表会、石川ハイテク交流センター(石川) 2017 年 12 月

辻 爽太郎、野口 夢乃、福田 知博、トレハロース高分子のタンパク質分子認識特性、平成 29 年度高分子学会北陸支部研究発表会、新潟大学(新潟) 2017 年 11 月

福田 知博、糖質の精密集積に基づく生体機能材料、平成 29 年度北陸地区高分子若手研究会、メイワサンピア(新潟) 2017 年 11 月

福田 知博、重合後修飾反応による糖鎖高分子の調製、第 66 回高分子討論会、愛媛大学(愛媛) 2017 年 9 月

〔図書〕(計2件)

Yoshiko Miura, Tomohiro Fukuda, Hirokazu Seto, Yu Hoshino, "Syntheses and Functions of Glycosaminoglycan Mimicking Polymers" in "Coupling and Decoupling of Diverse Molecular Units in Glycosciences" ed. by Zbigniew J. Witczak and Roman Bielski, Springer, pp. 213–224 (2018), DOI: 10.1007/978-3-319-65587-1_10

Yoshiko Miura, Tomohiro Fukuda, Yu Hoshino, "Glycoglycan Mimic by Synthetic Polymers (Chapter 3)" in "Advances in Bioinspired and Biomedical Materials Volume 2" d. by Yoshihiro Ito, Xuesi Chen and Inn-Kyu Kang, ACS Publications Volume 1253, 69–77 (2017), DOI: 10.1021/bk-2017-1253.ch003

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。