

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：14701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21655063

研究課題名（和文）：複数の糖を含む両親媒性化合物によるミセルとベシクルの開発と細胞認識特性の検討

研究課題名（英文）Development of micelle and vesicle based on amphiphilic compound bearing various sugar moieties and estimation of their cell recognition abilities.

研究代表者

坂本 英文 (SAKAMOTO HIDEFUMI)

和歌山大学・システム工学部・教授

研究者番号：10192593

研究成果の概要（和文）：

本研究では、薬剤送達システム(DDS)のカプセルとして利用するためのミセルあるいはベシクルを形成しうる両親媒性分子の開発を目指して、肝細胞に特異的に取り込まれることが知られているガラクトースを親水性部位に持ち複数の疎水性基を備えた両親媒性分子を合成し、それらの集合体形成能とその特性を調べる段階まで研究を進めた。具体的には、ガラクトースのC-1位に2,2-ビス(オクタデシルオキシメチル)-1-プロポキシ基あるいは2-ベンジルオキシメチル-2,2-ビス(オクタデシルオキシメチル)-1-エトキシ基を導入して、それぞれ化合物**1**と化合物**2**を合成した。特に、この化合物**1**について水溶液中における集合体の形状と特性を種々の分光測定と透過型電子顕微鏡により調べたところ、内水相を備えたベシクル構造と考えられる結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is the development of stable micelle and/or vesicle based on amphiphilic compounds in order to apply them to the capsule for the drug delivery system (DDS). It is well-known that galactose selectively interacts with the cell on the surface of a liver. Thus, the amphiphilic compounds composed of galactose group as a hydrophilic moiety and various lipophilic moieties were synthesized and the property of their aggregates were investigated. The glycoside bonds were formed on galactose using 2,2-bis(octadecyloxymethyl)-1-propanol and 2-benzyloxymethyl-2,2-bis(octadecyloxymethyl)-1-ethanol to give compounds **1** and **2**, respectively. It was found by using the spectrophotometry and transmission electron microscope (TEM) that the aggregate of compound **1** has the vesicle structure, which includes an aqueous phase inside.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	0	1,500,000
2010年度	1,100,000	0	1,100,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	180,000	3,380,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸・蛋白質・糖化学・自己組織化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、糖鎖を利用した研究がバイオ高分子材料の分野で盛んに取り上げられ、糖鎖工学という新たな分野が発展の様相を呈しているが、これは基本的には糖が生体内でエネルギー貯蔵物質としての単糖やオリゴ糖ばかりでなく植物の骨格を形成する多糖類等の形で存在して、生物活動の中心を担っている分子であり、さらに、最近の研究ではオリゴ糖が種々の生理活性に関わっていることが明らかになってきたことにも起因する。特に、インフルエンザウィルスが動物細胞表面のシアル酸を含むオリゴ糖の構造を特異的に認識して感染したり、エイズウィルス、ペロ毒素やコレラ毒素などは細胞表面の糖鎖に結合して細胞内に侵入することが知られており、このような糖の性質を利用して遺伝子を糖被覆ナノ粒子で覆った人工ウィルスの構築に関する研究がなされている。また、癌の増殖や転移、糖尿病、アルツハイマー病などにも糖の関わりが疑われ、糖鎖が細胞分化の分子マーカーに利用される可能性についても検討されている。ここでは一部の研究について取り上げたが、現状ではこの分野については海外よりも国内で先駆的な研究が繰り返されているといえる。以上の研究で示されるように、オリゴ糖や多糖類は生体内で特異的な認識能を示し、当然のことではあるが生体適合性に極めて優れることが理解できる。

申請者はここ数年、ミセルに関する研究に取り組み、その特性に関していくつかの研究成果を報告してきた。また、本申請年度の前年より、上記のグルコース誘導体を用いて同様の研究を進めていることが本申請の根拠となった。

## 2. 研究の目的

本研究では複数の糖に長鎖アルキル基を備えた両親媒性化合物を合成してミセルおよびベシクル、ならびに、薄膜を作製し、細胞表面との親和性、タンパクと糖の相互作用について検討するとともに、これらを利用した薬物送達システム(DDS)や生体適合性薄膜などに応用するための基礎研究を行う。具体的には、出発原料としてD-グルコースの1-位の水酸基にアクリルオキシエチルを付与した化合物を用いて、これらのモノマーあるいは不飽和結合の付加重合反応により得たオリゴマーに長鎖アルキル基を付与したもので、上記のミセル、ベシクルそれに薄膜を作製する。さらに、これらの集合体の生体細胞認識能と作用特性について検討することで、動物細胞に直接アプローチできるDDS用の薬剤キャリアや、人工細胞としての応用に供することを最終目的とした。

## 3. 研究の方法

まず初めに、本研究の中心となる(1)複数のグルコースが連結されたものに長鎖アルキル基を備えた両親媒性分子の合成の予備実験を試みた。続いて、(2)肝臓の表皮細胞に特異的に認識されるガラクトースを親水性部位とし、複数の長鎖を備えた両親媒性化合物を合成した。そして、(3)これらの化合物について、水中における会合体の特性を詳細に調べた。

### (1) 複数の糖鎖を備えた両親媒性化合物の合成

準備段階として、塩化シクロペンタジエニルビス(トリフェニルホスフィン)ルテニウム(II)または銅(I)フェナントロリン錯体を触媒に用いて塩化オクタデシルとを反応させた後、2-アクリロイルオキシエチル基をC-1位に置換したグルコースを添加して原子移動重合を行い、グルコースを側鎖に持つオリゴマーを親水性部位、オクタデシル基を疎水性部位とする両親媒性分子を、重合反応のバッチに依存することなく重合度や添加率を再現性良く合成する手法の確立を目指した(図1)。本法では、ラジカル重合の性質上、重合するモノマー単位の数を制御することが困難であるため、重合体の重合度には相当数の分布が生じるものと考えた。それにより、ミセルを構成する両親媒性分子の分子長ならびに重合体の親水性にばらつきが予想されるので、アルキル基部位をある程度長くすることで分子間の分子長バランスの均一化を図るためにオクタデシル基を選んだ。

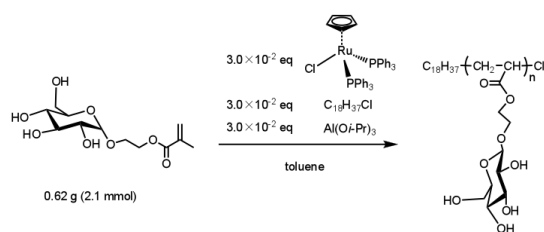


図1. グルコースオリゴマーの合成反応

本合成反応では<sup>1</sup>H NMRにより目的物の生成はほぼ確認できたが、その親水性の高さから、十分に精製することはできなかった。そこで、オープンカラムなどによる精製が容易な程度の疎水性を備えるとともに、疎水性基のかさ高さが重合性に及ぼす影響を調べるために、図2のような、オクタデシル基の代わりに疎水性部分として1-ヒドロキシ-2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロパンを出発物質として1-クロロ-2,2-ビス(オクタデシルオキシメチル)プロパンの合成を試みたが、反応

は進行しなかった。

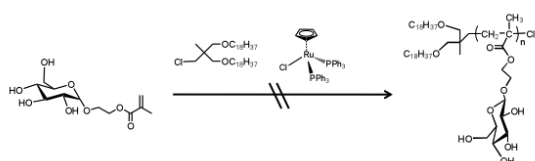


図2. 2つの長鎖アルキル基を備えたグルコースオリゴマーの合成反応

引き続き、この種のオリゴマーの合成法である原子移動ラジカル重合法 (ATRP) について、回数を重ねて検討を進めたが、目的物を合成するに至らなかった。

## (2) ガラクトースに複数の脂溶性長鎖を付与した両親媒性化合物の合成

当初目的とした、複数の糖鎖を備えた両親媒性化合物について(1)の実験により合成が困難であることがわかったので、複数の糖鎖ではなく、1つの糖を備えたコンパクトな両親媒性分子の開発に方向を転換した。具体的には、肝臓の表皮細胞表面に選択的に認識されることが知られているガラクトースを親水性部分とする両親媒性分子の合成を行い、分岐した2つの長鎖(オクタデシルオキシメチル基)をガラクトースに付与した分子を得ることに成功した。合成実験は次のような手順で行った。予め、1-ヒドロキシ-2,2-ビス(ヒドロキシメチル)プロパンを出発原料に用いてベンズアルデヒドによる2つの水酸基のアセタール保護、残りの水酸基の塩化ベンゾイルによるベンゾイルエステル保護、2つの水酸基のアセタールの脱保護、1-ブロモオクタデカンによる2つの水酸基のエーテル化、その後の脱ベンゾイルによる脱保護を経て、1,3-ビス(オクタデシルオキシ)-2-ヒドロキシメチルプロパン(BODHMP)を合成した。並行してガラクトースの5つの水酸基に塩化ベンゾイルを作用させてエステル化し、1位のアノマー炭素を臭素置換した後、上記のBODHMPとの反応により1位が、この化合物で置換されたガラクトースのテトラベンゾイルエステルを得た。最後に、メタノール中で塩基であるナトリウムメトキシドにより加水分解して目的化合物1を得た。化合物1は、親水性部位と疎水性部位のかさ高さのバランスが取れているため、ベシクルの作製を行い、(3)で記すように会合体(ベシクル)の構造特性を詳細に検討した。更にその類縁体として、BODHMPの代わりに疎水性部位として2-ベンジルオキシメチル-2,2-ビス(オクタデシルオキシメチル

)-1-エタノールを作用させて化合物2を合成した(図4)。

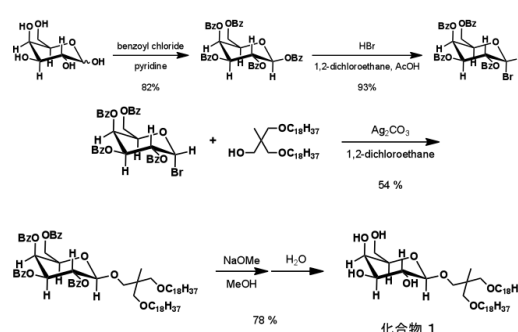


図3. 化合物1の合成反応

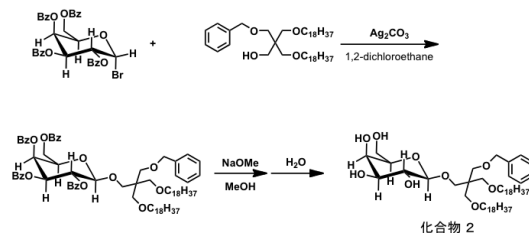


図4. 化合物2の合成反応

## (3) 化合物1の水溶液中における特性評価

ガラクトースを親水性部位に持ち複数の疎水性基を備えた両親媒性化合物1と2が得られたので、特に化合物1について水溶液中における会合体の形状と特性を調べた。

### ○ 臨界ミセル濃度(CMC)の測定

THFに化合物1を溶解した溶液を超音波照射下で99:1となるようにミリQ水中に滴下して会合体の生じる濃度、即ち、臨界ミセル濃度を紫外可視分光光度計(日本分光製、UV-VIS V-530)を用いて、25℃条件で化合物が吸収を持たない波長域において透過率の低下する濃度から見積もった。

### ○ 粒子径測定

化合物1を $1.0 \times 10^{-4}$  Mとなるように添加した溶液について、25℃条件でダイナミック光散乱光度計DLS-8000DL(大塚電子)を用いて動的散乱測定を行った。

### ○ 会合体の形状観察

化合物1を $1.0 \times 10^{-4}$  Mとなるように添加して調製した会合体溶液を凍結乾燥後、ヘキサンに再分散させた。続いて、親水化処理をした銅グリッドに滴下後、12-タングステンりん酸3%水溶液で染色を行い、真空乾燥したものを透過型電子顕微鏡(TEM) JEM 1013EX(日本分光)で観察した。

### ○ 会合体の内物質放出挙動の調査

0.01 Mのグルコース水溶液を用いて上記と同様の操作で化合物1の $1.0 \times 10^{-4}$  Mの会合

体溶液を調製し、余分なグルコースは透析を行い取り除いた。この溶液に等量のエタノールを添加した前後について、グルコースアッセイキット (BioVision) を用いた蛍光強度変化より、系内へのグルコースの放出の有無を蛍光光度計 FP-6200 (日本分光) により評価した。

#### 4. 研究成果

本研究で行った合成については、「3. 研究の方法」に記載したので、ここでは化合物 1 の特性評価結果について記す。

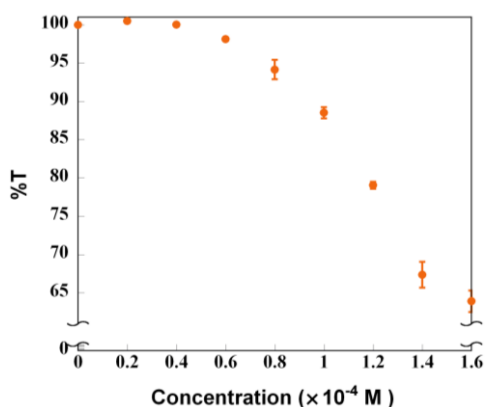


図 5. 化合物1の透過率の濃度依存性 (at 600 nm)

図 5 に水溶液中の透過率に及ぼす化合物 1 の濃度依存性を示しているが、 $4.0 \times 10^{-5}$  M 以上の濃度で透過率が急激に低下していることが分かる。このことより、ガラクトース誘導体1は $4.0 \times 10^{-5}$  MのCMCを持ち、CMC以上では会合体が形成されていると考えられる。

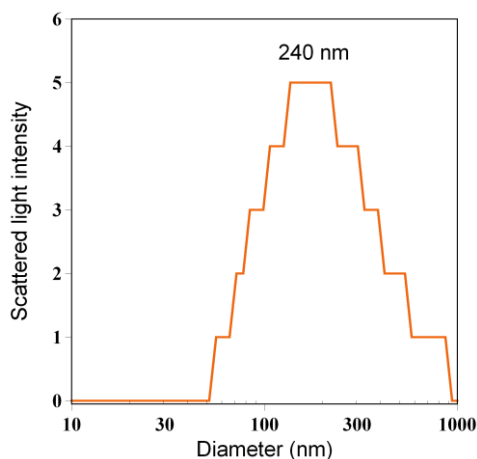


図 6. 化合物 1 が形成する会合体の DLS による粒子径分布

図 6 の動的光散乱 (DLS) の測定結果より、平均粒径が240 nm程度であることがわかる。一般に、低分子量の両親媒性分子が生成する会合体がミセルの場合、概ね数十nm程度であるために、この粒径よりミセルが凝集したモノか、あるいは、疎水性長鎖を複数備えた両親媒性分子で形成されることが知られているベシクルであると考えられる。粒子の形状を調べるために行った透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察の写真が図 7 である。この写真では $1 \mu$  m 程度の会合体が目立つが、矢印で示した部分に、内部がわずかに透けた粒子の存在が認められる。この写真より、会合体はベシクルである可能性が示唆された。

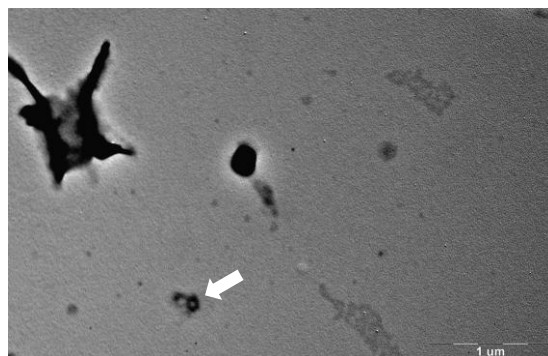


図 7. 化合物 1 のTEM写真

そこで、生成した会合体がベシクル構造をとるかどうかについて、内部にグルコースを包含させたモノの崩壊によるグルコース放出の有無により調べた。上記のように、0.01 M のグルコース水溶液を用いて同様の操作で $1.0 \times 10^{-4}$  Mの溶液を調製し、余分なグルコースは $1.5 \sim 5$  nmの孔径を持つ透析膜を用いて3日間透析を行い取り除いた。会合体の破壊は

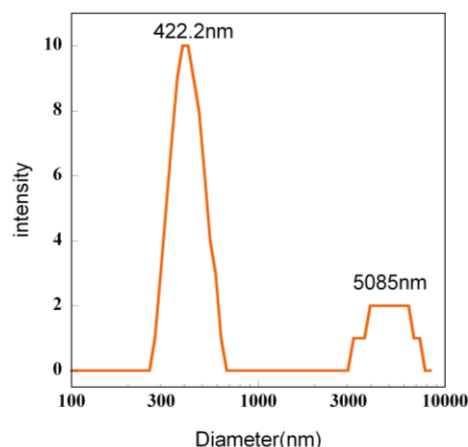


図 8. 化合物1が形成する会合体溶液へのエタノール添加後のDLSによる粒子径分布

エタノールを加え、親水疎水のバランスを崩すことにより試みた。エタノールの添加前後について、グルコースアッセイキットの蛍光強度を測定したが、残念ながら蛍光強度に大きな変化は認められなかった。一方、エタノールの添加前後のDLSによる粒子径分布を調べたところ(図8)、図6と比べて主となる粒子径が増大し、特に5 $\mu$ m程度の粒径を持つ凝集体と考えられる粒子の存在も確認されたことから、エタノールの添加により何らかの会合状態の変化が生じていることが判る。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[その他]

ホームページ等

[http://wakarid.center.wakayama-u.ac.jp/ProfileRefMain\\_2237.html#t1](http://wakarid.center.wakayama-u.ac.jp/ProfileRefMain_2237.html#t1)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

坂本 英文 (SAKAMOTO HIDEFUMI)

和歌山大学・システム工学部・教授

研究者番号：10192593