

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 25 年 5 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22658038

研究課題名（和文）シアル酸をモチーフにした血液脳関内通過DDSキャリアの開発

研究課題名（英文）Development of DDS-carrier for BBB based on sialic acid

研究代表者

木曾 真 (KISO MAKOTO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：90092931

研究成果の概要（和文）：近年、薬剤の効率的な利用あるいは副作用の軽減を目的として薬剤送達システムの開発が進められてきた。しかし、中枢神経系への送達は、脳内への物質の送達を厳しく管理する血液脳関門（BBB）が障壁となり、従来、困難とされてきた。本研究では、乳ガンが高頻度で脳に転移する事象に注目し、乳ガン特異的に発現する糖鎖を用いてリポソームを修飾することで、リポソームの BBB 通過の可能性を検討することとした。リポソームの作製、シアル酸を含む目的糖鎖の合成に成功し、シアロ糖鎖修飾リポソームの開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：The DDS in which the medicine are included in the liposome and delivered to the diseased region has already been partially used in practice. However, restriction of drug distribution in to the brain by the blood-brain barrier (BBS) is one of the serious issue for DDS. Based on the molecular basis for breast cancer metastasis to the brain, the liposome modified with the sialoglycan uniquely found on breast cancer was prepared and applied for the DDS to brain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	0	1,100,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質

1. 研究開始当初の背景

[薬剤送達システム（DDS）について]

種々の経路から投与された医薬品は、吸収された後、血流中に入って各臓器に分布し、代謝や尿中排泄によって体内から消失する。薬剤は作用部位に到達した薬物によって発現されるが、他の部位に移行した薬物はしばしば副作用の原因となる。即ち、薬物は必要な量が、必要な時に必要な組織に送達されな

ければならない。それを目指したのが薬剤送達システム（DDS）である。

申請者らは、薬物を包含する担体（キャリア）としてリポソームを用い、その表面に各種組織、細胞に特徴的に発現するレクチンのリガンド糖鎖を結合することで、目的とする送達を達成している。具体的には、炎症部位、あるいはガン細胞に発現するセレクチンとそのリガンド糖鎖であるシアリルルイス X の

組み合わせによって、炎症部位とがんの存在部位を分子イメージングできることをマウスによるモデルで証明している。

[血液脳関門 (BBB) について]

中枢神経機能に破綻をきたす血中物質 (薬剤など) の脳内移行を制限するシステムであり、物質移送の選択性は脳内皮細胞に局在する。アミノ酸、グルコース、ペプチドなどは内皮細胞表面の物質特異的な輸送体で通過する。このシステムは、一方で中枢神経系への薬剤の送達を阻むものであり、BBB を通過する DDS の確立が強く望まれている。

2. 研究の目的

薬剤の効果の増強、副作用の低減などを目的として薬剤送達システム (DDS) の開発が進められ、成果を収めている。しかし、脳への効率的な送達については、血液脳関門 (BBB) が障壁となり、十分には達成されていない。本研究では、BBB 通過との関連が示唆されているシアリ酸をモチーフにして、脳への送達を可能にする DDS の確立を目指す。

3. 研究の方法

DDS の基盤技術としてリポソームを用いる。リポソームは生体適合性が高く、また薬剤などの内包が可能で、タンパク質や糖鎖などでの表面修飾が可能である。脳に転移した乳がんにおいて ST6GALNAc5 の活性が上昇していることから、ST6GALNAc5 の基質あるいは生成物の構造に相当する糖鎖 (シアリル α (2-3) ガラクトシル β 1-3 ガラクトサミン、シアリル α 2-3 ガラクトシル β 1-3 (シアリル α 2-6) ガラクトサミン) を合成し、それらを用いてリポソーム表面を修飾する。アッセイ系としては、リポソームに Cy5.5 などの蛍光物質と内包し、マウス尾静脈から投与する。24 時間、48 時間、72 時間後に *in vivo* imager により脳への集積を検討する。上述の脳転移性乳がんにおいて、プロスタグランジンの生合成に関与するシクロオキシゲナーゼ 2

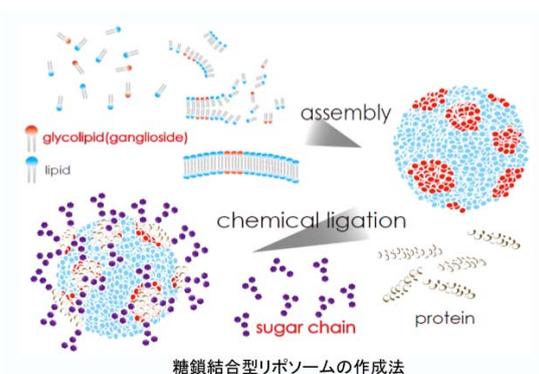
(COX2) や、上皮細胞成長因子 (EGF) の関与も示されていることから、糖鎖による表面修飾のみで不十分な場合には、COX2 や EGF も内包させ、同様に脳への集積性を調べる。

4. 研究成果

本研究は 3 つの部分から構成される。1 つはリポソームの調製であり、2 つめは指向性を有する糖鎖の構築とそれを用いたリポソームの修飾である。最終的に糖鎖修飾リポソームの DDS キャリアーとしての指向性を評価する。

まず、第一段階の研究であるリポソームの調製を行った。リポソームの調製において、主体となるリン脂質に加えてガングリオシド (シアリ酸を有するスフィンゴ糖脂質) の

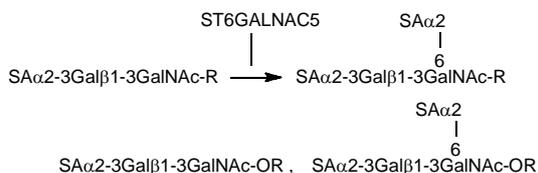
添加が有効であることが知られている。その添加剤として牛の脳などから抽出したガングリオシドが用いられてきたが、希少性や不均一性の問題からリポソームの大量調製が阻まれてきた。本研究では、化学合成ガングリオシドによる代替の可能性について検討した。抽出ガングリオシドの主要成分である GM3 に着目し、糖鎖部分の構造-活性相関、脂質部分の構造活性相関を検討し、合成コストの点も勘案し、安価で大量合成が可能なガングリオシドとして植物型セラミド含有 GM3 をリード化合物として見出した。それを用いてリポソームを調製し、得られたリポソームの粒子径、分布、ゼータ電位などが抽出ガングリオシド含有リポソームと同等であることを明らかにした。炎症部位に発現するセレクチンとそのリガンド糖鎖であるシアリルイクス X をモデルとして当該リポソームの指向性を評価したところ、抽出ガングリオシドを用いたリポソームと同等、あるいはそれ以上の良好な結果を示した。



糖鎖結合型リポソームの作成法

第 2 段階は、リポソームに指向性に付与する糖鎖の合成と、それによるリポソームの修飾である。本研究では、BBB 通過を達成するための鍵分子としてシアリル α (2-3) ガラクトシル β 1-3 ガラクトサミン、シアリル α 2-3 ガラクトシル β 1-3 (シアリル α 2-6) ガラクトサミンに着目し、その合成を行った。2 種の標的化合物を効率的に合成するために、合成中間体であるシアリル α 2-3 ガラクトース、シアリル α 2-6 ガラクトサミン、ガラクトサミン誘導体の各ユニットの効率的な合成法の確立が必要である。シアリル α 2-3 ガラクトースのユニットは、当研究室により大量かつ簡便な合成法が確立された N-Troc シアリルガラクトースを出発物質に用いることで、鍵中間体であるシアリル α 2-3 ガラクトース供与体をグラム単位で合成することができた。シアリル α 2-6 ガラクトサミンユニットは、高い反応性を有することで知られている N-Troc シアリル酸を供与体に、また後の 4 糖骨格構築に向けて適切に保護したガラクトサミン誘導体を受容体に用いるこ

とで効率的な合成を達成した。各々の2糖を縮合して4糖とした後、リポソームに結合するために末端アミノ基を有するリンカーを導入した。



現在、得られた糖鎖修飾リポソームの物理的性質（形状、サイズ、電荷など）を測定するとともに、マウスを用いたDDSキャリアーとしての評価を進めている

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 23 件）

1. Kasai, T., Nakane, D., Ishida, H., Ando, H., Kiso, M. and Miyata, M. Role of Binding in Mycoplasma mobile and Mycoplasma pneumoniae Gliding Analyzed through Inhibition by Synthesized Sialylated Compounds. J. Bacteriol. 195, 429-435, 2013. 査読有
2. Tamai, H., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. First synthesis of a pentasaccharide moiety of ganglioside GAA-7 containing unusually modified sialic acids through the use of N-Troc-sialic acid derivative as a key unit. Organic Lett. 14, 6342-6345, 2012. 査読有
3. Nohara, T., Imamura, A., Yamaguchi, M., Hidari, K.I.P.J., Suzuki, T., Komori, T., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Design and synthesis of a novel ganglioside ligand for influenza A viruses. Molecules, 17, 9590-9620, 2012. 査読有
4. Nakashima, S., Ando, H., Saito, R., Tamai, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Efficiently synthesizing lacto-ganglio-series gangliosides by using a glucosyl ceramide cassette approach: the total synthesis of ganglioside X2., Chemistry-An Asian J., 7, 1041-1051, 2012. 査読有
5. Fujikawa, K., Nakashima, S., Konishi, M., Fuse, T., Komura, N., Ando, T., Ando, H., Yuki, N., Ishida, H. and Kiso, M. The first total synthesis of ganglioside GalNAc-GD1a, a target molecule for autoantibodies in Guillain-Barré syndrome. Chem. Eur. J., 17, 5641-5651, 2011. 査読有
6. Nakashima, S., Ando, H., Imamura, A., Yuki, N., Ishida, H. and Kiso, M. A first total synthesis of a hybrid-type ganglioside associated with amyotrophic lateral sclerosis-like disorder. Chem. Eur. J. 17, 588-597, 2011. 査読有
7. Fujikawa, K., Nohara, T., Imamura, A., Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M. A cyclic glucosyl ceramide acceptor as a versatile building block for complex ganglioside synthesis. Tetrahedron Lett. 51, 1126-1130, 2010. 査読有

他 16 件

〔学会発表〕（計 104 件）

1. Makoto Kiso, Synthetic gangliosides and analogs: Versatile tools to elucidate the cell functions of sialoglycans, Commemorative Symposium on the 20th Anniversary of the Mizutani Foundation for Glycoscience Glycoscience : diversity and integration～生命多様性の統合的理解に向けた糖質科学～、東京コンファレンスセンター・品川(東京)、平成 24 年 11 月 28 日 - 29 日.
2. 今牧理恵, 北爪しのぶ, 小川加寿子, 石田秀治, 安藤弘宗, 木曾真, 谷口直之: PECAM のホモフィリックな相互作用にシアル酸が果たす役割. 第 30 回日本糖質学会, 長岡リリックホールとハイブ長岡(新潟), 平成 23 年 7 月 11 日～13 日.
3. Kiso, M., Ishida, H. and Ando, H.: Novel gangliosides synthesis toward applications in medicinal chemistry and cell biology. 13th International Conference on Biology and Chemistry of Sialic Acids - SialoGlyco 2010, Potsdam, Germany, August 21-26, 2010.
4. Kiso, M., Ishida, H. and Ando, H.: Synthetic sialosides: biological recognition at molecular and cellular levels, and applications in medicinal chemistry. Assiut Univ. 7th International Pharmaceutical Science Conference, Assiut, Egypt, March 17-18, 2010.

他 100 件

〔図書〕（計 2 件）

1. Ando, H., Ishida, H. and Kiso, M.: Renewed synthetic approach to

gangliosides exploiting versatile and powerful synthetic units, in Methods In Enzymology, Glycomics, F. Minoru, Editor. Elsevier: Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. pp522-540, 478, 2010.

2. 秋元義弘, 安形高志, 安藤弘宗, 池北雅彦, 石田秀治, 岡島徹也, 掛樋一晃, 神奈木玲児, 木曾真, 北島健, 木下タロウ, 木全弘治, 久野淳, 佐藤ちひろ, 鈴木康夫, 竹川薫, 館野浩章, 谷口直之, 永井尚子, 羽渕脩躬, 浜村和紀, 平林淳, 古川圭子, 古川鋼一, 堀戸重臣, 宮坂昌之, 矢部富雄, 山内祥生, 「コールドスプリングハーバー 糖鎖生物学 第2版」, 鈴木康夫, 木全弘治 監訳, 丸善: 東京, 2010.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.gifu-u.ac.jp/~kasseil/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木曾 真 (KISO MAKOTO)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号: 90092931