

氏名（本籍）	笹津備尚	（静岡県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	乙第173号	
学位授与年月日	平成21年3月16日	
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当者	
学位論文の題名	新規方法によるポリ乳酸誘導体の合成とそれを用いたナノパーティクルの特性	
論文審査委員	主査	教授 町田良治
	副査	教授 高山幸三
	副査	教授 上田晴久

論文内容の要旨

薬物療法において、Quality of life やコンプライアンスの向上を図る目的で、薬効の改善や副作用の軽減は重要な課題となっている。特にカンプトテシン(CPT)やパクリタキセルなどの脂溶性の抗悪性腫瘍薬は強い効果を有する半面、低い水溶性や副作用などが問題になっている。このような問題に対し、薬物担体を応用することで薬物の投与を容易にし、薬効の改善や副作用を軽減することが試みられている。高分子ナノパーティクル、リポソーム、solid-lipid ナノパーティクルを代表とする薬物担体（微粒子担体）は、近年、薬物送達システム(DDS)の概念を基本として、抗悪性腫瘍薬を用いた薬物療法の改善を目的として研究されている。このような薬物担体による改善は、受動的ターゲティングにより、患部つまり標的とする部位に薬物を集積させることを目的としている。その条件として、薬物担体の粒子径を数十~400 nm にすること、また担体表面を親水化することなどが挙げられるが、それらの条件を満たすことで血中での滞留性が向上し、血管透過性が亢進した腫瘍組織等に集積しやすくなることが明らかになっている。このような現象は、EPR 効果(Enhanced Permeability and Retention Effect)と呼ばれている。

著者は、薬物担体の中でも特に高分子に注目し研究を進めてきた。高分子担体の基剤としては、生体内分解性及び生体適合性を有するものが安全性の面から頻りに利用され、ポリ乳酸(PLA)や乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA)などはこれら両方の機能を有することが知られている。さらに、近年、新たな薬物担体としての可能性探索を目的として、PLA や PLGA の誘導体が研究開発されている。特に PLA-PEG 共重合体は、その DDS への利用が盛んに試みられている高分子である。PLA-PEG 共重合体の合成法としては、DL-ラクチドと PEG または MeO-PEG を開

始剤とする開環重合法が一般的である。しかしながら、この方法では PLA に導入できるリガンドが開始剤により決定されるため、PEG や MeO-PEG 以外のリガンドを導入した PLA 誘導体を合成することは難しい。

そこで、PLA への PEG 誘導体及びその他の種々のリガンドの導入を可能にする、より応用範囲の広い合成法について検討を行った。すなわち PLA に新たなリガンドを導入するために、PLA の末端に反応性の高いホルミル基を導入した PLA 誘導体 (PLA-aldehyde) の合成に着手し、得られた誘導体のホルミル基と、アミノ基を有する化合物との間の還元的アミノ化により、種々のリガンドの導入が可能かどうか検討を行った。その結果、PLA-aldehyde は末端にアセタールを有する PLA (PLA-acetal) を介することにより効率よく合成できた。PLA-acetal は DL-ラクチドの開環重合により合成することができ、そのアセタール部位を酸加水分解によりアルデヒドに変換することで、PLA-aldehyde を得られることがわかった。また PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH₂ を用いて PLA-(MeO-PEG) が合成できたことにより、PLA にアミノ基を有する化合物を還元アミノ化により導入することができることが示唆された。

次に PLA-(MeO-PEG) の粒子化を試みた。その結果、粒子径 60-340 nm のナノパーティクルを調製することができ、その粒子径は調製法により左右された。また脂溶性蛍光物質である DiD をモデル薬物として選択し、PLA-(MeO-PEG) ナノパーティクルに封入を試みたところ、DiD を効率よく封入することができ、その粒子径は受動的ターゲティングに十分な大きさであった。以上の結果より、PLA-aldehyde は新たな PLA 誘導体を得るために有用であり、本研究で得られた PLA-(MeO-PEG) は高分子ナノパーティクルの調製に利用できることが示唆された。

次に、PLA 誘導体合成法の改善を行った。PLA-aldehyde と MeO-PEG-NH₂ を還元アミノ化する際に、ジクロロメタンとメタノールの混液 (1:1, v/v) を使用し、GPC において分取するポイントを変更することで、PLA-(MeO-PEG) をより簡単に再現性よく得ることができた。また、得られた PLA-(MeO-PEG) と PLA の混合物 (55:45, mol/mol) を用いて DiD 封入ナノパーティクルを調製し、粒子特性と DiD の体内分布について検討した。その結果、平均粒子径は 154 nm であり、ゼータ電位もわずかにプラス側であった。マウスに尾静脈内投与すると、ナノパーティクルは DiD 溶液に比較して DiD をより多く体内に滞留させた。in vitro および in vivo の結果より、高い MeO-PEG/PLA 比を示した PLA-(MeO-PEG) で調製したナノパーティクルは、血漿中薬物滞留性を有する DDS として有用であることが示唆された。

さらに、開発した新規合成法を用いた蛍光 PLA 標識体の合成とそれを用いたナノ

パーティクルの特性の解明について検討した。さきに述べたナノパーティクルの体内分布は、脂溶性の DiD がナノパーティクルの内殻に安定に封入されていることが確認できたため、DiD の分布を基にナノパーティクルの分布を推察したものであった。しかしながら、血球や細胞などとの接触により、DiD がナノパーティクルから遊離している可能性は否定できず、DiD 分布がナノパーティクルの分布を完全に反映しているとは断言できないものと考えられた。そこで、PLA-誘導体の合成法を応用し、PLA の末端に蛍光物質である Aminopyrene を導入した誘導体を合成した。そして、この PLA 蛍光誘導体を標識としてナノパーティクルに封入し、ナノパーティクルの体内分布をより確実に検討することを試みた。その結果、新規標識体として、PLA-Pyrene を PLA-aldehyde と Aminopyrene の還元アミノ化により合成することに成功した。またこの標識体はシンク条件および血漿存在下において、安定にナノパーティクルに内封されていることがわかった。さらに、PLA-Pyrene は PLA と同様の構造を有していることから、コアを形成する PLA と同様の挙動を示し、ナノパーティクルの体内分布をより確実に反映できることがわかった。Sarcoma 180 担がんマウスに PLA-pyrene 封入ナノパーティクルを尾静脈内投与したところ、標識体は脾臓と肝臓にある程度集積するものの、血漿から徐々に消失することから、ナノパーティクルが効果的に EPR 効果により腫瘍に蓄積し得ることを示すものであると考えられた。PLA-(MeO-PEG)ナノパーティクルは平均粒子径が 220 nm であり、腫瘍に集積して長い時間維持されたことから、本研究で調製したナノパーティクルは受動的ターゲティングの担体として有用であることが示唆された。

以上より、本研究で検討した PLA 誘導体の新規合成法は、ナノパーティクルの基剤や標識体などの新たな誘導体を合成できるなど、応用範囲も広く有用であると考えられる。また得られた PLA 誘導体を用いて調製したナノパーティクルは、脂溶性抗悪性腫瘍薬などの薬物担体として利用し得ることが示され、抗悪性腫瘍薬を代表とする薬物治療の改善に有益であることが示された。

論文審査の結果の要旨

抗悪性腫瘍薬を用いた薬物療法において、副作用の軽減は薬効の改善と共に常に考慮されるべき事項となっている。副作用軽減のための手段の一つとして標的部位に薬物を集積させるターゲティング製剤が注目され、種々のタイプの微粒子担体に抗悪性腫瘍薬を封入した製剤が研究されている。申請者は生分解性および生体適合性を有するポリ乳酸(PLA)の誘導体として薬物送達システム(DDS)への応用が広く試みられているポリエチレングリコール(PEG)との共重合体PLA-PEGに着目した。PLA-PEGの一般的な合成法はDL-ラクチドとPEGあるいはメトキシポリエチレングリコール(MeO-PEG)を開始剤とする開環重合によるものである。しかし、この方法ではPLAに導入できるリガンドが使用する開始剤によって決定されてしまうため、リガンドが制限されてしまうという欠点があった。

そこで申請者はPLAの末端にホルミル基を導入したPLA誘導体(PLA-aldehyde)を合成し、反応性の高いホルミル基とアミノ基を有する化合物との間の還元的アミノ化により種々のリガンドを導入することを考案した。検討の結果、DL-ラクチドの開環重合によりPLA-アセタールを合成し、そのアセタールを酸加水分解してPLA-aldehydeを得ることができ、さらにPLA-aldehydeとMeO-PEG-NH₂を用いてPLA-(MeO-PEG)を合成することに成功した。これにより、アミノ基を有する化合物を還元的アミノ化により、PLAに導入できることを示した。

次に申請者は液中乾燥法および3通りの溶媒拡散法によりPLA-(MeO-PEG)の微粒子化を試みた。その結果、得られたナノパーティクルの粒子径は、用いた高分子の分子量やPEG導入率よりも調製法およびその条件によって左右されることを見出した。ナノパーティクルの体内分布を調べるために脂溶性蛍光物質であるDiDの封入を試みたところ、効率よく封入できることが確認された。そこで、PLA-(MeO-PEG)とPLAの混合物(55:45, mol/mol)を用いて平均粒子径154nmのDiD封入ナノパーティクルを調製した。これをマウスに尾静脈内投与すると、ナノパーティクルはDiD溶液と比較してDiDをより多く体内に滞留させることが判明した。

DiD封入ナノパーティクルにおいてDiDは内核部に安定に封入されているものの、体内を循環している際に放出される可能性があり、さきのDiDの体内分布からナノパーティクルの動態を推察する方法は万全とは言えない。そこで申

請者はPLA誘導体の合成法を利用して、PLAの末端に蛍光物質であるAminopyreneを結合させたPLA-Pyreneを合成し、これを蛍光標識体としてナノパーティクルに封入することを試みた。PLA-PyreneはPLA-aldehydeとAminopyreneの還元的アミノ化により合成できた。また、封入したPLA-Pyreneは構造の類似性により内核を構成するPLAと同様の挙動を示し、ナノパーティクル自体の体内分布をさらに確実に反映することを確認した。PLA-Pyreneを封入した平均粒子径220nmのナノパーティクルをSarcoma 180担がんマウスに尾静脈内投与したところ、脾臓と肝臓にある程度のPLA-Pyreneの集積が認められたものの良好な血中滞留性と腫瘍に集積する傾向が確認された。この結果から、調製したナノパーティクルはEPR効果により腫瘍に蓄積したことが示唆され、受動的ターゲティング能を有するDDSとして有用である可能性が示された。

本研究により開発された合成法により、さらに選択範囲の広いPLA誘導体の合成が可能となり、また得られたPLA-(MeO-PEG)を用いて調製したナノパーティクルが、脂溶性抗悪性腫瘍薬のターゲティング製剤として有用となりうる可能性が示された。本研究は論理的に構成され、また悪性腫瘍の効果的な治療につながる有益な知見を与えている。よって、本論文は博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと判断する。