

学位論文要旨

糖応答性分子ネックレスを用いたインスリンコントロールドリリースシステムに関する

研究

関 智 宏

インスリン(Ins)分泌能を欠く糖尿病患者は自己注射による Ins の補充が必須となる。しかし、Ins 自己注射には、低血糖のリスクがあり、重篤な場合には死に至るため、血糖値に応じた Ins 投与が必要である。これを実現するために、生体内に投与される Ins 製剤自体にグルコース(Glc)応答放出機能を持たせる試みがあり、Glc と結合する特性を持つフェニルボロン酸(PBA)が応用されている。PBA は糖類などの *cis*-ジオールを介して結合する特性があり、糖と結合すると負電荷を生じる。そこで新たに著者は、PBA を用いた Glc 応答 Ins 放出制御に、単分子が持つ特性を超えた構造や機能を創りだす超分子集合体を組合せることで、新規の動作原理を有する Glc 応答性 Ins 放出制御製剤を開発できるのではないかと考えた。生体適合性の高い超分子集合体として環状のオリゴ糖であるシクロデキストリン(CyD)が、鎖状高分子のポリエチレングリコール(PEG)を包接した分子ネックレス構造が挙げられる。空孔径の小さな α -CyD は PEG を 1 本、空孔径の大きな γ -CyD は PEG を 2 本包接した状態で難水溶性の分子ネックレス固体を形成することが報告されている。一方、タンパク質への PEG 修飾は安定性、血中滞留性、免疫原性の改善が得られることから多くのタンパク質医薬品に利用されており、Ins にも PEG 化技術が応用されている(PEG-Ins)。これらを背景として本研究で企画した Glc 応答性分子ネックレスを用いた Ins 放出制御システムを以下に記す。糖センサーである PBA 誘導体が化学修飾された CyD (PBA 誘導体修飾 CyD)が、PEG-Ins を多数で包接した分子ネックレスが得られる。これは正常血糖では難水溶性の分子ネックレス構造を維持するので PEG-Ins の放出は遅いと予想される。一方、血糖値が上昇した場合、PBA 誘導体修飾 CyD の PBA 誘導体残基と Glc との結合を引き金に、分子ネックレス中の PBA 誘導体修飾 CyD が、PEG 鎖を抜けることで分子ネックレスの崩壊が進み、PEG-Ins が放出されると期待される。尚、探索的検討において PBA 修飾 α -CyD を用いたが、PEG 鎖を包接せず、分子ネックレス調製には不向きであったことから、本研究ではより大きな空孔を持つ γ -CyD に PBA 誘導体を修飾して用いることとした。

本論文の内容を以下、章ごとに要約する。

第 1 章では、末端修飾 PEG の調製とその分子ネックレス形成能について取り組んだ。CyD への化学修飾により、その後の PEG 鎖との分子ネックレス形成が起こりにくくなる問題があった。修飾 CyD においても分子ネックレスを効率的に形成する目的で、PEG 鎖末端に CyD 空孔と相互作用する分子としてベンゼン、ナフタレン、*m*-ジニトロベンゼンをそれぞれ修飾した。4-carboxylPBA 修飾 γ -CyD (PBA- γ -CyD)との分子ネックレス調製において、速やかに高収率で分子ネックレス形成を起こす末端ナフタレン修飾 PEG (Naph-PEG)を見出した。本章の検討中に得られた Naph-PEG/PBA- γ -CyD の分子ネックレスの化学量論比について ^1H NMR を用いて調査すると、空孔の大きな γ -CyD の誘導体であるにも関わらず PEG 鎖を 1 本のみ包接した新規の分子ネックレス構造であることが明らかとなった。

第 2 章では、PBA 誘導体修飾 γ -CyD と Naph-PEG を用いた分子ネックレスの調製と、その糖応答性の評価を行った。また、前章の PBA- γ -CyD のほかに、より高い Glc 応答性を目指し、糖結合能のより高い PBA 誘導体と

して 3-carboxy-5-nitroPBA (NPBA)を γ -CyD に化学修飾した NPBA- γ -CyD を用いた。Glc に対する結合定数は PBA- γ -CyD が 8.0 M^{-1} 、NPBA- γ -CyD が 50.1 M^{-1} であった。PBA- γ -CyD 及び NPBA- γ -CyD の Naph-PEG との水中での分子ネックス形成過程について濁度を指標に評価した。すると、NPBA- γ -CyD でより速やかな分子ネックス形成が観察された。調製により得られた Naph-PEG/PBA- γ -CyD 及び Naph-PEG/NPBA- γ -CyD 分子ネックスの Glc 応答性を Glc 溶液(100 mM)中に分子ネックス固体を添加した後の Naph-PEG の放出量を経時的に蛍光測定すると、NPBA- γ -CyD の分子ネックスでより大きな Glc 応答放出が見られた。これは NPBA 修飾基が PBA 修飾基よりも高い Glc 親和性を有することに起因すると考えられた。さらに、Naph-PEG 放出初期において Naph-PEG/NPBA- γ -CyD で鋭い Glc 応答が見られ、Naph-PEG/PBA- γ -CyD のそれとプロファイル自体が異なった。これは放出メカニズム自体が異なる可能性を示唆し、PBA 誘導体修飾基の包接状態や、分子ネックス構造の違いに起因していると考えられた。すなわち、鋭い Glc 応答を示した Naph-PEG/NPBA- γ -CyD は、分子ネックス中で NPBA 修飾基が CyD 空孔に包接されずに存在し、Glc へのアクセスが良い状態にあることが考えられ、それに対し、比較的緩やかな Glc 応答を示した Naph-PEG/PBA- γ -CyD は PBA 修飾基が CyD 空孔に包接されて存在し、Glc へのアクセス性が低いことが考えられた。

観察された Glc 応答性の違いを分子ネックス構造や PBA 誘導体修飾基部分の包接状態の点から考察することとした。分子ネックスの結晶構造を粉末 X 線回折(PXRD)測定により解析すると、NPBA- γ -CyD の分子ネックスは、Head-to-Head の正方晶チャンネル型構造として知られる Naph-PEG/ γ -CyD と同様なパターンを示した。一方、Naph-PEG/PBA- γ -CyD 固体は NPBA- γ -CyD や非修飾 γ -CyD の分子ネックスと全く異なる PXRD パターンを示し、Head-to-Tail の配列で分子ネックスの結晶構造を形成したことが考えられた。 ^1H NMR スペクトル及び固体蛍光スペクトルの解析から、NPBA- γ -CyD の分子ネックスは PBA- γ -CyD の分子ネックスと同様に PEG 鎖 1 本のみを包接していることが明らかとなった。PBA 及び NPBA 修飾基の包接状態について、 ^1H - ^1H NOESY スペクトルにより解析した。その結果、PBA 修飾基は CyD 空孔内部のプロトンと相関を示し、一方、NPBA 修飾基は CyD 内部のプロトンとは相関を示さず、空孔縁のプロトンと相関を示した。これらの結果より、PBA 修飾基は近接する CyD 空孔に包接された状態で、それに対して、NPBA 修飾基は近接する CyD 空孔に包接されない状態で分子ネックスが形成されるものと結論付けられた。以上の構造解析より、Glc へのアクセスが良い NPBA を有する Naph-PEG/NPBA- γ -CyD 分子ネックスが、鋭い Naph-PEG 放出を示したと考えられた。

第 3 章では、Glc 応答性分子ネックスの応用を目指し、PEG-Ins と組み合わせて Glc 応答 Ins 放出制御について検討を行った。PEG 鎖片側末端にナフタレンを有する PEG を Ins に修飾し、Naph-PEG-Ins を調製した。 ^1H NMR の測定から平均 PEG 鎖修飾率を求めると、その値は約 2.2 であった。糖尿モデルラットへの投与により、得られた Naph-PEG-Ins が非修飾 Ins に対して 71.5%の活性を保持していることが明らかとなった。この Naph-PEG-Ins を軸成分として、PBA- γ -CyD または NPBA- γ -CyD との分子ネックス固体を得た。得られた分子ネックス固体の PXRD パターンを解析すると、PEG 鎖末端の Ins は分子ネックスの結晶構造に影響しないことが明らかとなった。Naph-PEG-Ins/PBA- γ -CyD と Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD の分子ネックスについて、糖応答性 Naph-PEG-Ins 放出を調べた。どちらの分子ネックスも Glc を含まない緩衝液中に比べ、Glc 100 mM 溶液中で高い Naph-PEG-Ins 放出を示した。臨床応用の観点から行った Glc 30 mM 溶液中においても、NPBA- γ -CyD の分子ネックスは応答して Naph-PEG-Ins を放出した。これは Glc 30 mM 程の高い食後血糖値を示す患者に対しては Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD 分子ネックスの応答が得られる可能性を示すものである。

以上をまとめると、本研究では Glc 応答性インスリン放出制御システムにおける新規の動作原理となる、Glc 応答性分子ネックスの調製に成功し、さらには Glc 応答性 Ins 放出を示すことに成功した。

Abstract of presentation of a doctoral dissertation

Sugar-responsive molecular necklaces and their application in sugar-induced release of PEGylated insulin

Tomohiro Seki

Diabetic patients who lack insulin (Ins) secretion need Ins self-injection treatments. However the Ins self-injection treatments are associated with difficulties concerning controlled blood sugar levels and risk of hypoglycemia. Thus, sugar-responsive Ins release systems are highly expected to increase the degree of freedom and convenience of use of self-injections for diabetic patients. For developing sugar-responsive Ins controlled-release systems, phenylboronic acid (PBA) constructs are promising. PBA reacts with *cis*-diol functional groups of sugars. In this study, I designed an Ins controlled release system by a combination of PBA and a supra molecular assembly. Molecular necklaces consisting of cyclodextrin (CyD) and polyethylene glycol (PEG) have been known as biocompatible supramolecular assemblies, in which PEG penetrates many cavities of CyD. It was reported that α -CyD that has a smaller cavity forms a single stranded molecular necklace where the only one PEG chain is included and γ -CyD that has a larger cavity forms a double stranded molecular necklace where the two PEG chains are included. Both these molecular necklaces are poorly water-soluble. It is reasonable to use PEG for drug controlled release systems because PEG itself is biocompatible and is approved as a pharmaceutical additive. Furthermore, PEGylation technologies have been widely used to improve therapeutic efficacies of some protein drugs, including Ins (PEG-Ins). Based on these backgrounds, the Ins controlled release system with the Glc-responsive molecular necklace is designed in this study and is as follows. A lot of PBA derivative-modified CyDs include the PEG-Ins, then it results the molecular necklace. This molecular necklace remains as a poorly water-soluble solid in the normal blood Glc level and the release rate of Ins is expected be slow. When the Glc level increases, the disintegration the molecular necklace is induced due to the reaction between a PBA moiety and Glc, and the release rate of PEG-Ins change faster.

Following is the chapter-by-chapter summary of this study.

In chapter one, terminal modified PEGs were prepared and their formation abilities were investigated. There was a problem that a formation ability decreases when using modified CyD. To improve the formation ability, benzene, naphthalene, or *m*-dinitrobenzene were modified to both terminals of PEG chain because they were expected to show the interaction to CyD cavity. In the preparation of molecular necklace with 4-carboxyPBA-modified γ -CyD (PBA- γ -CyD), Naphthalene modified PEG (Naph-PEG) showed the fastest formation compared to other modified PEGs. Then Naph-PEG was selected to use for subsequent preparations. It is interesting to note that structural analyses using ^1H NMR showed the Naph-PEG/PBA- γ -CyD molecular necklace was single stranded that has never been reported before, whereas ordinary molecular necklaces using parent γ -CyD were double stranded.

In chapter two, the preparations of molecular necklaces using PBA derivative-modified γ -CyDs and the evaluation of their Glc responsiveness were carried out. Moreover, in order to achieve better Glc-responsiveness, 3-carboxy-5-nitroPBA (NPBA) was attached to the γ -CyD and NPBA- γ -CyD was obtained. Binding constants to Glc were 8.0 M^{-1} for PBA- γ -CyD and 50.1 M^{-1} for NPBA- γ -CyD. Molecular necklaces of Naph-PEG/PBA- γ -CyD

and Naph-PEG/NPBA- γ -CyD were prepared in water and obtained as solid state. I evaluated the sugar responses of the obtained molecular necklaces. The release rates of Naph-PEG from the both molecular necklaces were accelerated in the presence of Glc 100 mM compared to that in the absence of Glc. The release profiles also showed that the molecular necklace with NPBA- γ -CyD has a higher response to Glc than that of the molecular necklace with PBA- γ -CyD. This improvement was due to the higher binding affinity of NPBA- γ -CyD to Glc. Moreover, the release profile of Naph-PEG from Naph-PEG/NPBA- γ -CyD showed the much faster initial release of Naph-PEG compared to Naph-PEG/PBA- γ -CyD. This was likely to be due to the difference of the spatial arrangements of a PBA moiety and a NPBA moiety. That is to say, it indicated that a NPBA moiety is not included in the neighboring CyD and is capable of binding with Glc directly, whereas a PBA moiety is included in the neighboring CyD and the accessibility to Glc is low.

In order to discuss the observed difference of Glc-responsiveness, I carried out the structural analysis of molecular necklaces and spatial arrangements of PBA and NPBA moieties. Powder X-ray diffraction (PXRD) pattern of the Naph-PEG/NPBA- γ -CyD molecular necklace demonstrated the same pattern as a molecular necklace with a native γ -CyD where the γ -CyDs are stacked in Head-to-Head sequence. In contrast, the crystalline structure of Naph-PEG/PBA- γ -CyD was different from that of the Naph-PEG/NPBA- γ -CyD, and is suggested the Head-to-Tail sequence. From the results of ^1H NMR spectra and solid state fluorescence spectra, it was revealed that Naph-PEG/NPBA- γ -CyD molecular necklace was formed as a single strand same as Naph-PEG/PBA- γ -CyD molecular necklace shown in chapter one. In order to investigate molecular interaction between PBA derivatives and CyD cavities, I carried out the ^1H - ^1H NOESY spectra. Correlations between PBA protons and interior protons of a CyD cavity were observed, whereas there was no correlation between NPBA protons and interior protons of a CyD cavity. From these results, I concluded that a PBA moiety was included in the neighboring CyD cavity when forming a molecular necklace and a NPBA moiety was not included in the neighboring CyD cavity in contrast to a PBA moiety. As structural analysis explained above, it was inferred that Naph-PEG/NPBA- γ -CyD having a NPBA moiety which can binds to Glc directly showed the sharp release of Naph-PEG.

In chapter three, molecular necklace was applied to Glc-responsive Ins controlled release by a combination of PEG-Ins and molecular necklaces studied in previous chapters. PEG that has naphthoyl group on one terminal of chain was attached to the Ins (Naph-PEG-Ins) with the degree of PEGylation of 2.2. Relative activity of Naph-PEG-Ins was determined to be 71.5% by the administration to diabetic model rats. Then molecular necklaces of Naph-PEG-Ins/PBA- γ -CyD and Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD were prepared. The obtained solid of molecular necklaces was revealed by PXRD that Ins attached to the terminal of PEG chain has no influence on the crystalline structure of molecular necklaces. The release rates of Naph-PEG-Ins from both molecular necklaces were accelerated in the presence of Glc 100 mM, and the Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD has a higher responsiveness to Glc. Moreover, in the presence of Glc 30 mM as carried out in terms of clinical use, the release of Naph-PEG-Ins from Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD molecular necklace was significantly higher than that in the absence of Glc. This result indicated the possibility that Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD molecular necklace release Naph-PEG-Ins in response to the patients' blood sugar level who has Glc 30 mM level.

To summarize the above, I have successfully developed Glc-responsive molecular necklaces with a novel principle, and I demonstrated that the molecular necklaces released Ins in response to Glc.

論文審査の結果の要旨

糖尿病患者におけるインスリン (Ins) の自己注射は、non-compliance を含め血糖値の変動に合わせたかなり精密な投与速度のコントロールができないため、しばしば血糖値を十分に下げることができないことや、逆に低血糖を誘発する。これらの問題点を克服するために、血糖値をモニターし、Ins を必要なときに放出する人工膵臓システムの開発が行われてきた。有名なものに電気機器であるグルコース (Glc) センサーと Ins ポンプを組合せたものがある。一方で、糖応答性の高分子ゲルを調製し、糖濃度に依存したゲルの膨潤と収縮による内封した Ins の放出を制御するシステムの研究が数多く報告されている。しかし、糖センサーに対する Ins の on-off 制御という優れたアイデアに基づくこれらの研究は、これまで十分な Ins 放出の制御に至っていない。本研究は、ポリエチレングリコール (PEG) とシクロデキストリン (CyD) とが固体の超分子複合体 (分子ネックレス) を形成することを利用した。すなわち、その軸成分として PEG 修飾 Ins を用い、さらに糖と結合する分子化学センサーとしてフェニルボロン酸 (PBA) 誘導体を CyD に導入した。この分子ネックレスはこれまでのゲルタイプとは異なり、PBA 誘導体が Glc を感知すると分子ネックレスの構造が変化し、溶解した PEG 修飾 Ins が放出される新たなアイデアに基づく、より糖濃度に鋭く応答する Ins 放出制御が可能であると考えている。本研究は、このような分子ネックレスの調製を 3 章に分けて評価した。

第 1 章では、予備検討の段階で、PEG 修飾 Ins と PBA 誘導体を導入した CyD とは効率的に分子ネックレスを調製できなかったため、PEG 修飾 Ins が効率的に CyD に包接されて分子ネックレスを調製できるように、まず末端修飾 PEG を調製して PBA 誘導体を導入していない CyD (未修飾 CyD) との分子ネックレス形成能について評価した。ベンゼン、ジニトロベンゼンおよびナフタレンを修飾した benzoyl PEG (Bn-PEG)、3,5-dinitrobenzoyl PEG (dNBn-PEG) および naphthoyl PEG (Naph-PEG) はいずれも未修飾 CyD と効率的に分子ネックレスを形成した。この結果をもとに、フェニルボロン酸 (PBA) 誘導体 (4-carboxyl PBA) を CyD に導入した PBA- γ -CyD と Bn-PEG、dNBn-PEG および Naph-PEG との分子ネックレス形成能を評価したところ、Naph-PEG が速やかにかつ高収率で PBA- γ -CyD との分子ネックレスを形成することを見出した。粉末 X 線回折、誘起円偏光二色性スペクトル法、 ^1H -NMR スペクトル法による解析から、通常 PEG 鎖を 2 本包接して分子ネックレスを形成する γ -CyD の誘導体を用いたのにも関わらず、Naph-PEG/PBA- γ -CyD は PEG 鎖 1 本のみを包接した、全く新しい分子ネックレスが得られたことを初めて明らかにした。

第 2 章では、第 1 章の結果を踏まえ、より高い Glc 応答性の得られる分子ネックレスの調製とその糖応答性を評価した。3-Carboxy-5-nitro PBA (NPBA) を CyD に導入した NPBA- γ -CyD と Naph-PEG との分子ネックレスを調製し、第 1 章で調製した PBA- γ -CyD と Naph-PEG から成る分子ネックレスの糖応答性を Naph-PEG の放出性から評価・比較した。Naph-PEG/PBA- γ -CyD からの Naph-PEG の放出は、Glc 添加濃度に依存したが、非常にゆっくりとした放出性を示した。一方、Naph-PEG/NPBA- γ -CyD からの Naph-PEG の放出は、Naph-PEG/PBA- γ -CyD と同様に Glc 添加濃度に依存したが、実験開始 15 分までに非常に素早い Naph-PEG の放出がみられた。すなわち、加えた糖に対し非常に感度の高い応答を示した。この Naph-PEG の放出性 (糖応答性) の違いを調査した結果、Naph-PEG/PBA- γ -CyD では、PBA 修飾基

が分子ネックレス形成時に近接する CyD 空孔に包接されたことにより比較的低い Glc 応答性を示したのに対し、Naph-PEG/NPBA- γ -CyD では、形成した分子ネックレス中で NPBA 修飾基が包接されておらず、直接的に Glc 分子と反応し、速やかに PEG 鎖を放出したことがわかった。本章の結果は、PBA 誘導体の包接のされ方によって Glc 応答性を変化させることができるということを示唆しており、糖尿病患者の病態に応じた治療に選択肢を広げることが期待される。加えて、今後の刺激応答分子ネックレス研究を含めた超分子化学研究の発展にも寄与するものと考ええる。

第 3 章では、前 2 章までの結果に基づき、Ins が結合した Naph-PEG-Ins を作製し、2 章で得られた PBA 誘導体修飾 γ -CyD と組合せて、Naph-PEG-Ins/PBA- γ -CyD, および Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD 分子ネックレスを調製して、Naph-PEG-Ins の糖応答性を分子ネックレスからの放出性から評価した。評価を行う前に、Naph-PEG-Ins の血糖降下作用が Ins のそれに比較してどの程度なのかを、ストレプトゾシン誘発糖尿病ラットを用いて評価した結果、Ins に対する比活性は約 70%であり、Naph-PEG-Ins は十分な薬理活性を保持していると考えられた。加えて、Naph-PEG-Ins/PBA- γ -CyD, および Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD 分子ネックレスの構造を解析すると、軸分子として Naph-PEG-Ins を用いても 2 章で得られた 2 種類の分子ネックレスとそれぞれ同様な構造を形成していることがわかった。

Naph-PEG-Ins/PBA- γ -CyD, および Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD 分子ネックレスからの Naph-PEG-Ins の放出性を調べた結果、Naph-PEG-Ins/PBA- γ -CyD からの Naph-PEG-Ins の放出は、Glc 添加濃度に依存せず、高 Glc 濃度のときにのみ、応答して Naph-PEG-Ins を放出した。また、このときの Naph-PEG-Ins の放出性は Naph-PEG/PBA- γ -CyD からのそれとは異なり、短時間に素早い Naph-PEG-Ins の放出が認められた。一方、Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD からの Naph-PEG-Ins の放出は、Naph-PEG-Ins/NPBA- γ -CyD からの Naph-PEG の放出と同様に、ある程度 Glc 濃度に応じた応答性を示したが、Naph-PEG-Ins の放出性は、Naph-PEG/NPBA- γ -CyD からの Naph-PEG の放出性とは若干異なり、Naph-PEG の放出よりも比較的ゆっくりとしたプロファイルを示した。今後、これらの応答性の違いが明らかになることで、より精密な刺激応答型の分子ネックレスが設計されることが期待される。本章では、今後の課題はあるものの、Glc 応答性分子ネックレスを調製し、Glc 応答性の Ins 放出システムの構築に成功したものと考えられる。

以上、本研究により、これまでの糖センサー内蔵型の糖応答性の Ins 放出システムよりも、より応答感度の高いシステム構築に成功した。また、研究を遂行する過程で全く新しい分子ネックレスが得られたことを明らかにした。加えて、本研究で用いた構造解析の手法は、今後の刺激応答分子ネックレスを構築していく上で、有用な tool として期待できる。さらに、本研究で調製された分子ネックレスを基礎として新たな分子ネックレスが作られることで、糖尿病患者の病態に応じた厳密な薬物治療が可能になることが期待される。よって、本論文は、本研究科課程による博士（薬学）論文に十分値するものと判定した。