

学位論文要旨

ポリボロン酸と水溶性高分子間の相互作用を評価する実験系と それを用いたボロン酸修飾インスリンの放出制御の評価に関する基礎的研究

武井 千弥

外部の刺激によって特性を変化させて薬物のコントロールドリリースを可能にする材料は、インテリジェントマテリアルの応用の1つとして注目され、日々盛んに研究・開発が行われている。このインテリジェントマテリアルを組み込んだシステムを実現するためには、そのマテリアル自体とそれを組み込んだ薬物放出制御の仕組みをより効率的かつ的確に設計することが重要である。著者は、放出制御剤のデザイン基盤として糖応答性マテリアルに着目した。そこで、本研究では、糖センサーとして知られているボロン酸を分子内に複数有するポリボロン酸誘導体を合成した。ボロン酸は、アルカリ性条件下でホウ素にヒドロキシ基が配位し、ジオール構造をもつ化合物と可逆的に結合する。よって、ボロン酸構造を複数有する化合物は、ポリビニルアルコール (PVA) のような分子内にヒドロキシ基を多数含む水溶性高分子を架橋することができる。そのため、ポリボロン酸は PVA と共存することで複合材料を形成し、得られたその複合材料は、ジオール構造を有する糖を添加することで、結合の置換を介して崩壊すると期待される。また、静電的な相互作用を利用した複合材料の形成が報告されていることから、ヒドロキシ基が配位することで負電荷を帯びたポリボロン酸は、ポリカチオンと静電的相互作用による複合材料の形成も期待できる。よって、ポリボロン酸誘導体とポリオールもしくはポリカチオン性の水溶性高分子との間で生じる相互作用や、その特徴に起因する複合材料の物理化学的な性質および糖応答性の挙動を、いくつかの手法により調査することで、刺激応答性マテリアルの設計において有用な実験系とその応用に関して検討した。以下にその要約を示す。

第1章では、ポリボロン酸誘導体として、ボロン酸の導入数が異なるジピリジニウムボロンボロン酸 (DPrBA)、トリピリジニウムボロン酸 (TPrBA)、ヘキサピリジニウムボロン酸 (HPrBA) を合成した。そして、これらと PVA からなるゲルを調製し、そのゲルの静的・動的粘弾性測定を行うことで、ポリボロン酸と PVA 間の相互作用の評価を試みた。静的粘弾性測定の応力緩和測定においては、DPrBA/PVA gel と HPrBA/PVA gel で弾性項に相当する応力が観測されたため、一部にボロン酸と PVA 間の強固な結合が存在すると推測した。動的粘弾性測定のひずみ分散測定においては、ピリジニウムボロン酸誘導体/PVA ゲルが広い範囲で線形領域を有していることが示され、ボロン酸と PVA の結合により安定な3次元ネットワークが形成されていると考えられた。さらに、動的粘弾性測定の周波数分散も実施した。これらの測定で得られた結果から、TPrBA/PVA gel は架橋密度が高く、硬い3次元ネットワークを形成するのに対して、HPrBA/PVA gel は PVA との相互作用に寄与しないボロン酸の存在があることで架橋密度が低く、軟らかい3次元ネットワークを形成すると考えた。このように、粘弾性測定を実施することで、複合材料のミクロな内部構造を予測するとともに、相互作用に起因したマクロな性質の評価を行うことができた。

第2章では、Quartz crystal microbalance (QCM) 法を用いてポリボロン酸と水溶性高分子間の相互作用の評価を試みた。この方法は、電極上のミクロな質量の変化を共振周波数の変化として観測するため、ポリボロン酸と水溶性高分子間における相互作用の発生と消失がリアルタイムに観測できると考えた。また、本章では、第1章で扱ったピリジニウムボロン酸誘導体と PVA の検討に加えて、ポリアクリルアミドフェニルボロン酸 (PolyPBA) とポリアリルアミン (PAA) を用いることにより、負電荷を帯びたボロン酸とカチオン性の水溶性高分子間で生じる静電的な相互作用についても検討した。なお、PolyPBA と

PAA における検討ではさらにグルコースオキシダーゼ (GOx, 等電点 4.2) を共存させた。これは、ボロン酸はグルコース (Glc) と結合したとしても電荷に変化はなく、ゲルの糖応答性は低下することが予想されたためである。過酸化水素は、フェニルボロン酸 (PBA) のボロン酸部分をヒドロキシ基に置換する性質があり、Glc が GOx で酸化されて発生する過酸化水素で PolyPBA-PAA 間の静電的相互作用を消失させることで、より効果的なゲルの糖応答性崩壊を生じさせることができると期待した。結果、共振周波数の変化からピリジニウムボロン酸誘導体と PVA 間で生じている相互作用を検出することができた。特に、HPrBA は共振周波数の変化量が大きく、PVA と強く相互作用することが示された。これは、粘弾性測定において HPrBA/PVA gel は PVA と結合しているボロン酸部位の割合が低いにも関わらず最も安定なゲルを形成した結果と関係すると考えられる。また、PolyPBA/PAA と PAA/GOx 間における相互作用の発生も検出できた。そして、共振周波数の減少速度の違いから、ピリジニウムボロン酸/PVA 間と PolyPBA/PAA 間の速度的な相互作用の違いを検出することができた。よって、QCM 法を用いてマイクロ単位での質量変化を検出することで、ポリボロン酸と水溶性高分子間における相互作用の強さ、プロセスの違いを評価することに成功した。

第 3 章では、ゲルの糖応答性崩壊挙動を調査するためにフロースルーセル型溶出試験器を作成し、刺激応答性マテリアルの評価に向けた実験系の構築を試みた。その結果、DPrBA/PVA gel は Glc の添加による崩壊と、ゲルからの DPrBA の放出が観測された。一方で、GOx を共存させた PolyPBA/PAA gel は、Glc の添加によるゲルの崩壊とそれに伴った PolyPBA の放出は観察されなかった。これは、ボロン酸部位が多く存在し、PAA との架橋点が多いため、Glc によって部分的にそれらが切断しても架橋点が残存したためだと考えられる。つまり、水溶性高分子と相互作用させる際、分子内のボロン酸を必要最低限に少なくすることが Glc に応答しやすい複合材料を形成する上で重要であることが示唆された。このように、連続的かつ視覚的に刺激応答性マテリアルの薬物放出を評価する実験系を利用することで、応答性の最適化を行うための情報が得られると考えられる。

第 4 章では、これまでの評価系を利用した糖応答性マテリアルデザイン的应用として、インスリン (Ins) にボロン酸を複数修飾し、それと PVA からなるゲルによる放出制御に関して検討した。QCM 法の結果からボロン酸修飾 Ins と PVA の相互作用による複合材料の形成と糖応答性の崩壊が観測できた。また、修飾するボロン酸誘導体の違いによる特性の変化も評価することができた。フロースルーセル型溶出試験器を用いた放出試験から、GOx と組み合わせた PBA-Ins/PVA gel から Glc の流入に応答した PBA-Ins の放出が観測された。つまり、Glc 応答性を改善する上で GOx が有効であることが示された。そして、Glc 刺激時に PBA-Ins の放出率の上昇に合わせて GOx も放出されたことから、Glc による刺激応答性放出がゲルの網目構造の変化に起因することも併せて明らかとなった。よって、これまでの実験系を組み合わせることで、多様な情報が得られ、新規糖応答性 Ins 放出マテリアルの設計が行えたと思う。

以上のことから、マテリアルが持つ様々な特性の中から着目する特性を的確に把握するための、物理化学的な評価手法を選択および構築することができた。また、それらの実験系を利用して組み合わせることで、希望する薬物放出特性を持つ糖応答性マテリアルを設計するための有用な情報を得ることができた。これは、他の刺激応答性マテリアルへの応用も可能であり、特性に関して得た多様な情報を収集・蓄積することによって、より効果的なマテリアルデザインも可能になると考えられる。そして、この評価手法とマテリアルデザインの両方の改善を繰り返していくことにより、理想的な放出制御機能を有する製剤の開発につながると考えられる。

Thesis Abstract

Experimental systems to evaluate the interactions between polyboronic acids and water-soluble polymers, and a basic research for release control of boronic acid-modified insulin derivatives using the systems

Chihiro Takei

Materials that change properties in response to external stimuli to enable controlled drug release have attracted attention as an intelligent material application, and research and development activities are actively performed daily. To achieve a system with this intelligent material, it is critical that both the material itself and the drug release mechanism be designed more efficiently and appropriately. I focused on sugar-responsive material as a design base for controlled release. Therefore, in this study, I synthesized polyboronic acid derivatives with multiple boronic acids in their molecules. Boronic acids are known as sugar sensors. Boronic acid is coordinated to boron by OH^- under alkaline conditions and reversibly bound to a compound with a diol structure. Therefore, a compound with multiple boronic acids can crosslink a water-soluble polymer with a large number of hydroxyl groups in the molecule such as polyvinyl alcohol (PVA). Because of that, polyboronic acid can be expected to form a composite material by coexisting with PVA and disintegrate the material by adding sugar with a diol structure. In addition, formation of a composite material by electrostatic interaction has been reported, so I can expect that hydroxyl group coordination will form a polyboronic acid with a negative charge, and that polyboronic acid will form a composite material by electrostatic interaction with polycations. Accordingly, I studied useful experimental systems and applications for a stimuli-responsive material design by investigating the interaction between polyboronic acid derivatives and polyol or polycationic water-soluble polymers, and the physicochemical properties and sugar-responsive behavior of composite materials composed of them.

In chapter 1, dipyridiniumboronic acid (DPrBA), tripyridiniumboronic acid (TPrBA) and hexapyridiniumboronic acid (HPrBA) were synthesized as polyboronic acid derivatives with different numbers of boronic acids. I prepared gels composed of polyboronic acid and PVA and evaluated interaction between them by measuring static and dynamic viscoelasticity of the gels. In the stress relaxation measurement which is one of the static viscoelasticity measurements, stress corresponding to the elastic term was observed in the DPrBA/PVA and HPrBA/PVA gels, so it was inferred that there were strong bonds between the boronic acid and PVA in part. In the strain sweep measurement which is one of the dynamic viscoelasticity measurements, it was shown that the pyridiniumboronic acid derivative/PVA gels had a linear region in a wide range, and it seems that a stable three-dimensional network was formed by the bonding of boronic acid and PVA. Furthermore, a frequency sweep measurement was also performed. These results show that TPrBA/PVA gel has a high crosslinking density and forms a hard three-dimensional network, whereas HPrBA/PVA gel has a low crosslinking density and forms a soft three-dimensional network because of the boronic acid which doesn't contribute to interaction with PVA. By performing the viscoelasticity measurement, it was possible to predict the micro internal structure of the composite materials and evaluate the macroscopic properties resulting from the interaction.

In chapter 2, I evaluated the interaction between polyboronic acid and water-soluble polymer using the quartz crystal microbalance (QCM) method. Since this method observes micro mass changes on the electrode as a resonance frequency change, I anticipated that the occurrence and disappearance of interactions between polyboronic acid and water-soluble polymer could be observed real time. In this chapter, I also investigated the electrostatic interaction between negatively charged boronic acid and cationic water-soluble polymer using polyacrylamido phenylboronic acid (PolyPBA) and poly(allylamine) (PAA) in addition to the pyridiniumboronic acid derivative and PVA considered

in chapter 1. I also added glucose oxidase (GOx, isoelectric point 4.2) in the investigation of PolyPBA and PAA. This is because I anticipated that even binding the boronic acid to glucose (Glc) would not change the boronic acid charge, and would decrease the sugar-responsiveness of the gel. Hydrogen peroxide has a characteristic of substituting the boronic acid moiety of phenyl boronic acid (PBA) with OH^- , so I expected to achieve a gel with more sensitive sugar-responsive disintegration by using hydrogen peroxide derived by oxidation of Glc with GOx to eliminate the electrostatic interaction between PolyPBA and PAA. As a result, interaction between the pyridiniumboronic acid derivatives and PVA was detected from a resonance frequency change. In particular, HPrBA showed a large resonance frequency change and strong interaction with PVA. I thought this result was related to the viscoelasticity measurement of the HPrBA/PVA gel which formed the most stable gel despite the low proportion of boronic acid moiety bound to PVA. Interaction between PolyPBA/PAA and PAA/GOx was also detected. From the difference in the resonance frequency decrease rate, it was possible to detect the speed difference of the interaction between pyridiniumboronic acid/PVA and PolyPBA/PAA. Therefore, I was able to evaluate the difference in interaction strength and process between polyboronic acid and water-soluble polymer.

In chapter 3, I prepared a flow-through cell type dissolution tester to investigate the sugar-responsive behavior of these gels and constructed an experimental system to evaluate stimuli-responsive material. As a result, DPrBA/PVA gel disintegration and DPrBA release from the gel by adding Glc were observed. On the other hand, in PolyPBA/PAA gel with GOx, gel disintegration and PolyPBA release accompanying it due to adding Glc were not observed. This is probably because there were still crosslinking points remaining even though some were cut off by Glc because the gel has so many crosslinking points between PolyPBA and PAA. This suggests that it is important to minimize the boronic acid in the molecule to form a highly sensitive Glc-responsive composite material when it interacts with water-soluble polymers. Thus, information for optimizing responsiveness was obtained with an experimental system that continuously and visually evaluates the drug release of stimuli-responsive material.

In chapter 4, as an application of Glc-responsive material design using previous evaluation systems, I examined controlled-release with a gel composed of insulin (Ins) derivatives with multiple boronic acids and PVA. From the results of the QCM method, it was possible to observe composite material formation and Glc-responsive disintegration by interaction between boronic acid-modified Ins and PVA. I also evaluated characteristic changes due to the difference in modified boronic acid derivatives. In release tests using a flow-through cell type dissolution tester, the release of PBA-Ins from PBA-Ins/PVA gel with GOx was observed by the influx of Glc. In other words, it was shown that GOx is effective for improving Glc-responsiveness. Since GOx was also released by Glc stimulation along with the increase in the PBA-Ins release rate, it was also clarified that release in response to Glc stimuli is caused by a change of the network structure in the gel. Therefore, it seems that various information could be obtained and the design of a novel sugar-responsive Ins release material could be achieved by combining the experimental systems tried thus far.

From the above, I selected and constructed a physicochemical evaluation method to confirm accurately the characteristics to be focused on among the various material properties. Useful information for designing sugar-responsive materials with the desired drug release characteristics could be obtained by combining these experimental systems. This can be applied to other stimuli-responsive materials, and a more effective material design can be made possible by collecting and accumulating various characteristic data. It therefore seems that this will lead to the development of a drug formulation with an ideal release control function by repeatedly improving both the evaluation method and the material design.

論文審査の結果の要旨

薬物送達システム (DDS) は、標的部位への薬物指向性、製剤からの薬物放出制御、および生体への吸収促進を基礎として、高度な機能を製剤に付与することで薬物の体内動態を精密に制御することを概念としている。薬物放出制御技術のうち、主に時間的および量的制御を基盤として長時間に亘り薬物放出を可能にする徐放性制御は、多くの医薬品で既に利用され、投与回数の軽減を可能にしている。一方、環境や外部刺激に応答した放出制御は空間的制御を製剤に付与することができ、高機能な製剤材料として盛んに研究されている。

本論文は、環境に応答して薬物放出制御することが可能な製剤材料として、複数のヒドロキシ基を有する構造に感受性のあるポリボロン酸構造を導入した糖応答性高分子ゲルのデザインを目的とするとともに、薬物放出制御に直接関係する因子であるゲル中での物質間相互作用を評価するための評価系の有用性も併せて明らかにしている。論文構成は4章からなり、第1章では静的および動的粘弾性測定によるゲル特性の評価、第2章では水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法を用いたゲル内での相互作用の評価、第3章ではフロースルーセル型 (FTC) 溶出試験器を用いて糖に応答したゲル崩壊性の評価を行い、放出制御能を有する高分子ゲルの物性および機能性評価に対するこれら手法の有用性を検討している。さらに第4章では、インスリン (Ins) にフェニルボロン酸構造を組み込んだモデル薬物を合成し、それを内封したゲルからの糖応答性 Ins 放出を評価し、ポリボロン酸構造を利用することで薬物放出に対する高い機能性を有する製剤素材の開発が可能であることを示している。

第1章では、ボロン酸導入数が異なる3種のピリジニウムボロン酸誘導体 (PrBAs) とポリビニルアルコール (PVA) からなるゲルについて、静的および動的粘弾性測定を実施し、ボロン酸数とゲルの物性との関係性を評価している。静的手法により得られる応力緩和測定結果および動的手法により得られるひずみ分散測定と周波数分散測定結果に基づき、ゲル内部の架橋状態や3次元ネットワークの状態を推測することが可能であるとの知見を得た。

第2章では、ボロン酸化合物とゲルの相互作用の検出に QCM 法を利用している。この方法は、振動子にゲル基剤とボロン酸化合物の溶液を交互に流したとき、両者に相互作用が生じる場合に質量が増加して振動数が低下することを利用して相互作用を検出するという原理である。前章で用いた PrBAs のボロン酸構造と PVA のヒドロキシ基の間で生じる化学的な相互作用に加え、ポリフェニルボロン酸 (PolyPBA) とポリアリルアミン (PAA) の静電的相互作用とゲル形成能の関係を評価している。PrBAs/PVA と PolyPBA/PAA では、それぞれ相互作用変化に速度的な違いが観察され、QCM 法を用いてゲル内部で生じる相互作用機構を推測できることを明らかにした。また、第4章で詳述する応用の基礎的検討として、グルコースオキシダーゼ (GOx) と PAA との間で静電的相互作用が起こることも明らかとし、QCM 法がさまざまな複合材料の評価に利用できることを示した。

第3章では、糖感受性ゲルの応答性を評価するための FTC 溶出試験器の利用について検討している。PrBAs の一つである dipyrnidiniumboronic acid (DPrBA) を架橋剤として用いた DPrBA/PVA ゲルにグルコース (Glc) 含有液を接触させると、架橋剤である DPrBA の放出液中への放出とそれに伴うゲルの崩壊が観察された。また放出液を段階的に変更することができることから、刺激応答性のような機能を有する製剤材料の評価に FTC 試験器を用いた方法が有用であることを示した。

上述したように、複数のボロン酸構造を有する化合物は PVA のような高分子との間で糖応答性の機能性高分子ゲルを形成することが明らかとなったことから、第4章では実際の薬物放出制御を念頭に置いた検討を行っている。すなわち、 pK_a の異なる2つのフェニルボロン酸修飾した Ins (PBA-Ins および FPBA-Ins) を合成し、これを PVA との架橋剤として組み込むことで、糖応答性 Ins 放出に応用できるかを検討した。まず QCM 法を用いて、これら Ins 誘導体が PVA と相互作用してゲル形成することを示し、PBA-Ins と FPBA-Ins では振動数変化の影響の受けやすさが異なることから、Ins 誘導体による架橋形成の強さの違いを検出できることが示された。ボロン酸に対する結合定数の異なる Glc およびフルクトースを用いて糖応答性を評価したところ、結合定数および適用濃度に応じた結合の解離が検出され、糖応答性薬物放出制御に利用できることを示した。しかし、結合定数の低い Glc に対する応答性は低かったため、応答性を高めるために PBA-Ins/PVA に GOx を内封したゲルを調製し、Glc 存在下、GOx の触媒反応から生じる H_2O_2 によるゲルからの間接的な薬物放出制御が可能かどうかについて検討した。FTC 試験器を用いて Glc 含有放出液に対する PBA-Ins の放出性を評価したところ、GOx を内封したゲルでは効率的な PBA-Ins 放出性を示し、ボロン酸誘導体を利用したゲルからの糖応答性を高めるために、このような間接的手法が利用できることも併せて示した。

以上、本論文の結果から、静的および動的粘弾性測定や QCM 法を利用して分子間相互作用に基づく刺激応答性製剤材料の物性評価が可能であり、さらに FTC 試験器による放出性評価と組み合わせることで、刺激応答性ゲル製剤の機能性も評価できることが示された。本論文では、ボロン酸誘導体による架橋構造やゲル内での静電的相互作用をゲル内部に導入し、これら評価法から得られる情報を利用してしながら糖応答性 Ins 放出を可能にする高度な機能性材料の調製に繋げることができており、今後、さまざまな機能性製剤材料のデザインに応用されることが期待できる。新規の機能性製剤材料の開発に対する新たなアプローチとして学術的意義が高く、新規性も有している内容であると判断できる。よって本論文は、本研究科課程による博士(薬学)論文として十分な価値を有するものと判断する。