糖鎖コンジュゲート材料とDDS

特集 DDSのシーズ——糖とDDS

丸 山 厚^{*1,2)}

Glyco-conjugates for DDS

Carbohydrates have several unique biofunctions that are useful for drug delivery systems. To utilize these functions, glyco-conjugate design and chemistry are important. Glyco-conjugate materials consisting of polymeric materials and polysaccharides for DDS were described.

糖鎖の機能をDDSへ応用するには、糖鎖コンジュゲート材料が必要となろう。多糖と高分子材料からなる糖鎖コンジュゲートの設計とDDSへの応用について紹介する。

Atsushi Maruyama^{*1,2)}

key words : polysaccharides, bioconjugates, polycation, gene carriers, nanoparticles

糖鎖はさまざまな種類の糖が、特定の配列および結合様式で結合しており、DNAや蛋白質にくらべてより多様性が高い分子であり、その生体機能が注目されてきた。昨今の糖鎖機能解明に向けた精力的な取り組みにより、感染、細胞間認識、情報伝達に加え細胞分裂などに関わる役割など、糖鎖の持つ新たな生体機能が日に日に解明されてきている。したがって、糖鎖を巧みに利用することにより、新しい機能を盛り込んだDDS材料をはじめとする生命工学分野が構築できよう。一方、多糖の生体機能を最大限生かした材料を構築するためには、糖鎖の導入方法や導入量などを的確に制御する必要もある。

筆者らは、多糖と合成高分子との複合化材料(バイオコンジュゲート材料)に着目し、そのDDS材料や診断材料への応用を検討している。本稿ではその一端を紹介する。

バイオコンジュゲート素材としての多糖

多糖の個々の生体機能・生理活性に加え、多糖には高分子素材として特徴的な点がある。それらは、① 親水性・水溶性、② 加水分解性・生分

解性、③ 一つの還元末端の存在、および④ ユニークな高次構造形成などである。水溶性の面では、合成高分子にもポリエチレンオキシド、ポリオキサゾリンおよびポリビニルアルコールなど水溶性高分子は多いが、生分解性のものは数少ない。また、分解産物が糖あるいはオリゴ糖であることは、安全面を考えると大きなメリットである。また、この分解性を利用して適切な分子量の多糖を得ることもできる。一方、多糖は化学構造が複雑で、かつ多数の水酸基などの官能基を持つことで、化学合成や化学修飾が一般的に困難である。当然、材料へのコンジュゲート化方法が制約される。

このような状況下、多糖の修飾やコンジュゲート化を行ううえで、多糖の還元末端の存在はきわめて有用である。多糖や糖鎖には、基本的には一つの還元末端と一つ以上の非還元末端が存在する。非還元末端は、多糖の分岐状態に依存して増えるが、還元末端は基本的に一つである。還元末端の糖の1位は、アルデヒドとしての性質を持ち、多糖鎖中の他の水酸基とは反応性が異なる。したがって、還元末端の反応性を利用することで、多糖や糖鎖の位置特異的な修飾が可能となる。多糖の分子量を加水分解により制御した場合も、切断部位に還元末端が新たに生じるため、分子量を制御した多糖の修飾・コンジュゲート化にも非還元末端を利用することができる。

^{*1)} Department of Biomolecular Engineering, Tokyo Institute of Technology 東京工業大学大学院生命理工学研究科

^{*2)} Presto, Japan Science and Technology Agency 科学技術振興機構 さきがけ

図1 還元末端を利用した多糖コンジュゲーション

図2 ヒアルロン酸・ポリカチオンバイオコンジュゲートの調製

そもそも糖蛋白質や糖脂質の糖鎖は、還元末端側で蛋白質あるいは脂質に結合しているため、還元末端での材料への修飾は、生体中と同様に糖鎖を提示するうえでも有用である。このような非還元末端の反応性を利用し、保護基などの導入・脱保護なしに固相表面や蛋白質、あるいは合成高分子とのコンジュゲート作製が可能となる(図1)。

ヒアルロン酸・ポリカチオンコンジュゲート

多糖の持つ多様性を遺伝子デリバリーに応用する目的で、多糖をポリカチオン主鎖に導入したグラフ

ト共重合体を調製した。ヒアルロン酸(HA)は、*N*-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の繰り返し単位からなる多糖であり、血中のHAは肝臓の類洞内皮細胞(SEC)特異的に取り込まれることが知られている。肝臓は肝実質細胞(PC)のほかに、クッパー細胞(KC)・星細胞・SECなどの非実質細胞群からなり、互いに密接な連携を保ちながら恒常性を維持している。これらの構成細胞それぞれに対するDNAキャリアーシステムが構築できれば、肝機能を制御するうえで有用であろう。

そこで、ポリカチオンであるポリリシン(PLL)の側鎖にHAを導入したグラフト共重合体(PLL-g-HA)を合成した(図2)。入手可能なHAは分子量数十万と高分子量であるため、まずヒアルニダーゼで消化し、分子量3,000~10,000程度のフラクシオンを得たのち、還元アミノ化によりグラフト共重合体を調製した^{1,2)}。PLL-g-HAはポリカチオンであるPLLとポリアニオンであるHAからなるため、さらに、ポリアニオンであるDNAを加えたときに複合体を形成できるかが問題となる。複合体形成能を評価した結果、幸運なことにポリアニオンであるHA側鎖の存在にかかわらず、PLL部位のカチオンとDNAのアニオンとでほぼ1:1の複合体を形成することがわかった。つまり、HA部位が複合体形成は関与せずフリーで存在することが示唆される。

PLL-g-HA/DNA複合体は、PLL/DNAのコアの周りをHA層が覆い、見かけ上はHA粒子として振る舞うことが期待される。実際、PLL-g-HA/プラスミドDNA複合体は、100ナノメートルオーダーの粒子径を保ち、かつその表面は負荷電であった。HAを側鎖にしたグラフト共重合体構造が、このような複合体構造を形成させるうえで重要な役割を果たしていることが示唆される。形成させた複合体は、表面上にHAが存在することにより、生体内での非特異的相互作用を抑制し、HAの細胞認識性を生かしたSEC選択的遺伝子デリバリーへの応用が期待された(図3)。そこで、³²P標識したプラスミドDNAとの複合体をラット尾静脈より投与し、その体内動態を評価した。PLL-g-HA/DNA複合体は、PLLホモポリマーやPLL/HA混合物での複合体と比較して、肺や腎臓への集積性を有意に抑制し、1時間後に

図 3 細胞特異的 DNA キャリアーとしての PLL-g-HA コンジュゲート

図 4 アラビノガラクトランの構造

は 90% の放射線活性が肝臓で得られた。さらに、遺伝子発現活性を評価した結果、肝臓の類洞組織に沿って観察された。一方、プラスミド DNA だけでも肝臓に集積しやすいが、遺伝子発現は検出できなかった。

これらの結果により、PLL-g-HA が SEC 特異的遺伝子キャリアーとしての標的細胞指向性を持つことが確認された。さらに、類洞内皮細胞の機能制御を目的に、転写因子 NF- κ B に対するデコイ DNA の導入を *in vitro* で検討した³⁾。TNF α 刺激により内皮細胞は細胞間接着因子 ICAM-1 を発現する。一方で、デコイ DNA を PLL-g-HA とともに細胞に導入することにより、ICAM-1 の発現が有意に抑制された。

高分枝型多糖とのコンジュゲートによる遺伝子デリバリー

他の標的細胞でも多糖を利用したキャリアー設計が可能であるか、また、多糖の構造が複合体の性状に与える影響を評価するために、PC を標的とした

デリバリーシステムの構築を試みた。PC 特異的に発現している動物レクチンであるアシアロ糖蛋白質レセプター (ASGPR) は、クラスター化した β -ガラクトース構造を認識することから、多糖としてアラビノガラクトラン (AG) に注目した。AG は、非還元末端に多数の β -ガラクトース構造を持つ高度に分岐した多糖であり (図 4)、末端 β -ガラクトースのクラスター化によって、ASGPR との高い親和性が期待できる。

そこで、PLL とのグラフト共重合体 (PAX) を作製し、ヒト肝癌細胞由来株である HepG 2 を用いて *in vitro* で遺伝子発現評価を行った⁴⁾。その結果、ASGPR 特異的に遺伝子発現することがわかった。ところが、クロロキン非存在下では遺伝子発現が抑制され、エンドサイトーシス機構によって、内在化した DNA 複合体の大部分がリソソームで分解されてしまうと考えられた。より高い遺伝子発現効率を得るためには、エンドソームからの放出を促進させることが重要になってくる。膜融合ペプチドや脂質を用いて、積極的にエンドソーム膜を破壊する方法が解決策の一つである。最近では、膜透過性ペプチ

ドとしてアルギニンに富むペプチドが注目されている。

もう一つの方法が、エンドソーム pH で緩衝作用を持つポリカチオンの利用であり、ポリエチレンジアミン (PEI) がその代表例である。PEI は、エンドソーム内の酸性度を減少させることで、エンドソームへのイオン・水分子の流入を促進し、最終的にエンドソームを破壊することで細胞質への移行を促進させ (プロトンスポンジ効果)、遺伝子発現能を高めると考えられている。

そこで、PLL の代わりに PEI をポリカチオンとして着目し、標的細胞内での DNA の動態制御を試みた。PLL 系と同様に、AG と PEI のコンジュゲート化により、それぞれのポリマーが持つ細胞特異性と細胞質移行性を両立できるか検討した⁵⁾。PEI (数平均分子量: 1×10^5) も高い分枝を持つ高分子であり、AG とのコンジュゲート化には困難が予測された。実際、反応は長時間を必要としたが、AG (数平均分子量: 2.5×10^4) を還元アミノ化法により導入できた。AG の仕込み量を調節することで、47~88 wt% と AG の導入量が幅広く制御された PEI-AG を合成できた。PEI-AG と DNA 複合体は PAX と同様に、高い分散安定性を保持した。AG 導入量が同等の系で遺伝子発現を検討した結果、PEI のほうが PLL よりも 100 倍程度発現効率が高く、PEI の高い遺伝子発現効率を活かされていることがわかった。

さらに、AG の導入量の遺伝子発現に対する効果を検討し、PEI の遺伝子発現活性を 100 としたときの比活性を図 5 に示す⁵⁾。ASGPR を発現しない 3T3 や HeLa 細胞では、AG の導入により遺伝子発現が著しく抑制された。一方、初代 PC では、PEI-AG 47 は PEI とほぼ同等の遺伝子発現活性を示した。つまり、AG により非標的細胞との非特異的な相互作用は顕著に抑制されるが、標的細胞である PC には ASGPR 介在的に相互作用し、高い発現活性を維持したと考えられる。

しかしながら、AG 含量を増加させると発現活性は標的細胞に対しても大きく低下した。過剰の親水性側鎖の導入は、PEI 部位と DNA との静電的相互作用を弱め、複合体安定性が失われたためと考えられる。効率のよい発現を実現するためには、AG の導

図 5 AG-PEI コンジュゲートによる遺伝子導入
□ PEI, ■ PEI-AG 47, ▨ PEI-AG 64

図 6 生分解性多層性ナノパーティクル

入量の最適値が存在することがわかる。このように、調製法が容易な一面を生かすことにより、グラフト共重合体の構造の最適化やさらなる高機能化が期待できる。

多層性生分解性ナノパーティクル

ナノパーティクルの医薬キャリアーとしての主要な課題の一つは、薬物の封入法に制約があることである。ミクロンオーダーのパーティクルでは、W/O/W エマルジョン法などにより、比較的容易に薬物やペプチド性医薬の封入が可能であるが、細粒化に伴い困難になる。

筆者らは、粒子を形成させたあとに核酸医薬などの担持 (後ローディング) が可能で、かつ表面性状を制御可能なナノパーティクルの調製法を、多糖コンジュゲートを利用しながら検討した^{6,7)}。末端にカルボン酸基を有するポリ乳酸と、ポリリジン・ポリカ

チオンコンジュゲートの相互作用を利用して、図6に示すようなおおむね3層の構造を有する生分解性ナノパーティクルの設計を行った。多糖などの親水性側鎖を配するポリリジングラフト共重合体と、ポリ乳酸を含むジメチルスルフォキシド(DMSO)溶液を水に対して透析(溶媒置換)することにより、分散安定性の高いナノパーティクルが得られた。ポリ乳酸末端のカルボキシル基と共重合体のポリリジン主鎖は、イオンの相互作用する。その結果、水の濃度の増大に伴い、ポリ乳酸が相分離する過程において、グラフト共重合体がポリ乳酸相の界面エネルギーを減少させ、ナノパーティクルの生成を安定化したものと考えられる。共重合体の初期濃度あるいは共重合体中の親水鎖の含量が高いものほど、小径の粒子(<100 nm)が生成し(図7)、ナノパーティクルの粒径制御が可能であることがわかった。

一方、親水鎖のグラフト率が高い共重合体で調製したパーティクルほどDNAの飽和吸着量が高いことが見いだされた。表面吸着型の微粒子では、元来微粒子あたりのDNA担持量が低い欠点がある。しかしながら、この系では細粒化が可能であり、また、表面積あたりのDNA吸着量をグラフト共重合体の組成により増大させられることから、これらの欠点が克服できる。

このようにして得られた粒子表面では、より親水性の高い多糖鎖が最表面を占有する。実際、リン酸塩やDNAなどのポリアニオンに対しても凝集が誘起されず、最表面に親水性グラフト鎖が優先的に存在し、凝集を妨げていることが示唆された。同様なことは、表面電位測定からも考察されている。

ポリリジンホモポリマーから調製されたナノパーティクルは、正に高い ζ 電位を示すが、共重合体を用いて調製した粒子は、親水鎖含量の増大とともに大きく減少し、ほぼニュートラルな ζ 電位を示す。DNAに対する飽和吸着量が高い粒子で、よりニュートラルに近い ζ 電位が観察された結果は、親水鎖の存在が ζ 電位測定における滑り面を、より沖合に移動させた結果と考えられる。血清アルブミンや細胞との相互作用も、グラフト共重合体粒子では顕著に抑制され、最外相に親水鎖が存在することにより、細胞やアルブミンとの非特異的な相互作用が

図7 コンジュゲートを用いたポリ乳酸微粒子の調製

図8 アンチセンスDNAの皮内徐放

実線：ナノパーティクル、破線：ポリマーコンプレックス
点線：アンチセンスのみ

効果的に抑えられた結果と考えられる。

このように後ローディング可能であり、かつ最外層の性質が制御できる多層型ナノパーティクルは、DNA医薬の放出担体やキャリアーとして多くに利点を兼ね備えていると期待される。一例として、アンチセンス医薬のリザーバーとしての機能を評価した結果を図8に示す。フリーのアンチセンスやアンチセンスと糖鎖コンジュゲート(PLL-Dex)との複合体を皮内に導入しても、速やかに皮内から拡散する。一方、PLL-Dexで調製したナノパーティクルにアンチセンス担持させ導入した場合には、長時間に

わたりアンチセンスが皮内に滞留することがわかった。

まとめ

グライコミクス研究の推進により、今後ますます、さまざまな糖鎖の生体機能が解明されていることが期待されるが、同時に糖鎖の合成手法や解析手法も日進月歩で進んでいる。これらの進展をDDS研究に取り込むうえで、糖鎖バイオコンジュゲート材料がますます注目されるものと期待している。とりわけ、クラスター構造や配向構造などのナノ構造を精密制御したバイオコンジュゲート材料の設計法が必要と考えられる。

なお、本稿で紹介した研究は、多くの共同研究者の努力の結果であり、紙面を借りて感謝を表したい。

文 献

1) Asayama S, Nogawa M, Takei Y, Akaike T, Maruyama

A: Synthesis of novel polyampholyte comb-type copolymers consisting of a poly(L-lysine) backbone and hyaluronic acid side chains for a DNA carrier. *Bioconjugate Chem* 9: 476-481, 1998.

- 2) Takei Y, Maruyama A, Asayama S, Nogawa M, Akaike T et al.: Targeted gene delivery to sinusoidal endothelial cells: DNA nanoassociate bearing hyaluronan-glycocalyx, *FASEB J.*, accepted.
- 3) Shibuya T, Takei Y, Maruyama A, Sato N: A double-stranded decoy DNA oligomer for NF- κ B inhibits TNF α -induced ICAM-1 expression in sinusoidal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 10-16, 2002.
- 4) Park JU, Ishihara T, Kano A, Akaike T, Maruyama A: Preparation of dendritic Graft copolymer consisting of poly-(L-lysine) and arabinogalactan as a hepatocyte specific DNA carrier. *Prep Biochem Biotech* 29: 353-370, 1999.
- 5) Nogawa M, Ishihara T, Akaike T, Maruyama A: Polyethylenimine/arabinogalactan conjugate as a hepatocyte specific gene carrier. *STP Pharma Sciences* 11: 97-102, 2001.
- 6) Maruyama A, Ishihara T, Akaike T, Kim JS, Kim SW: A nanoparticle DNA carrier with poly(L-lysine) grafted polysaccharide copolymer and poly(D, L-lactic acid). *Bioconjugate Chem* 8: 735-742, 1997.
- 7) Maruyama A, Ishihara T, Kim JS, Kim SW, Akaike T: Design of multi-layered nanoparticles as a DNA carrier. *Colloids Surf A* 153: 439-443, 1999.