

氏名	谷口育雄
学位(専攻分野)	博士(工学)
学位記番号	工博第1806号
学位授与の日付	平成11年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工学研究科合成・生物化学専攻
学位論文題目	Synthesis and Characterization of Cell-Specific Hydrophobized Polysaccharides (細胞特異性疎水化多糖類の合成と機能評価) (主査)
論文調査委員	教授 砂本順三 教授 田中渥夫 教授 齋藤 烈

論文内容の要旨

本論文は、疎水化多糖コレステロール置換プルラン (CHP) に細胞特異性糖鎖としてガラクトースとラクトースを導入し、その機能をガラクトース特異性レクチンおよび種々の実細胞との相互作用を通して検討した結果を、緒言と結言に加えて4章にまとめたものである。

緒言では、本研究の目的と意義について述べている。また、細胞表層での糖鎖認識に関する研究の歴史的背景を概説すると共にその分子レベルでの理解の重要性を指摘している。

第1章では、疎水化多糖誘導体の合成とその水溶液物性を検討している。実細胞表層における糖鎖認識の実験室系でのシミュレーションを念頭に、疎水化多糖コレステロール置換プルラン (CHP) にガラクトースおよびラクトースを長さの異なるスペーサーを介して種々の置換度で導入した。合成したCHP誘導体が水溶液中で自己会合し、粒径30nm程度のサイズ分布の小さいヒドロゲルナノ微粒子を形成することをサイズ排除クロマトグラフィーによって確認した。

第2章では、ガラクトース特異性レクチンおよびガラクトースオキシダーゼと上記合成したCHP誘導体との相互作用を検討した。細胞特異性糖鎖を導入したCHP誘導体が形成するナノ微粒子は、ガラクトース特異性レクチンRCA₁₂₀に強く結合した。またこの結合反応を定量的に解析した結果、細胞特異性糖鎖を高分子主鎖にグラフト化することによって、レクチンに対する親和性が飛躍的に増大することを見出した。また、親和性は糖鎖の化学構造やスペーサー長 (レセプターまでの距離) および導入率 (糖鎖密度) にも強く依存することを見出した。ガラクトースオキシダーゼに対する反応性の変化について速度論的解析を行った結果では、酵素に対する親和性がやはり劇的に増大 (K_m 値の減少) し、その結果酵素の触媒効率 (k_{cat}/K_m) が増加することを認めた。特に、酵素に対する親和性がガラクトース残値の局所濃度と密接に関連していることを見出した。

第3章では、上記CHP誘導体と種々のガン細胞との相互作用およびラットへの静中後のその体内動態を検討した。ガラクトース導入CHPナノ微粒子を¹²⁵Iで放射ラベル化し、種々の動物細胞およびガン細胞による取り込みを検討した。その結果、ガラクトースレセプターの存在が知られているラット肝実質細胞やHepG2細胞においてのみ、有意な取り込みの増加が見られた。これはレセプター介在型の食胞によるものと指摘した。これらのCHP誘導体でリポソームやO/W-エマルジョンの表面を被覆した微粒子についても同様の検討を行い、いずれもHepG2細胞への取り込みが増加することを認めた。また、ナノ微粒子について、ラットにおける体内動態を観察した結果、ガラクトース基を導入することによって微粒子の肝臓への分布が増大することを見出した。即ち、新たに導入した細胞特異性糖鎖が細胞レベルはもちろん生体組織レベルでも有効に機能していることを明らかにした。

第4章では、種々の抗ガン性抗生物質との複合体形成について検討した。疎水化多糖ナノ微粒子は制ガン剤ドキシソルピシン等の低分子化合物と水溶液中で安定な複合体を形成する。ドキシソルピシンはCHP誘導体のナノ微粒子とも複合体化によって安定化され、HeLa細胞に対する抗腫瘍活性も維持されていることがわかった。また、ネオカルチノスタチン (NCS) は

その活性を担っているクロモフォア部分 (NCS-*chr*) とアポタンパク質部分 (apo-NCS) から構成されている。従来NCS-*chr*は非常に不安定であり、その生理活性発現にはapo-NCSが必須であると考えられてきた。ホロタンパク質から抽出したNCS-*chr*もCHPナノ微粒子と安定な複合体を形成し、得られた複合体は種々のガン細胞に対して細胞増殖抑制を示した。特にガラクトース導入CHPナノ微粒子との複合体では、ガラクトースを特異的に認識する3'-mRLh-2細胞に対して、NCSそのものに匹敵する細胞毒性を発現した。これらの事実より、NCS-*chr*はCHP誘導体と複合体形成後もその生理活性を保持しており、CHP誘導体がNCSのアポタンパク質の機能をも代行し得ることを明らかにした。

結言では、本研究で得られた成果を総括し将来への展望を述べている。

論文審査の結果の要旨

本論文は、疎水化多糖コレステロール置換プルラン (CHP) にさらに細胞特異性糖鎖としてガラクトースおよびラクトースを導入し、その機能をレクチンおよび種々の実細胞との相互作用、および動物実験を通して検討した。その結果を緒言と結言に加えて4章にわたって述べている。得られた成果は以下の通り要約される。

- (1) 疎水化多糖CHPにガラクトースおよびラクトースを導入した。RCA₁₂₀レクチンに対する結合定数を定量的に決定することに成功し、糖鎖を高分子に導入することによって結合定数が飛躍的に増大することを示した。また、糖鎖の化学構造、結合に用いたスペーサー長および置換度がレクチンに対する親和性に強く影響することを明らかにした。ガラクトースオキシダーゼに対する反応性についても定量的に解析することに成功し、糖鎖密度が親和性の増大に密接に関連していることを明らかにした。
- (2) 新規に分子設計した細胞特異性CHP誘導体が種々の動物細胞、特にガラクトース特異的レセプターを有する肝実質細胞およびHepG2細胞に対して親和性を大きく向上させることを見出した。また、動物実験でも合成したCHP誘導体が肝臓へ特異的に集積することを見出し、新たに導入した細胞特異性糖鎖の有用性を認めた。
- (3) ドキソルビシンおよびネオカルチノスタチンクロモフォアなどの抗癌性抗生物質とCHP誘導体との複合体形成能および得られた複合体の種々のガン細胞への毒性試験から、新たに合成したCHP誘導体が薬物運搬体としても有効に機能することがわかった。

以上、本論文では、疎水化多糖に更に細胞特異性糖鎖を導入し、基盤である多糖の特性を利用して、細胞表層での糖鎖認識における糖鎖構造、スペーサー長および糖鎖密度の効果を定量的かつ系統的に評価するという独創的方法を展開した。これらの研究成果は学術的にも実際的にも極めて有意義である。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認めた。また、平成11年1月26日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。