

称号及び氏名 博士（工学） 山本 聡

学位授与の日付 平成 30 年 3 月 31 日

論文名 「Functional Evaluation of TiO₂ Nanoparticles-Incorporated Polyion Complex Micelles for Sonodynamic Therapy
(超音波力学療法のための二酸化チタンナノ粒子内包ポリイオン
コンプレックスミセルの機能評価)」

論文審査委員 主査 八木 繁幸
副査 松本 章一
副査 久本 秀明
副査 原田 敦史

論文要旨

光線力学療法（PDT）は様々ながん治療に適用されており、その侵襲性の低さから新規ながん治療法として注目されている。PDT では、腫瘍に集積した光増感剤へ適切な波長のレーザー光を照射することで生成する活性酸素種（ROS）ががん細胞に効果を及ぼす。また、光増感剤を腫瘍細胞へ送達するドラッグデリバリーシステムを開発することにより、腫瘍細胞を選択的に攻撃でき、非侵襲的な治療が実現できる。しかしながら、光は生体深達度が低く、生体深部の腫瘍への有効性が低いことが課題である。超音波力学療法（SDT）は、超音波照射により ROS を生成する超音波増感剤と超音波を組み合わせた治療法である。SDT に用いられる超音波は安全に生体深部に到達できることから、SDT は PDT の課題を克服でき、生体深部の腫瘍に対しても高いがん治療効果が期待できる。

PDT や SDT における抗腫瘍効果は ROS による細胞ダメージに由来し、特に一重項酸素 (¹O₂) が抗腫瘍効果を発現する ROS と考えられている。¹O₂ は細胞内で局所的な酸化ダメージを与え、自発的な細胞死であるアポトーシスを誘導する。特に、ミトコンドリアへの酸化ダメージがアポトーシス誘導に効果的であることが知られており、それが様々なストレスシグナル経路のトリガーとなり、アポトーシスを誘導することが多数報告されている。すなわち、効果的な SDT の実現には ¹O₂ によるミトコンドリアダメージが重要である。

近年、二酸化チタン (TiO₂) は超音波照射により ROS を生成することから、超音波増感剤としての利用が検討されている。TiO₂ ナノ粒子は生体適合性や生理条件下での安定性などの優れた特性から有用な増感剤である一方、生理的 pH で分散性が低く、血中で凝集する可能性があるため、TiO₂ ナノ粒子を運搬するキャリアシステムの開発が必要不可欠である。Harada らは TiO₂ ナノ粒子の表面負電荷に着目し、カチオン性高分子であるポリアリルアミンに生体適合性に優れたポリエチレング

リコールを導入したグラフト共重合体 (PAA-g-PEG) と静電的に複合化することで、TiO₂ ナノ粒子内包ポリオンコンプレックス (PIC) ミセルを構築した。この PIC ミセルは、表面が PEG 鎖で覆われ、かつ、内核に TiO₂ ナノ粒子を担持した構造をとると考えられ、水中での高い分散安定性を示した。さらに、細胞に取り込まれた PIC ミセルは超音波照射により ¹O₂ を生成し、照射部位特異的に殺細胞効果を誘導した。これは PIC ミセルを用いた SDT が、高度に時空間制御された治療効果を実現できることを示している。しかしながら、¹O₂ は反応性が高いために寿命が短く、持続的な治療効果は期待できない。この問題に対して、ミセルにより超音波増感剤と他の薬物を同時に運搬し、SDT と他のがん治療法を組み合わせることは治療効果の増強につながる。そこで、本論文では TiO₂ ナノ粒子内包 PIC ミセルの薬物キャリアとしての機能を検討した。また、PIC ミセルの調製に用いるポリマーの組成や超音波条件が及ぼす SDT 効果への影響を検討することで、PIC ミセルの低侵襲超音波力学療法への応用を目指した。

本論文は以下の 5 章から構成される。

第 1 章は本論文の緒言として、研究背景と目的及び本論文の概要について述べた。

第 2 章では、TiO₂ ナノ粒子内包 PIC ミセルの調製に用いるポリマーの組成や超音波の照射条件が SDT 効果に与える影響について検討した。PEG グラフト鎖の分子量及び導入率の異なる PAA-g-PEG を合成し、TiO₂ ナノ粒子と静電的に複合化させることで、PIC ミセルを調製した。得られた PIC ミセルについて、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に対する超音波照射による SDT 効果の誘導を比較検討した。その結果、PIC ミセルは照射時間に依存した細胞生存率の低下を示し、殺細胞効果の指標として細胞生存率が 50% となる超音波照射時間 IT50 を決定したところ、ポリマーの組成の異なるミセル間で IT50 値に差が認められた。この IT50 に差が生じる要因を明らかにするために、PIC ミセルの細胞取り込みや超音波照射による ¹O₂ の生成、細胞内分布を評価した結果、PIC ミセルの調製に用いたポリマーの組成は、ミセルの取り込み量や超音波照射による ¹O₂ の生成量には影響しなかったが、細胞内分布に違いがあることが確認された。特に、超音波照射による著しい細胞生存率の低下を誘導した PIC ミセルでは、細胞質ゾルに広く分布する性質を示した。これは細胞内に広く分布したミセルが、より多くのミトコンドリアに酸化ダメージを与えることで効果的に殺細胞効果を誘導したことを示している。また、殺細胞効果の誘導に重要な ¹O₂ の生成量は超音波出力・照射時間に比例することが確認されていることから、これら超音波照射条件が及ぼす SDT 効果への影響を評価した。その結果、超音波出力の増強よりも照射時間の延長により効果的に殺細胞効果が増強された。これは、高強度の超音波を照射しても ¹O₂ の寿命が極めて短いために酸化ダメージを与えうる範囲は限定されるが、照射時間を延長することで、ミセルの拡散による細胞質ゾルでの分布範囲の増大につながり、効果的に殺細胞効果を誘導したと考えられる。さらに、これら超音波照射による SDT 効果はアポトーシスによる細胞死であることを明らかにした。これらの結果は、TiO₂ ナノ粒子内包 PIC ミセルが SDT に有用であることを示し、その実用化に向けた重要な知見である。

第 3 章では、TiO₂ ナノ粒子内包 PIC ミセルの多価アニオン凝縮効果を発見し、その特性を利用した薬物キャリアとしての機能を検討した。種々の溶媒中での PIC ミセルのゼータ電位を測定した結果、PIC ミセルは水中において最も大きな正のゼータ電位を示した。これは TiO₂ ナノ粒子に対して過剰量のポリマーを添加してミセル調製を行っているため、過剰な PAA 主鎖の正電荷に起因するものであると考えられる。興味深いことに、同一イオン濃度の Tris/HCl 緩衝液中とリン酸緩衝液 (PS) 中では、ミセルのゼータ電位は大きく異なり、PS 中ではほぼ中性のゼータ電位を示した。これは、

対イオンである塩化物イオンとリン酸イオンそれぞれの PIC ミセル近傍での分布に差があることを示し、特にリン酸イオンはミセル内核に効果的に対イオン凝縮していると考えられる。この対イオン凝縮効果を明確にするため、PIC ミセルのアニオン性化合物保持能を評価した結果、PIC ミセルの対イオン凝縮はアニオン性分子の価数に影響され、PIC ミセルは多価アニオン性化合物を高効率で保持できることが分かった。さらに、PIC ミセルは価数の異なる 2 種類の多価アニオン性化合物を同時に高効率で保持できることを明らかにした。この効果的な対イオン凝縮効果は PIC ミセルの薬物キャリアとしての利用に有用な性質であり、薬物キャリアとして機能するためには保持した薬剤の放出及び細胞内送達が必要となる。そこで、透析法により PIC ミセルからの多価アニオン性化合物の放出を評価した結果、保持した多価アニオン性化合物の緩やかな放出が確認された。さらに、多価アニオン性化合物を保持した PIC ミセルは、HeLa 細胞によって時間依存的に取り込まれ、細胞内に多価アニオン性化合物を送達した。これらの結果は、多価アニオン凝縮効果を有する PIC ミセルが多価アニオン性薬物のキャリアとして有用であることを示し、その薬物デリバリーと SDT を組み合わせた新規な治療法の開発につながるものである。

第 4 章では、疎水性プロドラッグであるカルモフルを可溶化した TiO_2 ナノ粒子内包 PIC ミセルを作製し、SDT 効果に抗がん活性を組み合わせることで治療効果の増強を目指した。カルモフルはフッ化ピリミジン系抗がん剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) のプロドラッグであり、生体内で加水分解により 5-FU に変換されることで抗がん活性を示す。カルモフル DMSO 溶液をリン酸緩衝生理食塩水に添加すると、ただちに白色沈殿が生じたが、PIC ミセル溶液に添加しても沈殿形成は確認されず、カルモフルの可溶化が確認された。そこで、カルモフル溶液を混合した PIC ミセル溶液について、動的光散乱測定を行った結果、カルモフルの可溶化による PIC ミセルの相対散乱強度及び平均粒径の変化は確認されなかった。これは PIC ミセルがカルモフルをミセル内部の疎水場へ分配させることによって可溶化したことを示している。続いて、カルモフル可溶化ミセルについて、HeLa 細胞に対する抗がん活性を評価した結果、カルモフル単独及び PIC ミセル単独では高い細胞生存率を維持したが、カルモフル可溶化ミセルは細胞生存率の低下を示した。これは可溶化により PIC ミセルがカルモフルのキャリアとして機能し、ミセル内部で加水分解により変換された親水性の 5-FU が細胞質に放出され、抗がん活性を示したためと考えられる。さらに、カルモフル可溶化ミセルは超音波照射した場合、 TiO_2 と超音波を組み合わせた SDT 効果とプロドラッグによる抗がん活性が相加的に働くことにより、細胞生存率の低下が強く誘導された。これらの結果は、抗がん活性の発現やプロドラッグの変換反応に ROS が関与する化合物を用いることで、抗がん活性と SDT 効果の相乗効果による超音波プロドラッグ治療の開発につながるものである。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章で得られた知見について総括した。

審査結果の要旨

本論文は、二酸化チタンナノ粒子内包ポリイオンコンプレックスミセル（以下、PIC ミセル）と超音波を組み合わせた低侵襲がん治療法である超音波力学療法（SDT）の治療効果の向上を目的として、

SDT 効果の誘導メカニズムの解明と PIC ミセルの薬物キャリアとしての機能評価についての研究成果をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

- (1) さまざまな組成のポリエチレングリコールグラフト鎖を導入したポリアリルアミンを用いて PIC ミセルを調製し、*in vitro* での SDT 効果の誘導メカニズムを精査した結果、SDT 効果は、超音波増感剤である二酸化チタンを担持した PIC ミセルの細胞内分布に影響され、超音波照射によって生成する一重項酸素を含む活性酸素種がミトコンドリアへ酸化ダメージを与えることによって強力に誘導されることを見出した。また、SDT 効果によって誘導される細胞死は、管理・調節された自発的な細胞死であるアポトーシスであることを明らかにした。
- (2) PIC ミセルについて、コアを構成するカチオン性高分子（ポリアリルアミン）の特性に基づいたアニオン性薬物のキャリアとしての機能評価を行った結果、多価アニオン性分子を効果的に対イオン凝縮することを見出した。また、この性質により、PIC ミセルは多価アニオン性分子を高効率で保持しながら細胞内に送達できることを明らかにし、PIC ミセルの多価アニオン性薬物のキャリアとしての有用性を示した。
- (3) PIC ミセルのコアが疎水場であることを利用して、疎水性プロドラッグの可溶化と SDT 効果について検討した結果、疎水性プロドラッグをコア内部の疎水場に分配させることで水系媒体中に可溶化できることを見出した。この可溶化の効果により PIC ミセルが疎水性プロドラッグのキャリアとして機能し、SDT 効果と疎水性プロドラッグの抗がん活性を組み合わせることによる効果的な細胞死を誘導することを明らかにした。

以上の諸成果は、二酸化チタンナノ粒子を用いた新規低侵襲がん治療である超音波力学療法の基盤となるものであり、医用材料化学、さらには医療科学分野における学術的・技術的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを証したものである。