

称号及び氏名	博士（工学） 西本 豊
学位授与の日付	令和 2 年 9 月 25 日
論 文 名	「Molecular design of dendrimers with anionic terminal groups for delivery to various lymph node-resident cells (リンパ節に存在する種々の細胞へのデリバリーのための アニオン性末端基を有するデンドリマーの分子設計)」
論文審査委員	主査 松本 章一 副査 原田 敦史 副査 久本 秀明

## 論文要旨

近年、癌免疫療法が注目されている。この治療法は、主として体が本来持っている免疫力（免疫細胞、特に T 細胞）を活かして癌と闘うことを特徴としており、他の標準療法で効果が得られなかった患者でも完治が期待できることから、科学誌「サイエンス」で 2013 年科学ブレイクスルーのひとつとして選ばれた。癌免疫は、①発生した癌組織において、全身をパトロールしている免疫細胞が癌細胞を攻撃し、癌特異的な情報を癌組織近傍のリンパ節へ運搬する、②リンパ節で癌特異的なキラー T 細胞を増殖させる、③リンパ節からキラー T 細胞が癌組織に遊走し、癌細胞を特異的に排除する、の 3 ステップで発現するため、癌免疫治療の効果向上には、リンパ節内のキラー T 細胞活性化が重要である。したがって、リンパ節へのデリバリーシステム、さらには、リンパ節内免疫細胞へのデリバリーシステム構築が重要である。

リンパ節には、様々な免疫細胞が存在するため、癌免疫療法では癌周辺リンパ節の温存が不可欠である。一方で、従来の癌治療では癌周辺の積極的なリンパ節除去が講じられてきた。リンパ節除去は、癌転移の予防措置として、また、転移性癌細胞の有無を確認する生検を行うためにやむなく実施されているのが実情である。今後の新しい癌免疫療法の開発には、リンパ節を切除することなく、非侵襲的に癌転移の有無を診断・治療する技術が必要である。

デンドリマーは樹状構造の合成高分子であり、内部及び末端構造を自由に制御できるナノ構造体である。デンドリマーの内部または末端への薬物やイメージング剤の付与は容易であり、特に末端構造の変換によって、血中滞留性、目的細胞への標的能、刺激応答性など様々な機能を付与できる。したがって、デンドリマーはドラッグデリバリーやイメージングにおける有用な運搬体である。これまでの研究で、カチオン性、ノニオン性末端基をもつデンドリマーと比べ、アニオン性末端基をもつデンドリマーは皮内投与後の効率良いリンパ節移行

能が報告されている。しかし、 dendroliマー表面のアニオン性末端構造とリンパ節への移行性やリンパ節内の細胞取り込み挙動との相関は明らかになっていない。効果的な癌免疫療法の達成には、①リンパ節内の免疫細胞にデリバリーする技術、ならびに②リンパ節内の免疫細胞とは相互作用せず転移した癌細胞を認識する技術が必要である。前者はキラーT細胞を活性化するため、後者はリンパ節内の免疫細胞を温存するための非侵襲的な癌細胞イメージングに利用できる。

本研究では、癌免疫療法への応用を目的とし、リンパ節移行性が報告されているアニオン性末端基をもつポリアミド dendroliマーの末端構造の変換により、リンパ節内の免疫細胞との相互作用制御及び癌細胞選択的なイメージングの可能性を検討した。本論文はこれらの研究成果をまとめたものであり、全5章から構成されている。

第1章では、本研究の背景及び本研究に関連する既存の研究についてまとめ、本研究の目的と本論文の構成を示した。

第2章では、リンパ節移行性を示すアニオン性末端基をもつ dendroliマーを用いて、その末端構造とリンパ節内の免疫細胞との相互作用について評価した。末端をカルボキシ基、スルホ基、またはホスホ基で修飾した dendroliマーに蛍光色素または放射性物質を結合させ、マウスの手足に皮内投与した。蛍光イメージングから、いずれのアニオン性末端基をもつ dendroliマーもリンパ節に移行することが示され、体内分布試験の結果からもリンパ節移行性は認められた。ただし、末端構造によって体内分布が異なることが示された。特に、ホスホ基末端の dendroliマーは投与部位での顕著な滞留を示し、全身循環への移行性が低かった。これは dendroliマーの末端構造が細胞との相互作用に大きく影響しているためと考えられる。次に、リンパ節から免疫細胞を採取し、 dendroliマーと免疫細胞との相互作用をフローサイト法により評価した。ホスホ基末端の dendroliマーはB細胞、樹状細胞、マクロファージと高い相互作用を示したが、T細胞との相互作用はみられなかった。このように、ホスホ基末端の dendroliマーはリンパ節内のT細胞を除く免疫細胞に効率よく運搬でき、また投与部位で顕著な滞留を示すことから、B細胞やマクロファージ、樹状細胞などを標的としたデリバリー技術または皮内滞留性製剤への応用の可能性を示すことを明らかにした。一方、カルボキシ基、スルホ基末端 dendroliマーではいずれの免疫細胞との相互作用は認められなかった。このことから、カルボキシ基、スルホ基末端をもつ dendroliマーは、リンパ節内に転移した癌細胞への薬剤のデリバリーやイメージングへの応用の可能性が示された。

これらの結果より、アニオン性末端基をもつ dendroliマーはいずれもリンパ節には移行するが、末端構造により体内分布及びリンパ節内での免疫細胞との相互作用を制御でき、用途に応じて適切な末端構造をもつ dendroliマーが使用できることを明らかにした。

第3章では、リンパ節内のT細胞との相互作用を向上させるために、カルボキシ基末端をもつ dendroliマーに疎水基を導入し、疎水性とT細胞との相互作用の関係を評価した。まず、疎水性の cis-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸無水物 (Chex) と疎水性アミノ酸であるフェニルアラニン (Phe) を反応させたカルボキシ末端 dendroliマー (Chex-Phe-den) を新たに分子設計し、合成を行った。Chex-Phe-den の比較対象化合物として、Chex のみを導入したカルボキシ末端 dendroliマー、Phe のみを導入したカルボキシ末端 dendroliマー、Chex、Phe いずれも含まないカルボキシ末端 dendroliマーも合成した。これらの dendroliマーを蛍光色素で標識し、フローサイト法を用いて免疫細胞との相互作用を評価した。その結果、Chex-Phe-den は免疫細胞と相互作用し、T細胞との相互作用も認められたが、他の dendroliマーではT細胞との相互作用は認められなかった。これらの dendroliマーはいずれも同程度のマイナスの表面電位をもつ一方、疎水性の指標である末端構造の logP 値は異なり、Chex-Phe-den が最も高い疎水性度を示した。このことから、 dendroliマーの疎水性末端構造がT細胞との相互作用に関与することが示唆された。また、4°Cでのインキュベーションでは Chex-Phe-den とT細胞との相互作用が低減したため、エンドサイトーシス経路で dendroliマーがT細胞内に取り込まれていることが示唆された。次に、Chex-Phe-den をマウスの手足に皮内投与し、in vivo

でのリンパ節移行性及びリンパ節内の T 細胞への取り込み挙動を調べた。Chex-Phe-den は、疎水性分子をもたないカルボキシ末端 dendrimer と比べて、高いリンパ節移行性を示した。また、Chex-Phe-den はリンパ節内の T 細胞と強い相互作用を示した。

これらの結果より、カルボキシ末端をもつ dendrimer への疎水基の導入により、T 細胞を含む免疫細胞との相互作用を制御できる可能性を明らかにした。本技術はリンパ節に存在する T 細胞の内部へのデリバリーとして応用でき、癌免疫療法向上に必要なキラー T 細胞の直接的活性化方法への展開の可能性を示すものである。

第 4 章では、リンパ節への癌転移の有無を非侵襲的に診断するための dendrimer イメージング剤を作製した。効率よく機能するイメージング剤を設計するために、免疫細胞に取り込まれにくいカルボキシ末端 dendrimer に、癌細胞を検出するための蛍光プローブを付与した。この蛍光プローブは、転移性癌細胞が分泌するマトリックス・メタロプロテアーゼ-2 (MMP-2) によって開裂するペプチド (GGPLGLAGGKG) のリシン (K) の側鎖に蛍光物質であるフルオレセインイソチオシアネート (FITC) を結合させ、N 末端に消光剤である *p*-メチルレッド (pMR) を付与したものである。Dendrimer とはペプチドの C 末端のグリシン (G) と結合させた。上記のイメージング剤を用いたシステムを使用すると、MMP-2 非存在下では蛍光共鳴エネルギー移動のために消光しているが、MMP-2 存在下では PLGLAG 部分が開裂し、消光状態が解除されて FITC が発光する。蛍光測定により、分子設計から予測されたとおり、MMP-2 酵素の存在下で FITC の蛍光増加を認めた。細胞実験の結果、MMP-2 を分泌するヒト繊維肉腫由来の HT1060 細胞の可視化に成功し、その効果は MMP 阻害剤により抑制された。一方、MMP-2 を分泌しないマウスマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞は可視化されなかった。

これらの結果より、MMP-2 応答ペプチドを付与した dendrimer は MMP-2 を分泌する癌細胞を選択的に可視化できることを明らかにした。

第 5 章では、本論文で得られた成果を総括した。

## 審査結果の要旨

本論文は、癌免疫療法への応用を目的とし、リンパ節移行性が報告されているアニオン性末端基をもつポリアミドアミンデンドリマーの末端構造の変換により、リンパ節内の免疫細胞との相互作用制御及び癌細胞選択的なイメージングへの応用について検討したものである。様々なアニオン性末端基を有する樹状高分子（デンドリマー）の設計・合成とそれらのデリバリー能・イメージング能の評価に関する研究成果をまとめ、以下の成果を得ている。

- (1) カルボキシ基、スルホ基、またはホスホ基で修飾したアニオン性末端基をもつポリアミドアミンデンドリマーを合成し、これらのデンドリマーをマウスの手足に皮内投与して末端構造がリンパ節移行能およびリンパ節内の免疫細胞との相互作用に与える影響について検討した結果、アニオン性末端基をもつデンドリマーはいずれもリンパ節には移行するが、末端構造により体内分布及びリンパ節内での免疫細胞との相互作用が異なることを明らかとした。
- (2) リンパ節内の免疫細胞との相互作用を向上させるために、カルボキシ末端をもつデンドリマーに疎水性の *cis*-1,2-シクロヘキサジカルボン酸無水物とフェニルアラニンを反応させ、カルボキシ末端をもつデンドリマーの疎水性と免疫細胞との相互作用の関係を評価した結果、このデンドリマーは疎水性分子をもたないカルボキシ末端デンドリマーよりも高いリンパ節移行性を示すとともに、デリバリーが難しいとされるリンパ節内の免疫細胞（T細胞）と強い相互作用を示すことを明らかとした。
- (3) リンパ節への癌転移の有無を非侵襲的に診断するためのデンドリマーイメージング剤として、免疫細胞に取り込まれにくいカルボキシ末端デンドリマーに、癌細胞を検出するための蛍光プローブを付与した化合物を合成し、癌細胞のイメージング能を評価した結果、癌細胞が分泌する酵素に応答して、癌細胞を選択的に可視化できることを明らかとした。

以上の成果は、リンパ節に存在する種々の細胞へのデリバリー・イメージングのためのデンドリマーの設計指針を与えると同時に、癌免疫治療技術の向上のための重要な知見であり、高分子材料化学ならびに薬物送達学分野における学術的・技術的な発展に大きく貢献する。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。

学位論文審査委員会は、本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士（工学）の学位を授与することを適当と認める。