

称号及び氏名 博士（工学） 宮崎 麻衣子

学位授与の日付 2019年3月31日

論文名 「Design of functional polysaccharide-based drug delivery systems for cancer therapy
(機能性多糖を基盤としたがん治療のための薬物送達システム的设计)」

論文審査委員 主査 原田 敦史

副査 小川 昭弥

副査 松本 章一

論文要旨

近年の分子生物学・細胞生物学の進歩によりさまざまな疾病の原因が解明され、細胞内の特定部位あるいは特定分子を標的とした医薬品の開発が進んでいる。また、細胞に治療用核酸を導入して治療物質を産生させる、または疾病の原因物質の産生を抑えることで治療を行う遺伝子治療や、患者が本来もつ免疫機構を利用する免疫療法、といった新しい概念に基づく治療法も提案されており、がん治療への応用が進んでいる。これらの治療法の実現には、薬物・核酸・タンパク質などの生理活性分子を、標的組織、標的細胞、さらには細胞内小器官レベルの高い精度で送達し、適切な量を適切な時間だけ作用させる、高機能性運搬体（キャリア）の開発が必要不可欠である。

これまで、生理活性分子を送達するためのキャリアシステムとして、高分子-薬物コンジュゲート、高分子微粒子、高分子ミセル、リポソームなどが開発されてきた。中でも、脂質二分子膜からなる閉鎖小胞体・リポソームは、内水相に水溶性薬物や生理活性分子を、脂質膜中に疎水性薬物を保持できるといった特徴をもつ。さらに生体由来物質であるリン脂質を基盤として作製されるため生体適合性に優れており、抗がん剤・抗真菌剤のキャリアとしてすでに実用化されている。リポソームは主に細胞の食作用であるエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、エンドソームに移行し、その後消化酵素を含有したリソソーム内で消化・分解される。したがって、生理活性分子を細胞内に導入する場合、この分解経路を回避する機能をリポソームに付与することが重要である。また、化学療法に用いられる抗がん剤が正常組織に分布することで引き起こされる副作用を低減するためには、特定の組織・細胞へ選択的に結合する機能をリポソームに付与し、標的特異的な薬物送達を実現することが重要である。

細胞内の分解経路を回避する機能として、pH 応答機能が挙げられる。リソソーム内は pH 5.0 程度の弱酸性の環境であり、弱酸性環境に反応してリソソーム膜を不安定化する、または膜融合性となる機能性リポソームが開発されている。具体的には、弱酸性で荷電状態や親-疎水性バランスを変化させる pH 応答性脂質や、コイル-グロビュール転移して形態を大きく変化させる高分子を複合化することで pH 応答性リポソームが作製されている。特に後者では、高い安定性を有するリポソームと機能性高分子を

組み合わせることで、生理的環境での安定性と強力な pH 応答性を併せもつ機能性リポソームの構築が期待できる。一方、リポソームに標的指向性を付与する方法として、標的細胞に高発現するレセプターへ特異的に結合する抗体やリガンド分子の利用が挙げられる。細胞表面は多糖を主成分とするペプチドグリカンで覆われており、糖と細胞表面のレセプターとの相互作用が細胞認識や接着などの生物プロセスに大きく関与している。さらに、生体由来分子である多糖は、生分解性・安全性の面でも大きな利点を有するため、多糖を表面被覆したリポソームが細胞特異的なデリバリーシステムとして研究されている。しかし、pH 応答機能と標的指向性の双方を有し、かつ、それらを高いレベルで機能発現させ、治療作用を誘導できるキャリアシステムはほとんど報告されていない。

そこで本論文では、pH 応答機能と標的指向性を併せもつ機能性多糖を基盤として、特定の細胞内部に生理活性分子を効果的に送達するためのキャリアシステム構築を目的とした。ここでは、細胞特異性をもつ多糖に、細胞内の弱酸性 pH に応答して脂質膜と強く相互作用する官能基を導入した機能性高分子を設計した。これらの多糖誘導体を生理活性分子封入リポソームに表面被覆し、標的となる細胞（がん細胞、免疫細胞）に効率よく取り込まれ、エンドソーム・リソソーム内の弱酸性環境に応答して抗がん剤や抗原タンパク質の細胞内放出を促進して、高い治療作用や免疫活性化作用を発現する多機能性リポソームの構築を行った。

本論文は以下の 6 章から構成される。

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

第 2 章では、ヒアルロン酸 (HA) に pH 応答機能を付与した HA 誘導体で修飾したリポソームの抗がん剤デリバリーキャリアとしての機能を検討した。3-メチルグルタリル化ヒアルロン酸 (MGlu-HA)、より疎水的なスパーサー構造を有する 2-カルボキシシクロヘキサン-1-カルボキシ化ヒアルロン酸 (CHex-HA) の 2 種類のカルボキシ基導入 HA を合成し、これらをリポソームに表面修飾した。これらのリポソームは、中性 pH では内包物を安定に保持したが、弱酸性環境下で速やかに内包物を放出した。これはリポソーム上の HA 誘導体のカルボキシ基がプロトン化されることで疎水化し、リポソーム膜を不安定化したことを示している。これらのリポソームとさまざまながん細胞との相互作用を調べたところ、CHex-HA リポソームはがん幹細胞マーカータンパク質である CD44 を高発現した細胞に効果的に取り込まれたが、CD44 低発現細胞にはほとんど取り込まれなかった。CD44 高発現細胞に対する CHex-HA リポソームの取り込み量は、事前に HA を加えることで大きく低下したことから、このリポソームが細胞表面上の CD44 を介して取り込まれることがわかった。さらに、CHex-HA 修飾リポソームは CD44 高発現がん細胞に抗がん剤を効果的に導入し、高い細胞殺傷効果を誘導できたことから、このリポソームが抗がん剤を細胞特異的に送達できるキャリアであることが示された。

第 3 章では、HA 誘導体修飾リポソームの抗原キャリア機能について検討した。CD44 はがん細胞だけでなく、抗原提示細胞をはじめとする免疫細胞にも発現している。また、低分子量 HA は CD44 またはトル様受容体を介して炎症反応を引き起こすことが知られている。したがって HA 誘導体は、抗原提示細胞への特異性を付与できるだけでなく、免疫応答を活性化するアジュバントとしてもはたらくと期待できる。モデル抗原タンパク質としてオボアルブミン (OVA) を内包した CHex-HA リポソームは、CD44 がほとんど発現していない線維芽細胞よりも、CD44 を高発現した抗原提示細胞に対して効率よく取り込まれ、サイトゾルに OVA を導入するとともに、Th1 サイトカイン産生を促進した。マウスへこれらのリポソームを皮下投与したところ、CHex-HA リポソームを投与した群では脾臓における細胞性免疫応答が確認され、それは抗原特異的であった。さらに、誘導された細胞性免疫によって担がんマウスの腫瘍縮退と生存率の大幅な改善を達成した。したがって、pH 応答 HA 誘導体修飾リポソームは、細胞特異性、サイトゾルへの抗原送達能、およびアジュバント特性を有する多機能性抗原キャリアとして有望

であることが明らかとなった。

第4章では、血漿増量剤としてヒトへの投与実績がある多糖デキストランを基盤とした機能性高分子の開発を行った。これまでの検討で、MGlu基を導入したデキストラン(MGlu-Dex)を修飾したリポソームによる細胞性免疫の誘導と腫瘍縮退効果が確認されているが、その効果は限定的であった。そこでデキストラン誘導体修飾リポソームの抗原送達能の向上を目指して、より疎水性の高いCHex-Dexを修飾したリポソームの免疫誘導機能を調べた。CHex-Dexは、MGlu-Dexよりも高いpH領域で疎水性ドメインを形成し、脂質膜を不安定化した。CHex-Dex修飾リポソームは、MGlu-Dex修飾リポソームよりも効率よく樹状細胞に取り込まれ、モデル抗原をサイトゾルに送達した。さらに、CHex-Dexで処理した細胞からは、MGlu-Dexよりも数百倍高いサイトカイン産生が確認された。したがってCHex-Dexは、サイトゾルへの抗原送達機能と、樹状細胞の強力な活性化特性を有する多機能性多糖として利用できる。

第5章では、pH応答性基を導入したコンドロイチン硫酸誘導体を修飾したリポソームの抗原デリバリー機能について検討した。前章で開発したCHex-Dex修飾リポソームによるがん治療効果を検証したところ、予想に反して、腫瘍縮退効果が確認できなかった。CHex-Dexはその高い疎水性によって皮下で非特異的な取り込みが起こり、生体内で効果的に免疫を誘導できなかったと考えられる。そこで、生理活性と荷電性官能基をもつ多糖を主鎖とするpH応答性高分子を用いて、抗原のサイトゾル送達機能とアジュバント作用を併せもつ多機能性多糖を設計した。コンドロイチン硫酸(CS)はアニオン性多糖であり、スルホ基を介して樹状細胞を活性化させるアジュバント作用をもつことが知られている。そこでCSにpH応答基としてCHex基を導入したCHex-CSを合成した。CHex-Dex修飾リポソームは樹状細胞だけでなく、線維芽細胞にも高い取り込みを示した。一方、CHex-CS修飾リポソームは線維芽細胞にはほとんど取り込まれなかったが、樹状細胞には効果的に取り込まれ内包物をサイトゾルに導入した。CHex-CS修飾リポソームは樹状細胞からのTh1サイトカイン産生を促進し、CHex-Dex修飾リポソームよりも高い腫瘍縮退効果を示した。したがって、荷電性基をもつコンドロイチン硫酸を主鎖として利用することで、CHex基に由来する疎水性を緩和するとともに、細胞特異性・細胞内抗原放出機能・アジュバント特性を併せもつ多機能性抗原キャリアの設計につながるということが明らかとなった。

第6章では、第2章から第5章で得られた知見を総括した。

審査結果の要旨

本論文は、がん治療に有用な薬物送達システムの開発を目的として、生体由来高分子である多糖を機能性高分子として利用し、多糖のもつ機能に加えてpH応答機能を付与した機能性多糖修飾リポソームの抗がん剤キャリアもしくは抗原キャリアとしての機能評価に関する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) がん幹細胞マーカータンパク質であるCD44を認識するヒアルロン酸(HA)にpH応答性を付与したHA誘導体を合成し、これらで表面修飾したリポソーム(HA誘導体修飾リポソーム)の抗がん剤キャリアとしての機能評価をした結果、HA誘導体修飾リポソームがCD44高発現がん細胞に対して高い細胞殺傷効果を誘導できることを明らかとした。

(2) HAが認識するCD44が免疫細胞にも発現していることに着目し、HA誘導体修飾リポソームの抗原キャリアとしての機能について検討した結果、細胞認識、サイトゾルへの抗原送達能に加えて、免疫応答を活性化させるアジュバント特性を示すことを見出した。さらに

脾臓における抗原特異的な免疫応答を確認し、HA 誘導体修飾リポソームの抗原キャリアとしての有用性を明らかとした。

(3) 血漿増量剤としてヒトへの投与実績があるデキストラン (Dex) に pH 応答性を付与した Dex 誘導体を合成し、Dex 誘導体修飾リポソームの細胞取込及びアジュバント特性の指標としてサイトカイン産生能を評価した結果、Dex 誘導体が非特異的な細胞との相互作用を伴った強力なアジュバント特性を示すことを明らかとした。

(4) Dex 誘導体の非特異的な細胞との相互作用を軽減するという観点からコンドロイチン硫酸 (CS) に pH 応答特性を付与した CS 誘導体を合成し、CS 誘導体修飾リポソームの抗原キャリア機能を評価した結果、動物実験において Dex 誘導体修飾リポソームよりも高い腫瘍縮退効果が誘導されることを明らかとした。

以上の諸成果は、機能性多糖を基盤とした薬物送達システムによるがん治療の実現につながる重要な知見を与えるものであり、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。