

称号及び氏名	博士（工学） 橋本 拓弥
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 31 日
論 文 名	「Design and Functional Evaluation of Drug Delivery System Based on Dendritic Molecules and Gold Nanorods (樹状分子と金ナノロッドを基盤とした薬物送達システムの設計と機能評価)」
論文審査委員	主査 原田 敦史 副査 松本 章一 副査 八木 繁幸

論文要旨

1960 年代、Zaffaroni によって薬物送達システム (DDS) の概念が初めて提唱されて以降、高分子ミセル、デンドリマー、リポソーム、薬物/高分子コンジュゲート、ナノゲルなどのナノキャリアを利用した DDS 開発が進められている。DDS の設計において刺激応答機能は、標的部位への薬物送達・薬物動態制御など DDS の根幹となる概念を実現するうえで重要な要素である。DDS に利用される刺激として、pH・酸化還元・酵素などの生体内環境に存在する刺激や、超音波・レーザー光・マイクロ波などの外部物理刺激が挙げられる。特に外部物理刺激により発生させる熱は簡便に扱うことができ、安全性が高いためがん治療において有用である。熱を利用したがん治療は温熱療法 (ハイパーサーミア) として古くから行われており、その起源は紀元前 1700 年にまで遡る。しかしながら、現行のハイパーサーミアには、医療従事者に高度な技術が要求されること、治療における病巣選択性が低いといった課題がある。そこで近年、外部物理刺激を利用してハイパーサーミアを行うだけでなく、加温部位特異的に薬物を作用させる DDS が次世代型医療として注目されている。

規則的で高度に分岐した構造をもつ樹状高分子は、生体応用において線状高分子にはないさまざまな特長を有している。代表的な樹状高分子であるデンドリマーは、球状構造を有し、分子構造やサイズを精密制御することが可能である。デンドリマーは分子鎖のコンホメーションが制限されているため分子内に空間を有し、この内部空間はさまざまな生理活性分子の保持に利用できる。また末端に存在する多数の官能基を利用して、薬物やリガンドを結合させることが可能である。さらに、機能性分子または無機あるいは金属ナノ粒子をデンドリマーの部分構造であるデンドロンとハイブリッド化することによって、多機能性を付与することが可能である。

金ナノ粒子は、表面修飾が可能であり、さらに局在表面プラズモン共鳴により、吸収した

光を熱に変換する光温熱効果（フォトサーマル効果）や、強い光散乱といった特異な光学特性を示す。中でも、棒状に形態制御された金ナノロッド（AuNR）は、生体深達度の高い近赤外光に対する光応答性を示すことから、光温熱治療やバイオイメージングのための生体材料として有望視されている。光照射は、光源の照射強度・時間・位置を変えることによって、時空間的に制御することが可能であることから、AuNR と温度応答性分子をハイブリッド化することで光・熱応答性生体材料を創製することができる。

このような性質から、樹状分子およびAuNRはDDSのプラットフォームとして有用であり、両者を組み合わせることによって、外部物理刺激との併用による薬理作用・遺伝子発現の制御や、複数のがん治療効果の相乗作用が期待でき、病巣部位に対して高選択的かつ高い治療効果を発現する高機能な DDS の創出が期待される。そこで本論文では、機能性樹状分子とAuNR からなるナノハイブリッド材料を設計し、DDS としての機能評価を行った。

本論文は以下の 5 章から構成される。

第 1 章では、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、ポリアミドアミン（PAMAM） dendrimer の末端にポリエチレングリコール（PEG）を導入することにより血中滞留性と生体適合性を付与し、薬物のカプセル化機能を高めるために dendrimer 内部にオレオイル鎖を導入した dendrimer を合成した。得られた dendrimer を AuNR 表面へ結合させることによりナノハイブリッドを作製し、その *in vitro* におけるがん細胞殺傷機能および *in vivo* における抗腫瘍効果について評価を行った。シードレス法により作製したアスペクト比約 4.0 の AuNR に対し、カルボキシアルカンチオールを反応させることにより AuNR 表層にカルボキシ基を導入した。続いて PEG-PAMAM dendrimer を縮合反応により AuNR に結合させ、残存する PAMAM dendrimer 末端アミノ基のオレオイル化を行った。熱重量測定により、AuNR 当たりの PEG-PAMAM dendrimer 結合数は約 12 個であることが明らかになった。得られたナノハイブリッドは優れたコロイド安定性、近赤外照射に対する光発熱特性を示し、光-熱変換効率 は 25% であった。 dendrimer 内部にオレオイル基を導入することにより抗がん剤である doxorubicin (DOX) の保持量が増加した。DOX を封入したナノハイブリッドを取り込ませた子宮頸がん由来 HeLa 細胞に近赤外光照射を行ったところ、DOX を封入しないナノハイブリッド、または近赤外光照射を行わない条件で処理した場合と比較して高い細胞殺傷効果を示した。これは DOX の抗がん効果と AuNR のフォトサーマル効果の相乗効果に起因するものと考えられる。また大腸がん由来 Colon 26 細胞を担がんしたマウスにナノハイブリッドを尾静脈投与し、近赤外光照射することで顕著な加温効果が見られ、強力な抗腫瘍効果が確認された。以上の結果は、本ナノハイブリッドが AuNR に由来する光発熱効果と薬物に由来する薬理作用の相乗効果により、強力にがん細胞を殺傷するナノ治療デバイスとして利用できることを示すものである。

第 3 章では、温度応答性基として生体適合性に優れるオリゴエチレングリコール（OEG）鎖を末端にもつ、温度応答性 PAMAM dendron 脂質（OEG-DL）の合成とその薬物送達機能について検討した。種々の世代数と OEG 鎖をもつ dendron 脂質を合成した。分子集合体が水溶性から水不溶性に変化する温度（曇点）は、 dendron の世代数が 1 の OEG-DL より 2 で、エトキシジエチレングリコール鎖を末端に有する OEG-DL よりメトキシジエチレングリコール鎖を末端に有する OEG-DL で、高温側にシフトすることが分かり、 dendron 脂質の分子構造によって、分子集合体の温度応答挙動を制御できることが分かった。さらに、この温度応答性 dendron 脂質の分子集合体に PEG を極性基にもつ脂質を組み込んだところ、分子集合体の分散安定性が向上した。また、PEG 脂質の複合化率を調整することで、40°C 付近で曇点を示す分子集合体を得られた。この集合体は、10°C ではベシクル状、50°C ではファイバー状の構造をとり、温度にตอบสนองして形態変化することが分かった。またこの分子集合体を細胞培養液に加え加温すると、細胞表面への分子集合体の吸着が促進された。DOX を内包した PEG 脂質複合化 dendron 脂質集合体を作製し、細胞に加えたところ、加温によって薬物の細胞内移行が促進され、殺細胞効果が向上した。これらの結果は、温度応答性 dendron

ン脂質集合体が、加温部位特異的に抗がん活性を誘導する、高選択的薬物キャリアとして機能することを示すものである。

第4章では、第3章で温度応答性を明らかにしたエトキシジエチレングリコール (EDEG) 鎖導入デンドロン脂質を AuNR に組み込むことで、光と熱への応答性を有するハイブリッドベクターを設計し、光照射特異的に遺伝子発現を誘導する高機能性ベクターへの展開について検討した。デンドロン脂質で AuNR 表面をコートしたハイブリッドベクターは、静電相互作用によって DNA と複合体を形成することを確認した。DNA-ハイブリッドベクター複合体は、局在表面プラズモン共鳴に由来する 800 nm 付近の強い吸収を維持していることを確認した。さらに細胞培養液中におけるハイブリッドベクターおよび DNA 複合体の近赤外光照射による発熱挙動は、作製に用いた AuNR よりも高かった。これは中性条件で凝集する AuNR の表面にデンドロン脂質が被覆されることにより分散安定性が向上したためと考えられる。また、デンドロン脂質分散液およびハイブリッドベクター分散液は 50°C 付近で透過率が大きく減少したことから、加温下における複合体表面の EDEG 鎖の脱水和に伴う疎水性相互作用により凝集することがわかった。一方、DNA-ハイブリッドベクター複合体分散液の場合、40°C 付近において透過率が減少したことから、DNA とデンドロン脂質の静電相互作用によって形成された疎水場の影響により応答温度が低温シフトすることが示唆された。また、DNA-ハイブリッドベクター複合体の細胞内動態について調べたところ、近赤外光を照射しない条件では主にエンドソームに分布した DNA が、近赤外光を照射することにより、一部がサイトゾルに放出されることが確認された。近赤外光照射下の発熱によって複合体表面が疎水化し、細胞との相互作用が高まるとともに、エンドソーム脱出が促進されたものと考えられる。この結果を反映して、ハイブリッドベクター複合体で処理した細胞の遺伝子発現は、近赤外光照射によって向上した。以上の結果は、本複合体による近赤外光を利用した遺伝子発現の時空間制御の可能性を示すものであり、光制御型遺伝子導入技術の開拓につながるものと期待される。

第5章では、第2章から第4章で得られた知見を総括した。

審査結果の要旨

本論文は、生体外からの物理刺激を利用したがん治療に有用な薬物送達システム（DDS）の開発を目的として、生体深達度の高い近赤外光を熱に変換する光温熱効果を示す金ナノロッドと規則的な分岐構造をもつ樹状分子からなるナノハイブリッド材料を設計し、DDS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) 樹状高分子であるポリアミドアミン（PAMAM） dendroliマーの末端に優れた生体適合性をもつポリエチレングリコール（PEG）を導入した PEG 修飾 PAMAM dendroliマーに、薬物カプセル化機能を高めるためのオレオイル鎖を導入した後、金ナノロッド表面へ結合させることによって作製したナノハイブリッド材料の抗がん剤キャリアとしての機能評価をした結果、担がんしたマウスを用いた実験において近赤外光照射による加熱効果および強力な抗腫瘍効果を誘導できることを明らかとした。
- (2) 2本のアルキル鎖をフォーカルポイントにもつ PAMAM dendroliマーの末端にオリゴエチレングリコール（OEG）鎖を導入した dendroliマー脂質が形成する集合体の温度応答特性を評価し、DDS 利用に適した温度応答性を示す OEG 導入 dendroliマー脂質と PEG 脂質からなる分子集合体の抗がん剤キャリアとしての機能評価をした結果、加温による分子集合体の形態変化を通じた抗がん剤の細胞取込促進および抗がん活性の増強を誘導できることを明らかとした。
- (3) DDS 利用に適した温度応答性を示す OEG 導入 dendroliマー脂質と金ナノロッドからなる遺伝子デリバリー用ナノハイブリッド材料を作製し、培養細胞に対する遺伝子発現効率への近赤外光照射の効果を評価した結果、近赤外光照射による金ナノロッドの発熱にตอบสนองした OEG 導入 dendroliマー脂質の疎水化を通して遺伝子発現の向上を誘導できることを明らかとした。

以上の諸成果は、樹状分子と金ナノロッドを基盤とした近赤外光を利用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。

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。