

称号及び氏名 博士（工学） 寺西 諒真

学位授与の日付 平成 29 年 3 月 31 日

論文名 「ドラッグデリバリーシステムのための  
刺激応答性ポリマーの開発と癌治療への応用」

論文審査委員 主査 松本 章一

副査 八木 繁幸

副査 久本 秀明

副査 原田 敦史

## 論文要旨

癌は先進国において第一位、発展途上国においては第二位の死因を示す深刻な病である。癌に対する治療法は現在のところ、制癌剤による化学療法や外科的手術などが主である。しかしながら、これら治療法の癌に対する選択性の低さから、結果的に、患者は全身毒性や長期にわたる副作用に悩まされている。このような問題を解決するため、制癌剤の人体に好ましくない作用を最小化し、癌組織においてのみ高い治療効果を得るドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究が盛んに行われてきた。DDSとは「必要なとき」、「必要な場所で」、「必要な量だけ」薬剤を放出させることを目的とした概念であり、癌治療DDSの場合、従来の制癌剤をリポソームや高分子ナノ粒子等のキャリアに内包し、腫瘍組織へと集積させるものである。上記のナノキャリアを腫瘍組織へとターゲティングし、集積させる方法はいくつか報告されており、アクティブターゲティングとしてはキャリア表面に癌細胞に発現するレセプターを認識するリガンドを修飾する手法、パッシブターゲティングとしては炎症部位や腫瘍における血管透過性の向上を利用し、粒径10-200 nm程度のナノキャリアを血中から腫瘍組織へと漏出させるEPR効果(Enhanced Permeability and Retention Effect)が知られている。特に後者は様々な研究で幅広く活用されている。さらに固形腫瘍においてはリンパ系の働きが欠落しており、一度集積したナノキャリアは長期間腫瘍に滞留するため、上記のターゲティング手法は癌に対するアプローチとして確立されてきた。

しかしながら、薬剤を保持したキャリアが癌組織へと集積するだけでは不十分であり、高い治

療効果を得るためには、内包した薬剤を、細胞内の作用部位まで精密にデリバリーする必要がある。特に分子量が 1 kDa を超える物質は細胞膜を透過することできないため、DDS におけるナノキャリアのような高分子材料は、必然的にエンドサイトーシスという細胞の食作用により取り込まれる。エンドソームは成熟に伴いプロトンポンプや膜融合の作用で酸性化し、リソソームにおいて内包した薬剤は分解を受けることとなる。したがって、DDS による治療効果を最大化するためには、ナノキャリアが効率的にエンドソームを脱出し、内包物を放出することが必要不可欠となる。

エンドソーム脱出に関しては、エンドソーム内の弱酸性 pH に応答する材料が数多く報告されており、弱酸性環境下で疎水的なコンフォメーションへと変換し、エンドソーム膜と相互作用する材料や、プロトンスポンジ効果を持つ材料が研究されている。プロトンスポンジ効果とは、エンドソーム内 pH 付近に pKa を持つ官能基が、流入したプロトンを消費することで、エンドソーム内 pH を緩衝する作用であり、この結果、エンドソーム内への過剰なプロトンおよび塩化物イオンの流入を促進し、浸透圧を上昇させる。最終的に、エンドソーム内へと水が流入し、膨潤もしくは崩壊を誘導する。

酸性 pH に応答して薬剤リリースを促進する材料としては、pH 応答性ポリマー修飾リポソームや、弱酸性下で崩壊する結合を導入した高分子ミセルなどが研究されており、エンドソーム内 pH に応答して崩壊や形態変化を引き起こすことで、薬剤放出が促進される。一方で、より精密な薬剤放出のために、細胞質内の還元環境に応答するキャリアが設計されており、この場合、グルタチオンとの交換により崩壊するジスルフィド結合がよく用いられる。還元環境で崩壊するナノキャリアの設計としては、粒子を形成する高分子骨格中にジスルフィド結合を組み込むことや、高分子鎖間をジスルフィド結合で架橋安定化する手法があるが、いずれのナノキャリアも細胞質内の還元環境下においてジスルフィド結合が崩壊することで、内包物を効率的に放出することが期待される。本論文では、上述した細胞内の環境に応答して DDS の効果を最大化する、刺激応答性材料およびナノキャリアを開発し、癌治療への応用を目指した。

第 1 章では、本論文の緒言として、研究の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、弱酸性環境で生体膜と相互作用するポリカルボン酸の pH 応答性材料について、応答特性を制御する研究を行った。ポリカルボン酸のような側鎖に多数のカルボキシ基を持つポリマーは、弱酸性下で、親水的コイルから疎水的な丸まったコンフォメーションへと転移し、エンドソームなどの生体膜に相互作用する。相互作用する pH は、ポリマー骨格の疎水性や側鎖スペーサー構造の疎水性と相関し、DDS 材料として用いる場合、pH7.4 では生体膜と相互作用せず、弱酸性環境でのみ相互作用を引き起こす必要がある。そこで、ポリアリルアミン側鎖に、二種類

の疎水性が異なる側鎖構造を、種々比率で導入したポリカルボン酸を合成し、側鎖構造が生体膜と相互作用する pH に与える影響について検討した。この結果、高疎水性側鎖と比較的親水的な側鎖の導入比を変化させることで、ポリカルボン酸が、生体膜のモデルであるリポソームと相互作用する pH を制御することができた。このような材料設計は DDS において最適な pH 応答性材料を作製する上で有用である。

第 3 章では、pH に応答して動的分子形を変化する両親媒性分子として、構造中に 1 級および 3 級アミンを有する世代 1.0 ポリアミドアミンデンドロンを極性基に、二本のオクタデシル鎖を疎水性基に持つデンドロン脂質を合成し、集合体を作製した。pH10 から pH4 においてデンドロン脂質集合体の形態を観察したところ、中性以上の pH ではベシクル形態をとるが、弱酸性 pH ではミセルへと転移していることが確認された。弱酸性環境においてデンドロン脂質中のアミンがプロトン化することにより、デンドロン脂質の動的分子形が変化し、結果として集合体の形態変化を誘導したことが示唆された。また、デンドロン脂質集合体は、内包した FITC-OVA を中性環境では安定に保持するが、弱酸性環境ではほぼ 100% 放出することが分かった。さらに、FITC-OVA を内包したリポソームを免疫細胞に接触させることで、FITC-OVA を細胞質中へと送達することができた。以上の結果はデンドロン脂質集合体が、様々な物質を細胞質へと送達するための pH 応答性キャリアシステムとして有用であることを示すものである。

第 4 章では、エンドソーム内 pH においてプロトンスポンジ効果を示すことで知られる、世代 3.5 ポリアミドアミンデンドロンをヘッド部に、ポリリシンをテイル部に有する PAMAM dendron-PLL を合成し、DDS への展開を目指した。PAMAM dendron-PLL は水/メタノール=2/8 の混合溶媒系において、極めて単分散な粒径分布を持つポリマーベシクルを形成し、リシン部のアミノ基間にジスルフィド結合を導入することで、pH および還元環境に応答するナノカプセルを形成した。ナノカプセルの膜はプロトン化したアミノ基によりカチオン性を示すことから、ローダミン 6G のようなカチオン性色素を静電的バリアで安定に保持し、細胞内へと送達できる。本研究ではナノカプセルを癌治療に応用するため、カチオン性制癌剤であるドキソルビシン(DOX)の内包および細胞内デリバリーについて検討した。DOX 内包ナノカプセルを HeLa 細胞に接触させた結果、ナノカプセルにより、DOX を細胞核へと送達できることが確認され、ナノカプセルがプロトンスポンジ効果によりエンドソームを脱出し、細胞質内の還元環境下で DOX を放出していることが示唆された。また、DOX 内包ナノカプセルは、HeLa 細胞に対し、効果的な制癌活性を示した。以上の結果は、pH および還元環境に応答するナノカプセルが、癌治療のための DDS キャリアとして有用であることを示すものである。

第 5 章では、制癌剤である DOX が超音波照射により活性酸素種(ROS)を生成することに着目し、

超音波力学療法(SDT)への応用を検討した。SDTとは音増感剤と呼ばれる超音波照射によりROSを生成する化合物を細胞内へと送達し、超音波を照射することで音増感剤からROSを生成させ、細胞に酸化ダメージを与える治療法である。これにより、音増感剤の制癌活性増強や、制癌活性を持たない音増感剤に対して超音波照射に依存した制癌活性を誘導することができる。特にDOXは細胞核に集積する性質を持つため、生成したROSは核DNAに対し酸化ダメージを与えることが期待される。また、ROSが効果的に作用する細胞内小器官としてミトコンドリアが知られているため、DOXに対し、ミトコンドリア指向性を持つ疎水性カチオンであるトリフェニルホスホニウム基(TPP基)を導入したTPP-DOXを合成し、音増感剤として用いた。DOX、TPP-DOXはいずれも超音波照射により一重項酸素を生成し、細胞核およびミトコンドリアへと集積することを明らかにした。続いて、DOXおよびTPP-DOX内包ナノカプセルについて、HeLa細胞に対する制癌活性を評価した結果、DOX内包ナノカプセルは濃度依存的に穏やかな細胞生存率の低下を示し、超音波照射を行うことで制癌活性は増強された。この結果は、DOXがナノカプセルにより細胞核へと送達され、超音波照射により核DNAへと酸化ダメージを与えたことを示している。また、TPP-DOX内包ナノカプセルは超音波照射しない場合では制癌活性を示さなかったが、超音波照射することで細胞生存率は顕著に低下した。TPP-DOXが制癌活性を示さなかったことについては、TPP基の導入により細胞核への集積能が失われたためであると考えられる。さらに、超音波照射により顕著な制癌活性を示したことについては、TPP-DOXがミトコンドリアに送達され、ミトコンドリアへの酸化ストレスを介したアポトーシスを誘導したことを示唆している。以上の結果は、特定の細胞内小器官に対し指向性をもつ音増感剤とナノカプセルの組み合わせが効果的なSDTに有効であることを示している。

第6章では研究で得られた結果をもとに、本論文の総括を行った。

## 審査結果の要旨

本論文には、細胞内のpHや還元環境に応答し、性質を変化させる、刺激応答性ポリマーの開発と、それらの特性を利用したドラッグデリバリーシステムについて研究した結果が述べられている。その結果は以下の項目に要約できる。

- (1) ポリカルボン酸の側鎖に、疎水性の異なる2種類の構造を導入し、その比率により、ポリカルボン酸と生体膜が相互作用するpHを制御した結果が述べられている。疎水性の異なる2種類の側鎖導入比により、生体膜のモデルであるリポソームと相互作用するpHを制御できることを明らかにしており、このようなpH応答特性の制御は、生体内での利用に適切なpH応答性材料の開発において有用であると言える。
- (2) pHに応答して形態変化するデンドロン脂質集合体の作製と、細胞内デリバリーキャリア

としての特性評価を行った結果が述べられている。デンドロン脂質集合体には蛍光ラベル化したタンパクを内包することができ、これを細胞に接触することで、細胞質内へとタンパクをデリバリーできることを明らかにしている。

- (3) pH に応答してエンドソーム脱出し、細胞質内で内包物を放出するカチオン性ナノカプセルを用いた、制癌剤ドキソルビシン(DOX)の細胞内デリバリーについて検討した結果が述べられている。DOX はナノカプセル膜と同様にカチオン性であるため、静電的バリアによりナノカプセル内へ安定に保持され、癌細胞内の標的部位である核へデリバリーされることを明らかにしている。さらに、DOX 内包ナノカプセルを用いて効果的な殺細胞効果の誘導を達成している。
- (4) DOX 内包ナノカプセルを超音波力学療法へと利用した結果が述べられている。また、ミトコンドリアへと集積する TPP-DOX の利用についても検討されており、DOX および TPP-DOX はナノカプセルにより核、ミトコンドリアへと送達され、超音波照射により制癌活性が増強されることを明らかにしている。

以上の研究成果は、より効果的な癌治療へと繋がるものであり、ドラッグデリバリーシステムの発展に大いに貢献するものであると言える。また、申請者が自立して研究活動を行うのに十分な能力と学識を有することを証したものである。