

論文の要旨

題目 Development of polysaccharide-based bioresponsive nanomaterials for cancer therapy
(がん治療を指向した生体環境応答性多糖ナノ材料の創製)

氏名 山名 啓太

医療技術や科学技術の進展に伴って、がんの種類によっては治療可能な時代となってきた。それに伴って、患者への副作用が少なく、侵襲性に優れた治療法の開発が強く求められている。このような背景の下、Chemical Surgery が注目を集めている。Chemical Surgery は光・中性子などの物理エネルギーを与えることで殺細胞効果をもたらす薬剤をがん細胞へ集積させ、そこへ光・中性子の照射を行うことで局所的な治療効果が得られる、極めて低侵襲ながん治療法である。これら治療法の成否には、腫瘍組織およびがん細胞への選択的な薬剤の送達が必要となり、それを達成し得る優れた薬剤送達キャリアの開発が求められている。近年、腫瘍組織に対して受動的標的指向性(EPR 効果)を示すことから、ナノ材料が薬剤送達キャリアとして注目されており、ナノ材料を利用した薬剤の開発が盛んにおこなわれている。本論文では、多糖を基盤とするナノ材料をトップダウン的な高速振動粉碎法とボトムアップ的な自己組織化法により開発し、Chemical Surgery である光線力学療法(PDT)とホウ素中性子捕捉療法(BNCT)への応用を試みた。さらに、ナノ材料の EPR 効果に加え、生体環境応答性を導入することで、より高度な腫瘍選択的な送達技術の開発を目指した。本論文における生体環境応答性とは細胞膜上に過剰発現している受容体や内因性の種々の刺激とナノ材料との相互作用であり、これらの応答性は腫瘍組織への効率的な薬剤送達、治療効果の向上を実現させるために必要な性質である。

第 1 章では、研究の背景として、ナノ材料を用いたがん治療薬の開発における現状と本論文で使用する具体的な材料設計手法について概説する。第 2 章から第 4 章では高速振動粉碎法を利用したナノ材料の開発について、第 5 章では自己組織化法を利用したナノ材料の開発について述べる。

第 2 章では、熱応答性多糖類であるヒドロキシプロピルセルロース(HPC)に着目し、HPC と光増感剤であるポルフィリンを高速振動粉碎法により複合化した熱刺激応答性ナノ材料を開発し、PDT への応用を試みた。

PDT は可視光照射により励起された光増感剤が生成する細胞障害性の活性酸素種を用いた治療法である。PDT の治療過程において、ミトコンドリアの光損傷が効果的であることがわかっている。ここでは、ミトコンドリア膜近傍が約 50°C と他の細胞小器官と比較して高温を示すことに着目した。具体的には、50 °C 付近に下限臨界溶液温度を持つ HPC を使用することで、光増感剤の簡便な水溶化とミトコンドリア近傍での光増感剤のトリガー放出が可能なナノ材料を開発した。調製したポルフィリン・HPC 複合体の分散液の基礎物性について動的な光散乱測定により評価したところ 200 nm 程度の複合体を形成していることが分かった。複合体の熱応答性を確認するため、周囲の温度を変化させた際のポルフィリンの放出を評価した。その結果、温度が上昇するにつれて放出量が増加し、ミトコンドリア近傍温度において最大となり、光増感剤の熱応答的な放出挙動が確認できた。ミトコンドリアへのポルフィリン送達能を評価するため、HPC 複合体と熱応答性を持たないプルラン複合体の細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。プルラン複合体では、大部分がリソソームに集積しているのに対して、HPC 複合体ではミトコンドリアへのポルフィリンの集積が確認できた。最後に複合体の光毒性を評価すると、プルラン複合体と比較して HPC 複合体は 1.5 倍高い光毒性を示した。以上の結

果から、HPC とポルフィリンの複合体はミトコンドリア近傍の温度に応答し、内容物を放出可能であり、ミトコンドリアへのポルフィリンの送達とその後の光損傷により効果的に治療が可能な薬剤であることを明らかとした。

第 3 章では、がん細胞表面に過剰発現した受容体の認識能により腫瘍標的化部位として働くヒアルロン酸に注目し、ヒアルロン酸と高速振動粉碎法を用いて腫瘍選択的送達が可能ナノ材料を調製した。ここでは BNCT 用のホウ素薬剤であるカルボランをヒアルロン酸により水溶化することで、腫瘍選択的ホウ素薬剤を開発した。

BNCT とはホウ素原子 (^{10}B) と熱中性子線の間で生じる核反応を利用したがん放射線療法のひとつである。現在、臨床において、ホウ素薬剤の集積はアミノ酸誘導体である L-boronophenylalanine (BPA) を放射性ラベル化した ^{18}F -BPA の PET イメージングによって行われている。すなわち、PET トレーサー分子を合成する特別な施設が必要であることに併せて、 ^{18}F の半減期がおよそ 110 分と短いことから、 ^{18}F -BPA の合成から投与、イメージングまでを 110 分以内に終えなければならないため、汎用性に乏しい。

そこで本研究では、より汎用性に優れたホウ素薬剤のトレーサーの作製を目指し、蛍光性カルボランに着目した。カルボランは分子内にホウ素原子を豊富に含むホウ素クラスターであり、BNCT への応用が期待されてきた。このカルボランへ蛍光性官能基を修飾した蛍光性カルボランは、優れた発光特性を有することから、蛍光によるホウ素薬剤のイメージングへ応用することができると考えられる。これらの背景の下、蛍光性カルボランをがん細胞への効率的な送達が可能多糖ヒアルロン酸により水溶化し、そのホウ素中性子捕捉療法への応用について検討を行った。

ヒアルロン酸と蛍光性カルボランを高速振動粉碎法により、水溶化した。調製した複合体は強い発光を示した。また、ヒアルロン酸のがん細胞認識能を介したがん細胞への取込みを実現した。さらに細胞内に取り込まれた複合体からはカルボラン由来の蛍光が確認され、ホウ素の細胞内イメージングが可能であることを示した。最後に本システムの中性子照射による殺細胞効果を評価した。その殺細胞効果は臨床試験薬として用いられている Fructose-BPA に匹敵するものであった。

以上の結果より、蛍光性カルボランヒアルロン酸複合体はホウ素薬剤の細胞内イメージングを可能にするホウ素中性子捕捉療法用ホウ素薬剤としての応用が期待される。

第 4 章では、ホウ素含有量が極めて高い窒化ホウ素ナノチューブ (BNNT) に着目し、BNNT と腫瘍標的化抗体である HER-2 抗体を組み合わせた腫瘍指向性ホウ素薬剤を開発し、BNCT における治療効果について検討した。具体的には、疎水性の BNNT と多糖である β -glucan を高速振動粉碎により混合することで水溶化を行った。このとき、 β -glucan へ抗体と強く相互作用することが知られているプロテイン A インスパイアードリガンド (抗体結合部位、PAM) を修飾することで、抗体結合能を持たせ、HER-2 抗体修飾 BNNT (BNNT/ β -glucan-IgG) を作製した。

BNNT と β -glucan-PAM を高速振動粉碎により複合化し、この複合体分散液中へ HER-2 抗体を添加することで BNNT/ β -glucan-IgG を調製した。DLS 測定により、調製した複合体が 100 nm 程度のサイズを有していることが明らかとなり、EPR 効果による腫瘍への集積が期待された。続いて、HER-2 を過剰発現している SK-OV3 細胞に対する中性子照射下における殺細胞効果を検討したところ、臨床研究によりその有効性が示されている Fructose-BPA と比較して 29 倍高い治療性能を示した。最後に担がんマウスにおける複合体の体内動態を評価したところ、複合体は正常組織と比較して 100 倍以上腫瘍へ蓄積していることが明らかとなった。以上の結果より、BNNT/ β -glucan-IgG は腫瘍選択性に優れたホウ素薬剤であることが分かった。

第 5 章では、疎水性多糖類とその自己組織化ナノゲルに注目し、腫瘍選択性と刺激応答性放出を兼ね備えたナノ材料を開発した。本章では、疎水性ホウ素剤 BPA を多糖類に担持させたホウ素化ナノゲルを調製し

た。このナノゲルは、BPA の腫瘍選択性と EPR 効果により効率的なホウ素送達が可能である。さらに、ナノゲルのもつ薬剤複合化能を利用し、免疫チェックポイント阻害剤をナノゲルに封入することで、BNCT と免疫療法の併用による効果的ながん治療および治療困難とされている転移がんに対する治療法の確立を目指した。

ホウ素化ナノゲルの基礎物性について、まず系統的な解析を行った。ナノゲルの粒径、形態について動的な光散乱測定、透過型電子顕微鏡観察により行なったところ、EPR 効果に適した 150 nm 前後の粒子径を有していることを明らかとした。また多角度散乱測定からナノゲルを構成する分子の数を決定し、ホウ素が高度に集積した構造を有していることを明らかとした。それだけでなく、このナノゲルはがん細胞と強く相互作用し、積極的に取り込まれることが細胞内のホウ素集積量の定量結果から明らかとなった。ここへ中性子線を照射することで臨床薬である L-BPA/fructose 錯体を凌駕する治療性能を有していることも実証した。

BNCT において優れた治療効果をもつナノゲルと免疫チェックポイント阻害薬である PD-1 抗体を複合化したハイブリッドナノゲルを作製し、転移がんに対する治療効果を検討した。PD-1 抗体は超分子的な相互作用により、ナノゲル内部へ封入した。担がんマウスにおけるハイブリッドナノゲルの腫瘍集積性について検討すると、抗体のみを投与した場合と比較して、腫瘍への抗体の送達量が飛躍的に上昇した。最後に転移がんモデルマウスを利用した中性子照射によるハイブリッドナノゲルの治療効果を検討した。その結果、抗体を共送達することにより、ナノゲル担体と比較して原発巣における治療効果の向上が見られ、さらに転移がんにおいては、多くのマウスにおいてがんの縮退が見られた。

以上の結果より、BPA 修飾多糖ナノゲルは優れた BNCT 用薬剤であり、さらに PD-1 抗体を複合化することで、BNCT と免疫チェックポイント阻害療法の組み合わせにより従来治療が困難とされている転移がんの治療に対して有効な結果を示した。

本論文では、多糖類のユニークな特性を利用し、がん治療のための汎用性の高い多糖を基盤とするナノ材料を開発した。高速振動粉碎法を使ったナノ材料については、これまでになかった刺激応答性や腫瘍選択性といった生体環境応答性を付与することができ、今後の材料設計における知見が得られた。第 4 章では、自己組織化ナノゲルの特性を巧みに利用し、免疫チェックポイント阻害薬とホウ素薬剤の共送達を達成した。これにより、転移がんに対する画期的で効果的なアプローチを開拓した。