

氏 名	石井 志郎			
学 位 の 種 類	博 士（工学）			
学 位 記 番 号	博 甲 第 7669 号			
学位授与年月日	平成 28 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科			
学 位 論 文 題 目	Development of Protein Loaded Redox-Active Injectable Gel by Polyion Complex for Pharmaceutical Applications (薬学的応用のためのポリイオンコンプレックスによるタンパク質内包レドックスアクティブインジェクタブルゲルの開発)			
主 査	筑波大学教授	長崎幸夫	工学博士	
副 査	筑波大学教授	陳 国平	博士(工学)	
副 査	筑波大学准教授	辻村 清也	博士(農学)	
副 査	筑波技術大学教授	平山 暁	博士(医学)	

## 論 文 の 要 旨

近年、生理活性タンパク質を用いたがんの免疫療法が注目を集めている。免疫療法は患者自身の免疫を活性化することで治療効果を発揮するものであるため、患者への負担が少なくかつ治療効果が大きいと考えられていたからである。しかしながら、このようなタンパク質は免疫に由来する深刻な全身毒性を示すことが報告されており、実用化には大きな障壁がある。例えば、インターロイキン-12 (IL-12)は非常に強い抗腫瘍効果を示す一方で、通常行われるような静脈や皮下への注射による投与では、死亡を含む非常に深刻な有害事象が報告されており、これが障壁となり IL-12 は実用化に至っていない。

薬物の疾患部位への局所デリバリーは、腫瘍部位における生理活性タンパク質の有効治療濃度を維持するために魅力的なアプローチであり、最大許容量を超えての投与を回避可能である。タンパク質の局所デリバリーのために、薬物/ポリマー複合体のような試みが数多く行われているものの、投与部位での滞留性や機械的強度が低いことが原因で、そのデリバリー技術はあまり確立されていない。刺激応答性のインジェクタブルゲルは、局所デリバリーのために有望な技術の一つである。インジェクタブルゲルは、投与前は溶液状態だが、生体内に投与されると温度や pH などの変化に応答し、即座にゲル化する。インジェクタブルゲルシステムのマトリックスとして、疎水性-親水性-疎水性(A-B-A タイプ)トリブロックコポリマーは薬物の放出制御のために広く研究が行われてきた。しかしながら、トリブロックコポリマーの疎水性部位と電荷を有するタンパク質の相互作用が弱いために、ゲル中への効率的なタンパク質の内包、タンパク質の放出制御が非常に困難であった。

本研究では、これらの問題を解決するために、理想的なタンパク質局所治療のためのポリイオンコンプレックス(PIC)によって形成されるタンパク質内包レドックスアクティブインジェクタブルゲル(protein@RIG)を開発した。protein@RIG は、両末端にアミノ基及び活性酸素種(ROS)除去分子ニトロキシドラジカルを有するカチオン性のポリアミン-ポリエチレングリコール-ポリアミントリブロックコポリマー(PMNT-PEG-PMNT)、アニオン性のポリアクリル酸(PAAc)、タンパク質から成る。室温に

において、PMNT-PEG-PMNT のカチオン性ポリアミン鎖、アニオン性の PAAc 及び電荷を有するタンパク質が PIC を形成し、ループ状の PEG をシェルとしたフラワーミセルとなる。このタンパク質内包 PIC ミセルは溶液として病変部位に投与でき、生理条件下で温度とイオン強度に応答してゲル化する。PIC フラワーミセル形成の駆動力は静電的相互作用であるため、PIC ミセルが電荷を有するタンパク質を効率的に内包できること、生体内において形成される PIC ゲルとの相互作用によりタンパク質のすばやい拡散が抑制され、長期放出制御が可能になることが期待された。また、PMNT-PEG-PMNT の側鎖に ROS 消去能を有するニトロキシドラジカルが組み込まれているため、ROS が誘導する有害事象をこのシステムにより抑制できることが期待された。

まず、RIG の材料特性を詳細に評価した。カチオン性の PMNT-PEG-PMNT とアニオン性の PAAc が PIC フラワーミセルを形成することを動的光散乱法による粒子サイズ測定、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)測定により明らかにした。この PIC フラワーミセルが温度とイオン強度に応答して不可逆的にゲルに相転移することをレオメーターを使用した粘弾性評価により確認した。また、この PIC フラワーミセルは温度とイオン強度の増加に伴い、粘度が上昇し、ゲル化しており、その機械的強度(貯蔵弾性率:  $G'$ )が従来の疎水性-親水性-疎水性型トリブロックコポリマーのゲルと比較して極めて高いことを明らかにした。

次に protein@RIG を様々な分子量、等電点を有するタンパク質を用いて調製し、その材料特性を評価した。protein@RIG は RIG にタンパク質を内包させていない時と同様、温度を上昇させることでゲルへ相転移し、生理条件温度(37℃)で高い粘度を示した。RIG は分子量や等電点によらずタンパク質を内包することができ、著しい初期バーストなくタンパク質を徐放できることが *in vitro* の評価により明らかになった。また、protein@RIG をマウスに皮下投与した場合、タンパク質を単独投与した場合と比較して、投与部位でのタンパク質の滞留性が著しく向上することが確認された。

最後に IL-12 を RIG に内包し(IL-12@RIG)、がん免疫療法への応用を目指した。担がんマウスの腫瘍近傍に皮下投与した時、IL-12@RIG は IL-12 単独投与と比較して著しい腫瘍成長抑制効果を有することが明らかとなった。また、IL-12@RIG は IL-12 が引き金となって発生する ROS によって引き起こされると考えられる白血球の減少や肝臓の TNF- $\alpha$ レベルの上昇を有意に抑制できることが確認された。

以上より、開発した protein@RIG は薬物による有害事象を軽減しつつ高い治療効果を提供可能な、タンパク質の持続的な放出のためのプラットフォームテクノロジーとして非常に期待できる。

## 審 査 の 要 旨

### 〔批評〕

本論文はタンパク質をポリイオンコンプレックスにより形成されるレドックスアクティブインジェクタブルゲルに安定に内包させ、局所タンパク質デリバリーキャリアを構築し、がん治療へ展開している。開発した材料のゲル化メカニズム、温度・イオン強度応答特性の評価から従来型のインジェクタブルゲルとの違い、優位性を明らかにした。そして、開発した材料によりタンパク質の徐放、局所滞留性の向上に成功し、生理活性タンパク質の治療効果の向上及び副作用の低減に成功した。本論文の新しい材料の設計、特性評価及び治療への応用における成果が評価された。

### 〔最終試験結果〕

平成 28 年 2 月 12 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

### 〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(工学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。