

氏名	工藤心平			
学位の種類	博士(工学)			
学位記番号	博甲第7519号			
学位授与年月日	平成27年7月24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	Preparation of Core-shell-type Polyion Complex Micelles Containing Poly(L-Arginine) Segments in Block Copolymers for Novel Cancer Immunotherapy (新規がん免疫療法に向けたポリ(L-アルギニン)セグメントを含むブロック共重合体から成るコアシェル型ポリイオンコンプレックスミセルの調製)			
主査	筑波大学教授	長崎幸夫	工学博士	
副査	日本大学教授	青柳隆夫	博士(工学)	
副査	筑波大学教授	陳国平	博士(工学)	
副査	筑波大学准教授	白木賢太郎	博士(理学)	

論文の要旨

本論文では次世代のガン治療として注目を集める免疫療法に向けた新規材料の設計から評価までをストーリーがわかるように記述している。免疫療法とは、従来の化学療法で用いられるような抗がん剤で直接がん細胞を死滅させるのではなく、腫瘍組織中に存在する免疫細胞を活性化させることでガン治療する方法で、副作用の低下などの利点が挙げられる。本論文ではこの免疫療法の歴史から最新の免疫療法までを紹介しており、免疫療法について十分な記述がなされている。また、本論文でターゲットにした腫瘍組織中の免疫細胞の一種であるマクロファージについてもきちんと言及しており、マクロファージを活性化させる理由や目的を記述している。マクロファージは細胞質内に iNOS 酵素を発現しており、この iNOS は L-アルギニンを基質とすることで細胞傷害性の一酸化窒素(NO)を放出する。この作用によりマクロファージは抗腫瘍活性を示す。本論文ではマクロファージの抗腫瘍活性を高めるために必要な L-アルギニンを全身投与によって腫瘍組織に効率的に伝達する戦略をドラッグデリバリーシステムに基づいた方法で記述しており、この目的を達成しようとする新規材料の設計と開発が記述されている。具体的に、ポリエチレングリコール-b-ポリ(L-アルギニン)(以下、PEG-b-P(L-Arg))からなるポリイオンコンプレックスミセル(PIC ミセル)と呼ばれるナノ粒子を開発し、このナノ粒子を全身投与することで腫瘍へアルギニンを伝達する方法を確立した。本論文で用いられる PEG-b-P(L-Arg)合成の過去の報告はなく、本論文では新規合成経路により初めて簡易に PEG-b-P(L-Arg)を精密合成することに成功したことを報告している。また、従来の PIC ミセルでは全身投与後の血液中での安定性の低さがしばしば問題として挙げられるため、本論文では血液中でも安定な PIC ミセルを設計するため、異なるポリアニオンやポリカチオンを用いて網羅的に調製した PIC ミセルの安定性を評価した。これらの実験により、PEG-b-P(L-Arg)のポリアルギニンセグメント側鎖のグアニジノ基は従来のポリカチオン側鎖であるアミノ基と比べて、PIC ミセルの安定性を向上

させる効果をもつことがわかった。また、ポリアニオンの荷電密度も安定性に影響を与え、荷電密度が高いほど安定な PIC ミセルを形成することを明らかにしている。その結果、PEG-b-P(L-Arg)とコンドロイチン硫酸からなる PIC ミセルは非常に安定な PIC ミセルを形成することを明らかにした。また、PEG-b-P(L-Arg)の iNOS 特異的機能を証明するためにコントロールポリマーである PEG-b-P(D-Arg)と PEG-b-P(L-Lys-G)を合成し、iNOS 酵素による NO 産生評価を行っている。iNOS 酵素の NO 産生速度はアルギニン濃度が律速段階となっているため、PEG-b-P(L-Arg)中のペプチド結合が分解して系中のアルギニン濃度が上昇すると NO 産生量が増加する。実際に、PEG-b-P(L-Arg)のみペプチド結合が分解されると有意に NO が産生されることを明らかにした。以上より、本論文で新規合成した PEG-b-P(L-Arg)は iNOS の酵素活性を高める機能性をもつことを明らかにした。PEG-b-P(L-Arg)からなる PIC ミセルにも NO 産生量を増加させる機能があるかを確認するため、in vitro における評価も行っている。マクロファージ RAW264.7 と PEG-b-P(L-Arg)、PEG-b-P(D-Arg)、または PEG-b-P(L-Lys-G)からなる PIC ミセルを 72 時間共培養した後、リポ多糖で刺激して腫瘍組織中のマクロファージを再現し、NO 産生量を定量した。その結果、PEG-b-P(L-Arg)からなる PIC ミセルと接触させた場合のみ有意に NO 産生が増加したことを明らかにした。これは酵素実験の結果と一致しており、PIC ミセル化してもポリマーのみの場合と同様の機能を維持していることを示している。また、この PIC ミセルの細胞毒性も評価しており、高濃度であっても毒性を示さないことを明らかにした。このように PIC ミセルは生体適合性が高いことがわかったため、実際に担癌マウスに投与してナノ粒子による抗腫瘍活性を評価している。マウスの結腸癌由来の C26 癌細胞を Balb/c マウスに播種して作成した担癌マウスに PIC ミセルを尾静注から投与し、体重変化と腫瘍体積変化の経時変化を追跡している。PIC ミセルを投与した担癌マウスはその投与回数によってグループ分けし、初日のみ(投与回数 1 回)、初日から 24 時間おきにそれぞれ計 2 回、計 3 回、そして計 4 回の 4 つのグループをコントロールの担癌マウスと比較した。その結果、いずれのグループの担癌マウスも体重減少は見られなかったことから、PIC ミセルによる毒性はないと考察している。投与回数が計 1 回または計 2 回のグループはコントロールマウスよりも腫瘍成長を促進する効果が観察された。投与回数が 3 回ではコントロールマウスの腫瘍成長と差はなく、投与回数が 4 回になると今度は逆に腫瘍成長の遅延が認められた。このような複雑な結果が得られたが、これは腫瘍組織中の NO 濃度の違いによるものだと考察している。すなわち、低 NO 濃度では細胞増殖を促進するシグナル経路である ERK や Akt、HIF-1 を活性化する一方、高 NO 濃度は細胞のアポトーシスを誘導する p53 を活性化させたり細胞の酸化ストレスによって細胞死することが報告されているため、この効果が動物実験で観察されたのではないかと考察している。以上の結果から、投与回数を増やすことによって本論文で開発した PIC ミセルは有望ながん免疫療法の治療薬になり得ると結論付けている。このように、本論文はがん免疫療法の諸言から始まり、PEG-b-P(L-Arg)の新規合成経路の確立、PEG-b-P(L-Arg)からなる PIC ミセルの調製と機能評価、最後に担癌マウスへの治療効果までを一連の流れで記述している。

審 査 の 要 旨

[批評]

本論文は PEG-b-ポリアルギニンブロック共重合体の新規合成法を開発し、コンドロイチン硫酸とのポリイオンコンプレックス型ナノ粒子を形成せしめ、これが腫瘍近傍のマクロファージに貪食されることによって一酸化窒素（NO）を効果的に発生させ、腫瘍近傍の免疫応答能を向上させる新しい免疫ナノメディシンの設計を行ったものである。論文審査及び質疑応答に関して、過去論文調査結果を踏まえて的確に回答していた。このように本論文では新しい材料設計と機能構築にわたる広範な成果を上げている点で評価された。

〔最終試験結果〕

平成 27 年 6 月 22 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。