

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

### A Study on the Design of In Vivo Environment-sensitive Intelligent Polymeric Micelle Drug Carriers and their Biological Applications for Tumor-directed Treatment

(体内環境応答性機能化高分子ミセル薬物キャリアーの設計及び  
癌標的治療への応用に関する研究)

氏名 裴 潤秀 (ペー ユンスー)

人間の体を構成する細胞は、体内物質の移動や交換を正確に制御することによって生命活動を維持している。ところで、体内物質移動というのは、物質の合成・分解といった化学変化を伴っており、このような正常なバランスを保つことができなくなった場合、細胞は死滅したり、あるいは突然変異を起こして癌化したりする。一方、薬物の効果や毒性というのは、体内での吸収(Absorption)、分布(Distribution)、代謝(Metabolism)、排出(Excretion)といったメカニズムによって決定されるため、薬物を体内へ投与する際にはADMEを総合的に考慮して行わなければいけない。以上のような事実は、我々が体内で物質の流れや変化を制御することさえできれば、必要な物質を体内の的確な場所へ必要な量だけ輸送することによって、癌を治療および予防することが可能であることを示唆している。このような背景で、抗癌剤による毒性を軽減し、癌組織を標的部位として薬物を正確に且つ効率良く輸送する、すなわちドラッグデリバリシステム(DDS)の開発は近年大きな注目を集めており(1-2)、実際の癌治療においても目覚ましい変化をもたらしつつある(3)。中でも、体内環境変化に应答するインテリジェントドラッグキャリアーは、薬物の活性を選択的にコントロールすることができることから、今までとは異なる治療効果をもたらすと期待されており、その創製がますます強く要求されている(4-5)。本稿は、その一つの試みとして筆者が平成14年4月から現在に至るまで過去3年間の博士課程在学中に行った、細胞内pH応答性超機能化高分子ナノミセルキャリアーに関する研究を、その実験結果に基づいて、材料学、生物学、薬学的な観点から考察した内容を学位論文としてまとめたものである。

第1章では、まず、体内環境変化に連動して選択的に機能する機能性高分子ナノミセルの設計に関する研究の背景を記述した。特に高分子材料の応用範囲を、がん治療を目的とする医療分野へ展開させる際、考慮しなければいけない重要なポイントに焦点を合わせることで、本研究の意義及び論点を明らかにした。

第2章では、高分子ミセルの調製に用いられる両親媒性ブロック共重合体の構造設計及び精密合成方法を説明しており、実際に得られた機能性ブロック共重合体からなる高分子ミセルの物理化学的な特性の解析結果を記述した。用いられたブロック共重合体の主鎖は、生体適合性に優れた親水性ポリエチレングリコール(PEG)ブロックと疎水性ポリアスパラギン酸(PAsp)ブロックから構成されており、PAspブロックの側鎖にはヒドラジド基が導入されている。このヒドラジド基は抗癌剤であるアドリアマイシン(ADR)のC-13位カルボニル基と

シッフ塩基を經由して結合されており、外部 pH 低下と連動して選択的に開裂することが可能である (図 1)。調製された高分子ミセルは約 50 nm の粒径を有するコアシェル二層構造をしており、逆送クロマト解析からは、本ミセルが pH7.4 の生理条件では 48 時間以上安定に存在するが、pH6.0 以下では迅速に内包薬物を放出できることが明らかとなった。このような結果は、ミセルがエンドソーム及びリソソームといった細胞内酸性環境(pH4-6)で薬物を選択的に放出できることを示唆している。

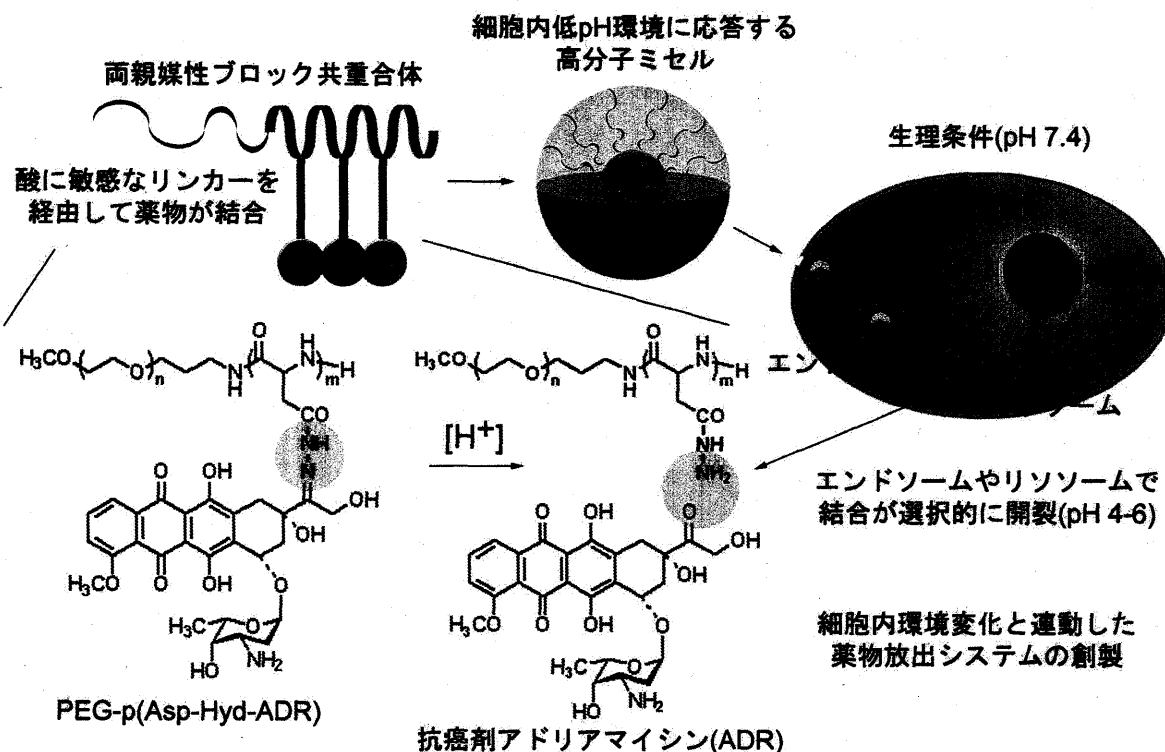


図 1. pH 応答性高分子ミセル薬物キャリアーの設計及び細胞内挙動

第 3 章では、ミセルの細胞内挙動及び細胞成長阻害活性を綿密に調査した。細胞内挙動を観察する際に有効だったのはミセルの蛍光消光効果であった。強い自家蛍光を有する ADR はミセルの内部コアで局所的な濃度増加によってその蛍光強度が消光されるが、薬物の放出に伴い再び強い蛍光が観測されると知られている。このような特徴を利用すると、ミセルの構造変化及び薬物放出挙動を細胞内で追跡することができる。実際に、生きている細胞にミセルを接触させてその挙動を観察した結果、本ミセルは細胞内で薬物を、その活性を失わせることなく、選択的に放出できることが確認された。一方、体内固形癌組織は、巨大分子の浸透性が低いと一般的に言われていることから、多くの高分子薬剤にとって越えなければいけないバリアとなっている。従って、ミセルのがん組織浸透性を検証することはとても重要であるが、実際に腫瘍組織浸透性を細胞培養系で確認することは困難であり、新しい実験モデルが必要とされる。そこで、本章では、腫瘍の体内マイクロ環境を培養プレート上で再現できると知られている癌スフェロイドを用いることによって、ミセルの細胞マトリックス間での挙動を観測することができた。その結果、ミセルは半径約 100  $\mu\text{m}$  の組織内範囲で薬物を細胞内へ確実に輸送していることが示唆された。

第4章では、ミセルの抗腫瘍効果をマウスを用いた動物実験で確認した。その結果、本ミセルは広い投与範囲で高い制癌活性を示していることが明らかとなった。特に、薬物単体の場合に比べて約4倍以上の毒性軽減効果が確認されたにも関わらず、投与後6匹中3匹で腫瘍が完全に消えたことは注目すべきである。このような特徴的な抗腫瘍効果は、ミセルの薬物放出を体内シグナルに連動させることによって達成されたことと考えられており、薬物を時間依存的に放出する多くの高分子薬剤とは明らかに異なる挙動であった。このようなミセルの低毒性・高活性を実現したメカニズムは、続いて行われた投与後体内分布を調べる、*biodistribution* 実験によって薬理学的な観点から明らかとなった。投与後の血中濃度変化から、本ミセルは長い血中滞在性を示していることが確認されており、また、効果的に薬物を癌組織へ輸送していることが確認された。さらに、癌組織へのミセルの集積量は大幅に増加した反面、心臓や腎臓といった臓器への集積は殆どなく、肝臓や脾臓への集積も他の高分子薬剤に比べて低い値を示していることが明らかとなった。すなわち、本ミセルは腫瘍特異的な薬物輸送能を有することによって、薬剤の毒性を大きく軽減できたと結論づけられる。

第5章では、本システムの特性を維持、あるいは向上させる為に必要な最適薬物導入量を検討した。第2章で示したように、薬物導入量はミセルを形成するブロック共重合体のヒドラジドリンカーの置換率によって決定されるが、本章ではヒドラジドの導入をより簡便かつ精密に制御する方法として、エステルアミド交換反応を用いる新しい合成ルートを開発した。その結果、P(Asp)の高分子鎖にヒドラジド基をワンステップ反応で定量的に導入することが可能となった。合成されたブロック共重合体はそれぞれ導入されたヒドラジド基の量に比例して薬物導入率も増加したが、安定なミセルを調製できる組成はP(Asp)の側鎖置換率が50%以上のものだけであった。特に注目すべきな点は、置換率が100%であるP(Asp)からなるミセルが酸性条件下でも薬物は放出しなかったことである。このような現象は、さらなる研究は必要であるものの、薬物放出制御においてコア内導入薬物量の制御がミセルにpH応答性を付与するために重要であることを実証したことから、その意義は大きい。また、この合成法は、今後酸に敏感な分子にやさしい合成法として、本システムの応用を更に広められるだろうとも期待される。

第6章では、前章まで述べた実験結果および開発された精密合成法を総網羅して、細胞内pHに応答して薬物を放出できるだけでなく、がん細胞表面に過剰発現している受容体と選択的に結合できる、超機能化高分子ミセル薬物キャリアーを設計・調製した。ビタミンの一種である葉酸(folic acid)はその受容体(folate-binding protein:FBP)が癌細胞の表面に多量に存在していることから、癌細胞標的治療において高い指向性と選択性を有する優れたパイロッキング分子として知られている。本章ではその葉酸分子をミセルの表面に装着させることによって、癌細胞標的指向型ミセルを調製することができた。調製されたミセルはpH応答性薬物放出挙動を示す一方、FBPと強力かつ選択的に相互作用していることが、表面プラズモン共鳴(SPR)測定装置によって確認された。さらに人の喉頭癌細胞であるKB細胞を用いた実験の結果、この葉酸表面修飾型pH応答性高分子ミセルは、短い細胞接触時間でもより効果的な癌細胞成長抑制活性を示していることが明らかとなった。このような結果は、本システムが今後の体内標的治療において大きな進展をもたらすことが可能であることを示唆している。

以上のように、本論文は機能性高分子ミセルを用いることによって、種々の医療目的に応じた機能化デバイスを設計及び構築可能であることを実証しており、将来的には、このような試みによって、癌の予防、検出、診断、治療などの機能を一体化とした、生体内で働く超機能化ナノマシンが実現されると期待される。

参考文献：

1. K. Kataoka, G. Kwon, M. Yokoyama, T. Okano and Y. Sakurai (1993) *J. Control. Release* 24, 119.
2. K. Kataoka, A. Harada and Y. Nagasaki (2001) *Adv. Drug. Deliver. Rev.* 47, 113.
3. T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai and K. Kataoka (2001) *J. Control. Release* 74, 295.
4. Y. Bae, S. Fukushima, A. Harada and K. Kataoka (2003) *Angew. Chem. Int. Edit.* 42, 4640.
5. Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro and K. Kataoka (2005) *Bioconjugate Chem.* 16, 122.