

審査の結果の要旨

氏名 村上 真美

近年、がん化学療法において、薬剤の効果を高めるために様々なナノテクノロジーの開発が試みられており、ナノキャリアはその基盤として多大な注目を集めている。ナノキャリアは固形がんにおいて、その病態生理学的特徴を活かし、選択的に薬剤を運搬することを可能にする。標的部位にナノキャリアが集積された後、薬剤を放出することが高い制がん効果を得るために非常に重要であるものの、細胞内におけるナノキャリアの経路、その機能的影響は十分に解明されていない。したがって、従来型の長期血中滞留性ミセルは内包された薬剤より活性が低く、同程度の抗腫瘍効果を示すために高い濃度を必要とする。そこで、本研究では、ミセルを構成するブロック共重合体の両末端に二種類の異なる蛍光を導入し、そのミセルの安定性と薬剤が放出される時期を *in vitro*、*in vivo* においてモニターできるシステムを開発した。以下に、その論文内容を示す。

第一章は序論であり、がんの疫学、現在の抗がん剤について説明し、分子標的薬は従来の抗がん剤に比べ、副作用の軽減が期待されているものの、依然として未知の副作用を招く可能性があること、白金錯体制がん剤は広く使用されているものの耐性を獲得しやすいことから新たなアプローチが要求されていること、他の高分子キャリアにおいて、薬剤の細胞内動態（取り込み過程、細胞内局在、細胞内での薬剤の放出パターン）に変化をもたらす、薬理作用に影響を与えるという報告があること、現在、Phase I 試験が実施されているダハプラチン内包ミセルは、オキサリプラチンが効果不良のマウス大腸がん、転移がんにも有効であることが示されているが細胞内動態については未解決であることなどの研究背景を説明し、本研究内容である蛍光標識を利用したミセルの細胞内動態の評価法の確立とそれを利用したダハプラチンミセルの *in vitro* および *in vivo* 評価の概要について記述している。

第二章は蛍光ラベルしたミセルの作成方法について解説したのち、蛍光標識したミセルのサイズ、様々な生理的条件下（細胞外、初期エンドソーム、後期エンドソーム）における薬剤の放出および蛍光強度の時間変化を評価している。また、これら物理化学的特性（サイズ、薬剤の放出パターン）は蛍光標識ミセルと非標識ミセル間で同様であったことを述べている。

第三章は共焦点顕微鏡により、蛍光ラベルしたミセルがミセルの形状を維持したままエンドサイトーシスにより取り込まれ、核付近に集積することを示し、*in vivo* においても、ミセル内核に標識された色素の蛍光が徐々に現れてくることを確認している。また、細胞内 Pt 量、DNA アダクト量の評価から、ミセルは Pt の DNA への送達効率を高めうることを説明している。

第四章はオキサリプラチン耐性がんの作成方法を説明するとともに、ダハプラチンミセ

ルのオキサリプラチン耐性がんに対する制がん活性を *in vitro* および *in vivo* 実験により明らかにしている。また、cell panel と NCI database による解析結果から、metallothionein、methionine synthase の遺伝子が強く発現している細胞種に対し、オキサリプラチンは低い細胞毒性を示したが、ダハプラチンミセルの細胞毒性はそれらのタンパク質の発現量に影響を受けないことを示し、本研究で作成した耐性がんはこれらのタンパク質の発現が高いことを real time RT-PCR および Western blotting により確認している。以上の結果から、ダハプラチンミセルの細胞内動態について、次のように考察している。白金錯体制がん剤は能動輸送あるいはトランスポーターにより細胞内に取り込まれ、metallothionein および methionine synthase によって解毒作用を受けるため、DNA アダクト量はわずか 5~10% と考えられている。一方、ダハプラチンミセルはミセルの形状を維持したままエンドサイトーシスにより取り込まれ、初期エンドソームにおいては Pt を放出せず、後期エンドソーム（核付近）で Pt を放出することによって、上記の解毒機構を回避し、DNA への Pt の送達効率を 3 倍程度高めることが可能になる。このため、ダハプラチンミセルはある細胞種において、オキサリプラチンより高い制がん作用を示し、耐性がんにも有効であったと考えられるとしている。

第五章は結論であり、蛍光標識したミセルで細胞内動態を確認するシステムの開発により、ダハプラチンミセルの *in vitro* および *in vivo* における挙動が明らかになり、その結果としてダハプラチンミセルがオキサリプラチン耐性の克服など優れた薬効を示したことなど、研究内容全般の総括を行っている。

以上、本論文は高分子ミセル型 DDS の *in vitro* および *in vivo* における挙動を明らかにし、その制御によって薬効を高めることが可能であることを示した先駆的な研究内容となっており、ドラッグデリバリーをはじめとする医工融合領域の研究の進展に寄与するところが少なくない。よって本論文は博士（工学）の請求論文として合格であると認められる。