

審査の結果の要旨

氏名 高野 勝

がんの早期発見は、治療の選択肢を増加させ、また転移の可能性を減少させるため、生存率の上昇に直結する。ヒトの血液中には、細胞から放出された cell-free (cf)DNA が存在し、がん患者の血液にはがん細胞に由来する cfDNA が存在し、糸球体膜を通過し尿からも排出されている。そのため、血液や尿などの生体液中の cfDNA を利用したがん診断がすでに医療現場でも実施されているが、生体液中のがん細胞由来 cfDNA の量が少なく、確実な診断が難しかった。生体分析化学教室は、これまでに、マウスの静脈に投与すると血流に乗って体内を循環した後、数時間以内に尿排泄されるポリエチレングリコール(PEG)ナノ粒子を開発していた。

高野は、PEG ナノ粒子の尿排泄される特性を維持したまま、標的物質である血中 cfDNA を捕捉する機能を付与し、血中 cfDNA 回収用ナノ粒子の開発を目指した。血液検査では数 10 mL の血液が採血されるが、ナノ粒子が血流に乗って体内を循環し、成人の体内に存在する血液約 5 L 中に存在する全ての cfDNA を回収した場合、数 100 倍の cfDNA が回収される。つまりこれまでは微量なため検出が難しかった cfDNA の量が数 100 倍になることで、検出が容易になり、診断精度の向上や疾患の超早期発見につながると考えられる。

本論文は、9 章より構成されている。第 1 章「序論」では、本研究の目的と背景、および概要が記載されている。

第 2 章では「PEG ナノ粒子及び蛍光 PEG ナノ粒子の作製、粒子径制御」について述べられている。ナノ粒子の体内動態に大きな影響を与える粒子径を調節するために、ナノ粒子の調製条件が粒子径に与える影響を調べ、目標とする粒子径の蛍光 PEG ナノ粒子を調製する条件を明らかにした。

第 3 章では「血中 cfDNA 回収用ナノ粒子として poly-Lys 修飾蛍光 PEG ナノ粒子の検討」について述べられている。第 2 章で明らかになった条件で調製した PEG 蛍光ナノ粒子の表面に DNA 捕捉部位として poly-Lys を導入した。PEG ナノ粒子溶液 500 μ L に poly-Lys 3 mg を溶解し、20 時間反応させることで修飾を行った後、限外ろ過膜で精製したナノ粒子を実験に用いた。ナノ粒子と DNA の混合液をアガロースゲル電気泳動で分析したところ、修飾前のナノ粒子は DNA と複合体を形成しなかったのに対し、poly-Lys 修飾ナノ粒子は DNA と複合体を形成した。しかし、本粒子を、マウスに尾静脈から投与したところ、尿中に排泄されず、さらに一部のマウスからは毒性が見られた。

第 4 章では「血中 cfDNA 回収用ナノ粒子として Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子の検討」について述べられている。前章で DNA 捕捉部位としてポリカチオンである poly-Lys を用いると、毒性が見られたので、本章では修飾基として Hoechst 33258 を導入したナノ粒子を調製し、評価した。本ナノ粒子も DNA と複合体を形成することが電気泳動の実験で明らかとなった。マウスの尾静脈からナノ粒子を投与したところ、顕著な毒性は見られず尿中に排泄された。しかし、投与後 3 時間以内で尿排泄されたナノ粒子の割合は投与量の 2% 程度であり、未修飾の蛍光 PEG ナノ粒子と比べ大幅に減少した。

第 5 章では「Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子の尿排泄効率」について述べられている。前章の検討で尿排泄の効率が低下した要因として、DNA の添加によってナノ粒子が凝集していると考え、Hoechst

の修飾量と粒子径の最適化を行った。その結果、1 mL のナノ粒子(粒子径 57nm)溶液に 0.83 mgの Hoechst を添加して調製したナノ粒子は、過剰量の DNA を添加しても凝集しないことが分かった。そこで、本ナノ粒子をマウスに投与したところ 3 時間以内に、投与量の 81%以上が尿中に排泄されることが分かった。

さらに、予めウシ胸腺由来 DNA と複合体を形成した本ナノ粒子を投与したマウスの血液及び尿からナノ粒子を回収し、PCRを行った。その結果、DNA が増幅されたことから、本ナノ粒子は DNA と複合体を形成した状態で、血流に乗って体内を循環し、尿排泄されていると考えられる。

第 6 章では「Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子を用いた水溶液中及び血液中からの DNA 回収」について述べられている。ナノ粒子に結合する DNA 量を求めるために、DNA に対して添加するナノ粒子の量を変化させ、遊離 DNA の量を電気泳動で測定した。その結果、水溶液中では 250 ng の DNA を 10 μ L のナノ粒子溶液で、血液中では 100 ng の DNA を 4 μ L のナノ粒子溶液で捕捉可能であった。血液及び尿中の cfDNA の濃度は、数 10 ng/mL であることから、本ナノ粒子溶液を用いることで、全身の血液に存在する cfDNA の捕捉が可能であることが示唆された。

第 7 章では「マウスによる疑似的ながん診断モデルを用いた評価」について述べられている。本検討では、事前に標的 DNA (GFPm 由来の 150 bp の DNA) をマウスに投与し、その後、ナノ粒子の投与群と非投与群に分けた。両群のマウスの尿を回収し、PCR により標的 DNA を増幅し検出した。その結果、ナノ粒子投与群では 5 ng 以上の DNA を投与すれば尿から DNA の検出が可能であった。一方、ナノ粒子の非投与群では、500 ng 以上の DNA を投与したマウスの尿から DNA が検出されたことから、ナノ粒子の投与によって検出に必要な DNA の量が約 1/100 倍になった。つまり粒子を用いることで、従来法と比較して 100 倍程度微量な DNA の検出に成功した。これは、本粒子が、血流に乗って体内を循環している間に標的 DNA を捕捉し、尿排泄されていると考えられる。以上の結果から、本研究で目標としていた投与後に血中で DNA を回収し尿排泄される血中 cfDNA 回収用ナノ粒子の開発に成功した。

しかし、ナノ粒子非投与群のマウスの血液を DNA 投与後 10 分で採取し、DNA を分析した結果、500 pg 以上の DNA を投与したマウスから DNA が検出された。これは投与群で尿排泄された DNA が検出された時の投与量 (5 ng) と比較して 1/10 倍の量である。ナノ粒子が血液中に存在する全ての標的 DNA を捕捉し、尿排泄された時に存在する DNA の量は、採血した血液中に存在する DNA の量の 100 倍程度であることから、ナノ粒子の形状や投与法の最適化によって、より微量な DNA の検出が可能になると考えられる。

第 8 章では「マウスへの投与前後での Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子の形態や性質を確認し、本粒子が糸球体ろ過を通過でき尿排泄される理由」について述べられている。投与前と尿中に排泄された本ナノ粒子の形態を透過型電子顕微鏡 (TEM) で比較したところ、投与前と尿排泄後でナノ粒子の形態が変化していた。また、投与前のナノ粒子は分画分子量 50000 の限外ろ過膜を通過できなかったが、尿排泄されたナノ粒子は通過した。したがって、ナノ粒子の形態や性質が、マウスに投与し尿排泄されるまでの過程で変化していることが分かった。

第 9 章「総括及び今後の展望」では、本研究の意義と今後の展望がまとめられている。

以上のように、高野は、本研究において、DNA を効率的に捕捉し、さらにマウスの尾静脈に投与すると体内を循環した後、尿排泄される Hoechst 修飾蛍光 PEG ナノ粒子を開発した。そして、予め、5 ng の標的 DNA を投与したマウスに本ナノ粒子を投与し、投与後 3 時間以内に排泄された尿を回収し、PCR によって標的 DNA を増幅した結果、標的 DNA の検出に成功した。したがって、

本ナノ粒子は、血液中に存在する微量の cfDNA の分析に利用できると考えられ、今後、がんなどの疾患の早期診断への応用が期待される。

よって、本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。