

審査の結果の要旨

氏名 金雅瀧 (キム アラム)

抗体を含むタンパク質は疾患関連分子に対して特異的に作用することから、次世代を担う有用な医薬品として期待され、細胞を中心とした薬理作用についての研究が盛んに展開されている。しかしながら、このようなタンパク質医薬品を生体に対して作用させるためには、投与から疾患部位までの経路に存在する多くの生体バリアを回避し、効率良くタンパク質医薬品を送達可能なシステム開発が必要となっている。一方で、高分子ミセルなどのナノキャリアの内部へ薬剤を内包させるドラッグデリバリーシステム (DDS) は、薬剤の有効性と生体内の防御機構からの回避を同時に充足可能な新たな創薬技術として注目されている。タンパク質医薬品の場合は、タンパク質と高分子共重合体の静電相互作用によるポリオンコンプレックス化がナノキャリア合成の鍵となり得ることがこれまでの先行研究に於いて明らかとなっている。しかしながら、タンパク質に於ける電荷の度合いやポリオンコンプレックス形成能、更にはそれらの安定性、薬効・活性とのバランスなどの要素に関しては、未だ明らかにされていない側面がある。本論文では、ヘムタンパク質の一つであるシトクロムならびに細胞核を認識可能な抗核膜孔 (NPC) 抗体をモデルタンパク質として、高いキャリア化効率と機能の保持を兼ね備えた表面電荷の精密制御法を開発し、さらには、得られたナノキャリアによる細胞ならびに生体内での効果発現について検証している。以下、各章毎に本論文の審査結果の概要を述べる。

第一章では、タンパク質デリバリーの現在までの発展状況について、ナノキャリアを用いた DDS の必要性や関連する過去のキャリアシステムについてまとめている。タンパク質医薬品の有用性と治療における問題点について総括するとともに、ナノキャリアに関連した基本的な知識と展望、脂質やハイドロゲルなどと比較して、高分子共重合体をナノキャリアの構成成分とすることの利点についてこれまでの開発状況を踏まえながら考察している。

第二章では、タンパク質医薬品の電荷変換、すなわちチャージコンバージョン法についての最適条件の検討について述べている。タンパク質のチャージコンバージョンにおいては、鍵物質となる酸無水物の選択と修飾率の選定が重要

となるが、本章では無水 cis-アコニチン酸、無水コハク酸、無水プロピオン化メチルマレイン酸、ならびに無水シトラコン酸を用いて検討し、無水シトラコン酸をタンパク質のリシン残基に対して 50%の修飾率で電荷変換させることが最適であることを明らかにしている。

第三章では、エンドソーム内 pH よって自己分解するブロック共重合体: PEG- $\{N-[N-(2\text{-aminoethyl})-2\text{-aminoethyl}] \text{ aspartamide}\}$ [PEG-PAsp(DET)]の合成と、PEG-PAsp(DET)と前章で得られたシトラコン酸修飾タンパク質から構成されるポリオンコンプレックスミセルの調整ならびにそれらのキャラクターゼーションについて検討している。本章で合成されたブロック共重合体については、核磁気共鳴スペクトルとゲル浸透クロマトグラフィーによって評価を行い、設計通りの生成物が得られていることを確認している。また、ポリオンコンプレックスミセルについては動的光散乱測定、透過型電子顕微鏡観察、蛍光相関分光法、細胞を用いた蛍光顕微鏡観察によって評価を行い、安定性と形状を精密に制御可能であること、さらには細胞内の核膜と選択的に結合することを見出している。

第四章では、 $N-[N-(2\text{-aminoethyl})-2\text{-aminoethyl}] \text{ aspartamide}$ 単独重合体 [PAsp(DET)]の添加によるポリオンコンプレックスミセルの安定性の強化について検討している。重合度が 55 である PAsp(DET)を抗 NPC 抗体内包ポリオンコンプレックスミセルの形成過程にて添加することによって、キャリアを形成する総ポリマー量が増加し、また、内包している抗 NPC 抗体への遮蔽効果が增强されることを明らかにしている。さらに電荷比で 75%の割合で PAsp(DET)を添加した系が最も安定、かつ、高い細胞への取込能と抗原認識能を有していることが確認されている。

第五章では、分子間架橋によるポリオンコンプレックスミセルの安定性の強化について検討している。PEG-PAsp(DET)の側鎖にチオール残基を有するブロック共重合体:PEG-PAsp(DET/DET-SH)を合成し、それらと第二章で見出された最適条件下で電荷調整を行った抗 NPC 抗体とを反応させることによって、分子内ジスルフィド結合によって架橋された抗 NPC 抗体内包ポリオンコンプレックスミセルを新たに調製している。得られた架橋ポリオンコンプレックスミセルを静的光散乱測定、蛍光相関分光測定、イメージングサイトメーター、ならびにマウス大腸がん (Colon26) を皮下移植した実験モデルマウスを用いて評価した結果、架橋ミセルが前章の PAsp(DET)を添加したミセルよりもさらに安定性に優れ、かつ、生体を対象とした薬物デリバリー用のキャリアとして適用可能であることを明らかとしている。

第六章では、総括として本論文で開発したポリオンコンプレックスミセルの有効性についてまとめるとともに、それらの将来展望について述べている。

以上、本論文では、高いキャリア化効率と機能の保持を兼ね備えたタンパク質医薬品の表面電荷制御法を開発し、さらには、得られたポリオンコンプレックスミセルによる細胞ならびに生体内での抗体デリバリーを実現している。本論文で得られた結果は、DDSなどの関連する研究領域ならびに医療の現場へ極めて有益な知見を与えるとともに、バイオエンジニアリング分野の研究開発の進展へ貢献するものと結論される。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。