

論文審査報告書

氏名	ふくだりょうすけ 福田亮介
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博生第27号
学位授与日	令和2年9月29日
論文題目	Fundamental and Applied Research on Therapeutic Nanocomposites of Lipoproteins and Polycyclic Aromatic Materials (リポタンパク質と多環芳香族材料からなる治療用ナノ複合体に関する基礎および応用研究)
論文審査委員	(主査) 富山県立大学 教授 村上達也 教授 榊利之 教授 米田英伸 大阪大学 教授 松崎典弥

内容の要旨

福田亮介氏は、高密度リポタンパク質(HDL)をバイオアクティブドラッグキャリアとして捉え、その工業的生産に向けた新規作製法を確立するだけでなく、その作動メカニズムを生化学的および分光学的手法を駆使して明らかにした。加えて、HDLの有効成分として光応答性分子・材料である polycyclic aromatic materials (PAM) に注目し、それらの新たな光応答性を見出すとともに、HDLおよびその構成成分による製剤化を実現し、難治疾患に対する新たな光治療の可能性を提案した。

薬物療法の進歩に伴い、高い治療効果を示す反面、深刻な副作用を引き起こす薬物が開発されている。その背景から、薬の有効性や安全性を保証するために、最適な薬物投与形態を設計することが求められる。対照的に、従来の薬物投与形態は必ずしも十分な機能を有していないため、薬物動態の精密制御を目的とした新しい薬物投与形態が開発されてきた。さらに薬物投与形態とともに、さらに有効性、安全性を高めるために、ドラッグナノキャリアを、光や磁場などの外部刺激と組み合わせる手法が開発されてきた。ドラッグナノキャリアによって目的の箇所に到達した薬物は、任意のタイミングで外部刺激を加えることで反応促進され、局所的に治療効果を発揮する。この手法により副作用を抑えつつ、最大の治療効果を得ることが可能となる。このように、薬効を時間的・空間的に制御する手法が確立されつつあるが、その実現のためには、外部刺激に応答して機能を発現する材料が必要不可欠である。外部刺激の中でも、光に応答して機能を発現する材料として、PAMが知られている。福田氏は、PAMの光応答発現を可能にするリポタンパク質ドラッグナノキャリア

の開発と、リポタンパク質/PAM複合体の光機能の評価、およびその生物医学応用を検討した。

公聴会で発表された研究内容は、以下に示す3つの項目からなる。

- (1) 尿素存在下、apolipoprotein A-I (apoA-I)とリン脂質1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholineとを試験管内で、モル比1:100で混合し、24°Cで6時間以上静置反応することで、HDLを高効率で作製できることがわかった。またHDL形成には、apoA-Iの変性における転移中点尿素濃度が最も適しているという新しい知見を得た。さらにHDL生成には、30 nm程度の脂質ナノ粒子形成、脂質ナノ粒子へのapoA-Iの吸着、脂質の切り取りという3つの過程が存在することが明らかとなった。トリプトファン蛍光ピーク波長測定より、脂質ナノ粒子へのapoA-Iの吸着過程は、尿素添加で促進されることが示唆され、apoA-Iの高次構造がHDL形成に重要であることがわかった。加えて、新規作製法で作製したHDLの薬物搭載効率は、従来法で作製されるHDLと同等であり、薬物を含む脂質溶液とapoA-I溶液の単純混合により、薬物搭載HDLを作製することも可能であった。
- (2) PAMの一種であるヘキサフィリンとHDLとを複合化し、生理的条件下での安定性を向上させることに成功した。近赤外光照射下、この複合体は持続的な光線温熱効果を示し、T24がん細胞に対してアポトーシスを光誘導した。近赤外光照射後の吸収スペクトル測定により、ヘキサフィリンは既存の近赤外色素であるインドシアニングリーンよりも光に対して安定であることが明らかになった。この光安定性は、 π 共役拡張により基底状態(S0)/一重項励起状態(S1)間のバンドギャップを小さくし、活性酸素種生成を最小限に抑えたことで達成されたと考えられる。さらにヘキサフィリンは分子内に導入されたフッ素原子により、¹⁹F magnetic resonance imaging (MRI)検出可能なことがわかり、治療・診断を同時に達成する近赤外励起セラノスティクス材料としての応用可能性を示した。
- (3) 近赤外光応答的に活性酸素種を生成するPAMとして、単層カーボンナノチューブ(SWNT)に注目した。多成分の混合物から直径が細い特定成分((6,4)-SWNT)を分離濃縮し、近赤外光を照射したところ、顕著に高い一重項酸素(¹O₂)、ヒドロキシルラジカル生成活性を示し、その活性は少なくとも30分間持続した。この(6,4)-SWNTの高い光線力学効果が、一重項/三重項励起状態間における高い系間交差効率と、高い光安定性に起因することが過渡吸収測定の結果から示唆された。(6,4)-SWNTをapoA-Iと混合して生成する複合体は生理的条件下で少なくとも24時間安定に存在した。この複合体でHeLa細胞を3時間処理したところ、暗毒性なく細胞内移行することがわかった。一方で光照射により、¹O₂依存的な光細胞毒性が検出された。同複合体を用いて、神経毒性が報告されているアミロイド β ペプチド凝集体を光分解することにも成功した。

HDLはヘキサフィリンに水溶液中での安定性を与え、がん光線温熱療法およびMRI診断への応用を可能にした。ApoA-Iは単層カーボンナノチューブの特定成分(6,4)-SWNTに水溶性を与え、がん光線力学療法、および近赤外光を利用したアミロイド β 凝集体分解を可能にした。これらの材料の最大の特徴は「持続的な光応答」である。ポルフィリン誘導体を用いたアミロイド β 凝集体の光分解を示した先行研究で、分解には光安定性が重要であることが示唆されており、本研究における(6,4)-SWNTの光安定性が、アミロイド β 凝集体分解に対して有利に働いたものと考えられる。以上のように、本研究を通じて持続的な光機能を示す近赤外光応答性の次世代治療用材料の治療効果

を引き出す上で、ドラッグナノキャリアが重要な役割を担うことを示した。

ドラッグナノキャリアと光線療法についてまとめた本研究の応用先の一例として、加齢黄斑変性 (AMD) 治療が想定される。既存の AMD 治療法には、まず抗体医薬品を眼球に直接注射する方法がある。他には PAM の一種であるベルテポルフィンを含むリポソーム製剤を血管内投与し、新生血管に対して光照射を行い、血管閉塞を起こす光線力学療法がある。この治療法における治療メカニズムは、リポソームに対する血漿リポタンパク質の吸着、およびリポタンパク質受容体を介する後眼部移行であるとされている。前者は侵襲性、後者は薬物送達の標的特異性が課題となっている。低侵襲で副作用が少ない治療法の確立のために、第一に HDL を点眼投与により後眼部網膜に送達し、AMD 治療できる可能性がある。その他に、HDL を用いれば、現在の光線力学療法 of 欠点である標的特異性の問題を克服することができると思う。既存の光線力学療法剤であるリポソーム製剤において眼内移行メカニズムを担っているのは血漿リポタンパク質であるため、リポタンパク質を含むドラッグナノキャリア、すなわち本研究で述べてきたような再構成 HDL を使用することはターゲティングの観点から合理的である。そこにさらに新生血管へのアクティブターゲティングモチーフを融合することで、後眼部新生血管への PAM 送達効率が向上することが予想される。このように薬物送達の標的特異性の向上を通じて、光線力学療法における副作用を低減できる可能性がある。本研究は、リポタンパク質ドラッグナノキャリアの開発、PAM との複合化、およびその生物医学応用について検討したものであり、PAM をドラッグナノキャリアと複合化することで初めて発現する機能を見出すことができた。本研究を通じて、生理的条件下での安定性が低い PAM の、治療応用に向けた戦略を提示できた。

審査の結果の要旨

福田亮介氏の博士論文は、以下のリストに示すとおり、原著論文3報（うち第一筆者2報）と総説論文1報（第一筆者）で発表した内容を元にして作成された。

1. Fukuda, R., Umeyama, T., Tsujimoto, M., Ishidate, F., Tanaka, T., Kataura, H., Imahori, H., and Murakami, T.*, Sustained Photodynamic Effect of Single Chirality-Enriched Single-Walled Carbon Nanotubes, *Carbon* 2020, 161, 718–725.
2. Higashino, T., Nakatsuji, H., Fukuda, R., Okamoto, H., Imai, H., Matsuda, T.*, Tochio, H., Shirakawa, M.*, Tkachenko, N. V., Hashida, M., Murakami, T.*, and Imahori, H.*, Hexaphyrin as a Potential Theranostic Dye for Photothermal Therapy and ¹⁹F Magnetic Resonance Imaging, *ChemBioChem* 2017, 18, 951–959.
3. Fukuda, R., Saito, M., Shibukawa, S., Sumino, A., Nakano, M., and Murakami, T.*, Urea-Assisted Reconstitution of Discoidal High-Density Lipoprotein, *Biochemistry* 2020, 59, 1455–1464.
4. Fukuda, R. and Murakami, T.*, Potential of Lipoprotein-Based Nanoparticulate Formulations for the Treatment of Eye Diseases, *Biol. Pharm. Bull.* 2020, 43, 596–607.

福田氏の博士論文研究の中心課題は、光応答性物質のドラッグデリバリーシステム開発である。上記の4つの文献の中で、最初の2つはカーボンナノチューブの特定成分（文献1）と環拡張ポルフィリン（文献2）の光機能と生体材料（リポタンパク質）による可溶化に関する原著論文、3つ目はリポタンパク質の新規作製方法の開発に関する原著論文、4つ目はリポタンパク質と眼疾患の関係をまとめたミニレビュー、である。

文献1のハイライトは、近赤外光という低エネルギー光で活性酸素種を持続生成するカーボンナノチューブ成分の発見と、この光応答性を利用した有害タンパク質凝集体の分解、である。近赤外光は生体透過性が高く、副作用の少ない光線力学療法を可能にする。そして活性酸素種生成が持続することは薬効増強に寄与する。カーボンナノチューブは代謝されにくいいため、長期毒性が危惧されているものの、このリスクが将来適切に明らかになれば、今回見出されたカーボンナノチューブ成分は前例のない光線力学療法剤となる。

文献2は、もう1つの医療上有用な光応答性、すなわち光線温熱効果に関するものであり、ここでもこの効果の持続性がポイントである。リポタンパク質はこの持続性にも寄与する。さらにここで報告された多環芳香族材料は、その分子合成の都合上、立体的にほぼ等価な位置に多数のフッ素原子を含む。このことを利用して、¹⁹F MRI 機能も発現することを見出した。すなわち本材料とリポタンパク質の複合体は、*theranostic nanomedicine* となりうる点で興味深い。

文献3では、尿素というありふれた製剤原料を利用することで、工業的生産にも適用可能な極めて簡便なリポタンパク質再構成法を開発している。リポタンパク質は、水溶性の大きく異なるタンパク質とリン脂質という2つの材料からなるため、その再構成操作は煩雑であった。本研究は、再構成条件の最適化にとどまらず、その意義・再構成メカニズムにまで明らかにしており、学術的にも意義がある。

公聴会では、副査および学外評価委員だけでなく、生物工学専攻主査、学科内外の教員から多数の質問があった。質問の中には、学外評価委員から頂いた「ドラッグデリバリーシステムは実学で

ある。今回の研究成果を臨床応用という観点から見た場合、リポタンパク質はどれくらいの将来性があるのか」というクリティカルなものもあったが、福田氏は冷静に対応できていた。

予備検討委員会を 2019 年 12 月 2 日に開催し、博士論文の審査および最終試験を 2020 年 8 月 4 日に行った結果、申請者は学術研究に相応しい討論ができ、当該分野に関して博士としての十分な学識と研究遂行能力を有するものと判定し、博士（工学）の学位論文として合格であると認められた。