

称号及び氏名 博士（工学） 司馬 寛也

学位授与の日付 2024 年 9 月 23 日

論文名 「Association of Carboxy-Terminal Phenylalanine-Modified
Dendrimers with Stimuli-Responsive Properties with T Cells
(刺激応答性をもつカルボキシ末端フェニルアラニン修飾
デンドリマーの T 細胞との相互作用)」

論文審査委員 主査 松本 章一

副査 原田 敦史

副査 八木 繁幸

副査 児島 千恵

論文要旨

近年、生体に備わっている免疫システムを利用した癌免疫療法が着目されている。癌免疫療法には様々な免疫細胞が関与しているが、T 細胞が中心的な役割を担っている。しかしながら、腫瘍組織内でみられる酸性環境では T 細胞の機能が抑制されるため、T 細胞の機能向上は効率的な癌免疫療法において重要である。T 細胞は異なる機能をもつサブタイプに分類され、ヘルパー T 細胞やキラー T 細胞はそれぞれ、免疫細胞の活性化や腫瘍細胞への攻撃を司っており、いずれも癌免疫療法におけるデリバリーの対象となる。しかし、既存の方法では、抗体を利用した T 細胞の表面分子へのデリバリーによる機能制御がほとんどであり、T 細胞の内部にデリバリーすることは困難である。したがって、効率的な癌免疫療法を実現するには、T 細胞内部へのデリバリー技術の開発が求められる。そのためには、体内分布を制御し、生理活性物質を標的細胞に送達するためのナノキャリアの設計が重要である。ドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究において、刺激応答性のナノキャリアは多く研究されている。代表的な刺激として、pH、酵素、活性酸素種といった内因性の刺激や、熱、光、超音波といった外因性の刺激が挙げられる。特に、腫瘍内やエンドソームの pH は生理学的 pH よりも低いことから、pH 応答性のナノキャリアは腫瘍への DDS において有用である。

デンドリマーは樹状の合成高分子であり、線状高分子とは異なって、規定された構造を有するユニークなナノ材料である。また、段階的な反応によって合成されることから、内部/末端構造や粒子径を緻密に制御することが出来る。特に、末端構造の制御は、目的細胞への標的能や刺激応答性など様々な機能発現をする上で重要である。これまでの研究で、アニオン性末端のポリアミドアミン(PAMAM)デンドリマーは免疫細胞が多く存在するリンパ節に効率よく移行することが明らかにされている。中でも、cis-1,2-シクロ

ヘキサンジカルボン酸(CHex)とフェニルアラニン(Phe)を有する dendritic polymer (PAMAM-CHex-Phe)はリンパ節内の T 細胞と相互作用することが見いだされた。しかし、Dendritic polymer と T 細胞との相互作用のメカニズムの理解に加えて、T 細胞とより効果的に相互作用するために必要な dendritic polymer の設計・作製が求められている。

ることが出来る。特に、末端構造の制御は、目的細胞への標的能や刺激応答性など様々な機能発現をする上で重要である。これまでの研究で、アニオン性末端のポリアミドアミン(PAMAM) dendritic polymer は免疫細胞が多く存在するリンパ節に効率よく移行することが明らかにされている。中でも、cis-1,2-シクロヘキサンジカルボン酸(CHex)とフェニルアラニン(Phe)を有する dendritic polymer (PAMAM-CHex-Phe)はリンパ節内の T 細胞と相互作用することが見いだされた。しかし、Dendritic polymer と T 細胞との相互作用のメカニズムの理解に加えて、T 細胞とより効果的に相互作用するために必要な dendritic polymer の設計・作製が求められている。

本研究では、T 細胞への効果的なデリバリーに向けたナノキャリアの作製に焦点をあて、カルボキシ末端 Phe 修飾 dendritic polymer における末端官能基の化学構造やその修飾密度が T 細胞への取り込みに与える影響について検討した。また、カルボキシ末端 Phe 修飾 dendritic polymer のユニークな pH・温度変化を明らかにした。本論文はこれらの研究成果をまとめたものであり、全 6 章から構成されている。

第 1 章では、本研究の背景及び本研究に関連する既存の研究についてまとめ、本研究の目的と本論文の構成を示した。

第 2 章では、化学構造が異なる種々のカルボキシ末端 PAMAM dendritic polymer を合成し、ジカルボン酸とアミノ酸の構造やその結合順序が T 細胞及びそのサブタイプへの取り込みに与える影響について評価するとともに、Dendritic polymer の細胞取り込みの pH 応答性について検討した。まず、PAMAM-CHex-Phe における CHex、Phe をコハク酸(Suc)、ロイシン(Leu)に変えた dendritic polymer (PAMAM-Suc-Phe、PAMAM-Suc-Leu、PAMAM-CHex-Leu)、結合順序の異なる dendritic polymer (PAMAM-Phe-Suc、PAMAM-Phe-CHex)を合成した。合成した dendritic polymer を蛍光色素で標識し、フローサイトメトリーによって T 細胞のモデル培養細胞である Jurkat 細胞、マウスの脾臓由来の T 細胞(CD3+)、ヘルパー T 細胞(CD3+CD4+)、キラー T 細胞(CD3+CD8+)との相互作用を評価した。その結果、CHex 及び Phe を有する dendritic polymer において様々な T 細胞と強く相互作用することを確認した。また、PAMAM-CHex-Phe 及び PAMAM-Phe-CHex は弱酸性条件(pH 6.5)において生理学的 pH 条件下よりも T 細胞と強く相互作用したことから、pH に応答して細胞との相互作用を制御出来る可能性が示された。そして、共焦点顕微鏡観察によってこれらの dendritic polymer は T 細胞内部に取り込まれていることが明らかになった。また、Dendritic polymer と細胞膜のモデルであるリポソームとの相互作用を比較したところ、PAMAM-CHex-Phe ではリポソームとの相互作用が見られなかったが、PAMAM-Phe-CHex はリポソームとの相互作用が見られたことから、これらの dendritic polymer の細胞取り込みメカニズムが異なることが示唆された。これらの結果より、CHex と Phe の組み合わせが T 細胞との効果的な相互作用に重要であることが明らかになった。また、pH 6.5 において T 細胞と強く相互作用したことから、腫瘍細胞近傍の T 細胞への送達に有用である可能性を示した。これは人工的なナノ粒子の T 細胞内部への高効率な送達を達成した最初の報告であり、癌免疫療法における治療技術の展開の可能性を示すものである。

第 3 章では、T 細胞と効果的に相互作用するのに適した dendritic polymer の表面構造を検討するために、Phe の結合数を変化させた PAMAM-CHex-Phe 及び PAMAM-Phe-CHex と T 細胞との相互作用を調べ、末端部位の Phe 密度の影響について評価した。Dendritic polymer に反応させる Phe のモル比を変えることで Phe 結合数の異なるカルボキシ末端 dendritic polymer を合成し、Dendritic polymer を蛍光色素で標識した。そして、フローサイトメトリーによって Jurkat 細胞、マウスの脾細胞由来の T 細胞との相互作用を評価した。その結果、PAMAM-CHex-Phe、PAMAM-Phe-CHex のいずれの場合においても Phe の導入率が 50%以上で、T 細胞と強く相互作用することが示された。とりわけ Phe の導入率が 75%の dendritic polymer において最も強い相互作用を示した。また、PAMAM-CHex-Phe と PAMAM-Phe-CHex にモデル薬物であるプロトポルフィリン(PpIX)を担持させ、Jurkat 細胞への薬物送達能を評価した。その結果、PAMAM-CHex-Phe、PAMAM-Phe-CHex のいずれも PpIX 由来の赤色蛍光強度の増強が確認された。これらの結果より、Dendritic polymer 末端部位の Phe 密度が T 細胞との相互作用の強さに影響を与えることを明らかにした。また、デ

ンドリマーにモデル薬物を担持させ、T 細胞に低分子薬物を送達できる可能性を示した。

第 4 章では、T 細胞との効果的な相互作用に適した PAMAM-CHex-Phe の作製に向けて、CHex 部位の構造最適化を行った。フタル酸(Ph)、炭素数 4-8 の直鎖ジカルボン酸(Cn)を有する Phe 修飾カルボキシ末端 dendritic 構造を合成し、リンカー部位の構造が T 細胞との相互作用に与える影響や薬物保持能を評価した。また、PAMAM dendritic 構造に換えて、DGL を用いて DGL-CHex-Phe を合成し、DGL-CHex-Phe の構造の影響についても合わせて評価した。直鎖のジカルボン酸を有する dendritic 構造が CHex や Ph のような環状構造のジカルボン酸よりも Jurkat 細胞との強い相互作用を示した。また、DGL-CHex-Phe は PAMAM-CHex-Phe よりも強く Jurkat 細胞と相互作用した。続いて、これらの dendritic 構造について抗癌剤パクリタキセル (PTX) の保持能を評価した。その結果、PAMAM-CHex-Phe が最も PTX を保持できることを確認し、DGL-CHex-Phe に保持されることで PTX の水溶性が約 200 倍にまで向上することを確認した。また、PTX を保持した PAMAM-CHex-Phe は Jurkat 細胞に対して PTX と同等の細胞毒性を示した。これらの結果より、T 細胞との相互作用や薬物保持において、リンカーやコアの構造が寄与することが明らかとなった。また、白血病由来 T 細胞への抗がん剤デリバリーの可能性を示した。

第 5 章では、第 3 章で T 細胞への取り込み挙動を検討した Phe の結合数の異なる PAMAM-CHex-Phe について、その pH・温度応答性を調べた。第 3 章と同様の方法で、Phe の結合数が 16～64 の PAMAM-CHex-Phe を合成した。pH 4～6.5 に調整した各種 dendritic 構造水溶液の 20℃～80℃ における透過率を測定したところ、低 Phe 結合数の PAMAM-CHex-Phe では pH 5 前後で下限臨界溶液温度 (LCST) 型の温度応答性が発現したのに対して、Phe 結合数が増加とともに LCST が消失し、pH 6 付近で上限臨界溶液温度 (UCST) 型の温度応答性が発現した。過去、Phe の結合数の異なる PAMAM-Phe-CHex について、その pH・温度応答性が報告されているが、Phe 結合数によって応答性が緩やかに変化しており、PAMAM-CHex-Phe のような明確な温度応答性の変化は発現していない。これらの結果より、PAMAM-CHex-Phe における Phe 結合数と pH を制御することで、LCST 型と UCST 型の温度応答挙動をスイッチングできることを明らかにした。

果より、PAMAM-CHex-Phe における Phe 結合数と pH を制御することで、LCST 型と UCST 型の温度応答挙動をスイッチングできることを明らかにした。

第 6 章では、本論文で得られた成果を総括した。

審査結果の要旨

本論文は、T 細胞への薬物送達に適したナノキャリアを作製するため、カルボキシ末端フェニルアラニン修飾 dendritic 構造の末端部位の化学構造や修飾密度が T 細胞への取り込みに与える影響について研究したものであり、以下の成果を得ている。

(1) 末端部位の化学構造が異なるポリアミドアミン dendritic 構造を合成し、ジカルボン酸とアミノ酸の化学構造や結合順序が T 細胞への取り込みに与える影響について評価するとともに、取り込みの pH 応答性を明らかにした。蛍光色素標識ならびにフローサイトメトリーの結果から、これら dendritic 構造が Jurkat 細胞、マウス脾臓由来 T 細胞、ヘルパー T 細胞およびキラー T 細胞と強く相互作用すること、ならびに細胞との相互作用を pH によって制御できることを見出し、T 細胞内部への取り込み挙動を明らかにした。これらの結果は、カルボキシ末端フェニルアラニン構造が T 細胞との相互作用に重要な役割を果たし、修飾 dendritic 構造が腫瘍細胞近傍の T 細胞への送達に有用であることを示しており、人工ナノ粒子の T 細胞内部への直接送達を利用する癌免疫療法への応用の可能性を示唆した。

(2) T 細胞と効果的に相互作用する dendritic 構造表面の化学構造を設計し、フェニルアラニン結合数 75% の dendritic 構造が Jurkat 細胞ならびにマウス脾臓由来 T 細胞と最も強く相互作用することを見出し、

モデル薬物であるプロトポルフィリン由来の赤色蛍光強度の増強を確認した。また、デンドリマーと T 細胞の相互作用の pH・温度応答性に着目し、pH 5 前後で下限臨界溶液温度 (LCST) 型の温度応答性が発現することや、フェニルアラニン結合数が増加すると pH 6 付近で上限臨界溶液温度 (UCST) 型温度応答性が発現し、結合数と pH 制御によって温度応答挙動をスイッチングできることを明らかにした。

(3) デンドリマーとカルボキシ末端の接続部位の化学構造が T 細胞との相互作用に与える影響や薬物保持能を評価し、鎖状ジカルボン酸アミド構造を含むデンドリマーが T 細胞と効果的に相互作用する一方で、環状ジカルボン酸アミド構造を含むデンドリマーが Jurkat 細胞内部で抗癌剤パクリタキセルを効率よく保持できることを見出した。このように、T 細胞との相互作用ならびに薬物保持においてデンドリマーのリンカーやコアの構造が重要に寄与することを明らかにしており、白血病由来 T 細胞への抗癌剤デリバリーへの応用の可能性を示した。

以上の諸成果は、T 細胞への効果的な薬物送達のためのナノキャリア作製において重要となるカルボキシ末端フェニルアラニン修飾デンドリマーにおける末端部位の化学構造や修飾密度の影響、ならびに pH および温度応答性に関する重要な知見を与えており、当該分野における学術・産業上の発展に貢献するものである。また、申請者が自立して研究活動を行う上で必要とされる能力と学識を有することを証したものである。本委員会は、本論文の審査ならびに最終試験の結果から、博士(工学)の学位を授与することを適当と認める。