論 文 内 容 要 旨

氏　　名	幾田　良和	提出年	平成 27 年
学位論文の 題　　目	薬剤ナノ粒子の創製と薬効評価に関する研究		

論 文 目 次

第 1 章　序
第 2 章　二量体型薬剤ナノ粒子の抗がん活性評価と加水分解挙動
第 3 章　プロドラッグ化を伴わない抗がん活性薬剤ナノ粒子作製法の開発
第 4 章　ナノ粒子点眼薬の作製と眼圧下降作用評価
第 5 章　総括

論 文 内 容 要 旨

第 1 章　序

近年、患部へと薬理活性化合物を効率的に送達するために、薬をナノサイズとするドラッグデリバリーシステム(DDS)に関する研究が盛んに行われている。DDS 研究において、対象となる疾病は、がん、炎症、眼疾患などが挙げられる。また、薬のサイズをナノレベルとするためには、高分子ミセルなどをキャリアーとして用い、キャリアーに薬理活性化合物を担持させる方法が一般的である。しかし、キャリアーに由来する抗原反応や担持量が 10%程度と少ないことが問題点として挙げられている。これに対して、これまでがん治療への応用を念頭に、抗がん活性化合物である SN-38 およびポドフィロトキシン(PPT)の二量体を合成し、薬理活性化合物のみからなるナノ粒子「薬剤ナノ粒子」を作製することで、SN-38 や PPT の水溶性類縁体と比較し、高い抗がん活性が発現することを明らかにした。

本研究では、PPT 二量体の分子設計と抗がん活性、さらに加水分解挙動との相関を解明した。また、二量体化などのプロドラッグの合成を伴わない薬剤ナノ粒子作製法を考案した。さらに、その知見を踏まえて、眼内移行性が低いという課題を抱える点眼薬に関して、薬剤ナノ粒子から構成される点眼薬「ナノ粒子点眼薬」を創製し、眼疾患への効率的な DDS 応用を目指した。

第 2 章　二量体型薬剤ナノ粒子の抗がん活性評価と加水分解挙動

リンカーの長さが異なる PPT 二量体 C4, PPT 二量体 C10, PPT 二量体 C18 および PPT 二量体 SS の 4 種類の二量体化合物を合成した。PPT 二量体 C10 と PPT 二量体 SS は、同じ長さのリンカーを有している。合成した PPT 二量体は、PPT とリンカーの間にエステル結合を有しており、酵素による加水

分解反応が可能な分子設計である。また、PPT 二量体 SS は、リンカーの中心部分にジスルフィド結合を有しているため、還元剤による分解反応が起こると考えられる。合成した PPT 二量体は、再沈法によりナノ粒子化したところ、PPT 二量体 C4 ナノ粒子が約 50 nm と最も小さく、リンカーの長さが長くなるにつれナノ粒子のサイズが増大することが明らかとなった。

次に、作製した PPT 二量体ナノ粒子の抗がん活性を評価したところ、PPT 二量体 C4 ナノ粒子が最も高い活性を示し、リンカーの長さが長くなるにつれて活性が低くなることが明らかとなった。一方、PPT 二量体 SS ナノ粒子は、PPT 二量体 C10 ナノ粒子と比較し、リンカーの長さが等しいにもかかわらず、高い抗がん活性を有することがわかった。リンカーの長さが変化することで抗がん活性が異なる要因を明らかにするため、PPT 二量体ナノ粒子の細胞浸透性を評価した。結果として、PPT 二量体ナノ粒子の細胞浸透性にほとんど変化は見られなかった。一方、PPT 二量体ナノ粒子の加水分解速度を評価したところ、抗がん活性の差と同様の挙動を示していることが明らかとなった。また、PPT 二量体 SS ナノ粒子は、リンカー部位にジスルフィド結合を有しているため、還元剤による分解挙動も観測された。この結果は、PPT 二量体 C10 ナノ粒子と PPT 二量体 SS ナノ粒子の抗がん活性の差によく反映されている。以上の結果から、PPT 二量体ナノ粒子の PPT 放出速度と抗がん活性は非常に高い相関があることが判明した。

第 3 章　プロドラッグ化を伴わない抗がん活性薬剤ナノ粒子作製法の開発

従来の再沈法に超音波照射を組み合わせることで、SN-38 ナノファイバーのアスペクト比が減少し、長軸方向の長さが短いロッド状の構造体が得られることが明らかとなった。また、超純水に注入する DMSO 溶液に界面活性剤を添加することでも同様の効果が得られた。そこで、超音波照射と界面活性剤の添加を組み合わせて再沈法を行ったところ、長軸方向の長さが 100 nm 程度の SN-38 ナノ結晶を作製することに成功した。さらに、粉末法 XRD 測定により、SN-38 ナノ結晶は、SN-38 ナノファイバーと同形であることがわかった。以上の結果から、超音波照射や界面活性剤を添加することで、生成する結晶核の数が増大し、それに伴い、結晶成長が抑制されるため、長軸方向の長さが減少したと考察した。

得られた SN-38 ナノ結晶を、がん細胞に投与したところ、SN-38 の水溶性プロドラッグで上市薬であるイリノテカンと比較し、非常に優れた活性を示した。また、SN-38 の疎水性プロドラッグである SN-38 二量体のナノ粒子と同程度の活性を有することが明らかとなった。このことから、SN-38 単量体のみからなるナノ結晶を作製することでも、非常に優れた活性を有する抗がん剤を作製できることがわかった。

第 4 章　ナノ粒子点眼薬の作製と眼圧下降作用評価

対象化合物には、緑内障治療薬として眼圧下降作用を有するブリンゾラミドに着目した。まず、ブリンゾラミドのナノ粒子化を再沈法により試みたところ、マイクロサイズの構造体が生成した。そこで、ブリンゾラミドの疎水性を向上させるため、ブリンゾラミドに、疎水性置換基としてコレステロールを化学修飾したコレステロールプロドラッグおよび二置換体コレステロールプロドラッグを合成した。合成したコレステロール類縁体のナノ粒子化を再沈法により行ったところ、どちらもナノ粒子が生成することが明らかとなった。ブリンゾラミドプロドラッグナノ粒子は、加水分解後、ブリンゾラミドを放出することで薬理効果を示す。そこで、眼内の組織液であり、加水分解酵素を含む前房水中での加水分解挙動を評価した結果、コレステロールプロドラッグ類縁体ナノ粒子は、加水分解が進行しないことが明

らかとなった。また、二置換体コレステロールプロドラッグナノ粒子点眼薬をラットに点眼した場合、眼圧下降作用が観測されなかった。以上の結果から、加水分解点であるカルバメート結合がブリンゾラミドと嵩高いコレステロール基の間にあり、酵素が接近できないため、コレステロールプロドラッグ類縁体ナノ粒子が加水分解されず、ブリンゾラミドを放出できないと考察した。

そこで、TML 基を化学修飾した TML プロドラッグを合成した。TML プロドラッグは、加水分解点が分子の外側に位置するため、加水分解が進行しやすく、その後、3 つの Me 基により C－C 結合の回転が抑制されるために分子内反応が速やかに進行し、ブリンゾラミドを放出しやすい設計となっている。次に、合成した TML プロドラッグのナノ粒子化を行った。再沈法の実験条件を最適化した結果、0.5%の高濃度分散液において、平均粒径が 200 nm のナノ粒子を作製可能になった。作製した TML プロドラッグナノ粒子の加水分解挙動を評価したところ、速やかに加水分解が進行し、ブリンゾラミドが放出されることが明らかとなった。また、TML プロドラッグナノ粒子点眼薬をラットに点眼したところ、1 時間後に、有意な眼圧下降作用が観測された。さらに、ブリンゾラミドの上市薬である 1% Azopt を点眼した場合にも同様の挙動が観測された。TML プロドラッグナノ粒子点眼薬は、1% Azopt と比較し、モル濃度比で 1/5 であったが、0.2% Azopt を点眼した場合、眼圧下降作用を示さなかった。以上のことから、TML プロドラッグナノ粒子点眼薬は、高い眼内移行性を示し、眼内で酵素により加水分解され、速やかにブリンゾラミドを放出するため、低濃度で眼圧下降作用を発現したと結論付けた。

次に、TML プロドラッグの加水分解制御を行うために、ブリンゾラミドの EtNH 基に TML 基を化学修飾した Iso-TML プロドラッグ、2 つのアミン基に TML 基を化学修飾した二置換体 TML プロドラッグを合成した。TML プロドラッグ類縁体のナノ粒子化を行ったところ、0.5%高濃度分散液において、Iso-TML プロドラッグナノ粒子は平均粒径 130 nm、二置換体 TML プロドラッグナノ粒子に関しては 100 nm 程度のナノ粒子が生成した。作製した TML プロドラッグ類縁体ナノ粒子の前房水中での加水分解挙動を評価したところ、Iso-TML プロドラッグナノ粒子のブリンゾラミド放出速度は、TML プロドラッグナノ粒子と比較し、遅いことが分かった。二置換体 TML プロドラッグナノ粒子に関しては、加水分解速度、ブリンゾラミド放出速度共に非常に遅いことが明らかとなった。これらのナノ粒子点眼薬をラットに点眼したところ、Iso-TML プロドラッグナノ粒子点眼薬は、2 時間後に、二置換体 TML プロドラッグナノ粒子点眼薬は、3 時間後に眼圧の減少が観測された。これは、ブリンゾラミドの放出挙動と強い相関がある。すなわち、ブリンゾラミドの放出速度を制御することで、眼圧下降作用の発現時間を制御することに成功した。

第 5 章　総括

以上の結果から、「抗がん活性薬剤ナノ粒子」および「ナノ粒子点眼薬」の有用性が明らかとなった。また、プロドラッグの分子設計を最適化することで、薬剤ナノ粒子の薬効の強弱や発現時期を制御可能であることを見出した。本論文における、分子デザインの方向性や作用機序は基本的に同じであり、「薬剤ナノ粒子」の作製における本研究戦略の拡張性や汎用性が十分に高いことを実証できた。

論文審査の結果の要旨

幾田良和提出の本論文では、薬をナノサイズとする新規のドラッグデリバリーシステム(DDS)を目指して、がん治療への応用を念頭にしたSN-38およびポドフィロトキシン(PPT)から構成される「抗がん活性薬剤ナノ粒子」作製法の確立と加水分解挙動の解明、さらには眼内移行性が低いという課題を抱える点眼薬に関しても薬剤ナノ粒子から構成される点眼薬「ナノ粒子点眼薬」を創製することを目的とした。

第2章では、リンカーの長さが異なるPPT二量体C4～C10およびPPT二量体SSの分子設計・合成を行い、再沈法によりナノ粒子化した。PPT二量体ナノ粒子の抗がん活性を評価した結果、リンカーの長さとともに活性は低下した。PPT二量体ナノ粒子の細胞浸透性にはほとんど変化はなく、要因として、加水分解速度の違いが抗がん活性と強い相関を示すことを明らかにした。

第3章では、超音波照射と界面活性剤の添加を組み合わせた再沈法により、アスペクト比が大きく減少したロッド状SN-38単量体ナノ結晶（長軸：約100 nm）の作製に成功し、その抗がん活性を評価した。粉末法XRD測定から、SN-38単量体ナノ結晶は、通常の再沈法で作製されるSN-38ナノ結晶ファイバーと同形であった。超音波照射や界面活性剤は生成する結晶核の数を増大させ、結晶成長を抑制すると考察した。SN-38単量体ナノ結晶をがん細胞に投与した結果、SN-38の水溶性プロドラッグで上市薬であるイリノテカンと比較して、非常に優れた活性を示し、SN-38二量体ナノ粒子と同程度の活性を有することが明らかとなった。すなわち、SN-38単量体ナノ結晶でも、非常に優れた活性を有する抗がん剤になることが明らかとなった。

第4章では、緑内障治療薬として眼圧下降作用を有するブリンゾラミドにTML基を化学修飾したTMLプロドラッグを合成した。TMLプロドラッグは加水分解点が分子の外側に位置するため、加水分解が進行しやすく、3つのメチル基によりC－C結合の回転が抑制されるために、その後の分子内反応が速やかに進行し、ブリンゾラミドを放出し易い分子設計となっている。合成したTMLプロドラッグのナノ粒子化（平均粒径：200 nm）を行い、眼内の組織液であり、加水分解酵素を含む前房水中でのTMLプロドラッグナノ粒子の加水分解挙動を評価した結果、速やかに加水分解は進行し、ブリンゾラミドの放出を確認した。実際に、TMLプロドラッグナノ粒子点眼薬をラットに点眼したところ、上市薬である1% Azoptと比較し、モル濃度比で1/5にも拘わらず、1時間後に有意な眼圧下降作用が発現した。さらに、二置換体TMLプロドラッグナノ粒子やIso-TMLプロドラッグナノ粒子とすることで、ブリンゾラミドの放出速度の制御が可能となり、眼圧下降作用の発現時間を調整することに成功した。

第5章では、本研究を総括した。以上の成果から、「抗がん活性薬剤ナノ粒子」および「ナノ粒子点眼薬」における分子設計の方向性や作用機序は基本的に同じであり、プロドラッグの分子構造を最適化することで、薬剤ナノ粒子の薬効の強弱や発現時期の制御が可能なる。すなわち、「薬剤ナノ粒子」の有用性、拡張性や汎用性が十分に高いことを実証できた。

以上、本論文は著者が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、幾田良和提出の博士論文は、博士（理学）の学位論文として合格と認める。