

京都大学	博士（工学）	氏名	劉 健
論文題目	POLYMER MODIFICATION OF FULLERENE FOR PHOTODYNAMIC TUMOR THERAPY AND TUMOR IMAGING (光線力学がん治療とがんイメージングのためのフラーレンの高分子修飾)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、水溶性高分子修飾による水可溶性 C₆₀ の創製とその物理化学的性質が光線力学治療 (photodynamic therapy, PDT) 効果に与える影響について調べたものである。さらに、治療と診断とを同時にできるハイブリッドドラッグデリバリーシステム (DDS) による PDT 効果の増強、および DDS 技術に基づいた新規な新生骨の多機能性イメージング剤について評価した。これらの一連の研究成果を、2部5章にまとめている。</p> <p>第1部では、異なる分子量と末端基とをもつ水溶性高分子を用いて、様々な結合様式で C₆₀ を修飾することによって、種々な C₆₀ 誘導体 (C₆₀-polymer 複合体) を作製した。得られた C₆₀-polymer 複合体の材料特性、体内分布、および <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> 抗がん活性を評価した。これによって、よりよい PDT 抗がん効果を得るための C₆₀-polymer 複合体デザインに関する基礎的な知見を集積した。</p> <p>第1章では、異なる分子量と末端基とをもつポリエチレングリコール (PEG) と C₆₀ とを化学結合させることで得られた C₆₀-PEG 複合体の活性酸素産生能、体内分布、および <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> 抗がん活性における PEG の分子量と末端基の影響について調べた。C₆₀-PEG 複合体の活性酸素産生能と <i>in vitro</i> 抗がん活性は PEG の分子量と末端基には影響しなかったが、末端にメトキシ基をもち、分子量が最大の PEG からなる C₆₀ 複合体が、最も強い <i>in vivo</i> 抗がん活性を示した。この複合体は、最も高い血中滞留性とがん集積性をもち、このことが PDT 効果に影響していると考えられた。これらの結果は、C₆₀ 修飾に用いる PEG の分子量や末端化学構造が C₆₀-PEG 複合体のがんターゲティング能と PDT 抗がん活性に大きく影響を与えることを示している。</p> <p>第2章では、アジアロ糖タンパク質受容体と高い親和性をもつ水溶性多糖である pullulan を用いて、C₆₀ を修飾し、C₆₀-pullulan 複合体の細胞特異的な抗がん活性の評価を行った。還元的アミノ化反応によって、pullulan の末端アルデヒド基にエチレンジアミンを導入し、この末端アミノ基と C₆₀ と結合させた。C₆₀-pullulan 複合体をアジアロ糖タンパク質受容体をもつ肝がん細胞である HepG2 細胞、あるいは受容体のない HeLa 細胞とともに培養したところ、HepG2 細胞に対する C₆₀-pullulan 複合体の細胞親和性と増殖抑制効果が、HeLa 細胞に比べて、有意に高いことがわかった。一方、このような現象は、C₆₀-PEG 複合体では見られなかった。次に、皮下に HepG2 細胞をもつ担がんマウスの尾静脈から C₆₀-pullulan 複合体を投与した。C₆₀-pullulan 複合体の PDT 抗がん活性は、C₆₀-PEG 複合体や生理食塩水を投与した群と比べて、有意に高くなった。これらの結果は、pullulan 修飾が C₆₀ に HepG2 細胞に対するターゲティング能を与え、PDT 抗がん活性を細胞特異的に増強したことを示している。</p> <p>第3章では、pullulan 分子の水酸基を利用して、ペンダント状に (C₆₀-p-pullulan 複合体)、あるいは pullulan の還元末端を利用して、分子の末端に C₆₀ を結合させた C₆₀-t-pullulan 複合体を作製した。pullulan の分子量とその結合様式に関係なく、全ての C₆₀-pullulan 複合体は同じレベルの活性酸素産生能を示した。一方、</p>			

C₆₀-t-pullulan 複合体は、C₆₀-p-pullulan 複合体と比べて、高いレクチン親和性と細胞親和性、および高い *in vitro* 抗がん活性を示した。その程度は分子量の増加とともに増大することがわかった。pullulan の分子量と結合様式が、C₆₀-pullulan 複合体の pullulan 鎖のレクチンおよび細胞表面アシアロ糖タンパク質受容体による認識能を変化させ、その結果として、C₆₀-pullulan 複合体の PDT 効果に影響を与えることを明らかにした。

第2部では、C₆₀-polymer 複合体とイメージングプローブを組み合わせることで、治療と診断とを同時にできるハイブリッド DDS をデザインした。加えて、新生骨をイメージングできる多機能性イメージング剤を作製した。

第4章では、PDT 光増感剤である C₆₀-PEG 複合体に MRI 造影剤のガドリニウムイオンを導入した C₆₀-PEG-Gd 複合体を作製した。担がんマウスの尾静脈から C₆₀-PEG-Gd 複合体を投与したところ、C₆₀-PEG-Gd 複合体が市販の MRI 造影剤に比べて、より高いがん造影効果を示した。次に、がん組織で高い MRI 信号を検出された時に光照射が行うと、予想通り、C₆₀-PEG-Gd が高い抗がん活性を示すことがわかった。この C₆₀-PEG-Gd を用いることで、C₆₀ のがん組織への集積を MRI で追跡でき、治療のための光照射の最適タイミングを見つけることが可能であることを示している。

第5章では、骨親和性をもつパミドロン酸塩で修飾された pullulan 誘導体に蛍光イメージングプローブ (Cy5.5) ならびに MRI 造影剤のカドリニウムイオンを導入した多機能性高分子造影剤 (PA-pullulan-F/M) を作製した。PA-pullulan-F/M は骨組織の成分であるヒドロキシアパタイトに親和性を示した。次に、骨形成因子 (BMP) -2 の徐放技術を利用して、骨再生モデルを作製した。このモデル動物の尾静脈内に PA-pullulan-F/M を投与したところ、PA-pullulan-F/M が骨に集積し、骨再生部位での蛍光強度の増加が認められた。この蛍光強度の増加が、新生骨中のカルシウム濃度に対応して増加していた。組織観察により、カルシウム沈着のある新生骨でのみ、蛍光発光が見られた。これらの結果は、PA-pullulan-F/M が再生骨イメージング剤として有効であることを示している。

本研究を通して、高分子修飾により C₆₀ の物理化学的性質が変化し、その性質の変化が C₆₀-polymer 複合体の *in vitro* 抗がん活性、体内動態、さらには *in vivo* 抗がん活性に影響を与えることを示している。これらの結果は、PDT のための C₆₀ 複合体の DDS 設計する際に重要な知見を与えている。さらに、PDT 光増感剤とイメージング剤を組み合わせることによって、最適なタイミングで光照射することで、光増感剤の PDT 活性を増強している。加えて、DDS 技術を用いた多機能性イメージング剤の骨再生診断に対する有用性を確認している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、水溶性高分子修飾による水可溶性 C₆₀ の創製とその物理化学的性質が光線力学治療 (photodynamic therapy, PDT) 効果に与える影響について調べたものである。さらに、治療と診断と同時に行えるハイブリッドドラッグデリバリシステム (DDS) による PDT 効果の増強および DDS 技術に基づいた新規な新生骨の多機能性イメージング剤について評価している。得られた主な成果は次のとおりである。

異なる分子量と末端基とをもつ水溶性高分子を用いて、様々な結合様式で C₆₀ を修飾することによって、種々な C₆₀ 誘導体 (C₆₀-polymer 複合体) を作製した。得られた C₆₀-polymer 複合体の材料特性、体内分布、および *in vitro* と *in vivo* 抗がん活性を評価することで、以下のようなことを明らかにしている。

1. ポリエチレングリコール (PEG) 分子量とその末端基構造が C₆₀-PEG 複合体のがんターゲティング能と PDT 効果に大きく影響を与えた。

2. pullulan 修飾が C₆₀ に HepG2 細胞に対するターゲティング能を与え、PDT 抗がん活性を細胞特異的に増強した。

3. pullulan の分子量とその結合様式が、C₆₀-pullulan 複合体の pullulan 鎖のレクチンおよび細胞表面アシアロ糖タンパク質受容体に対する認識能が変化し、その結果として、C₆₀-pullulan 複合体の PDT 効果に影響を与えた。

4. C₆₀-polymer 複合体と MRI 造影剤のカドリニウムイオンを組み合わせることで、治療と診断とを同時に行えるハイブリッド DDS がデザインできる。この DDS により、C₆₀ のがん組織への集積をリアルタイムで IMR 追跡し、治療のための照射の最適タイミングを見つけることが可能であった。

5. 骨親和性をもつパミドロン酸塩と蛍光イメージングプローブ (Cy5.5) と MRI 造影剤のカドリニウムイオンを組み込んだ pullulan 誘導体 (多機能性高分子イメージング剤) を作製した。このハイブリッド DDS 剤により再生骨を効率よくイメージングすることが可能となった。

以上、本論文は、よりよい PDT 抗がん効果を得るための C₆₀-polymer 複合体のデザイン、診断-治療ハイブリッド DDS、そして多機能性イメージング剤に関する基礎的な知見を得たものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 2 月 24 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。