

氏名	まつうら みなみ 松浦 みなみ
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲 第 5039 号
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	アミノ酸トランスポーターを標的とした温度応答性蛍光プローブ 及び薬物キャリアの開発
論文審査委員	(主査) 金澤 秀子 教授(薬学博士) (副査) 野口 耕司 准教授(博士(薬学)) 齋藤 義正 准教授(博士(医学))

論文内容の要旨

【背景】

近年、診断と治療の融合を意味するセラノスティクスという概念が注目されている。正常細胞と異なり、がん細胞の代謝は、悪性度の獲得及び維持のために代謝再プログラミングがされているため、診断・治療においては、がん細胞特異的な様々なターゲットが検討されている。

L 型アミノ酸トランスポーター1 (LAT1) は、グルコーストランスポーター1 等と同様に、がん細胞における発現の増加が知られている。LAT1 は、アミノ酸の α -アミノ基及び α -カルボキシル基の電荷を認識し、leucine、phenylalanine 及び tyrosine のような分岐アミノ酸や芳香族アミノ酸を選択的に輸送する。腫瘍組織では、肺、結腸、乳房、グリア細胞、前立腺及び膵臓などで高発現しており、過剰発現は転移の予後因子でもある。LAT1 を標的とする診断方法は、PET プローブが開発されている。また、SPECT やホウ素中性子補足療法で用いられるプローブも、腫瘍部位への集積において LAT1 が関与しているほか、LAT1 の阻害により抗腫瘍効果が得られることや、LAT1 を標的とする薬物担体が報告されている。しかし、これらのプローブや薬物担体は、一部の正常細胞において発現する LAT1 にも認識される。そのため、標的腫瘍組織への蓄積後に、標的細胞へ選択的に作用する能動的ターゲティング能の付与が重要であり、刺激に対する応答性として、温度、光、磁気、超音波などの物理的方法や pH、イオン組成、グルコース濃度などの化学刺激を用いた方法が検討されている。

検討 1 : がん細胞イメージングを目的とした LAT1 標的型温度応答性蛍光プローブ

【目的】

本検討では、がん細胞イメージングを目的として、外部環境の温度による細胞内取り込みを制御可能な温度応答性ポリマーに基づく LAT1 標的蛍光プローブを設計し、ポリマープローブと LAT1 との親和性を評価した。

【方法】

可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合により、温度応答性ポリマーである poly(*N*-isopropylacrylamide-*co*-*N,N*-dimethylacrylamide) (P(NIPAAm-*co*-DMAAm)) を合成した。ポリマー末端へアミノ酸を修飾することにより、L-phenylalanine-P(NIPAAm-*co*-DMAAm) (Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)) 及び L-tyrosine-P(NIPAAm-*co*-DMAAm) (Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)) を得た。合成したポリマーは、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC)、相転移挙動、サイズ及びゼータ電位測定により、評価した。

合成したポリマーとがん細胞に発現する LAT1 との相互作用を調べるために、ポリマーあるいは LAT1 阻害剤である 2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid (BCH) の存在下で、LAT1 の基質である L-[³H]-leucine の取り込み阻害実験を行った。ウエスタンブロッティング及び免疫染色により、LAT1 発現が確認された HeLa 細胞をモデルがん細胞として用いた。

Fluorescein-5-maleimide (FL) をポリマーの末端に結合し、蛍光ポリマープローブを合成した。インキュベーション温度及び LAT1 認識が蛍光プローブの細胞内取り込みに及ぼす影響を調べるために、P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-FL または Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-FL を HeLa 細胞に添加し、LCST 以下 (34°C) または LCST 以上 (37°C) でインキュベートした。インキュベーション後、共焦点顕微鏡で観察を行った。また、フローサイトメトリーにより、蛍光ポリマープローブの時間依存的な細胞内取り込みを評価した。Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)-FL の細胞内取り込みにおける LAT1 の関与を確認するために、LAT1 の基質である L-phenylalanine 存在下における蛍光ポリマープローブの取り込みを、フローサイトメトリーにより評価した。

【結果・考察】

P(NIPAAm-*co*-DMAAm)、Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)及び Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm) の LCST は、各々 37.3°C、39.3°C 及び 36.3°C、平均分子量 14,200~17,700 であった。L-phenylalanine や L-tyrosine の修飾により、LCST はわずかに変化した。PBS 中で温度応答性の鋭敏な溶解度変化を示した。

HeLa 細胞を用いた L-[³H] leucine の阻害実験において、P(NIPAAm-*co*-DMAAm)とインキュベートした場合、L-[³H] leucine の細胞内への取り込み量は、減少しなかった。この結果より、アミノ酸が修飾されていない P(NIPAAm-*co*-DMAAm)は、LAT1 を介した L-[³H] leucine の取り込みを阻害しないことが示唆された。さらに、L-phenylalanine を修飾した Phe-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)も同様に、L-[³H] leucine の取り込みを阻害しなかった。対照的に、L-tyrosine を修飾した Tyr-P(NIPAAm-*co*-DMAAm)は、L-[³H] leucine の取り込みを阻害した。L-phenylalanine を修飾したポリマーでは、 α -カルボキシル基のみが存在し、L-tyrosine を修飾したポリマーは、 α -アミノ基と α -カルボキシル基を有する。 α -アミノ

基の正電荷と α -カルボキシル基の負電荷が、LAT1 の基質認識に関与していることが報告されており、本研究の結果と一致する。いずれのポリマーも、LCST 以上及び LCST 以下で、L-[^3H] leucine 阻害効果の差は、観察されなかった。従って、ポリマーの物性（親水性／疎水性）の変化に関わらず、LAT1 はポリマー末端の L-tyrosine を認識することが示唆された。

共焦点顕微鏡画像において、LCST 以下では、蛍光プローブの細胞内取り込みは観察されなかった。対照的に、LCST 以上では、蛍光プローブの細胞内取り込みが確認された。これは、蛍光ポリマープローブの親水性／疎水性の物性変化に起因する。LCST 以下では、蛍光ポリマープローブは親水性であり、細胞膜との親和性は低く、細胞内へ取り込まれなかったと考察できる。一方、LCST 以上で蛍光ポリマープローブが疎水性になると、細胞膜との親和性が増強され、細胞内取り込みが促進された。また、蛍光プローブはライソソームに局在しており、エンドサイトーシスによる取り込みが示唆された。フローサイトメトリー測定においては、アミノ酸を修飾していない P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL をインキュベートした細胞では、LCST 以上及び以下における蛍光強度に有意差はなかった。よって、蛍光ポリマープローブの疎水性変化が、細胞へのプローブの取り込みを誘導するには、不十分であったことが示唆された。対照的に、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL では、LCST 以下と比較して、LCST 以上でインキュベートした細胞は、30 分後には 2 倍の蛍光強度が観察された。さらに、4 時間のインキュベーション後、LCST 以上でインキュベートした細胞の蛍光強度は、LCST 以下と比較して 3 倍であった。この結果より、LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との間の親和性と、ポリマープローブの疎水性との相乗効果が、蛍光ポリマープローブの細胞内取り込みを促進することが示唆された。

また、LAT1 を介して細胞内へ取り込まれる L-phenylalanine と Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL をインキュベートすると、L-phenylalanine を添加していない場合よりも蛍光強度は低くなり、LAT1 が Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL の細胞内取り込みに関与していることが示唆された。

検討 2：がん治療を目的とした LAT1 標的型温度応答性薬物キャリア

【目的】

本検討では、LAT1 標的型温度応答性薬物キャリアの創製を目指し、3-*sn*-phosphatidylcholine, from egg yolk (EPC) 及び L- α -phosphatidylethanolamine, dioleoyl (DOPE) からなるリポソームに LAT1 親和性部位を有する温度応答性ポリマーを修飾し、リポソームの温度依存性及び LAT1 認識による選択的な細胞内取り込み能を評価した。

【方法】

温度応答性ポリマーである P(NIPAAm-co-DMAAm)及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)

に DOPE を修飾した。温度応答性ポリマーへの L-tyrosine 及び DOPE による温度応答性への影響を調べるために、ポリマーの相転移挙動を示差走査熱量測定 (DSC) で評価した。

DOPE 修飾温度応答性ポリマー、EPC 及び DOPE からなる温度応答性リポソームを作製した。比較対照として、未修飾リポソーム及び polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソームを作製した。相転移挙動、サイズ測定及びゼータ電位によって、物性を評価した。

インキュベーション温度及び LAT1 認識がリポソームの細胞内取り込みに及ぼす影響を調べるために、5(6)-carboxyfluorescein (CF) を内封させた未修飾リポソーム、PEG 修飾リポソーム、P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームまたは Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームを HeLa 細胞に添加し、LCST 以下 (37°C) または LCST 以上 (42°C) でインキュベートした。インキュベーション後、共焦点顕微鏡で観察を行った。

また、フローサイトメトリーにより、リポソームの時間依存的な細胞内取り込みを評価した。

【結果・考察】

DSC の結果より、いずれのポリマーも相転移に伴う吸熱ピークが観察され、P(NIPAAm-co-DMAAm)及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)の吸熱ピーク温度は、それぞれ 37.9°C 及び 37.1°C であった。P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-DOPE の吸熱ピーク温度は、それぞれ 37.6°C及び 38.0°Cであり、DOPE 修飾後のポリマーでも吸熱ピーク値は観察された。修飾前後の吸熱ピーク温度の差は、1°C以内であり、温度応答性ポリマーへの L-tyrosine 及び DOPE 修飾は、温度応答特性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

リポソーム懸濁液の透過率測定の結果より、未修飾リポソーム及び PEG 修飾リポソームは、温度による透過率変化を示さなかった。対して、温度応答性ポリマー修飾リポソームは、40°C付近で透過率の劇的な減少を示した。これは、リポソームに修飾された温度応答性ポリマーが、38°C付近で相転移して疎水性となり、疎水性相互作用によりリポソームが互いに凝集、沈殿し、リポソーム懸濁液中の透過率の低下がもたらされたことによる。また、作製したリポソームの粒径は、25°Cで 130.5~145.1 nm の範囲であり、*in vivo* 細胞取り込みに適したサイズであった。PDI 値は 0.12 以下であり、作製したリポソームが均一なサイズを有することを確認した。

共焦点顕微鏡画像において、42°Cのインキュベートで細胞内へ取り込まれたリポソームは、ライソソームと共局在しており、取り込み経路はエンドサイトーシスである可能性が示唆された。PEG 修飾リポソームや P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームでは、細胞膜への吸着も観察されたのに対し、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、多くがライソソームに局在し、LAT1 に認識されることにより、細胞内取り込みが促進

されることが示唆された。フローサイトメトリー測定においては、未修飾リポソーム、PEG 修飾リポソーム及び P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、LCST 以上及び以下でインキュベートした細胞間で、蛍光強度の有意差は観察されなかった。対照的に、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの蛍光強度は、インキュベーション時間と共に、42°Cで著しく増加した。この結果より、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの細胞内取り込みは、修飾ポリマーの疎水性と LAT1 と末端 L-tyrosine との間の親和性の相乗効果により、促進されることが示唆された。

【総括】

LAT1 によって認識、温度に応答して細胞に取り込まれ、がん細胞に対して高い親和性を有する蛍光性ポリマープローブ及びリポソームを開発した。HeLa 細胞における L-[³H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験の結果は、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が L-[³H]-leucine の取り込みを阻害することを示した。ポリマー末端に修飾した L-tyrosine の α -アミノ基と α -カルボキシル基により、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が LAT1 に認識されることが示唆された。

ポリマーの末端に FL を修飾した蛍光ポリマープローブ、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)ポリマー修飾 CF 内封リポソームは、いずれも LCST 以下での細胞内取り込みは観察されなかった。対照的に、LCST 以上では、細胞内への取り込みが確認された。フローサイトメトリー測定の結果では、LAT1 認識部位を有さない蛍光プローブやリポソームとのインキュベーションに対し、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)ポリマー修飾 CF 内封リポソームは、細胞内で高い蛍光強度を示した。また、LCST 以上でインキュベートした際の蛍光強度は、LCST 以下に対して有意差を示し、ポリマーの疎水性及び LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との親和性の相乗効果が、細胞内取り込みを促進することが示唆された。

LAT1 によって認識され、がん細胞に対して高い親和性を有し、温度に応じて細胞内へ取り込まれるリポソームの開発に成功した。細胞内へ取り込まれたリポソームは、ライソソーム内に局在しており、リポソームが疎水性になり、細胞膜との相互作用によるエンドサイトーシスが生じた可能性が示唆された。開発した LAT1 標的型温度応答性ポリマー修飾リポソームは、LAT1 親和性により高いがん選択性を示し、温度に依存した親水性／疎水性の変化により、細胞内取り込みが調節可能であるため、セラノスティックのための薬物担体として期待される。

LAT1 標的型の温度応答性蛍光ポリマープローブ／薬物キャリアは、LAT1 との親和性及び温度依存的な細胞内取り込みを示し、LAT1 発現に関与する悪性腫瘍及びがん細胞の環境に応答するイメージングや薬物デリバリーに有用であることが示唆された。

論文審査結果の要旨

博士論文提出後、副査 2 名による個人面談（試問）を行った後、博士論文発表会は、平成 31 年 2 月 21 日（木）に、慶應義塾大学薬学部 1 号館マルチメディア講堂において、研究科委員会のメンバー等の出席の下、学内公開の形で実施された。25 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

論文申請者の松浦君は、テルモ株式会社に勤務しながら、当大学院薬学研究科の社会人博士課程の学生として研究を実施してきた。本研究は、がん細胞における発現の増加が報告されている L 型アミノ酸トランスポーター 1 (LAT1) に着目し、診断 (Diagnostics) と治療 (Therapeutics) を融合したセラノスティクス (Theranostics) 技術への応用を目的として LAT1 を標的とした温度応答性蛍光プローブ及び薬物キャリアを開発し、その成果をまとめたものである。

疾患と密に関連した発現制御を受けるトランスポーターは、創薬研究において治療の分子標的としてだけでなく、疾患選択的な薬物移行を設計する上でも大きな役割を果たすことが期待されている。正常細胞とは異なる代謝的特徴をもつがん細胞ではトランスポーターの発現も変化しており、LAT1 などのがん細胞に特異的に発現しているトランスポーターが注目されている。LAT1 は、細胞増殖に必須なアミノ酸をがん細胞に供給する役割を担い、非小細胞性肺がん、脳腫瘍、前立腺がん、乳がんにおいて、LAT1 の高発現群は予後不良であり、がんの悪性度と LAT1 の発現が関連することが示唆されている。さらに多発性骨髄腫の治療に用いるメルファランは L-phenylalanine を基本構造とする抗腫瘍薬であり、がん細胞特異的な LAT1 により細胞内に取り込まれた後、DNA 鎖間または DNA 鎖内架橋形成あるいは DNA-タンパク架橋形成を通して抗腫瘍作用や脊髄抑制作用を示すことが知られている。このようにがんの悪性度と関わり、予後不良因子となることが立証されているトランスポーターの可視化プローブはこれまでになく、創薬研究において治療の分子標的としてだけでなく、疾患選択的な薬物移行の機構解明のためにも重要である。

松浦君は、温度応答性ポリマーにアミノ酸誘導体を導入することで、LAT1 によって認識され、温度に応答して細胞に取り込まれ、がん細胞に対して高い親和性を有する蛍光プローブと薬物キャリアが開発可能であると考えた。LAT1 と親和性の高い L-phenylalanine や L-tyrosine を基盤とするアミノ酸誘導体を導入した温度応答性ポリマーを設計し、温度応答性蛍光ポリマープローブ Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び L-tyrosine 結合温度応答性ポリマー Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) 修飾リポソームを開発した。HeLa 細胞における L-[³H]-leucine の細胞内取り込み阻害実験は、L-tyrosine 結合温度応答性ポリマー Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm) が、L-[³H]-leucine の取り込みを阻害するこ

とを示した。ポリマー末端に修飾した L-tyrosine の α -アミノ基と α -カルボキシル基により、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)が LAT1 によって認識されることが示唆された。

ポリマーの末端に FL を修飾した蛍光ポリマープローブ、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、LCST 以下での細胞内取り込みは確認されなかった。対照的に、LCST 以上では、細胞内取り込みが確認された。フローサイトメトリー測定においては、LAT1 認識部位を有さない蛍光プローブやリポソームに対して、Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)-FL 及び Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームは、高い蛍光強度を示した。また、LCST 以上でインキュベートした際の蛍光強度は、LCST 以下に対して有意差を示し、ポリマーの疎水性及び LAT1 とポリマー末端の L-tyrosine との親和性の相乗効果が、細胞内取り込みを促進することが示唆された。

さらに、抗がん剤の doxorubicin (DOX)を封入した L-tyrosine 結合温度応答性ポリマー Tyr-P(NIPAAm-co-DMAAm)修飾リポソームの培養細胞を用いた *in vitro* 実験の結果より、LAT1 との親和性及び温度依存的な細胞取り込みを示し、温度制御により DOX の抗腫瘍活性を制御可能であることが示された。

以上、本研究では、温度応答性ポリマーPNIPAAm に L-phenylalanine や L-tyrosine を基盤とするアミノ酸誘導体を導入し、LAT1 によって認識、温度に応答して細胞に取り込まれ、がん細胞に対して高い親和性を有する、温度応答性蛍光ポリマープローブ及び温度応答性ポリマー修飾リポソームの開発に成功した。LAT1 標的型の温度応答性蛍光ポリマープローブや薬物キャリアは、LAT1 との親和性及び温度依存的な細胞取り込みを示し、LAT1 発現に関与する悪性腫瘍及びがん細胞の環境に応答するイメージングや薬物デリバリーに有用であることが示唆された。

本論文の内容は査読のある国際学術誌にも掲載されており、博士（薬科学）の学位に値する業績であると判定した。さらに、申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当であり、さらに周辺知識も十分であり、これらに関しても博士（薬科学）の学位に十分値するものと考えられる。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する討議が行われ、松浦みなみ 君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

論文目録

1. 主論文に関する原著論文

➤ Matsuura M.; Ohshima M.; Hiruta, Y.; Nishimura, T.; Nagase, K.; Kanazawa, H.

LAT1-Targeting Thermoresponsive Fluorescent Polymer Probes for Cancer Cell Imaging. *Int. J. Mol. Sci.* 19(6) 1646, **2018**.

- Maekawa M. M.; Fujieda K.; Maekawa, Y.; Nishimura, T.; Nagase, K.; Kanazawa, H. LAT1-targeting thermoresponsive liposome for cancer therapy. *ACS Omega*, *in press*.

2. 参考論文（申請者が著者である、主論文に関する原著論文以外の論文）

- Hiruta, Y.; Shimamura, M.; Matsuura, M.; Maekawa, Y.; Funatsu, T.; Suzuki, Y.; Ayano, E.; Okano, T.; Kanazawa, H. Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *ACS Macro Lett.* 3(3) 281–285, **2014**.
- Hiruta, Y.; Funatsu, T.; Matsuura, M.; Wang, J.; Ayano, E.; Kanazawa, H. pH/temperature-responsive fluorescence polymer probe with pH-controlled cellular uptake. *Sens. Actuators B Chem.* 207, 724–731, **2015**.