

氏名	まえかわ ゆうたろう 前川 祐太郎
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第〇〇号
学位授与の日付	2021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	新たな医療モダリティへの応用を目的とした機能性高分子を用いた分離システムの開発
論文審査委員	(主査) 教授 金澤 秀子 (薬学博士) (副査) 教授 齋藤 義正 (博士(医学)) 准教授 大江 知之 (博士(薬学))

## 論文内容の要旨

### 【背景】

近年、従来の低分子医薬品や抗体医薬品から発展して、より高度かつ複雑な創薬技術及び作用機序を有した医療モダリティが開発されている。核酸医薬品は、オリゴヌクレオチドから構成される、特定の塩基配列や特定のタンパク質を認識して遺伝子発現やタンパク質の機能を制御する医薬品である。従来のモダリティでは対処が難しかった疾患への治療手段として開発されている。また、新たなモダリティとしてエクソソームの研究が進んでいる。エクソソームは、細胞が分泌する細胞外小胞の一種である。がんをはじめ、様々な疾患の病態に深く関与する可能性があり、診断マーカーや予後予測因子としてのバイオマーカー、そして治療標的としての活用が期待されている。

医薬品の製造販売には、品質確保及び安全性の観点から、製造過程で生じる類縁物質・不純物等の分離が求められる。従来より複雑な製造プロセスをもった医療モダリティが開発されるにつれ、これまで以上に品質評価及び管理が重要となる。併せて、生理活性を損なわずに類縁物質を分離可能な分離システムの開発が求められる。本研究では、低分子医薬品から新たな医療モダリティに至る分析対象物質に対して、機能性高分子を用いた分離システムを構築し分析対象物質に温和な条件での新たな分離システムの確立を目指した。

### 検討1:異なる基本骨格を有する化合物の分離を目指した分子認識能を有するグリーンクロマトグラフィーの開発

#### 【目的】

低分子医薬品の製造過程で生じ得る類縁物質・不純物等の分離精製を模した、異なる基本骨格を有する低分子化合物の分離システムの開発を行った。poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を基盤とした高分子修飾充填剤を用いた温度応答性クロマトグラフィーによって、有機溶媒を使用しない分析条件で検討を行った。

## 【方法】

異なる基本骨格を有する低分子化合物の組み合わせには、薬物代謝酵素 CYP に対する臨床試験で汎用される典型基質薬の組み合わせを選択した。PNIPAAm と疎水性モノマーの *n*-butyl methacrylate (BMA) 又は *n*-acryloyl L-tryptophan methyl ester (L-Trp-OMe) とのコポリマーをラジカル開始剤及び連鎖移動剤を用いたラジカル重合により合成した (P(NIPAAm-co-BMA) (IBMA) 及び P(NIPAAm-co- L-Trp-OMe) (ITRP))。L-Trp-OMe は、分子内に NH 基と芳香環を有することから、分析に用いた。合成したコポリマーをアミノプロピルシリカへ修飾させた後、ステンレスカラム (長さ 50 mm×内径 2.1 mm) に充填し温度応答性カラムを作成した。

CYP 典型基質薬を IBMA カラム及び ITRP カラムを用いた温度応答性クロマトグラフィーによって、酢酸アンモニウム緩衝液を移動相 (流速 0.2 mL/min) に、イソクラティック (単一移動相) な溶出条件で分析した。

## 【結果・考察】

IBMA カラム及び ITRP カラムともに、カラム温度の上昇に伴い分析対象物質の保持が強くなる傾向が見られた。カラム温度の上昇によりカラム固定相が親水性から疎水性へと変化し、分析対象物質との相互作用が変化するため、疎水性度が高い分析対象物質ほど温度上昇に伴い保持が強くなったと考えられる。

IBMA カラムではすべての基質薬の分離が不十分であったのに対し、ITRP カラムでは高温において良好な分離がみられた。IBMA 及び ITRP の相転移温度 (lower critical solution temperature: LCST) は、それぞれ 22.1°C 及び 21.4°C であり、BMA 及び L-Trp-OMe モノマーの疎水性度は同程度と推察された。

L-Trp-OMe の分子認識能が、分離の差に寄与していると考えられた。すなわち BMA とは異なり、L-Trp-OMe は分子内に芳香環を有しており、ポリマー内及び分析対象物質それぞれの NH 基又は芳香環との間で、NH- $\pi$  又は  $\pi$ - $\pi$  相互作用が働くことで分離に差が生じたと考えられる。

温度応答性に加え、分子認識能を持たせることで、水系溶媒のみのイソクラティックな溶出条件で、異なる基本骨格を有する複数化合物の分離が可能であった。加えて、CYP 典型基質薬の一斉分析としても応用可能であることが示唆された。

## 検討 2: 静電的特性及び温度応答性を有した環境低負荷型分析技術によるオリゴヌクレオチドの分離精製法の開発

### 【目的】

オリゴヌクレオチドの製造工程では、最終生成物と類似した配列を有する類縁物質が生じ得る。現在上市されている核酸医薬品の多くは生体内での安定性向上のため、リン酸基の O 原子のホスホロチオエート化が行われている (S-Oligo)。現在、S-Oligo を含むオリゴヌクレオチドの分析には、逆相クロマトグラフィー (RPLC) による、有機溶

媒又はイオン対試薬を含んだグラジエント（複数移動相）法が用いられている。イオン対試薬の使用は、分離後に分析対象物質からのイオン対試薬の解離が必要となる。そのため、イオン対試薬を必要としない分離は分析対象物質にとって温和であるが、これまでイオン対試薬を使わず S-Oligo を含む複数のオリゴヌクレオチドを分離した報告はない。さらに水系溶媒のみのイソクラティックな溶出による分離の報告もない。本検討では、カチオン性を有する温度応答性クロマトグラフィーにより、イオン対試薬及び有機溶媒を使用しないイソクラティックな溶出条件での複数オリゴヌクレオチドの分離を行った。

#### 【方法】

カチオン性モノマーである *N,N*-dimethylaminopropylacrylamide (DMAPAAm) を含む P(NIPAAm-*co*-BMA-*co*-DMAPAAm: IBD) ハイドロゲルを修飾した IBD ハイドロゲルシリカを合成し、ステンレスカラム（長さ 50 mm×内径 4.6 mm 又は長さ 100 mm×内径 4.6 mm）に充填し温度応答性カラムを作成した。オリゴヌクレオチドは分子内にリン酸基を持ち、溶液中では負電荷を有しているため、DMAPAAm を導入することで静電的相互作用によりオリゴヌクレオチドを捉えやすくすると考えた。

IBD ハイドロゲルカラムにより、オリゴヌクレオチドの塩基鎖長の違い、一塩基の違い、及び S-Oligo の S 化の数の違いについて一斉分析の検討を行った。移動相はリン酸緩衝液を使用した（流速 1.0 mL/min）。オリゴヌクレオチドの塩基鎖長の違いにおける一斉分析には、デオキシリボースのポリチミン（5, 6, 10, 11, 15, 及び 20 mer、それぞれ dpT5、dpT6、dpT10、dpT11、dpT15、及び dpT20）を用い、一塩基の違いには、デオキシリボースのランダム配列（XTCATCACAC；X=C [dCend], T [dTend], G [dGend], 及び A [dAend]）を用いた。S-Oligo の S 化の数の違いには、デオキシリボースのポリチミン 15 mer 内に分子内に S 化リン酸基が 12 個、13 個、及び 15 個のもの（それぞれ dT15-12S、dT15-13S、及び dT15-14S）を用いた。

#### 【結果・考察】

IBD ハイドロゲル修飾シリカは元素分析により、ポリマー修飾されていることを確認した。また、表面ゼータ電位測定により、DMAPAAm 由来の静電的特性（カチオン性）を有することが確認された。

塩基鎖長の異なるオリゴヌクレオチドの分析では、5~20 塩基鎖長のいずれにおいても温度上昇により保持の増強が確認され、十分な分離が得られた。また、分析中にカラム温度を 50°C から 10°C へ変更（温度グラジエント）することで、分析時間を大幅に短縮することが可能であった（80 分→25 分以内）。

末端一塩基の異なるオリゴヌクレオチドの一斉分析では、すべての分析対象物質は温度上昇により保持の増強が確認され、50°C のカラム温度で最もよく分離された。核酸一塩基の疎水性は、C < G < A < T の順に強くなることが報告されているが、4 つのオリゴヌクレオチドの溶出順序は dCend < dTend < dGend < dAend であり、核酸塩基の疎水性強

度とは異なり、dTend は dGend や dAend よりも強く保持されなかった。IBD ハイドロゲルカラムの DMAPAAm による静電的相互作用が、この溶出順序の違いに寄与していると考えられた。

S-Oligo の分析は、15 塩基長の S 化の数の異なる各 3 つのオリゴヌクレオチドの分析において、イオン対試薬を使用せずに複数 S-Oligo の分離が可能であった。一般に S 化によって疎水性が高くなるが、IBD ハイドロゲルの固定相は、PNIPAAm の相転移により RPLC よりも親水性が高く、S-Oligo の保持に対して適度な強度となり保持が強くならなかったと考えられる。また、DMAPAAm の静電的相互作用とも相まって、単一の S 化数の違いであっても良好な分離が見られたと考えられる。

静電的相互作用を有した温度応答性分離システムによって塩基鎖のわずかな違いを持った複数オリゴヌクレオチドの分離が可能であった。

### 検討 3：温度応答性アフィニティー精製法によるエクソソームの分離精製法の検討

#### 【目的】

がん細胞由来のエクソソームの一部は、がんの転移に関係することが報告されている。がん切除後に、再発・転移が発見されるには画像検査で発見できるほどがんが進行する必要がある。がんが進行する前に体液中のがん細胞由来エクソソームを捕捉、機能を評価できれば、早期治療の開始や予防治療を検討することが可能となりがんの根治的治療につながる可能性がある。つまり、がん細胞由来のエクソソームを生理活性を維持したまま分離することには意義があると考えられる。既存のエクソソーム分離精製法は、エクソソームへのダメージがある、精製度が低いといった課題が残る。本検討では、PNIPAAm を用いた温度応答性アフィニティークロマトグラフィーによるエクソソームの新規分離法の検討を行った。

#### 【方法】

温度応答性ポリマーとして PNIPAAm 及びアフィニティーリガンドとして一部のがん細胞に高発現する human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) を標的としたペプチドリガンドを修飾させた温度応答性アフィニティーシリカを合成し、エクソソームの分離を行った。エクソソームは、HER2 高発現の SK-BR-3 細胞の培養上清より回収した。

温度応答性アフィニティーシリカ及びペプチドリガンドの無い温度応答性シリカを PBS 中で 37°C (高温下) 又は 4°C (低温下) に保ちながら、エクソソームを添加し作用させた。タンパク質濃度によって、シリカへのエクソソーム吸着量を評価した。また PBS 中の HER2 タンパクをウェスタンブロッティングにより検出し、確認した。

#### 【結果・考察】

エクソソームの分離の結果、温度応答性アフィニティーシリカにおいて高温下では低温下に比べ、シリカへの吸着量は有意に多い傾向が見られた。またウェスタンブロッティングの結果、低温下と比較し、高温下の PBS 中では HER2 タンパクは減少していた。

これは、高温下では PNIPAAm が収縮しペプチドリガンドと HER2 タンパクが結合しやすいのに対して、低温下では PNIPAAm が伸長しペプチドリガンド遮蔽効果により HER2 発現エクソソームを捕捉できなかったことに起因したと考えられる。今後、さらに固定相の条件を最適化（静電的特性の付与、修飾量の増加等）することで、温度制御のみによる選択的なエクソソームの分離精製法として期待できる。

#### 【結論】

本研究では、温度応答性高分子 PNIPAAm を基盤とした機能性高分子を用いた分離システムを構築し、従来の医療モダリティである低分子医薬品、近年開発が活発する核酸医薬品、そして新たな医療モダリティとしてエクソソームへの応用を検討した。本システムは、有機溶媒やイオン対試薬・グラジエント溶出（特別なポンプ装置が必要）といった従来の分析条件を必要とせず、分析対象物質にとって温和かつ環境低負荷な条件における新規分析法である。さらに、分析対象物質の特徴に合わせ、分子認識能や静電的相互作用、アフィニティーの特性を付与することが可能であり、既存の医療モダリティに加え今後進化する医療モダリティへも応用性の高い分離システムである。

## 論文審査結果の要旨

2019年7月12日に主査1名と副査2名による中間審査会、2021年1月に博士論文提出後、副査2名による個人面接（試問）がそれぞれ行われており、論文内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。博士論文発表会は、2021年2月24日（水）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などの出席の下、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。

前川君は、第一三共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、脱炭素社会への貢献を目指した Green Analytical Methods の概念に基づいて、温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) を基盤とした機能性高分子を分離担体に応用し、新しい医療モダリティのための Green Chromatography による分離方法を開発した成果をまとめたものである。

現在、広く用いられている低分子医薬品、特に薬物代謝に重要な酵素である Cytochrome P450 (CYP) の基質となる複数の骨格の異なった薬物の分離について検討した。アミノ酸誘導体により分子認識能を付与した温度応答性クロマトグラフィーを用いることで、移動相に有機溶媒を使用せず、グラジエント分離法も用いずに、水系の単

一移動相のみで分離が可能となった。CYP 典型基質薬の一斉分析としても応用可能であり、製薬企業で用いられる分離法としても期待される。

次に、前川君は、最近注目されている中分子医薬品の1つである核酸医薬品に着目し、静電的特性及び温度応答性を有した環境低負荷型分析技術によるオリゴヌクレオチドの分離精製法を開発した。核酸医薬品の多くは生体内での安定性向上のため、リン酸基のO原子のホスホロチオエート化が行われている（S-Oligo）が、疎水性が高いため従来法では、有機溶媒及びイオン対試薬を含んだグラジエント溶出法が用いられており、煩雑である。本研究では、イオン対試薬及び有機溶媒を使用しないイソクラティックな溶出条件での塩基鎖のわずかな違いを持った複数オリゴヌクレオチドの分離を達成した。近年、ほとんど進歩のなかった核酸分離法に一石を投じる手法としても大いに評価できる。

さらに、以上の分離法の成果を踏まえて、温度応答性アフィニティー法によるエクソソームの分離精製法の開発について検討した。エクソソームは、がんをはじめ、様々な疾患病態に関与する可能性があり、バイオマーカーや治療標的としての活用が期待されている。本研究では、PNIPAAm 及びアフィニティーリガンドとして一部のがん細胞に高発現する human epidermal growth factor receptor 2（HER2）を標的としたペプチドリガンドを修飾させた温度応答性アフィニティー担体を開発し、HER2 高発現の SK-BR-3 細胞の培養上清より回収したエクソソームの分離により評価した。HER2 標的ペプチドリガンドを用いた温度応答性アフィニティー精製法により、温度変化により HER2 発現エクソソームの吸脱着が可能であることが示された。本法は、温和な条件で分離可能であることから、エクソソームの新規分離精製法として期待される。

本研究は、低分子医薬品、近年開発が活発化する核酸医薬品、そして新たな医療モダリティとしてエクソソームの分離について、温度応答性高分子 PNIPAAm を基盤とした機能性高分子を用いた新しい分離システムを構築し、それぞれ分子認識能、静電的相互作用、およびアフィニティーの特性を付与して応用した。本研究で開発した分離法は、従来法で用いていた有機溶媒やイオン対試薬・グラジエント溶出を必要とせず、分析対象物質に対し温和であり、環境低負荷な条件で分離可能であることから様々な医療モダリティへの応用性の高い分離システムとして評価できる。

本論文の内容は査読のある国際学術誌に2報の論文が掲載されており、博士（薬学）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、前川 祐太郎 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

### 【主論文に関する原著論文】

1. Yutaro Maekawa, Naoya Okamoto, Yuji Okada, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. Green Analytical Method for the Simultaneous Analysis of Cytochrome P450 Probe Substrates by poly(*N*-isopropylacrylamide)-based Temperature-Responsive Chromatography. *Sci Rep.* **10(1):8828, 2020.**
2. Yutaro Maekawa, Kaichi Yamazaki, Miwa Ihara, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. Simultaneous Analysis of Multiple Oligonucleotides by Temperature-Responsive Chromatography Using a poly(*N*-isopropylacrylamide)-based Stationary Phase. *Anal Bioanal Chem.* **412 :5341–5351, 2020.**

### 【参考論文】

1. Yuki Hiruta, Mirai Shimamura, Minami Matsuura, Yutaro Maekawa, Takaaki Funatsu, Yuichi Suzuki, Eri Ayano, Teruo Okano, Hideko Kanazawa. Temperature-Responsive Fluorescence Polymer Probes with Accurate Thermally Controlled Cellular Uptakes. *ACS Macro Lett.* **3, 281–285, 2014.**
2. Minami Maekawa-Matsuura, Kei Fujieda, Yutaro Maekawa, Tomohiro Nishimura, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. LAT1-Targeting Thermoresponsive Liposomes for Effective Cellular Uptake by Cancer Cells. *ACS Omega* **4(4):6443-51, 2019.**
3. Yutaro Maekawa, Eri Ayano, Kenichi Nagase, Hideko Kanazawa. Effective Separation for New Therapeutic Modalities Utilizing Temperature-Responsive Chromatography. (Review), *Anal Sci*, **2021**, in press.