

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	前川 祐太郎
<p>主 論 文 題 名： 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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>【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。</p> <p>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。</p> <p>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</p> <p>【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(<i>N</i>-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。</p> <p>【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 <i>n</i>-butyl methacrylate (BMA) 又は <i>n</i>-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。</p> <p>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。</p>			

【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換し、分析対象物質との相互作用が変化するため、疎水性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- π 又は π - π 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。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つたと考えられる。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ト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トティングの結果、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つ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。