

氏 名 吉野 芙美

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 博士甲第 851 号

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

学位授与年月日 令和元年 9 月 1 1 日

学位論文題目 Preferential tumor accumulation of polyglycerol functionalized nanodiamond conjugated with cyanine dye leading to near infrared fluorescence in vivo tumor imaging

(近赤外蛍光 in vivo 腫瘍イメージングにつながるポリグリセロール修飾ナノダイヤモンド-シアニン色素複合体の優先的な腫瘍集積)

審査委員 主査 教授 河内 明宏

副査 教授 目良 裕

副査 教授 縣 保年

論文内容要旨

*整理番号	859	(ふりがな) 氏名	よしの ふうみ 吉野 芙美
学位論文題目	Preferential tumor accumulation of polyglycerol functionalized nanodiamond conjugated with cyanine dye leading to near infrared fluorescence in vivo tumor imaging		
<p>➤ 研究の目的</p> <p>悪性腫瘍の局在診断および治療において、薬剤を腫瘍に優先的に送達することができれば、診断精度の向上と副作用の低減につながる。数十から百ナノメートル程度の大きさのナノ粒子は、EPR 効果によって腫瘍に集積することが知られており、その性質を利用した診断薬および治療薬の開発に向けて、広く研究が行われている。しかし、実際生体内に投与されると、細網内皮系で捉えられて肝臓から排出されてしまい、EPR 効果のみで十分な腫瘍集積が得られることは少ない。EPR 効果を高めるためには、より長く血中に滞留する必要がある、そのためには補体や抗体などのタンパクとの非特異的な吸着を起こしにくい表面修飾が重要である。ポリグリセロール (PG) によるナノ粒子の表面修飾は、一般的なポリエチレングリコール (PEG) による表面修飾よりも厚い固定水和相を形成することから、より高い血中滞留性を持ち、腫瘍に効率的に集積することが期待される。そこで、本研究では、50 nm の粒径をもつナノダイヤモンド (ND) を PG によって表面修飾した ND-PG を、蛍光色素である Cyanin7 (Cy7) で標識した ND-PG-Cy7 を新規合成し、ND-PG-Cy7 の血中滞留性と腫瘍集積について、in vivo で検証を行った。</p> <p>➤ 方法</p> <ul style="list-style-type: none"> ● <u>ND-PG-Cy7 の合成</u> <p>平均 50 nm のサイズをもつ ND に PG を共有結合させた。我々が以前に報告した手順に従って、PG 上のいくつかのヒドロキシル基 (OH) をアジド基 (N₃) で置換し、続いてアミノ基 (NH₂) に還元した。このようにして調製した ND-PG-NH₂ を、暗所で Sulfo-Cy7 NHS エステルと反応させることにより Cy7 と共役させた。</p> ● <u>ND-PG-Cy7 の血中動態</u> <p>マウスに ND-PG-Cy7 を静脈内投与後、あらかじめ決められたタイミングで尾静脈から採血を行った。蛍光分光光度計を用いて血液検体の蛍光強度を測定し、検量線に基づいて Cy7 濃度を算出、血中濃度として記録した。</p> 			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等を用いて印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

- ND-PG-Cy7 の in vivo imaging および ex vivo imaging

GFP/HeLa 細胞を皮下移植した担癌マウスに ND-PG-Cy7 または PBS を静脈内投与し、in vivo 蛍光イメージング装置を用いて投与後 8 日目まで撮像を行った。また、別の担癌マウスを用いて ND-PG-Cy7 または PBS を投与後 3 日目に ex vivo imaging を行った。

- ND-PG-Cy7 の腫瘍内集積に関する組織学的検討

GFP/HeLa 細胞を皮下移植した担癌マウスに ND-PG-Cy7 または PBS を静脈内投与し、3 日後に腫瘍組織を摘出、凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

➤ **結果**

ND-PG-Cy7 の血中濃度半減期は 58 時間であった。

In vivo imaging では、ND-PG-Cy7 は腫瘍組織に著明な集積を認め、8 日間の観察期間にわたって増強し続けた。頭頸部および腋下のリンパ節にも集積を認めたが、他の正常臓器には目立った集積は認めなかった。Ex vivo imaging においても、ND-PG-Cy7 は正常臓器にも弱い集積を認めたものの、腫瘍からの蛍光が圧倒的に強かった。in vivo および ex vivo imaging で ND-PG-Cy7 の腫瘍への集積を確認した後、腫瘍組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、ND-PG-Cy7 は GFP/HeLa の細胞集塊を取り巻く腫瘍間質に集積していることがわかった。

➤ **考察**

今まで報告されているナノ粒子の血中半減期は、長くても 20 時間程度のものがほとんどであり、58 時間という血中半減期は非常に長く、ND-PG-Cy7 の血中滞留性の高さが証明された。長時間血中に留まることで、新生血管から腫瘍組織へと徐々に漏れ出し、腫瘍組織に集積していった結果、in vivo imaging で腫瘍がはっきりと描出されたと考えられる。ND-PG-Cy7 の多くが肝臓で捕捉され、胆汁を介して腸管に排出されているとすれば、肝臓と消化管は他の臓器よりも強い蛍光を発するはずであるが、ex vivo imaging ではそれらの臓器にそれほど目立った集積は認めなかった。それは、ND-PG-Cy7 のステルス性が高く、細網内皮系で捕捉されにくいためと考察される。また、ND-PG-Cy7 には腫瘍に特異的に集積する分子は含まれないことから、腫瘍に集積したのは純粋に EPR 効果によるものと考えられる。組織学的検討では、ND-PG-Cy7 は癌細胞の集塊を取り囲む腫瘍間質に集積していた。腫瘍間質は、癌の浸潤・転移に深くかかわっていると考えられており、PG 修飾したナノ粒子が腫瘍間質に集積するという今回の結果は、腫瘍間質をターゲットとした新たな画像診断や治療へとつながる可能性がある。

➤ **結論**

PG 修飾したナノダイヤモンドは、優れた血中滞留性を持ち、EPR 効果によって優先的に腫瘍組織に集積する。PG 修飾は ND 以外の様々なナノ粒子に適用できることがすでに報告されており、本研究で得られた知見は、腫瘍の診断と治療のためのナノ材料設計に寄与するものと考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	859	氏名	吉野 芙美
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨) ※明朝体 11ポイント、600字以内で作成のこと</p> <p>本論文は、悪性腫瘍の局在診断および治療におけるナノ粒子の効果を高めるための表面修飾としてポリグリセロール (PG) を用いることを考案し、ナノダイヤモンド (ND) を PG によって表面修飾した ND-PG を、蛍光色素である Cyanin7 (Cy7) で標識した ND-PG-Cy7 の血中滞留性と腫瘍集積について検討し、以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none">1) マウスに ND-PG-Cy7 を静脈内投与すると、ND-PG-Cy7 の血中半減期は 58 時間と過去のナノ粒子の血中半減期の報告より 3 倍以上長かった。2) GFP/HeLa 細胞を皮下移植した担癌マウスに ND-PG-Cy7 を静脈内投与し、In vivo imaging を行うと ND-PG-Cy7 は主要組織に著明な集積を認め、8 日間の観察期間にわたって増強し続けた。頭頸部および腋窩リンパ節にも集積を認めたが、他の正常臓器には目立った集積は認めなかった。3) Ex vivo imaging においても ND-PG-Cy7 は正常臓器にも弱い集積を認めたものの、腫瘍からの蛍光が圧倒的に強かった。4) 腫瘍組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、ND-PG-Cy7 は GFP/HeLa の細胞集塊を取り巻く腫瘍間質に集積していた。 <p>本論文は、PG 修飾したナノダイヤモンドが優れた血中滞留性を持ち、優先的に腫瘍組織に集積することを明らかにしたもので、本領域の研究に新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士 (医学) の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">(総字数 545 字) (平成 31 年 8 月 30 日)</p>			