

論文の内容の要旨

光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は、腫瘍組織に集積した光増感剤に光を照射し、得られた一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) で細胞死を誘導するがん治療法である。しかし、正常組織よりも低酸素環境にある腫瘍組織においては $^1\text{O}_2$ 生成効率が低く、PDT 効果が制限される。その課題を改善するため、① O_2 を直接送達する方法、② 腫瘍組織に豊富に存在する H_2O_2 を不均化して O_2 を作り出す方法が提案されている。本研究は、 O_2 輸送ヘムタンパク質であるヘモグロビン (Hb)、ヘムを酸化した O_2 輸送能を持たないメト Hb (metHb)、 H_2O_2 不均化酵素であるカタラーゼ (Cat) に、光増感剤 [プロトポルフィリン IX (PP)] 内包ヒト血清アルブミン (HSA) を結合したタンパク質クラスターを合成し、 O_2 供給能が PDT 活性に及ぼす効果を明らかにすることを第一の目的とした。さらに、ヘムタンパク質-HSA 複合体を亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnP) で再構成し、その PDT 活性も解明した。また、白血病治療薬である L-アスパラギナーゼ (ASP) にポリオキサゾリン (POx) を結合した POx-ASP を合成し、その抗がん活性、免疫原性を明らかにすることを第二の目的とした。

第 1 章は序論である。PDT の原理、臨床応用されている光増感剤、 O_2 供給能や腫瘍集積性を有する機能性光増感剤の開発について概説している。

第 2 章では、Hb-HSA₃ の HSA 部位に PP を結合した Hb-(HSA-PP_{0.7})₃ の合成、光化学特性、PDT 活性について述べている。予想に反し、metHb-(HSA-PP_{0.7})₃ は Hb-(HSA-PP_{0.7})₃ より高い PDT 活性を示し、metHb の H_2O_2 不均化能が PDT に有効であることが示唆された。

そこで第 3 章では、さらなる PDT 活性の増強を目指して Cat-(HSA-PP)₅ を合成し、その PDT 活性を解明した。期待通り、Cat-(HSA-PP)₅ の PDT 活性は metHb-(HSA-PP_{0.7})₃ よりも高く、 H_2O_2 不均化能が高いほど PDT 効果を向上させることが明らかとなった。

第 4 章では、分子内架橋 Hb-HSA₃ (XHb-HSA₃) のヘムを ZnP で置換した ZnXHb-HSA₃ の合成と PDT 活性について記述している。ヘムを除去した apoXHb-HSA₃ は生理条件下で安定であり、高効率に再構成できることを見出した。

第 5 章の前半では、*Pichia* 酵母を用いてミオグロビン (Mb) と HSA を連結した Mb-HSA 融合タンパク質の産生と O_2 結合能についてまとめている。ヘムタンパク質-HSA 融合タンパク質は世界初の報告例である。後半では、ZnP で再構成した ZnMb-HSA の PDT 活性について述べている。

第 6 章では、PEG 代替物として期待されている POx を ASP に結合した POx-ASP の合成、酵素活性、抗がん活性、免疫原性について述べている。POx-ASP は免疫原性の低い白血病治療薬となることが明らかとなった。

第 7 章は本論文の総括と将来展望である。

以上のように本論文では、タンパク質からなるがん治療薬の合成と抗がん活性に関する多くの成果が詳細にまとめられている。いずれも抗腫瘍効果を向上するための重要な知見といえる。

論文審査の結果の要旨

1. 論文の主題

Synthesis of Protein-Based Photosensitizer for Cancer Therapy

(タンパク質からなるがん治療用光増感剤の合成)

2. 当該研究分野における位置付け

光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は臨床応用されているがん治療法の一つである。しかし、腫瘍組織は O_2 濃度が低いため細胞障害性の一重項酸素 (1O_2) を生成しにくく、PDT に対して抵抗性を示す。近年、 O_2 供給能と光増感能を併せ持つ製剤の開発が注目されている。また、ポルフィリンを基本骨格とする多くの光増感剤は疎水性が強く、水中で凝集するため、生体への直接投与が難しい。ヘモグロビン (Hb) は赤血球に含まれる O_2 輸送ヘムタンパク質であり、カタラーゼ (Cat) は H_2O_2 を不均化して O_2 を生成する強力な酵素である。本研究では、①Hb、酸化したメト Hb (metHb)、Cat にヒト血清アルブミン (HSA) を結合して得た Hb-HSA₃、metHb-HSA₃、Cat-HSA₅ の HSA 部位に光増感剤 [プロトポルフィリン IX (PP)] を内包した Hb-(HSA-PP_{0.7})₃、metHb-(HSA-PP_{0.7})₃、Cat-(HSA-PP)₅ を合成し、その PDT 活性を明らかにした。また、②ヘムタンパク質の再構成技術を活用し、ポルフィリンの可溶化を試みた。Hb-HSA₃ およびミオグロビン (Mb) -HSA 融合タンパク質のヘムを亜鉛プロトポルフィリン (ZnP) に置換し、その PDT 活性を評価した。③白血病治療薬として認可されている L-アスパラギナーゼ (ASP) は高い治療効果を発揮するものの、異種タンパク質であるため免疫反応による副作用が懸念される。ASP の分子表面に水溶性高分子ポリオキサズリン (POx) を結合した POx-ASP を合成し、その抗がん活性および免疫原性を明らかにした。

成果①②は、PDT の治療効果を向上させる要因を明示するとともに、これまで使用できなかった光増感剤の PDT への応用を加速させるものである。成果③は、安全性の高い白血病治療薬の実現、免疫原性を持たないタンパク質製剤の開発における基盤技術である。いずれもタンパク質の多様な機能を利用したがん治療薬の合成アプローチに新たな指針を示す重要な知見といえる。

3. 論文の構成

本論文は、以下の 7 章で構成されている。

- 第 1 章 序論
- 第 2 章 プロトポルフィリン IX 結合 (ヘモグロビン-アルブミン) クラスターの合成と PDT 活性
- 第 3 章 プロトポルフィリン IX 結合 (カタラーゼ-アルブミン) クラスターの合成と PDT 活性
- 第 4 章 (亜鉛置換ヘモグロビン-アルブミン) クラスターの合成と PDT 活性
- 第 5 章 亜鉛置換ミオグロビン-アルブミン融合タンパク質の合成と PDT 活性
- 第 6 章 ポリオキサズリン結合 L-アスパラギナーゼの合成と抗がん活性
- 第 7 章 結論と将来展望

4. 論文の独自性や成果

低分子医薬品に比べ、タンパク質からなるがん治療薬は安全性と有効性の向上が期待される。本研究では、O₂ 供給能を有するタンパク質光増感剤(3 種類)と再構成ヘムタンパク質-HSA 複合体からなるタンパク質光増感剤(2 種類)を合成し、PDT への応用を試みた。さらに、安全性の高い白血病治療薬を合成した。本論文は、それら 6 種類のがん治療薬に関するまとめである。業績の詳細は、以下の 3 点に要約される。

- 1) O₂ 輸送能を持つ Hb-(HSA-PP_{0.7})₃、O₂ 輸送能を持たない metHb-(HSA-PP_{0.7})₃、H₂O₂ 不均化能を有する Cat-(HSA-PP)₅ を合成した。これらの光化学特性は同等であったが、PDT 活性は Hb-(HSA-PP_{0.7})₃ < metHb-(HSA-PP_{0.7})₃ < Cat-(HSA-PP)₅ の順に向上した。metHb は弱い H₂O₂ 不均化能を持つ。O₂ 輸送よりも H₂O₂ の不均化が PDT に有効であり、H₂O₂ 不均化能が高いほど PDT 活性が向上することが明らかとなった。
- 2) *Pichia* 酵母を宿主として Mb-HSA 融合タンパク質発現系を構築した。ヘムタンパク質-HSA 融合タンパク質は世界初の報告例となった。酸-ブタン法を用いて分子内架橋 Hb-HSA₃ (XHb-HSA₃) と Mb-HSA からヘムを除去した後、ZnP で再構成した ZnXHb-HSA₃ と ZnMb-HSA を調製した。これらは生理条件下で安定であり、PDT へ応用可能であることが明らかとなった。
- 3) ASP の分子表面に 10 本の POx を結合した POx-ASP を合成した。POx-ASP の酵素活性は ASP の約 60% を保持していた。細胞実験から POx 結合後も抗がん活性に変化はないことがわかった。また、動物実験により POx-ASP は抗 ASP および抗 POx 抗体を産生せず、免疫原性がきわめて低いことが実証された。POx-ASP は副作用の小さい白血病治療薬となる。

5. 論文の課題

著者は、ユニークな計 5 種類のタンパク質光増感剤を合成し、*in vitro* における PDT 活性を評価した。今後、*in vivo* における安全性と有効性の検証を行う必要がある。また、本論文で用いた PP や ZnP は可視光で励起しているため、より生体透過性の高い長波長域の光で励起可能な光増感剤との組合せが望ましい。遺伝子組換え技術を用いて HSA のヘムポケットを改変すれば、長波長域に吸収帯を有するフタロシアニン類も利用できると考えられる。一方、POx-ASP は工業的スケールでの合成法を確立するとともに、動物実験における有効性評価、臨床試験を早急に実施する必要がある。

6. 論文の評価

本論文は、タンパク質光増感剤および白血病治療薬の開発において、大きな一歩となる研究成果のまとめといえる。当該分野における学術的貢献度はきわめて高く、本論文が博士(工学)の学位論文として価値のあるものと認める。また、2023 年 2 月 13 日、論文内容とそれに関連した事項についての諮問を行った結果、合格と認定した。