

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	葉酸受容体 α 型に高親和性のペプチド修飾葉酸化合物の調製
Title(English)	Preparation of peptide-modified folate compounds with higher affinity to folate receptor α .
著者(和文)	ダルマティ ルーパ
Author(English)	Roopa Dharmatti
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11265号, 授与年月日:2019年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:山村 雅幸,瀧ノ上 正浩,小野 功,関嶋 政和,小畠 英理,伊藤 嘉浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11265号, Conferred date:2019/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)
Doctoral Program

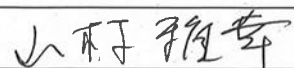
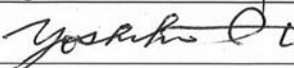
論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Computational
Department of intelligence and systems science 専攻

学生氏名 : Dharmatti Roopa
Student's Name

申請学位 (専攻分野) : 博士 (Engineering)
Academic Degree Requested Doctor of

指導教員 (主) : 
Academic Supervisor (main)
指導教員 (副) : 
Academic Supervisor (sub)

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx. 2000 Japanese Characters)

がんは人類にとって最も深刻な疾病の一つである。がんの効果的な治療方法の開発は、現代医療にとって世界的な課題である。申請者はこうした問題意識に鑑み、葉酸および葉酸受容体に着目し、独自の手法により新規の抗がん剤送達システムの開発を行ってきた。

膜結合型の葉酸受容体 (Folate Receptor: FR) は、がん細胞などの腫瘍細胞表面に過剰発現している。がん細胞は活発な細胞分裂のために、より多くの葉酸を栄養源として取り込む必要があり、FR を細胞表面に過剰発現しており、エンドサイトーシスにより葉酸を細胞内部に取り込む。そのため、葉酸に抗がん剤等の薬剤を結合させ、薬剤送達システム (drug delivery system: DDS) が開発されてきた。しかしまだその効果は不十分である。そのため、葉酸にさらなる FR 指向性を付与できれば、がん細胞特異的な薬剤キャリアーを創成できる可能性がある。申請者は、葉酸をペプチド修飾することにより FR 特異性を付与した葉酸ペプチド化合物の調製に取り組んだ。

第 1 章では、現在行われているがん治療方法を紹介しつつ、FR を標的としたがん治療薬開発の状況について説明している。がんの標準治療方法は、手術・抗がん剤治療・放射線治療の 3 種類の他に、最近では第 4 の治療方法として、抗体医薬品が主流となりつつある。また、抗体に抗がん剤等の抗腫瘍薬剤を結合させた、薬剤結合抗体 (ADCs) についても言及している。しかし、抗体医薬品も万能ではなく、その長所と短所が説明されている。すなわち、抗体医薬品は標的分子に対する高い特異性による優れた薬効と、副作用が少ないという長所を持つ一方、バイオ医薬品製造のための高価なコストが社会問題化しつつあることを指摘している。また、IgG 抗体の巨大な分子量に由来する、調製の際に不均一な試料が、抗体医薬品の腫瘍細胞への低い浸透性や、免疫原性などの問題点についても指摘している。そこで、それらの問題点を解決する方法として、有機化学合成可能な、ペプチド結合化合物 (PDCs) の調製について述べられている。ペプチド結合化合物は、低～中分子化合物であるため、有機化学合成による低コスト調製が可能であり、腫瘍細胞への高浸透性、低免疫原性など、抗体医薬品と比較して、様々な長所を有することが説明されている。また、ペプチド配列を最適化することにより、標的分子への親和性を制御可能であることが説明されている。そこで本研究では、FR を標的とした、ペプチド結合葉酸化合物を開発することが説明されている。

第 2 章では、FR の大量調製について述べられている。ペプチド結合葉酸化合物と FR との親和性測定のためには、FR を大量に調製する必要がある。しかし、FR は分子内部に 8 箇所のジスルフィド結合を有するため、大腸菌での調製は一般に困難と考えられ、その報告はなかった。現在までに、FR の異性体である FR α および FR β の大量調製については、動物細胞や昆虫細胞による報

告があるだけであった。一方で、調製コストの点で大腸菌による FR の調製が可能であることが望ましい。そこで、FR 分子内部 8 箇所のジスルフィド結合の正しい形成を可能にする、高度なリフォールディング方法の開発と、実際に FR α および FR β についての調製について述べられている。調製した FR の活性を評価するため、Biolayer Interferometry (BLI)法により、葉酸との結合を測定したことが説明されている。その結果、FR の葉酸に対する平行解離定数 K_d は、 10^{-9} ほどであり、文献値と同等であることが確認されたことが述べられている。

第 3 章では、ペプチド結合葉酸化合物の実際の調製について述べられている。ペプチド部分を固相合成後、葉酸と結合させる方法について説明されている。具体的には、コンピューターシミュレーションにより設計したペプチドを実際に合成する際に、非天然アミノ酸である azidophenylalanine (AzPhe)を導入し、クリック反応により、葉酸が導入されている。葉酸には Propargyl 基または Dibenzocyclooctyne (DBCO)基を結合させ、ペプチド内の AzPhe への結合を試みたことが述べられている。結果として、葉酸-DBCO だけがペプチドとの結合に成功したことと、その理由についての考察がなされている。さらに、BLI 測定のために、ペプチドの N 末端に NHS-PEG₂₄-biotin を結合させたことが述べられている。これらの化合物と FR との親和性を BLI により測定した結果、FR α への K_d が 10 倍程度向上した化合物の取得に成功したことが述べられている。

第 4 章では、本研究についての結論と、今後の展望について述べられている。今回の研究で、世界で初めて、大腸菌由来の活性型葉酸受容体が調製されたことが述べられている。また、クリック反応により、葉酸とペプチドの結合化合物の調製にも成功したことが述べられている。これらの試料を用い、葉酸結合ペプチドの葉酸受容体への親和性測定を行い、親和性が向上した化合物の取得に成功したことが述べられている。今後の展望としては、ペプチド配列の最適化により、FR α への親和性が FR β よりも高くなれば、FR α を高発現している腫瘍細胞への選択的な薬剤送達が可能になると推察している。その際に、抗腫瘍薬剤を酸性 pH 感受性の自己切断性リンカー等で葉酸ペプチド化合物に結合させておけば、酸性環境下の腫瘍細胞に抗腫瘍剤を送達後、リリースすることが可能になるといった、申請者の新規構想についても述べられている。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

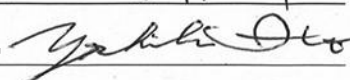
論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Computational intelligence and systems science
Department of , 専攻

学生氏名 : Dharmatti Roopa
Student's Name

申請学位 (専攻分野) : 博士 (Engineering)
Academic Degree Requested Doctor of)

指導教員 (主) : 山本雅幸
Academic Supervisor(main)
指導教員 (副) : 
Academic Supervisor(sub)

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

The development of an effective cancer treatment is worldwide concern for modern medicine. Folate receptors (FRs) are membrane receptors that overexpressed on cancer cells. Therefore, if anticancer drugs are conjugated with folate, excellent anticancer drug delivery systems (DDS) can be establish. However, the previous conjugates have not been enough. In this thesis, the author tried to enhance the affinity by conjugation with peptides.

Chapter 1 introduces current trend in cancer therapies. Surgery, chemotherapy and radiation are standard treatment available. Recently, antibody and the drug conjugates (ADCs) are popular mainstream for cancer therapy. However, large size antibody has a limitation for tumor penetration and production cost. To overcome the problem, peptide-based drug conjugates (PDCs), which is small size, synthesized with low cost, and enhances tissue penetration, are attracting attention. In this thesis, folate-conjugated peptides with enhanced affinity towards FR were prepared.

Chapter 2 explains mass production of FRs in cost effective manner. For binding affinity study between FRs and folate-peptides requires huge amount of FRs. We overexpressed FR α and FR β using *Escherichia coli*. Although, FRs contains 8 disulfide bonds, the purified FRs can be refolded as active forms with a few milligrams.

Chapter 3 describes the synthesis of folate conjugation with peptides via click chemistry. The peptides, designed by computer simulations, were synthesized using the solid phase synthesis method and coupled with folate. Further, peptides were modified at N-terminal with biotin-PEG₂₄ for real time binding assay, biolayer interferometry, to determine association rate constant (k_a) and dissociation rate constant (k_d). As a result, it was demonstrated that the binding affinity of folate to FR increased by the peptide conjugation.

Chapter 4 provides conclusion and future vision of selective drug delivery to FR α . It is suggested that the binding affinity of selected peptide with FR α higher than FR β is desirable. Also, it is proposed that initiative measures for drug release in tumor acidic microenvironment or endosome pH with aid of self-immolative linker between drug and FA-peptides are discussed.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).