

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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第		号	学位申請者氏名		Dharmatti Roopa	
論文審査 審査員		氏 名		職 名		氏 名	職 名
	主査	山村 雅幸		教授		小畠 英理	教授
	審査員	瀧ノ上 正浩		准教授	審査員	伊藤 嘉浩	特定教授
		小野 功		准教授			
		関嶋 政和		准教授			

論文審査の要旨（2000 字程度）

がんは人類にとって最も深刻な疾病のひとつである。特に、日本では高齢化社会の急速な進行に伴い、生涯のうち二人に一人ががんに罹患すると言われており、1980 年代から、死亡原因の第一位となっている。そのため、がんの効果的な治療方法の開発は、現代医療にとって最重要な課題である。本論文で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、独自の手法による新規の抗がん剤送達システムの開発について述べている。膜結合型葉酸受容体 (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。また、葉酸と FR との平衡解離定数 K_d は $10^{-9} \sim 10^{-11} \text{M}$ と小さい。そのため、葉酸に抗がん剤等の薬剤を結合させれば、優れた薬剤キャリアーになる。さらに、葉酸に FR 指向性を増強できれば、がん細胞特異的な薬剤キャリアーを創成でき、抗がん剤の優れた薬剤送達システム (drug delivery system: DDS) を確立できる。本論文は、こうした葉酸受容体の薬剤ターゲットとしての可能性に着目し、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関する研究について述べたもので、“Preparation of peptide-modified folate compounds with higher affinity to folate receptor α” (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) と題し、英文 4 章からなる。 第 1 章 “General introduction on folate receptor targeting” では、現在行われているがん治療方法を紹介しつつ、葉酸受容体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、抗体医薬品によるがん免疫療法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、その長所と短所を説明している。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、比較的軽度な副作用を示すという長所を持つ一方、巨大な分子量 (約 150,000) を持つ IgG 抗体を基にした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、調製時の不均一な試料による、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、低免疫原性などの、抗体医薬品と比較して、様々な長所を有することを説明している。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を説明している。その事例として、現在までに著者の所属研究室では、進化分子工学を用いたキナーゼ阻害剤の開発などの実績があることから、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としたと説明している。 第 2 章 “Preparation of folate receptors” では、葉酸受容体 (FR) の大量調製について述べている。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としている。現在までに、FRα および FRβ 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と述べている。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 FRα および FRβ についての調製について述べている。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を説明している。その結果、FR の葉酸に対する平衡解離定数 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と述べている。

第3章 “Enhancement of binding affinity of folate to its receptor α by peptide conjugation” では、ペプチド結合葉酸化合物の調製法と FR α に対する親和性について述べている。まず調製のために葉酸には Propargyl 基または Dibenzocyclooctyne (DBCO) 基を結合させ合成する方法を述べている。合成された葉酸-Propargyl 化合物または葉酸-DBCO 化合物を、Click 反応により、アジド基を介してペプチドへ導入するために、まず azide-phenylalanine (AzPhe) との反応を検討したことを述べている。結果として、葉酸-DBCO だけがペプチドとの結合に成功したと、その理由についての考察がなされている。そこで、コンピューターシミュレーションにより設計した AzPhe を含有するペプチド配列を固相法で合成し、このペプチドに葉酸-DBCO を結合させる方法について説明している。さらに、BLI 測定のために、ペプチドの N 末端に NHS-PEG₂₄-biotin を結合させたことを述べている。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と述べている。

第4章 “Summary and future outlook” では、本研究についての結論と、今後の展望について述べている。今後は、このように FR α に高い結合性をもつペプチド複合体と低分子抗がん剤を、スパーサー分子を介して結合させ、新しい PDC としての展開が期待できることが記載されている。

以上を要するに、本論文は抗がん剤の優れた薬剤送達システムの開発のために、葉酸受容体の薬剤ターゲットとしての可能性に着目して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ついて述べたものであり、工学上貢献するところが大きい。よって博士（工学）の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意：「論文審査の要旨及び審査員」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。