

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	pH応答性ポリベタイン修飾脂質ナノ粒子のマイクロ流体デバイスによる調製と分子量の最適化
Title(English)	
著者(和文)	本間啓太郎
Author(English)	Keitaro Homma
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12900号, 授与年月日:2024年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:西山 伸宏,三浦 裕,小畠 英理,小倉 俊一郎,藤枝 俊宣,柳田 保子
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12900号, Conferred date:2024/9/20, 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

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	ライフエンジニアリング コース	系	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	20D48163		審査員主査： Chief Examiner	西山伸宏

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx. 2000 Japanese Characters)

本論文は「pH 応答性ポリペプチド修飾脂質ナノ粒子のマイクロ流体デバイスによる調製と分子量の最適化」と題して、pH 応答性を有するポリペプチドで修飾された siRNA 内包脂質ナノ粒子 (LNP) に関し、マイクロ流体デバイスを用いた調製法およびポリペプチドの分子量について、物性評価および *in vitro* での機能評価による最適化検討を行っており、全 3 章から構成されている。

第 1 章は序章であり、LNP およびポリペプチドの性質を中心に、本研究に至る背景と研究目的が述べられている。siRNA を用いた RNA 干渉療法は、細胞内の mRNA を標的とするため、既存のモダリティでは対応できない疾患が克服できる可能性がある点で革新的であり、がんなどの治療に於いてその有効性が大きい期待されている。しかし、siRNA は血中で極めて不安定であるため、それらの全身投与に至っては siRNA をポリエチレングリコール等で被覆した LNP へ内包する手法が検討されてきた。ポリエチレングリコールによる修飾は、血中タンパクや免疫細胞による捕捉を防ぐ機能がある一方で、LNP の細胞取り込みを抑制するため、薬効を低下させるジレンマがある。本研究では、腫瘍組織などの弱酸環境下に応答して正電荷を示し、積極的に細胞へ取り込まれる pH 応答性ポリペプチドで修飾された LNP を用いることで上記課題を解決するため、マイクロ流体デバイスによる調製法の確立、物性評価および *in vitro* での機能評価による分子量の最適化に取り組んだ。

第 2 章では、脂質結合型ポリペプチドの合成および pH 応答性ポリペプチド修飾 LNP の調製および物性評価を行った。ポリペプチドは、末端にアジド基を有するポリグルタミン酸に対して、側鎖にアミド結合を介してエチレンジアミン構造およびカルボキシル基を導入した PGlu(DET-Car)を用いた。PGlu(DET-Car)は、酸性 pH 条件下においてはエチレンジアミン構造が 2 価の正電荷、カルボキシル基が 1 価の負電荷を有するため、ポリマー全体としてはカチオン性となる一方、中性 pH 条件下においてはエチレンジアミン構造がゴースク構造を示し 1 価の正電荷を示す状態となるため、ポリマー全体として中性となる pH 応答性を有する。PGlu(DET-Car)に対して、DBCO-DSPE をクリック反応により導入し、脂質結合型 pH 応答性ポリペプチド DSPE-PGlu(DET-Car)を得た。LNP はマイクロ流体デバイスを用いて調製を行った。LNP の調製法には薄膜水合法、エタノール注入法、T チューブ法等があるが、マイクロ流体デバイスによる調製法は、高い再現性と粒子径の制御性、スケラビリティを有しており、現在 LNP の調製法で広く取り入れられている方法である。マイクロ流体デバイスの流速などの機械パラメータ、LNP の脂質組成や siRNA 濃度等を検討し、マイクロ流体デバイスによる調製法を確立した。また、DSPE-PGlu(DET-Car)は重合度(DP)が 20、70、110 のものを使用し、PGlu(DET-Car)修飾 LNP を CB20-LNPs、CB70-LNPs、CB110-LNPs と名付けた。また、コントロールとして PEG 修飾型 LNP (PEG-LNP) を調製した。CB-LNPs の粒子径は 110~130nm、内包率は 67~94%であった。また、どの CB-LNPs においても PEG-LNP よりも優れた pH 応答性が電位に見られ、PGlu(DET-Car)修飾に由来する物性が確認された。

第 3 章では、CB-LNPs の機能評価を行った。まず、ヒト卵巣腫瘍細胞 SK-OV-3-luc に対して、蛍光色素 Alexa Fluor647 結合 siGL3 を内包した LNPs を投与し、pH6.5 と pH7.4 における siRNA の細胞内動態および細胞取り込み量について検証したところ、LNPs はエンドサイトーシスによって取り込まれていた。また、すべての CB-LNPs において、PEG-LNPs と比較して pH6.5 において細胞取り込み量が増加していることを確認した。遺伝子抑制能評価のため、SK-OV-3-luc に対して各 LNPs を投与後、ルシフェラーゼの発光強度を測定したところ、pH 6.5 において CB20-LNPs は CB70-LNPs よりも高い遺伝子抑制能を示し、一方 CB110-LNPs は PEG-LNPs と同様にほとんど遺伝子抑制を示さなかった。また、各 LNPs の膜融合能を測定したところ、CB20-LNPs の pH 応答性は CB70-LNPs および CB110-LNPs よりも高く、低 pH 領域において強い膜融合能を示した。また、エンドソーム脱出能を測定したところ、CB20-LNP が最も高い値を示した。以上より、pH 応答性ポリペプチド修飾 LNPs が CB20-LNPs に最適化された。

第 4 章は総括であり、本研究の成果が総括され、将来展望が述べられている。

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

系・コース： ライフエンジニアリング 系
Department of Graduate major in コース
学生氏名： 本間 啓太郎
Student's Name

申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
審査員主査： 西山 伸宏
Chief Examiner

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

In chapter 1, The background and purpose of this study are described, focusing on the properties of LNPs and polybetaine. RNA interference therapy based on siRNA is innovative in that it targets intracellular mRNA and therefore has the potential to overcome diseases that cannot be treated with existing modalities, thus showing much potential for its effectiveness in the treatment of cancer and other diseases. However, siRNAs are extremely unstable in the bloodstream, and thus, for systemic administration of siRNAs, methods of encapsulating siRNAs in LNPs coated with polyethylene glycol or the like have been investigated. While modification with polyethylene glycol has the function of preventing capture by blood proteins and immune cells, it also suppresses cellular uptake of LNPs, which is a dilemma that reduces the efficacy of the drug. In this study, to solve the above problem by using LNPs modified with pH-responsive polybetaine, which shows positive charge in response to weakly acidic environments such as tumor tissue and is actively taken up by cells, we established a preparation method using a microfluidic device, evaluated physical properties, and optimized molecular weight through in vitro functional evaluation. In chapter 2, I synthesized polybetaine conjugated polybetaine and use it for preparing polybetaine-coated LNPs (CB-LNPs) with microfluidic device. As a result, CB-LNPs showed around 100 nm size, 67~94% encapsulation rate, and higher pH responsibility on ζ potential than PEG-coated LNPs (PEG-LNPs). In chapter 3, the functions of LNPs were evaluated. On the cellular uptake of LNPs, LNPs were incorporated via endocytosis and all CB-LNPs showed higher cellular uptake at pH 6.5 than pH 7.4 compared to PEG-LNPs. On the gene silencing assay, at pH 6.5, CB20-LNPs showed higher gene repression than CB70-LNPs, while CB110-LNPs showed little gene repression, as did PEG-LNPs. When the membrane fusion ability of each LNPs was measured, the pH responsiveness of CB20-LNPs was higher than that of CB70-LNPs and CB110-LNPs, showing strong membrane fusion ability in the low pH region. When endosomal escape ability was measured, CB20-LNP showed the highest value. In conclusion, pH-responsive polybetaine-modified LNPs were optimized as CB20-LNPs.

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).