

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	グルタミン代謝に関連したトランスポーターの認識に基づき腫瘍選択的に相互作用する機能性高分子の開発
Title(English)	Development of Glutamine-Functionalized Polymers with Tumor-Selective Interaction Capacity by Sensing Dense Glutaminolysis-Related Transporters
著者(和文)	山田直生
Author(English)	Naoki Yamada
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10658号, 授与年月日:2017年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:西山 伸宏,上田 宏,山口 猛央,宍戸 厚,丸山 厚
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10658号, Conferred date:2017/9/20, 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

専攻: Department of	化学環境学	専攻	申請学位 (専攻分野): Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名: Student's Name	山田 直生		指導教員 (主): Academic Supervisor (main)	西山 伸宏	
			指導教員 (副): Academic Supervisor (sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx. 2000 Japanese Characters)

本論文では、腫瘍特異的なグルタミン代謝の亢進により過剰発現しているグルタミントランスポーターを認識することで、腫瘍選択的に相互作用する機能性高分子の開発とその機能評価を行った。

第1章では、腫瘍と強く相互作用する分子の代表例である標的指向性分子(リガンド分子)の開発や近年のオミックス解析の発展により明らかにされたがん特異的なグルタミン代謝の現在の研究状況について記した。リガンド分子を利用したがん治療は、がん選択的な薬物送達を可能にする技術として注目を集めており、がん特異的な受容体等の探索とそれを認識するリガンド分子の開発が精力的に行われている。これに関連し、亢進したグルタミン代謝とそれに伴うグルタミントランスポーターの過剰発現およびグルタミン取り込みの向上が、多くのがんに共通する性質として近年注目を集めている。従ってグルタミンは、幅広いがん細胞と相互作用可能なリガンド分子として大きな可能性を秘めていると考えられる。しかしながらグルタミンとグルタミントランスポーターとの結合力は既存のリガンド分子とその受容体との結合力よりも弱いため、グルタミン単体ではリガンド分子として利用しにくい。これを解決する手法として本研究では高分子を利用した多価結合に注目した。多価結合可能な機能性高分子はグルタミントランスポーターが過剰発現しているがん細胞とは多価結合により強く相互作用する一方で、過剰発現していない正常細胞とは弱い相互作用しかせず、がん選択的に強く相互作用すると期待できる。

第2章では、グルタミンとグルタミントランスポーターとの多価結合を可能とする機能性高分子の合成について示した。まずアミノ酸 *N*-カルボキシ無水物の開環重合により前駆体の高分子(poly(L-Lysine)(PLys))を合成し、縮合反応により側鎖へグルタミン構造を導入することで狭い分子量分布($M_w/M_n < 1.2$)かつ鎖長が精密制御(PLysの重合度にして 30, 50, 100)された機能性高分子を得た。得られた高分子の末端には、今後の機能評価において蛍光により高分子を検出するために蛍光色素を導入した。同様の手法で、分子量や中性 pH での電荷は機能性高分子と等しいが、側鎖にグルタミン構造を持たないコントロール高分子も合成した。

第3章では、合成した機能性高分子の評価系を検討した。グルタミン代謝に関連したグルタミントランスポーター-ASCT2については細胞表面での密度や分布が詳細には明らかになっていないこと、また膜タンパクであるトランスポーターを単離精製することは困難であることから、一般にリガンド分子とその受容体等との相互作用解析に用いられる表面プラズモン共鳴(SPR)等は本研究では適当でないと考え、培養細胞および実験動物を用いた評価系を採用した。まず培養細胞における ASCT2 の発現量をフローサイトメトリーおよび ELISA により調べたところ、ヒト由来膵臓がん細胞(BxPC3)はヒト由来胎児腎細胞(HEK293)に比べ ASCT2 の過剰発現が確認された。さらに BxPC3 皮下腫瘍での ASCT2 の過剰発現は BxPC3 皮下移植モデルマウスにおいても確認されたことから、これらの細胞種を機能性高分子と ASCT2 との相互作用の評価に用いることとした。

第4章では、第3章で選定した BxPC3 細胞および HEK293 細胞を用い、合成した機能性高分子とグルタミントランスポーター-ASCT2 との相互作用を培養細胞レベルおよび実験動物レベルで評価した。まず BxPC3 細胞における機能性高分子の取り込みをフローサイトメトリーにより評価したところ、重合度 100 の機能性高分子は重合度 50 および 30 の機能性高分子に比べそれぞれ 10 倍、18 倍の取り込み量を示した。この重合度の増加に伴う劇的な取り込み量の増加は多価結合によるものと推察される。また BxPC3 細胞における重合度 100 の機能性高分子の取り込み量は HEK293 での取り込み量のおよそ 5 倍多く、機能性高分子は ASCT2 の発現量の差を認識して培養細胞と相互作用していることが示唆された。さらに HEK293 細胞においては機能性高分子とコントロール高分子の取り込みは同様であった一方で、BxPC3 細胞においてはコントロール高分子に比べ機能性高分子の取り込みが多かったことから、機能性高分子側鎖のグルタミン構造が、がんと強く相互作用するために重要であることが示唆された。各種グルタミントランスポーターの阻害剤を用いた細胞内取り込みの阻害実験では、ASCT2 阻害剤のみが顕著な取り込み阻害効果を示したことから、実際に ASCT2 が機能性高分子と細胞との相互作用において重要な役割を担っていることが示唆された。生体内での機能性高分子と ASCT2 との相互作用を評価するために BxPC3 皮下腫瘍へ機能性高分子を局所注射し、その残存率を経時的に測定したところ、重合度 100 の機能性高分子は他の機能性高分子およびコントロール高分子に比べ有意に長い腫瘍滞留率を示し、重合度 100 の機能性高分子は生体内においても腫瘍と強く相互作用していることが示唆された。

第5章では、総括および今後の展望について述べた。

これを要するに、本論文では、多種のがんで過剰発現が報告されているグルタミントランスポーター-ASCT2 を認識することで、がん細胞選択的に強く相互作用する画期的な機能性高分子の開発に成功した。

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).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	化学環境学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 (工学) Doctor of
学生氏名 : Student's Name	山田 直生		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	西山 伸宏
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Recently, elevated glutaminolysis has attracted much attention as one of the hallmarks of tumor cells; it has been well-documented that this elevated glutaminolysis is accompanied with increased uptake of glutamine mediated by specific glutamine transporters, including ASC transporter 2 (ASCT2). This molecular interaction between glutamine and ASCT2 offers great interest to sensing tumor cells; however, developing glutamine-functionalized molecules with high affinity to tumor cells is a big challenge because the binding affinity of glutamine to ASCT2 is too weak for this purpose.

In this study, I successfully developed glutamine-functionalized polymer having strong affinity to tumor cells overexpressing ASCT2. This functional polymer was synthesized by ring-opening polymerization of *N*-carboxyanhydride, which permits facile control of the polymer length, and subsequent modification of the side chain to have glutamine-like structure. In this design, modulation of the polymer length would allow strong multivalent interaction with dense ASCT2 on tumor cells, whereas such multivalent interaction is unlikely to occur on normal cell surface with low transporter density. This density-associated multivalent effect could achieve tumor-selective interaction of the functional polymer. Indeed, the developed polymer with suitable length showed significantly faster and higher (~ 5-fold) cellular uptake in tumor cells (high expression of ASCT2) compared to non-cancerous cells (low expression of ASCT2). Furthermore, chemical structure at the side chain also potentially affected this cellular interaction of the polymer; lack of glutamine-like structure at the side chain significantly decreased the affinity to ASCT2 and tumor selectivity, indicating that glutamine-like structure at the side chain is the key for strong interaction with ASCT2. The developed polymer with fine-tuning of polymer length as well as chemical structure at the side chain accomplished selective and strong interaction with dense ASCT2 on tumor cells, thereby showing strong binding affinity to tumor cells that is comparable to potent ligand molecules in the literature.

In conclusion, this is the first study utilizing glutamine as a functional molecule showing tumor-selective high affinity by interacting with the glutaminolysis-related transporter ASCT2. Furthermore, this study can provide a novel approach of molecular design to target dense transporters using their substrates that have a great potential for tumor therapy and diagnosis based on tumor-specific metabolism.

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).