

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	高機能化タンパク質ナノ粒子の開発とその応用
Title(English)	
著者(和文)	池田裕介
Author(English)	Yusuke Ikeda
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10815号, 授与年月日:2018年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小島 英理,山口 雄輝,白木 伸明,小倉 俊一郎,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10815号, Conferred date:2018/3/26, 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： Department of	生命情報	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	池田 裕介		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	小島 英理	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor (sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

微粒子工学においてナノ粒子は、様々な分野で高機能化材料のカギとなる先端材料として注目を浴びており、医療分野への応用まで進展している。その中でも弾性タンパク質であるエラスチンをベースとしたポリペプチド (ELP) から成るナノ粒子は、単分散で機能付加が容易であり、さらに生分解性及び生体適合性に優れているため、ナノメディシン(ナノ医療)としての応用に相応しい材料である。

当研究室ではエラスチン由来の温度応答性ペプチド(AVGVP)₄₂とポリアスパラギン酸 (以下、D₄₄) のハイブリッドポリマーがナノ粒子を形成することを見出している。通常、ELPは、温度に応答して可逆的に構造を変化させ、高い温度で巨大な凝集体を形成する。しかしながら、D₄₄を導入したELPは、加熱時にD₄₄の反発力によりミセル状の粒子を形成し、粒子のサイズを30 nm程度に制御することが可能である。上記の特性を利用して、(AVGVP)₄₂ D₄₄で構成されたタンパク質に機能性分子を付加し、医療分野への応用を目指した高機能化タンパク質ナノ粒子を設計し、進行がんに対する早期発見の実現や画期的な治療法を開発することを本研究の目的とした。

がんの診断技術においては、腫瘍マーカーを早期の段階で発見するためにELISAの高感度化が求められており、特にナノサイズの材料を担体としてシグナル増幅の役割を果たす酵素を複数提示する手法は、大幅な検出感度の向上が期待できる。そこでバイオセンシングシステムの高感度化を目指し、(AVGVP)₄₂ D₄₄融合タンパク質にトゲオキヒオドシエビ由来のルシフェラーゼであるNanoluc®とbiotin acceptor peptideを融合し、発光能とアビジンを介した抗体結合能を付与することで、イムノアッセイにおける検出プローブとなる融合タンパク質(ADNB)を作製し、その機能評価を行った。ADNBは大腸菌発現系を利用した遺伝子工学的な手法で作製した。そして肝臓がんの腫瘍マーカーであるAFPを標的として、1次抗体とストレプトアビジン標識2次抗体を介して、ADNBナノ粒子を提示するELISA系を構築し、検討を行った。その検出能を評価したところ、従来の標的1分子に1酵素を提示する検出法と比較して、10倍程度高い検出能を有することが明らかとなった。また、ヒト血清中におけるAFPについても高感度かつ定量的に検出することができ、臨床検査へ応用できる可能性が示された。

がんの治療技術においては、薬剤をより安全かつ効果的に利用するシステムであるDDS分野において、DDSキャリアとして高い素質を有しているELPナノ粒子が注目を浴びており、DDSキャリア表面にがん細胞への標的指向性を付与することで、効果的かつ薬剤による副作用が低減されたDDSが実現できると期待されている。そこで(AVGVP)₄₂ D₄₄に腫瘍に対するホーミングペプチドであるinternalizing RGDペプチド(iRGD)を融合し、がん細胞に対する標的能と細胞内移行能を付与した融合タンパク質(ADiR)を作製し、優れた薬剤キャリアの構築を目指した。ADiRは、大腸菌発現系を利用した遺伝子工学的な手法により作製を行っている。蛍光を内包したADiRナノ粒子が、ヒト肺がん細胞内部において有意に蓄積されていることから、細胞内移行能を有していることを示した。また、抗がん剤を内包してヒト肺がん細胞へ投与すると、iRGD配列のがん細胞標的能と細胞内移行能の両機能の相乗効果により、内包した抗がん剤を細胞内で放出することで、顕著に細胞死を誘導することを示した。さらに蛍光を内包したナノ粒子をマウス血中に静脈注射すると、免疫細胞の捕食による排泄を回避し、血中に長時間滞留する性質を有していることを示しており、担癌マウスにおいては腫瘍への有意な蓄積が示され、iRGDを融合したタンパク質ナノ粒子が生体内の腫瘍を標的とした臨床応用に適用可能であることが示唆された。

以上、本研究ではELPナノ粒子表面への機能性分子の付加により、がんの診断分野においてはシグナル増幅能の向上による腫瘍マーカーの高感度検出、治療分野においてはがんターゲティング能の付加による薬剤効果の向上といった特性を示す高機能化タンパク質ナノ粒子の開発に成功した。実際の臨床応用までに検討すべき点を克服することで、患者の受診から、高感度検出による超早期診断、副作用の少ないピンポイントな根本治療、そして完治に至るまでをナノスケールで一体化した診断・治療システムが構築できると期待している。

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 : Department of	生命情報	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	池田 裕介		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	小島 英理	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Nanoparticles composed of elastin-like polypeptide (ELP) are monodisperse, easy to add functionalities, and are further excellent in biodegradability and biocompatibility. Therefore, these materials are suitable for application as nanomedicine. Our laboratory has found that hybrid polymers composed of elastin-derived temperature responsive peptide (AVGVP)₄₂ and polyaspartic acid (D₄₄) form nanoparticles. This polymers can form micelle-like particles due to the electrostatic repulsion of D₄₄ upon heating, and it is possible to control the particle size to about 30 nm. In this study, functional molecules are fused to proteins composed of (AVGVP)₄₂ D₄₄, and highly functionalized protein nanoparticles are designed for application in the medical field. We aimed to realize early detection of advanced cancer and to develop innovative cancer therapy.

First, to increase the sensitivity of cancer diagnosis, Nanoluc®, a luciferase derived from *Oplophorus gracilirostris*, and biotin acceptor peptide as a biotin-presenting sequence were fused with (AVGVP)₄₂ D₄₄ fusion protein to give a luminescence ability and an antibody binding ability via avidin. Using nanoparticles, detection sensitivity for cancer marker (AFP) was about ten times higher compared to the using of monomer version of the protein in ELISA. In addition, AFP in human serum can be detected with high sensitivity and quantitatively, and the possibility of application to clinical examination were shown.

Second, to develop nanocarriers for delivering drug safely and efficiently to tumor tissue, fusion protein (ADiR) was constructed by fusing iRGD, a homing peptide against tumor to (AVGVP)₄₂ D₄₄ to confer targeting ability and intracellular translocating ability to cancer cells. Since ADiR nanoparticles containing fluorescence are significantly accumulated inside human lung cancer cells, they showed cancer internalization ability. In addition, when the anticancer agent is encapsulated and administered to human lung cancer cells, the encapsulated anticancer agent induced cell death markedly due to the synergistic effect of both functions of iRGD sequence. Furthermore, when intravenously injecting fluorescent-encapsulated nanoparticles into tumor-bearing mouse blood, a significant accumulation in the tumor was shown, suggesting that protein nanoparticles fused with iRGD are applicable to clinical applications for targeting tumors *in vivo*.

From these results, the addition of a functional molecule to the surface of ELP nanoparticles enables highly sensitive detection of tumor markers by improving signal amplification capability for the cancer diagnosis and effective anticancer treatment by enhancement of cancer targeting ability for the cancer therapy.

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).