

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	西川 正浩
論文題目	Structural elucidation, control and transformation of poly(glycerol) functionalized nanodiamond, and its application to boron neutron capture therapy (ポリグリセロール修飾ナノダイヤモンドの構造解析、反応制御および化学変換、ならびにホウ素中性子捕捉療法への応用)		
(論文内容の要旨)			
<p>ナノダイヤモンド (ND) には主に4種の合成法が知られている。そのうち、爆轟法ナノダイヤモンド (DND) は、粒子サイズが4種の中では最も小さく、またその形状はほぼ球状である。さらに表面官能基への化学修飾の可能性や高い生体適合性と合わせて、医療分野を中心とした種々の応用に関する研究が行われてきた。一方で、ND, DNDを含むナノ粒子を生理的条件下で安定に分散させる方法として、ポリグリセロール (PG) による修飾が汎用的に用いられている。PG修飾は、ナノ粒子表面を起点としたグリシドール (GD) の開環重合反応により行われるが、PG鎖中のヒドロキシ基により高い親水性をナノ粒子に付与し、またヒドロキシ基を利用したさらなる化学修飾を可能にする。さらにPG修飾は、ナノ粒子の体内での免疫応答を回避させることが知られている。PG修飾ナノ粒子に化学修飾を施し、さらに機能を付加して応用展開を図るためには、PG修飾反応を定量的に制御するとともに、PG鎖の詳細な構造を把握することが重要と考えられる。このような背景において申請者は、DNDを中心にPG修飾反応の定量的制御と得られるPG修飾ND (ND-PG / DND-PG) の構造解析を行った。また、この結果に基づき、DND-PGへのホウ素-10含有置換基の導入によるホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) 薬剤の合成とその薬効評価を行った。なお、BNCTは、ホウ素-10原子と中性子との核反応を利用する先進的がん治療法の一つで、近年注目を集めており、ナノ材料をベースとしたホウ素-10を含む新奇な薬剤に関する多くの研究が行われている。</p> <p>本論文は6つの章より構成されており、以下に各章の概要を述べる。</p> <p>第1章は序論であり、申請者は上記の内容を含むDND, PG修飾およびBNCTに関する一般的な情報について述べている。</p> <p>第2章では、まずGDの開環重合を安全に行うため、エチレングリコール (EG) を溶媒に用いるPG修飾反応の手順を示し、この手順で合成した種々ND-PGのPG修飾量がGDおよびEGの使用量、ND粒子の酸素含量および粒子サイズにより理論的に予測また制御可能であることを明らかにした。次にND-PGの¹³C NMRによる構造解析を行い、PG鎖中の置換基の数および結合様式の異なるモノマー単位の存在比を求め、存在比から分岐構造の出現頻度および1級ヒドロキシ基の量を求め、PG鎖中のヒドロキシ基のうち約半数が1級ヒドロキシ基であることを明らかにした。また、この解析から開環重合反応におけるカチオン性の反応機構の寄与が示唆された。動的光散乱 (DLS) 分析に関しては、まずND-PG粒子間の静電相互作用の影響について考察し、これを打ち消す10 mM NaCl中での測定結果から、それぞれのPG鎖の長さを求めた。また、DND-PGにおいてPG鎖は柔</p>			

軟でありPG層内部に多くの水を含むことが可能であると推定した。

第3章ではTEMPO酸化によるND-PGの1級ヒドロキシ基のカルボキシ基 (COOH) への変換について検討した。酸化剤NaClO₂の使用量に対するCOOH生成量について解析し、COOH含量が約1 mmol/g以下の範囲ではNaClO₂の量に対してほぼ定量的にCOOHが生成することを示した。NaClO₂の使用量が多い場合には、COOH生成量の増加が鈍化する傾向が見られたが、PG鎖中の2級ヒドロキシ基の酸化に由来する、エーテル結合の切断によるPG鎖の脱落が生じるためと考察している。

第4章ではDND-PGにフェニルボロン酸 (PBA) を担持したBNCT薬剤の合成と、マウスによる評価について述べている。PBAはホウ素-10の供給源であることに加え、がん細胞表面のシアル酸との結合による腫瘍細胞への導入促進が期待されることから、DND-PGのOH基をアミノ基に変換し、PBAのアルデヒド体との還元的アミノ化によりPBAを導入した。本検討では、PBA基の構造について還元的アミノ化に供するホルミル基とボロン酸残基の置換位置が*o*-位であることが生理的条件下での分散に重要であった。しかし、残存した遊離のアミノ基のために、*in vitro* の実験において血清タンパク質との凝集が生じ、この問題を解決し血液中で分散させるためにスクシニル基、メチル基によるアミノ基の保護を行った。ナノ薬剤は、薬物動態試験において担がんマウスの腫瘍に蓄積されることが確認され、完治には至らなかったが、中性子照射により腫瘍の増大を有意に抑制することが確認された。

そこで第5章では、ナノ薬剤中のホウ素-10の含量を増加させるために、ホウ素-10クラスターを担持したDND-PGを設計、合成した。ホウ素-10クラスターには能動的ターゲティングの効果がないと考えられたため、効果が期待されるPBAまたはRGDペプチドを別途結合させた。第3章で示したCOOHを含むDND-PGから出発し、ホウ素-10クラスターはアジド基を経由したクリック反応で導入し、またCOOH基に能動的ターゲティング部位を結合した。合成したナノ薬剤に対して、細胞毒性試験、細胞への中性子照射によるBNCT評価を行った。ホウ素-10クラスターを担持したナノ薬剤は、それを担持していないものに比べて高い細胞毒性を示し、また中性子照射によりBNCT効果を示すことを確認した。しかし、能動的ターゲティング部位の有無による差異はわずかであった。透過型電子顕微鏡による細胞導入の観察においては、ホウ素-10クラスター担持ナノ薬剤は能動的ターゲティング部位の有無にかかわらず細胞内に導入されることが確認されたが、ナノ薬剤間での差異は見られなかった。一方でホウ素-10クラスターを担持しないナノ薬剤の細胞導入量はわずかであり、このことから安定な負電荷を持つと考えられるホウ素-10クラスターの細胞導入への寄与が示唆された。

第6章は結語である。本論文におけるND-PGに関する詳細かつ定量的な検討が、バイオ・医療分野でのND-PGの応用に対して、ラボスケールから臨床・工業化段階にわたり重要な知見を与えると期待されること、およびDND-PGによるBNCT薬剤が、今後の薬剤開発でのリード物質となり得ると述べられている。

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、ナノ粒子の医療応用への展開を目指し、ナノ粒子表面の化学修飾、特にポリグリセロール修飾ナノダイヤモンドについて、検討を行っている。審査の結果、以下の3つの点で本論文は優れているとの結論に至った。

1. ナノダイヤモンドを始めとするナノ粒子へのポリグリセロール (PG) 修飾は既に広く行われており、PG修飾量の制御およびPG鎖のヒドロキシ基への官能基変換や更なる修飾反応などを利用した研究が行われてきた。これに対し本論文の第2章では、将来の工業的生産も意識し、反応性が高いグリシドールの開環重合を安全に行う手順を示した。次いで、種々のPG修飾量を持つPG修飾ナノダイヤモンド (ND-PG) を合成し、反応における物質収支を解析することにより、従来の経験的な制御に対してより理論的、定量的にPG修飾量の制御が行えることを示した。また、PG鎖中のモノマー単位の置換パターンの違いによる異なる部分構造の存在比を解析し、PG鎖の分岐度、1級ヒドロキシ基の量を求めた。特に1級ヒドロキシ基の量は、PG鎖上での化学変換を設計するにあたって重要な知見となる。更に、分散液中でのPG鎖のサイズ、そのPG修飾量との関係に関して解析を行っており、ND-PGの生理学的条件下での粒子の挙動を理解するための基礎的な情報を提供している。上記の内容とその理解は、本論文においても第3章以降の議論の基礎となっている。
2. 第3章ではPG鎖中の1級ヒドロキシ基の酸化による、カルボキシ基を有する新規なND-PGの合成法を開示している。反応は水分散液中ニトロキシラジカル触媒存在下で、安価な無機試薬である亜塩素酸ナトリウムを酸化剤として実施され、従来の無水コハク酸を用いるカルボキシ基導入の方法に比べて、簡便であり、更にカルボキシ基を有するグリセリン酸ユニットはエーテル結合により結合しているために頑健性が高い。また、カルボキシ基の導入量が少ない範囲では化学量論的にカルボキシ基の導入量が制御可能であることが、反応の解析により見いだされた。カルボキシ基上への生体関連物質の担持など、導入量を精密に制御する場合に特に有用であると考えられる。
3. 第4章、第5章では、PG修飾爆轟法ナノダイヤモンド (DND-PG) をベースとした、新規ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT) 薬剤の設計と合成について述べられている。ナノダイヤモンドの表面修飾によるBNCT薬剤の研究例はこれまで

になく、将来的には蛍光ナノダイヤモンドなどによる薬剤の可視化と組み合わせることで、有用なBNCT薬剤となることが期待される。一方、第4章では、ホウ素-10の供給源であるとともに能動的ターゲティング能も有するホウ素-10濃縮フェニルボロン酸（PBA）を担持したBNCT薬剤の合成について述べられている。合成ルートは信頼性の高い有機合成反応で構成されており、目的物および各中間体において定量的な構造確認が行われている。合成したナノ薬剤については、効果は決して高くないものの、担がんマウスに対する腫瘍成長抑制効果が確認されたことから、今後、ホウ素-10含量や腫瘍ターゲティング能などの向上による薬効の増大が期待される。実際、第5章では、ホウ素-10クラスターを担持してホウ素含量を向上させたナノ薬剤を合成し、細胞による評価を行い、中性子照射により高いBNCT効果を有することが確認された。したがって、当該ナノ薬剤はナノダイヤモンドを用いたBNCT薬剤のリード物質になり得ることを示した。

上述のように、本論文は高い新規性を有すると認められ、有機分子・物質と生体との相互作用の講究を目指す人間・環境学研究科関連環境学専攻分子・生命環境論講座の趣旨にふさわしい内容を有している。

よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、2023年11月7日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行なった結果、合格と判定した。

要旨公表可能日：2024年 1月 23日 以降