HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Characterizing Topology of Surface Ligands on Liposomes [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	李, 尚軒
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11852号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59253
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	ShangHsuan_Lee_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬科学）　　氏　名　　李　尚軒

	主　査	教　授	原　島　秀　吉
審査担当者	副　査	教　授	前　仲　勝　実
	副　査	准教授	尾　瀬　農　之
	副　査	准教授	秋　田　英　万

学 位 論 文 題 名

Characterizing Topology of Surface Ligands on Liposomes
（リポソーム表面に標識されたリガンドのトポロジーに関する評価）

博士学位論文審査等の結果について（報告）

Drug Delivery System (DDS) は薬物を必要な時、必要な場所に、適切な量を送達することで優れた薬効と高い安全性を両立する技術である。中でもリポソームは広く研究されている薬物担体の一つであり、Doxil を初めとした複数のリポソーム製剤が既に臨床で使用されている。これらのリポソーム製剤は、血中投与後に物理的にアクセス可能ながん組織や免疫細胞を標的としているが、そのメカニズムはリガンドによる積極的な標的 (active target) ではなく、受動的な集積による標的 (passive target) である。Active target はナノ粒子が本来通過できない様々な組織・細胞への標的化を可能とし、DDS の応用性を飛躍的に向上し得る重要な基盤技術である。しかし、Active target を可能とするリガンド修飾ナノ粒子の開発は遅れており、これまでに第 I 相臨床試験へ進行した例が一つあるものの、未だに実用化されていないのが現状である。この原因としては、リガンド修飾ナノ粒子の製造過程が比較的煩雑であることや、製剤の厳密な評価が難しいことが挙げられる。特に製剤の評価は適切な製剤設計をする上で極めて重要である。

リガンド修飾ナノ粒子の標的親和性や薬物動態等の様々な性質は、ナノ粒子表面のトポロジーと深く関わっている。特にリガンド密度は最も厳密に評価されるべきパラメーターの一つである。しかし、リガンド修飾リポソームの報告は多く存在するものの、リガンド密度を正確に測定した例はほとんど無い。使用したリガンド全てが修飾されたとみなしてバイオアッセイを行った報告が大半を占めることから、適切なリガンド密度の評価系が確立されていないことが分かる。

このような背景の下、李氏はナノ粒子表面のリガンド密度（incorporation ratio; IR）の評価系の構築が、有用なリガンド修飾ナノ粒子の開発に大きく貢献すると考えた。また、IR と同時に、リポソームの安定性やリガンド能力に影響するポリエチレングリコール (PEG) アンカーの修飾密度（surface anchor density; SAD）を求めることで、より厳密なリガンドのトポロジーに関する評価を試みた。PEG アンカーの後修飾法において、SAD は使用したアンカーの約 60%に相当する 2.82 mol%の挿入に留まり、100%に達しないことが明らかとなった。続いて、様々な温度でリガンドをアンカー修飾リポソームと反応させたところ、温

度依存的な反応効率（reaction yield; RY）の上昇が認められた。得られた SAD に RY を乗ずることで厳密な IR を求めることに成功した。また、本評価系を構築することによって、同じリガンド修飾量・異なるアンカー修飾量のリポソームを明確に見分けることが初めて可能となった。

PEG アンカーの修飾量はリポソーム構成脂質、温度、時間、使用するアンカー量等の様々な条件によって影響されることが明らかにされている。しかし、それらの検討のほとんどは粒子径約 100 nm 程度のリポソームを用いて行われており、リポソームの粒子径に着目した検討はなされていない。李氏は、リポソームの粒径の違いによる脂質膜の曲率の変化が PEG アンカーの修飾量に影響すると仮説を立て、それを検証した。一般にリポソームの粒径分布は広いため、僅かに粒径の異なるリポソームを製造し分けることが困難である。そこで、リポソーム製造後にサイズ排除クロマトグラフィーによって分画することで、粒径が数 nm 異なるリポソームを複数得ることに成功した。これらの様々な粒径を有するリポソームに PEG アンカーを挿入した結果、100 nm 以上のリポソームでは粒径に依存せずに 3 mol% 程度の修飾量を示した。一方、100 nm 未満のリポソームでは粒径の減少に伴ってアンカー修飾量が上昇し、最小粒径である 42 nm のリポソームでは約 6 mol%に達した。

以上、本学位論文は active target が可能なリガンド修飾リポソームのリガンドのトポロジーを厳密に測定する新たな手法を見出し、また、リガンドを標識する際に必要な PEG アンカーの修飾量に影響する新たなパラメーターを見出すことに成功した。これらの新たな知見は、次世代 DDS であるリガンド修飾ナノ粒子の研究開発に貢献するところ大なるものがある。

よって筆者は、北海道大学博士（薬科学）の学位を授与される資格あるものと認める。