

氏名	HAFIZAH BINTI MAHMUD		
授与した学位	博士		
専攻分野の名称	工学		
学位授与番号	博甲第	5738	号
学位授与の日付	平成30年 3月23日		
学位授与の要件	自然科学研究科 生命医用工学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Study on the Establishment of a Glioblastoma Stem Cell Model and the Drug Delivery Targeting Glioblastoma Stem cells (膠芽細胞腫幹細胞モデルの樹立と膠芽細胞腫幹細胞を標的する薬物送達に関する研究)		
論文審査委員	教授 妹尾 昌治	教授 大槻 高史	教授 徳光 浩
<b>学位論文内容の要旨</b>			
<p>This study described the establishment of Glioblastoma Stem Cell Model and targeting of Glioblastoma stem cell by doxorubicin encapsulated in chlorotoxin conjugated liposome. This thesis is divide into three chapters: General introduction, chapter I and chapter II. Chapter I and II is further subdivided into five sections: Abstract, Introduction, Material and Methods, Results and Discussion and Conclusion.</p> <p>In general introduction, the definition about glioma stem cells, glioma stem cell marker, the invasiveness of glioma correlated with expression of matrix-metalloproteinase 2 (MMP-2) in glioma stem cells and drug delivery system using chlorotoxin as a ligand in targeting glioma is discussed.</p> <p>In chapter 1, the establishment of glioblastoma stem cell is discussed. In this, glioma cancer cell lines, U251MG and A172 each representing different degree of malignancy have been used. The microenviroment regulation in the brain tumor and metastasis involves the cooperative interaction between hyaluronan acid (HA) and CD44. CD44, being a multifaceted transmembrane glycoprotein by itself, or in combination with several other cell surface receptors, has been used as a marker for CSC isolation. Non-adherent culture of U251MG and A172 was treated with high molecular weight of HA. Further these cells were transplanted subcutaneously in Balb/c mouse for the generation of the xenograft model for the cancer stem cell. The primary cell excised from tumor were further characterized. Confirming the tumorigenicity of U251MG-P1 cells, we concluded that U251MG-P1 cells was suitable to provide a xenograft model of CSC.</p> <p>In chapter 3, drug delivery system targeting U251MG-P1 was discussed. Firstly, the effect of doxorubicin toward U251MG-P1 was assessed. Then, the expression of MMP-2 in U251MG-P1 cells was confirmed by both Western blot and reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Chlorotoxin peptide fused to human IgG Fc region without hinge sequence (M-CTX-Fc) has been used as a ligand exploiting it affinity toward MMP-2. Finally, liposome conjugated with M-CTX-Fc encapsulating doxorubicin were evaluated <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i>.</p>			

## 論文審査結果の要旨

本研究では、ドキソルビシンを封入したリポソームにクロロトキシンを結合させて、がん幹細胞性をもつ脳腫瘍細胞モデルを標的するドラッグデリバリーシステムを樹立している。まず、標的となる脳腫瘍由来細胞として、ヒト細胞株 U251MG から CD44 を発現する幹細胞性細胞群をヒアルロン酸存在下でスフェロイド培養して濃縮し、ヌードマウスに移植すると増殖速度の早い腫瘍の形成が効率良く認められ、形成された腫瘍から初代培養細胞を得て U251MG-P1 細胞とした。この細胞は、CD44 陽性で幹細胞性マーカーを発現しており、ヌードマウスへの再移植も可能であることから脳腫瘍細胞の腫瘍移植モデルとして適していると考えられた。この細胞に対して効果のある制がん剤を検討したところ、ドキソルビシンに対して感受性が高いことがわかった。ドキソルビシンはすでに臨床で治療に用いられているが、心筋症を起こす副作用強く、そのままでは生涯投与量が定められており、用量に制限がある。そこで、これをリポソームに封入して、標的能を付与することで、副作用が低く奏効性の高い剤形のデザイン化を試みている。ドキソルビシンのリポソーム封入には、リモートローディング法を用い、高い封入効率と担持率を実現している。一方、脳腫瘍のがん幹細胞性と高い浸潤性はマトリックスプロテアーゼ 2 (MMP-2) の発現と相関があることがすでに知られており、この MMP-2 を標的するのに適したリガンドがサソリ毒として知られるクロロトキシンである。クロロトキシンは 36 アミノ酸から成るペプチドであるが、ヒト免疫グロブリンの定常領域を融合したキメラタンパク質としてデザインし、がん幹細胞性の脳腫瘍細胞を標的する人工リガンドとして調製を行って、これをドキソルビシン封入リポソームの表面に結合したイムノリポソームをデザインした。このイムノリポソームは *in vitro* における細胞への効果を増強しただけでなく、*in vivo* においても、副作用を軽減しながらマウスに移植した腫瘍の増殖を有意に抑制して、明らかな制がん効果を認めることに成功している。以上より、この研究は脳腫瘍の治療に効果が期待できる、新規なドラッグデリバリーシステムの開発を加速化することが期待できる成果と認め、審査委員の全員が本論文を学位にふさわしい論文であると評価した。