

京都大学	博士（工学）	氏名	村田 勇樹
論文題目	Design and Preparation of Gelatin-Based Carriers for Imaging Probes to Visualize Cell Functions (細胞機能を可視化するイメージングプローブのためのゼラチンからなるキャリアのデザインと作製)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、イメージングプローブのためのゼラチンからなるキャリアをデザイン、作製し、細胞機能を可視化する技術の創製を目指した研究であり、総論、第1部5章、第2部3章よりなっている。</p> <p>総論では、細胞機能を可視化するためのイメージング技術の重要性およびイメージングプローブとそのキャリア材料に関する研究の必要性を概説し、本論文の研究目的ならびに研究結果の概要が述べられている。</p> <p>第1部（第1～5章）では、細胞機能イメージングのための基盤技術を開発し、マルチモーダル細胞イメージングおよび基本的な細胞機能である増殖能と細胞死（アポトーシス）の可視化を行った。</p> <p>第1章では、蛍光イメージングプローブである量子ドット（QD）および磁気共鳴イメージング（MRI）プローブである酸化鉄ナノ粒子（IONP）を内包するゼラチンナノ粒子（GNS_{QD+IONP}）を作製し、そのマルチモーダルプローブとしての有用性を評価した。オクタアルギニン（R8）によって修飾された GNS_{QD+IONP} を取り込んだ細胞は、蛍光イメージングおよび MRI によって可視化されることが示された。</p> <p>第2章では、メッセンジャーRNA（mRNA）検出プローブであるモレキュラービーコン（MB）とカチオン化ゼラチンを複合体化し、細胞内 mRNA 検出活性を評価した。複合体とともにマウス骨髄由来間葉系幹細胞（MSC）を培養したところ、細胞毒性と MB 細胞内導入量は複合体の作製条件に依存し、これら2つのバランスによって MB の蛍光検出活性は変化した。これにより、細胞内 mRNA を効率よく検出するための最適な複合体の作製条件を明らかにした。</p> <p>第3章では、カチオン化ゼラチン-MB 複合体および MB 内包カチオン化ゼラチンナノ粒子（cGNS_{MB}）を作製し、MB の細胞内徐放性と細胞内 mRNA 検出期間を比較、評価した。MB の徐放性を調べたところ、複合体の方が cGNS_{MB} に比較して急速な MB の放出挙動を示した。細胞毒性を示さず、MB 細胞内導入量をそろえた条件において複合体あるいは cGNS_{MB} をマウス MSC に取り込ませた。その結果、複合体よりも cGNS_{MB} の方が細胞内 mRNA 検出期間は長く、その分解性を制御することでより長期にわたって蛍光強度が高く維持された。これにより、cGNS_{MB} を用いた MB 細胞内徐放によって細胞内 mRNA 検出期間が長期化されることを示した。</p> <p>第4章では、細胞増殖マーカーである Ki67 の mRNA に対する MB を内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子（cGNS_{Ki67 MB}）を作製した。cGNS_{Ki67 MB} を MSC に取り込ませ、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）添加によって細胞増殖を加速させた。その結果、cGNS_{Ki67 MB} の蛍光強度は bFGF 濃度および Ki67 mRNA 発現レベルに応じて有意に増加し、bFGF 添加により高められた細胞増殖能が可視化されることが示された。</p> <p>第5章では、アポトーシス細胞で発現が増加する caspase-3 の mRNA に対する MB を内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子（cGNS_{casp3 MB}）を作製した。cGNS_{casp3 MB} を MSC に取り込ませた後、異なる濃度のカンプトテシンを添加することで細胞にアポトーシスを誘導した。その結果、cGNS_{casp3 MB} の蛍光強度はアポトーシス誘導によって有意に</p>			

京都大学

博士 (工 学)

氏名

村田 勇樹

増加し、アポトーシスを従来の解析手法よりも感度よく可視化できることがわかった。

第 2 部 (第 6 ~ 8 章) では、第 1 部で開発した基盤技術を複数の標的分子を同時に検出するマルチカラーイメージングへと応用し、3 次元細胞集合体内部における細胞機能を可視化する技術の開発についてまとめている。

第 6 章では、解糖系と酸化的リン酸化において発現が増加する複数種の標的 mRNA に対する MB を同時に内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{multi MB}) を作製した。cGNS_{multi MB} を異なる分化状態のマウス胚性幹細胞に取り込ませた結果、同一細胞集団における未分化および分化細胞のエネルギー代謝経路をマルチカラーで可視化できることを実証した。

第 7 章では、蛍光波長の異なる 3 種類の QD および IONP を内包するゼラチンナノ粒子 (GNS_{3QD+IONP}) を作製した。ヒト人工多能性幹細胞由来の 3 次元軟骨組織を単一細胞へと解離し、平面培養下で R8 修飾 GNS_{3QD+IONP} によって標識した後、3 次元軟骨ペレットおよび軟骨細胞シートを構築した。その結果、3 次元構造体内部まで細胞は均一に標識され、マルチカラーで可視化できることが示された。

第 8 章では、caspase-3 および一定の発現を示すグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素の mRNA に対する MB を同時に内包するカチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{dual MB}) を作製した。cGNS_{dual MB} で標識した MSC から構築した 3 次元細胞凝集体にアポトーシスを誘導した結果、凝集体内部におけるアポトーシス細胞の位置を可視化できることが示された。

以上の一連の研究から、作製したゼラチンキャリアは、イメージングプローブを効率よく細胞内に送達することで細胞を標識し、2 次元および 3 次元環境における様々な細胞機能を可視化できることがわかった。ゼラチンキャリアとイメージングプローブの組み合わせは、細胞機能のイメージングに有効な技術であることを示している。