

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。

(論文審査の結果の要旨)

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についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

イメージングプローブである量子ドットおよび酸化鉄ナノ粒子を同時に内包するゼラチンナノ粒子を作製し、これを取り込んだ細胞は蛍光および磁気共鳴イメージングにより可視化されることがわかった。また、異なるスペルミン導入率のカチオン化ゼラチン、および異なるモレキュラービーコン (MB) /カチオン化ゼラチン混合比をもつカチオン化ゼラチン-MB 複合体を作製した。その結果、細胞内メッセンジャーRNA (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。さらに、複合体と MB 内包カチオン化ゼラチンナノ粒子 (cGNS_{MB}) を比較したところ、cGNS_{MB} では、MB 細胞内徐放によって細胞内 MB 活性および mRNA 検出期間が長期化されることを実証した。この MB 細胞内徐放によって、基本的な細胞機能である細胞増殖能および細胞死 (アポトーシス) を感度よく可視化することができた。

次に、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を作製し、異なる分化状態の細胞における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。さらに、イメージングプローブを内包するゼラチンナノ粒子によって標識された細胞から 3 次元細胞集合体を構築した。その結果、3 次元集合体の内部まで細胞は均一に標識され、集合体内部におけるアポトーシス細胞の位置を可視化することがわかった。

以上、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のデザインおよび細胞機能の可視化に関して重要な基礎的知見を得たものであり、学術上、実際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 3 年 1 月 25 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、(令和 5 年 3 月 23 日までの間) 当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。