

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	ZOU Yajuan
論文題目	Studies on protein corona formation and cellular uptake mechanism for nanoparticles covered with polyglycerol and its derivatives (ポリグリセロールおよびその誘導体で被覆されたナノ粒子のタンパク質コロナ生成と細胞取り込み機構に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>ナノ粒子は、癌の治療や診断などの生物医療応用において有用なプラットフォームとなり得る。また、ナノ粒子の生体内での振る舞いには、体液中でナノ粒子の表層に形成されるタンパク質コロナと呼ばれるタンパク質層の性質が影響していると言われている。このタンパク質コロナ形成によるナノ粒子と生体組織との相互作用、具体的には、生理学的環境下におけるナノ粒子表面へのタンパク質の吸着、生成したタンパク質コロナと細胞表面との相互作用や続いて起こる細胞への取り込み機構などを包括的に解釈するような研究は、これまでにほとんど例がない。</p> <p>このような背景において申請者は、親水性高分子であるポリグリセロール (PG) により表面が修飾されたナノ粒子に焦点を当て、PG 修飾の度合いとタンパク質コロナ形成との相関、および PG 表面上の荷電官能基のタンパク質コロナ形成とその後の細胞取り込みへの影響について定量的な検討を行った。本論文では、それらに関する新規性の高い研究結果が考察とともに系統的にまとめられている。</p> <p>本論文は全六章で構成されており、以下に各章の概要を述べる。</p> <p>第一章は序論であり、まず、ナノ粒子とその医療応用について概観したのち、ナノ粒子の腫瘍へのターゲティングについて解説している。次に、タンパク質コロナ形成と細胞表面との相互作用、およびナノ粒子の表面化学修飾とタンパク質コロナ形成との相関、そして最後に、本論文の目的について述べている。</p> <p>第二章では、ナノ粒子 (ナノダイヤモンド、酸化鉄ナノ粒子) 表面への PG による化学修飾がタンパク質コロナ形成を著しく阻害することを、ポリエチレングリコール (PEG) との定量的比較により明らかにした。例えば、直径 100 nm のナノダイヤモンドを 10 wt% の PEG および PG で被覆した場合の単位面積当たりのタンパク質の吸着量を比較すると、前者は 8 mg/m² であったのに対し、後者では、2 mg/m² であった。さらに、30 wt% の高密度で PG 修飾した場合には、ナノ粒子の直径や種類に関わらず、ほとんどタンパク質は吸着されなかった。一方で、タンパク質の吸着が阻害されたことにより、PG は PEG よりもナノ粒子のマクロファージ (貪食細胞) への取り込みをはるかに</p>			

高い効率で抑制することも明らかにした。30 wt%の高密度で PG 修飾されたナノ粒子では、マクロファージへの取り込みもほとんど認められなかった。このことは、PG 修飾がナノ粒子に肝臓などでの捕食を回避する能力、すなわちステルス性を与え、その生体内での血中滞留時間をより長くすることを示唆している。

第三章では、前章で確認された PG がタンパク質の吸着を阻害する性質を利用し、PG 上に導入された荷電官能基とタンパク質との相互作用を定量的に評価した。具体的には、PG で修飾されたナノ粒子表面に荷電官能基（カルボキシレートとアンモニウム）を 1 粒子当たりの数（密度）を制御しながら導入し、3 種類のタンパク質（lysozyme, bovine serum albumin (BSA), γ -globulin）それぞれとの親和性を定量的に評価した。その結果、官能基の電荷と反対の電荷を有するタンパク質が優先的に相互作用することを明らかにした。また、BSA とアンモニウムとの会合定数を決定することに成功し、それがナノ粒子表面におけるアミノ基の密度に比例することも見出した。このような特定の官能基とタンパク質との精度の高い定量的評価は、タンパク質との相互作用のない PG を用いることで初めて可能になったと考えられる。

第四章では、第三章の成果をさらに発展させ、荷電官能基とタンパク質混合物とのタンパク質コロナ形成、およびその細胞取り込みと取り込み機構について検討を行っている。本章では、荷電官能基として、カルボキシレート、アンモニウムに硫酸イオンを加え、ウシ胎児血清 (FBS) 中のタンパク質がアンモニウムと高密度の硫酸イオンを有するナノ粒子表面に吸着し、このタンパク質コロナの形成が癌細胞への取り込みを誘起することを明らかにした。さらに、コロナタンパク質の有無により、細胞への取り込み量、さらには、取り込み経路が大きく変化することも明らかにした。

第五章では、トリフェニルホスホニウム (TPP) のミトコンドリアへの標的指向性に対するタンパク質コロナの影響を検討した。TPP が結合した PG 修飾ナノ粒子の表面にある薄いタンパク質コロナ層は、そのミトコンドリアに対する標的指向性に影響を与えなかった。一方で、より厚いタンパク質コロナ層により TPP の標的指向性が著しく減少することが明らかになった。さらに、いずれの場合においても、タンパク質コロナ層は TPP の細胞毒性を顕著に減少させることが見出された。

第六章では、以上の内容をまとめるとともに今後の展望についても言及している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文では、ナノ粒子の生物医療応用を加速させるため、ナノ粒子表面上へのタンパク質コロナの形成とその細胞取り込みへの影響について検討を行っている。審査の結果、以下の点で本論文は優れているとの結論に至った。

1. 先行研究において、すでに PG によるナノ粒子の化学修飾法と構造決定、さらには、その定量法などが報告されてきた。本論文の第二章では、まず、PG 修飾の反応条件を検討することで、その重合度を制御することに成功した。さらに、第三、四、五章では PG に荷電官能基を導入する際、それらの密度を制御し、導入することにも成功した。以上の精緻な材料合成とその定量的な分析は、高い新規性を有するとともに、本論文の根幹ともなっている。
2. 先行研究では、PG 修飾されたナノ粒子が肝臓や脾臓などの捕捉をすり抜ける性質、すなわち、ステルス性を有していることが報告されてきた。また、PEG はステルス性を有する代表的な高分子として広く使われてきた。一方、本論文の第二章では、ナノ粒子表面の PG がタンパク質の吸着を抑制する性質を有することを明らかにし、それ故、ナノ粒子がマクロファージに捕食されないことも明らかにした。さらに、それらの効果が PEG に比べて優れていることも明瞭に示した。以上、PG のステルス性を揺るぎの無いものとした意義は非常に大きく、今後、PG が PEG に代わって、ナノ粒子を被覆するステルス性高分子の世界標準となるための第一歩を踏み出したと言える。
3. 第三章では、特定の荷電官能基（カルボキシラートとアンモニウム）のみを、その密度を制御しながら PG 上へ導入し、3種類のタンパク質（lysozyme, BSA, γ -globulin）それぞれとの親和性を定量的に評価した。ここでは、第二章で見出された PG がタンパク質コロナの生成を抑止する性質を利用していることから、荷電官能基とタンパク質との相互作用のみを純粹に評価することができる。したがって、これまでに報告されたナノ粒子表面とタンパク質との相互作用の定量的評価に比べ、その精度と信頼性が格段に向上している。実際、第三章でも述べているように、アミノ基と BSA との会合定数を決定し、これがナノ粒子上のアミノ基の密度と非常に良い相関を示すことを明らかにした。これ

までに、このような報告例はなく、高い評価精度の実現により得られた初めての例といえることができる。今後、様々な官能基と各種タンパク質との親和性の評価が行われる際の標準的な実験条件として広く認知を得ていくと期待される。

4. 第四章では、第三章と同様、荷電官能基（カルボキシラート、アンモニウム、硫酸イオン）を、密度を制御しながら PG 上へ導入し、タンパク質混合物（FB S）中でのタンパク質コロナの生成について定量的な評価を行なった。その後、まず、タンパク質コロナがナノ粒子の細胞への取り込みにどう影響するかについて検討したところ、コロナを形成するタンパク質の種類により取り込みが促進、あるいは抑制されることが明らかとなった。また、ナノ粒子の細胞への取り込みの経路についても、コロナタンパク質の存在により左右されることが明らかとなった。以上のような、ナノ粒子表面上の荷電官能基とタンパク質コロナ形成、細胞への取り込み、さらには取り込み経路との相関を精査した報告はこれまでになく、新規性の高い研究内容と言える。
5. 第五章では、第三、四章と同様、荷電官能基（トリフェニルホスホニウム、TP P）を、密度を制御しながら PG 上へ導入し、タンパク質コロナ形成、ミトコンドリアへの標的指向性、細胞毒性への影響について精査した。先行研究では、細胞小器官への標的指向性とタンパク質コロナ形成の相関について精査した例は見当たらず、細胞小器官を標的とする、より精密なナノ医療への指針となる新規性の高い研究と言える。

以上述べてきたように、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・生命環境論講座の設立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、2021年2月5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：2021年 12月 23日 以降