

京都大学	博士 (工学)	氏名	水田 涼介
論文題目	Development of artificial biomembrane vesicles for nano-DDS based on organic-inorganic hybrid materials (有機-無機ハイブリッド材料に基づくナノ DDS のための人工生体膜小胞の開発)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、ナノ医療応用を見据え、生体膜と無機微粒子との複合化に基づく人工生体膜小胞の構築及び、ドラッグデリバリーシステム (Drug Delivery System; DDS) への応用について報告したものである。生体膜からなる細胞外小胞 (Extracellular vesicle; EV) やエンベロープウイルスなどの生体膜小胞は、様々な生体内現象に密接に関わっている。これらのナノ粒子は、生体膜に起因する生体適合性やターゲティング能などの優れた特性を有しており、内包する核酸やタンパク質を受容細胞へ伝達する天然の薬物キャリアと捉えることができる。しかし、単離効率の低さ、標的特異性の不十分さ、組成の不均一さや薬物のローディング効率の低さといった問題点があり、その治療応用は制限されている。そこで近年、この生体膜小胞の機能改変や模倣といった、生体膜小胞に触発されたキャリアの開発、治療応用が検討されている。</p> <p>このような背景のもと、本論文では、有機成分と無機成分の相乗効果により新しい特性を生み出す有機-無機ハイブリッドに基づく生体膜小胞に触発された DDS 開発が述べられている。具体的には、超分子化学的なアプローチによる磁場応答性キャリアと EV の複合化に着目し、EV に磁気誘導能を付与することで磁場を用いた EV の輸送法の開発と細胞機能制御、再生医療への利用について検討した。さらに、脂質濃縮層に対して、シリカナノ粒子を透過させることで人工生体膜を効率的に被覆する手法を確立した。</p> <p>本論文は、緒論と本論 5 章から構成されている。緒論では、生体膜小胞および有機-無機ハイブリッドマテリアルの特性やナノ DDS 応用、生体膜小胞にインスパイアされたナノマテリアル開発のためのエンジニアリング手法の現状や課題について概説している。そして、研究背景について述べるとともに、本論文の研究目的を明確にし、最後に本論文の構成及び概要について論じた。</p> <p>第 1 章では、モデル生体膜小胞 (リポソーム) を用い、両親媒性多糖ナノゲルをインターフェースとする酸化鉄ナノ粒子との複合化について解析を行った。リン脂質からなるリポソームをモデル生体膜として用い、磁気微粒子を内包したコレステリル基置換プルランナノゲル (磁性ナノゲル) と混合することで複合体を調製した。調製した複合体の構造特性を動的光散乱 (DLS)、透過型電子顕微鏡 (TEM) により解析したところ、磁性ナノゲルとリポソームとの複合化が確認された。イメージングフローサイトメトリー (Imaging flow cytometry: IFC) によりこの複合化の単粒子解析を行なったところ、リポソームと混合した磁性ナノゲルからは脂質由来の蛍光が共局在することが単一粒子レベルで確認できた。また、カルセインを内包した蛍光標識リポソームと磁性ナノゲルの複合体の単粒子解析より、リポソームが内水層を保持したまま磁性ナノゲルと複合化していることが示された。さらに、リポソームと磁性ナノゲルの複合体の示差走査熱量測定より、ナノゲルの疎水性のコレステロール基がリポソームの脂質膜にアンカリングすることで複合化していることが示された。</p> <p>第 2 章では、磁気誘導 EV デリバリーシステムの構築について検討している。複合化挙動の解析では、モデル系と同様に IFC を用いて検討した。その結果、EV とナノゲルの複合化において量論比を制御可能であることが示された。これらのイメージングフローサイトメトリーを用いた解析手法は、溶液中に存在する複合化ナノ粒子の組成というこれまでに解析が困難であった情報を明らかにでき、蛍光や散乱光をもとに単一粒子レベルでナノ粒子の組成を明らかにできる新たな評価法としても重要である。また、脂肪由来間葉系幹細胞 (ADSC) を神経様細胞へと分化させることが報告されているラット副腎褐色細胞腫由来細胞 (PC12) 由来の EV を用いて磁性ナノゲルとの複合体を調製した。</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	水田 涼介
<p>この複合体の ADSC への磁気誘導デリバリーにより、その分化が効率的に促進される事が免疫染色より明らかとなった。この結果からナノゲルをインターフェースとする超分子化学的な酸化鉄ナノ粒子と EV 膜との複合化により、EV 内包物の機能保持と磁気誘導による送達効率の向上がともに達成できることが示された。</p> <p>第 3 章では、磁性ナノゲルを生体膜によって被覆する新規手法について検討した。細胞に取り込まれた磁性ナノゲルが細胞から自発的に放出される過程で、粒子と細胞膜が複合化した生体膜被覆磁性ナノゲルが得られることを見出した。HeLa 細胞内に磁場を用いて磁性ナノゲルを導入した後、さらに培養を行うことで培養上清に磁性ナノゲルが排出されることが蛍光測定より明らかとなった。また回収した粒子について Western blotting を行った結果より、排出された磁性ナノゲルには細胞膜由来の膜タンパク質が複合化したことが明らかとなった。また、表面電荷の低下し、粒径が優位に増大すること DLS により確認された。これらの結果より、磁性ナノゲルに生体膜が被覆したことを明らかにした。</p> <p>第 4 章では、密度勾配遠心法により作製した濃縮脂質層に、シリカナノ粒子を遠心法で透過させることで、粒子を脂質膜で被覆する手法を開発した。脂質層を透過したシリカナノ粒子は、脂質二分子膜に相当する 20 nm 程度の粒径の増大が確認された。また、示差走査熱量分析測定より、脂質膜を被覆した粒子からはリン脂質二分子膜のゲル-液晶相転移に伴う吸熱ピークが確認されたことから、シリカナノ粒子表面に脂質二分子膜が被覆したことが示された。また、単一粒子解析よりシリカナノ粒子の 95%以上に脂質が複合化していることが明らかとなり、本脂質層透過法が極めて効率の高い脂質膜コーティング手法であることが示唆された。また、本手法がさまざまな粒径のナノ粒子及びさまざまな種類の脂質を用いて同様の手法で、粒子表面への脂質二分子膜コーティングを行った。その結果、本手法は汎用性のある手法であることが明らかとなった。</p> <p>第 5 章では、再構成型無細胞タンパク質発現系 (PURE system) を用い、モデル膜タンパク質としてコロナウイルス由来の Spike タンパク質を合成し、シリカナノ粒子表面の脂質膜への再構成について検討した。Western blotting により脂質膜上に、Spike protein が再構成されていることが明らかとなった。また、単粒子解析の結果より、発現系中に存在する粒子の約 80%にウイルス同様に受容体結合部位が露出するような配向で Spike タンパク質が導入されており、またその Spike タンパク質は受容体であるアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) と相互作用することが示された。したがって、開発した一連の手法により様々な機能を持ったナノ粒子と生体由来の膜タンパク質の機能が融合した、新規ハイブリッドマテリアルの開発が可能であることが示唆された。</p> <p>以上のように、本論文では磁性ナノゲルとの複合化による天然および人工の生体膜小胞の標的細胞への磁気誘導デリバリーシステムを構築した。また、脂質層透過法により、効率的にナノ粒子表面に脂質二分子膜が被覆でき、その粒子をテンプレートとして表面に膜タンパク質の修飾が可能であることを見出し、機能化人工生体膜小胞が構築可能であることを示した。これらの成果は、先端医療用バイオマテリアルとしての生体膜を用いた新たな有機-無機ナノハイブリッド開発につながる事が期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、生体膜と無機微粒子との複合化に基づく新規人工生体膜小胞の構築及び、ドラッグデリバリーシステム(DDS)への応用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。

1. 第1章では、モデル生体膜小胞(リポソーム)と磁性ナノゲルの複合体を調製し、示差走査熱量測定より、ナノゲルのコレステロール基が脂質膜にアンカリングすることで複合化していることを示した。また、イメージングフローサイトメトリーを用いた単一粒子解析により、その複合化挙動を定量的に明らかにした。
2. 第2章では、磁性ナノゲルを用いた磁気誘導EVデリバリーシステムを構築した。脂肪由来間葉系幹細胞(ADSC)を神経様細胞へと分化させるラット副腎褐色細胞腫由来細胞由来のEVを用いて磁性ナノゲルとの複合体を調製した。複合体のADSCへの磁気誘導デリバリーにより、分化が効率的に促進される事が免疫染色より明らかとなった。この結果からEV内包物の機能保持と磁気誘導による送達効率の向上がともに達成できることが示された。
3. 第3章では、磁性ナノゲルを生体膜によって被覆する新規手法を開発した。細胞に取り込まれた磁性ナノゲルが細胞から自発的に放出される過程で、粒子と細胞膜が複合化した生体膜被覆磁性ナノゲルが得られることが明らかとなった。
4. 第4章では、密度勾配遠心法により作製した濃縮脂質層に、シリカナノ粒子を遠心法で透過させることで、粒子を脂質膜で被覆する手法を確立した。脂質層を透過したシリカナノ粒子表面に脂質二分子膜が被覆したことが示された。また、単一粒子解析より、本脂質層透過法が極めて効率の高い脂質膜コーティング手法であることが明らかとなった。
5. 第5章では、無細胞タンパク質発現系を用いて、脂質膜被覆シリカナノ粒子表面へ膜タンパク質を組み込むことに成功した。単粒子解析の結果より、発現系中に存在する粒子の約80%にウイルス同様に受容体結合部位が露出するような配向でSpikeタンパク質が修飾されており、またそのSpikeタンパク質は受容体であるアンジオテンシン変換酵素2(ACE2)と相互作用することが示された。これにより、このSpikeタンパク質搭載ナノ粒子は人工コロナウイルスとしての機能を有し、新たなナノワクチンとしての応用の可能性が示された。

以上、本論文は磁性ナノゲルとの複合化による天然および人工の生体膜小胞の標的細胞への磁気誘導デリバリーシステム、ならびに脂質層透過法を用い、機能化人工生体膜小胞の効率的な作製手法を確立し、新規ドラッグデリバリーキャリアとしての有用性を明らかにしたものであり、学術および先進医療などの応用の観点から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5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い、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、京都大学学位規定第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際して、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。