

京都大学	博士 (工学)	氏名	金 哲柱
論文題目	Physical and Immunological Characterization of Molecular Assemblies Comprising Poly(sarcosine)-Based Amphiphilic Polymers (ポリサルコシンを有する両親媒性ポリマーで構成された分子集合体の物理的および免疫学的特性に関する研究)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文は、ポリサルコシンを親水性ブロックにした両親媒性ポリマーを用いて、水中で分子集合体を調製し、分子集合体のサイズ、粘弾性、膜構造などの物性を構成ポリマーに基づいて解析し、また、これらの分子集合体をマウスに投与したときに惹起される免疫応答を調べた研究成果をまとめたものであり、序章、五章、および結語からなっている。</p> <p>序章では、歴史的な背景と目的、および本研究の概要について述べている。</p> <p>第一章では、疎水性ヘリックスブロックに、バリン(Val)やロイシン(Leu)とその光学異性体と、アミノイソ酪酸(Aib)との交互配列を持つ 12 量体ヘリックスペプチドを用い、ヘリックスペプチドの N 末端にポリサルコシンを導入した 4 種類の両親媒性分子(SLL、SDL、SLV、SDV)を合成し、エタノールインジェクション法により水中で自己組織化分子集合体を調製している。SLL を含む二成分系で分子集合体を調製することにより、ベシクルの形態を持つ 3 種類の分子集合体(SLL-SDL、SLL-SDV、SLL-SLV の各ペア)を得ている。これらのベシクルの水中での粘弾性を、原子間力顕微鏡を用いたナノインデンテーション法によって評価している。ヘルツ接触モデルにより force-distance curve から弾性率を計算したところ、二成分の組み合わせにより、卵黄レシチンリポソームよりもかなり高い 11.9 MPa を示すものから、Val ベースのヘリックスポリペプチドを用いて 4.3 MPa まで軟化するものまで、分子集合体を構成するペプチドのアミノ酸組成に基づき薄膜の粘弾性が変化することを明らかにしている。薄膜の粘弾性は、ステレオコンプレックス形成およびヘリックス間の側鎖の噛み合わせによって調節可能であることが示された。</p> <p>第二章では、構造テンプレートとしてナノチューブを使用することにより、均質なサイズ分布を有するベシクルを調製する新たな方法について検討している。Leu と Aib の交互配列を有するポリペプチドについて、鎖長あるいはヘリシティの異なる 3 種類の両親媒性ブロックポリペプチド(L16、D16、D14)を合成している。様々な組み合わせで分子集合体を調製し、モルフォロジーへの影響を解析したところ、L16 と D14 混合系ナノチューブに対して D16 ナノシートを加えて加熱処理を行うことにより、直径約 60nm の均一なベシクル形状の分子集合体を得ている。透過型電子顕微鏡によりベシクル形成プロセスを観察したところ、ナノチューブ末端にてナノシートとの膜融合が起こり、続いてラウンドボトムフラスコのような形状になり、膜切断が起こる一連のプロセスにより、ベシクルの形成されることを明らかにしている。これらのことから、均一な直径を有するナノチューブ構造が、ペプチド膜の融合および切断によるベシクル形成においてテンプレートとして働き、ベシクル形成プロセスを制御しているため、直径を精密に制御することが可能になったと示唆された。</p> <p>第三章では、疎水部ヘリックス C 末端に芳香族基を導入し、芳香族基が分子集合体の形態および膜構造に及ぼす影響について調べている。安定な αヘリックス構造を取り、水中で強くパッキング</p>			

京都大学	博士 (工学)	氏名	金 哲柱
<p> グすることが知られている Leu と Aib の交互配列 12 量体を用い、発色基としてエチルカルバゾール (ECz)、ナフタルイミド (NapIm)、ポルフィリン (Por) を C 末端に導入し、3 種類の両親媒性ブロックポリペプチド (SL12-ECz、SD12-NapIm、SD12-Por) を新たに合成している。3 種類の両親媒性ブロックポリペプチドは水中で分子集合体を形成し、透過型電子顕微鏡によって様々なモルフォロジーが観察された。一方、90°C で加熱することにより、すべてについてベシクルへとモルフォロジーが収束した。これは芳香族基を導入していない SL12 から形成されたナノチューブとは対照的な結果であり、芳香族基の C 末端への導入が、分子集合体のモルフォロジーに大きく影響することが示された。さらに、原子間力顕微鏡により大気中でベシクルの厚さを厳密に測定した結果から、芳香族基を有しない場合は、インターディジテート構造の単分子膜であるのに対し、ナフタルイミドとポルフィリンを導入した場合、疎水性および π-π 相互作用により、二分子膜になることがわかった。ヘリックス分子を有する両親媒性ブロックポリペプチドは、C 末端に導入した芳香族基の種類に応じて、分子集合体のモルフォロジーと単分子膜/二重層構造の変化に繋がることがわかった。 </p> <p> 第四章では、ポリサルコシンとポリ乳酸で構成した両親媒性ブロックポリマーで調製した高分子ミセル (Lactosome) の免疫学的動態について検討している。Lactosome は、T 細胞非依存性抗原であることが知られており、主に B 細胞との相互作用について調べたところ、腹腔内に存在する B1a 細胞が Lactosome に対する免疫誘導を担っていることがわかった。Lactosome によって活性化した B1a 細胞は脾臓に移動し、抗体分泌細胞である形質芽球に分化し、さらに一部の細胞は形質細胞まで分化して脾臓と骨髄で抗ポリサルコシン IgM を産生することが示された。さらに、T 細胞や B 細胞を欠失した RAG2^{-/-} マウスへ、免疫したマウスの脾臓や腹腔細胞を移植した結果から、Lactosome と反応して抗ラクトソーム IgM の産生をもたらす細胞は腹腔内に存在する B 細胞であることがわかった。また、腹腔内で活性化した B1a 細胞は増殖し、抗体分泌細胞を脾臓で数か月間まかなうことが示された。 </p> <p> 第五章では、ポリサルコシンを有する両親媒性ブロックポリマーで調製した様々な分子集合体が、それらの物理的性質に応じて免疫原性を変化させることについて検討している。5 種類の分子集合体を用いて、第四章で調べた免疫学的機構をベースに、抗ポリサルコシン IgM や IgG3 の産生量と親和性について調べた。これらの分子集合体の物理的特性は、サイズ、粘弾性、および膜構造が異なっている。その結果、直径 35 nm のポリマーミセル (G1) および直径 85 nm のベシクル (G4) を用いると、IgM と IgG3 の産生が最大であることがわかった。一方で IgG3 の親和性は、G4 および直径 200 nm のベシクルを用いた場合、初回投与生産される抗体よりも 2 回投与で増加することが示された。これらの結果は、ポリサルコシンを表面に有するナノ粒子は、ナノ粒子の物理的特性によって免疫細胞 (B1a 細胞) との相互作用が変化し、異なる特性をもつ抗体産生に繋がることを示された。 </p> <p> 結語では、本論文で得られた成果について要約している。 </p>			

氏 名	金 哲柱
-----	------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、ポリサルコシンを親水性ブロックにした両親媒性ブロックポリマーを用いて、水中で分子集合体を調製し、分子集合体のサイズ、粘弾性、膜構造などの物性を構成ポリマーに基づいて解析し、また、これらの分子集合体をマウスに投与したときに惹起される免疫応答を調べた研究成果を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. Leu 或いは Val を含むヘリックスペプチドを、疎水性ブロックに用いた両親媒性ブロックポリペプチドを用いて、水中でベシクルとなる分子集合体を調製している。液中 AFM 観察により、ベシクルの粘弾性測定を行い、Leu を含むヘリックスペプチドについて、右巻きと左巻きとが共存すると、高い弾性率を示す単分子膜の得られることを明らかにしている。一方、直径が 60 nm 程度の小さなサイズのベシクルを調製する新規な方法を提示している。直径が 50 nm 程度のナノチューブを作製し、これとナノシートとを融合・切断することで、均一な粒径を有するベシクルを得ており、ナノチューブが鋳型の役割を果たすことを示している。さらに、分子集合体の光機能化を目指して、様々な芳香族官能基を両親媒性ポリペプチドに導入したときの分子集合体の膜構造変化を解析している。AFM 観察による膜厚の解析に基づいて、芳香族官能基の種類により、単分子膜あるいは二分子膜になることを示している。
2. ポリサルコシンを親水性ブロックに、ヘリックスとなるポリ乳酸を疎水性ブロックにした両親媒性ブロックポリマーが高分子ミセルを形成し、これをマウスに尾静脈投与したときに免疫系を惹起するメカニズムを調べている。高分子ミセルは、B1a 細胞に認識され、脾臓にてプラズマ細胞へと変換されることを明らかにしている。さらに、高分子ミセルやサイズ・弾性率の異なるベシクルなどのナノ粒子を、マウスに投与して惹起される免疫応答を調べ、産生される IgM および IgG3 について、それらの生産量やエピトープ親和性を評価し、分子集合体の物性と関連付けて議論している。

以上要するに、本論文は、両親媒性ブロックポリマーを用いた分子集合体の調製・物性解析・免疫応答を調べることにより、ナノ粒子の医療への応用の可能性を示す重要な成果であり、学術上、實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、平成 29 年 4 月 24 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、京都大学学位規定第 14 条第 2 項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものと認める。