



|              |                                                                                                                                                       |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | ナノ粒子の細胞内取り込み機構の解明：細胞内動態研究における評価方法への提言                                                                                                                 |
| Author(s)    | 畑, 勝友                                                                                                                                                 |
| Citation     | 大阪大学, 2016, 博士論文                                                                                                                                      |
| Version Type |                                                                                                                                                       |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/56175">https://hdl.handle.net/11094/56175</a>                                                                   |
| rights       |                                                                                                                                                       |
| Note         | やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文内容の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 氏 名 ( 畑 勝 友 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                            |
| 論文題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | ナノ粒子の細胞内取り込み機構の解明<br>～細胞内動態研究における評価方法への提言～ |
| <p>論文内容の要旨</p> <p>ナノマテリアル (NM) は少なくとも一次元の大きさが100 nm以下である物質と認識され、微小化により、サブミクロンサイズ以上の素材が有する組織浸透性や界面反応性などの機能が飛躍的に向上することから、我々の生活水準を高める素材として注目されている。実際、食品や化粧品などの分野において、銀ナノ粒子や非晶質ナノシリカ (nSP) などが既に実用化され、今後もその有効活用が期待されている。一方で、微小化により想定外の生体影響をおよぼすことが懸念されており、起炎性や発がん性などのハザード情報が多く報告されている。安全性評価においてハザード情報は必要不可欠であるが、NMの曝露実態や生体内動態が十分に考慮されておらず、ハザード情報だけが独り歩きしているのが現状である。したがって、曝露実態に基づいた安全性評価が必要であり、リスク解析に資する、生体内動態を加味した情報の提供が重要である。その点、NMの生体内動態に影響を与える要因としてはこれまで、NMの粒子径や表面電荷などの物性の違いが、主に考えられてきた。さらに近年では、生体内に取り込まれたNMは、血中のタンパク質などと接触し可逆的に相互作用することが明らかになりつつあり、NMに相互作用するタンパク質の違いが、生体内動態に影響をおよぼす新たな要因として注目されている。この相互作用により形成されたタンパク質の層は、「プロテインコロナ (PC)」と定義され、NMの物性の違いのみならず、曝露経路の違いによっても変化することが指摘されている。したがって、PCの品質とも言うべき、NMと相互作用を示すタンパク質の種類や量と、生体内動態との連関を評価することが重要な課題となっている。しかし、NMと血中タンパク質などとの相互作用の解明に必要な個々のタンパク質との結合性を定量的に評価した知見は不足している。また、生体内に取り込まれたNMは、生体内の各組織や細胞に接触する前に既にPCを形成していることから、細胞内取り込みを評価するためには、PC形成後に細胞へ作用させるなどの条件設定が必要であると考えられるが、そのような知見は不足しており十分な理解が得られていないのが現状である。本観点から筆者は、NMの物性・PCの品質・細胞内動態の連関関係を明確にするための情報収集を試みた。</p> <p>本検討では、まず、NMの物性とPCの品質との連関を評価するため、NMが血中に取り込まれた際の影響を鑑み、粒子径と表面修飾の異なるnSPと血中濃度の高いアルブミン、トランスフェリン、IgG、フィブリノゲンとの結合性を定量的に評価した。その結果、いずれのタンパク質においても、結合量はnSPの比表面積に依存することを明らかとした。また、フィブリノゲン以外は、アミノ基で表面修飾したnSPにおいて、未修飾のnSPおよびカルボキシル基で表面修飾したnSPと比べて、タンパク質との結合性が減少することを明らかとした。この点、当研究室ではこれまでに、アミノ基で表面修飾したnSPは、未修飾のnSPおよびカルボキシル基で表面修飾したnSPとは異なり、細胞膜に局在することを明らかとしている。本結果は、表面修飾の違いが細胞内局在に影響をおよぼすことを示唆する重要な知見であり、細胞内動態におよぼすPCの影響を評価することが必要である。以上のことから次に、PCと細胞内動態との連関を評価するために、nSPよりも定量性に優れた銀ナノ粒子を用いて、血中を介して各組織・細胞内へ分布する過程を想定し、血清あるいは血漿でPC形成後の細胞内取り込みについて定量的な解析を試みた。血清は血漿から血液凝固因子の一部が除去されたものであり、この含有タンパク質の種類の違いがPCの形成に影響を与え、細胞内取り込みに影響をおよぼす可能性を鑑みて血清あるいは血漿を用いた。その結果、PC非形成群よりも血清および血漿でPCを形成させた場合に細胞内取り込みが有意に抑制されることを明らかとした。さらに詳細に解析したところ、血清よりも血漿でPCを形成させた方が、細胞内取り込みが有意に抑制されることを明らかとした。そこで、血清よりも血漿に多く含まれているフィブリノゲンに着目し、フィブリノゲンが細胞内取り込みへ与える影響を評価した。その結果、フィブリノゲンによる細胞内取り込みの抑制などは認められず、フィブリノゲンの影響はないと考えられた。そこで次に、プロテオーム解析により、PCの構成タンパク質を網羅的に同定し、その違いから、細胞内取り込みに影響を与えるタンパク質の絞り込みを試みた。その結果、LDL受容体を介して細胞に取り込まれるとの報告があり結合することで細胞内取り込みを増加させ得るPlatelet factor 4や、単独で結合させた場合に細胞との相互作用が抑制され、細胞への取り込みが抑制されるとの報告があるApolipoprotein A4など、細胞内取り込みに影響を与える可能性のあるタンパク質を同定する</p> |                                            |

ことができた。

また、培地へ添加する血清は非働化して用いられることが多く、血清あるいは血漿でPCを形成させた際の細胞内取り込みの違いのように、非働化による影響も鑑みて細胞内取り込みを評価した。その結果、非働化血清でPCを形成させた場合には、非働化していない血清群と比べ、細胞内取り込みが有意に抑制されることが明らかとなった。さらに、非働化血清群のPCの構成タンパク質をプロテオーム解析により同定すると、補体の種類が多く結合することが明らかとなった。今後より詳細な検討が必要ではあるが、これらのタンパク質がNMに結合することにより、受容体などの細胞との相互作用に影響をおよぼす可能性が示唆され、細胞内取り込み機構の解明に向けた知見を得ることができた。

本研究では、NMの物性・PCの品質・細胞内動態の連関関係を明確にするために情報収集を試みた。その結果、表面修飾などの物性の違いがタンパク質との結合性に違いを生じることを見出した。さらに、血清・非働化血清・血漿などの違いにおいて、PCの構成タンパク質が変化し、細胞内動態に影響をおよぼす可能性を見出してきた。以上のことから、細胞内動態研究において、実際の曝露経路に近い評価をするためには、例えば、経肺曝露を想定した場合なら肺液などと混合しPCを形成させてから細胞へ作用させるというように、曝露経路で接触が想定される液でPCを形成させることが必要となる。また、プロテオーム解析により同定できたPCの構成タンパク質に基づいて、生体内動態や生体影響をより詳細に評価することができれば、NM特有の品質保証や規制などのガイドライン策定においての一助となる可能性がある。今後、個々のタンパク質との結合性および細胞内取り込みへの影響についてより多くの知見を得ることで、NMのハザード発現や生体内動態情報の集積に貢献できるものと確信している。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 畑 勝 友 ) |     |    |       |
|---------------|-----|----|-------|
| 論文審査担当者       | (職) |    | 氏 名   |
|               | 主 査 | 教授 | 堤 康央  |
|               | 副 査 | 教授 | 高木 達也 |
|               | 副 査 | 教授 | 平田 収正 |

## 論文審査の結果の要旨

本博士論文では、一次・二次粒子径や表面電荷といった、ナノマテリアルの物性と、ナノマテリアルの表面を覆うプロテインコロナの品質との関連評価を目的に、非晶質ナノシリカと血中に含まれる主要なタンパク質との結合性を定量的に評価した。また、プロテインコロナの品質と生体内動態との関連について解析するために、種々由来、種々前処置の血液を用い、プロテインコロナが銀ナノ粒子の細胞内取り込みにおよぼす影響を評価し、以下の知見を得た。

1. 非晶質ナノシリカの粒子径や表面電荷など、物性の違いが、ナノ粒子表面へのタンパク質結合量に大きく影響すること、即ち、プロテインコロナが質的・量的に変化することを定量的に示した。
2. 銀ナノ粒子表面を、血清・血漿・非働化血清由来のタンパク質成分でプロテインコロナ形成させた場合、各々の銀ナノ粒子の細胞内への取り込みが異なることを明らかにし、曝露経路や投与部位、存在環境によって体内動態が変動することを先駆けて認めた。また、この現象が、プロテインコロナを構成するタンパク質の違いに起因していることを提示した。
3. プロテインコロナ構成タンパク質のプロテオーム解析の結果から、銀ナノ粒子の細胞内への取り込みなど、体内動態に影響をおよぼす候補を同定した。

本研究成果は、医療分野などで活用されているナノマテリアルの品質、規格、規定に非常に重要な知見であり、レギュラトリーサイエンスの重要な知見と言える。また、プロテインコロナを考慮した素材選択、物性選択、投与部位選択など、Sustainable Nanotechnology: 安全かつ有効に持続利用可能なナノテクノロジーに大きく貢献するものである。

以上より、人の健康環境を科学する薬学領域において、興味深い知見であり、博士(薬学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。