



Title	Development of Vaccine Carriers Composed of Size-Regulated Amphiphilic Poly(amino acid) Nanoparticles
Author(s)	金, 亨振
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/57490
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	金 亨 振
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学 位 記 番 号	第 23778 号
学 位 授 与 年 月 日	平成22年3月23日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
工学研究科応用化学専攻	
学 位 論 文 名	Development of Vaccine Carriers Composed of Size-Regulated Amphiphilic Poly (amino acid) Nanoparticles(粒径制御された両親媒性ポリアミノ酸ナノ粒子を用いたワクチンキャリアの開発)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 明石 満 (副査) 教授 三浦 雅博 教授 茶谷 直人 教授 井上 佳久 教授 馬場 章夫 教授 神戸 宣明 教授 生越 専介 教授 関 修平 教授 真嶋 哲朗 教授 安蘇 芳雄 教授 芝田 育也

論 文 内 容 の 要 旨

本学位論文では、生分解性の両親媒性ポリアミノ酸を合成し、会合数を制御することにより、粒径が異なるナノ粒子の調製を行った。また、ナノ粒子のワクチンアジュバントとしての機能を抗原デリバリー能と免疫活性化能に分けて検討し、そのメカニズムを明らかにした。その構成は、緒言、本章3章、総括からなっている。

緒言では、本研究の背景、目的、研究内容の概要について述べた。

第1章では、粒径制御による最適なDDSキャリアの調製を目的として、粒径の異なるポリアミノ酸ナノ粒子を調製した。生分解性高分子であるポリ(γ-グルタミン酸)に疎水性アミノ酸をグラフトし、良溶媒に溶解させた後、貧溶媒と混合すると自己組織化ナノ粒子が形成された。粒子調製時の、貧溶媒のイオン強度を変化させることにより、ポリアミノ酸ナノ粒子の粒径が制御可能であった。また、各粒径のナノ粒子の分子量を測定しポリアミノ酸の会合数を求めた結果、粒径の増加に伴い会合数の増加が示され、イオン強度によりポリマーの会合数を制御が可能であることが明らかとなった。

第2章では、ポリアミノ酸ナノ粒子のワクチンアジュバントとしての応用を目的として、抗原デリバリー機能と免疫活性化能を検討した。どの粒径のナノ粒子においても抗原の内包が可能であり、単位重量当たり内包した抗原量が同じであった。抗原を担持したナノ粒子を樹状細胞に加え取り込みを調べた結果、粒径が大きいほど、樹状細胞内に抗原を効率的にデリバリーすることが可能であることを見出した。しかし、免疫活性化能においては、粒径が小さいほど、樹状細胞の活性化能力が高いたことが分かった。また、マウスを用いた動物実験から細胞性免疫の誘導を検討した結果、粒径が大きいほど、細胞性免疫が強く誘導されることを見出した。

第3章では、ナノ粒子による細胞性免疫の誘導メカニズムの解明を目的として、赤血球膜を用い、各pHにおけるナノ粒子と細胞膜間の相互作用を検討した。その結果、ナノ粒子は酸性pH領域(5~6.5)のみにおいて溶血活性を示した。また、疎水性アミノ酸の導入率を上げると、溶血活性も共に増加し、疎水基の導入が溶血活性の発現に

重要であることが示唆された。更に、pHが低下すると構造変化によりナノ粒子表面の疎水性度が増加することが分かった。これらの結果から、ナノ粒子は後期エンドソームのpH(5~6)に応答して膜と積極的に相互作用し、細胞質へと脱出し抗原を放出することが明らかになった。

総括では、以上の結果をまとめた。本学位論文においてはポリアミノ酸の会合制御により、粒径が異なるナノ粒子の調製に成功した。また、各粒径のナノ粒子のワクチンアジュバントとしての機能を詳細に検討し、そのメカニズムを明らかにした。本研究は、DDSへの応用を目的とした高分子ナノ粒子の開発において新たな指針を与えるものであり、特に汎用性の高いワクチンアジュバントの開発と実用化に対して重要な知見を提供するものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、生分解性の両親媒ポリアミノ酸からなる粒径制御されたナノ粒子の調製と、得られたナノ粒子のワクチンアジュバントとしての機能と粒子径の効果、およびナノ粒子ワクチンによる免疫誘導メカニズムについて明らかにしたもので、主な成果を要約すると以下の通りである。

本論文は、序章、本論3章、ならびに総括から構成される。

第1章では、納豆由来のポリアミノ酸であるポリ(γ-グルタミン酸)(γ-PGA)にフェニルアラニンおよびトリプトファンを導入した疎水化γ-PGAを合成し、有機溶媒に溶解した疎水化γ-PGAをNaCl水溶液に添加する際の塩濃度を変化させることにより、30~300 nmの範囲での精密なナノ粒子の粒径制御に成功している。また、得られた粒径の異なるナノ粒子の構造・物性評価により、粒子調製時の塩濃度の増加に伴い粒子1個あたりの疎水化γ-PGAの会合数が増加することで、粒径が増大することを明らかにしている。

第2章では、粒径の異なる疎水化γ-PGAナノ粒子のワクチンアジュバントとしての機能評価を目的に、抗原蛋白を内包した異粒径ナノ粒子の調製、および免疫担当細胞(樹状細胞)への抗原蛋白デリバリーと樹状細胞の活性化について検討している。疎水化γ-PGAナノ粒子は粒径に依存せず、抗原蛋白を粒子内に効率よく内包することで可能あることを見出している。また、抗原を内包したナノ粒子は、粒径が大きいほど樹状細胞に効率よく取り込まれ、ナノ粒子の免疫活性化能においては、粒径が小さいほど樹状細胞の活性化能が高くなることを明らかにしており、ナノ粒子の粒径が細胞取込みおよび活性化に大きな影響を与えることを実証している。さらにマウス免疫実験からもナノ粒子ワクチンに対する粒径制御の重要性を示している。

第3章では、疎水化γ-PGAナノ粒子の細胞内での動態およびナノ粒子ワクチンによる免疫誘導メカニズムの解明を目的として、赤血球膜を用い、各pHにおけるナノ粒子と細胞膜間の相互作用を評価している。疎水化γ-PGAナノ粒子は、酸性pH領域(5~6.5)のみにおいて溶血活性を示し、これはpH低下に伴いナノ粒子の構造が変化し、粒子表面の疎水性度の増加に起因していることを明らかにしている。この結果より、ナノ粒子のエンドソームからの細胞質へのエスケープ機構のメカニズムを明らかにしている。

以上のように、本論文は両親媒性高分子の会合数を制御することにより精密に粒径制御されたナノ粒子の調製し、得られたナノ粒子の粒径とワクチンアジュバントとしての機能との相関性について初めて精査したものである。本論文で得られた結果は、抗原デリバリー型アジュバントとしてのナノ粒子の分子設計指針に対して重要な知見を与えるものであり、また普遍性の高いワクチンアジュバントの開発・実用化に向けて大きな貢献をなすものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。