The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ナノ安全科学研究の発展に資する、ナノ粒子の細胞内動態評価
Author(s)	青山, 道彦
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61707
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、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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　青山道彦　　）	
論文題名	ナノ安全科学研究の発展に資する、ナノ粒子の細胞内動態評価

論文内容の要旨

近年、健康医療分野などで、一次元の大きさが100 nm以下に制御されたナノ粒子の開発・応用が推進されている。一方で、ナノ粒子は、従来の100 nm以上の粒子（サブミクロン粒子）と異なる体内/細胞内動態を示すことから、予期せぬハザードを発現することが懸念されている。しかし、ハザードの決定因子である、ナノ粒子の細胞内動態は、未だ十分に理解が進んでいないのが、現状である。本観点から、著者は、世界的にも定性的な局在解析に終始していた、これまでのナノ粒子の細胞内動態研究を発展させ、時空間的な局在観察を基にした、細胞内運動と粒子の物性との連関解析に先駆けて着手した。

本検討では、Rhodamine Bを内包した、一次粒子径が70、300、1000 nmの非晶質シリカ粒子（nSP70、SP300、SP1000）を使用した。まず初めに、細胞内に1粒子で存在するナノ粒子をリアルタイム観察可能な系を構築する目的で、斜光照明蛍光顕微法をナノ粒子の観察に適用した。その結果、細胞内で凝集している粒子のみならず、1粒子で存在しているnSP70、SP300、SP1000をも観察し得ることが示された。次に、細胞内での運動を観察・追跡し、その運動を客観的に評価可能な拡散運動・能動運動に着目した解析を行った。その結果、拡散運動を示す粒子と能動運動を示す粒子の割合は、粒子径による違いが認められないのに対し、粒子径が減少するにつれ、拡散運動・能動運動共に運動性が増加することが示された。さらに、nSP70・SP300の少なくとも一部の粒子は、微小管依存的に能動運動していることを見出した。そこで、nSP70とSP300の運動性が異なるメカニズムの解明に向け、微小管依存的な能動運動を示すエンドソームに着目した。初期エンドソーム、後期エンドソーム、リソソームといった成熟度が異なる小胞へのnSP70、SP300、SP1000の局在を解析した結果、粒子径が小さいシリカ粒子ほどリソソームに多く局在し、粒子径が大きい粒子ほど、初期/後期エンドソームに多く局在することが見出された。従って、エンドソームへの局在の違いが、nSP70とSP300の運動性の違いに関連している可能性が考えられた。次に、各種小胞に内包された粒子の運動性を評価したところ、粒子径が同じであれば、局在する小胞の違いは運動性に影響を与えないものの、後期エンドソーム・リソソームに内包されたSP300は、同種の小胞に内包されたnSP70より運動性が低いことが示された。従って、粒子を内包したエンドソームに与える影響の違いが、nSP70とSP300の運動性が異なる機序の一つとして考えられた。

加えて、次に、細胞内取込において鍵となる蛋白質の同定を目的に、PEG化によるナノ粒子の貪食細胞への取込抑制と関連することが報告されたclusterinに着目した解析を行った。その結果、血漿由来プロテインコロナは、血清由来プロテインコロナと比べ、貪食細胞に対する高い取込抑制能を示すと共に、結合しているclusterinの量が多いことが見出された。従って、プロテインコロナ中のclusterinの量の違いが、シリカナノ粒子、銀ナノ粒子の細胞内移行量と相関し得ることが示された。

以上、本検討では、シリカナノ粒子の細胞内運動性と粒子の物性の連関解析を先駆けて推進した結果、拡散運動・能動運動の観点から、粒子径が細胞内運動に及ぼす影響を実証するなど、ナノ粒子特有の細胞内動態の一端を明らかとした。さらに、メカニズム解明に向けた、更なる研究が重要ではあるものの、粒子径の増加に伴い、シリカ粒子を内包したエンドソームの運動性が低下し得るという、基礎細胞生物学的に新たな知見を見出した。従って、本研究の推進は、ナノ粒子の安全性・有効性の担保は勿論のこと、エンドソームなどの細胞の膜動態機構の理解にもつながり得ると期待される。また、ナノ粒子の細胞内動態、特に細胞内取り込みにおいて重要な役割を果たしているプロテインコロナに着目し、血清・血漿由来のプロテインコロナに含まれるclusterinが、貪食細胞に対する取込阻害において重要な役割を果たすことを見出した。今後、clusterinに加え、ナノ粒子の細胞内取込に関与する蛋白質や該当蛋白質との結合性に関わる粒子の物性などを同定することで、ナノ粒子の細胞内移行の制御法の構築につながることが期待される。以上の研究は、細胞内動態研究において、これまで評価の進んでいなかった点を明らかとした重要な知見であり、今後、このような包括的な細胞内動態研究を推進することで、ナノ粒子の安全性や有効性の担保を目指した応用研究に資する基盤情報が得られるものと期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　青山道彦　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	堤　康央
	副 査	教授	八木清仁
	副 査	教授	小比賀　聡

論文審査の結果の要旨

本学位論文では、ナノテクノロジー産物（ナノマテリアル）の一例として、非晶質ナノシリカを用い、その細胞内運動性の定量的解析法をはじめて確立し、そのうえで、物性と細胞内運動性の連関解析に先んじて取り組み、以下の貴重な知見等を得たものである。

1. 斜光照明蛍光顕微法を駆使することで、細胞内に1粒子で存在する非晶質ナノシリカの細胞内運動の定量的解析法を初めて確立した。

2. 非晶質ナノシリカは細胞内で高い運動性を示すものの、100nmサイズ以上の非晶質シリカの細胞内運動性は低下していること、特に1μmの粒子は、微小管依存的な素早い能動運動は示さないことを認めた。

3. エンドソームに内包された非晶質ナノシリカはエンドソームの運動性には影響しないものの、300 nmの非晶質シリカは、粒子を内包した後期エンドソーム・リソソームの運動性を抑制することを最初に発見した。

以上、本学位論文では、ナノテクノロジー産物（ナノマテリアル）の一例として、非晶質ナノシリカを用い、その細胞内運動性の定量的解析法を確立し、物性と細胞内運動性の連関解析を先駆けて追究したものである。その結果、「ナノ粒子はサブミクロンサイズ以上（100nm以上）の粒子よりも細胞内運動性が高いこと」を拡散運動・能動運動の観点から解明した。さらに、粒子径が増加することにより、粒子を内包したエンドソームの運動性が低下し得るという、基礎細胞生物学的に新たな知見を見出した。以上、本研究で構築したナノテクノロジー産物（ナノマテリアル）の観察手法、得られたナノテクノロジー産物（ナノマテリアル）の細胞内運動と粒子径の関係に関する知見は、その細胞内運動を解析、評価、活用の道を拓くものであり、ナノテクノロジー研究を大きく進展させ得るものと期待される。

以上、ナノテクノロジー研究の基礎から実用化に至る領域で、新たな知見・概念を提示・発見したことにより、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める