審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　　名　　陳　**煒昕**（ちん　うぇいしん）

安全な組織再生医療を実施するために、細胞を取り扱う細胞工学分野において充分に機能制御された細胞種の提供が必要とされる。タンパク質は細胞の機能発現に関与する重要なバイオ分子であり、これを利用した細胞機能制御が試みられている。しかしながら、タンパク質は高分子量、かつ親水性であるために細胞膜透過が容易でなく、細胞内への送達が困難な場合が多い。また、タンパク質は細胞内の酵素により簡単に加水分解されてしまう。この問題を解決すべく、本研究ではマテリアル工学の視点から、細胞内へ生理活性タンパク質を送達するためのキャリアを設計・調製し、その特性評価を実施している。

本学位請求論文は６章から構成されている。

第１章では研究背景を説明し、本研究の位置づけを行っている。生体組織の再生には、構築要素となる種々の機能を持つ細胞の機能制御が必要である。細胞機能の制御において、タンパク質の細胞内送達は優れた方法と考えられる。細胞内に容易に移動でき、外部からの信号にて最適な条件でタンパク質を放出できる光応答性を有するポリマーナノ粒子は、タンパク質送達の有効なキャリアーとして期待される。ここでは光照射の波長およびエネルギーを調節することにより、材料特性を迅速、かつ効率的に変化させる最も好ましい方法の一つであると考え、光照射で解離するユニットのナノ粒子表面への導入を企画している。ナノ粒子表面に結合したタンパク質は、任意の時間および場所で、光解離反応とともに放出させることが可能である。この作業仮説を証明するために、タンパク質の非特異的吸着や細胞に対して影響の少ないポリマー表面を構築することを基盤として、光反応性ナノ粒子の創製を研究目的としている。

第２章では、光反応性ポリマーナノ粒子のための材料設計について記述している。細胞親和性を有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)、水中での溶存状態を制御するための疎水性モノマー、および光反応性モノマーを利用することで、光反応性を有する両親媒性MPCポリマー(PMB-PL)を合成している。PMB-PLの光反応特性について、分光学的手法により示し、光強度を最適化することで、全体の光化学反応が、1 分間以内に完了することを見いだしている。また、PMB-PL 水溶液の表面張力は、ポリマー濃度の増加とともに減少した。これは PMB-PL が水溶液中でポリマー会合体を形成することを示している。この結果より、PMB-PL を乳化剤および表面被覆材とする溶媒蒸発法に適用できることを示している。

第３章では、PMB-PL 会合体の内部にポリ乳酸 (PLA) を芯ポリマーとして導入した光反応性 PMB-PL/PLA ナノ粒子の調製に関して記述している。調製時のポリマー濃度、温度、乳化

時間を調節することで、粒径 100nm 程度、表面電位がほぼ中性のナノ粒子を調製することに成功した。ナノ粒子表面の X 線光電子分光解析により、ナノ粒子表面上へのホスホリルコリン基の集積を確認している。また、ナノ粒子に対するタンパク質吸着試験を実施し、その吸着量が未処理の PLA に比較して少なくなることから、タンパク質の非特異的吸着の抑制を見いだした。これはホスホリルコリン基の集積表面に起因するものであり、細胞親和性に優れることが期待された。

第４章では、光反応性 PMB-PL/PLA ナノ粒子におけるタンパク質の固定化、および光照射に伴う放出過程を議論している。蛍光分光学的手法により、タンパク質が PL ユニットに存在するカルボキシル基を介してナノ粒子表面上に結合されたことを確認している。さらに、光照射 1 分間後に、固定化タンパク質の 90%以上が脱離していることを示した。これにより、PMB-PL はナノ粒子表面で各ユニットの特徴を活かして機能することを明らかにした。PMB-PL/PLA ナノ粒子は、タンパク質を細胞内輸送できると同時に、任意の場所での放出特性を有することが期待される。

第５章では、光反応性 PMB-PL/PLA ナノ粒子の細胞内への取り込み、および光照射による細胞内でのタンパク質の放出特性を議論している。細胞生存率に対する光照射の影響を評価し、光強度を 28mW／cm^2 として 1-3 分間の光照射を行った後でも、ヒト子宮がん由来 HeLa 細胞の生存率は 90%以上維持されていることを示し、これにより波長 350nm の短時間の光照射では細胞生存率に影響しないと結論している。また、PMB-PL/PLA ナノ粒子を添加した培養液を用いて HeLa 細胞を 6 時間培養した後でも、細胞生存率は 97%以上であり、ナノ粒子の細胞毒性が低いことを示している。細胞膜を効率的に透過させるために細胞膜透過性ペプチドに着目し、これをナノ粒子表面上にタンパク質と共固定することで、細胞内に取り込ませることに成功した。さらに、光照射によって細胞に導入された光反応性ナノ粒子からタンパク質が放出されることを定性的に観測した。

第６章は総括である。

本研究では、細胞内へタンパク質を送達する光反応性ナノ粒子の創製に関わる基盤マテリアルの創製と表面特性に関わるもので有り、非特異的吸着の抑制と効率の良い光反応系の複合化、さらに生理活性ペプチドの機能を利用して細胞膜透過を実現し、細胞内でのタンパク質の放出制御を実現している。このマテリアル設計概念は、細胞への分子送達とそれによる細胞機能制御に結びつき、今後の組織再生医療につながる細胞工学の発展を誘引すると考えられる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。