HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies of Cellular Uptake of Surface-engineered Triangular-shaped Gold Nanoparticles [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	南原, 克行
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第12783号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65427
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Katsuyuki_Nambara_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（理学）　氏名　南原　克行

学 位 論 文 題 名

Studies of Cellular Uptake of Surface-engineered Triangular-shaped Gold Nanoparticles
（表面修飾三角形金ナノプレートの細胞取り込みに関する研究）

近年、目的とした細胞内へ薬剤を輸送するドラッグデリバリーシステム（DDS）に関する研究が盛んに行われている。DDS において重要な点は、細胞膜という障壁を効率よく突破することであり、そのための様々な研究が報告されている。その中でもキャリアーを用いる方法が数多くある。代表的なキャリアーとして、リポソーム、カーボンナノチューブや量子ドット等が主に用いられており、これらのキャリアーに薬剤を担持、又は内包することで細胞内への薬剤輸送を達成してきた。しかしながらキャリアーの作製においては、薬剤内包効率が悪いことや、キャリアー自体の細胞毒性が高いため、新たな手法が望まれている。

これらの問題点を解決するために、キャリアーとして金ナノ粒子に着目した。金ナノ粒子は、サイズ・形状のコントロールが容易であり、また生体適合性が高いことから、薬剤キャリアーとして DDS のみならず治療や診断に用いられている。細胞内への金ナノ粒子の取り込みは主にエンドサイトーシス経路で取り込まれ、エンドサイトーシスを誘起する最適なサイズが直径約 40 nm であることや、金ナノ粒子の形状によりエンドサイトーシスの効率が変化することが知られている。しかしながら金ナノ粒子の形状・サイズが細胞への取り込みに及ぼす影響については不明な点が多い。

金ナノ粒子の細胞取り込みにおいては、(1) 細胞膜への接着及び (2) 細胞の能動的な取り込みという 2 つの過程を必要とする。金ナノ粒子の形状の中で、細胞への接着には平たい構造が、細胞への取り込みにおいてはシャープな構造が有利であることがシミュレーションにより明らかになりつつある。そこで本研究では、細胞膜との相互作用を詳細に解析すること及び細胞内への輸送効率を上げることを目的として金ナノ粒子の形状に着目した。特に三角形金ナノプレートに着目し、その細胞取り込みについて詳細に解析した。

第 1 章は、序論であり、本研究の背景及び目的について言及した。

第 2 章では、様々なサイズ及び形状を持つ金ナノ粒子を作製した。既報に従い三角形金ナノプレート及び金ナノ粒子を作製した。電子顕微鏡観察により、三角形金ナノプレートは、一辺が 46、55、72、94 nm のものを、金ナノ粒子は直径が 22、39、66 nm のものを作製した。表面リガンドについては、細胞毒性を持たないアニオン性で、かつ薬剤としてタンパク質で修飾できるように、nitrilotriacetic acid（NTA）を用いて表面交換反応を実施した。表面交換反応については、表面交換前の金ナノ粒子の表面保護材である CTAB や CTAC が

残っていないことを NMR で確認した。また、金ナノ粒子表面のリガンドの被覆率について調べた結果、同じ表面積を持つ粒子間で比較した場合、三角形金ナノプレートは金ナノ粒子より被覆率が高いことが分かった。三角形金ナノプレートは表面の金原子が(111)面であり、金ナノ粒子は(110)面と(111)面の両方が存在する。(111)面は表面交換反応が速いことが知られており、これが三角形金ナノプレートの高いリガンド被覆率に寄与していると考えられる。

第 3 章では、作製した金ナノ粒子の細胞取り込みについて、細胞外の物質を取り込む様式が異なる 2 種類の細胞（RAW264.7 細胞及び HeLa 細胞）を用いて比較した。ICP 発光分析により 24 時間培養後の金ナノ粒子の細胞取り込み量を解析した結果、どちらの細胞においても、三角形金ナノプレートはそのサイズが大きいほど細胞取り込み量が多く、金ナノ粒子はサイズが小さいほど細胞取り込み量が多いことが分かった。細胞の電子顕微鏡観察からどちらの粒子もエンドソームに取り込まれていることが分かったものの、取り込み様式について不明であった。そこで各エンドサイトーシス経路を阻害して金ナノ粒子の取り込み量を比較したところ、三角形金ナノプレートはサイズに関係なくクラスリン介在型のエンドサイトーシスであることが示唆された。一方金ナノ粒子は、サイズが小さいとクラスリン介在型が、サイズが大きいとクラスリン非介在型のエンドサイトーシスであることが示唆された。さらに細胞膜への金ナノ粒子の接着とその形状の関係を調べた結果、三角形金ナノプレートは金ナノ粒子より細胞膜への接着が有利であることが示唆された。金ナノ粒子のサイズ及び形状により、細胞取り込み、特に細胞膜との相互作用が異なることが分かり、三角形金ナノプレートは細胞取り込みに有利な形状であることが示された。

第 4 章では、これまで作製した金ナノ粒子に、抗原タンパク質であるヘマグルチニン（HA）を Ni^{2+}-NTA/His-tag の結合により修飾した。HA の修飾量を western blotting により解析した結果、総修飾量は金ナノ粒子のサイズや形状に依存しなかった。しかしながら大きいサイズの金ナノ粒子においては、非特異吸着で結合している HA の割合が大きかった。次に表面に修飾した HA の構造安定性について CD スペクトルにより評価した結果、大きいサイズの金ナノ粒子はタンパク質の二次構造に変化が起きていることが示された。一方同じ表面積を持つ三角形金ナノプレートでは HA の二次構造が保持されていることがわかった。HA 修飾金ナノ粒子の細胞取り込み量を評価した結果、三角形金ナノプレートは金ナノ粒子よりも細胞内に多量の HA を輸送可能であることが分かった。さらにマウスを用いたこれら HA の抗体産生量を定量した結果、三角形金ナノプレートは金ナノ粒子より抗体産生量が多いことが分かった。以上の結果、タンパク質の細胞内輸送において三角形金ナノプレートは金ナノ粒子より効率の良いキャリアーであることが分かった。

第 5 章では、本学位論文における総括を行った。

本研究により、三角形金ナノプレートの細胞内への薬剤輸送キャリアーとしての有用性を明らかにすることが出来た。本研究の成果は、今後の DDS における金ナノ粒子のデザインに新たな知見を与えることが出来る。