

## 学位論文題名

## Glyconanoparticles : molecular design, synthesis and live cell/animal imaging

(糖鎖ナノ微粒子の分子設計、合成および生きた細胞・動物のイメージングへの応用)

## 学位論文内容の要旨

人の体内に存在するタンパク質のうち約半数は糖鎖による翻訳後修飾を受けており、細胞の増殖や分化、免疫、がんの転移や浸潤、シグナル伝達、感染や炎症などの生命現象に深く関わっていることが知られている。しかしながら、これらの知見は、試験管や培養器などの中でヒトや動物の組織を用いた *in vitro* 試験系で得られたものが多い。次なる興味は、これらの糖鎖分子が実際に生体内 (*in vivo*) でどのようなプロセスを経てどのような生体内分布を示すかをリアルタイムの動画で明らかにし、糖鎖機能を理解し、診断や治療に応用していくことである。近年、常磁性元素や陽電子放射性原子をプローブとする MRI や PET イメージングに加え、蛍光イメージングもマウスなどの小動物では比較的容易に *in vivo* イメージングが行えるようになってきた。本研究では、比較的安価で操作に熟練の操作を有せず、リアルタイムイメージングが可能な蛍光イメージングを用いて、糖鎖体内動態解析を行った。

蛍光プローブとして蛍光性ナノ微粒子 (QDs) に着目した。QDs は、一般的な有機色素分子や蛍光タンパク質に比べ、退色しづらい、量子収率が高いなどの魅力的な特徴を持つ。また、QDs 表面には糖鎖を多価に提示することができるため、糖鎖クラスター効果による糖鎖認識タンパク質の高感度検出が期待される。しかしながら、QDs は半導体原子からなるナノ粒子であるため、そのままの構造では水溶液に溶けない。そのため、QDs 表面を親水性化合物で被覆し、水溶液中での凝集を防ぐこと (=水溶化) が必須である。ホスホリルコリン誘導体である 11-mercaptoundecylphosphorylcholine (PC) と、アミノオキシ基を有する 11,11'-dithio bis [undec-11-yl 12-(aminooxyacetyl)amino hexa(ethyleneglycol)] にて QDs を被覆することで、水溶液中での分散性、pH 耐性、長期安定性において、従来の水溶性 QDs よりも優れていることがわかった。続いて、アミノオキシ基に糖鎖誘導体や糖脂質誘導体を化学選択的に反応させ糖鎖蛍光ナノ微粒子を定量的に合成した。その後、様々な糖鎖蛍光ナノ微粒子 (glyco-PC-QDs) をそれぞれ培養細胞やヌードマウスの尾静脈に投与して、蛍光イメージングを行った。

細胞イメージングの結果、glyco-PC-QDs はエンドサイトーシスによって細胞に

取り込まれリソソーム内に局在していた。その取込み効率は糖鎖の種類ごとに異なり、特に GD1a 糖脂質 (GD1a-PC-QDs) が最も取り込まれた。

動物イメージングの結果、シアル酸 (Neu5Ac-PC-QDs) およびコントロール (PC-QDs) は全身に分散し、グルコース (Glc-PC-QDs)、マンノース (Man-PC-QDs)、フコース (Fuc-PC-QDs)、ラクトース (Lac-PC-QDs)、*N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc-PC-QDs)、*N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc-PC-QDs) は投与後すぐに肝臓に集積した。また、GlcNAc-PC-QDs からの種々の糖転移酵素反応によって、LacNAc-PC-QDs、Le<sup>x</sup>-PC-QDs、sialyl LacNAc-PC-QDs、sialyl Le<sup>x</sup>-PC-QDs の合成を行い、動物イメージングを行った。Le<sup>x</sup>-PC-QDs は LacNAc-PC-QDs、Lac-PC-QDs と同様に注射後すぐに肝臓に集積し始め、1 時間後には消光した。一方、sialyl LacNAc-PC-QDs と sialyl Le<sup>x</sup>-PC-QDs は 2 時間経過しても体内で検出され、それぞれの臓器分布が異なった。これは個々のシアリル糖鎖の構造の違いが最終的な生体内分布を制御しているものと考えられる。

本研究により、糖鎖ナノ微粒子を用いることで、糖鎖の生物学的機能解明、糖鎖を利用したドラッグデリバリーのための要素技術を確立した。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	西村	紳一郎
副査	教授	綾部	時芳
副査	教授	金城	政孝
副査	教授	出村	誠
副査	教授	門出	健次

学位論文題名

## Glyconanoparticles : molecular design, synthesis and live cell/animal imaging

(糖鎖ナノ微粒子の分子設計、合成および生きた細胞・動物のイメージングへの応用)

近年、糖鎖ナノ微粒子を用いた研究が着目されている。とりわけ、分子イメージングやドラッグデリバリーシステムでの応用を指向した様々なナノ微粒子に関する発表論文数は今世紀に入り指数関数的に激増している。金コロイド(金ナノ微粒子)のように古くて新しい素材から蛍光ナノ微粒子(量子ドット)や磁性ナノ微粒子まで様々な材料を用いた興味ある研究が報告されている。今後さらに糖鎖を含む生体分子のイメージングはもとより多様な薬剤や遺伝子の特異的キャリア等としての実用化が大いに期待されている。しかし、実際にナノ微粒子を *in vivo* で高次利用するにはいくつかの課題がある。例えば、①粒子径の制御、②安全性の評価、③非特異吸着や凝集の排除、④糖鎖や薬剤の担持法、さらに④臓器指向性などが考えられる。本論文はこのような現況において、これらの課題をクリアする新しいナノデバイスを開発し、生きた細胞や動物への応用を目的としたものである。

第二章では、11-mercaptopundecylphosphorylcholin と 11,11'-dithio bis [undec-11-yl 12-(aminooxyacetyl)amino hexa(ethyleneglycol)]により蛍光ナノ微粒子を被覆する方法を確立した。次いで、微粒子表面のアミノオキシ基に対して様々な糖鎖誘導体を結合させ糖鎖蛍光ナノ微粒子を効率的かつ簡便に合成している。蛍光相関分光法を用いた物性評価により、従来の水溶化量子ドットとの性質の大きな相違がホスホリルコリン基による非特異的相互作用の排除によることを証明している。

第三章・第四章では、第二章で作製した様々な糖鎖蛍光ナノ微粒子を生きた細胞や動物に投与して蛍光イメージングを行い、糖鎖の構造が生体内分布の違いの原因となる事を見出している。分子イメージングのみならず、広くドラッグデリバリーシステム等にも応用できるツールとしての可能性があることも示した。

このように、本論文は、分子イメージングや医薬品開発さらに細胞生物学等の基礎研究におけるブレークスルーとなる新しいツールを開発した点で高く評価され、今後の新領域での研究開発などにつながることを期待される。

よって著者は、北海道大学博士(生命科学)の学位を授与される資格あるものと認める。