

# Functional Design of Bioadaptive Nano- Polysaccharide Architectures Constructed by Pickering Emulsion Templating

李, 淇

<https://hdl.handle.net/2324/7157393>

---

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (農学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

氏名	李 洪 (Li Qi)			
論文名	<b>Functional Design of Bioadaptive Nano-Polysaccharide Architectures Constructed by Pickering Emulsion Templating</b> (ピッカリングエマルジョン鋳型法による生体適応性ナノ多糖構造体の機能設計)			
論文調査委員	主査	九州大学	教授	北岡 卓也
	副査	九州大学	教授	片倉 喜範
	副査	九州大学	准教授	一瀬 博文
	副査	九州大学	准教授	横田 慎吾

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、これまで分子レベルで議論されてきた天然多糖類の生物活性に対して、ナノサイズの固体である構造多糖ナノファイバーの生体機能に着目し、表面化学修飾やピッカリングエマルジョン (Pickering emulsion: PE) 形成能を活かしたナノマイクロ構造体の機能設計により、細胞培養足場基材や炎症性サイトカイン産生を誘導するアジュバントとしての応用可能性を見出したものである。

まず、TEMPO 酸化セルロースナノファイバー (TEMPO-oxidized cellulose nanofiber: TOCNF) とキトサンナノファイバーを用いて、PE 鋳型法と凍結乾燥法を組み合わせることで、細胞培養に適した 3 次元多孔質基材を設計することに成功している。各ナノファイバー単独では水中油滴型の安定な PE 形成は困難であったが、長繊維キトサンナノファイバーで粗乳化後に短繊維 TOCNF で PE 表面を被覆する 2 段階乳化プロセスにより、TOCNF で油滴の界面層を密にしつつ、油滴周辺のネットワーク構造を強化することで、PE の安定化を達成している。凍結乾燥により多孔質基材を調製し、マウス線維芽細胞 NIH/3T3 とヒト肝がん細胞 HepG2 を培養した結果、細胞毒性がなく、基材内部でも細胞増殖が可能で、高い生体適応性を明らかにしている。特に、HepG2 細胞は基材内部でスフェロイドを形成することで、市販の平面培養用プラスチック基材での培養より、10 倍以上高い解毒酵素活性を示すことを見出し、生体外で生体内の肝機能を高発現することに成功している。

次に、TOCNF 安定化 PE とキチンナノファイバー安定化 PE を設計し、炎症性プログラム細胞死のピロトーシスに特徴的な挙動を見出している。エマルジョンタイプのワクチンアジュバントの油剤に用いられるスクアレンと多糖ナノファイバーの組み合わせを検討し、多糖ナノファイバー単体やスクアレンとの単純混合物は全く毒性がないにも関わらず、多糖ナノファイバー安定化 PE マイクロ粒子がヒト HepG2 細胞や肝マクロファージのマウス Kupffer 細胞 KUP5 に対して明瞭な細胞毒性を示すことを、用量依存的な乳酸デヒドロゲナーゼ放出挙動で明らかにしている。この結果は、従来の界面活性剤安定化エマルジョンや  $\beta$ -リン酸三カルシウムナノ粒子安定化 PE と比較しても顕著であり、超低濃度で作用している。さらに、単に細胞毒性を示すだけではなく、多糖 PE で処理した KUP5 細胞は、細胞膨潤、ブレブ形成、カスパーゼ-1 の活性化、インターロイキン-1 $\beta$  産生といった炎症性プログラム細胞死のピロトーシスに特徴的な挙動を示している。これらの結果は、多糖 PE が炎症反応のメディエーターとしての生物活性を示しており、抗がん剤やワクチンのアジュバント設計指針に新たな知見を与える。

さらに、多糖 PE のアジュバント機能を精査するため、異なる表面官能基を有する 4 種類の CNF、

すなわち、未修飾 CNF、表面リン酸化 CNF、表面硫酸化 CNF (Sulfated CNF: SCNF)、TOCNF を用いてスクアレンを乳化し、各々の多糖 PE の生体適応性の検証を行っている。CNF 安定化 PE は液滴サイズが大きく不均一であったが、多糖ナノファイバー表面に酸性官能基を導入することで安定性が向上することを見出している。特に、SCNF 安定化 PE マイクロ粒子は高い安定性を示し、KUP5 細胞に供した結果、活性酸素種の発生とリソソームのダメージ指標であるカテプシン B の放出、すなわち炎症性反応の誘導が確認されている。さらに、抗原モデルとしてオボアルブミンを担持したところ、SCNF 安定化 PE の高い安定性と大きな比表面積により、極めて高い担持効率を達成している。多糖 PE はマクロファージへの効率的な取り込みに適した優れた変形性と柔軟性を有することが期待され、新規ワクチンアジュバントのモダリティとして有用である。

以上要するに、本論文は、代表的な森林・海洋バイオマスであるセルロースやキチンが有するナノファイバー構造に着目し、エマルジョン形成により新たな生体適応性を見出したものである。細胞培養用多孔質足場基材としての構造-機能設計に加えて、細胞内取り込みによるパイロトーシス誘導が惹起するアジュバント機能を見出しており、新たな創薬モダリティとしても期待され、サステイナブル資源科学および生物資源化学の発展に寄与する価値ある業績と認める。よって、本研究者は博士（農学）の学位を得る資格を有するものと認める。