

論文審査の結果の要旨

氏名：木原慶彦

博士の専攻分野の名称：博士（工学）

論文題名：細胞への外来因子の特異的導入法に関する研究

審査委員：（主査）教授 春木 満

（副査）教授 根本修克 准教授 石原 務 准教授 平野展孝

日本大学松戸歯学部教授 吉垣純子

薬物や遺伝子などの外来因子を細胞に特異的に導入する方法の開発は、医療や産業への生命科学の応用において重要な課題となっている。そのひとつとして医療分野では、薬効を最大限に発揮させるために、薬物をミセルやエマルジョンなどのキャリアに保持し、目的細胞に送達する技術がますます重要になってきている。癌細胞などに薬物を選択的に送達するためには、細胞表面の標的分子に特異的に結合する分子を薬物キャリアに連結する必要がある。クリック反応は、生理的条件下で効率よく進行し、極めて特異的であるため、その連結法として適している。以上の背景から本論文では、以下に具体的に記すように、このようなキャリアとして安全性が高く食品添加物などにも用いられているポリシロキサンに注目し、四級イミダゾリウム化によりアルキンを導入した両親媒性かつクリック反応可能なポリマーの合成に成功している。さらに、このポリマーを用いてラベル分子やターゲティング分子を連結したナノエマルジョンを製し、細胞特異的に薬剤を送達するキャリアとして期待できることを示している。さらに、このポリマーが細胞への遺伝子の導入にも有用である可能性も示している。また、遺伝子治療や細胞を用いた物質生産では、導入した遺伝子をさらにゲノムに特異的に組み込む手法の開発も重要となる。本論文では、放線菌 TG1 ファージ・インテグラーゼを用いて、ゲノムの特定の位置に効率良く外来遺伝子を導入することができることを示している。以上により、本論文では薬物・遺伝子送達および遺伝子導入に有用である新たな手法を提供し、医学や工学への寄与が期待される新規性の高い研究成果がまとめられている。

本論文は四章から構成されている。

第一章は序論であり、細胞への外来因子導入、薬物送達システム (DDS)、ポリシロキサンの特性、クリック反応、外来 DNA のゲノムへの導入について概説し、本論文の目的、意義および構成について述べている。

第二章は、四級イミダゾリウム化反応を利用してアルキンを導入した新規ポリシロキサン誘導体の合成に成功したことを報告している。さらに、このポリマーは両親媒性であり、大豆油を乳化して直径約 150 nm のナノエマルジョンを形成できることを述べている。加えて、このナノエマルジョンに薬物モデルとしてナイルレッドを内包できることを示し、薬物キャリアとして利用可能であることを明らかにしている。さらに、代表的なクリック反応である、銅(I)触媒存在下でアジドとアルキンを連結するフイスゲン反応により、アジド化した蛍光ラベル分子や肝細胞へのターゲティング分子であるラクトースをこのポリマーに連結してナノエマルジョンを形成できることを明らかにしている。また、このポリマーが DNA と複合体を形成することも示している。さらに、ラクトースを付加したナノエマルジョンおよび DNA 複合体は、ラクトースを付加していないものに比べて、肝細胞へ多く取り込まれることを明らかにしている。

第三章は、放線菌 TG1 ファージ・インテグラーゼによる異種微生物ゲノムへの外来遺伝子の導入について検討を行っている。まず、TG1 インテグラーゼを発現させた大腸菌のゲノムに組換え部位を導入し、これを介して～2 kbp または～10 kbp のプラスミドを挿入することに成功している。また、attP を挿入した大腸菌ゲノムへの attB 含有プラスミド DNA の組換えは、attB を挿入した大腸菌ゲノムへの attP 含有プラスミド DNA の組換えよりも効率的であることが示された。さらに、ゲノムの複製開始点付近に導入する場合に導入効率が高いことを明らかにしている。また、TG1 インテグラーゼの発現量を多くした場合に～10 kbp のプラスミドの導入効率が向上することを明らかにしている。

第四章は、本研究で得られた結果を総括して述べている。

以上述べたように、本論文は、アルキンを有する新規ポリシロキサン四級イミダゾリウム塩がクリック反応により容易にターゲティング分子を連結できる有用な薬物・DNA 送達材料となり得ること、また TG1 インテグラーゼが異種微生物への長鎖 DNA の部位特異的導入に有用であることを初めて示し、独創性の高い

研究成果がまとめられたものであると判断できる。

このような研究成果が得られたことは、論文提出者の豊富な学識と優れた研究能力を裏付けるものである。

よって本論文は、博士（工学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成27年2月23日