

## 【平成24年1月-3月授与分】博士學位論文内容の要旨 及び審査の結果の要旨

<https://hdl.handle.net/2324/25919>

---

出版情報：2012-12-10. 九州大学  
バージョン：  
権利関係：



氏名・(本籍・国籍)	こじま りえこ 小島 理恵子 (福岡県)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第72号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	MOLECULAR MECHANISM FOR LIGAND RECOGNITION OF HUMAN IMMUNE COSIGNALING MOLECULE CD160 (ヒト免疫系共シグナル分子CD160のリガンド認識の分子機構)
論文調査委員	(主査) 教授 木村 誠 (副査) 教授 服巻 保幸 教授 川畑 俊一郎 准教授 岡 敏彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

T細胞は感染を防ぐ生体防御反応において中心的な役割を果たしており、T細胞抗原受容体 (TCR) を介して活性化され、免疫応答が始まる。T細胞の活性化には、TCRが抗原由来ペプチド-MHC複合体を認識することに加えて、補助刺激シグナルが必要である。補助刺激シグナルは、T細胞上の補助刺激受容体と抗原提示細胞上の補助刺激分子との相互作用によりT細胞へ伝達される。さらに補助刺激受容体には活性型と抑制型のものがあり、それぞれ活性、抑制性のシグナルを伝達するため、最終的なT細胞の活性化は、これらの補助刺激受容体からのシグナルバランスによって複雑に制御されている。HVEM (ヘルペスウイルス侵入仲介因子) は、抑制型受容体であるBTLA、活性型受容体であるLIGHTに認識されることが分かっている。さらに近年、HVEMの新しい抑制型受容体としてCD160が同定され、CD160/BTLA/LIGHT/HVEM経路として注目を集めつつある。しかし、分子レベルでの相互作用や、これらの受容体を介した最終的なT細胞へのシグナル伝達がどのように決定されるのかなどについて、明らかでない点が多い。

我々は今回、(1)CD160が単量体で存在していること、(2)CD160とHVEMがダイレクトに結合すること、(3)CD160とBTLAがHVEMへの結合に対して競合すること、(4)BTLAへの結合親和性が低くなるHVEMのアミノ酸変異体が、CD160への結合親和性にも影響すること、(5)LIGHTがCD160

および BTLA の HVEM への結合に対して競合しないことなどを、表面プラズモン共鳴 (SPR) を用いた相互作用解析により明らかにした。これらの結果より、CD160 と BTLA の HVEM 結合領域は、オーバーラップしていると考えられる。今後は、これらの分子認識の構造的な基盤の解析を行い、HVEM が絡んだ複雑な認識をより詳細に分子レベルで明らかにし、T 細胞の活性制御機構の解明を目指す。

## 論文審査の結果の要旨

T 細胞は生体防御反応において中心的な役割を果たしており、T 細胞抗原受容体を介して活性化され免疫応答が始まる。さらに、T 細胞の活性化は T 細胞上の補助刺激抑制型受容体および活性型受容体と抗原提示細胞上の補助刺激分子との相互作用により複雑に制御されている。HVEM (ヘルペスウイルス侵入仲介因子) は、抑制型受容体である BTLA、活性型受容体である LIGHT に認識されることが知られている。近年、HVEM の新しい抑制型受容体として CD160 が同定され、CD160/BTLA/LIGHT/HVEM 経路として注目されているが、その分子機構は不明であった。本研究では、ヒト細胞および大腸菌を用いて CD160 を調製し、その生化学的性質を明らかにするとともに、HVEM への結合を表面プラズモン共鳴法を用いて検討した。

まず、CD160 の細胞外領域をヒト HEK293S 細胞および大腸菌を用いて調製し、その分子量をゲルろ過クロマトグラフィー、電気泳動、および質量分析計により測定した結果、CD160 は溶液中では単量体として存在していることを確認した。

次に、大腸菌を用いて調製した CD160 および BTLA の HVEM への結合を表面プラズモン共鳴法を用いて検討した結果、CD160 は HVEM と解離定数  $0.34 \mu\text{M}$  で直接結合すること、さらにその結合は BTLA によって影響されることを明らかにした。続いて、HEK293S 細胞を用いて調製した 3 種の部位特異的変異体 HVEM (P17A、Y23A、V36A) に対する CD160 と BTLA の親和性を検討したところ、2 種の変異体に対しては両受容体とも同程度の親和性を示したが、1 種の変異体 (Y27A) に対しては異なった親和性を示した。これらの結果から、HVEM の CD160 と BTLA に対する結合領域は部分的に重なっていることが示唆された。最後に、LIGHT が CD160 と BTLA の HVEM への結合に対して競合しないことを表面プラズモン共鳴法により明らかにしている。

以上の結果は、新たに同定された T 細胞補助刺激抑制型受容体 CD160 の生化学的性質を明らかにするとともに、CD160 を介した T 細胞の活性制御機構を分子レベルで解明するための端緒となるもので、構造生物学分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士 (システム生命科学) の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	アン    カン キョ 晏    涵 虚 (中国)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第73号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Studies on the Lifespan Extension and Neuroprotection Effects of Electrolyzed Reduced Water (電解還元水の寿命延長及び神経保護効果に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 白畑 實 隆 (副査) 教授 木村 誠                      准教授 片倉 喜 範

## 論 文 内 容 の 要 旨

Water is not only essential to lives, but also the quality of drinking water is very important to human body and health. Electrolyzed reduced water (ERW) produced in the vicinity of cathode during electrolysis of water contains a lot of hydrogen molecules and a small amount of Pt nanoparticles (NPs) derived from Pt-coated electrodes. It has been reported that ERW can scavenge reactive oxygen species (ROS) and have various kinds of precautionary and therapeutic effects for many diseases, especially oxidative stress-related diseases. Free radical theory of aging suggests that age results from an accumulation of molecular damage caused by free radicals and degenerative diseases associated with aging generally involve free radical producing processes. Based on these backgrounds, I investigated the effects of ERW on the lifespan of nematodes and neural degeneration.

First, I developed a new culture medium which was designated Water medium to elucidate the effects of ERW on the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. Wild-type *C. elegans* had a significantly shorter lifespan in Water medium than in conventional S medium. However, worms cultured in ERW-Water medium exhibited a significantly extended lifespan (from 11% to 41%) compared with worms cultured in ultrapure water-Water medium. There was no difference between the lifespans of worms cultured in ERW-S medium and ultrapure water-S medium. Nematodes cultured in ultrapure water-Water medium showed significantly higher levels of ROS than those cultured in ultrapure water-S medium. Moreover, ERW-Water medium significantly reduced the ROS accumulation induced in the worms by paraquat, suggesting that ERW-Water medium extends the longevity of nematodes at least partly by scavenging ROS. Furthermore, it was found that synthetic Pt NPs at ppb levels significantly extended the nematode lifespan and scavenged ROS in the nematode induced by paraquat treatment. In contrast, a high concentration of dissolved molecular hydrogen had no significant effect on the lifespan of the nematode. These findings suggest that the Pt NPs in ERW, rather than the molecular hydrogen, extend the longevity of the nematode, at least partly by scavenging ROS.

Oxidative stress is directly related to a series of age-related neural degenerative diseases such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease etc. ERW significantly reduced the death of neural cells induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ERW also scavenged the intracellular ROS and prevented the decrease of mitochondrial membrane potential induced by ROS. Pt NPs also exhibited the neuroprotective effects on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated neural cells.

The results obtained suggest that ERW is beneficial for the prevention and alleviation of oxidative stress-related ageing and neurodegenerative diseases.

## 論文審査の結果の要旨

活性酸素種 (ROS) などによって引き起こされる酸化ストレスはガン、糖尿病、動脈硬化症、脳神経変性疾患などの生活習慣病の原因となる他、老化を促進することが知られている。一方、ROS消去能を持つ電解還元水は生活習慣病をはじめとした様々な疾患の予防及び改善に効果が期待されている。電解還元水に含まれる水素分子及び白金ナノ粒子のROS消去作用が注目されているが、詳細な作用機構はまだ十分解明されていない。本論文は電解還元水の寿命延長効果をモデル生物である線虫 (*C. elegans*) を用いて初めて明らかにするとともに、ROSによる神経細胞障害に及ぼす電解還元水の抑制効果を明らかにした。

まず、従来から *C. elegans* の培養に使用されているミネラル豊富なS培地中では電解還元水の寿命延長効果は認められないことを確認した。そこで、より自然環境に近い水培地を開発し、それを用いた線虫の培養法を確立した。水培地中では線虫の平均寿命は著しく短縮したが、電解還元水を用いて調製した水培地中では線虫の平均寿命が10~40%伸びることを見出した。S培地中に比べて水培地中では線虫体内のROSが著しく増加した。パラコート処理により線虫体内で亢進したROSレベルを電解還元水が低減できたことから、電解還元水は線虫体内のROSレベルを低下させることにより寿命を延長することが推定された。高濃度溶存水素水では線虫の寿命は延長されず、ppbレベルの合成白金ナノ粒子の添加によって線虫体内のROSレベルが低下し、有意に寿命が延長された。これらの結果から、電解還元水による線虫寿命延長効果の少なくとも一部は微量の白金ナノ粒子による線虫体内のROSレベルの低下に起因すると推定された。

脳は体内で最も酸素を消費する臓器であり、酸化ストレスが様々な脳神経変性疾患を引き起こすことが知られている。アルツハイマー症やパーキンソン病などの神経変性疾患は老化と関連しているため、電解還元水の抗神経変性疾患に及ぼす効果を検討した。電解還元水はマウス神経芽細胞株 N1E115 の細胞内過酸化水素レベルを低下させた。また、N1E115細胞の過酸化水素によるミトコンドリアの膜電位の低下を抑制した。また、白金ナノ粒子はラット副腎褐色細胞株の細胞内ROSレベルを低下させた。これらの結果から、電解還元水はROSによる神経細胞障害を抑制し、抗神経変性効果を持つことが推測された。

以上、要するに本論文は電解還元水の線虫に及ぼす寿命延長効果及び神経細胞に及ぼす神経変性抑制効果を明らかにしたものであり、動物細胞工学及び食品機能工学に貢献する価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は博士 (システム生命科学) の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	いいだ たか ゆき 飯田 誠之 (愛知県)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第75号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	PEI/DNA複合体に結合する細胞質タンパク質の網羅的同定と細胞機能に対する影響の解明に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 片山 佳樹 (副査) 教授 村上 輝夫 准教授 狩野 有宏 准教授 新留 琢郎

## 論文内容の要旨

近年、様々な疾病の原因に遺伝子が関わっていることが明らかとなったことから、遺伝子を薬物として用いる「遺伝子治療」が新たな治療法として期待されている。遺伝子治療が画期的な治療法として期待されている理由は、細胞内で生理的に重要な機能を持つタンパク質を直接用いるのではなく、遺伝子を細胞内に導入し発現をコントロール出来るためである。遺伝子治療薬として用いられる非ウイルス遺伝子キャリアー/DNA 複合体製剤は、細胞内外で治療用遺伝子を分解から守りつつ、核に治療用遺伝子を運ぶ必要があるため、標的組織の細胞質内においても DDS 製剤としての機能をはたすことが期待されている。しかし、現在まで臨床応用に耐えうる治療効果を持つ非ウイルス遺伝子キャリアーの開発には至っていない。

細胞質内には非常に多くの種類のタンパク質が存在しており、遺伝子治療薬の表面にタンパク質膜が形成され、治療効果や細胞毒性に何らかの影響を与えていることが考えられる。そのため、遺伝子治療薬表面に結合する細胞質内タンパク質とその影響が明らかになれば、高い治療効果をもつ非ウイルス遺伝子キャリアーの開発に繋がる。しかし、遺伝子治療薬と細胞質内タンパク質とのタンパク質との結合に関する報告はほとんど無い。

そのため本論文では、これまでに多くの研究実績があり、安価かつリガンド修飾などの機能付加が容易であるポリエチレンイミン (PEI) と DNA からなるナノ粒子である PEI/DNA 複合体と細胞質内のタンパク質との結合を調べるための網羅的解析法を構築した。また、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質の同定と、細胞機能に対する影響の評価を行い、治療効果の高い遺伝子治療薬を設計するための知見を得ることを目指した。

第2章では、PEI/DNA 複合体に結合する細胞質内タンパク質の解析と同定を行った。まず、複数のタンパク質を分離する手法として二次元電気泳動、細胞質タンパク質としてマウス肝臓から調製したものを選択した。二次元電気泳動による PEI/DNA 複合体結合タンパク質の分離は良好で、全細胞質タンパク質とは異なるタンパク質組成を示した。次に、分離されたタンパク質を同定するためにペプチドマスフィンガープリント法を用いることで、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質を15種同定した。PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質の分子量、等電点に偏りはなく、多様なタンパク質が結合していた。中でも結合量が多かったタンパク質は、actin、tubulin、argininosuccinate synthase、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase であった。加えて、タンパク質組成の異なるマウスの心臓、肺、能、腎臓、脾臓から作成した細胞質画分を用いて同様の評価を行ったが、結合するタンパク質はほぼ同じであった。このため、PEI/DNA 複合体の表面にタンパク質が結合する特定の要因があることが示された。一方、ヒトの子宮頸がん由来である HeLa 細胞から作成した細胞質タンパク質で同様の評価を行ったところ、マウスの細胞質タンパク質とは異なるタンパク質が PEI/DNA 複合体に結合しており、特に glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase は全く結合していなかった。マウスとヒトにおける glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase のアミノ酸配列相同性を解析したところ、タンパク質表面のアミノ酸配列に違いが見られた。そのため、タンパク質の PEI/DNA 複合体への親和性は、タンパク質アミノ酸配列に依存し、生物種間で結合するタンパク質が異なることが示された。

第 3 章では、粒径と表面電荷の異なる PEI/DNA 複合体に細胞質タンパク質が結合することで、治療効果や生体機能に与える影響を明らかにするために、結合タンパク質の機能解析、結合タンパク質の酵素活性評価、結合動態解析、PEI/DNA 複合体からの DNA のリリース、結合タンパク質のロスオブファンクションアッセイをおこなった。PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質の機能解析をデータベースを利用して行ったところ、75%が代謝に関わるタンパク質であり、他は主に細胞骨格に関わるタンパク質であった。また、PEI/DNA 複合体複合体に結合するタンパク質である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase について酵素活性評価を行ったところ、PEI/DNA 複合体に結合することで活性が下がることを見出した。これは、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の構造が、正電荷を表面に持つ PEI/DNA 複合体に結合することで、活性部位の構造が変化したためだと考えられる。また、結合タンパク質の結合挙動を解析したところ、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質は、細胞質タンパク質添加直後から結合する早期結合、60 分後から結合する後期結合、および一時的な結合をするタンパク質があることを見出した。さらに、PEI/DNA 複合体にマウス肝臓の細胞質画分を加え、リリースされる DNA 量と、結合タンパク質の結合解離挙動と照らしあわせたところ、actin および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase が PEI/DNA 複合体からのリリースに関わっていることが示唆された。さらに、HeLa 細胞質内において PEI/DNA 複合体に結合する(heat shock cognate 70 kDa)HSC70 をノックダウンしたことで、導入遺伝子の発現がコントロールと比較して 10 倍程度低下した。HSC70 は NLS 配列を有しており、importin と結合する機能を有していることから、PEI/DNA 複合体の核内への輸送を HSC70 が促進している可能性が示唆された。以上の結果から、治療効果が高く、細胞毒性が低い遺伝子治療薬を設計するためには、細胞内で結合するタンパク質をコントロールする必要があることが示されたといえる。

第 4 章では本論文で得られた結論の総括を行った。

## 論文審査の結果の要旨

近年、様々な疾病の原因に遺伝子が関わっていることが明らかになったことから、遺伝子を薬物として用いる「遺伝子治療」が新たな治療法として期待されている。遺伝子治療薬として用いられる非ウイルス遺伝子キャリアー/DNA 複合体製剤は、細胞内外で治療用遺伝子を分解から守りつつ、核に治療用遺伝子を運ぶ必要がある。細胞質内には非常に多くの種類のタンパク質が存在しており、遺伝子治療薬の表面にタンパク質膜が形成され、治療効果や細胞毒性に何らかの影響を与えていることが考えられる。この様な遺伝子治療薬表面に結合する細胞質内タンパク質とその影響が明らかになれば、高い治療効果をもつ非ウイルス遺伝子キャリアーの開発に繋がる。本論文では、これまでに多くの研究実績があり、安価かつリガンド修飾などの機能付加が容易であるポリエチレンイミン (PEI) と DNA からなるナノ粒子である PEI/DNA 複合体を用いて細胞質内のタンパク質との結合を調べるための網羅的解析法を構築し、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質の同定と、細胞機能に対する影響の評価を行っている。得られた成果は以下のとおりである。

まず、PEI/DNA 複合体に結合する細胞質内タンパクを分離する手法として二次元電気泳動を用い、マウス肝臓の破砕液中に含まれる全細胞質タンパク質と、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質が異なるプロフィールを有することを明らかにしている。次に、分離されたタンパク質にペプチドマスフィンガープリント法を適用して、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質を 15 種同定し

ている。さらに、タンパク質組成の異なるマウスの心臓、肺、脳、腎臓、脾臓から作成した細胞質画分を用いて同様の評価を行い、マウスの異なる臓器間では PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質に差がないが、種が異なるヒトの子宮頸がん由来である HeLa 細胞では、大きく異なることを見出している。特に glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase はマウスでは強く結合していたが、ヒト細胞では全く結合せず、これが、タンパク質表面のアミノ酸配列の違いに由来する可能性を指摘している。

複合体に結合したタンパク質の機能をデータベースを利用して調査し、75%が代謝に関わるタンパク質であり、他は主として細胞骨格に関わるタンパク質であることを明らかにしている。さらに、結合タンパク質の結合挙動を解析したところ、PEI/DNA 複合体に結合するタンパク質は、細胞質タンパク質添加直後から結合する早期結合型と、60分後から結合する後期結合型、および一時的な結合をする型があることを見出している。次いで、PEI/DNA 複合体にマウス肝臓の細胞質画分を加え、放出される DNA 量と、結合タンパク質の結合解離挙動とを評価して、actin および glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase が PEI/DNA 複合体からの DNA 放出に関わっていることを明らかにしている。また、HeLa 細胞質内において PEI/DNA 複合体に結合する heat shock cognate 70 kDa (HSC70) をノックダウンすることで、導入遺伝子の発現が 10 倍程度低下した事実より、核局在シグナル(NLS)配列を有し、importin と結合する機能を持つ HSC70 が、PEI/DNA 複合体の核内への輸送を促進している可能性を見出している。

以上の結果は、現行の非ウイルスキャリアーによる遺伝子送達において未知であった細胞内でのタンパク質との相互作用を明らかにし、遺伝子複合体の挙動を考察する上で重要な知見を提供し、有効な遺伝子キャリアーの設計に重要な情報を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（システム生命科学）の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	ファン シュオハオ 黄 碩 豪 (中国)
学位の種類	博士(システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第80号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Development of Hybrid Retroviral Vectors with Targeted Genome Integration Ability (ターゲットゲノムインテグレーション能力を持つハイブリッドレトロウイルスベクターの開発)
論文調査委員	(主査) 教授 上平正道 (副査) 教授 片山佳樹 教授 後藤雅宏

## 論文内容の要旨

The attribution of certain diseases to the defects in DNA led to the proposal of delivering the functional gene into cells to retrieve the normal function. This therapeutic gene delivery process is called gene therapy. The first approved gene therapy trial on patients was performed in the US on September 14<sup>th</sup>, 1990 to treat two patients with adenosine deaminase (ADA) deficiency by using mouse Moloney retroviruses vector encoding the functional ADA gene. Following this, recombinant adenovirus vectors (rAd), recombinant adeno-associated

viral vectors (rAAV), and lentiviral vectors entered clinical trials. Two great breakthroughs for gene therapy were seen at the beginning of this decade. In 2000 and 2002, groups led by Alain Fischer and Claudio Bordignon reported the impressive improvement of immune systems for patients with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID) after receiving murine retroviral vector modified bone marrow cells. A more recent encouraging breakthrough in gene therapy came in 2009 when Jean Bennett's group reported improved visual function for all the 12 patients after receiving direct AAV injection into eyes.

Among different viral vectors in gene therapy, retroviral vectors play a major role. All retroviruses have RNA as their genome, and the RNA is reverse-transcribed into DNA in the cellular cytoplasm before integration into the host genome. Integrated DNA is called provirus, and genes encoded in the proviruses can be expressed stably. Due to the high gene transfer efficiency and the long-term expression nature, retroviral vectors have been attractive candidates in gene therapy, a process that often requires a long-term expression of introduced genes in patients to cure the diseases. Retroviral gene therapy has been proven effective in clinical trials. However, retrovirus based strategies are not perfect. One prominent concern is related to the gene integration of retroviral vectors. Since these vectors have functional promoters, their uncontrollable integration is likely to activate proto-oncogenes and turn infected cells into tumor cells. Therefore, development of retroviral vectors with controllable gene insertion profile should benefit hugely their application in gene therapy.

In this thesis, promising strategies to control retroviral integration were described. To control retroviral integration, a mutation of viral integrase, responsible for the viral genome integration, was first introduced. The resulting vectors were termed as integrase-defective retroviral vectors (IDRV), whose genome integration ability was severely compromised. Due to the free ends of the linear IDRV genome, the DNA molecules could be turned into circular forms. The first strategy was to use Cre/*loxP* recombination to direct circular IDRV DNA to a specific genomic target *loxP* locus of Chinese hamster ovary (CHO) cells, which had been introduced into CHO genome as a single-copy insertion. Cre recombinase was delivered into the CHO target cells by lipofection-based transfection, and several hours later the transfected cells were infected with IDRV harboring *loxP* sites and neomycin resistant gene (*Neo*). After G418 selection, viable colonies formed. Next, G418-resistant colonies were analyzed by both Southern blotting and genomic PCR to clarify the genomic structure at the target locus. The results suggested that picked clones were due to Cre-mediated insertion of IDRV, although clones derived from incomplete Cre recombination were also identified.

A second method involved the use of the integration system from AAV. In the presence of AAV Rep proteins, plasmids possessing the p5 integration efficiency element (p5IEE) can be integrated into the AAV integration site (AAVS1) in the human genome. AAVS1 has been proven safe for foreign transgene insertion. Similarly, p5IEE, with *Neo*, was engineered into IDRV genome, and *Rep* gene was inserted into an independent IDRV. Co-infection of HeLa cells with the two IDRVs followed by G418 screening resulted in an appearance of G418-resistant colonies, and the resistant colony number was high compared with the infection with the p5IEE and *Neo* bearing IDRV alone. Southern blotting revealed that 30% of randomly picked clones after co-infection had IDRV inserted at AAVS1.

The aforementioned two methods need the addition of enzymes to direct retroviral genome integration, and the delivery was achieved by transfection and IDRV infection, which could still

potentially result in the random integration of foreign DNA into host genome. Protein transduction via retroviruses has been demonstrated feasible after embedding the protein into viral particles. A third strategy was to deliver Cre recombinase as a protein, together with a genome used in the first strategy. The CHO line was also used in this research. The results suggested that the incorporated Cre in the viral particles were bioactive, although it had negative effects on virus production and on the transgene expression from IDRV genome. The colony forming efficiency was also reduced dramatically compared with delivering Cre by plasmid transfection. Nonetheless, G418-resistant colonies were observed, and the genomic PCR showed expected recombination products.

This work focused on the development of hybrid retroviral vectors with targeted genome integration ability. Ideal retroviral vectors should have high cell transduction efficiency and tailored gene insertion capacity without any side effects. Due to their inherent tendency to quasi-randomly insert transgenes into host chromosome, the original integration process of retroviral vectors is expected to be exchanged with other safer integration systems to remedy this defect. This work is hoped to contribute to the development of novel retroviral vectors, which will ultimately lead to novel methods, maintaining the merits and resolving the genotoxicity. With the continued work in genetic medicine world-widely, gene therapy, with its many unrealized potentials yet, shall witness the coming of a day when people with inherited diseases no longer suffer and patients with acquired diseases can be cured soon.

## 論文審査の結果の要旨

遺伝子欠陥による疾患に対して、正常な機能を回復するために、細胞に機能遺伝子をデリバリーするという概念の治療法が提案され、この治療用遺伝子デリバリープロセスを遺伝子治療とよんでいる。これまで、ウイルスの宿主細胞への遺伝子送達メカニズムを利用したウイルスベクターやウイルスによらない人工的な遺伝子デリバリーに基づく非ウイルス法が、遺伝子治療のための方法として検討されており、すでに様々な遺伝子欠損性疾患のための治療法として臨床応用されている。遺伝子治療で使われるウイルスベクターの中で、レトロウイルスベクターは重要な部分を占めている。すべてのレトロウイルスはゲノムとして RNA を持っており、ウイルス RNA は宿主細胞ゲノムへ組み込まれる前に、細胞質内で DNA に逆転写される。宿主細胞ゲノムに組み込まれたウイルス DNA はプロウイルスとよばれ、プロウイルスにコードされる遺伝子を安定に発現することができる。レトロウイルスベクターは、高い遺伝子導入効率と長期的な導入遺伝子発現の性質を有するため、導入された遺伝子の長期発現を必要とする疾病に対する遺伝子デリバリー法として魅力的な方法であり、レトロウイルスベクターを用いる遺伝子治療は臨床試験で効果が実証されてきた。しかし、レトロウイルスベースの遺伝子導入法は、宿主細胞ゲノムへの組込み位置が特定されないため、癌原遺伝子を活性化し遺伝子導入細胞を腫瘍細胞に変化させる可能性がある。したがって、遺伝子導入位置を制御可能な組込みプロファイルを持つレトロウイルスベクターの開発が、遺伝子治療への応用において要望されている。

本論文では、レトロウイルスの宿主ゲノムへの組込みを制御するための有望な戦略について検討を行っている。レトロウイルスの宿主ゲノムへの組込みを制御するために、ウイルスゲノムの組込みを担うウイルスインテグラーゼの変異を最初に導入した。結果として得られるベクターは、ゲノムへの組込み能力が著しく阻害されたインテグラーゼ欠損レトロウイルスベクター (IDRV) となる。リニア IDRV ゲノムの自由末端をもつ DNA 分子は、円形の形態に変えることができる。研究における最初の検討では、Cre/*loxP* 部位特異的組換え反応を IDRV の宿主細胞ゲノムへの組込みに利用する

ものである。そのためまず、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞のゲノムに、単一コピーとして組み込みターゲットとなる *loxP* 配列を導入し、IDRV によって送達された DNA を Cre リコンビナーゼ依存的に CHO ゲノムに組み込むシステムを開発した。Cre リコンビナーゼ発現用プラスミドをリポフェクションにより CHO 細胞に導入したのち、組換え用の *loxP* とネオマイシン耐性遺伝子 (*Neo*) を有する IDRV で感染させたところ、G418 耐性 CHO 細胞コロニーが形成された。サザンブロット解析およびゲノム PCR 解析 によって、G418 耐性細胞クローンの標的遺伝子座におけるゲノム構造解析の結果、不完全な Cre 組換えから派生したクローンも確認されたものの、約 79% の細胞クローンは、目的のゲノム部位に Cre を介して IDRV 由来 DNA が挿入されたものであることを明らかにした。

さらに本論文では、IDRV の宿主細胞ゲノムの特定部位への組み込みのための第二の方法として、アデノ随伴ウイルス (AAV) の組み込みメカニズムを統合したシステムについて検討した。AAV は、ヒト 19 番染色体の AAVS1 部位に特異的に組み込まれることがわかっており、AAVS1 は外来導入遺伝子の挿入によって腫瘍を誘発しないことが確認されている。AAV の特異的組み込みに必要な要素として、p5IEE 配列と AAV タンパク質 Rep が知られているので、Cre/*loxP* システムを IDRV に組み込んだ場合と同様に、*Neo* と p5IEE を組み込んだ IDRV と、Rep タンパク質を発現するための遺伝子を組み込んだ IDRV を設計して生産させた。2 つの IDRVs をヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に共感染させ、G418 を用いた選抜により G418 耐性 HeLa 細胞コロニーが出現した。サザンブロット解析およびゲノム PCR 解析 によって、上記 2 つの IDRVs を使った遺伝子導入によって、ランダムに選択した G418 耐性細胞クローンの 30% で目的遺伝子が HeLa 細胞の AAVS1 部位に挿入されていることを明らかにした。

前述の 2 つの方法は、レトロウイルスゲノムの宿主細胞ゲノムへの組み込みを誘導する酵素の添加を必要とし、それら酵素のデリバリーにプラスミドトランスフェクションや IDRV を使っていたが、これらは宿主ゲノムへの組み込みにつながる可能性がある。ウイルス粒子へタンパク質を埋め込むことによって、レトロウイルス粒子を介したタンパク質送達が可能であることが報告されている。本論文における第三の検討として、Cre/*loxP* システムを組み込んだ IDRV における検討で使用されている IDRV ゲノムとともに、タンパク質として Cre リコンビナーゼを IDRV 粒子内に取り込ませることを試みた。Cre リコンビナーゼのウイルス粒子内への取り込みは、ウイルスの生産と IDRV のゲノムからの遺伝子発現に負の影響があったが、ウイルス粒子に取り込まれた Cre は、組換え活性を有することを明らかにした。特異的な遺伝子組み込み効率は、プラスミドトランスフェクションによって Cre を供給する場合と比べて著しく減少したものの、目的の細胞ゲノム部位に組み込まれた G418 耐性細胞クローンを得ることに成功している。

本論文では、細胞の標的ゲノム位置に組み込み能力を持つハイブリッドレトロウイルスベクターの開発を試みた。理想的なレトロウイルスベクターでは、副作用なく高い細胞導入効率と特定染色体部位への外来遺伝子導入能力を持つことが望まれる。レトロウイルスベクターは、ほぼランダムに宿主細胞ゲノムに導入遺伝子を挿入するため、レトロウイルス元来がもつ組み込みプロセスを他の安全な組み込みシステムと交換することが期待されている。本論文では、部位特異的な遺伝子導入システムをレトロウイルスベクターに組み込むアプローチとして、Cre/*loxP* システムや AAV のシステムを IDRV に組み込み、細胞ゲノム部位特異的に外来遺伝子を導入できることを明らかにした。

以上の結果は、遺伝子治療においてレトロウイルスベクターがもつ利点を維持し難点を解決する、新たなベクターの開発に寄与するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士 (システム生命科学) の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	ジョーメイ テキ 徐 鳴 鎬 (中国)
学位の種類	博士 (システム生命科学)
学位記番号	シ生博甲第88号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	An Event-related Potentials Study on Repetition Priming and Stimulus Probability in Face Processing. (事象関連電位を用いた顔認知処理における反復プライミングと刺激確率に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 伊良皆 啓 治 (副査) 教授 甲 斐 昌 一 教授 ヨハン・ローレンス 教授 森 周 司

## 論 文 内 容 の 要 旨

Due to the intrinsic expertise of human in processing faces and its irreplaceable importance in social communication, in the recent decades, there has been an explosion of researches focusing on various topics in face processing. Nevertheless, many questions are still in controversy, for instance, the speed at which human visual system detects (differentiate faces from other non-face objects) and discriminates (distinguish different faces from each other) faces. One party of the neuroscientists suggest that face detection takes place prior to face discrimination; the other party, however, argue that the two processes may possibly occur almost within the same time window – as soon as a face is detected, it is discriminated (recognized). The present work, using ERP (event-related brain potentials) analyses, a method with distinguished temporal resolution, employed different types of repetition priming to investigate the temporal characteristics of face detection and face discrimination in parallel.

Repetition priming, a form of implicit memory, refers to the facilitated processing of a stimulus on repeated, relative to initial, presentation. In the context of cognitive neuroscience, repetition priming effect can be mirrored both at the behavioral level and the physiological level. At the behavioral level, comparing with a novel stimulus, a repeated stimulus would lead to faster and more accurate response. At the physiological level, stimulus repetition would result in a reduced level of neuronal activity at the stimulus-sensitive area. It is owing to the logic “at the time point (or brain region) when (or where) repetition priming occurs, the specific neural process takes place in the brain” that repetition priming has been repeatedly used as a tool in neuroscience studies pursuing to elucidate the underlying mechanisms of various stages in perceptual/cognitive processing. This also explains why repetition priming paradigms were used in the present study to probe the temporal profiles of face detection and face discrimination.

Stimulus probability, analogous to repetition priming, can influence human behavior as well, i.e., response would be faster and more accurate to the stimulus with high presentation probability. Hypotheses are that both repetition priming and stimulus probability may possibly improve task performance via influencing the processes *prior to* the actual stimulus (response needed) onset: repetition priming shortens reaction times via prior processing of a stimulus on

the one hand, and stimulus probability by introducing an expectation factor – leading to pre-activation of underlying mechanism for processing the stimulus – on the other. To the extent that they may have different nature, for instance, implicit/automatic for repetition priming versus explicit/voluntary for stimulus probability, it is important to unveil their underlying mechanisms in facilitating information processing in the brain; as well as to examine their interaction, if any, using a factorial design. These questions, to my knowledge, have never been examined in face processing and remain largely unclear; thus, elucidation of these questions may, at least partially, fulfill the gap in literature. Therefore, the present study, employing well-designed paradigms, performed several experiments to shed light on the characteristics of the mechanisms underlying repetition priming and stimulus probability in face processing, especially, whether they are independent or interactive.

This thesis consists of three primary experiments, which separately aimed to (1) search for an appropriate paradigm for studying repetition priming in face processing with ERP; (2) dissociate category repetition priming effect and item repetition priming effect in face processing with both behavior and ERP measurement; (3) examine how stimulus probability will influence repetition priming in face processing by measuring behavior, visual ERPs and LRP (lateralized readiness potential).

Combining the main findings across these experiments, the following conclusions were drawn. (1) An SOA (stimulus onset asynchrony) of 600ms is appropriate for studying repetition priming in face processing with ERP. (2) Category and item repetition priming in face processing are dissociable: the former effect emerges at approximately 160ms after target stimulus onset (N170 component), most prominent in the right occipito-temporal area, indicating the neural process distinguishing faces from other object categories; the latter effect occurs at around 200ms after target stimulus onset (P200 component), most prominent in the posterior inferior temporal area, indicating the neural process discriminating faces from each other. (3) In face processing, stimulus probability does not influence category and item repetition priming effect, which are measured after target stimuli onset; rather, it affects behavior performance before the target stimuli onset by introducing an expectation factor, which is revealed on the fore-period (the period between prime and target stimuli onset) LRP at the motor area. Thus, repetition priming and stimulus probability appear to modulate human behavior performance via different mechanisms.

## 論文審査の結果の要旨

ヒトにおける顔認知は非常に高次の脳機能であり、顔認知に関する脳機能研究が多く行われているが、顔認知の脳内処理メカニズムは、まだ十分解明されていない。例えば、顔の検出と顔の識別、これらの二つのプロセスが「いつ」「どこで」起こっているかは、未だに議論が続けられている。ある対象が提示されると、その後に提示された対象の分類と同一性が速くなるという反復プライミング効果がよく知られており、本研究は、反復プライミング課題を用いて、顔認知における反復プライミング効果について、事象関連電位を用いて検討し、「顔の検出」と「顔の識別」の処理に関わる脳内メカニズムの時間特性を調べた。

まず、適切な反復プライミング課題を構築するため、刺激間隔を変化させ、反復プライミング効果にどのように影響を与えるかを検討した。同じ種類のペア刺激への刺激応答を脳波で計測した結果、600 ミリ秒間の刺激間隔が顔認知における反復プライミング効果を調べる際に適切であることを明らかにした。

次に、異なる種類の刺激で構成されるカテゴリー反復プライミングや同じ種類から構成されるアイテム反復プライミングを含む 8 種類のペア刺激に対して、刺激反応時間や正答率を調べる行動実験、および事象関連電位を計測した結果により、顔認知におけるカテゴリー反復プライミングとアイテム反復プライミング効果が分離でき、カテゴリー反復プライミング効果が「顔の検出」、アイテム反復プライミング効果が「顔の識別」の処理を示すことを明らかにした。また、本研究は「顔の検出」の処理は刺激後約 150 ミリ秒に、「顔の識別」の処理は刺激後約 200 ミリ秒に、いずれも後側頭部を中心に脳内にて行われることを、事象関連電位測定により新たに示した。

最後に、反復プライミングと刺激出現確率という反応時間を速くする二つの要素を含む課題を構築し、顔認知において、両者はどのように、ヒトの認知パフォーマンスに影響を与えるのかを検討した。具体的には、顔がターゲット刺激として出現する確率を変化させ、カテゴリーとアイテム反復プライミングを含む 6 種類のペア刺激に対する行動実験や事象関連電位を計測した結果、反復プライミング効果と刺激出現確率効果は異なった脳内処理によって生じていることを示した。

以上、本論文は「顔の検出」と「顔の識別」の処理に関わる脳内メカニズムの時間特性を明らかにするとともに、顔認知において、ヒトの認知反応に関わる反復プライミングと刺激出現確率との関係を明らかにしたものであり、ヒトの顔認知研究に貢献する価値ある業績であると認める。

よって、本研究者は博士（システム生命科学）の学位の資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	むらた だいすけ 村田 大輔 (福岡県)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	シ生博甲第76号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	A study on biological roles of GPI-anchor synthesis in the germline development of the nematode <i>Caenorhabditis elegans</i> (線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> の生殖系列細胞発生における GPI アンカー合成の生物学的役割に関する研究)
論文調査委員	(主査) 准教授 野村 一也 (副査) 教授 石原 健 教授 川畑 俊一郎

## 論文内容の要旨

### 序論

真核生物において、グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 修飾はタンパク質の主要な翻訳後修飾の 1 つである。GPI 修飾されたタンパク質は GPI アンカー型タンパク質と呼ばれ、GPI

を介して細胞膜表面につなぎとめられる。GPI アンカー型タンパク質には、加水分解酵素や細胞接着因子、抗原分子など様々な種類が知られており、多様な生命現象に GPI が関与していることが予想されている。しかしながら、生物個体における研究は GPI 合成遺伝子のノックアウトマウスの研究例が数例報告されている程度であり、線虫 *Caenorhabditis elegans* における研究例はほとんど無かった。そこで本研究では、線虫の生殖系列細胞や胚発生における GPI 合成の生物学的役割について解析を行った。

#### 線虫における GPI アンカー型タンパク質の検出と同定

まず、2つの手法を用いて線虫に GPI アンカー型タンパク質が存在することを実証した。第一に、GPI アンカー型タンパク質に特異的に結合する蛍光試薬 FLAER を用いて組織染色を行った。その結果、生殖細胞（卵母細胞や精子）や生殖腺を構成する体細胞（distal tip cell (DTC)）、神経、筋肉細胞において FLAER 染色が観察され、これらの組織に GPI アンカー型タンパク質が存在することが分かった。第二に、界面活性剤 Triton X-114 による相分離とホスファチジルイノシトール特異的ホスホリパーゼ C による酵素消化を組み合わせた方法を用いて、GPI アンカー型タンパク質の抽出・精製を行った。SDS-PAGE の結果、抽出したタンパク質画分から複数のバンドが得られた。これらのバンドに含まれるタンパク質を同定するため、質量分析 (LC/MS/MS) を行い、続いて GPI シグナル予測プログラムによる解析を行った。これにより、22 種類の GPI アンカー型タンパク質が同定された。以上の実験から、線虫に GPI アンカー型タンパク質が存在することが示された。

#### RNAi による GPI 合成遺伝子の機能阻害実験

次に、これまでに哺乳類細胞で同定された 29 個の GPI 合成遺伝子をもとに BLAST 検索を行い、線虫ゲノム中に存在する GPI 合成遺伝子の探索を行った。その結果、24 個の線虫 GPI 合成遺伝子が見出された。これらの遺伝子に対して RNAi を行ったところ、生殖細胞の増殖や卵母細胞の成熟に異常を示したり、受精卵を産まなくなるなど、生殖系列に重篤な異常が見られた。このことから、線虫の GPI 合成は生殖系列に必須であることが分かった。

#### 欠失変異による GPI 合成遺伝子の機能阻害実験

さらなる解析を行うため、GPI 合成の初発反応を担う遺伝子 *piga-1* の欠失変異体を作製した。この変異体の生殖細胞では、FLAER 染色が全く見られないことから、細胞膜上の GPI アンカー型タンパク質が欠損していることが分かった。観察の結果、*piga-1* 変異体の胚には大きく 2つの異常が認められた。第一に、この変異体がつくる胚は全て致死となった。この致死胚には、一度も分裂せずに 1 細胞期で発生が止まっているものと、細胞分裂を繰り返して多細胞期まで発生が進んでいるものが見られた。第二に、3分の2の割合で、胚を覆う卵殻の形状に異常が生じていた。そこで、細胞膜を染色する蛍光色素 FM4-64 を使って卵殻の透過性を検証した。野生型の卵殻は FM4-64 のような分子を通さないため、胚の細胞膜は染色されなかった。これに対し、*piga-1* 変異体の約 25% の胚では細胞膜の染色が認められ、卵殻の透過性に異常が生じていることが分かった。このような卵殻をもつ胚の浸透圧変化に対する感受性を調べるため、最適な浸透圧条件下で *piga-1* 変異体の胚発生を観察した。胚致死表現型の回復は見られなかったことから、*piga-1* 変異体の胚致死は単に浸透圧感受性によるものではないことが示された。以上より、線虫の GPI 合成は胚発生に必須であり、卵殻形成にも関与していることが示された。

#### 遺伝子レスキュー実験

*piga-1* 変異体の胚致死表現型のレスキュー実験を行うため、野生型 *piga-1* 遺伝子と EGFP を融合した遺伝子コンストラクト (*piga-1::egfp*) を作製した。本研究では、①体細胞組織、②生殖細胞、

③distal tip cell (DTC)、④gonadal sheath cell、⑤貯精嚢および子宮（③～⑤は生殖腺を構成する細胞）、⑥筋肉、⑦神経において、それぞれ特異的に発現する遺伝子プロモーターを用いて、*piga-1::egfp* を発現させた。このレスキュー実験によって、次の2点が明らかとなった。第一に、②生殖細胞でのレスキューが最も胚致死率が低くなる、すなわち、最も効率良くレスキューされることが分かった。第二に、生殖細胞以外に、③DTC で *piga-1* 遺伝子を発現させることで、効率良くレスキューされることが分かった。この DTC レスキュー線虫に対して FLAER 染色を行ったところ、卵母細胞膜に弱い FLAER 蛍光が見られ、細胞膜上に GPI アンカー型タンパク質がわずかに存在していることが分かった。抗 GFP 抗体を用いた免疫組織染色の結果、*piga-1::egfp* は DTC のみで発現しており、生殖細胞では発現していないことが確認された。この結果は、DTC で合成された GPI アンカー型タンパク質が生殖細胞に移動した可能性を示唆している。

#### DTC における GPI 合成と有糸分裂生殖細胞の関連

これまでの研究により、DTC は幹細胞ニッチとして機能することが知られている。DTC は隣接する生殖細胞の減数分裂を抑制し、生殖細胞の有糸分裂を維持している。そこで、GPI 合成と生殖細胞の有糸分裂との関連を調べるため、有糸分裂マーカーとして知られる抗リン酸化ヒストン ( $\alpha$ -pH3) 抗体を用いて、*piga-1* 変異体の免疫組織染色を行った。その結果、*piga-1* 変異体では  $\alpha$ -pH3 陽性細胞の数が著しく減少していた。一方、DTC レスキュー線虫では  $\alpha$ -pH3 陽性細胞の数は野生型線虫と変わらなかった。以上の結果は、DTC における GPI 合成が正常な数の有糸分裂生殖細胞を維持するのに十分であることを示している。

以上のように、本研究は線虫の GPI 合成が生殖系列細胞や胚発生に極めて重要であることを示している。

### 論文審査の結果の要旨

GPI anchor 型蛋白質とは蛋白質が glycosylphosphatidylinositol といわれる構造を介して膜につながとめられている分子であり、古細菌から多細胞生物にわたるほとんどの生物に存在している。GPI anchor 型蛋白質は *Trypanosoma cruzi* などの病原性の寄生虫の表面に存在する分子種として発見され、宿主の免疫システムからの攻撃をまぬがれる手段として利用されている。また細胞膜上の raft あるいは microdomain とよばれる構造に集中していることが知られており、信号伝達などに重要な役割を果たすとされている。GPI anchor 合成は一連の合成経路に従って進行し、ヒトやマウスでは 29 種類以上の遺伝子の関与が知られている。マウスの GPI anchor 合成の第一段階を触媒する酵素 Pig-a の遺伝子破壊は ES 細胞が得難く組織特異的遺伝子破壊しかできなかった。またヒトの該当遺伝子 PIGA の変異による病気は体細胞突然変異によるもの以外は知られておらず、発作性夜間血色素尿症が有名である。GPI anchor 合成遺伝子の変異による病気の少なさは、この遺伝子の変異が生殖細胞や初期胚において重要な機能を果たしており、欠損は致死となるとすれば簡単に説明できる。マウスやヒトの初期胚や生殖細胞での GPI anchor 合成の研究は困難であることが知られているので、本研究では、初期発生や生殖細胞形成の観察や遺伝子破壊が容易なモデル生物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて GPI anchor の機能を探る研究を行った。研究開始当時、線虫においては、ヒトの GPI anchor 合成遺伝子に相同な遺伝子が幾つか相同性検索で同定されていた以外にはほとんど GPI anchor の研究はなされていなかった。そこでまず線虫に GPI anchor 構造が存在するかどうかを検討するところから研究を始めた。

GPI anchor と特異的に結合する細菌毒素 aerolysin が発見され、結合能を保ったまま無毒化して蛍光ラベルした蛍光 aerolysin (FLAER) が開発された。この試薬で線虫を染色してみると、卵母細胞

胞、精子、生殖体細胞である distal tip cell や gonadal sheath cell、受精卵、神経、筋肉などの体細胞など多種の細胞が染色された。またこの染色は GPI anchor 合成をできなくした細胞では消失したことからその信頼性を確認した。さらに生化学的に GPI anchor 型蛋白質の存在を示すために Triton X114 の相分離を利用した膜タンパク質の分離を行い、膜タンパク質分画を GPI anchor 型蛋白質の脂質結合部分を特異的に切断する酵素 Phosphatidyl inositol specific phospholipase C で切断した。この処理後に Triton X114 処理を再びおこなって膜タンパク質が Triton X114 層でなく水層に分配されるようになれば、その蛋白質は GPI anchor 型蛋白質だったと確認できる。この実験を行い水層に分配された蛋白質を SDS 電気泳動で分離、ゲルから切り出して質量分析(LC/MS/MS)でアミノ酸配列を決定して GPI anchor 判定プログラムと組み合わせて判断することで、線虫にどのような GPI anchor 型蛋白質が存在しているかを網羅的に同定した。この結果、50 種以上の線虫 GPI anchor 型蛋白質の存在を確認した。

次に線虫での GPI anchor 合成遺伝子を調べるため、ヒトで研究済みの 29 種の GPI anchor 合成遺伝子それぞれを利用して PSI-BLAST で線虫ゲノムを検索し、24 種類の GPI anchor 合成遺伝子オーソログを同定した。全ての遺伝子についてそれぞれ RNAi で線虫の生殖巣や初期胚への影響を評価したところ、多くの遺伝子の RNAi で生殖巣の形成異常、卵子合成の消失、初期胚発生の異常などが観察された。GPI anchor が卵母細胞の形成、初期胚発生前に重要な働きを果たしていることを示唆する重要な観察結果であった。

次にこれらの異常が GPI anchor 合成の異常に起因することを確認するため、哺乳類から酵母にいたる広い範囲の生物で保存されており、GPI anchor 合成の第一段階を触媒する酵素の触媒サブユニットをコードする PIGA 遺伝子に着目し、その線虫オーソログの遺伝子 *piga-1* の遺伝子破壊株 *tm2939* を取得してバッククロスしたのち詳細に解析した。遺伝子破壊株はホモのヌルアレルでは致死であり、ヘテロから生まれたホモのヌルアレルではすべての生殖細胞に異常があり致死となる。このヌル変異株では生殖巣の異常や初期胚分裂の異常が生じ、FLAER 染色も消失、GFP タグをつけた GPI anchor 蛋白質遺伝子を導入したところ膜表面にはこぼれることはなかった。これらの実験結果は *piga-1* 遺伝子が GPI anchor 合成に必須であることを示している。さらに野生型の *piga-1* 遺伝子 (GFP 付加) によってこの欠失変異株をトランスジェニックレスキューすることを試みた。その結果、*tm2939* 株が示す、すべての異常が消失し、ヌル変異株での生殖巣や初期胚の異常はたしかに *piga-1* 遺伝子の欠失によるものであることが確認された。以上の実験によって、GPI anchor 合成が線虫の生殖巣の発生、卵母細胞形成、初期胚分裂などに必須であることが明らかになった。これは GPI anchor 合成が生殖系列の発生や初期胚分裂に必須の働きをしていることの世界で初めての発見である。

*piga-1* 遺伝子破壊株 *tm2939* のトランスジェニックレスキューは全ての細胞で発現するプロモーターを用いる場合以外に、distal tip cell 特異的プロモーター、神経細胞特異的プロモーター、筋肉特異的プロモーター、gonadal sheath cell 特異的プロモーター、生殖細胞特異的プロモーターなど様々なプロモーターを用いて試みられた。このうち、生殖細胞特異的プロモーターと distal tip cell 特異的プロモーターでは効率良くレスキューされたが、gonadal sheath cell 特異的プロモーターではレスキュー効率は著しく低下、その他のプロモーターでは全くレスキューできなかった。線虫の 2 個しかない distal tip cell でのみ野生型の *piga-1* 遺伝子を発現して生殖系列のすべての異常がレスキューされる事実は、Notch リガンドの LAG-2 を分泌して生殖幹細胞の体細胞分裂維持をおこなう生殖幹細胞ニッチを形成するのに必須の役割を担っている distal tip cell での GPI anchor 合成が生殖系列の発生の回復に十分であることを示している。生殖幹細胞とそれに由来する体細胞分裂を

行っている細胞数をリン酸化ヒストンの抗体で染色することで数えてみると、GPI anchor 合成がなくなるとその数が激減すること、野生型遺伝子でレスキューすると回復することがわかった。以上の結果から、GPI anchor 合成は生殖幹細胞ニッチでの体細胞分裂の維持に必要であることがわかった。

本研究は、線虫の GPI アンカーについての初めての系統的、網羅的研究である。また GPI アンカー合成が生殖巣と初期胚発生に必須であり、生命の連鎖に不可欠であることを示した初めての研究であり、生命科学における価値ある業績とみとめられる。また今後の、ヒトを含めた高等生物での GPI アンカー合成の生殖への役割の研究・不妊研究などの基礎となることも期待される。

よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	いとやまあきのり 糸山彰徳 (佐賀県)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	シ生博甲第83号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Studies on the molecular mechanism of peroxisomal division (ペルオキシソーム分裂の分子機構に関する研究)
論文調査委員	(主査) 教授 藤木幸夫 (副査) 教授 近藤久雄 教授 横溝岳彦 准教授 田村茂彦

## 論文内容の要旨

Peroxisome division is regulated by several factors, termed fission factors, as well as the conditions of the cellular environment. Over the past decade, the idea of metabolic control of peroxisomal morphogenesis has been postulated, but remains largely undefined to date. In the current study, docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) was identified as an inducer of peroxisome division. In fibroblasts isolated from patients that carry defects in peroxisomal fatty acid  $\beta$ -oxidation, peroxisomes are much less abundant compared to normal cells. Treatment of these patient fibroblasts with DHA induced the proliferation of peroxisomes to the level seen in normal fibroblasts. DHA-induced peroxisomal proliferation was abrogated by treatment with a small inhibitory siRNA targeting *dynammin-like protein 1 (DLP1)* and with dynasore, an inhibitor of DLP1, which suggested that DHA stimulates peroxisome division. DHA augmented the hyper-oligomerization of Pex11p $\beta$  and the formation of Pex11p $\beta$ -enriched regions on elongated peroxisomes. Time-lapse imaging analysis of peroxisomal morphogenesis revealed a sequence of steps involved in peroxisome division, including elongation in one direction followed by peroxisomal fission. DHA enhanced peroxisomal division in a microtubule-independent manner. These results suggest that DHA is a critical signal for peroxisomal elongation, a prerequisite for subsequent fission and peroxisome division. In this study, I also revealed that mitochondrial fission factor (Mff) is an essential factor for DHA-inducible peroxisomal division. Ectopic expression of *MFF* induced the recruitment of DLP1 to peroxisomes, while siRNA for *MFF* caused the abnormal elongated peroxisomes due to the mislocalization of DLP1. Peroxisomal elongation was required for Mff-induced proliferation of peroxisomes. Moreover, Pex11p $\beta$  interacted with DLP1 via Mff.

Collectively, Mff functions in the membrane fission of peroxisomes; possibly in a concerted manner with Pex11p $\beta$  and DLP1.

## 論文審査の結果の要旨

細胞内小器官ペルオキシソームは「膜の伸張化・切断」を経て分裂し、恒常的にその数を維持する。本申請者は下記3点に大別される項目から、ペルオキシソーム分裂の分子機構の研究を遂行した。

1. ペルオキシソーム系脂肪酸  $\beta$  酸化能障害患者由来の線維芽細胞では、ペルオキシソーム数の減少、肥大化等の形態異常が認められている。本申請者は、これら患者由来細胞中のリン脂質に含まれる脂肪酸量を定量・解析し、多価不飽和脂肪酸である docosahexaenoic acid (DHA, C22:6n-3) 量が著減していることを見出した。DHA 存在下で培養した患者由来細胞では、ペルオキシソームの伸長化に続き、時間経過と共に健常人由来細胞と同様な顆粒状で形態的に正常なペルオキシソーム数の増加が観察された。さらに、DHA によるペルオキシソーム数の増加が、既知のペルオキシソーム分裂因子である dynamin-like protein 1 (DLP1) の遺伝子発現抑制、さらには DLP1 の阻害剤である dynasore によって阻害されたことから、DHA がペルオキシソームの分裂を誘導することが明らかとなった。また、DHA はペルオキシソーム分裂因子 Pex11p $\beta$  依存的にペルオキシソームを伸長化させることで、その後の分裂を促進させた。DHA 存在下の培養系では、Pex11p $\beta$  の複合体形成が促進し、伸長化したペルオキシソーム上に Pex11p $\beta$  に富んだ膜領域が形成された。再構成リポソームを用いた *in vitro* の実験系において、リン脂質含有型の DHA 量の増加は、同リポソーム膜上に組み込まれた Pex11p $\beta$  のオリゴマー化を促進させた。これらの結果から、DHA が Pex11p $\beta$  の機能的複合体の形成を促進し、ペルオキシソームの伸長化を誘導することにより、分裂を促進させるものと推察される。また、DHA によるペルオキシソーム分裂は微小管に非依存的であるが、分裂後のペルオキシソームの正常な細胞内局在には微小管上が不可欠であることを本申請者は見出している。上記の結果より、本申請者は DHA がペルオキシソーム形態制御において重要な役割を担うこと、ペルオキシソーム分裂の初期段階である伸長化に必須な因子であることを明らかにした。

2. DLP1 はペルオキシソームおよびミトコンドリアの膜切断に機能する GTP 加水分解酵素の一種である。DLP1 は主にサイトゾルに局在するが、ペルオキシソームおよびミトコンドリア膜切断時には、各オルガネラ膜上へと移行し、膜切断時に機能する。近年、新たなペルオキシソームおよびミトコンドリアの形態制御因子として mitochondrial fission factor (Mff) が同定されている。ごく最近の報告より、Mff が DLP1 のミトコンドリア膜局在に機能することが示唆されたため、本申請者はペルオキシソーム膜状における Mff の機能解析に取り組んだ。本申請者は *MFF* の遺伝子発現抑制が DHA によるペルオキシソームの増殖誘導を著しく阻害することを見出した。また、同遺伝子発現抑制処理が DLP1 のペルオキシソーム局在を低下させ、DLP1 変異細胞に観察されるようなペルオキシソームの異常伸張化を引き起こした。さらに *MFF* の遺伝子過剰発現が DLP1 のペルオキシソーム膜上移行を促進させたことから、Mff が DLP1 のペルオキシソーム膜局在時に機能することを明らかにした。さらに、*MFF* の遺伝子過剰発現細胞ではペルオキシソームの増殖は認められないが、ペルオキシソーム膜の伸張化に機能する *PEX11 $\beta$*  と *MFF* の共発現細胞ではペルオキシソームの増殖が促進されたことから、Mff によるペルオキシソーム膜切断には同膜の伸張化が不可欠であることが明らかとなった。また、Pex11p $\beta$  が Mff を介して DLP1 と相互作用することを見出すとともに、これら3者の相互作用には DLP1 の middle domain を必要とすることも明らかにした。上記の結果より、本申請者は Mff がペルオキシソーム膜上への DLP1 の局在化に不可欠であること、さらには Pex11p $\beta$ 、Mff、DLP1 が共奏的にペルオキシソーム膜切断時に機能することを報告した。

3. 本申請者は、DHA 投与によるペルオキシソーム分裂誘導系を確立し、生細胞中のペルオキシソーム分裂過程の観察を試みた。DHA を投与したペルオキシソーム系脂肪酸  $\beta$  酸化能障害患者由来の線維芽細胞中において、ペルオキシソームは一方側へとその膜を伸張化させ、その後に膜が切断されることで分裂した。本申請者は、生細胞中においてペルオキシソームが「膜の伸張化・切断」を経て分裂する過程を初めて示すことができた。

以上の結果は、生命科学、分子細胞生物学の分野において価値ある業績と認められる。よって、本申請者は、博士(理学)学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	いとう たいち 伊藤 太一 (三重県)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	シ生博甲第84号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Behavioral and molecular studies on membrane-bound transporters implicated in the circadian rhythm of <i>Drosophila melanogaster</i> . (ショウジョウバエ概日時計に関する膜タンパク質の行動分子遺伝学的解析)
論文調査委員	(主査) 准教授 谷村 禎一 (副査) 教授 石原 健 准教授 市川 敏夫 准教授 小早川 義尚

## 論文内容の要旨

ショウジョウバエの概日時計の分子メカニズムの研究は、時計遺伝子の発現制御機構の解明を中心として、転写因子と翻訳後修飾にターゲットを絞って行われてきた。一方で、膜タンパク質の概日リズムへの関与に関しての知見は乏しい。ABC トランスポーターは膜を介した物質輸送を ATP 依存的に行う膜タンパク質であり、ショウジョウバエでは 56 種類が見つかっている。私は時期・組織特異的な RNAi を用いた新規時計遺伝子のスクリーニングを行い、概日リズムに関与する ABC トランスポーターの網羅的な同定を試みた。その結果、組織特異的なノックダウンにより、脳内の時計細胞で機能していると考えられる 5 個の ABC トランスポーターが同定された。得られた遺伝子は、ノックダウンシステムの活動リズムの表現型から、ほぼ全ての個体が長周期を示すグループと、一部が無周期になるだけで、残りの個体は正常な周期を示すという 2 つのグループに分類された。私はその中の *Early gene at 23 (E23)* 遺伝子に着目し解析を進めた。*E23* は脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdysone (20HE) によって発現が誘導される。*E23* のノックダウンシステムは長周期もしくは無周期を示し、時計遺伝子 *vri* (*vri*) の発現だけが上昇していた。さらに、20HE の核内受容体である *Ecdysone receptor (EcR)*, *ultraspiracle (usp)* のノックダウンシステムでもリズムの異常が見られた。時計遺伝子の中で *E23* と *vri* の 2 つの遺伝子には、20HE と CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) のそれぞれに対する応答配列が存在し、実際にこれらの遺伝子は 20HE と CLK/CYC によって相乗的に誘導されることが *in vitro* のプロモーターアッセイで確かめられた。一方、20HE による *E23* と *vri* の発現誘導は *E23* タンパク質により特異的に阻害された。また、*E23* のプロモーター-GAL4 システムと UAS-GFP システムを交配した子孫では、時計細胞であるペースメーカーニューロンで GFP の発現が観察された。つまり、*E23* タンパク質は時計細胞において 20HE によるシグナルを抑制することで *vri* の発現を制御し、さらに自身の発現に対してもフィードバックループを形成することで、概日振動体の制御に関与しているという新規の分子機構を本研究によって提唱することができた。

## 論文審査の結果の要旨

地球上の生物は約 24 時間周期の環境変動に適応して生きているが、ほとんどの生物は体内に生物時計を有している。近年の研究の進展により生物時計の機能に関わる数多くの時計遺伝子が同定され、細胞内の遺伝子転写のフィードバックループがリズム振動の核を形成してことが明らかになってきた。しかし、その振動が細胞間、あるいは出力系へどのように伝わっているのかはほとんどわかっていない。サーカディアンリズムの研究において、ショウジョウバエを用いた分子遺伝学的解析が中心的な貢献を生み出してきたが、まだ同定されていない遺伝子が時計機能に関与している

と考えられている。本研究は、サーカディアンリズムに関わる新規の遺伝子を同定するために、転写が振動していることが明らかになっていた多数の遺伝子について RNA 干渉法を用いて網羅的にスクリーニングを行った。その結果、新規の ABC トランスポーター遺伝子が時計機能に関わっていることを発見した。

ABC トランスポーターは膜を介した物質輸送を ATP 依存的に行う膜タンパク質であり、ショウジョウバエでは 56 種類が見ついている。本論文では、時期・組織特異的な RNAi を用いた新規時計遺伝子のスクリーニングを行い、概日リズムに関与する ABC トランスポーターの網羅的な同定を試みた。その結果、組織特異的なノックダウンにより、脳内の時計細胞で機能していると考えられる 5 個の ABC トランスポーターが同定された。得られた遺伝子は、ノックダウン系統の活動リズムの表現型から、ほぼ全ての個体が長周期を示すグループと、一部が無周期になるだけで、残りの個体は正常な周期を示すという 2 つのグループに分類された。本研究はその中の *Early gene at 23* (*E23*) 遺伝子に着目し解析を進めた。*E23* は脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdysone (20HE) によって発現が誘導される。*E23* のノックダウン系統は長周期もしくは無周期を示し、時計遺伝子 *vri* (*vri*) の発現だけが上昇していた。さらに、20HE の核内受容体である *Ecdysone receptor* (*EcR*), *ultraspiracle* (*usp*) のノックダウン系統でもリズムの異常が見られた。時計遺伝子の中で *E23* と *vri* の 2 つの遺伝子には、20HE と CLOCK/CYCLE (CLK/CYC) のそれぞれに対する応答配列が存在し、実際にこれらの遺伝子は 20HE と CLK/CYC によって相乗的に誘導されることが *in vitro* のプロモーターアッセイで確かめられた。一方、20HE による *E23* と *vri* の発現誘導は *E23* タンパク質により特異的に阻害された。また、*E23* のプロモーター GAL4 系統と UAS-GFP 系統を交配した子孫では、時計細胞であるペースメーカーニューロンで GFP の発現が観察された。要約すると、*E23* タンパク質は時計細胞において 20HE によるシグナルを抑制することで *vri* の発現を制御し、さらに自身の発現に対してもフィードバックループを形成することで、概日振動体の制御に関与しているという新規の分子機構を本研究によって提唱することができた。

以上の結果は、神経生物学の分野において価値ある業績であると認められる。よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があると認められる。

氏名・(本籍・国籍)	おおもりりょうすけ 大森 亮介 (埼玉県)
学位の種類	博士 (理学)
学位記番号	シ生博甲第 8 5 号
学位授与の日付	平成 24 年 3 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	THEORETICAL STUDY OF HETEROGENEOUS FACTORS IN EPIDEMIOLOGICAL MODELS (疫学モデルにおける不均一要素の理論研究)
論文調査委員	(主査) 教授 巖佐 庸 (副査) 教授 館田 英典 総合研究大学院大学先導科学研究科 教授 佐々木 顕

## 論文内容の要旨

理論疫学とは感染症の流行ダイナミクスを理論的に解析する学問であり、感染症流行抑制に非常に重要である。理論疫学において感染症の流行ダイナミクスは SIR モデルと呼ばれる数理モデルが使

われる事が多いが、SIR モデルの基本式は実際の感染症の解析に使えない事が多い。その理由として、不均一性があげられる。不均一性の例として、病原体の抗原性の進化、感染率の季節変動性、感受性を持つ宿主の年齢、宿主体内での病原体の増殖ダイナミクス、宿主の接触ネットワークが挙げられる。本論文では、この中で特に、病原体の抗原性の進化、感染率の季節変動性、宿主体内での病原体の増殖ダイナミクスに注目し、これらを SIR モデルに適用し解析した。以下に各題目の要旨を記す。

#### 第一章：季節性インフルエンザにおける系統の共存条件

インフルエンザ A 型に見られる様な抗原性の進化において宿主免疫の交叉反応は重要な要因であり、数理モデルにより、抗原型の分岐には宿主免疫の交叉反応と一般免疫の両方が重要である事が既に明らかになっている。本章では、新系統の誕生時期と既に存在している系統との共存との関係性について解析し、新系統の誕生時期が重複した年に新しいクレードは誕生しやすく、流行シーズンの初期に誕生した新系統が流行を引き起こすという知見を得るに至った。

#### 第二章：季節性インフルエンザの新系統誕生時期

インフルエンザウイルスの新系統予測は流行抑制の為に最も必要とされるが、進化動態の複雑さから困難を極める。本章では、インフルエンザウイルスの進化動態モデルを構築し、新系統の誕生時期、流行ピーク時期、流行期間について解析した。結果、新系統は流行シーズン初期に誕生し、誕生から一年以上経過した時期に流行ピークを迎える事が分かった。特に後者の発見は、将来流行する新系統が既に宿主集団に存在する事を意味し、新系統の予測可能性が示唆された。

#### 第三章：コイヘルペスにおける感染症流行の季節性の理論的解析

コイヘルペスウイルスはコイに感染する非常に毒性の高いウイルスであり、流行に季節性を持つ事が知られている。この流行の季節性により、過去に水温を人工的に変化させ流行を制御するという試みが行われた。本章では数理モデルによりコイヘルペスの流行の季節性を解析し、水温を人工的に変化させた時の効果について評価した。その結果コイヘルペスは秋に流行が始まると宿主の死亡個体が少なくなる事が分かった。水温を人工的に変化させる療法については、感染個体が最大になる時に開始し秋に終わると効果が最大になる事が分かった。しかし、この療法は流行初期に開始しすぐに治療を止めると、治療をしない時より死亡個体が増加する危険性があることも判明した。

### 論文審査の結果の要旨

理論疫学とは感染症の流行ダイナミクスを理論的に解析する学問であり、感染症流行抑制に非常に重要である。理論疫学において感染症の流行ダイナミクスは SIR モデルと呼ばれる数理モデルが使われる事が多いが、SIR モデルの基本式は実際の感染症の解析に使えない事が多い。その理由として、不均一性があげられる。不均一性の例として、病原体の抗原性の進化、感染率の季節変動性、感受性を持つ宿主の年齢、宿主体内での病原体の増殖ダイナミクス、宿主の接触ネットワークが挙げられる。本論文では、この中で特に、病原体の抗原性の進化、感染率の季節変動性、宿主体内での病原体の増殖ダイナミクスに注目し、これらを SIR モデルに適用し解析した。以下に各題目の要旨を記す。

#### 第一章：季節性インフルエンザにおける系統の共存条件

インフルエンザ A 型に見られる様な抗原性の進化において宿主免疫の交叉反応は重要な要因であり、数理モデルにより、抗原型の分岐には宿主免疫の交叉反応と一般免疫の両方が重要である事が既に明らかになっている。本章では、新系統の誕生時期と既に存在している系統との共存との関係性に

ついて解析し、新系統の誕生時期が重複した年に新しいクレードは誕生しやすく、流行シーズンの初期に誕生した新系統が流行を引き起こすという知見を得るに至った。

## 第二章：季節性インフルエンザの新系統誕生時期

インフルエンザウイルスの新系統予測は流行抑制の為に最も必要とされるが、進化動態の複雑さから困難を極める。本章では、インフルエンザウイルスの進化動態モデルを構築し、新系統の誕生時期、流行ピーク時期、流行期間について解析した。結果、新系統は流行シーズン初期に誕生し、誕生から一年以上経過した時期に流行ピークを迎える事が分かった。特に後者の発見は、将来流行する新系統が既に宿主集団に存在する事を意味し、新系統の予測可能性が示唆された。

## 第三章：コイヘルペスにおける感染症流行の季節性の理論的解析

コイヘルペスウイルスはコイに感染する非常に毒性の高いウイルスであり、流行に季節性を持つ事が知られている。この流行の季節性により、過去に水温を人工的に変化させ流行を制御するという試みが行われた。本章では数理モデルによりコイヘルペスの流行の季節性を解析し、水温を人工的に変化させた時の効果について評価した。その結果コイヘルペスは秋に流行が始まると宿主の死亡個体が少なくなる事が分かった。水温を人工的に変化させる療法については、感染個体が最大になる時に開始し秋に終わると効果が最大になる事が分かった。しかし、この療法は流行初期に開始しすぐに治療を止めると、治療をしない時より死亡個体が増加する危険性があることも判明した。

以上の研究は、数理生物学および理論疫学として、重要な貢献である。よって、本研究者は博士(理学)の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	さ えき こう いち 佐 伯 晃 一 (山口県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	シ生博甲第86号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	THEORETICAL STUDIES OF SELF-TOLERANCE: REGULATORY T CELLS AND ANERGY (自己寛容に関する理論的研究：制御性T細胞とアナジーについて)
論文調査委員	(主査) 教授 巖 佐 庸 (副査) 教授 館 田 英 典 九大高等研究院 特別主幹教授 笹 月 健 彦 准教授 岩 見 真 吾

## 論 文 内 容 の 要 旨

自己寛容とは免疫システムが自分の体に対して反応を示さない状態のことである。これは生物が生まれながらに持っている性質ではなく、成立にはその為のメカニズムが必要である。例えば、獲得免疫系を担うリンパ球はランダムに生成された受容体を用いて抗原の認識を行うため、自分の体由来の抗原を認識するリンパ球も作られる。そのため成熟前に受容体をチェックし、自己抗原を認識するものは排除する(負の選択)機構が存在する。しかしながら、このチェック機構だけでは不十分であり、リンパ球の成熟後に末梢において自己寛容を保証するメカニズムがあることが知られている。自己寛容の破綻は自己免疫疾患につながるため、メカニズムの理解は医学的な観点からも注

目を集めている。本論文では、自己寛容の成立に関わっている二つの機構、制御性 T 細胞とアナジーに着目しそれらの意義について数理モデルを用いて議論した。二つの機構は常に有益となるわけではなく、幾つかの条件下で有利に働くことが分かった。以下に各章の要旨を記す。

#### 第一章：制御性 T 細胞が有益となる条件

制御性 T 細胞は他の T 細胞の活性化を抑制する働きを持つ。しかし抑制する対象が自己抗原特異的であるのか、外来抗原特異的であるのかは基本的に区別できない。本章では、適応度の考えを導入し、外来抗原を排除する利益と自己抗原を攻撃する不利益から制御性 T 細胞が有利となる条件を求めた。その結果、自己抗原が存在する局所でのみ抑制が働くことが必須であることが明らかとなった。また適応度の比較によって、制御性 T 細胞の分化についての予測も得られた。

#### 第二章：制御性 T 細胞の最適な数

制御性 T 細胞による局所的な抑制についてより具体的なプロセスを考えるため、抗原提示細胞を介した抑制について数理モデル化を行った。活性化される外来抗原特異的および自己抗原特異的な T 細胞の数を計算することで、局所的な抑制を仮定した上でさらに制御性 T 細胞が有利な条件が明らかとなった。また、制御性 T 細胞の最適な数についても議論が可能となった。

#### 第三章：アナジー（T 細胞の不活性化状態）の意義

本章では制御性 T 細胞以外の自己寛容のメカニズムとして、抗原認識後に誘導される不活性化状態、アナジーについて考えた。T 細胞は抗原認識時のシグナルの強さ（強い弱いか）から応答（活性化、不活性化、現状維持）を選ぶこととし、どのシグナルに対してどの応答が良いか調べた。その結果、自己抗原の頻度が高く自己抗原を攻撃したときのダメージが中程度のときに、アナジーが有利となることが分かった。

### 論文審査の結果の要旨

自己寛容とは免疫システムが自分の体に対して反応を示さない状態のことである。これは生物が生まれながらに持っている性質ではなく、成立にはその為のメカニズムが必要である。例えば、獲得免疫系を担うリンパ球はランダムに生成された受容体を用いて抗原の認識を行うため、自分の体由来の抗原を認識するリンパ球も作られる。そのため成熟前に受容体をチェックし、自己抗原を認識するものは排除する（負の選択）機構が存在する。しかしながら、このチェック機構だけでは不十分であり、リンパ球の成熟後に末梢において自己寛容を保証するメカニズムがあることが知られている。自己寛容の破綻は自己免疫疾患につながるため、メカニズムの理解は医学的な観点からも注目を集めている。本論文では、自己寛容の成立に関わっている二つの機構、制御性 T 細胞とアナジーに着目しそれらの意義について数理モデルを用いて議論した。二つの機構は常に有益となるわけではなく、幾つかの条件下で有利に働くことが分かった。以下に各章の要旨を記す。

#### 第一章：制御性 T 細胞が有益となる条件

制御性 T 細胞は他の T 細胞の活性化を抑制する働きを持つ。しかし抑制する対象が自己抗原特異的であるのか、外来抗原特異的であるのかは基本的に区別できない。本章では、適応度の考えを導入し、外来抗原を排除する利益と自己抗原を攻撃する不利益から制御性 T 細胞が有利となる条件を求めた。その結果、自己抗原が存在する局所でのみ抑制が働くことが必須であることが明らかとなった。また適応度の比較によって、制御性 T 細胞の分化についての予測も得られた。

## 第二章：制御性 T 細胞の最適な数

制御性 T 細胞による局所的な抑制についてより具体的なプロセスを考えるため、抗原提示細胞を介した抑制について数理モデル化を行った。活性化される外来抗原特異的および自己抗原特異的な T 細胞の数を計算することで、局所的な抑制を仮定した上でさらに制御性 T 細胞が有利な条件が明らかとなった。また、制御性 T 細胞の最適な数についても議論が可能となった。

## 第三章：アナジー（T 細胞の不活性化状態）の意義

本章では制御性 T 細胞以外の自己寛容のメカニズムとして、抗原認識後に誘導される不活性化状態、アナジーについて考えた。T 細胞は抗原認識時のシグナルの強さ（強いが弱い）から応答（活性化、不活性化、現状維持）を選ぶこととし、どのシグナルに対してどの応答が良いか調べた。その結果、自己抗原の頻度が高く自己抗原を攻撃したときのダメージが中程度のときに、アナジーが有利となることが分かった。

以上の研究は、数理生物学および免疫生物学として、重要な貢献である。よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	わ ち なかただ 和 智 仲 是 (高知県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	シ生博甲第87号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	Speciation History of Three Closely Related Oak Gall Wasps, <i>Andricus mukaigawae</i> , <i>A. kashiwaphilus</i> and <i>A. pseudoflos</i> (Hymenoptera: Cynipidae) Inferred from Nuclear DNA and Mitochondrial DNA Sequences (核DNAとミトコンドリアDNAの塩基配列から推定されたナライガタマバチ種群の種分化の歴史)
論文調査委員	(主査) 教授 舘田 英典 (副査) 教授 阿部 芳久 准教授 Alfred Edward Szmidt

## 論 文 内 容 の 要 旨

ナラタマバチにおいて寄主転換や生活環の違い（両性生殖＋単為生殖と単為生殖のみ）がどのような順番で進化してきたのかを明らかにするために、ナライガタマバチ種群に属する近縁な三種（*Andricus mukaigawae*, *A. kashiwaphilus*, *A. pseudoflos*）を用い核DNAとミトコンドリアDNAの塩基配列を比較解析した。寄主植物が同じで生活環が異なる種間（*A. kashiwaphilus*:両性生殖＋単為生殖と *A. pseudoflos*:単為生殖のみ）は遺伝的にも分化が小さかった。一方で寄主植物が異なるが生活環は同じ種間（*A. mukaigawae*, *A. kashiwaphilus*:ともに両性生殖＋単為生殖）は遺伝的に分化が大きかった。このことから寄主転換が起こった後に単為生殖化が起こったことが示唆された。さらに *A. pseudoflos*（単為生殖のみ）が遺伝的に二つのグループを持つことから、ナライガタマバチ種群において単為生殖化は複数回起こったことが示唆された。また、*A. mukaigawae*, *A. kashiwaphilus* の種間では、核とミトコンドリアで一方向かつ逆方向という特徴的な遺伝子流動が推定され、昆虫共生菌 *Wolbachia* がタマバチの種分化に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

新しい種がどのように進化するかを解明することは進化生物学の大きな課題の一つである。特に昆虫では寄主転換や生活環の変化を伴った種分化が多く知られており、これらがどのようにして起こったのかを解明することは種分化機構を解明する上で意義深い。

この研究はナライガタマバチ種群に属する近縁な三種 (*Andricus mukaigawae*, *A. kashiwaphilus*, *A. pseudoflos*) を用い、集団遺伝学的手法を使って寄主転換や生活環の進化がどのように起こったかを明らかにした。このために日本各地から採集したこれら三種総計 51 個体のタマバチから DNA を抽出し、ミトコンドリア DNA 1 領域と核 DNA にコードされる 9 遺伝子座の塩基配列を決定した。これらのデータから分子進化学的手法により種の分岐過程を推定したところ、まずコナラ属 (*Quercus*) の様々な樹種を寄主とする *A. mukaigawae* から、カシワ (*Q. dentata*) を寄主とする *A. kashiwaphilus* が種分化し、その中から単為生殖のみを行う *A. pseudoflos* が最近に種分化したことがわかった。興味深いことに単為生殖の進化は複数の系統で起こっており、このような生活環の変化がこの種群では起こりやすいことが明らかになった。

更に遺伝子系図学に基づくベイズ法を用いた解析から、寄主転換が起こった後、*A. mukaigawae* と *A. kashiwaphilus* の間では弱いながらも遺伝子流動が続いており、しかもその方向がミトコンドリア遺伝子では *A. mukaigawae* から *A. kashiwaphilus* で、核遺伝子では逆に *A. kashiwaphilus* から *A. mukaigawae* となっていることが推定された。この二種の場合、このようなミトコンドリアと核の遺伝子での逆方向の遺伝子流動は、昆虫共生菌 *Wolbachia* による細胞質不和合性を仮定するとよく説明できる。実際に *A. mukaigawae* は *Wolbachia* に感染していることがこれまでの研究でわかっており、この細胞質不和合性による遺伝子流動の制限が、寄主転換による種分化を促進させた可能性が示唆された。一般にナラタマバチでは近縁樹種間での寄主転換は殆ど見られないが、この種群では *Wolbachia* の感染による遺伝子流動制限が寄主転換による種分化を引き起こした可能性がある。

これらの成果は昆虫における種分化の過程について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は博士（理学）の学位を受ける資格があるものと認める。

氏名・(本籍・国籍)	くりはら りょうすけ 栗原 亮介 (京都府)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	シ生博甲第74号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	デンドリティックポリリジンを用いた遺伝子キャリアーの開発
論文調査委員	(主査) 教授 片山佳樹 (副査) 教授 澤田廉士 教授 木戸秋 悟 准教授 新留琢郎

## 論文内容の要旨

近年、科学技術のめざましい進歩にともないナノテクノロジーは我々の生活に欠かせない技術と  
なっている。このようなナノテクノロジーに応用可能な高分子素材の一つとして、デンドリマーが

注目されている。デンドリマーは、規則正しく分岐した構造を持つ単分散の高分子であり、デンドリマーの表面に存在する官能基により、さまざまな目的に応じた多機能な修飾が可能である。このユニークな構造により、デンドリマーは、光機能材料、触媒化学材料、液晶材料、塗料など様々な分野での応用が期待されている。この様な生体材料としての応用に注目が集まるなか、最近、遺伝子キャリアーとしても利用可能であることが報告されている。一方、遺伝子治療用の核酸としては新たに、siRNA、アプタマー、アンチセンス、デオキシ核酸、リボザイムなどのオリゴ核酸 (ODN) を用いた核酸医薬の研究が活発におこなわれている。核酸医薬は、疾患にあわせて配列をデザインすることができ特異性が高く、プラスミド DNA や抗体医薬で見られる免疫応答が抑えることができ、化学的方法で大量合成が可能であるなどの利点があるため、既存薬のない分野への応用が期待されている。そこで本論文では、デンドリマーの遺伝子キャリアーとしての機能に着目し、デンドリマーによる核酸医薬のデリバリーを目指した。

第 1 章は序論であり、デンドリマーの合成法やさまざまな分野への応用について概説した。

第 2 章では、リジンを枝分かれユニットとする 6 世代のデンドリティックポリリジン (KG6) とオリゴ核酸 (ODN) の複合体の物性および担がんマウスにおける体内分布を検討した。また、KG6 にポリエレングリコール (PEG) 鎖を修飾することで、複合体の腫瘍への集積能向上を試みた。まず KG6 と PEG 修飾 KG6 (PEG-KG6) を合成し、ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) を用いて、これが ODN と複合体を形成できることを明らかにした。次に、複合体の血中滞留性に大きな影響を与える要素である粒径とゼータ電位を評価した。動的光散乱法 (DLS) で粒径を測定した結果、グルコース溶液中では PEG-KG6 / ODN 複合体および KG6 / ODN 複合体は安定に分散することが確認された。またリン酸緩衝生理食塩水中では、KG6 / ODN 複合体は凝集するが、PEG-KG6 / ODN 複合体は安定に分散することが確認された。ゼータ電位を測定した結果、KG6 / ODN 複合体は正に大きく荷電しているのに対し、PEG-KG6 / ODN 複合体はわずかに正に荷電していることが確認された。これらの結果より、KG6 に PEG を修飾することで、複合体を生体環境で安定化できることが示唆された。複合体の体内分布を検討するため、KG6 にガドリニウム (Gd) を標識した。これをマウス尾静脈から投与後、摘出した臓器を硝酸で完全に溶解し、誘導結合プラズマ質量分析装置 (ICP-MS) を用いて Gd を定量することで各臓器における複合体の集積量を評価した。その結果、KG6 / ODN 複合体は、PEG-KG6 / ODN 複合体と比較して、肝臓、脾臓、肺および腎臓に集積していることが確認された。一方、PEG-KG6 / ODN 複合体は、腫瘍への集積量が高いことが確認された。また、ODN に蛍光色素を修飾し (Cy5-ODN)、複合体の体内分布を評価した。その結果、KG6 / Cy5-ODN は肝臓および脾臓に集積し、PEG-KG6 / Cy5-ODN 複合体は腫瘍にも集積することが確認できた。以上のことから、KG6 は肝臓および脾臓を標的とした遺伝子キャリアーとして、PEG-KG6 は腫瘍を標的とした遺伝子キャリアーとして期待できることが示された。

第 3 章では、第 2 章で得られた結果を踏まえ、KG6 を用いて siRNA を肝臓へ送達することを目指した。そこで、まず KG6 と siRNA の複合体の物性を評価し、次に KG6 を用いて *in vitro* における細胞への siRNA 導入を評価し、最後にマウスに複合体を尾静脈投与し肝臓における siRNA の効果を評価した。まず、KG6 を合成し、PAGE より siRNA と複合体形成を形成することを確認した。次に DLS によって、KG6 に由来するカチオンと siRNA に由来するアニオンの比 (C/A 比) に対する複合体粒径の依存性を評価した。その結果、C/A 比が高くなる (カチオンが増加する) に伴い粒径は小さくなり、最終的には大きさが一定値になることが確認された。また、ゼータ電位は C/A 比が高くなるに伴い電位も大きくなり、最終的には電位も一定値となることが確認された。*in vitro* における細胞への siRNA 導入のため、ルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA を KG6 を用いて細胞へ導入し、その後、ルシフェラーゼを抑制する siRNA を KG6 を用いて細胞へ導入した。その結果、siRNA 導入によるルシフェラーゼ発現の抑制が確認された。肝臓への siRNA デリバリーを評価するため、マウスにルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA をハイドロダイナミクス法

を用いて投与し、肝臓でルシフェラーゼを発現させたマウスを作製した。このマウスに、さまざまな C/A 比における KG6 / siRNA 複合体を尾静脈より投与した。18 時間後に肝臓を摘出し、そのライセートのルシフェラーゼ活性をルミノメータを用いて測定した。その結果、C/A 比が高くなるに伴い、肝臓におけるルシフェラーゼの発現量が低下することが確認された。また、肝毒性をアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) を測定することで評価した。その結果、肝毒性は確認されなかった。これらの結果より、KG6 は肝臓を標的とする遺伝子キャリアーとして期待できることが示唆された。

第 4 章は結論であり、本研究の総括を述べた。

## 論文審査の結果の要旨

デンドリマーは、規則正しく分岐した構造を持つ単分散の高分子であり、デンドリマーの表面に存在する官能基により、さまざまな目的に応じた多機能な修飾が可能である。特にアミノ酸であるリジンを構成ユニットとするデンドリティックポリリジンは、遺伝子キャリアーとしての応用が期待される分子である。本論文では、このデンドリティックポリリジンの機能に着目し、遺伝子キャリアーとしてこれまで詳細が不明であった体内動態を明らかにするとともに、その特性を利用した核酸医薬の腫瘍と肝細胞への送達に成功している。得られた成果は以下のとおりである。

まず、リジン残基を枝分かれユニットとする 6 世代のデンドリティックポリリジン (KG6) にポリエングリコール (PEG) 鎖を修飾した PEG 修飾 KG6 (PEG-KG6) を合成し、KG6 とともにその核酸との複合体の物性を詳細に調べている。その結果、ポリアクリルアミド電気泳動法 (PAGE) を用いて、これらが核酸医薬と複合体を形成できること、動的光散乱法により、リン酸緩衝生理食塩水中では、KG6 / DNA 複合体は凝集するが、PEG-KG6 / DNA 複合体は安定に分散すること、この原因が両者のゼータ電位の違いに基づくことを明らかにしている。また、複合体の体内分布を検討するため、KG6 及び PEG-KG6 にガドリニウムイオンを標識し、マウス尾静脈から投与後、摘出した臓器を用いた誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) を行うことにより、KG6 / DNA 複合体は、肝臓、脾臓、肺および腎臓に集積し、PEG-KG6 / DNA 複合体は腫瘍への集積能力が高いことを明らかにしている。また、蛍光色素を修飾した DNA を用いて複合体の体内分布を評価した結果、KG6 との複合体は肝臓および脾臓に集積し、PEG-KG6 との複合体は腫瘍に集積することを確認している。以上のことから、KG6 は肝臓および脾臓を標的とした遺伝子キャリアーとして、PEG-KG6 は腫瘍を標的とした遺伝子キャリアーとして、それぞれ期待できることを示している。

次に上述の成果を利用して、KG6 を用いた siRNA の肝臓への送達に成功している。KG6 と siRNA の複合体の粒径は、KG6 に由来するカチオンと siRNA に由来するアニオンの比 (C/A 比)が高くなるに伴い小さくなることを見出し、最適な複合体作成条件を確立している。さらに、ルシフェラーゼを発現する培養細胞を作成して、これにルシフェラーゼを抑制する siRNA を KG6 を用いて導入することでルシフェラーゼ発現の抑制を達成している。また、*in vivo*での効果を検証するため、マウスにルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA をハイドロダイナミクス法により投与して肝臓でルシフェラーゼを発現させたマウスを作製し、さまざまな C/A 比における KG6 / siRNA 複合体を尾静脈より投与し、肝臓で発現するルシフェラーゼの発現を抑制できることを示している。

以上の結果は、デンドリティックポリリジンの遺伝子キャリアーとしての性能を詳細に明らかにするとともに、遺伝子送達における新規な手法を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士 (工学) の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	あきやま やす ゆき 秋 山 泰 之 (広島県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	シ生博甲第77号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	治療および診断への適用を目指した金ナノロッドの生体内挙動制御に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 片山佳樹 (副査) 教授 後藤雅宏 教授 村上輝夫 准教授 新留琢郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

ナノテクノロジーを駆使し開発された DDS (Drug delivery system) 製剤は、従来の薬と比較して標的部位への高い集積能と、薬効を示す。また、他の部位への蓄積量を減少させることで、副作用の軽減を可能とするため、QOL (Quality of life) の向上が期待できる薬剤として用いられている。現在はさらなる低侵襲治療実現のため、標的部位の環境もしくは外部刺激に応答した薬物放出制御に関する研究が数多く報告されている。その中でも、従来の薬剤とは大きく性質の異なる無機ナノ粒子が注目されつつある。この無機ナノ粒子は特徴的な化学的、電気的、磁氣的性質を示すことから、外部刺激に応答する薬剤として、もしくはイメージングにおけるプローブとして利用されている。また比較的容易に表面修飾が可能であることから、薬物送達のためのキャリアとしても期待されている。本論文では、無機ナノ粒子である金ナノロッドに着目し、実験に用いた。この金ナノロッドは棒状の金ナノ粒子であり、生体透過性の高い近赤外光を吸収し発熱するため、治療や診断のためのプローブとして注目されている。これまで、フォトサーマル治療やイメージング、光に応答した薬物放出制御などに応用されてきたが、金ナノロッドを用いた治療効果を向上させるための研究はほとんど行われてこなかった。そこで本論文では、がんに対する治療や診断への適用を目指した金ナノロッドの創製を試みた。

第1章では、序論として、現在までの DDS 製剤および無機ナノ粒子、金ナノロッドの治療や診断への応用について概説した。

第2章では、金ナノロッドの腫瘍への集積能向上を狙い、PEG (ポリエチレングリコール) 修飾金ナノロッドの PEG 密度や投与濃度、形状について検討した。また、治療や診断のために投与した金ナノロッドが与える副作用を知る上で、金ナノロッドの長期間での体内動態や排出の有無を知ることが重要な意味を持つ。そこで、金ナノロッドの投与90日後までの体内動態を評価した。

PEG 密度を増加させることで、脾臓の蓄積度が減少し腫瘍の集積度が向上した。また、投与濃度を増加させることによって、肝臓の蓄積度が減少し腫瘍への集積度が向上することが明らかとなった。特に、PEG 添加モル比 1.5 以上で修飾した金ナノロッド、もしくは投与金原子重量 39.0  $\mu\text{g}$  以上の金ナノロッドを投与することによって、他の臓器と比較して高い腫瘍への集積を示した。形状変化による体内分布を評価した結果、脾臓での蓄積度が粒子の球状化により減少したのみで、他の臓器での蓄積度に大きな影響を及ぼさなかった。しかし、これまで形状は異なるが PEG 密度や表面電荷、体積が等しいナノ粒子で体内分布を比較した例はなく、新しい知見を得ることができた。金ナノロッドの体外排泄の有無を評価するため、長期体内動態を評価した。金ナノロッドの多くが蓄積していた肝臓や脾臓への蓄積が時間経過に伴い減少していき、他の臓器への再分布もなかったことから、体外排泄されていることが示唆された。これらの結果は、金ナノロッドが医療の領域で応用されるための重要な基礎情報となると期待できる。

金ナノロッドは凝集することで近赤外域の吸収を減少させてしまうため、標的部位への蓄積量を

知るだけでは、金ナノロッドの吸光に依存する治療や診断への効果を考える上で十分とは言えない。そこで第3章では、金ナノロッドが持つ吸光特性に着目した生体内挙動評価法を開発した。また得られた情報から、治療を行う上で適した表面修飾法を検討した。

高い生体浸透性を持つ近赤外光を用いて、生体内に投与した金ナノロッドを光イメージングした。その結果、腹部において金ナノロッドの吸収に基づくコントラストの変化を観察することができた。このコントラストの変化を定量的に評価するために、積分球を用いた分光法により吸収スペクトルを評価した。投与後のマウスの腹部を測定したところ、金ナノロッドに由来する吸収ピークを観察することができ、また経時変化を追うことにより血中滞留性を評価することに成功した。この測定法を用いて臓器に蓄積した金ナノロッドの評価を試みた。CTAB（ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロマイド）コート金ナノロッドを投与することで肝臓へ蓄積させ、極短時間で吸収スペクトルを測定することができるマルチチャンネル分光器と積分球を用いて、肝臓部位でのスペクトル変化を評価した。肝臓部位で金ナノロッドに由来する近赤外域の吸収が増加していったが、他の部位では逆に減少する傾向を取った。この結果は、CTAB コート金ナノロッドが血中から速やかに肝臓へ蓄積していったことを表している。また、腫瘍への集積を評価するために、PEG 修飾金ナノロッドを投与した担がんマウスの腫瘍部位を測定した。皮下に接種した腫瘍部位と皮膚部位の差を見ることができ、投与 48 時間以降において金ナノロッドの腫瘍への集積が認められた。これらの結果は、積分球を用いた分光器により生体内の金ナノロッドが評価できることを示唆しており、腹部から光が届く範囲であれば金ナノロッドの血中滞留性や臓器への蓄積についても、マウスを解剖することなくリアルタイムにモニタリングすることが可能であることを示した。

リアルタイムモニタリングでは評価することの出来なかった臓器や、より詳細な吸収スペクトルを測定するために、臓器をマウスから摘出しライセートにすることで評価に供した。測定には積分球を用いた分光光度計を利用した。その結果、PEG 修飾金ナノロッドにおいて腫瘍とそれ以外の臓器の凝集傾向に違いがあることが確認された。この違いをイメージングにより観察することができれば、腫瘍の選択的な画像化ができると期待される。また、シリカコートすることで PEG 修飾と比較して凝集による吸光変化を抑制できることが明らかとなった。この吸光特性をほとんど変化させないシリカコート金ナノロッドは、腫瘍へ集積しない。そこでシリカ表面に PEG を修飾させることで、腫瘍集積を目指した。その結果、腫瘍に蓄積しても吸収スペクトルを大きく変化させることなく、劇的に腫瘍集積度を向上させた。このことから、腫瘍治療に対する有用なフォトサーマル素子として期待できる表面修飾を提示することができた。

第4章では、本論文で得られた成果や知見、今後の展望について総括した。

本論文では、医療への応用が期待されている金ナノロッドを用いて、治療や診断に対して効果的に機能させるための金ナノロッドの創製に向け検討した。その結果、金ナノロッドの調製と投与において、いくつか最適な条件について確立することができ、また実験の過程で、生体内に存在する金ナノロッドを非侵襲的に評価する手法の確立にも成功した。この成果は、金ナノロッドを用いた治療や診断をこれまでと比較して効果的に行えることを示唆しており、ヒトへの応用・臨床に向け一歩前進することができたと考えている。ナノ粒子の医療への応用に向けた研究はまだ発展途上であることから、金ナノロッドに留まらず他のナノ粒子に対しても、本論文における成果や知見が臨床へ向けた一助となれば幸いである。

## 論文審査の結果の要旨

ナノテクノロジーを利用して開発された薬物送達システム(DDS)製剤は、従来の薬と比較して標的部位への高い集積能と、薬効を示す。また、他の部位への蓄積量を減少させることで、副作用の軽減を可能にするため、QOL (Quality of life) の向上が期待できる薬剤として有望である。中でも、従来の薬剤とは大きく性質の異なる無機ナノ粒子が、特徴的な化学的、電気的、磁氣的性質を

示すことから、外部刺激に応答する薬剤として、もしくはイメージングにおけるプローブとして期待されている。本論文では、無機ナノ粒子であり、生体透過性の高い近赤外光を吸収し発熱する特性を有する金ナノロッドに着目し、がんに対する治療や診断への適用を目指した金ナノロッド製剤の創製に成功し、その評価法を確立している。得られた成果は以下のとおりである。

まず、金ナノロッドの腫瘍への集積能向上を狙い、ポリエチレングリコール(PEG)修飾金ナノロッドのPEG密度や投与濃度、形状の違いが及ぼす体内動態に対する影響についてマウスを用いて検討している。その結果、PEG密度を増加させることで、脾臓の蓄積度が減少し腫瘍の集積度が向上すること、投与濃度を増加させることによって、肝臓の蓄積度が減少して腫瘍への集積度が向上することを見出している。また、金ナノロッドの長期体内動態を評価し、肝臓や脾臓への蓄積が時間経過に伴い減少する一方、他の臓器への再分布がないことから、長期的には金ナノロッドは体外排泄されることを明らかにしている。形状に関しては体内動態に影響しないことも見出している。

また、近赤外光を用いて、生体内に投与した金ナノロッドをイメージングする手法を考案し、腹部において、金ナノロッドの吸収に基づくコントラストの変化と積分球を用いた分光法による吸収スペクトルを計測することに成功している。さらにこの計測手法を用い、金ナノロッドの血中滞留性や臓器への蓄積を評価できることを示している。すなわち、本手法を用いてヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロマイドでコートした金ナノロッドの血中から肝臓への移行や、PEG修飾金ナノロッドの腫瘍への集積の確認に成功している。

しかしながら、上述の評価と組織破砕液を用いたスペクトル解析により、PEG修飾金ナノロッドでは種々の臓器で凝集していることが認められた。そこでこれを回避するため、新規にシリカコートした金ナノロッドを開発し、これが臓器での凝集を抑制できること、さらにシリカ表面にPEGを修飾させることで、劇的に腫瘍集積度を向上できることを明らかにしている。

以上の結果は、金ナノロッドの医療応用のために必要な重要な知見と、最適な分子設計指針、使用条件を確立したものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士(工学)の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	た なか ひろ ゆき 田 中 洋 行 (鳥取県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	シ生博甲第78号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	細胞内酵素に応答する遺伝子発現のためのカチオン性ペプチド担持型高分子ベクターの開発
論文調査委員	(主査) 教授 片山佳樹 (副査) 教授 今任稔彦 教授 澤田廉士 准教授 新留琢郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

従来の低分子化合物では完治させることが難しかった難治性疾患に対する新しい治療法として、遺伝子治療は大きな期待を集めてきた。治療用遺伝子を目的の細胞内に送達するにはベクター(遺伝子キャリア)が必要であるが、これはウイルスベクターと非ウイルスベクターに大別できる。一般に、ウイルスベクターは、遺伝子の導入効率は優れているものの、安全性に問題がある。一方、

非ウイルスベクターは、遺伝子導入効率はウイルスベクターに劣るが、安全性に優れる。しかし、もちろん非ウイルスベクターであれば全て安全性に優れるというものではない。そこで、本研究では、治療対象を癌に特定し、副作用の危険性が少ない非ウイルスベクターの開発を最終目標とした。そのためには、有効な治療効果を得るのに十分な遺伝子発現効率を持つことと、副作用を回避するために疾患細胞選択性があることという2つの条件が必要である。

我々は、癌細胞と正常細胞のプロテインキナーゼ C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) 活性の差を利用して、癌細胞選択的な遺伝子発現を目的とした遺伝子発現制御システム (D-RECS) を開発してきた。これまで用いられてきたベクターは、ポリアクリルアミドや直鎖型ポリエチレンイミン (LPEI) を主鎖として、側鎖に PKC $\alpha$  の基質ペプチド (カチオン性) を担持させたポリマーである。前者 (ポリアクリルアミド-ペプチドコンジュゲート: PPC) は、遺伝子発現が低いことが問題であった。後者 (LPEI-ペプチドコンジュゲート) は遺伝子発現が増加したものの、合成が困難であった。また、いずれのポリマーも生分解性をもたないため、長期投与時には安全性に不安が残る。このような経緯から、本システムがなぜ遺伝子発現効率が悪いのかを解明し、本システム、特に PKC $\alpha$  応答性送達遺伝子発現システムに用いるための、高遺伝子発現効率を有し、かつ安全なベクターの開発を行った。

第1章では、高い遺伝子発現効率の達成や、副作用を回避するための疾患細胞特異的遺伝子送達を目指した非ウイルスベクターについて、従来どのような戦略で設計されてきたかについてまとめた。

第2章では、PPC/プラスミド DNA (pDNA) 複合体の形成様式について詳細に検討し、得られた知見を新規キャリア設計に還元することを目的として研究を行った。その結果、PPCに担持したペプチドの正電荷密度や、ペプチドグラフト率は、対応する複合体の構造を決定する要因であることが判明した。ペプチドの正電荷とペプチドグラフト率が共に高い場合、PPCはPLLと同程度に強固にpDNAと複合体を形成し、この複合体は生理塩濃度条件下で分散安定性を持たなかった。しかし、ペプチドの正電荷とペプチドグラフト率が共に低い場合、PPCはpDNAと緩い複合体を形成し、この複合体は分散安定性を持っていた。またPPCは、かさだかく中性かつ親水性の主鎖が、pDNAを強く凝縮するのを妨げ、その結果、自身の持つカチオン当量以上のアニオンと相互作用する性質を持つことが判明した。このPPCとpDNAの相互作用は強くなく、ゲル電気泳動で分離する程度の「スティッキー」な相互作用であった。このPPCとpDNAの特徴的な相互作用形式は、反応できる酵素を選択する環境を創りだしていることが明らかになった。例えば、本章の実験では、ヌクレアーゼの反応は進行したが、一方、DNA増幅反応や遺伝子発現は抑制した。以上の結果から、PPCをキャリアとして用いた場合、複合体の表面電荷が中性であるため、細胞表面と相互作用しにくく、細胞内へのpDNAの導入量が少なかったことが低い遺伝子発現効率の主な原因であると考察した。

第3章では、D-RECSのための新規ポリマーを開発した。ポリマーの設計は、従来のD-RECS用ポリマーに存在していた、遺伝子発現効率の低さ、生分解性が無いこと、合成の困難さといった問題点を克服することを目的としておこなった。側鎖への修飾が容易で、その電荷密度の高さから、ベクターとして広く用いられているPLLを主鎖として、側鎖にPKC $\alpha$ 特異的な基質ペプチドを担持した、PKC $\alpha$ 応答性D-RECSポリマー (PLPC) を合成した。

PLPCとpEGFPの複合体をHepG2細胞にトランスフェクションした結果、PLPC(S)のみでEGFPタンパク質由来の蛍光が認められ、陰性対照であるPLPC(A)では全く蛍光が認められなかったことから、PLPCをD-RECSポリマーとして用いることが証明された。また、PPCでは、同様の実験で蛍光が認められなかったことから、遺伝子発現効率の改善に成功したと言える。

このように、合成が容易で、PPCより遺伝子発現効率が高い、新規D-RECSポリマーの開発に成功した。また、最適なC/ADNA比 (ポリマーの正電荷/pDNAの負電荷) で複合体を形成させることで、酵素応答性も従来のポリマーより向上させることができた。

第4章では、これらの結果をまとめ、将来への課題と展望について述べた。

本論文では、癌細胞と正常細胞のプロテインキナーゼ Ca 活性の差を利用して、癌細胞特異的に送達遺伝子を放出・発現できるシステムにおいて、本システムの問題点であった、低い遺伝子発現効率の原因を解明し、高い遺伝子発現効率と酵素応答性を持つ非ウイルスベクターを開発した。これにより、副作用の無い遺伝子治療にまた一歩近づいたと言える。しかし、本システムは未だ基礎研究の段階にあり、今後の臨床応用に向けて、さらなる改善が必要であろう。本論文が今後の遺伝子送達研究の一助になれば幸いである。

## 論文審査の結果の要旨

細胞内シグナル伝達系は細胞の生命活動そのものであるために、この異常は様々な疾病と密接に関連している。特にタンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）の異常は様々な疾病において確認されている。これまでに標的キナーゼのカチオン性基質ペプチドを担持したポリアクリルアミドや直鎖型ポリエチレンイミン (LPEI) を主鎖とした高分子コンジュゲートが、活性化された標的キナーゼ依存的な外来遺伝子発現を達成できることが見出されたが、前者は発現効率が低い、後者は合成が困難であるという問題があった。本論文では、このようなキナーゼ応答型の遺伝子制御高分子の分子構造と遺伝子発現効率の関係を解明し、高遺伝子発現効率を有し、かつ合成が容易なキナーゼ応答型遺伝子キャリアーの開発を行っている。得られた成果は以下のとおりである。

まず、主鎖がポリアクリルアミドで種々のアミノ酸配列を有するカチオン性ペプチドを担持した高分子コンジュゲートを合成し、それらとプラスミド DNA (pDNA) との複合体の形成様式について詳細に検討している。その結果、担持したペプチドの正電荷密度とペプチドグラフト率が対応する複合体の構造を決定する要因であることを明らかにしている。ペプチドの正電荷とペプチドグラフト率が共に高い場合、pDNA と強固な複合体を形成するが、生理塩濃度条件下で分散安定性を示さず、ペプチドの正電荷とペプチドグラフト率が共に低く、pDNA と緩い複合体を形成する場合は、分散安定性を保つことを見出している。またコンジュゲートの親水性の主鎖が pDNA を強く凝縮するのを妨げ、その結果、自身の持つカチオン当量以上のアニオンと相互作用する性質を持つことが反応できる酵素を選択する環境を創りだしていることを解明している。

次にこれらの知見を踏まえ、合成的にも容易で高い発現制御能を有する遺伝子キャリアーとして、ポリリジンを主鎖に有するプロテインキナーゼ Ca 応答型遺伝子キャリアーを設計・合成して、HepG2 細胞において従来のポリアクリルアミド型キャリアーに比較して高い遺伝子発現能を有する新規キャリアーを実現している。

以上の結果は、現行の遺伝子送達における細胞特異性の問題を解決する新しい遺伝子キャリアー設計における指針を確立し、薬物探索、薬効評価、疾患診断における新規な手法を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（工学）の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	つちや あきら 土谷 享 (福岡県)
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	シ生博甲第79号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	プロテインキナーゼ応答性ポリマーの新たな標的探索と安定性向上に向けた設計
論文調査委員	(主査) 教授 片山佳樹 (副査) 教授 山東信介 教授 上平正道 准教授 新留琢郎

## 論文内容の要旨

生物は生命活動を維持するために外界からの刺激に敏感に応答し、その情報を確実に核へと伝達する必要がある。細胞内でその役割を担っているのが細胞内シグナル伝達系であり、核へと伝達された情報により細胞増殖、分化、細胞死といった細胞機能を制御している。細胞内シグナル伝達因子のなかでも、タンパク質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）は細胞内シグナル伝達系において重要な役割を果たしている。プロテインキナーゼは上流からの情報を受け取ると活性化し、下流のタンパク質をリン酸化することで情報を伝達する。正常な細胞ではプロテインキナーゼの活性は正常に制御されているが、疾患細胞中では特定のプロテインキナーゼが異常活性化していることが知られている。筆者らは疾患細胞で異常活性化しているプロテインキナーゼに着目し、プロテインキナーゼに応答して細胞内で遺伝子の発現を制御するシステムの構築を試みてきた。このシステムはプロテインキナーゼによりリン酸化される基質ペプチドを担持したカチオン性ポリマーを用いる。このポリマーはプラスミド DNA (pDNA) と静電相互作用により複合体を形成し、細胞内でリン酸化されると pDNA を放出し、遺伝子の発現が活性化する。本システムとして、これまでにプロテインキナーゼ A (PKA)、プロテインキナーゼ C $\alpha$  (PKC $\alpha$ ) に応答した遺伝子発現制御に成功している。本論文では、プロテインキナーゼ応答性遺伝子発現制御システムの遺伝子治療への応用を目指し、本システムの適用が可能な新たな標的疾患の探索、及び、プロテインキナーゼ応答性ポリマー/pDNA 複合体の血中投与のための新たなポリマーの設計を試みた。

第1章ではナノ粒子の医療応用に向けた研究に関して概説し、その中でも筆者らが目指す細胞内プロテインキナーゼ活性に応答した遺伝子発現制御システムの現状を総括し、その課題、また、課題克服に向けた本論文の目的を述べた。

第2章では新たな標的プロテインキナーゼとして Rho associated coiled-coil kinase (ROCK)を用い、ROCK に応答した遺伝子発現制御システムの構築に関して述べた。これまで筆者らが標的としてきた PKA や PKC $\alpha$  は主になんで異常活性化が報告されているプロテインキナーゼである。これらのキナーゼを標的とすればがん治療への応用は可能となるが、筆者らのシステムは基質ペプチドの種類を変えることで様々なプロテインキナーゼに応用可能である。ROCK は循環器系疾患、アルツハイマー病といった難治性疾患で異常亢進が報告されており、ROCK の活性に応答した遺伝子発現制御システムを構築できれば、循環器系疾患、アルツハイマー病の遺伝子治療への応用が可能と言える。本章では、これまでに筆者らが探索した ROCK 基質ペプチドを用いてアクリルアミド主鎖、ROCK 基質ペプチドを有するカチオン性ポリマーを ROCK 応答性ポリマーとした。ROCK 応答性ポリマーは pDNA と静電相互作用により複合体を形成し、ROCK によりリン酸化されること、また、ROCK によりリン酸化された複合体はリン酸化反応が進むにつれて弱体化することが確認された。次に、ROCK 応答性ポリマー/pDNA 複合体を細胞に添加し、ROCK の活性に応じて遺伝子の発現量が上昇するかどうかを評価したところ、ROCK が活性化している細胞では有意に遺伝子の発現が上

昇した。これらの結果から、ROCK の基質ペプチドを担持したカチオン性ポリマーは ROCK の活性に応答して遺伝子の発現制御が可能なが示唆された。

第 3 章ではプロテインキナーゼ応答性ポリマー/pDNA 複合体の血中投与を目指し、複合体安定化のための新たなポリマーの設計を行った。筆者らはこれまでに、プロテインキナーゼ応答性ポリマー/pDNA 複合体をがん組織に局所投与し、プロテインキナーゼの活性に応答した遺伝子発現制御、また、治療用遺伝子を用いたがんの成長抑制に成功している。適用する疾患にもよるが、複合体の投与は局所投与よりも血中投与が望ましく、そのための新たな設計が必要であった。本章では、標的プロテインキナーゼを PKA とし、まず、ナノ粒子の血中安定性を向上するために広く用いられている、ポリエチレングリコール (PEG) を PKA 応答性ポリマーに修飾した。PEG の導入は PKA 応答性ポリマー/pDNA 複合体の塩、血清タンパク質溶液中での凝集を抑制したが、PEG の導入率を上昇させると複合体は形成するものの、血清中の DNA 分解酵素による pDNA の分解、複合体形成時の遺伝子発現の抑制ができなかった。PEG の導入率を最適化し、血清耐性が確認できる PEG 修飾 PKA 応答性ポリマーで PKA 応答性を評価したところ、PEG が PKA による基質ペプチドのリン酸化は阻害しないことを示し、また、PKA に応答した遺伝子発現制御も確認できた。また、この複合体は細胞内に導入されると、細胞内の PKA 活性に応答して遺伝子の発現を制御できた。

次に、親水性高分子の PEG ではなく、疎水基としてコレステロールを PKA 応答性ポリマーに導入し、PKA 応答性ポリマー/pDNA 複合体をコレステロールの疎水性相互作用にて安定化させることを試みた。コレステロール修飾 PKA 応答性ポリマーは塩、血清タンパク質中で安定に複合体を形成し、また、過剰のポリアニオン存在下でも pDNA を遊離することがなかった。一方で、PKA によるリン酸化は基質ペプチドとコレステロールをそれぞれ親水性主鎖に付加したポリマーで確認され、このポリマーでは PKA の活性に応答した複合体の弱体化、遺伝子発現の活性化が確認できた。本結果により、プロテインキナーゼ応答性ポリマー/pDNA 複合体の安定性向上が達成され、実際に血中投与による遺伝子治療が期待される。

第 4 章では結論として本論文の総括を行った。

## 論文審査の結果の要旨

細胞は、生命を維持するために細胞内シグナル伝達系と呼ばれる反応カスケードを保有しており、外部からの情報を様々な細胞内応答へと変換している。この細胞内シグナル伝達系は細胞の生命活動そのものであるために、この異常は様々な疾病と密接に関連している。細胞内シグナル伝達系を構成する分子群の中で、最も重要な酵素の一群がタンパク質のリン酸化を触媒するタンパク質リン酸化酵素 (プロテインキナーゼ) である。プロテインキナーゼは細胞内で重要な役割を担っているため、その異常は様々な疾病において確認されている。本論文では、このプロテインキナーゼに応答する分子システムの開発において、これまでに検討されてきたキナーゼ応答型遺伝子制御ポリマー型キャリアーについて、新たな標的疾患の探索、及び、プロテインキナーゼ応答性ポリマー/プラスミド DNA (pDNA) 複合体の血中投与のために複合体を安定化できる新たなポリマーの設計を試みている。得られた成果は以下のとおりである。

まず、新たな標的プロテインキナーゼとして循環器系疾患、アルツハイマー病といった難治性疾患で異常亢進が報告されている Rho associated coiled-coil kinase (ROCK) を用い、ROCK に応答する遺伝子発現制御システムの構築に成功している。すなわち、ROCK の基質である種々のタンパク質のリン酸化部位周辺の配列を基に作成したペプチドライブラリーを用いて新規な ROCK 応答型基質ペプチドを開発し、アクリルアミド主鎖に担持したキャリアー分子を合成して、pDNA との複合体を形成し、側鎖ペプチドが ROCK によりリン酸化されること、リン酸化された複合体が弱体化することを明らかにしている。次に、ROCK 応答性ポリマー/pDNA 複合体を細胞に添加し、ROCK が活性化

している細胞では有意に遺伝子の発現が上昇することを見出している。

さらに、プロテインキナーゼ応答性ポリマー/pDNA 複合体の血中投与を指向して、複合体安定化のための新たなポリマーの設計を行っている。まず、ナノ粒子の血中安定性を向上するために広く用いられているポリエチレングリコール (PEG) をキナーゼ応答性ポリマーに修飾したところ、ポリマー/pDNA 複合体の塩、血清タンパク質溶液中での凝集を抑制できること、しかしながら、PEG の導入率を上げすぎると複合体は形成されるものの、血清中の DNA 分解酵素による pDNA の分解、及び複合体形成時の遺伝子発現の抑制ができず、PEG の導入率に最適値があることを見出している。さらに、最適な PEG 導率では基質ペプチドのリン酸化を阻害せず、標的キナーゼに応答した遺伝子発現制御が可能であることを、溶液中と細胞内で確認している。

また、疎水基としてコレステロールをポリマーに導入することで、ポリマー/pDNA 複合体を疎水相互作用により安定化できることも見出している。すなわち、コレステロール修飾ポリマーは塩、血清タンパク質中で安定に複合体を形成し、過剰のポリアニオン存在下でも pDNA を遊離することがない一方で、標的キナーゼの活性に応答した遺伝子発現の活性化は可能であることを実証している。

以上の結果は、現行の遺伝子送達における細胞特異性の問題を解決するプロテインキナーゼ応答型遺伝子送達システム概念の一般化を実現し、また、複合体の弱体化に伴う血中投与の問題を解決する分子設計の指針を与えるものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士 (工学) の学位を受ける資格があるものと認められる。

氏名・(本籍・国籍)	やましたしゅうじ 山下 秀 治 (長崎県)
学位の種類	博士 (工学)
学位記番号	シ生博甲第81号
学位授与の日付	平成24年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 システム生命科学府 システム生命科学専攻
学位論文題目	金ナノロッドを用いた近赤外光応答性コントロールドリリースシステムに関する研究
論文調査委員	(主 査) 教授 片山 佳 樹 (副 査) 教授 神谷 典 穂 准教授 水本 博 准教授 新留 琢 郎

## 論 文 内 容 の 要 旨

ナノ領域で物質の挙動や機能を制御するナノテクノロジーは分子イメージング、再生医療、バイオセンサー、生体適合材料、ドラッグデリバリーシステム (DDS) などのメディカル分野にも応用され、盛んに研究されている。メディカル分野で使用されるマテリアルに求められる性質としては、用いるマテリアルの挙動や機能を制御できることはもちろん、マテリアルの生体に対する適合性などが求められる。金ナノ粒子はこれら条件を満たすマテリアルの一つであり、不活性であるため生体への応用も期待でき、光学的にも注目すべき特性を多数有している。この金ナノ粒子は、特に DDS やバイオイメージングにおいて重要な材料として注目され、盛んに研究されている。

中でも金ナノ粒子の1つである金ナノロッドは、生体透過性が高い近赤外光を吸収し、熱に変えることができる特性を有している。そのため、生体内の金ナノロッドを、近赤外光照射で生体内の金ナノロッド近傍のみを加熱することができる。この金ナノロッドの特性を利用し、腫瘍のハイパーサーミア治療を行った研究としてフォトサーマル治療がある。この特性は、生体外から近赤外光

照射で、熱刺激を制御できるということである。そこで本論文では、この金ナノロッドを DDS に応用し、近赤外光に応答した薬物コントロールドリリリースシステムの開発を検討した。

第 1 章では、がん医療技術として重要な DDS について概説した。さらに、その材料として金ナノロッドに着目し、その光学特性とバイオアプリケーションについて述べた。

第 2 章では、金ナノロッドを用いたコントロールドリリリースシステムを開発するため、近赤外光連続波 (CW) レーザー照射、もしくは、近赤外光パルスレーザーの 2 種類の照射モードにおける金ナノロッドの発熱挙動と、金ナノロッドに修飾された分子の放出挙動について検討した。

ポリエチレングリコール (PEG) 修飾した金ナノロッド (PEG<sub>5,000</sub>-NR) に、この 2 つの近赤外光レーザーをそれぞれ照射したところ、近赤外光パルスレーザー照射では、金ナノロッドは球状変化し、PEG 鎖のコントロールドリリリースができた。一方で、近赤外光 CW レーザー照射では、金ナノロッドは球状変化することなく、効率よく PEG<sub>5,000</sub>-NR 分散液の温度を上昇させることができた。これらの結果から、パルスレーザーと金ナノロッドとの組み合わせでは、金ナノロッドの形状変化を利用して修飾部位を放出させるコントロールドリリリースシステムが期待できる。また、CW レーザーと金ナノロッドとの組み合わせでは、形状変化することなく安定して一定の熱を放出できるため、金ナノロッド表面に熱応答性の高分子や反応部位を修飾できれば、熱によって表面の物性変化を誘起させるシステムや、修飾部位を放出させるコントロールドリリリースシステムの開発が期待できる。

第 3 章では、第 2 章で得られた結果を基に、近赤外光 CW レーザーを使用したコントロールドリリリースシステムの開発を試みた。フォトサーマル効果に依存するための温度応答性の分子や反応としてそれぞれ、2 本鎖核酸、Diels-Alder 反応に注目し、これらを熱応答性のリンカーとした使用したコントロールドリリリースシステムの開発を検討した。

2 本鎖オリゴ DNA を金ナノロッドに修飾することで (DNA-NR)、金ナノロッドのフォトサーマル効果により 2 本鎖オリゴ DNA が変性し、1 本鎖オリゴ DNA で金ナノロッドから放出されるコントロールドリリリースシステムの開発を検討した。DNA-NR に近赤外光 CW レーザーを照射した結果、レーザー照射強度や、照射時間に依存した 1 本鎖オリゴ DNA の放出が確認できた。さらに、担がんマウスを用いた *in vivo* 実験においても、近赤外光 CW レーザーを照射した担がんマウスで、1 本鎖オリゴ DNA の放出が確認できた。

熱応答性の反応として Diels-Alder 反応を用いたシステムでは、はじめに、モデルドラックとして蛍光基である Rhodamine B を熱応答性のリンカーである Diels-Alder 環化物を介して金ナノロッドに修飾した (Rhodamine-DA-NR)。近赤外光 CW レーザーを照射した結果、レーザー照射時間に依存した蛍光強度の増加が確認できた。しかし、ここで用いた修飾法は、金ナノロッド表面にシリカコート、ポリエチレンイミンコートをし、その後、Diels-Alder 環化物を介することで Rhodamine B を修飾する方法であった。そのため、Diels-Alder 環化物と金表面の距離が長く、放出効率が低かった。また、Rhodamine B の修飾率にも問題があった。そこで、より金表面に近い位置に Diels-Alder 環化物をチオール基を介して金表面に修飾することができる手法を考案した。さらに、逆 Diels-Alder 反応による修飾部位の放出を凝集で観測することができる様に、チオール基を有するフランと PEG 鎖を有するマレイミドで Diels-Alder 環化物を合成し (PEG<sub>20,000</sub>-DA-SH) 金ナノロッドに修飾した (PEG<sub>20,000</sub>-DA-NR)。近赤外光を照射した結果、近赤外光の照射時間に依存した PEG の放出に伴う金ナノロッドの凝集が確認できた。さらに、PEG の放出量を定量した結果、その放出量は近赤外光の照射時間に依存していた。これらの結果から、設計・作製した、金ナノロッドと Diels-Alder 反応を組み合わせたコントロールドリリリースシステムが、狙い通り働いていることが示唆できた。

第 4 章では第 2~3 章までの結果を総括した。

## 論文審査の結果の要旨

ナノ領域で物質の挙動や機能を制御するナノテクノロジーは、医療分野にも応用され、盛んに研究されている。医療分野で使用される材料に求められる性質としては、用いる材料の挙動や機能を制御できることや材料の生体に対する適合性などが挙げられる。金ナノロッドはこれらの条件を満たす材料の一つであり、近赤外光を吸収して発熱する等、注目すべき特性を多数有している。本論文では、この金ナノロッドを薬物送達システム(DDS)に応用し、近赤外光に応答する薬物のコントロールドリリースシステムの開発を検討している。得られた成果は以下のとおりである。

まず、金ナノロッド表面をポリエチレングリコール(PEG)で修飾し、近赤外光連続波(CW)レーザー照射、もしくは、近赤外光パルスレーザー照射の2種類のモードにおける金ナノロッドの発熱挙動と、PEGの放出挙動について検討している。その結果、近赤外光パルスレーザー照射により金ナノロッドが球状に変化することに伴いPEG鎖を放出させることに成功している。

次に、近赤外光CWレーザー照射では、金ナノロッドは球状変化することなく、効率よく発熱できることを見出し、これを利用した新規なコントロールドリリースシステムの構築に成功している。すなわち、まず2本鎖オリゴDNAを金ナノロッドに修飾することで、金ナノロッドのフォトサーマル効果により2本鎖オリゴDNAが変性し、1本鎖オリゴDNAが金ナノロッドから放出されるコントロールドリリースシステムの開発に成功している。さらに、担がんマウスを用いた*in vivo*実験においても、近赤外光CWレーザーを照射した担がんマウスで、1本鎖オリゴDNAの放出を実現している。さらに、逆Diels-Alder反応を用いた放出システムも創成している。金ナノロッド上でのDiels-Alder環化物の導入法を最適化した結果、より金表面に近い位置にDiels-Alder環化物をチオール基を介して修飾することができる手法を考案している。さらに、Diels-Alder反応による修飾部位の放出を凝集で観測することができる様に、チオール基を有するフランとPEG鎖を有するマレイミドでDiels-Alder環化物を合成し金ナノロッドに修飾した後、近赤外光を照射した結果、近赤外光の照射時間に依存したPEGの放出を実現し、それに伴い金ナノロッドを凝集させることに成功している。PEGの放出量は近赤外光の照射時間に依存しており、本コントロールドリリースシステムが制御可能であることも明らかにしている。

以上の結果は、生体透過性の高い近赤外光に応答して金ナノロッド上に固定化した薬物を放出させたり、任意の照射部位で金ナノロッドを凝集させて組織に沈着させたりすることが可能な、新規な光応答性医用材料を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士(工学)の学位を受ける資格があるものと認められる。



(OMRI) が研究されている。OMRI は、装置の普及率の低さから、未だ造影剤となるニトロキシルラジカルを高分子に担持させて送達した報告はない。一方で、MRI 造影剤を撮像対象の組織特異的にデリバリーする手法も求められている。これに関しては、我々の研究グループは、ポリエチレングリコール (PEG) を修飾した KG6 (PEG-KG6) が静脈投与後に効率良く腫瘍に集積することを報告している。以上の研究背景から、本研究ではニトロキシルラジカルを修飾した PEG-KG6 を作成し、高分子効果と OMRI のシグナル増強効果の相乗効果によって、高感度な MRI 撮像が可能な造影剤の開発を目指した。しかし、ニトロキシルラジカルの修飾位置及び修飾量を変化させて OMRI 測定した結果、いずれの PEG-KG6 誘導体もニトロキシルラジカル単体の造影能に及ばなかった。原因として、高分子効果と OMRI のシグナル増強効果を高めるファクターが相反する事が明らかとなった。そこで、PEG-KG6 にニトロキシルラジカル修飾すると OMRI 造影能が低下することを利用し、腫瘍環境で PEG-KG6 からニトロキシルラジカルが放出されて造影能が OFF/ON 変化する、刺激応答性造影剤を開発した。腫瘍特異的に発現するウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ (uPA) で切断される基質ペプチドを介して、ニトロキシルラジカルを PEG-KG6 に修飾し、腫瘍特異的 OMRI 造影剤を作製した。uPA と同じ部分で基質ペプチドを切断するトリプシンで処理し、OMRI 造影能を評価したところ、シグナルの酵素応答的な OFF/ON 変化が認められた。しかしながら、その OMRI 造影能はニトロキシルラジカル単体に及ばなかった。ニトロキシルラジカルに結合した断片ペプチドが、運動性を低下させたと考えられる。切断後のニトロキシルラジカルの運動性が高く保たれる結合様式を利用することが、高い造影能を持つ組織特異的な OMRI 造影剤の設計に重要であることが明らかとなった。

第 4 章では、オルソゴナル合成を利用した KG6 の高機能化について検討した。 dendroliマーは、オルソゴナル合成を適用することで、異方性の付与や官能基間距離の厳密な調節が可能であり、機能性 DDS キャリアとして有用と考えられる。そこで、KG6 からのオルソゴナルな世代伸長を試みた。α 位を Boc 基、ε 位を tfa 基で保護したリジンを利用して、 dendroliティックポリリジンの α 位選択的な世代伸長を達成した。作成した KG6 誘導体は、α 位が分子表面の物性を、ε 位が分子内部の物性を決定する構造体と考えられた。そこで、α 位選択的に PEG を修飾し、内部に小分子を担持できる単分子ミセル (PEG-K<sub>n</sub>-KG6, n = 1~3) を作製した。分子内部の ε 位にカチオン性のアミノ基を持つ PEG-K<sub>n</sub>-KG6 と 21 残基の 2 本鎖 DNA (dsDNA) の混合物の物性を評価したところ、dsDNA は PEG-K<sub>n</sub>-KG6 に内包された事が示唆された。PEG-K<sub>n</sub>-KG6 は、30 nm 程度の粒径を持ち、表面が PEG で覆われた構造である。よって、静脈投与後に Kupffer 細胞の取り込みを回避して肝実質細胞に蓄積すると考えられる。つまり、肝実質細胞への核酸医薬のデリバリーに利用できると考えられる。また、PEG-K<sub>n</sub>-KG6 は、先に報告した PEG-KG6 と同様の腫瘍集積性を持つと期待できる。そこで、PEG-K<sub>n</sub>-KG6 の ε アミノ基にカルボキシル基を導入し、配位結合によって抗がん剤のシスプラチン (CDDP) を担持させた。白金原子を定量して担持量を評価したところ、最も担持量の多い誘導体で 15 wt% の CDDP の担持が認められた。この担持量は、担がんマウスの抗がん効果を報告した先行研究のデリバリーシステムに匹敵する。したがって、今後の in vivo での腫瘍集積性の評価や抗がん効果の検討が期待できる。

本研究の一連の成果は、 dendroliティックポリリジンに限らず、種々の dendroliマーを利用した核酸医薬、造影剤、抗がん剤の DDS の開発の一助となる知見と考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

薬物の副作用の低減や既存薬の用途拡大を目的としたドラッグデリバリーシステムは、医療技術として重要である。そのため、様々な機能性の高分子、あるいはリポソームやミセルなどの超分子を薬物の運び屋 (キャリアー) として利用するシステムが研究されている。アミノ酸のリジンを構成単位とする樹状高分子 ( dendroliマー) である dendroliティックポリリジン (KG6) は、比較的高い血中滞留性や高密度で制御された表面アミノ基を有するなど、核酸医薬や小分子薬物の送達キ

キャリアとして利用できるいくつかの優れた特性を有している。本論文では、この KG6 の *in vivo* における核酸デリバリー、あるいは核磁気共鳴撮像法 (MRI) の造影剤、抗がん剤デリバリー等への適用について検討して重要な知見を得ている。得られた成果は以下のとおりである。

まず、KG6 を利用した肝臓への核酸デリバリーについて、肝疾患の改善に機能するデコイ核酸あるいは siRNA の送達を検討している。デコイ核酸としては NF $\kappa$ -B デコイ核酸を用い、エンドトキシン誘発性の劇症肝炎モデルマウスを作成して KG6/NF $\kappa$ -B デコイ核酸複合体を投与した結果、NF $\kappa$ B デコイ核酸の、配列及び投与量依存的な炎症抑制作用が認められ、KG6 を利用した核酸医薬の Kupffer 細胞への送達に成功している。続いて、肝実質細胞に特異的に発現するアポリポプロテイン B (ApoB) を発現抑制する siRNA を投与し、ApoB の mRNA の変化量を逆転写定量 PCR 法で評価した結果、ApoB の発現抑制を認めている。この場合は、siRNA の投与量や配列に依存しない発現抑制も認められ、siRNA が肝実質細胞のみでなく、免疫を司る Kupffer 細胞へも取り込まれ、インターフェロン応答あるいは炎症応答が誘起されることも見出している。

次に、KG6 のオーバーハウザーMRI(OMRI)造影剤としての利用検討のため、ニトロキシラジカルを修飾したポリエチレングルコール(PEG)コート型 KG6 を合成し、検出感度に対する高分子効果と OMRI のシグナル増強効果を評価している。その結果、高分子効果と OMRI のシグナル増強効果は相反し、高分子にニトロキシラジカルを結合すると OMRI シグナル強度は低下することを明らかにしている。また、その事実を利用して、腫瘍環境で発現するウロキナーゼプラスミノゲンアクチベータ (uPA) により、PEG-KG6 からニトロキシラジカルが放出されて造影能が発揮される刺激応答性造影剤を開発している。

さらに、オルソゴナル合成を利用した KG6 の高機能化についても検討している。すなわち、 $\alpha$  位と  $\epsilon$  位を異なる保護基で保護したリジンを利用して、 dendritic ポリリジンの  $\alpha$  位選択的な世代伸長を達成し、 $\alpha$  位選択的に PEG を修飾し、内部に小分子を担持できる単分子ミセルを実現している。本材料は、30 nm 程度の粒径を持ち、表面が PEG で覆われた構造で、2 本鎖 DNA を内包でき、Kupffer 細胞の取り込みを回避した肝実質細胞への選択的蓄積や、腫瘍集積性を持つことが期待できる。また、 $\epsilon$  位にカルボン酸を導入し、制癌剤であるシスプラチンを 15 wt% と多量に結合できることも見出している。

以上の結果は、 dendritic ポリリジンの薬物、遺伝子キャリアー、あるいはイメージング剤としての応用に重要な知見を与え、新規な材料として、治療、診断分野に重要な方法論を提供するものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士 (工学) の学位を受ける資格があるものと認められる。