

京都大学	博士 (工学)	氏名	竹田 茂生
論文題目	Functionalization of Glucan Dendrimers and Bio-applications (グルカンデンドリマーの機能化とバイオ応用)		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>本論文では、新規球状多糖であるグルカンデンドリマー (GD) の構造解析および機能性グルカンデンドリマーの合成とナノバイオマテリアル機能について報告したものである。GD はデンプンの分解物に三種類の酵素を加えて合成された、<math>\alpha</math>-1,4;<math>\alpha</math>-1,6-グルカンである。この多糖は、特徴として内部に 20 単糖程度の環状構造と <math>\alpha</math>-1,6 結合による分岐を 10%程度持つことで高密度かつ水溶性の高い多糖である。この多糖はグルカンを糖骨格にしていることから、生分解性も高い。また酵素の反応条件を制御することにより、分子量の異なる GD の合成が可能である。近年、様々な疾患に関する診断、予防、治療、および再生医療などの先進医療においては、ナノテクノロジーを駆使したナノ医療が発展し、それに用いられるバイオ材料の開発は益々重要となってきた。従来の低分子医薬に比べて、バイオ医薬品は高い標的特異性、比較的低い副作用、幅広い薬理効果などの利点がある。一方で、生産技術、安定性、さらに投与、デリバリー効率などの重要な課題も残されている。その際、特に注目されているバイオ医薬品 (抗体、サイトカイン、核酸など) を安定に送達、徐放しえる新規ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が不可欠となっている。本論文では、興味深い特徴を有する新規多糖ナノスフェアである GD に長鎖アルキル基であるドデシル基やカチオン性基であるスぺルミンを修飾した誘導体を合成し、その水中における会合挙動などを明らかにするとともに、DDS や再生医療への応用を目指した細胞内デリバリー機能について報告した。</p> <p>緒論では、近年注目されているタンパク質や核酸などによるバイオ医薬品とそのデリバリーシステム研究について概説し、研究背景について述べるとともに、本論文の研究の目的を明確にし、次いで本論文の構成と概要について論じた。</p> <p>第 1 章では、グリコーゲン分岐酵素、スクロースホスホリラーゼ、<math>\alpha</math> グルカンホスホリラーゼの 3 種類の酵素により合成された高分岐 <math>\alpha</math> グルカン、グルカンデンドリマーの構造特性解析が行われ、ナノメートルサイズで分子量が制御された新規な球状分岐多糖が得られることを明らかにした。さらに、アルキル基を修飾した疎水化グルカンデンドリマーの合成とタンパク質との相互作用について報告されている。疎水化グルカンデンドリマーはタンパク質と複合体を形成し、その複合体を細胞に添加するとタンパク質が細胞内へ効率よく取り込まれることが見出された。さらに細胞内に取り込まれた酵素が酵素活性を示したことから、タンパク質に対する新規細胞内デリバリーキャリアとして機能することを明らかにした。</p> <p>第 2 章では、第 1 章で合成された疎水化グルカンデンドリマーのタンパク質の巻き戻り過程における分子シャペロン機能について報告している。生体の分子シャペロンは、疎水性相互作用などを駆動力により変性した巻き戻り中間体タンパク質を捕捉し、不可逆的なタンパク質凝集体の形成を阻害し、タンパク質の正しいフォールディングを助け</p>			

京都大学

博士 ( 工 学 )

氏名

竹田 茂生

ている。タンパク質の凝集の制御は、タンパク質工学やタンパク質医薬品の開発においても重要な課題である。変性タンパク質の自発的な巻き戻り実験において、疎水化グルカンデンドリマーはタンパク質の凝集を抑制して天然状態のタンパク質への折り畳みを助ける新規人工分子シャペロン機能を発現しえることを明らかにした。抗体やサイトカインをはじめとするタンパク質製剤におけるリフォールディングシステムとしての利用が期待される。

第3章では、グルカンデンドリマーと疎水化グルカンデンドリマーにカチオン性基を導入した機能性グルカンデンドリマーの合成と核酸との相互作用、さらに DDS 応用について検討している。近年、生理活性を持つ核酸の医療への応用が進められているが、生体内での安定性が低く体内投与の際に速やかに代謝されてしまうため、それらを安定に保持し、細胞内に効率良くデリバリーするキャリアが必要となる。特に遺伝子治療のためのプラスミドや目的の mRNA を切断しタンパク質の発現を抑制する (RNA 干渉) small interfering RNA (siRNA) が注目を集めており、従来用いられてきた低分子の化学合成薬剤に替わる次世代の薬剤として期待されている。このような核酸を安定にデリバリーするキャリアとしてカチオン性リポソームや高分子ミセルなどの研究が盛んにおこなわれているが、徐放制御やターゲティングなどの解決すべき課題が残っている。

本論文では、アニオン性核酸との相互作用を与える機能性グルカンデンドリマーとして、生体由来のポリアミンであるスペルミンを導入したカチオン性グルカンデンドリマーが設計されている。カチオン性グルカンデンドリマーは、siRNA と効率よく相互作用し、安定な複合体を形成し、細胞実験において RNA 干渉を誘起する新規ナノキャリアとして機能することが示された。さらに、血管新生因子を標的とした siRNA 複合体を用いて、担がんマウスを用いた抗腫瘍実験において、新生血管の抑制と優れた腫瘍抑制効果が得られることが明らかになった。

以上のように、酵素合成により分子量、サイズの制御が可能な単分散なナノスフェアとしてのグルカンデンドリマーは、バイオマテリアルの新規多糖材料素材として、優れた機能を示すことが明らかにされた。グルカンデンドリマーは、多糖の水酸基を利用した化学修飾が可能であり、疎水性基の導入による 1 分子高分子ミセル様の特性やカチオン性基の導入による機能化に成功し、タンパク質や核酸などの生体安定性の低い薬剤を効率よく、細胞内に送達し得るナノ DDS キャリアとして有用であることが明らかにされた。

氏名	竹田 茂生
----	-------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、新規球状多糖であるグルカンデンドリマーの構造解析および機能性グルカンデンドリマーの合成とナノバイオマテリアル機能について検討している。グルカンデンドリマーに疎水性基やカチオン性基などを化学修飾した機能性多糖の構造特性解析およびタンパク質や核酸との相互作用解析とナノキャリアとしてのドラッグデリバリーシステムへの応用についてまとめたものであり、得られた主な成果は次の通りである。

1. 第1章では、グリコーゲン分岐酵素、スクロースホスホリラーゼ、 $\alpha$ グルカンホスホリラーゼの3種類の酵素により合成された高分岐 $\alpha$ グルカン、グルカンデンドリマーの構造特性解析およびアルキル基を修飾した疎水化グルカンデンドリマーの合成とタンパク質との相互作用について検討している。酵素合成によりナノメートルサイズで分子量が制御された新規な球状分岐多糖が得られ、また、疎水化することでタンパク質と効率よく複合化して、細胞内タンパク質デリバリーナノキャリアとして機能することが明らかになった。

2. 第2章では、第1章で合成された疎水化グルカンデンドリマーのタンパク質の巻き戻り過程における分子シャペロン機能について検討している。変性タンパク質の自発的な巻き戻り実験において、疎水化グルカンデンドリマーはタンパク質の凝集を抑制して天然状態のタンパク質への折り畳みを助ける人工分子シャペロン機能を発現しえることが明らかになった。

3. 第3章では、グルカンデンドリマーと疎水化グルカンデンドリマーにカチオン性基を導入した機能性グルカンデンドリマーの合成と核酸との相互作用について検討している。カチオン性グルカンデンドリマーは、RNA干渉を起こす siRNA (small interfering RNA) と効率よく相互作用し、安定な複合体を形成した。さらに、血管新生因子を標的とした siRNA 複合体を用いた細胞内取り込み実験や担がんマウスを用いた抗腫瘍実験において、優れたナノキャリアとして機能することが明らかになった。

以上、本論文は、機能性グルカンデンドリマーが、タンパク質や核酸などの生体安定性の低い薬剤を効率よく送達する新規デリバリーナノキャリアとして有用であることについて纏められており、新規性のみならず医療応用展開も見据えたものであり、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士(工学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和2年3月18日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行って、申請者が博士後期課程学位取得基準を満たしていることを確認し、合格と認めた。なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。