

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Molecular Design and Biological Evaluation of siRNA-conjugated Polymer that Responds to Redox Potential
著者(和文)	HuangChih-Hao
Author(English)	Chihhao Huang
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10529号, 授与年月日:2017年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:西山 伸宏,上田 宏,中村 浩之,宍戸 厚,三重 正和
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10529号, Conferred date:2017/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	Huang Chih Hao	
論文審査 審査員		氏名	職名	氏名	職名
	主査	西山 伸宏	教授	三重 正和	准教授
	審査員	上田 宏	教授		
		中村 浩之	教授		
	穴戸 厚	教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「Molecular Design and Biological Evaluation of siRNA-conjugated Polymer that Responds to Redox Potential (酸化還元電位に反応する siRNA 結合高分子の分子設計と生物学的評価)」と題し、英文で書かれ、5 章より構成されている。

第 1 章「General introduction」では、small interfering RNA (siRNA)、薬物送達システム(DDS)、環境応答性リンカーという本研究のキーワードを中心に、本研究に至る背景と研究目的が述べられている。siRNA の作用機構、治療薬としての応用に向けた siRNA の化学修飾やデリバリーシステムの意義と先行研究例とともに、それらの設計における環境応答性リンカーの重要性と具体的な例について概説されている。これらを踏まえて、本研究では、glutathione(GSH)と glutathione-S-transferase(GST)の共存下で開裂する 2-nitrobenzenesulfonamide 結合の環境応答性リンカーとしての応用と siRNA 送達システムへの展開を目的とすることが記されている。

第 2 章「Synthesis, preparation, and characterization of PEG-siRNA conjugates」では、2-nitrobenzenesulfonamide 結合をリンカー分子として有する poly(ethylene glycol)(PEG)-siRNA コンジュゲート体の構築について述べられている。methyl 4-(chlorosulfonyl)-3-nitrobenzoate の合成、末端にアミノ基を有する PEG との反応、dibenzocyclooctyne (DBCO) の導入を経て合成された PEG-sul-DBCO と azide 基を有する siRNA の間で銅触媒フリーのクリック反応を行い、イオン交換クロマトグラフィーによって精製することにより、高純度の PEG-sul-siRNA が高効率で得られることが示されている。また、コントロールとして還元環境に反応しない carboxylic amide 結合および還元環境に反応して開裂する disulfide 結合をリンカーとして有する PEG-siRNA (それぞれ PEG-car-siRNA および PEG-disulfide-siRNA) の合成に関しても、DBCO と azide 基の銅触媒フリーのクリック反応の利用により高効率で行えることが記されている。

第 3 章「Evaluation of PEG-siRNA conjugate containing different linkages」では、第 2 章で構築したリンカーの異なる PEG-siRNA に関して異なる還元環境下でのリンカーの開裂とそれに伴う siRNA の放出の挙動について述べられている。PEG-siRNA からの siRNA の放出をサイズ排除クロマトグラフィーを利用して評価した結果、PEG-disulfide-siRNA の disulfide 結合は細胞内 GSH 濃度 (1mM) で速やかな開裂を示す一方で、細胞外 GSH 濃度 (20µM) においても徐々に開裂し、72 時間後において 40% の siRNA 放出を示すのに対して、PEG-sul-siRNA の 2-nitrobenzenesulfonamide 結合は、細胞外および細胞内 GSH 濃度で開裂せず、細胞内 GSH 濃度に 1mM の GST が存在する条件において時間依存的な開裂を示し、72 時間後に 90% の siRNA 放出を示すことを明らかにしている。また、リンカーの血中での安定性を評価することを目的として PEG-ポリカチオンとポリイオンコンプレックスを形成させ、siRNA の血中滞留性を評価した結果、PEG-disulfide-siRNA の系は血中滞留性の低下を示すのに対して、PEG-sul-siRNA の系は PEG-car-siRNA の系と同等の高い血中滞留性を示すことを明らかにしている。

第 4 章「Evaluation of biological activities (in vitro)」では、2-nitrobenzenesulfonamide 結合を有する PEG-sul-siRNA の培養細胞に対する生物活性について述べられている。異なるリンカーを有する PEG-siRNA をリポフェクションにより培養細胞に導入した結果、2-nitrobenzenesulfonamide 結合を有する PEG-sul-siRNA が最も優れた RNA 干渉能を示し、siRNA 結合高分子による効率的な RNA 干渉のためには細胞外における安定性と細胞内における効率的なリンカーの開裂を両立することが重要であることが示されている。また、PEG-siRNA の設計における siRNA の最適な化学修飾部位やリンカー切断後に放出される siRNA が未修飾の siRNA と同等の RNA 干渉能を示すことが示されている。これらの結果より、本章では、2-nitrobenzenesulfonamide 結合が siRNA 結合高分子のリンカー分子として有用であることが明らかにされている。

第 5 章「Summary」では、本研究の成果が総括され、将来展望が述べられている。

これを要するに、本論文は、還元環境応答性リンカーとして最も広く利用されている disulfide 結合と比較して、細胞外環境での高い安定性と細胞内環境特異的な開裂反応を示す 2-nitrobenzenesulfonamide 結合の新規リンカー分子としての有用性を siRNA 送達システムの観点から明らかにしており、細胞内環境に反応する薬物送達システムの発展に資する重要な知見を与えるものとして、工学上貢献するところが大きい。よって本論文は博士 (工学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意:「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。