

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	合成高分子のコイル・グロビュール転移に基づくsiRNA 周囲の空間支配と薬理機構制御への展開
Title(English)	Development of a Methodology for an Artificial Control of siRNA Bioactivity Based on the Coil-Globule Transition Behavior of the Conjugated Polymeric Molecule
著者(和文)	NOORFaizah
Author(English)	Noor Faizah
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10530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,小畠 英理,金原 数,宍戸 厚,田巻 孝敬
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10530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	Noor Faizah Binti Che Harun		
論文審査 審査員		氏名	職名		氏名	職名
	主査	西山 伸宏	教授	審査員	田卷 孝敬	講師
	審査員	小島 英理	教授			
		金原 数	教授			
宍戸 厚		教授				

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「Development of a Methodology for an Artificial Control of siRNA Bioactivity Based on the Coil-Globule Transition Behavior of the Conjugated Polymeric Molecule (合成高分子のコイル・グロビュール転移に基づく siRNA 周囲の空間支配と薬理機構制御への展開)」と題して、温度応答性高分子を利用して small interfering RNA (siRNA) の細胞内における RNA-induced silencing complex (RISC) 形成とそれに伴う RNA 干渉を人為的に制御する技術に関する研究の結果が記されたものであり、英文で書かれ、5章より構成されている。

第1章「General introduction」では、siRNA と温度応答性高分子という本研究のキーワードを中心にして、本研究に至る背景と研究目的が述べられている。siRNA の歴史、治療薬としての応用における課題、その課題を克服するための 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、温度応答性高分子による酵素などの生体分子の機能活性の人為的制御に関する研究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、温度応答性高分子と siRNA のコンジュゲート体の構築とそれによる細胞内における siRNA の機能発現の温度による ON/OFF 制御法の開発を目的とすることが記されている。

第2章「Synthesis of thermoresponsive polymer conjugated with an siRNA molecule (PNIPAAm-siRNA)」では、温度応答性高分子 poly(*N*-isopropylacrylamide)(PNIPAAm)と siRNA のコンジュゲート体の構築について述べられている。末端官能性の PNIPAAm の合成に関して、原子移動ラジカル重合 (ATRP) と可逆的付加開裂連鎖移動 (RAFT) 重合の2種類のリビングラジカル重合法を検討した結果、RAFT 重合によって、分子量が 9,500~39,000 の範囲で制御された比較的狭い分子量分布 ($M_w/M_n=1.18\sim1.24$) を有する PNIPAAm が合成できることが示されている。得られた末端官能性の PNIPAAm に dibenzocyclooctyne (DBCO) を導入し、azide 基を有する siRNA と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 PNIPAAm-siRNA が高効率で得られることが明らかにされている。

第3章「Physicochemical properties of PNIPAAm-siRNA」では、第2章で構築した PNIPAAm-siRNA に関して PNIPAAm の下限臨界共溶温度(LCST)を境とする溶液中での温度応答性挙動について述べられている。細胞内環境を想定した siRNA 濃度 (100nM) における流体力学的直径を蛍光標識 siRNA を用いて蛍光相関分光法により評価した結果、siRNA 単独とコントロールである poly(ethylene glycol)(PEG)-siRNA では室温 (LCST 以下) と 37°C (LCST 以上) での流体力学的直径に差異は見られないが、PNIPAAm-siRNA では室温から 37°C への変化によって 1.1nm の流体力学的直径の減少が見られることが示されている。一方、高 siRNA 濃度 (5 μ M) における散乱光強度の変化を測定した結果、PNIPAAm-siRNA は室温から昇温させたところ 35°C 以下では散乱光強度に変化を示さないが、36°C 以上で散乱光強度の増大を示し、凝集体を形成することが示されている。また、PNIPAAm-siRNA の凝集体形成は昇温過程と降温過程でヒステリシスを示すことも明らかにされている。これらの結果に基づいて、PNIPAAm-siRNA の PNIPAAm 鎖は LCST を境にコイル・グロビュール転移を示すことが明らかにされている。

第4章「In vitro evaluation of the biological properties of PNIPAAm-siRNA」では、PNIPAAm-siRNA によって培養細胞に対する RNA 干渉が温度によって制御できることが述べられている。ルシフェラーゼ (Luc) を発現する HeLa 細胞に対して Luc に対する siRNA を用いて RNA 干渉能を評価した結果、siRNA 単独と PEG-siRNA では温度変化による RNA 干渉能の変化は見られなかったが、PNIPAAm-siRNA では 30°C では RNA 干渉を示さないが、37°C において顕著な RNA 干渉 (80% の Luc 発現抑制) を示すことが明らかにされている。細胞内における Agonote 2 (Ago2) との複合体形成を評価した結果、PNIPAAm-siRNA は 30°C の条件に比べて 37°C の条件において 2.75 倍の siRNA-Ago2 複合体形成を示し、このような温度応答性は siRNA 単独と PEG-siRNA では見られないことが示されている。これらの結果より、本章では、PNIPAAm-siRNA により、siRNA の RISC 形成とそれに伴う RNA 干渉が温度により制御できることが明らかにされている。

第5章「Summary and future perspectives」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、本論文では、温度応答性高分子を利用して siRNA の細胞内におけるタンパク質複合体 (RISC) 形成とそれに伴う RNA 干渉を人為的に制御する画期的な技術の開発に成功しており、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。