

論文審査の要旨および学識確認結果

報告番号	㊦／乙第 号	氏 名	新倉 啓介
論文審査担当者：			
	主査	慶應義塾大学准教授	博士（地球環境科学） 土居 信英
	副査	慶應義塾大学教授	農学博士 井本 正哉
		慶應義塾大学教授	工学博士 佐藤 智典
		慶應義塾大学教授	工学博士 岡 浩太郎
<p>(論文審査の要旨)</p> <p>学士（理学）、修士（理学）新倉啓介君提出の学位請求論文は、「ウニ配偶子認識タンパク質由来膜融合促進ペプチドの機能解析と抗体 DDS への応用」と題し、全4章から成っている。</p> <p>抗体医薬は、従来の低分子化合物医薬と比べて標的分子への高い親和性や特異性、生体内での高い安定性などの長所を有するが、細胞内へ膜透過しにくいいため細胞内の疾患標的分子に対しては直接作用できないという課題がある。先行研究では、TAT やポリアルギニンなどのカチオン性の細胞膜透過性ペプチド(CPP)を利用することで細胞内因子を標的とした抗体の構築が試みられてきたが、エンドソーム離脱効率が低く実際に細胞質に到達する分子が少ないことや、細胞選択性が低いなどの課題があった。一方、HA2 などの膜融合促進ペプチド(FP)は、単独では細胞膜とは相互作用しないが、エンドソーム内の pH 依存的に脂質膜を不安定化しエンドソーム離脱を促進することが知られている。しかし、その効果は十分ではなく新規の FP が求められていた。そこで本研究では、ウニ配偶子認識タンパク質 Bindin の脂質結合領域に存在する FP である B18 (103-120 残基) および B55 (83-137 残基)に着目し、これらのペプチドのヒト培養細胞における機能を解析し、抗体 DDS (Drug Delivery System) に応用することを目的とした。</p> <p>第1章は序論であり、本論文の背景となる既存の抗体医薬の問題点およびその解決策について概説し、本研究の目的と意義を示している。</p> <p>第2章では、B18 および B55 ペプチドの eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) 融合タンパク質を作製し、HeLa 細胞を用いてその膜透過促進に関する機能を解析した結果について記述している。解析の結果、eGFP-B18-TAT 融合タンパク質は従来の eGFP-TAT と比べて高い膜透過効率を示し(<i>cis</i>型)、eGFP-B55 は共添加したデキストランや IgG 抗体、リボヌクレアーゼなどの高分子の <i>trans</i> 型の膜透過を促進することを見出した。この膜透過はエンドサイトーシス阻害剤で抑制されること、また、eGFP-B18-TAT および eGFP-B55 に細胞毒性はみられないことを確認した。また、eGFP-B55 による膜透過促進は、弱酸性環境と高 Zn²⁺濃度環境で効率が異なることから、<i>cis</i> 型と <i>trans</i> 型の膜透過の分子メカニズムは異なることが示唆された。さらに、eGFP-B55 と共添加することで <i>trans</i> 型の膜透過が促進された IgG やリボヌクレアーゼは、細胞質に移行した後もその機能を維持していることが示唆された。</p> <p>第3章では、B18 および B55 ペプチドを細胞選択的な膜透過促進に応用するために、これらのペプチドを抗 EGFR 一本鎖抗体(scFv)に融合した結果について記している。作製した scFv-B18 および scFv-B55 融合タンパク質は、いずれも抗原である EGFR 特異的な結合能を維持していた。EGFR 高発現細胞に対する各 scFv のエンドソーム離脱効率を定量的に評価するために、核移行シグナルの有無で核画分の scFv の相対存在比を定量する新しい手法を確立した。その結果、scFv-B18 のエンドソーム離脱効率が向上しており、B18 ペプチドが scFv の <i>cis</i> 型の膜透過を促進することが示唆された。また、scFv-B55 は共添加した eGFP やデキストランの <i>trans</i> 型の膜透過を EGFR 高発現細胞特異的に促進することが示唆された。</p> <p>第4章では、総括として全体のまとめと今後解決すべき課題、および本研究の将来的な応用について記述している。</p> <p>以上、本論文では、ウニ配偶子認識タンパク質由来 B18 および B55 ペプチドが <i>cis</i> 型および <i>trans</i> 型の膜透過を促進する性質を見出し、その詳細な解析を行なった。これらの成果は、抗体医薬や非膜透過性薬剤の細胞選択的な DDS に応用することが期待できる。</p> <p>よって、本論文の著者は博士(工学)の学位を受ける資格があるものと認める。</p>			
学識確認結果	学位請求論文を中心にして関連学術について上記審査会委員で試問を行い、当該学術に関し広く深い学識を有することを確認した。 また、語学（英語）についても十分な学力を有することを確認した。		