

審査の結果の要旨

論文提出者氏名 加藤 耕一

細胞工学分野において動物細胞の細胞膜に機能性タンパク質を導入することにより、細胞に新たな機能を付加する研究が行われてきた。特に免疫細胞を活性化するために、腫瘍細胞や免疫細胞の表面に抗原、抗体など機能性タンパク質を提示する研究は注目を浴びている。従来、細胞膜にタンパク質を提示するための方法として遺伝子導入法、細胞膜の化学修飾法が開発されてきたが、遺伝子導入細胞を得るのに時間や手間がかかる、化学修飾が細胞膜上のタンパク質、糖鎖などの本来の機能を障害するなどの問題点を含んでいた。近年、脂質を結合したタンパク質を細胞と混ぜるだけで細胞膜表面にアンカーリング提示する脂質アンカー法が開発された。しかし脂質アンカーは水溶液に不溶性でありミセルを形成するため、タンパク質との結合反応効率が低く、加えて細胞膜への導入効率も極めて低かった。

また、遺伝子導入細胞マイクロアレイは遺伝子機能を効率良く網羅的に分析するシステムとして近年注目されているが、利用できる細胞は接着性細胞に限られていた。浮遊細胞には免疫細胞、がん細胞、幹細胞など医学的、生物学的にも重要な細胞を含んでおり、これらの細胞への遺伝子導入細胞マイクロアレイ技術の応用が望まれていた。

本論文では両親媒性高分子であるポリエチレングリコール鎖（PEG 鎖）を脂質アンカーとしてのオレイル基と結合させた誘導体が、水溶性の脂質アンカーとして利用できることを見出し、この試薬が細胞毒性を示すことなく細胞膜にアンカーリングできることから **Biocompatible Anchor for Membrane (BAM)** と名づけている。この **BAM** を利用した抗体などの機能性タンパク質の細胞表層への導入法の開発や、免疫細胞、幹細胞などの浮遊細胞を固相表面に固定化し、培養する技術の開発、さらにこの技術を発展させ、浮遊細胞にも適用できる遺伝子導入細胞マイクロアレイ技術の開発などの成果について述べている。

第1章は序論であり、研究背景、既往の研究について述べている。

第2章では **BAM** を用いたタンパク質の細胞膜表層へのアンカーリング技術について述べられている。**BAM** を化学結合したタンパク質を細胞に添加することにより 30 秒程度の非常に短い時間で、そのタンパク質を細胞膜へアンカーリングできることを示している。また **BAM** の PEG 鎖長が短いと、従来の脂質アンカーと同様にミセル形成により細胞膜への導入効率が低下するが、40 モル重合以上の PEG 鎖長ではミセル形成することなく細胞膜導入効率が向上することを明らかにしている。また **BAM** によるタンパク質のアンカーリングは、

細胞培養で通常用いられる血清中に含まれるアルブミンとオレイル基との結合によって著しく阻害されるが、脂質アンカー部分をオレイル基からジオレイル基に変更することで、10%血清添加培地中でもタンパク質のアンカーリングを24時間以上持続できる BAM の開発に成功している。結論として、タンパク質を容易かつ速やかに細胞膜表層にアンカーリングするための細胞膜修飾試薬及び方法を開発できたと述べている。

第3章では、浮遊細胞適用型細胞マイクロアレイを開発するためのアプローチとして、固相化した BAM 表面を用いて、浮遊細胞を生存状態で固定化する方法について述べている。固定された細胞を培養により増殖させることも可能であった。BAM による固定化培養細胞と通常の浮遊培養細胞について、その比増殖速度を比較した結果、差はみられなかった。このことから、増殖シグナルや分化シグナルなど細胞増殖速度に影響を与えるシグナルが、BAM による固定化によって誘導される可能性は低いと考察している。さらに BAM 修飾表面にはリポソームも結合させることができたことから、BAM による細胞の固定化には、BAM の脂質アンカー部位と細胞膜のリン脂質二重膜との相互作用が重要であると結論づけている。結論として、BAM 修飾表面を利用して非接着性細胞の固定化培養が可能であったことを述べている。

第4章では前章の細胞固定化培養技術を利用して浮遊細胞適用型遺伝子導入細胞マイクロアレイを作製した結果について述べている。カチオニックリポソームである遺伝子導入試薬リポフェクトアミン 2000 (LF2000) と遺伝子の複合体を BAM 修飾スライドガラスにスポットし、遺伝子を固定化した。その上に浮遊細胞である K562 を固定化し、培養することによって遺伝子を発現した固定化細胞が得られた。続いて遺伝子と LF2000 の混合液を BAM 修飾スライド上にマイクロアレイフォーマット状にインクジェットプリンターでプリントした上に K562 細胞を固定化し、培養することで、遺伝子プリントパターンに対応した遺伝子発現細胞のマイクロアレイを作製することに成功している。また、この細胞マイクロアレイには、遺伝子のみならず small interfering RNA も利用可能であることも示している。結論として、BAM 修飾スライドガラスを用いることにより、浮遊細胞適用型の遺伝子導入細胞マイクロアレイを開発できたと述べている。

第5章では本論文の総括及び将来展望を述べている。

本論文は細胞膜修飾剤 BAM を開発し、細胞膜へのタンパク質導入、浮遊細胞固定化培養、浮遊細胞適用型遺伝子導入細胞マイクロアレイへと応用したものであり、化学生命工学、特に細胞表層工学、遺伝子機能網羅的解析分野の発展に寄与するところ大である。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。