

## 審査の結果の要旨

論文提出者氏名 丸山 亮

細胞の機能は培養環境に大きく左右される。なかでも、細胞と足場材料の接着、さらに細胞同士の接着が細胞の増殖や分化に大きく影響するため、細胞培養足場材料を高い品質で再現性良く構築・供給することは再生医療分野において非常に重要な課題である。非動物由来成分で細胞接着分子と選択的に結合する生体適合性の高い分子を獲得し、非天然型の高度な結合様式を細胞に提供することができれば、本課題を克服できる可能性がある。本研究では、分子認識能をもつ一本鎖 DNA/RNA である核酸アプタマーに着目して研究を展開している。核酸アプタマーは、生物を利用せずにスクリーニングが可能であること、任意の箇所に化学修飾が導入できること、核酸アプタマー同士の連結が容易に行えること、温度に対する耐性が高くや保存性に優れた分子であること、相補配列を利用することで意図した高次構造変化を誘起することができることなど、抗体には無い多くの特徴を有する化学合成可能な生体高分子である。これまでに細胞表面タンパク質を標的とし、細胞機能を制御する核酸アプタマーは数多く報告されているが、細胞接着を誘導し、高い生存率と増殖能を維持したまま、細胞機能を制御できる細胞培養足場材料として機能するような核酸アプタマーは未だ報告されていない。本研究では、細胞接着を誘導し、高い生存率と増殖能を有したまま細胞機能を制御する DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料の構築を目的とし、E-cadherin 結合性 DNA アプタマー (EBA) を介した上皮細胞接着現象の研究を行っている。

本論文は 5 つの章から構成されている。第 1 章では、本研究の背景として細胞接着と接着タンパク質、細胞培養足場材料の設計と応用、核酸アプタマーについてまとめ、従来の細胞足場材料が抱える課題を明確に整理したうえで、本研究の目的を述べている。第 2 章では本研究で用いた材料及び手法について述べている。第 3 章では、三段平行型グアニン四重鎖構造を形成する EBA の構造推定を目的とし、三段平行型グアニン四重鎖における G-カルテット形成グアニンを推定する分光学的手法に基づく新しい分析法を提案している。本手法は核酸配列の網羅的な一塩基アデニン置換体の円偏光二色性 (Circular dichroism, CD) スペクトル測定と紫外可視分光光度計による融解温度 (Melting temperature,  $T_m$ ) 測定を併用することで G-カルテット形成グアニンを推定する。本手法の構築のために、構造が既知の 3 種類の三段平行型グアニン四重鎖に関して CD スペクトル測定及び  $T_m$  測定を行っている。最後に、本章で構築した分析法を利用して EBA の構造推定を行っている。第 4 章では、DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料の構築を目指し、EBA 修飾基板における細胞接着様式の解析と EBA 修飾基板が細胞機能に与える影響の評価を行っている。具体的には、EBA による細胞表面染色、前章で構築した分析法により推定した EBA の構造を元にした細胞接着モチーフ解析、細胞選択性、相補鎖導入による細胞接着制御及びエンドヌクレアーゼに

よる細胞剥離，細胞接着斑染色を評価し，EBA 修飾基板における細胞接着が EBA と E-cadherin の相互作用によって誘起されている可能性があること，細胞生存率と細胞増殖能が通常培養環境と同等であることを明らかにしている．更に，EBA がシグナル伝達に与える影響を遺伝子発現解析によって評価した結果，EBA が E-cadherin と  $\beta$ -catenin の複合体形成を誘発し，Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを負に調節する可能性があることを示している．第 5 章では，本研究の総括として前章までの内容を要約し，具体的に今後の課題と展望について述べている．

以上より，本研究で得られた知見は，DNA アプタマーが細胞接着を誘起し，高い細胞生存率と増殖能を有したまま細胞接着及び遺伝子発現量等の細胞機能を制御する新たな細胞培養足場材料になり得ることを示している．DNA アプタマーを利用した細胞培養足場材料の構築が実現することで，細胞生物学，生体分子科学などの基礎研究の領域のみでなく，正確な細胞機能や分子機構の解明が必要とされる再生医療，薬効，毒性評価のスクリーニングツールなどの医療応用分野においても，その安全性や可能性の向上に大きく貢献することが期待できる．したがって，本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する．