

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 位 高 啓 史

本研究は、高分子ミセル型ナノ構造体の遺伝子デリバリーシステム応用の可能性を明らかにすることを目的として、その培養細胞への遺伝子導入、生理的環境下における機能を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 水溶性のポリエチレングリコール (PEG) とカチオン性連鎖であるポリリン (PLL) とを連結したブロック共重合体 (PEG-PLL) を用い、天然のポリアニオンである DNA と混合することによって調製される高分子ミセル型ナノ構造体によって、293 細胞に対する良好な遺伝子導入が可能であった。この高分子ミセルによる細胞毒性は非常に低かった。また、培地中に血清の存在する条件下でも、その遺伝子発現に対する影響は少なかった。
2. 遺伝子発現促進試薬として、関節リウマチの治療薬であるヒドロキシクロロキンを検討したところ、クロロキンと同等に、高分子ミセルによる遺伝子導入に対する著しい効果を示した。また、ヒドロキシクロロキンの細胞毒性は、クロロキンと比べ低く、遺伝子治療に応用しうる可能性が示唆された。
3. マウス由来のマクロファージ、骨芽細胞、ラット由来のシュワン細胞の各初代培養株細胞、およびヒト間葉系幹細胞に対し、高分子ミセル型ナノ構造体による遺伝子導入を行ったところ、いずれの細胞においても遺伝子発現が得られ、高分子ミセルが種々の細胞種に対する遺伝子導入に応用可能であることが示唆された。
4. 種々の非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムにおいて、生理的環境下での安定性は遺伝子導入効率と密接に関連する。高分子ミセル型ナノ構造体は、凝縮された DNA 周囲を PEG が覆うという 2 層構造を取り、周囲環境に影響されない安定性を持つことが期待される。この評価のため、fluorescein、X-rhodamine の蛍光 2 重標識した pDNA を用い、その complex 内での形態変化を 2 蛍光分子間のエネルギー移動 fluorescence resonance energy transfer (FRET)

によって評価する新手法を確立した。本手法により、高分子ミセル、リポプレックス（脂質を用いた非ウイルス性システム）、ポリプレックス（カチオン性高分子を用いたシステム）の各 DNA complex の血清中での安定性を評価し、高分子ミセル型ナノ構造体が非常に長時間安定であることが示された。

5. この高分子ミセル型ナノ構造体の安定性は、血清存在下での遺伝子導入効率と非常によく相関した。一方、他の complex では、血清との incubation によって、遺伝子発現は大きく減少した。その原因を検討したところ、いずれの complex においても、内包された DNA 分子の変性は観察されなかったが、血清存在下での細胞による complex の取り込みが、高分子ミセルと他の complex とで大きく異なった。即ち、高分子ミセルでは、生理的環境下においても安定した性状が、生物学的機能に対しても重要な働きをしていることが示唆された。

以上、本論文は、高分子ミセル型ナノ構造体の優れた遺伝子導入能、生理的環境下での安定性を明らかとし、*in vivo* 遺伝子デリバリーシステムへの応用の可能性を示した。本研究は、遺伝子治療の臨床応用に必須とされる、非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムに重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。