

論文の内容の要旨

論文題目 Study on Polyion Complex Micelles Formed from End-Functionalized Charged Block Copolymer and Plasmid

DNA for Gene Vector System

(遺伝子ベクターシステムの為の末端機能化荷電性ブロック共重合体とプラスミド DNA から形成されるポリイオンコンプレックスミセルに関する研究)

氏名 分林 大輔

遺伝子治療実現の為の重要な条件の一つに、安全に効率良く、標的細胞に治療遺伝子を導入し、所定の遺伝子発現を達成する遺伝子ベクターの開発が挙げられる。これまでは、ウイルスベクターがその遺伝子導入効率の高さから、臨床試験において主に用いられてきたが、1999 年にアデノウイルスベクターによる遺伝子治療において、死亡事故が報告され、ウイルスベクターに代わる安全性の高い非ウイルスベクターの研究開発が盛んに行われている。その中で、カチオン性連鎖とポリエチレングリコール(PEG)のような親水性連鎖からなるブロックコポリマーがポリアニオンであるプラスミド DNA と水溶液中で形成するポリイオンコンプレックスミセル(PIC ミセル) は、遺伝子ベクターとしての様々な有用性を持つものとして注目が集まっている。PIC ミセルは、カチオン性連鎖が DNA と静電相互作用を駆動力としてコンプレックスを形成し、その周りを親水性連鎖が覆う構造をとる。これにより、電荷の中和点でさえも高い水溶性を保ち、生体内に存在する血清タンパクなどとの非特異的な相互作用を減少することができる。また、PIC ミセルの粒子径はナノオーダーであり、生体内での高い組織浸透性が期待できる。

しかしながら、PIC ミセルの遺伝子ベクターとしての能力としては、まだ十分ではなく、さらなる発展が期待されている。PIC ミセルの機能化として、本研究では、PIC ミセルに特定の組織、細胞への標的指向性の付与を施すために、PIC ミセル表層へのリガンド分子の導入を目的とした。これまでに、カチオン性ホモポリマーと DNA からなるポリプレックスへのリガンド分子の導入は数多く報告されているが、PIC ミセルでの報告は少数派であり、しかも、その効果は必ずしも十分ではない。このような現状から、著者は、標的指向性を有するミセル型遺伝子ベクターのために、まず最初に、末端に反応性基を有する荷電性ブロックコポリマーを設計し、新規合成を試みた(二章)。

以下に、本論文での各章の要約を示す。

一章では、遺伝子治療についてまず述べ、これまでに用いられてきたウイルスベクターと特徴とその問題点について、さらには非ウイルスベクターシステムとしての PIC ミセルの概要について述べた。また、カチオン性ポリ

マーを基にしたシステムでの化学構造の影響や、本論文でのターゲットである細胞内取り込みとレセプター介在性遺伝子導入についてのこれまでの報告をまとめた。他に、非ウイルスベクターシステムによる遺伝子導入において度々障害となるエンドソーム/リソソームでの分解を回避するための方法論も示した。また、本研究でカチオン性高分子として選択した、ポリジメチルアミノエチルメタクリレート(PAMA)の遺伝子導入剤としての特徴をまとめ、最後に本論文の構成を示した。

二章には、その新規ブロックコポリマーの合成とプラスミド DNA とからなる PIC ミセル調製、さらには PIC ミセル表面の反応性基の存在証明を行った。末端反応性荷電性ブロックコポリマーとしては、親水性連鎖をして PEG を、カチオン性連鎖としてポリジメチルアミノエチルメタクリレート(PAMA)選択し、PEG 末端にアルデヒド基の保護基であるアセタール基の導入に成功した。ここでは、所属研究室で確立した、ヘテロニ官能性 PEG の合成法と金属アルコールにより開始される AMA のアニオン重合法を組み合わせ、問題となるような副反応なしにブロックコポリマーの合成に成功した。得られたブロックコポリマー(acetal-PEG-PAMA)は pH 7.4 の緩衝液中においてプラスミド DNA(pDNA)と混合するとコンプレックスを形成し、その混合液は1カ月以上沈殿等は観察されず、コンプレックスが高い水溶性を有することが示された。また、動的光散乱測定によりコンプレックスのサイズは 149.0 nm であり、水中での高い分散性と合わせて、PIC ミセルの形成が示唆された。さらに、得られた PIC ミセル溶液を酸性下(pH2.5, 2 h)にさらすとアセタール基がアルデヒド基に変換されることがアルデヒド基検出蛍光試薬との反応による蛍光強度増大により示され、表層部に反応性基(アルデヒド基)を有する PIC ミセルが得られることが明らかとなった。

三章では、本研究で合成した acetal-PEG-PAMA と pDNA とから形成される PIC ミセルの物理化学的特性と培養細胞に対する遺伝子導入効率との関係について、acetal-PEG-PAMA とプラスミド DNA との混合比の影響に焦点を当てて、詳細な検討を行った。ここで混合比の定義は、pDNA のリン酸基に対する acetal-PEG-PAMA の AMA ユニットのモル濃度比とし、本論文では N/P 比とした。acetal-PEG-PAMA は pKa 値が 7.1 であるが、静電相互作用を駆動力として化学量論的な比である N/P=1 で pDNA とコンプレックスを形成することが示され、また、動的光散乱測定やエチジウムブロマイド蛍光強度測定により pDNA はコンパクションされて 100 nm 程の粒子径を有する PIC ミセルに内包されることが示された。一方、安定性の観点として、大過剰量のモデルポリアニオン存在下でさえも PIC ミセルは PAMA/pDNA complexes とは異なり、ミセル内核の疎水性の増大によると考えられる pDNA の内包が得られ、ミセル化による安定性向上が示された。また、それに対応するように 293 細胞に対する *in vitro* での遺伝子発現評価において、PIC ミセルは PAMA/pDNA コンプレックスを上回る遺伝子導入効率を得て、ミセル化の有用性が示された。PIC ミセルの N/P 比と遺伝子導入効率の関係では、PIC ミセルは非常に高い N/P 比(N/P=25)で遺伝子導入効率の最大値をとった。このような高い N/P 比での acetal-PEG-PAMA/pDNA complex は、ゼータ電位測定からコア-シェル構造を保った

PICミセルではなく、表面に acetal-PEG-PAMA が会合し、PAMA 連鎖を露出した構造体をとることと、フリーで存在する acetal-PEG-PAMA によるいわゆるバッファー効果などにより遺伝子導入効率を高められると考えられる。

四章では、標的指向性 PIC ミセルの調製とその遺伝子導入における効果について検討した。実験系としては、アシアロ糖タンパクレセプター(ASGP-R)を表面に有するヒト肝癌細胞 Hep2 細胞を選択し、acetal-PEG-PAMA のアセタール基を酸処理によりアルデヒド基に変換後、還元アミノ化法によって ASGP-R に対するリガンド分子であるラクトースをブロックコポリマーの PEG 末端に導入した。得られた lactose-PEG-PAMA と pDNA とから形成する lactose-micelle は、acetal-PEG-PAMA と pDNA とから形成する acetal-micelle と同様の粒子径とゼータ電位を持つことが示され、物理化学的特性に違いがないことが示された。この lactose-micelle と acetal-micelle による HepG2 細胞に対する遺伝子導入効率を評価すると、lactose-micelle が acetal-micelle を上回る遺伝子導入効率を示し、また、ASGP-R に対するリガンドであるアシアロフェクチン(ASF)共存下では、ASF の阻害効果により、lactose-micelle と acetal-micelle の遺伝子導入効率は同程度であったことから、lactose-micelle がレセプター介在性エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれていることが示された。lactose-micelle と acetal-micelle の遺伝子導入効率の差はより低 DNA dose で大きくなり、レセプター介在性エンドサイトーシスによる取り込みの効率化が示唆された。

五章では、各章の総括を示した。

この論文を通して、著者は末端機能化荷電性ブロック共重合体(acetal-PEG-PAMA)と pDNA から成る PIC ミセルの遺伝子デリバリー分野での有用性を検討してきた。著者は、この論文内で創製されたシステムが、将来の遺伝子デリバリー研究の発展に寄与し、安全で良好な治療効果が証明された遺伝子治療が実現されることを願ってやまない。