

[別紙2]

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名                      分 林      大 輔

ヒトゲノムの解読によって様々な遺伝病や難治性疾患の原因遺伝子が明らかにされつつあり、それに対する遺伝子治療の実現が期待されている。治療遺伝子を標的細胞内へ導入するための遺伝子ベクターには、これまで主にウイルスベクターが用いられてきたが、アデノウイルスベクターによる臨床試験での死亡例報告等を契機として、近年非ウイルスベクター開発の要求が飛躍的に高まっている。しかしながら、カチオン性ポリマーから成る非ウイルスベクターは、ウイルスベクターよりも安全性と汎用性の面で優れているが、遺伝子導入効率が低いというのが現状である。本論文は、効率的な遺伝子導入実現の観点から、カチオン性ポリマーとプラスミドDNA(pDNA)間のコンプレックス形成に基づく新規ポリプレックス型ベクター材料の分子設計を行った研究をまとめたものであり、末端機能化カチオン性ブロック共重合体の新規合成と pDNA を内包するポリプレックス(ポリイオンコンプレックス (PIC) ミセル) の調製、さらには、その遺伝子ベクターとしての有用性について述べられている。

第1章は緒論であり、遺伝子治療と遺伝子導入方法に関する概論の後に、PIC ミセル型遺伝子ベクターの特徴や現状が述べられ、本論文の背景が示されている。さらには、効率的な遺伝子導入のために必要なポリプレックス型ベクターの特性が、分子構造や分子修飾による機能付加と関連づけて述べられ、PIC ミセル型遺伝子ベクターの構造設計とそのための高分子材料設計の指針が示されている。本章の最後においては、以上の概論と関連づけて、本論文の目的と構成が示されている。

第2章は、 $\alpha$ -末端にアルデヒド基の保護基として機能するアセタール基

を配したポリエチレングリコール(PEG)とポリジメチルアミノエチルメタクリレート(PAMA)からなるブロック共重合体(acetal-PEG-PAMA)の新規合成と pDNA を内包する PIC ミセル形成について述べられている。acetal-PEG-PAMA の合成は、まず、アニオン開環重合によって分子量を高度に制御した acetal-PEG-O<sup>-</sup>K<sup>+</sup>を得て、さらに、この acetal-PEG-O<sup>-</sup>K<sup>+</sup>の $\omega$ -アルコール末端から AMA のアニオン重合を行うという新たな方法に基づいて行われている。通常、金属アルコールからメタクリレート系モノマーの重合を開始することは難しいが、ここでは、AMA の側鎖エステル $\beta$ 位に電子供与性原子が存在することに着目して、ブロック共重合を成功に導いている。PEG-PAMA ブロック共重合体の重合が副反応なく進行し、かつ PEG の $\alpha$ -末端への定量的アセタール基導入に基づいて、目的とする acetal-PEG-PAMA が得られたことは、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) ならびにプロトン核磁気共鳴スペクトル (<sup>1</sup>H-NMR) による構造解析から示されている。さらに、合成された acetal-PEG-PAMA は、pDNA と pH7.4 の緩衝液中で 150nm の会合体 (PIC ミセル) を形成し、1 ヶ月以上の長期間において高い水溶性を保つことが示されている。また、酸処理によってアセタール基はアルデヒド基に変換可能であることから、pDNA を安定に内包し、かつ反応性のアルデヒド基を表層に有する PIC ミセルが形成されることが述べられている。

第3章では、acetal-PEG-PAMA と pDNA から得られる PIC ミセルの物理化学的特性について詳細に検討した結果が述べられるとともに、培養細胞 (293 細胞) への遺伝子導入に対する PIC ミセルの物理化学的特性の影響とミセル化の効果について、acetal-PEG-PAMA と pDNA の混合比(N/P 比)に着目して検討した結果が示されている。N/P 比の増加に伴い、pDNA は acetal-PEG-PAMA との PIC 形成に基づいて凝縮構造へと変化し、動的光散乱 (DLS)測定から 90~100nm の粒径を示す PIC ミセル内に安定に内包されることが明らかとされている。PIC ミセルの安定性は、ポリアニオン(ポリビニル硫酸)との交換反応の観点から評価され、PAMA/pDNA ポリプレックスよりも安定に pDNA を内包できることが示されている。さらに、PIC ミセルは PAMA/pDNA ポリプレックスに比べて高い遺伝子導入効率を示し、遺伝子ベクターシステムにおけるミセル化の有用性が示されている。また、N/P 比と遺伝子発現効率の関係から、PIC ミセルの物理化学的性質が遺伝子導入効率

に与える影響についても詳しく述べられている。

第4章は、標的指向性 PIC ミセル型遺伝子ベクターの有用性について述べられている。第2章で得られた acetal-PEG-PAMA の PEG 末端に肝細胞のアシアロ糖タンパク質レセプター(ASGP-R)に対するリガンドとして、ラクトースが導入された lactose-PEG-PAMA を得る方法論が示され、さらに、このブロック共重合体と pDNA とから表層にラクトースを導入した PIC ミセル (lactose-micelle) を調製する方法が述べられている。さらに、ここでは、ヒト肝癌由来の HepG2 細胞に対して、lactose-micelle が acetal-PEG-PAMA と pDNA から成る acetal-micelle と比べて効率的な遺伝子導入を達成出来ることが示されている。この導入効率向上は、ASGP-R に対するリガンドであるアシアロフェチュインによって効果的に阻害されることからレセプター介在性エンドサイトーシス(RME)によるものであることが考察されている。RME を介した PIC ミセルの遺伝子導入の効率化は、低 pDNA dose においてより顕著であり、リガンド導入 PIC ミセルによる in vivo 遺伝子導入に期待が持てるものと結論づけている。

第5章は、総括として本論文全体の内容がまとめられている。機能性 PIC ミセル型遺伝子ベクターの創製ならびに、その物理化学的特性と遺伝子発現活性との相関を明らかとした本論文の内容は、バイオ関連分野での高度機能材料開発に有用な知見をもたらすものであり、特に遺伝子治療用材料への展開を通じてバイオマテリアル産業分野への貢献が大きい。よって、本論文はマテリアル工学の見地から鑑みて博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。