

近年、遺伝子治療への期待が高まる中、安全安心でかつ高い遺伝子導入効率を達成しうる非ウイルス型遺伝子ベクターの研究・開発に高い関心が寄せられている。通常このような研究を遂行するにあたり、細胞の単層培養を用いた *in vitro* 実験によりベクターをスクリーニングにかけ、その中で効果が現れたものを、動物を用いた *in vivo* 実験により効果を評価するという手法をとることが多い。しかしながら、単層培養と動物実験の結果には必ずしも相関があるわけではなく、*in vitro*での最適な条件が *in vivo*では全く効果がないということがしばしば起こる。本論文では、そのような研究遂行上の矛盾を解決すべく、単層培養よりも生理的な条件に近い多細胞がんスフェロイド培養を用いてベクターの評価を行っている。この多細胞がんスフェロイドシステムは、*in vivo* 固形がんの形態的・機能的特徴と類似した三次元的に培養された *in vitro* がんモデルであり、長期間にわたるベクターの評価を可能にしている。また、代表的な非ウイルス型遺伝子ベクターには、カチオン性脂質と遺伝子の複合体であるリプレックスと、カチオン性ポリマーとの複合体であるポリプレックスがあり、特に後者のポリプレックスは、構成するポリマーに対して化学修飾が可能なことから様々な機能付与を試みる研究が盛んに行われている。本論文では、プラスミド DNA (pDNA) を内包するポリプレックスを構成するポリマーのカチオン構造について、ポリアスパラギン酸(P(Asp))側鎖に *N*-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl 基を導入した P[Asp(DET)] と *N*-(3-amino propyl)-3-aminopropyl 基を導入した P[Asp(DPT)] の比較検討を行い、さらに生体適合性のポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体である PEG-*block*-P[Asp(DET)] と PEG-*block*-P[Asp(DPT)] から形成されるポリプレックスミセルに関して、その PEG 化の効果を検討している。前述のスフェロイド培養を *in vivo* 実験の代替評価系として、ポリプレックスの安定性、生体適合性、腫瘍組織浸透性、遺伝子導入効率を評価し、その結果を踏まえて実際に *in vivo* 腫瘍での評価を行っている。以下、各章ごとに、本論文の審査結果の概要を述べる。

第一章の序論では、遺伝子治療の現状と問題点に言及し、ポリプレックスとポリプレックスミセルの特性に関して述べ、*in vivo* の状況をより忠実に反映する *in vitro* 評価システムが必要であること、その候補として多細胞がんスフェロイドがあることを述べている。

第二章では、ポリマーの物性と、pDNA と形成するポリプレックスの物性、またポリプレックスの評価に用いる多細胞がんスフェロイドの性質について述べている。一般的にポリプレックスが高い遺伝子導入効率を達成するには、エンドソームを脱出するためのバッファー機能が必要と考えられているが、本論文でベクターとして位置付けた P[Asp(DET)] と PEG-*b*-P[Asp(DET)] に関しても pH に応答するポリマーのプロトン化を示し、バッファー機能が備わっていることを見出している。また、ヒト肝がん細胞 HuH-7 を用いて均一かつ長期間培養可能な多細胞がんスフェロイドの作製に成功し、*in vivo* 評価へ移行する前のポリプレックスの評価システムとしての有用性を示している。

第三章では、ポリプレックス及びポリプレックスミセルの遺伝子導入効率と毒性について、単層培養系とスフェロイド培養系を用いて比較評価を行っている。単層培養系では 2 日間までしか遺伝子発現の評価が出来ないのに対し、スフェロイド培養系では 10 日以上評価することが可能

であることを明らかにしている。また、多細胞がんスフェロイドはポリプレックスの毒性に対して非常に敏感で、市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミンや P[Asp(DPT)]を用いた場合、多細胞がんスフェロイドは崩壊することを指摘している。これに対して P[Asp(DET)]の毒性は非常に低く、同時に高い遺伝子導入効率を達成していることを見出すと共に、その要因として P[Asp(DET)]の特異的なプロトン化能力を挙げている。また、ポリプレックスの PEG 化は著しい毒性の低下をもたらし、遺伝子発現の遅延をも引き起こすことを見いだしている。これらの結果は PEG 化によるポリプレックスの毒性の軽減と安定性の向上効果を示すものであり、*in vivo* 応用を考える上で非常に重要であるものと考えられる。

第四章では、低酸素状態に陥ったがん細胞に対する遺伝子導入について検討している。不均一な環境下にある固形がんでは、酸素や栄養などの物質の供給が遅く、部分的に低酸素状態に陥ってしまい、制がん剤などのデリバリー効率も非常に低いことが知られている。このよう疾患部位へベクターを到達させるには、ベクターの組織浸透性が重要となってくる。本論文では、スフェロイド培養系を用いた実験より、PEG-*b*-P[Asp(DET)]ポリプレックスミセルが PEG 化により多細胞がんスフェロイドのより深部にまで到達できることを見出している。また遺伝子発現においても、PEG-*b*-P[Asp(DET)]ポリプレックスミセルと P[Asp(DET)]ポリプレックスでは、異なる位置で発現することを確認している。実際に、低酸素状態のみで発現する pDNA を用いて PEG-*b*-P[Asp(DET)]ポリプレックスミセルを評価したところ、多細胞がんスフェロイドの深部の低酸素部位特異的に発現させることに成功している。

第五章では、これまでの *in vitro* での結果を元に、ヒト膵臓がん BxPC3 胆がんマウスへの腫瘍内投与により P[Asp(DET)]と PEG-*b*-P[Asp(DET)]の組織浸透性と遺伝子発現評価を行うとともに、その前段階として BxPC3 スフェロイドを用いて評価を行っている。*In vivo* モデルに対して行った実験結果は、スフェロイドに対して行った実験結果と良く一致しており、スフェロイドモデルの有用性と、PEG-*b*-P[Asp(DET)]ポリプレックスミセルの *in vivo* での遺伝子ベクターとしての可能性を示す結果となっている。

以上のように本論文では、*in vitro* スフェロイドモデルおよび *in vivo* 固形がんモデルを用いて、精密にデザインされたポリプレックスミセルが、高い遺伝子導入効率と優れた組織浸透性を示し、毒性を著しく軽減させることを見出している。本論文の内容は、その独創的なアプローチや高い有用性から考えて医工融合の分野において極めて秀逸であり、展開される分子設計論は新しいバイオマテリアルにつながる重要な知見を提供しうるものと判断される。

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。