

## 【別紙 2】

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 松 本 悟

特定の 2 本鎖 RNA と相補的な塩基配列を持つ標的 mRNA が選択的に分解され、その遺伝子の発現が抑制される RNA 干渉 (RNAi) は 1990 年代に発見され、現在、疾患を惹起する遺伝子を抑制する次世代核酸医薬としての応用研究が世界各国で盛んに行われている中で、特定の遺伝子疾患に対応する RNAi を誘起する short interfering RNA (siRNA) が数多く発見されている。しかし、実際の医用応用に至るには siRNA を体内で安定に存在させ、患部まで送達する技術の開発が不可欠となる。本論文ではこの点に着目し、siRNA の全身投与型送達システムの開発を目指し、siRNA の分解の抑制や機能発現に適したブロック共重合体を設計すると共に、siRNA とブロック共重合体との複合体形成の物理化学的特性解析を行い、その生物学的評価では siRNA の機能発現を評価する新規株化細胞を樹立し、物理化学的评价と生物学的評価の結果をブロック共重合体の設計にフィードバックさせながら、siRNA 送達に最適な送達システムを構築している。さらに、マウスを用いた *in vivo* 実験では、培養細胞実験において高い遺伝子抑制効果を示した送達システムを用いることにより、siRNA の血中滞留性が大幅に向上し、siRNA に特化した新規送達システムとしての有用性を示している。以下、各章毎に、本論文の審査結果の概要を述べる。

第一章の序論では、siRNA の発見に至る歴史的背景から核酸医薬としての可能性および問題点を概観するとともに、昨今の siRNA 医薬開発情勢を踏まえ、高分子ミセルを用いた siRNA のための全身性送達システム開発の重要性を説いている。siRNA や RNAi の基礎研究については欧米の諸研究機関が先導的な役割を果たしているが、siRNA の医薬としての実用化には全身性送達システムの開発が不可欠であるため、本章において、ブロック共重合体を用いた siRNA 送達システムの開発を本論文の主題として位置付けている。

第二章では、siRNA 送達に適切な機能を有する高分子材料設計法の探索として、構造の異なる様々なブロック共重合体の、siRNA との複合体形成能および培養細胞への siRNA 送達能評価を行っている。siRNA 送達能の評価にあたり、検出の容易なレポーター遺伝子を恒常的に発現する株化細胞を独自に樹立し、

ブロック共重合体の構造機能相関を正確かつ高速に解析する工夫を行っている。siRNA と高分子ミセルを形成するためのブロック共重合体としては、親水性鎖とカチオン性鎖からなるブロック共重合体である poly(ethylene)-*block*-poly(L-lysine) (PEG-*b*-PLL)を基本構造として評価を進めている。PEG-*b*-PLL は、siRNA の核酸類縁体に相当する plasmid DNA (pDNA) やアンチセンス DNA と高分子ミセルを形成し、*in vitro* や *in vivo* において高い核酸送達能を有することが報告されてきた。本論文でも PEG-*b*-PLL と siRNA による複合体形成はゲル電気泳動や EtBr Assay より確認され、siRNA の酵素分解耐性は著しく向上したものの、培養細胞への siRNA 送達能には向上はみられなかった。そこで PEG-*b*-PLL の siRNA 送達能を改善する方策として、カチオン性側鎖にエチレンジアミン構造を有する弱塩基性官能基 (Asp(DET)) を導入する方法を検討した。Asp(DET)構造は、pDNA の遺伝子導入において細胞内への核酸-ブロック共重合体複合体の取り込みを促進することが実証されている。しかし、PEG-*b*-PLL への Asp(DET)構造の導入により siRNA 送達能は減少し、ゲル電気泳動による解析から siRNA との複合体が不安定化したことが示唆された。上記の通り本章では、ブロック共重合体の構造機能相関評価を行う RNAi 実験系を独自に構築したが、pDNA 等の核酸類縁体のために設計されたブロック共重合体が siRNA 送達には有効でないことを明らかにし、これらの検討から siRNA 送達に特化したブロック共重合体設計指針を確立する必要性を指摘している。

第三章では、siRNA 送達に優れたブロック共重合体設計指針として、内核にジスルフィド架橋を有するコア-シェル形の高分子ミセルを検討している。ジスルフィド架橋ミセルは、PEG-*b*-PLL の一級アミンにアミジン結合を介してチオール基を導入した PEG-*b*-(PLL-IM) と siRNA から形成され、細胞外では siRNA を安定に保持し、細胞内の還元的環境ではジスルフィド架橋の開裂により siRNA を放出する環境応答性を備えている。この設計では、培養細胞において siRNA による高い発現抑制効果を確認するとともに、マウスへの尾静脈投与において血中滞留性の大幅な向上をも確認している。一般に、血流中に投与された未修飾の siRNA は極めて速やかに腎排泄されることから、本システムにおける血中滞留性の向上は siRNA 用の送達材料に求められる機能として極めて重要である。本章では、生物学的評価に先立ち、PEG-*b*-(PLL-IM) と siRNA との複合体形成において、新たに微量サンプルでの光散乱測定法を導入し、従来は困難であった複合体形成過程の観測にも成功している。これにより、従来知られていなかった特殊な複合体形成挙動、即ちイミノチオレイン (IM) 修飾を施された PEG-*b*-PLL が siRNA と特定の比率で混合された場合にのみ、siRNA 内包高分子ミセルが形成されることを見出している。このミセル形成挙動の発見は、

ブロック共重合体を用いた siRNA 製剤技術の重要な要素技術である。

第四章は総括として、一連の研究のまとめと今後の高分子ミセルを用いた siRNA 送達システムの展望についてまとめている。

以上、本論文では PEG-*b*-(PLL-IM)を利用して siRNA を内包した環境応答性高分子ミセルの創製に成功している。この内容は、siRNA の機能評価のために独自の生物評価系を確立し、この結果を高分子材料設計にフィードバックさせ、真に有効な siRNA 送達用の高分子材料設計指針を確立したものと評価できる。その内容は医工融合研究分野において極めて秀逸であり、世界的にも実用化の機運が高まる siRNA 医薬の開発に多大な福音を与え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。