

## 論文の内容の要旨

論文題目 Preparation and evaluation of multifunctional gene carrier

based on various poly(amino acid)s

(異種ポリアミノ酸をビルディングブロックとして構築される

高機能性遺伝子キャリアの調製とその機能評価)

氏 名 三 條 舞

遺伝子治療は、従来の治療法では対処困難な疾患に対する治療法として、その実用化が期待されている。しかし、これまでの遺伝子導入技術では遺伝子導入効率、発現量、発現期間など様々な点で実用レベルに達しておらず、期待される治療効果が得られていない。そのため、遺伝子導入プロファイルを改善する遺伝子キャリアの開発が盛んに行われている。そして、免疫原性などの安全性の観点から、非ウイルス型キャリア開発への注目が目覚ましい。ところが、非ウイルス型キャリアは、細胞内動態を制御する機能に乏しいため、その遺伝子導入効率はウイルス型に比べて低いという問題がある。従って、細胞内の複雑な環境に対応し、遺伝子を効率良く核内へデリバリーする機能の創り込みが必要である。

低毒性な遺伝子キャリア用材料としてはポリアミノ酸が着目されている。中でもカチオン性のポリリシン(PLys)は遺伝子(pDNA)の凝縮能に優れていることから、有望な材料の一つとして期待されている。しかしながら、PLys をベースにしたキャリアは安定性において優れているが、細胞内でエンドソームから細胞質へと遺伝子を運ぶ機能に乏しいため、その遺伝子導入効率は必ずしも十分ではない。そこで近年、PLys 由来の遺伝子キャリアに対してエンドソーム脱出能を補うことで、遺伝子導入効率を改善する試みがなされている。つまり、細胞内動態を制御する機能、特にエンドソーム脱出能を組み込むことで、PLys 由来の遺伝子キャリアの性能は、実用的なレベルへ大きく近づくと期待される。

遺伝子キャリアのエンドソームから細胞質への移行効率向上は、高効率な遺伝子発現のための重要な課題である。エンドソームは内部が酸性環境のオルガネラである。これまでに、この酸性化をトリガーとしてエンドソーム膜を破壊する様々な分子設計が行われてきた。我々のグループでは、ポリアスパラギン酸の側鎖にジエチレントリアミン(DET)を結合させたカチオン性ポリマーPAsp(DET)が、低毒性かつエンドソーム脱出能に優れることを

見出した。この PAsp(DET)の側鎖カチオン鎖は、2段階のプロトン化挙動を示すことで酸に対する高いバッファ能を示すとともに膜傷害活性を発揮すると考えられる。しかし、ポリカチオンは生体分子との非特異的相互作用をすることが懸念されることから、PAsp(DET)側鎖のカチオン構造をアコニチン酸無水物で修飾した、アニオン性ポリマー PAsp(DET-Aco)を新たに合成した。このアコニチン酸無水物による修飾はエンドソーム内の弱酸性 pH に応答して速やかに解裂し、PAsp(DET)が復元することでポリマーの電荷が再び反転するという「Charge-Conversional 特性」を有している。従って、pH7.4 でアニオン性ポリマーである PAsp(DET-Aco)は、エンドソーム内の pH 低下に伴ってアコニチル基を脱離させ、カチオン性の PAsp(DET)へと変換し、高いエンドソーム脱出能を示すと考えられる。この Charge-Conversional 型ポリマーを用いることで、PLys 由来の遺伝子キャリアにエンドソーム脱出機能が付加されるものと考えられる。

本研究では、PLys ホモポリマーから形成させた pDNA/PLys ポリプレックスを、Charge-Conversional 型ポリマーでコートした三元ポリプレックスへと展開した。この三元ポリプレックスは、アニオン性の Charge-Conversional 型ポリマーでコートされることによって、血清との非特異的吸着が抑制され、その安定性が向上するものと期待される。さらに、エンドソーム脱出機能が不十分な PLys に添加することで、Charge-Conversional 型ポリマーのエンドソーム脱出素子としての有用性が明らかになり、また pDNA/PLys ポリプレックスの遺伝子導入効率が改善されると予想される。ここでは、この三元ポリプレックスの *in vitro* での遺伝子導入効率を評価し、さらに詳細な細胞内動態観察によりその遺伝子導入メカニズムの解明に取り組んだ。