

審査の結果の要旨

氏名 三條 舞

遺伝子治療は、疾患を遺伝子レベルで根本的に治療することから、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。現在までに、世界中で 1600 例近くの臨床試験が実施されたが、いまだ標準的治療として確立されるに至っていない。その最大の要因は安全かつ効率的に遺伝子を導入する手段が見出されていないためである。特に安全性や免疫原性の観点から、近年では非ウイルス型キャリアの開発が盛んに行われている。ところが非ウイルス型キャリアは、体内動態や細胞内動態を厳密に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。本論文ではこの点に着目し、「キャリアの安定性」、「遺伝子導入効率の向上」、「低毒性」の全てを満たしうる非ウイルス型キャリアの開発を目指し、体内動態と細胞内動態の両者に関わるバリアを突破するための機能性素子を合成すると共に、プラスミド DNA(pDNA)との複合体形成に関する物理化学的特性解析を行っている。さらに、キャリアのエンドソーム脱出効率や遺伝子発現効率に対する機能検証などの生物学的評価を行い、非ウイルス型キャリアとしての有用性を検証している。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、ウイルス型キャリアと非ウイルス型キャリアの相違を挙げると共に、安全性の観点から非ウイルス型キャリアの有用性を説いている。さらに、従来の非ウイルス型キャリアの課題点を示し、体内動態、細胞内動態メカニズムに立脚した各バリアを突破するための戦略立案を挙げている。具体的には、遺伝子凝縮能に優れる poly(L-lysine)(PLys)をベースにすることでキャリアの安定性を確立すると共に、エンドソーム脱出能に乏しい PLys を補完するため、高いバッファー能と低 pH 応答性の細胞膜傷害活性を有するカチオン性ポリマー poly{N-[N'-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide}PAsp(DET)) を組み込むことで、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により、高効率な遺伝子発現を導くことを提案している。しかし、カチオン性ポリマーによる生体分子との非特異的相互作用が懸念されることから、PAsp(DET)側鎖のカチオン電荷をアコニチン酸無水物修飾することで、アニオ

ン性ポリマー poly($N\{N^2[(N^2\text{-}cis\text{-aconityl})\text{-}2\text{-aminoethyl}]\text{-}2\text{-aminoethyl}\}$ aspartamide) (PAsp(DET-Aco))に変換し、この問題の解決を図っている。この PAsp(DET-Aco)は、弱酸性環境に応答して電荷が反転する機能を有する。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 低下に伴いアコニチル基を脱離させ、カチオン性の PAsp(DET)へと変換することで、エンドソーム脱出素子としての機能を発現することが期待される。本章では、戦略実現に必要な機能性素子およびそれらを合理的に配置したキャリアの設計を示し、本研究の意義および論点を明確に述べている。

第二章では、上記の戦略の一つ目の設計として、PLys ホモポリマーから形成させた pDNA/PLys ポリプレックスのカチオン性表面に対し、PAsp(DET-Aco)を静電相互作用によって組み込んだ三元ポリプレックスの調製法を検討している。ここでは、調製した三元ポリプレックスの粒径、ゼータ電位およびポリアニオンによる置き換わり実験の評価から、PLys 鎖が pDNA を凝縮し、さらにアニオン性の第三成分で覆われた安定な三元ポリプレックスの形成が示されている。さらに、株化培養細胞系での検討では、毒性に敏感で、かつ遺伝子導入が困難な細胞として知られている正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて、pDNA/PLys/PAsp(DET-Aco)三元ポリプレックスが pDNA/PLys ポリプレックスより低毒性でありながらも高い遺伝子発現効率を有することを確認した。この要因を明らかにするため、より直接的に遺伝子導入機構の解明を行っている。まず、共焦点レーザー顕微鏡観察によりポリプレックスの細胞内動態を観察したところ、PAsp(DET-Aco)が血清培地中において解離することなく、三元系を保持したまま細胞内に取り込まれていることが実証されている。さらに、pDNA/PLys/PAsp(DET-Aco)三元ポリプレックスは良好に速やかにエンドソームから脱出する様子が観察され、PAsp(DET-Aco)がエンドソーム脱出素子として働き pDNA/PLys ポリプレックスのエンドソーム脱出を促進したことが結論づけられている。

第三章では、第一章で述べた戦略の二つ目の設計として、全身投与型遺伝子キャリアシステムの構築を目指し、キャリアの中間層に生体適合性を示す Poly(ethylene glycol)(PEG)鎖を持つ高機能性遺伝子キャリアを提案している。具体的には、PLys と生体適合性を有する PEG とのブロック共重合体 (PEG-*b*-PLys)を用いて形成させた高分子ミセルに、PAsp(DET-Aco)を共有結合を介して組み込む方法を検討している。この高分子ミセルは、PLys 鎖によって pDNA を安定に内包でき、PEG 中間層からなる生体適合性と、外殻に配置された PAsp(DET-Aco)に基づくエンドソーム脱出機能を備えている。具体的には、末端にアジド基を有する PEG-*b*-PLys ブロック共重合体を用いて pDNA とミセ

ルを形成させ、末端アルキンを有する PAsp(DET-Aco)との環化付加反応(Click Chemistry)による導入を行っている。Click Chemistry は、種々の反応性官能基が共存する条件においても高い選択性を有することから、ポリアミノ酸側鎖のアミノ基やカルボキシル基が存在する複雑な条件においても適用できる有効な手法と考えられる。しかしながら、表層にアジド基を有する高分子ミセルの構築には成功しているが、最終段階の Click 反応を進行させる条件の確立には至っていない。その原因として、PEG 鎖の高い運動性によって反応性官能基が PEG 層内部に潜り込んでいるためと考察し、PEG 鎖長に着目したミセル設計を確立する必要性を指摘している。

第四章は総括として、一連の研究のまとめ、全身投与型遺伝子デリバリーを目指した PLys ベースのキャリアシステムの展望を述べている。

以上、本論文では pDNA/PLys ポリプレックスにエンドソーム脱出能を示す PAsp(DET-Aco)を静電相互作用によって組み込んだ三元ポリプレックスの創製により、「高い遺伝子発現」、「低毒性」、「キャリアの安定性」の全てを満たしうるキャリアシステムの構築に成功している。このようなマルチ機能型遺伝子キャリアは、これまでに例を見ない新しい取り組みといえ、実用的な遺伝子キャリア開発に向けたブレイクスルーとなることが期待される。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バイオエンジニアリング分野において極めて卓越した価値を有しており、世界的にも実用化の機運が高まる非ウイルス型キャリアの開発に多大な貢献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。