

審査の結果の要旨

氏名 金 鉉璣

近年、標的 mRNA を選択的に分解する RNAi をがん治療へ応用しようとする試みに期待が高まっている。がんを標的とし、全身投与により RNAi 活性を誘導するには、核酸分解酵素による分解および細網内皮系 (RES) による取り込みを回避し、がん組織に集積、標的細胞に侵入し、エンドソームから速やかに細胞質に移行するという多くの段階を越えていかねばならない。現在それら生体内障壁を克服する siRNA 送達キャリアの開発が精力的に行われている。エンドソーム脱出機能を有するポリカチオンとしては、poly{N-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]aspartamide} (PAsp(DET)) が開発されてきており、これを siRNA キャリアに展開することがこれまで試みられてきたが、生体環境下でのコンプレックスの安定性が十分ではないために、治療効果を得るに十分な RNAi 活性を得るに至っていない。本論文は、siRNA キャリア用ポリカチオンとして有望な PAsp(DET)の側鎖に疎水性の stearyl 基を導入することで、コンプレックスの安定性を強化したキャリアを創製し、全身投与により肺転移がんに対する治療効果を得ることを目的とした研究をまとめたものであり、以下の 5 章からなる。

第 1 章は序論であり、siRNA によるがん治療について述べるとともに、siRNA キャリアに求められる材料学的特徴を述べている。治療へ展開する際の問題点および課題について、現在行われている臨床治験の現状とともに解説し、本研究の意義及び論点を明確としている。

第 2 章では、本研究で取り扱う疎水性基 (stearyl 基) 導入カチオン性高分子 (stearyl PAsp(DET)) の合成法と、そのキャラクターゼーション、*in vitro* 遺伝子発現抑制について、疎水性基導入による効果を中心に検討している。物理化学的評価を通して疎水性基の導入により実際に siRNA とポリカチオンとのコンプレックスが安定化されたことを示すとともに、細胞取り込みが増し、遺伝子発現抑制効果が飛躍的に高まることを示している。

第 3 章では、全身投与を目的とし、第 2 章で述べた疎水性基導入コンプレックスにジスルフィド結合を介して PEG 鎖を導入した材料を設計し、そのキャラクターゼーションを *in vitro* および *in vivo* で行っている。はじめに stearyl PEG-PAsp(DET) および stearyl PEG-SS-PAsp(DET) の合成法およびそれら siRNA コンプレックスの物性評価を行い、PEG 化によってコンプレックスの表面電位が抑えられること、細胞毒性を抑制できることを確認している。さらに stearyl PEG-SS-PAsp(DET) コンプレックスにおいては、還元環境でジスルフィド結合の解離に伴う脱 PEG 化を確認している。*in vitro* での遺伝子発現抑制効果において、stearyl PEG-PAsp(DET) は遺伝子発現抑制が見られないものの、stearyl PEG-SS-PAsp(DET) では遺伝子発現抑制が得られることを確認し、脱 PEG 化の効果として議論している。続いて、Luc 発現肺転移モデルマウスに対し、全身投与での

遺伝子発現抑制を検討しており、stearyl PEG-SS-PAsp(DET)では Luc の遺伝子発現が抑制されることを確認し、本系が全身投与で有効であることを示している。さらにコンプレックスの血中動態を *in vivo* 共焦点顕微鏡を用いて評価しており、血中濃度の経時変化について曲線下面積 (Area Under Curve) を指標として評価した結果、stearyl PEG-SS-PAsp(DET)が最も高い値を示したことを述べている。一方で、本系は血中循環中において凝集体が観察されることを認めており、これは血中に存在するグルタチオンによりジスルフィド結合が開裂し、脱 PEG 化が一部進行した結果、血中成分との会合が起こったためと考察している。

第 4 章では第 3 章において有効性が示された stearyl PEG-SS-PAsp(DET)を用い、肺転移がんモデルに対し、治療用 siRNA による全身投与での制がん効果を検討している。治療用 siRNA として EGFR(上皮細胞増殖因子レセプター)を標的に選択し、がん増殖抑制を検討したが有意ながん増殖抑制は見られなかったことを述べている。これはがん増殖抑制をするに十分な siRNA が送達できなかったためか、あるいは EGFR はがん細胞にアポトーシスを十分に誘導出来なかったためであると考察している。一方で、膵臓がん皮下移植モデルに対しては、VEGF (血管内皮細胞増殖因子) siRNA により、投与期間中にがん増殖抑制が確認され、stearyl PEG-SS-PAsp(DET)/VEGF siRNA が膵臓がん治療に有効である可能性を認めている。

第 5 章の総括では 2~4 章で検討した内容を簡潔にまとめるとともに今後の展望について議論している。

以上のように本学位請求論文は、ポリカチオン側鎖に疎水性である stearyl 基を導入し、コンプレックスの安定性を強化することで、細胞取り込みと遺伝子抑制効果が飛躍的に向上することを見出すとともに、PEG 化による細胞取り込みと遺伝子抑制効果の低減というジレンマに対し、還元環境に応答して開裂するジスルフィド結合を PEG-ポリカチオン間に導入し、脱 PEG 化を誘起することで解決しうることを提示している。実際、PEG-SS-PAsp(DET)は低毒性化と遺伝子抑制効果を両立し、Luc 発現肺転移モデルにおいて全身投与により Luc 発現抑制を確認するなど本システムの有効性を見出している。EGFR を標的とした治療用 siRNA を用いた肺転移がん治療においては、有意ながん増殖抑制効果は見られなかったものの、一方で VEGF を標的とした siRNA を用いることで、膵臓がん皮下移植モデルにおいてがん増殖抑制を確認している。これは今後標的遺伝子をさらに検討することで本系が siRNA の全身投与によるがん治療において有効であることを示している。以上のように本研究は、高分子材料の精密合成技術に立脚して、未だ達成されていない siRNA の全身投与システムの開発を行い、これまで不可能であった膵臓がんの抗血管新生療法が可能であることを動物実験を通じて明らかにしたものであり、マテリアル工学の分野において極めて秀逸であると判定される。

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。