

審査の結果の要旨

氏名 Yelena Vachutinsky (エレナ ワホテンスキ)

遺伝子治療は、がんなどに代表される従来の方法では治療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。しかしながら、現在までに数多くの臨床治験が行われてきたものの、いまだ標準的治療法とは成り得ていない。その最大の要因は、安全かつ効率良く治療遺伝子を標的とする細胞の核内に導入する技術が確立されていないためである。例えばがんを標的とする場合、外科的手術では切除困難な腫瘍組織を治療するには、全身投与を介した遺伝子デリバリーが最も有効である。ここで従来のウイルスなどを用いた遺伝子キャリアは、免疫系に容易に補足されてしまい、腫瘍組織への到達効率は非常に低くなることが知られている。全身投与を介して腫瘍組織に治療遺伝子を運ぶためには、免疫系の補足を最小限に抑えつつ血液中を安定に循環し、腫瘍組織を効率的に認識するようなデリバリーシステムの開発が必要と考えられる。本論文では上記課題を解決するために、遺伝子キャリアの「生体内(血流中)での安定性」および「腫瘍組織認識能」に着目し、新たな非ウイルス型遺伝子キャリア材料の開発を行っている。具体的には、生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)とポリリシン(PLys)のブロック共重合体とプラスミド DNA(pDNA)の間で形成されるポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルを基盤とし、これに化学修飾を施すことによる高機能化を行っている。化学修飾としては「生体内での安定性」を向上させるためにミセル内核のジスルフィド架橋と PEG 重合度の増大に取り組み、「腫瘍組織認識能」を賦与するために環状 RGD ペプチド(cRGD)をミセル表層へと導入している。以下に、各章ごとに対する審査結果の概要を述べる。

第一章の序論では、遺伝子キャリアとしての PIC ミセルの特徴を記述すると共に、腫瘍組織の標的化とその治療に向けて必要とされる機能についてまとめている。腫瘍組織への集積には、**enhanced permeability and retention (EPR)** 効果を利用した受動的ターゲティングとキャリアへのリガンド分子導入に立脚した能動的ターゲティングがあり、両者を組み合わせることの有効性を述べている。また、がんの遺伝子治療に向けては治療遺伝子の選択が肝要であること

を説き、中でも腫瘍組織での血管新生阻害に基づく治療法である血管新生阻害遺伝子療法は、がん細胞そのものではなく、周囲の血管系細胞への遺伝子導入により治療効果が得られることから、有効性が非常に高いことを指摘している。本章では、がんの遺伝子治療実現に向け、治療遺伝子まで含めた合理的なキャリア材料設計指針を提案し、本研究の意義および妥当性を述べている。

第二章では、EPR 効果を介した受動的ターゲティングを向上させるために、ミセルキャリアの構造を安定化すると共に、生体成分との非特異的相互作用を最小限に抑えることを目指した研究がまとめられている。すなわち、ミセルコアへのジスルフィド架橋導入と PEG 重合度の増大を検討している。PEG 重合度を 12000 ないし 17000 とし、PLys のリシン側鎖に対して種々の導入率のジスルフィド架橋型ミセルを調製し、粒子径などの物理化学的評価、培養細胞に対する遺伝子導入効率、蛍光ラベル pDNA を用いた血中滞留性評価、皮下移植膵臓癌モデルに対する血管新生阻害遺伝子療法など、非常に幅広い分野に渡る一連の評価を行っている。そして、ミセルキャリアの血中滞留性は、架橋導入率および PEG 重合度の増大に伴い向上することを実験的に明らかにしている。その一方で、過度な架橋導入は細胞内での遺伝子放出を妨げ、培養細胞への遺伝子導入効率を下げることを示している。それらの結果として、分子量 17000 の PEG を用い、かつジスルフィド基導入率 15% のブロック共重合体から作成したミセルが皮下移植膵臓癌に対して最も高い抗腫瘍効果を有することを示し、架橋導入率の最適値が存在することを *in vivo* 実験からも明らかにしている。

第三章では、腫瘍組織への選択性をさらに高めるために、上述のジスルフィド架橋型ミセルの表層(PEG の先端)に cRGD を導入し、その効果を検証している。cRGD に対する受容体である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現した培養がん細胞に対する遺伝子導入実験においては、cRGD の導入により遺伝子導入効率が 10 倍以上増加することを示している。その理由として、ミセルキャリアの細胞内取り込みが増大することのみならず、細胞内動態までもが制御され、ミセルキャリアの核周辺への集積を加速させるという興味深い効果を挙げている。この加速効果は、PEG 重合度の増大(12000 から 17000)に伴い増幅されることも明らかにし、その原因は、PEG 重合度の増大により受容体を介さない細胞内取り込みが抑制されるためと考察している。さらに、皮下移植膵臓癌モデルに対する実験において、cRGD に基づく腫瘍組織、特に血管内皮細胞への集積性の向上を確認しており、結果として抗腫瘍効果の増強に成功している。同時に腫瘍血管密度の測定も行っており、得られた抗腫瘍効果は血管新生阻害に基づくことも検証している。

第四章では、総括として一連の研究のまとめと展望、そして今後さらに改善すべき遺伝子キャリアの課題についてまとめている。

以上、本論文では、PEG-PLys/pDNA から成る PIC ミセルの PEG 重合度とジスルフィド架橋導入率の制御および cRGD 導入を通じて、「生体内での高い安定性」と「腫瘍組織認識能」を具備した遺伝子キャリアが構築されることを実験的に明らかにしている。また新たな遺伝子キャリア用材料を創製するだけでなく、物理化学的評価から細胞・動物実験に至る一連の実験を行い、最終的には難治性で知られる膵臓癌モデルに対する有意な治療効果を得ている。よって本論文の内容は、その緻密なアプローチや優れた有用性から考えて、バイオエンジニアリングの分野におい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。