

審査結果の要旨

氏名 シルバ ピテラ フレデリコ

siRNA は、その強力な遺伝子発現抑制効果(RNAi)に基づき、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に、その応用が大いに期待されている。しかしながら、現在までに 10 件弱の臨床治験が行われたものの、治療法としていまだ承認を得ていない。その最大の要因は、安全かつ効率良く siRNA を標的とする細胞の細胞質に導入する技術が確立されていないことである。外科手術では治療困難ながんを治療するには、全身投与を介した標的腫瘍組織への siRNA デリバリーが強く求められる。ここで裸の siRNA を投与した場合、1) 血液中の酵素により速やかに分解され、腫瘍組織への到達効率は低くなり、2) また一部が標的細胞に取り込まれたとしても、分解オルガネラであるエンドソーム/リソソームへ運ばれた後に代謝されてしまう。結果として、標的細胞質まで到達できる siRNA 量は著しく低下することになる。よって、全身投与を介した siRNA がん治療を実現するには、siRNA を血中で保護し、腫瘍組織に効率良く集積し、さらにはエンドソームから細胞質へと移行するキャリア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、核酸担持能を有するリン酸カルシウム(CaP)粒子に着目すると共に、「生体内(血液中)での安定性」および「エンドソーム脱出能」を搭載した新たな siRNA 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)と酸性(pH ~5)環境に応答してポリアニオンからポリカチオンへと構造を変化させるチャージコンバージョンポリマー(CCP)のブロック共重合体(PEG-CCP)を合成し、リン酸カルシウム、siRNA の間で、有機-無機ハイブリッドナノ粒子を新規に構築している。これにより、CaP 封入に基づく siRNA 保護、PEG 化 CaP ナノ粒子(< 100nm)によるがんへの集積、CCP に誘起されるエンドソーム膜傷害に基づくエンドソーム脱出が付与され得る。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、siRNA の構造的特徴とその医療応用状況および改善すべき点を記述すると共に、siRNA によるがん治療に向けた血管新生阻害療法、キャリア設計指針についてまとめている。その中で、CaP 粒子は生体由来成分で

あり、かつ siRNA を含むポリアニオン分子の封入が可能であることから、siRNA キャリアとして高い適性を有することが述べられている。一方で、従来の CaP 粒子は凝集しやすく、またエンドソーム脱出機能に乏しいことを改善点として挙げ、それを解決するための方法として PEG-CCP 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、PEG-CCP およびコントロールとして酸性環境応答性を有していない PEG-nonCCP の合成および同定結果がまとめられている。本研究では、ポリアスパラギン酸(PAsp)側鎖にジエチレントリアミン(DET)が導入された PAsp(DET)の 1 級アミノ基に無水 *cis*-アコニチン酸(Aco)を反応させた PAsp(DET-Aco)を CCP セグメントとして合成している。得られた PEG-PAsp(DET-Aco)に対しては、GPC 測定により単分散な分子量分布を、¹H-NMR 測定により定量的な側鎖構造変化を確認している。PEG-PAsp(DET-Aco)は、中性 pH ではポリアニオンとして低毒性かつ安定であるが、エンドソームの様な酸性環境下では *cis*-アコニチルアミドが分解し、ポリカチオン PEG-PAsp(DET)となりエンドソーム膜傷害を惹起することが述べられている。一方、PEG-nonCCP としては、PAsp(DET)の側鎖に無水カルバリリル酸(Car)が導入された PEG-PAsp(DET-Car)を合成している。Car は、Aco の 2 重結合が単結合になった構造を有しており、酸性 pH 応答性が著しく低下することを記述している。

第三章では、調製された PEG-PAsp(DET-Aco)(もしくは PEG-PAsp(DET-Car))/CaP/siRNA ナノ粒子の物理化学的解析結果および培養細胞に対する siRNA デリバリー能がまとめられている。まず、ナノ粒子が調製されたことを、動的光散乱に基づく粒子径および粒子径分布測定と透過型電子顕微鏡観察により確認している。結果として、PEG-PAsp(DET-Aco)濃度 800 μ g/mL 以上での粒子調製を介して、単分散(polydispersity < 0.2)かつ粒子径 100nm 以下の粒子が調製されることを明らかにしている。同様の条件下における siRNA 封入率も定量しており、溶液中の約 80%の siRNA がナノ粒子に担持されたことを明らかにしている。そして、培養細胞実験より、得られたナノ粒子は非常に低毒性であること、siRNA の配列特異的かつ強力な RNAi 活性を有することを明らかにしている。特筆すべきは、共焦点レーザー顕微鏡を用いた siRNA キャリアの細胞内動態観察を通じて、PEG-PAsp(DET-Aco)/CaP/siRNA の優れた RNAi 活性は、設計指針通りのエンドソーム脱出によってもたらされることを実験的に示したことである。蛍光標識 siRNA とエンドソーム/リソソーム染色を介して両者の共局在率を見積もったところ、PEG-PAsp(DET-Aco)によるキャリアは、PEG-PAsp(DET-Car)によるキャリアと比べ、明らかに共局在率が低いことを確認している。

第四章では、ナノ粒子キャリアの *in vivo* 機能(動物実験)についてまとめている。マウスを用いた抗腫瘍効果の実験では、血管新生阻害を誘導する血管内皮増殖因子(VEGF)に対する siRNA をナノ粒子に搭載させることで、難治性として知られる皮下移植膵臓がんモデルに対して、優れた抗腫瘍効果を得ることに成功している。摘出した腫瘍組織における VEGF mRNA 量を定量することで、得られた抗腫瘍効果は、配列特異的かつ有意な RNAi 活性に基づくものであることが示されている。特筆すべき点は、25 μ g siRNA/mouse の 1 回投与により有意な抗腫瘍効果が得られていることであり、これは現在までに報告されている他の siRNA キャリアと比べても、最も優れた効果の一つと考えられる。さらに、ナノ粒子化による siRNA の血中安定化については、*in vivo* 共焦点レーザー顕微鏡による血流観察により証明している。

第五章では、ナノ粒子の保存安定化に向けての検討についてまとめている。CaP 粒子は、特に凝集しやすいことからその保存安定性が懸念事項であった。本章では、PEG-CCP(および PEG-nonCCP)被覆を通じて、CaP 粒子のコロイド安定性が飛躍的に高まり、長期に渡る粒子径の維持に寄与することを明らかにしている。また、凍結-融解 (freeze-thaw) の過程を経ることにより、希釈安定性が有意に高まることを見出した点は非常に興味深い発見である。

最後に総括として、一連の研究結果のまとめと siRNA デリバリーにおける展望についてまとめている。

以上、本論文では、PEG-CCP/CaP/siRNA から成るハイブリッドナノ粒子に基づいて、がんへの効果的な siRNA デリバリーを可能とする優れた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。細胞内動態を制御する高分子材料 PEG-CCP 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がんモデルに対する有意な治療効果を得ることに成功している。よって本論文に記された siRNA キャリア設計指針の意義は、幅広い評価を通じて支持されており、世界的に実用化が期待されている siRNA キャリア開発に、バイオエンジニアリング、特にバイオマテリアル創発の見地から多大な寄与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。