

審査の結果の要旨

氏名 内田 寛邦

遺伝子治療は既存の治療法では治療困難な疾患、特にがん、心疾患、先天性遺伝子疾患の治療を目指して 1700 以上の臨床試験が試みられてきた。これらの臨床試験の大部分はウイルスキャリアで行われているが、ウイルスの不活性化の失敗など事故が報告されたため、ウイルスキャリアの安全性が疑問視されている。そのため、非ウイルスキャリアが注目を集めている。カチオン性高分子と核酸の複合体(ポリプレックス)はそのような非ウイルスキャリアの一つであり、ウイルスキャリアと比較して安全で製造も容易という利点がある。しかし、遺伝子導入効率が未だ低いという問題点も指摘されている。さらに高い導入効率を可能とするカチオン性高分子の開発を目指した研究が進められているが、カチオン性高分子の構造とその導入機構の相関は十分明らかになったとはいえない。申請者はこのような研究背景に基づいてカチオン性高分子の構造と導入機構の相関を明らかにし、さらに高効率なカチオン性高分子の設計の指針を得ることを目指した研究を行った。まず、同一主鎖を有し、側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数のみ異なるポリマーを合成し、それぞれの化学的特性と pDNA 及び mRNA との複合体の細胞への導入機構を生物学的及び化学的手法を用いて解析し、化学構造と導入機構の相関について考察した内容を本学位請求論文としてまとめている。

第一章は序論として、遺伝子治療の現状と今回の研究で内包核酸として使用した pDNA 及び mRNA のそれぞれの特性とアミノエチレン構造の繰り返し構造の遺伝子導入機構における特性について紹介することで、本研究の意義と論点を述べている。

第二章は、アミノエチレン構造の繰り返し構造のみ異なる 4 種のポリカチオンの合成と、その化学的特性の解析についてまとめている。ポリベンジル-L-アスパルタミドの側鎖にアミノリシス反応でエチレンジアミン、ジエチレントリアミン、トリエチレンテトラミン、テトラエチレンペンタミンを導入することで、4 種のポリカチオンを合成する経路が述べられている。この合成法により、同一主鎖同一重合度を有し、側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数のみ異なる 4 種のポリカチオンが得られている。さらに、これらのポリカチオンの pH 応答性を調べるために、滴定と側鎖のモデル化合物のシミュレーションを行っている。滴定とシミュレーションの結果は良い相関を示し、pH 1~14 での側鎖のプロトン化状態の評価が合理的に示されている。これらの結果より、以後の pDNA と mRNA の導入機構を側鎖のプロトン化状態から考察することが可能となった。

第三章は、4 種のポリカチオンによる pDNA 導入についてまとめている。pDNA 導入において、4 種のポリカチオンは側鎖のアミノエチレン構造の繰り返し数において偶奇性を示すことが見出されている。すなわち、偶数のアミノエチレン構造を有するポリカチオンは明らかに奇数のものよりも高い遺伝子導入効率を示した。この導入効率の偶奇性は、側鎖の偶数のアミノエチレン構造が、エンドソーム環境応答的に細胞膜傷害活性を上昇させ、エンドソーム膜を不安定化することで、ポリプレックスのエンドソームからの脱出を促進

させるためであると考察している。また、この環境応答的な細胞膜傷害活性の上昇は、これらの側鎖が細胞外環境(pH 7.4)からエンドソーム内環境(pH 5.5)に下がるとプロトンを受容し、高荷電密度な構造であるジプロトン化ジアミノエタン構造を形成するためであることを上述のシミュレーションの結果から考察している。この特異的なプロトン化構造のエンドソーム脱出への寄与は今まで報告がなく、pDNA 導入に適したポリカチオンの設計において重要な知見が得られたと結論づけている。

第四章は、4種のポリカチオンによる mRNA 導入についてまとめている。3回のアミノエチレン繰り返し構造を有するポリカチオンと mRNA から作成したポリプレックスを導入した細胞は他のポリプレックスを導入した細胞よりも高い発現を示すことが見出されている。これは繰り返し数3回のポリカチオンが細胞質内で内包 mRNA の分解を抑制し、発現の持続性を高めているためであることが、共焦点顕微鏡観察から示唆されている。これより、同ポリカチオンは mRNA と緊密なポリプレックスを形成することで、内包 mRNA 分解を効率的に抑制していると考察している。また、ポリプレックスの緊密度はポリカチオンの側鎖の電荷密度及び立体障害と相関することも確認されている。なお、この構造依存的な RNase による分解の抑制と、mRNA 発現持続性との因果関係の証明はこれまで報告されていない全く新しい知見である。mRNA の発現持続性が短いことは mRNA 導入の実用化に向けた問題点の一つである。今回の研究では、最適設計されたポリカチオンにより、mRNA からのタンパク発現の持続性を延長させることに成功しており、この問題点を解決する方法論を提供するものと評価される。

第五章は総括であり、効率の良い pDNA 及び mRNA 導入を実現するために、ポリカチオン構造に要求される機能と化学的構造・特性についてまとめている。

以上のように、本論文ではカチオン性高分子を用いた pDNA 及び mRNA 導入において、高い導入効率を得るための高分子構造と細胞内メカニズムとの相関関係が、一連の実験から実証されており、遺伝子・核酸医薬治療に最適なバイオマテリアルとしてのポリカチオンの分子設計に向けた有益な知見が得られている。

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。