

審査の結果の要旨

氏名 グウダ ノハ マンドウ

遺伝子(例: plasmid DNA, pDNA)及び核酸医薬(例: small interfering RNA, siRNA)は、それぞれ配列に応じて特定遺伝子の発現を up regulation もしくは down regulation することから、がんなどの難治性疾患の治療薬として実用化が期待されてきた。しかし、いまだに米国 FDA(及び我が国)で承認された遺伝子治療薬・siRNA 医薬はない。その最大の要因は、安全かつ効率良く標的とする細胞内に遺伝子・核酸を導入する技術が確立されていないことである。よって、それらを効率良く細胞内にデリバリーするためのキャリア開発に注目が集まっている。遺伝子・核酸キャリアに必要とされる主な機能として、1)遺伝子・核酸の酵素分解を防ぎつつ、生体内で安定にデリバリーし、2)標的とする細胞に取り込まれた後に、分解オルガネラであるエンドソーム/リソソームを回避して細胞質(もしくは核)へと移行し、3)最終的には遺伝子・核酸を放出する機能が挙げられる。本論文では、上記機能を備えたキャリアを開発するために、pDNA もしくは siRNA とポリカチオンの間で形成されるポリイオンコンプレックス(PIC)に着目し、さらに PIC の問題点である生体内での安定性の低さを改善する方法論としてシリカによる PIC 被覆を提案している。具体的には、表面が正に帯電した pDNA ないし siRNA 封入 PIC を調製し、それをケイ酸溶液と混合することで PIC 表面に負に帯電したシリカ被覆層を形成させ、PIC の構造安定化を図っている。シリカ被覆により、PIC の構成成分であるポリカチオンと生体成分(主に負に帯電)との非特異的相互作用が抑制され、PIC の解離が大きく抑制されることが期待される。その一方で、シリカとケイ酸との間の平衡により、希釈環境下ではシリカ被覆層は徐々にケイ酸イオンへと溶解し、細胞内での遺伝子・核酸放出を妨げないものと考えられる。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、pDNA と siRNA の構造的特徴とその医療応用に向けた可能性および克服すべき点を論ずると共に、キャリアの設計指針についてまとめている。特に、キャリアの候補として PIC に注目し、その長所として、構成成分であるポリカチオンの多様なデザインに基づく PIC 機能化への高いポテンシャル及び調製の容易さを述べている。一方、改善すべき課題として生体内での

低い安定性を指摘しており、これを解決するための方法論として水溶性シリカゲルによる PIC 被覆を提案し、シリカの基礎物性や安全性と共に本研究の意義及び妥当性を述べている。

第二章では、PIC のシリカ被覆による機能化(安定化)を実証するために、pDNA とポリアルギニン(PArg)の間で PIC を調製し、そのシリカ被覆を行っている。PIC とケイ酸溶液を混合した後のケイ酸(イオン)分子の減少からシリカの形成を確認し、また PIC の粒子径の増大及び表面(ζ -)電位の正から負への反転に基づき、シリカによる PIC 被覆を確認している。そして、ポリアニオンであるデキストラン硫酸との混合後の pDNA 放出挙動から、シリカ被覆による PIC の可逆的安定化を検証している。すなわち、シリカ被覆なしの PIC はデキストラン硫酸の添加により pDNA を放出し、PIC が解離することが確認されるが、シリカ被覆した PIC は pDNA を放出しなかったことから、PIC 構造の安定化が示された。加えて、シリカ被覆した PIC を透析処理した後に同様の実験を行ったところ pDNA の明らかな放出が検出されたことから、シリカとケイ酸の間の平衡に基づき、シリカ被覆層が溶解することが示唆された。さらに、培養細胞に対してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、シリカ被覆なしの PIC に比べ、シリカ被覆した PIC は 1 桁近く高い遺伝子導入効率を達成した。よって、シリカ被覆による PIC の可逆的安定化が可能であり、また pDNA キャリアの性能向上に寄与することが示された。

第三章では、シリカ被覆の方法論を siRNA 封入 PIC へと拡張している。siRNA は、遺伝子改変を惹起しないことから遺伝子と比べてより実用性の高い核酸医薬として期待されている反面、安定なキャリア調製がより困難であることも知られている。よって、シリカ被覆の方法論が効果的に活用され得ることを強調している。PArg を用いた場合、siRNA の間で均一な PIC が調製されなかったため、ここではポリエチレングリコール(PEG)と側鎖に安定化ユニット(メルカプトプロピルアミジン(MPA))が導入されたポリリシン(PLL)のブロック共重合体 PEG-PLL(MPA)を用いて siRNA 封入 PIC ミセルを調製し、そのシリカ被覆を行っている。PArg/pDNA の PIC と同様に、siRNA 封入 PIC ミセルも粒子径の増大及び ζ -電位の反転が観察されたことからシリカ層形成を確認している。加えて、PIC 表面でのシリカ層形成に関するより直接的な証拠を得るために、走査透過電子顕微鏡(STEM)法を用いて元素分析を行い、シリカ由来のケイ素と siRNA 由来のリンが共局在していることを実証している。また、pDNA 封入 PIC と同様に、siRNA 封入 PIC ミセルもシリカ被覆に基づいて可逆的に安定化されること、及び培養細胞に対する RNAi 活性が有意に向上することを確認している。さらに、シリカ層形成に伴う RNAi 活性向上のメカニズムについて詳細な解析を行っている。考えられる主な可能性として、siRNA の細胞内取り込み量の増加と細胞

内動態の改善の二つが挙げられることから、蛍光標識 siRNA を用いて、それぞれに関して検証している。取り込み量に関してはシリカ被覆の有無で大きな差が見られなかったことから、細胞内動態に焦点を当て、シリカ被覆された PIC はエンドソーム/リソソームに集積しにくいことを明らかにしている。これを説明する仮説として、過去のシリカ粒子に関する研究を引用しつつ、i)シリカ層自体にエンドソーム膜を選択的に壊す作用があること、及び ii)マクロピノサイトーシス経路を介した細胞内移行を挙げている。特に ii)に関して、マクロピノサイトーシス経路により取り込まれた高分子物質はリソソームに送達されない可能性が指摘されていることを考慮し、核酸デリバリーに有利な取り込み経路であることを主張している。実際に培養細胞を用いた取り込み阻害実験を通じて、シリカ被覆された PIC ミセルは、シリカ被覆なしの PIC ミセルと比べ、マクロピノサイトーシスを介した細胞内移行量が有意に増加することを実証している。

第四章では、総括として一連の研究結果をまとめると共に、遺伝子・核酸デリバリーにおける展望について述べている。

以上、本論文では、シリカ被覆という方法論に基づいて、PIC の可逆的な構造安定化と効果的な遺伝子・核酸デリバリーが可能になることを実験的に明らかにしている。シリカ被覆層の形成を確認するための物理化学的評価に加え、培養細胞を用いた細胞内取り込み量・細胞内取り込み経路・細胞内動態に関する詳細な解析を行い、シリカ被覆に誘起される特異的な細胞内取り込み経路と細胞内動態を見出している。本論文に記された遺伝子・核酸キャリア設計に関する方法論は、難治性疾患の治療薬として世界的に囑望されている遺伝子治療薬・核酸医薬開発に有意義な知見を与え、バイオマテリアル分野において大きく貢献したものと認められる。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と判断される。