

審査の結果の要旨

氏名 武元 宏泰

siRNA は、配列特異的に遺伝子発現抑制 (RNAi) 効果を誘起することから、核酸医薬として注目されている。siRNA 医薬の実用化には、その効果を最大限に高めるドラッグデリバリーシステム (DDS) が必要となる。核酸 DDS の手法として、siRNA を化学修飾するコンジュゲート体の開発があり、核酸デリバリーに必要とされる機能を siRNA に直接付与できる利点がある。しかし、siRNA コンジュゲート設計に関するマテリアル工学上の知見は不足しており、合理的な設計指針及び合成法は確立されていない。本研究では、その課題を解決するために「高い RNAi 効果と低い免疫原性を両立する siRNA コンジュゲートの設計指針の確立」と「高い生産性を有する合成法の開発」を目的に掲げている。以下、各章毎に、本論文の審査結果の概要を述べる。

第 1 章では、siRNA 医薬開発の背景、及び本研究の目的とその方法論を説明している。具体的な方法論として、ポリイオンコンプレックス (PIC) の高機能化に向けた siRNA コンジュゲート設計を述べている。一般に、PIC 形成により核酸の細胞取り込みは増大し、高い薬理活性が期待される。しかし、単量体 siRNA あたりの負電荷数は、安定な PIC を得るには少ない。そこで、複数の siRNA を共有結合で繋げ、高分子 1 本あたりの電荷数を増大させた siRNA コンジュゲート高分子を提案している。これに関して、siRNA を直鎖状に繋げると構造が長鎖 2 本鎖 RNA に類似し、免疫応答が懸念されることから、ポリマーの側鎖に siRNA をグラフト導入する方法論の有効性を述べている。一方で、siRNA コンジュゲート合成時のカップリング効率の低さを指摘し、その改善は産業化に向けて重要であると述べている。そこで、カップリング分子同士の衝突頻度を増大させる凍結濃縮法に着目している。以上より、目的実現に必要なコンジュゲート体の設計指針および合成法を提案し、本研究の意義を明確に述べている。

第 2 章では、実際に siRNA グラフト共重合体を合成し、その RNAi 効果と免疫原性を評価している。合成に関しては、親水性かつアニオン性のポリアスパラギン酸 (PAsp) を主鎖に選択することで、水中での反応を容易にし、またグラフト共重合体 1 分子の負電荷数のさらなる増大を図っている。一方、RNAi 効果を得るには、細胞内で単量体 siRNA を遊離する機能が求められる。そこで、

細胞内還元環境に応答して開裂するジスルフィド (SS) 結合を PAsp と siRNA のリンカーとして選択している。そして、得られた SS 型コンジュゲートを用いて PIC 調製を行い、単量体 siRNA からなる PIC に比べて有意に高い RNAi 効果を確認している。さらに、SS 型コンジュゲートの PIC は有意な免疫応答を誘起しないことも確認している。以上より、siRNA グラフト共重合体の構造は高い RNAi 効果と低い免疫原性を両立することを実証している。

第 3 章では、siRNA コンジュゲートの新規合成法を開発し、その反応率の改善を検討している。第 2 章で述べた SS 型コンジュゲート合成では、約 70% の siRNA が未反応物として残存している。そこで、本章ではカップリング分子の衝突頻度を増大させる方法論として凍結濃縮法を行っている。これは溶液の凍結融解過程において溶質分子の濃厚溶液相が一時的に形成される現象に基づいている。実際に、反応系のモデルとして siRNA とポリエチレングリコール (PEG) のコンジュゲート体を合成する際に、一度、反応系を -30°C で凍結し、 4°C で融解させるという単純な処置を介して、系中の 95%以上の siRNA が PEG とカップリングできることを実証している。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章の知見に基づき、収率の高い siRNA グラフト共重合体の設計を行っている。この際に、SS 結合は血中での安定性に欠けるといふ弱点が挙げられることから新たなリンカーを検討している。具体的には、エンドソーム内の酸性 pH に応答するように、酸性条件下で加水分解されるマレイン酸アミド (MAA) を主鎖と siRNA のリンカーとして採用している。実際に、凍結融解法を用いて、siRNA が MAA を介してグラフト導入されたコンジュゲート体を合成することで、siRNA 換算で 98%の優れた反応率を達成している。得られた MAA 型コンジュゲートによる PIC は、SS 型と同様に、単量体 siRNA の PIC に比べて有意に高い RNAi 効果を示している。

第 5 章は総括として、一連の実験結果及び今後の siRNA コンジュゲート開発の展望についてまとめている。

以上、本研究では siRNA コンジュゲートの開発を通じて、高い RNAi 効果と低い免疫原性を実現する材料設計指針を明らかにし、また高い生産性を有する合成法の開発に成功している。本論文の内容は、その独創的な方法論で新規 siRNA コンジュゲートを構築し、その有用性を物理化学/生物学的評価を通じて示している。本研究の成果は、ポリマーコンジュゲートというマテリアル工学的視点に立脚したプロセスを新たに導入し、siRNA 医薬の実現に大きく寄与す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。