

審査の結果の要旨

氏名 前田 芳周

Small interfering RNA (siRNA)は、がんや感染症等の遺伝子関連疾患に対する新たな治療薬として注目されている。一方で、siRNA の生体内での安定性の低さおよび細胞内取り込み効率の悪さが臨床応用への障壁となっている。そこで、これらの問題を解決する siRNA キャリアの研究が盛んに行われている。本論文では、臨床応用可能な siRNA キャリアの開発を目指し、古くから核酸キャリアとして利用されてきたリン酸カルシウム (CaP)粒子に注目し、これと合成高分子からハイブリッドミセル型 siRNA キャリアを構築し、その機能評価とさらなる機能改善を行うべく研究を進めている。以下、各章ごとに審査の概要を述べる。

第一章は、序論として siRNA の作用機序や siRNA 医薬開発の現状、および酸性環境に応答して膜傷害性を示す電荷反転型ポリアニオン (CCP)とポリエチレングリコール (PEG)のブロック共重合体 (PEG-CCP)と CaP 粒子の間で構築されるハイブリッドミセルを siRNA キャリアとして応用することの意義や有用性について述べている。

第二章は、siRNA 内包ミセルの *in vitro* と *in vivo* における機能評価を行っている。蛍光相関分光法 (FCS)による細胞内外におけるミセルの安定性評価から、ミセルが細胞外環境では安定だが、疑似細胞質液中では速やかに siRNA を放出するという結果が得られている。また、腫瘍増殖抑制を目的として、血管内皮増殖因子 (VEGF)に対する siRNA (siVEGF)内包ミセルを調製し、皮下移植腫瘍がんモデルに対する抗腫瘍効果を検討している。全身投与された siVEGF 内包ミセルは、同様に投与された非治療用 siRNA (siScr)内包ミセルと比較し、有意に腫瘍増殖を抑制した。これは、siRNA をミセルに内包することで腫瘍まで安定に送達され、腫瘍内で VEGF mRNA 発現量を低下した結果と一致しており、ハイブリッドミセルが siRNA 送達システムとして優れたプラットフォームであることが示されている。

第三章では、より臨床症状に近い腫瘍モデルとして、腫瘍部位にルシフェラーゼ (Luc)を発現する自然発症腫瘍がんモデルを用いて、ハイブリッドミセルの遺伝子発現抑制効果の検討が行われている。全身投与された siLuc 内包ミセルは siScr 内包ミセル投与群と比較し、顕著に腫瘍由来の発光を抑制した。また、全身投与されたハイブリッドミセルは、肝毒性や腎毒性の指標となる血液パラメータ値および血中サイトカイン量に影響を与えなかったことから、有意な生体毒性を示さないことも確認された。これまで自然発症がんモデルを用いて siRNA の遺伝子発現抑制効果を検討した報告がないことから、ハイブリッドミセルのがん治療用全身投与型 siRNA キャリアとしての将来性の高さが示されている。

第四章では、前章まで用いていた PEG-CCP の酸加水分解速度を速めることにより、ハイブリ

ッドミセルのエンドソーム脱出能が向上されるものと考え、酸加水分解速度の速い新たな CCP として 2-pronionic-3-methylmaleic amide (PMM)を導入したブロック共重合体を合成し、ハイブリッドミセルに応用している。合成された新規 PEG-CCP (以下 PMM)は、エンドソーム内 pH を模した条件である pH 5.5 において従来の PEG-CCP (以下 ACO)と比較し、迅速な酸加水分解を示した。そして、PMM を用いて調製されたミセル (PMM ミセル)は従来のミセル (ACO ミセル)と比較し、低濃度で顕著に高い遺伝子発現抑制効果を示した。両ミセルの細胞内取り込み量に差が見られない一方で、PMM ミセルのエンドソーム脱出効率は ACO ミセルよりも有意に高いことが共焦点顕微鏡による細胞内動態観察から示された。よって、PEG-CCP の酸加水分解速度を速めることによるハイブリッドミセルのエンドソーム脱出能の向上が実証されている。

第五章では、より効果的ながん治療用 siRNA キャリアの構築を目指し、第四章で設計された PMM ミセルへ腫瘍選択性を賦与すべく、多様な腫瘍で過剰発現している $\alpha_v\beta_{3/5}$ インテグリンへ高い親和性を有する環状 RGD ペプチド (cRGD)をミセル表層へと導入している。cRGD が導入された PMM ミセルは、cRGD 非導入ミセルと比較し、 $\alpha_v\beta_{3/5}$ インテグリン発現培養がん細胞に対して有意に高い遺伝子発現抑制効果を示し、PMM ミセルのさらなる機能向上に成功している。

第六章は総括であり、一連の結果を整理するとともに、がん治療用全身投与型 siRNA キャリア開発に関する本研究の意義と将来展望について述べている。

以上、本論文では効率良くかつ安全な siRNA キャリア開発のために、合成高分子の精密設計が全身投与型 siRNA キャリアの機能に及ぼす影響を動物実験を含めて実証しており、実用的意義のみならず当該研究分野に対する有益な知見を提示している。

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。