

審査の結果の要旨

氏名 林 光太郎

Small interfering RNA (siRNA)は、遺伝子抑制作用を誘起することから難治性疾患への新たな治療薬として注目されているが、siRNA の生体内での安定性の低さが治療応用の妨げとなっている。そこで、siRNA を保護して標的組織へ送達する siRNA キャリアの研究が盛んに行われている。そのキャリアデザインとして広く受け入れられている手法の一つに、siRNA をカチオン性高分子と静電相互作用させ、ポリイオンコンプレックス(PIC)化するものがあげられる。本論文では、ポリエチレングリコール(PEG)-ポリアミノ酸ブロック共重合体の精密構造設計により、会合数が厳密に制御された最小単位の PIC (uPIC)が構築され、その構造及び siRNA キャリアとしての機能に関する研究が行われている。以下、各章ごとに審査の概要を述べる。

第一章は序章として、siRNA の構造的及び生物学的特徴や siRNA 医薬の現状、siRNA キャリアとしての PIC の位置付けを踏まえて、PIC の形成メカニズムを通じた uPIC の定義と siRNA キャリアとして利用することの意義や有用性を述べている。

第二章は、uPIC の形成条件を PEG の分子量及び RNA の構造から検討している。カチオン性高分子として PEG-ポリリシン(PEG-PLL)を用い、一本鎖 RNA ないし二本鎖 RNA (siRNA)との PIC 形成挙動を分析超遠心(AUC)と蛍光相関分光法(FCS)を用いて比較している。その結果、一本鎖 RNA では uPIC が臨界濃度以上で二次会合挙動を示すが、siRNA からは広い濃度領域で uPIC のまま存在するという結果が得られている。PEG の分子量を変化させても、この傾向に変化は見られず、uPIC の選択的な形成には siRNA の剛直な二本鎖構造が重要であることが示されている。

第三章は、uPIC の形成条件をより詳細に検討するため、PEG-PLL の電荷数の観点から uPIC の構造を評価している。PLL 鎖の電荷数(すなわち重合度)を siRNA の負電荷数の 1/2 から 2 倍まで調節し、siRNA との間で形成された uPIC の構造を AUC と FCS で解析することで、重合度により uPIC の会合数が制御されることを明らかにしている。特に、重合度が siRNA の電荷数の約数、同数、または倍数であるときには、PEG-PLL 由来の正電荷と siRNA 由来の負電荷が釣り合う最小会合数かつ単一成分の uPIC ができることが示されている。

第四章は、*in vivo* における uPIC の機能評価を行っている。siRNA uPIC の生体内での安定性に関しては血中滞留性を通じて比較検討しており、安定な siRNA キャリアを得るための PEG-PLL 重合度の最適化を行っている。また、過剰量の PEG-PLL を uPIC とともに投与すると、過剰量の PEG-PLL と uPIC 中の PEG-PLL の間で動的な置き換わり反応が生じて、siRNA uPIC の血中滞留性が顕著に向上することが明らかにされている。最適化された uPIC について、リポソーム製

剤などが到達しにくいとされる膵臓がんの皮下腫瘍モデルマウスに対して、顕著な腫瘍集積性が示された。さらに治療用 siRNA を搭載した uPIC の投与により、非治療用 siRNA 搭載 uPIC の投与や生理食塩投与に比べ、有意に高い遺伝子抑制作用及び抗腫瘍効果が得られている。これらの結果は、uPIC が siRNA キャリアとして高い可能性を有することを示している。

第五章では、siRNA の構造(具体的にはリン酸基の配置)に空間的にマッチするカチオン性ポリアミノ酸が高い安定性を有する uPIC を形成すると仮説を立て、リシンと同じく一級アミンを有するカチオン性ポリアミノ酸として PEG-ポリ(アミノアルキルグルタミド)および PEG-ポリオルニチン(PEG-PLO)を合成し、ポリアミノ酸側鎖構造の最適化を行っている。まず AUC と FCS による構造解析を通じて、新たに合成されたブロック共重合体も PEG-PLL と同様に uPIC を形成することを確認している。得られた uPIC の安定性をポリアニオンとの置き換わり反応の観点で評価した結果、アミノ基間のスペーサーが最も短い PEG-PLO から成る uPIC が最も高い安定性を示すことを明らかにし、その妥当性については RNA 構造の分子モデルに基づいて考察している。また PEG-PLO uPIC は、PEG-PLL uPIC と比較して少量のポリマーで優れた血中滞留性を示すことを明らかにしており、siRNA キャリアとして実用的観点での改善に成功している。

第六章は総括であり、一連の結果を集約するとともに、荷電性高分子の会合挙動の研究及び PIC による siRNA キャリアの研究に関して本研究の意義と将来展望について述べている。

以上、本論文は、uPIC の調製条件を確立すると共に、生物活性に至る一連の評価を通じて優れた血中滞留性及び腫瘍集積性を有する uPIC の構築に成功しており、バイオエンジニアリングに関する研究分野、さらには今後の siRNA キャリア開発に対して非常に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。