

審査の結果の要旨

氏名 武田 香織

本論文は、全身投与型遺伝子治療の臨床応用実現に向け、構造制御および構造安定性確保の観点より、ポリプレックスミセル (PM)型遺伝子キャリアの設計指針を与えることを目的とするものである。以下、章ごとにその内容を解説し、本論文の審査結果を述べる。

第1章は序論であり、PM型遺伝子キャリアの概説がなされている。特に本論文で取り上げるポリエチレングリコール(PEG)とポリ(L-リシン) (PLys)からなるブロック共重合体 (PEG-PLys)がプラスミドDNA (pDNA)と形成するPMに関し、先行研究で明らかとなったロッド状構造体の形成機構を詳細に述べている。また、現状の課題として、PM中へのpDNA凝縮の形態制御法が確立されていないことや、PMの血中安定性が十分得られていないことを述べている。

第2章では、PEG-PLysによるPM中へのpDNAの凝縮に関し、ロッド状凝縮体の他にグロビュール状凝縮体が形成される場合があることに着目し、二つの凝縮構造の違いや形態制御因子を明らかにしている。凝縮構造の違いは、DNAの一本鎖部分を選択的に切断する酵素を用いた実験により示している。酵素反応後の電気泳動パターンより、ロッド状凝縮体はDNA二重鎖の秩序高い折りたたみ機構によって形成されるのに対し、グロビュール状凝縮体はDNA二重鎖が非局所的に一本鎖に解離する機構によって形成されることを明らかにしている。また、形態制御因子について、凝縮開始時点のDNA上のPEG密度に着目して解明している。具体的には、PEG分子量とPLys重合度をそれぞれ変化させることでpDNA上のPEG密度を変化させ、各組成におけるグロビュール形成率を、透過型電子顕微鏡 (TEM)像から得られる形態を基に統計的に解析している。次に、超遠心分離を用いた手法により定量したpDNAへのポリマー会合本数から、凝縮開始時点のpDNA上のPEG密度を算出し、グロビュール形成率との相関を検討している。その結果、PEG密度とグロビュール形成率の間に明確な相関を見出し、凝縮開始時点のpDNA上で隣接PEG鎖同士に隙間がある状態からはグロビュール状凝縮体が、PEG鎖同士が重なり合う状態からはロッド状凝縮体が主に形成されることを明らかにしている。以上よりロッド/グロビュールの形態制御因子を見出した上で、ロッド状凝縮体の形成はグロビュール状凝縮体と比較して時間をかけて進行することを示し、PEGの立体反発による構造形成の違いが凝縮構造の違いを生むと動力学の観点から説明している。

第3章では、無細胞遺伝子発現系を用いた評価により、PM構造が遺伝子発現効率に与える影響を検討している。第一に、同様のロッド状形態で表層のPEG密度が異なるPM間で遺伝子発現を比較し、PM表層のPEG密度がある閾値以上となる場合には遺伝子発現が有意に抑制されることを明らかにしている。これは高密度のPEGが転写因子のpDNAへの結合を阻害するためと考察している。第二に、閾値以下のPEG密度で形態の異なるPM間で遺伝子発現を比較し、ロッドの形成率が高いほど遺伝子発現効率が高いとの相関を明らかにしている。加えて、転写効率でも同様の相関を示している。これに関し第2章で明らかにしたように、グロビュール状凝縮体内部ではDNA二重鎖が非局所的に解離していることで、転写因子によるプロモーター領域の認識が阻害されたことが主な要因となっているものと考察している。以上より、ポリマー組成の適切な選択によってPM構

造を制御することが、高い遺伝子発現効率を得るためには不可欠であると結論づけている。

第4章では、ロッド状に形態制御されたPMが血管内相当のせん断応力から受ける影響について、回転レオメーターを用いて検討を行っている。具体的には、TEM観察および超遠心分離を用いたポリマー会合本数の定量により、血管内相当のせん断応力によってポリマーが引き剥がされ、PMが構造変形することを見出している。さらに、これらがPM中のpDNAのDNA分解酵素耐性をも損なうことを示している。続いてこの対策として、PMコアにジスルフィド架橋を導入することによる構造安定化を試みている。PEG-PLysのLys側鎖のアミノ基に、49%の導入率で2-イミノチオランを導入したポリマーを合成し、これを用いて架橋導入PM(CPM)を調製している。CPMでは、上述のようなせん断応力によるポリマーの引き剥がしが回避され、せん断応力下でのDNA分解酵素耐性が著しく向上することを示している。以上より、ジスルフィド架橋の導入は血管内相当のせん断応力下でのPMの構造安定性の確保に有効であると結論づけ、これによって血管内でのPMの安定性向上も見込まれると述べている。

第5章では、架橋導入によるせん断応力耐性向上が、*in vivo*での血中安定性に反映されるか否かを検証している。マウスに尾静脈投与したPMとCPMの血中滞留プロファイルを*in vivo*共焦点顕微鏡を用いて観測し、CPMの血中安定性がPMに対して格段に向上したことを示している。さらに、PMの血中消失プロファイルが、*in vitro*で評価したせん断応力によるPMの構造変化の時間依存と連動していることを示し、せん断応力による構造不安定化がPMの急速な血中消失の一要因となっていることを裏付けている。また、ヒト膵臓腺癌由来細胞(BxPC3細胞)を用いた*in vitro*の実験により、せん断応力を受けたPMは、トランスフェクション効率も低下することが示されている。一方、CPMではせん断応力負荷後も遺伝子発現の有意な低下は確認されず、架橋導入による構造安定化が遺伝子発現能の保持につながることも示されている。さらに、BxPC3細胞の皮下移植マウスを用いた実験では、血管新生を阻害する可溶性VEGF受容体を発現するpDNAを内包したCPMを尾静脈投与した場合、同じpDNAを内包したPMと比較して有意に高い抗腫瘍効果が得られたことが示されている。以上より、全身投与型の遺伝子治療において治療効果を得るためには、PMのせん断応力下での構造安定性を向上させることで、血中安定性および遺伝子発現能を保持することが不可欠であると結論づけている。

第6章は総括であり、本論文のまとめと、将来の遺伝子キャリア開発における設計指針が述べられている。

以上のように本論文は、PM設計から全身投与による遺伝子治療効果までを俯瞰した内容となっており、PM型遺伝子キャリア設計における構造制御、および*in vivo*での構造安定性確保の重要性を提示するとともに、その達成に向けた具体的指針が示されている。構造制御に関しては、DNA二重鎖の解離度に着目した報告はこれまでに存在しておらず、生体高分子たるDNAをマテリアルの見地から取り扱った研究成果として秀抜である。また構造安定性に関しては、血管内のせん断応力が遺伝子キャリアに与える影響について初めて提言しており、全身投与型遺伝子キャリアの開発を大きく前進させる見識を与えるものである。以上より本論文は、マテリアル工学の見地からの独創的なアプローチにより、今後の遺伝子送達システム開発の礎となる重要な知見を提供したものと判定される。

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。