

## 審査の結果の要旨

氏名 トッカーリー セオフィルス アグリオス

全身投与による遺伝子治療を可能とする遺伝子送達システムの開発には大きな期待が寄せられている。これには、生体内の異物認識機構に捕捉されずに標的組織に移行するステルス特性が求められ、キャリア表層をポリエチレングリコール (PEG) で被覆する PEG 化が有効な戦略として第一選択となっている。PEG の被覆程度は、遺伝子キャリアの体内動態に大きな影響を及ぼすと考えられるものの、PEG の密度はこれまで求められておらず、血中滞留性に対する PEG の具体的な効果は明らかとなっていない。さらに、PEG は遺伝子キャリアに内包されるプラスミド DNA (pDNA) のパッケージング形態にも影響を与えると推察されるものの、その具体的な理解は進んでいない。本研究は、高分子ミセル型遺伝子キャリアの PEG 密度を定量することによって、PEG 密度と血中滞留性との相関のみならず、pDNA パッケージング構造決定に寄与する因子を明らかにし、最適な遺伝子キャリア構築への材料設計指針を提示することを目的としている。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、遺伝子治療とそれを可能とする遺伝子キャリア開発の背景、特に PEG-カチオン性連鎖からなるブロック共重合体と pDNA との自己会合により形成される遺伝子内包高分子ミセル (ポリプレックスミセル) の開発を概説するとともに、pDNA は複数回折り畳まれた束状にパッケージングされたロッド状構造を形成するという量子化折り畳み則を説明している。さらに、ポリプレックスミセルにおける PEG の役割について、機能、構造の両面から課題を指摘し、本論文の意義を述べている。

第 2 章では、PEG 密度の算出方法を述べている。具体的には、分子量 12,000 の PEG と poly(L-lysine) からなるブロック共重合体 PEG-PLys と pDNA とが形成するポリプレックスミセルに対し、pDNA の量子化折り畳み則を基に、パッケージングされた DNA 表層の面積を算出し、そこに超遠心分析で求めた PEG 本数を考慮することによって、PEG 密度を定量している。その結果、PEG 密度は PLys 重合度に依存し、70 量体 (PLys70)、39 量体 (PLys39)、19 量体 (PLys19) の順に密度が高まることを見出している。さらに、得られた密度を基に PEG のコンフォメーションを議論し、PLys70 量体では mushroom コンフォメーションをとること、PLys39、PLys19 では squeeze コンフォメーションをとること

を予想し、その妥当性を cryo-TEM 観察より確認している。

第 3 章では、PEG 密度とポリプレックスミセルの血中滞留性との相関を評価している。血中滞留性は  $PLys19 > PLys39 > PLys70$  と  $PLys$  鎖長に大きく依存することを見出し、この結果を第 2 章で求めた PEG の密度、コンフォメーションを基に議論している。

第 4 章では、ポリプレックスミセルの構造的側面に注目し、自由エネルギーの観点から理解することを試みている。具体的には、 $pDNA/PLys$  ポリプレックスと水との界面に発生する表面自由エネルギーを収縮項、それに対し DNA の剛直性と PEG の立体反発とが反収縮項として釣り合っているとのモデルを提案している。特に、PEG の立体反発として、PEG に起因する浸透圧、ならびにコンフォメーションが規制されることで生じるエントロピー損失の寄与を挙げている。これにより、 $PLys$  鎖長に対するロッド状構造の長軸長と PEG 密度との相関を合理的に説明している。さらに、この提案の妥当性を確認するために、ポリプレックスミセルから PEG が脱離する実験系を立ち上げ、PEG の減少によりロッド状からグロビュール状への構造転移を認めることで、上記自由エネルギー論の妥当性を導いている。

第 5 章では、第 4 章で論じたロッド構造にかかる自由エネルギー論を基に、DNA の剛直性を無くすことによって、原理的に最小のサイズ、かつ高い PEG 密度を有するグロビュール構造を形成させうることを示している。さらに、これにジスルフィド架橋を導入させたポリプレックスミセルを用い、膵臓がんモデルマウスに対し、全身投与によって腫瘍深部に遺伝子発現させることに成功し、ポリプレックスミセルのサイズと腫瘍浸透性を議論している。

第 6 章は総括として、一連の結果を整理するとともに、遺伝子キャリア開発に対する本論文の意義と展望をまとめている。

以上、本論文ではポリプレックスミセルの PEG 密度を定量することによって、血中滞留性との相関を明確化するとともに、ロッド型ポリプレックスミセル構造決定にかかる因子を自由エネルギーの観点から理解している。これにより、ポリプレックスミセル構造を材料工学的に自在に操る指針が確定され、ロッド型ポリプレックスミセルのみならず、PEG 密度が高く、原理的に最小サイズとなるグロビュール型ポリプレックスミセルをも構築させるうることを示している。本研究の成果は、ポリプレックスミセルに材料工学に立脚した設計指針を新たに導入するもので、遺伝子キャリア開発を加速化することで遺伝子治療の実現に大きく寄与すると判断される。

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。