

審査の結果の要旨

氏名 内藤 瑞

配列特異的にメッセンジャーRNAの分解を誘導する短い二本鎖核酸(siRNA)を薬として医療応用するためには、標的細胞へのデリバリー技術の開発が必要不可欠である。本論文では、siRNAのデリバリーキャリアとしてポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルに着目し、これにフェニルボロン酸(PBA)基を導入することで細胞内外のATP濃度差に応答するスマートキャリアを創製している。以下、各章ごとに概要を述べる。

第一章では、序論としてsiRNAの生体内での機能や既存のsiRNAデリバリー技術、中でもsiRNA内包PICミセルの現状についてまとめている。また、*cis*-ジオール構造と特異的かつ可逆的な結合能を示すPBAの物性や応用について述べ、最後に本研究全体の概要を述べている。

第二章では、PBA基を導入した高分子の合成法、PBA基の水中での pK_a 、及び*cis*-ジオール構造との結合能評価を行っている。ポリエチレングリコール(PEG)とポリリシン(PLys)のブロック共重合体(PEG-PLys)に対する4-carboxy-3-fuloro-phenylboronic acid (FPBA)の定量的な導入法、及び新規FPBA基導入高分子(PEG-PLys(FPBA))のモデル低分子の合成法が述べられている。次いで、FPBAの水中での電離度測定及び*cis*-ジオールを有する低分子との水中での結合定数測定を $^{11}\text{B-NMR}$ を用いて行っており、PEG-PLys(FPBA)は生理環境下で*cis*-ジオール構造との結合能を有することが確認されている。

第三章では、PICミセルを調製し、その安定性と環境応答能を蛍光相関分光法(FCS)により評価している。PEG-PLys(FPBA)とsiRNAとの攪拌混合によってPICミセルの形成が確認され、また血清タンパク質に対する安定性はFPBAの導入率に伴い向上することが確認されている。次いで、*cis*-ジオール構造を持つリボヌクレオチド類に対する応答性を検討し、リボヌクレオチドの添加に応じてPICミセルからsiRNAが放出されることが確認されている。特に、ATPの添加に対しては細胞内濃度以上でのsiRNAの放出が確認されたことから、細胞質内選択的なsiRNA放出能が示唆されている。

第四章では、PICミセルの*in vitro*及び*in vivo*での機能評価を行っている。

マウス尾静脈より PIC ミセルを投与したところ、FPBA 導入率の高い PIC ミセルは、siRNA 単独投与と比べ、10 倍以上の血中滞留性を示したことから、全身投与型 siRNA キャリアとしての高い潜在能力が実証されている。その一方で、培養がん細胞に対する遺伝子発現抑制効果は FPBA 導入率の増加に応じて低下することが確認され、遺伝子抑制効果と血流中での安定性の両立には FPBA 導入率等のポリマー組成の最適化が必要であることが示唆されている。

第五章では培養細胞に対して機能する PIC ミセルの調製を目指し、PLys 鎖長の影響について検討を行っている。PLys 重合度を 42 から 74 へと伸長することで、FPBA 導入率の低い PIC ミセルでも培地中での安定性が維持され、また有意な遺伝子発現抑制効果も確認されたことから、PIC ミセルの安定性や siRNA のデリバリー機能は FPBA 導入率に加え、PLys 鎖長により制御できることが示されている。

第六章では、PIC ミセルの更なる安定性向上を目指し、疎水基であるコレステロール基で修飾された siRNA を用いて PIC ミセルを調製し、その機能評価を行っている。コレステロール修飾 siRNA 内包 PIC ミセルは、コレステロール無しのコントロールと比較して、高い安定性及び効率の良い細胞への取り込み能を示し、更には培養がん細胞に対する遺伝子発現抑制効果の改善が確認されている。また、細胞質内での siRNA 放出も確認されたことから、細胞質内の ATP 濃度に応答した siRNA 放出が示唆されている。

第七章では、総括として ATP 濃度応答能を持つ FPBA 修飾 PIC ミセルによる一連の結果をまとめ、siRNA デリバリーキャリアとしての今後の展望を述べている。

以上、本論文では PBA 基の *cis*-ジオール構造への特異的な結合に着目し、細胞内に豊富存在する ATP を自律的に感知し、ATP と PIC ミセル内部の PBA との結合を引き金として、siRNA を細胞内へと放出可能な PIC ミセルの創製を行っている。細胞内の ATP に応答して機能変化するスマートシステムは、siRNA 以外のドラッグデリバリーシステムへの汎用性も期待され、新たなスマートバイオマテリアルの基盤技術としての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。