

称号及び氏名 博士（工学） 青野 留太

学位授与の日付 2024年3月31日

論文名 「Control of DNA Condensation by Multi-Arm PEG-Installed Polycation for Non-Viral Gene Delivery (非ウイルス性遺伝子デリバリーのための多分岐 PEG 導入ポリカチオンによる DNA の凝縮制御)」

論文審査委員 主査 原田 敦史

副査 椎木 弘

副査 八木 繁幸

## 論文要旨

2019 年末に中国で初めて発生した新型コロナウイルスによる COVID-19 パンデミックは、その高い感染力によって急速に世界中に拡大し、2020 年 1 月に世界保健機関 (WHO) は、「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態」を宣言した。COVID-19 に対するワクチン開発は世界中で迅速に進められ、2020 年末には mRNA ワクチン (Moderna、Pfizer-BioNTech) がアメリカ食品医薬品局 (FDA) に承認され、2021 年には DNA ワクチン (Zydus Cadila) がインドで承認された。これらの核酸を用いたワクチンは、細胞内でウイルスのスパイクタンパクを合成させて免疫応答を惹起させるが、そのためにはスパイクタンパクをコードした核酸を細胞内に効率良くデリバリーする必要がある。核酸デリバリー研究は、1970 年代から始まり、バイオテクノロジーとともに発展してきたが、COVID-19 パンデミックに対する mRNA ワクチンの成功が注目を浴び、遺伝子治療等、核酸デリバリー技術を用いる他の研究アプローチに対しても、関心の増加につながっている。

遺伝子治療は、機能不全に陥った細胞に対して治療用核酸をデリバリーして遺伝的異常を修正する手法で、先天性遺伝子疾患等の根本的治療が可能であると期待されている。治療用核酸を標的細胞に導入する場合、分解酵素からの保護や導入効率向上のために、通常、ベクターとよばれる運搬体を用いられる。アデノ随伴ウイルス等を用いるウイルスベクターは、遺伝子発現効率が高く、最も研究が進んでいる一方で、宿主の免疫応答を引き起こす場合があり、ベクターの安全

性に課題がある。非ウイルスベクターは、治療用核酸と、脂質、ポリマー、無機材料等から構成され、ウイルスベクターと比較して免疫応答を引き起こすリスクが低く、臨床における利用が期待されているが、遺伝子発現効率が低く有効性に課題があるため、現状は実用化に至っていない。

非ウイルスベクターを全身投与する場合、克服すべき生体内バリアはいくつかあり、免疫系の回避、分解酵素からの核酸の保護、標的組織への集積、細胞内取り込み、エンドソームと呼ばれる細胞内小器官からの脱出と細胞質内移行、核移行（治療用核酸に DNA を用いる場合）等、多岐にわたる。これらの課題に対処するために多くの研究が行われてきたが、核移行後の DNA の転写・翻訳過程の効率化を目的とした研究はほとんど行われておらず、非ウイルスベクターのさらなる発現効率の向上の為には、避けて通れない研究課題である。

非ウイルスベクターとして負に帯電した DNA と安定な複合体を形成するポリカチオンのポリ(L-リシン) (PLL) と、エンドソーム脱出を可能とするポリアミドアミンデンドロン (PAMAM dendron) から構成される Head-Tail 型カチオンブロック共重合体 PAMAM dendron-PLL に、PAMAM dendron の末端反応性基へ生体適合性に優れたポリエチレングリコール (PEG) を導入した多分岐 PEG PAMAM dendron-PLL (Multi-Arm PEG-PLL, maPEG-PLL) が報告されている。一般にポリカチオンは、DNA を凝縮させることで分解酵素から DNA を保護するが、過度の凝縮は遺伝子発現の低下に繋がると懸念されている。本論文では、maPEG-PLL がポリカチオンであるにも関わらず、DNA の過度な凝縮を抑制し、その結果、高い転写・翻訳活性を見出した。そこで、Head 部と Tail 部の分子バランスの異なる maPEG-PLL を種々設計し、maPEG-PLL と DNA の複合体 (ポリプレックス) の形態への影響、転写・翻訳効率への影響、及び遺伝子発現効率への影響を評価した。また、maPEG-PLL をベースとして、脂質との混合による発現効率の改善検討、ならびに架橋構造の導入によるポリプレックスの可逆的安定化を検討し、高い転写・翻訳活性を有する非ウイルスベクターの構築を目指した。

本論文は以下の 5 章から構成される。

第 1 章では、本論文の緒言として研究背景と目的および本論文の概要について述べた。

第 2 章では、分子バランスの異なる maPEG-PLL がおよぼす、ポリプレックスの形態への影響、転写・翻訳効率への影響、及び遺伝子発現効率への影響を評価した。Tail 部の PLL の鎖長や、Head 部の PEG の鎖長・PEG の導入本数の異なる maPEG-PLL を種々合成し、DNA と静電的に複合化させることで、maPEG-PLL ポリプレックスを調製した。得られたポリプレックスを原子間力顕微鏡で観察したところ、maPEG-PLL の違いによって、球状、ナノロッド状、ナノファイバー状の形態が確認された。特に、Head 部の PEG 鎖長と PEG 導入本数を増加させた場合、ポリプレックスの形態は球状からナノロッド状となり、最も maPEG 部のかさ高さ (排除体積) が大きくなる分子量 5000 の PEG を 16 本導入した maPEG-PLL では、ナノファイバー状のポリプレックスのみしか観察されなかった。これは、ポリプレックス内の maPEG の排除体積効果により、DNA が凝縮できず、伸長したナノファイバー状のポリプレックスを形成したと推測された。また、maPEG-PLL ポリプレックスについて、無細胞系における遺伝子発現効率を評価したところ、maPEG の排除体積が増加するに従い、発現効率が上昇し、ナノファイバーポリプレックスで最も高い発現効率を示した。これは、DNA の凝縮が抑制された状態では、転写酵素との反応が起こりやすくなり、転写・翻訳活性が上昇したためと推測された。また、ナノファイバーポリプレックスとナノロッドポリプレックスについて、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に対する細胞内取り込みと遺伝子発現効率の評価を行ったところ、ナノファイバーポリプレックスはナノロッドポリプレックスよりも細胞内取り込み量が少なかったにも関わらず、両者の発現効率に大きな違いはなかった。これは、ナノファイバーポリプレックスの高い転写・翻訳活性が細胞内取り込み量の差を相殺したことを示す。以上の結果から、maPEG-PLL の分子設計により、ポリプレックスの形態及び転写・翻訳活性の制御が可能であることが示され、maPEG-PLL はさらなる発現効率の向上に有望な非ウイルスベクターであると考えられた。

第 3 章では、高い転写・翻訳活性を有する maPEG-PLL ナノファイバーポリプレックスの細胞内取り込み効率改善を目的として、ナノファイバーポリプレックスと脂質で構成される遺伝子導

入試薬である lipofectamine を複合化し、非ウイルスベクターとしての機能評価を行った。ナノファイバーポリプレックスに lipofectamine を混合した複合体（ハイブリッドベクター）は、原子間力顕微鏡観察によって、100 nm 程度の均一な粒子に形態変化していることが分かった。このハイブリッドベクターを HeLa 細胞に導入したところ、エンドサイトーシス経路で細胞へと取り込まれ、エンドソームにより核近傍まで輸送されていることが共焦点レーザー顕微鏡観察により明らかとなった。また、このハイブリッドベクターの HeLa 細胞における遺伝子発現効率は、maPEG-PLL 量や lipofectamine 量によって変化することが確認され、スクリーニングにより lipofectamine 単独での遺伝子導入よりも高効率となる最適組成を見出した。最適組成のハイブリッドベクターを用いて無細胞系での遺伝子発現効率を評価したところ、lipofectamine との複合化後もナノファイバーポリプレックスと同等の高い転写・翻訳活性を維持していることが分かった。以上の結果より、maPEG-PLL は高い転写・翻訳活性を維持したまま、脂質等の他の機能性成分と併用して遺伝子発現を増強することができ、非ウイルスベクターの設計において有用であることが示された。

第 4 章では、ジスルフィド (SS) 架橋導入による maPEG-PLL ナノファイバーポリプレックスの可逆的安定化を行った。近年、ドラッグデリバリーにおいて細胞内還元環境に応答し開裂する SS 結合を有する構造が注目されている。これまでに最適化したハイブリッドベクターは、*in vivo* では遺伝子発現が認められず、低い血中安定性が起因していると示唆された。そこで、血中滞留中は安定に存在する一方で、細胞内部では SS 架橋が開裂し、効果的な転写・翻訳機能を発揮する maPEG-PLL ポリプレックスの構築を検討した。分子内に SS 結合、両末端にアミノ基反応性官能基をもつ架橋剤を選択し、ポリプレックス内のリシン残基間へ架橋構造を導入した。SS 架橋導入ポリプレックスを原子間力顕微鏡で観察したところ、非架橋のナノファイバーポリプレックスよりもコンパクトな形態が観察された。これは架橋導入により、maPEG-PLL の PLL 鎖が固定され、排除体積効果が低下したことに起因すると推測された。次に、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 効率を指標に、架橋導入による転写効率への影響を確認した。非架橋の場合、PCR 効率は約 15%であったが、デキストラン硫酸 (DexSul) の添加により 87%まで上昇した。これはポリアニオン交換により DNA がリリースされ、ポリメラーゼとの反応が起りやすくなったためと推測され、血中ではポリプレックスの不安定化が容易に起こると示唆された。一方、SS 架橋を導入すると、PCR 効率は 1%未満になり、DexSul を添加しても上昇しなかったが、DexSul と還元剤の両方を添加すると PCR 効率は 75% まで回復した。これは、SS 架橋を導入してもナノファイバーポリプレックスの高い転写活性は損なわれていないことを示す。最後に、HeLa 細胞での細胞内取り込みと遺伝子発現効率を評価した。非架橋ポリプレックスよりも架橋ポリプレックスは約 4 倍の取り込み量となり、これは、架橋導入による形態変化と安定化の効果と考えられた。また、取り込み量増加による発現効率の上昇も認められ、細胞質の還元環境で SS 結合が開裂していると示唆された。以上の結果から、maPEG-PLL と SS 架橋により、DNA の凝縮状態を精密に制御することで、血中安定性・還元環境応答能・高転写活性を併せもつ非ウイルスベクターの創製につながると考えられた。

第 5 章では、第 2 章から第 4 章で得られた知見を総括した。

## 審査結果の要旨

本論文は、遺伝子治療において細胞内に治療用 DNA を送達し発現させることを目的として、生体適合性に優れた多分岐ポリエチレングリコール (maPEG) を導入したポリカチオンの maPEG 部の効果に着目し、非ウイルス性遺伝子デリバリーシステムに関する研究成果をまとめたものであり、次のような成果を得ている。

(1) 分子サイズの異なる maPEG を導入した poly(L-lysine) (maPEG-PLL) の分子バランスが及ぼす、ポリプレックスの形態への影響及び遺伝子発現効率への影響を評価した。ポリプレックスの形態を原子間力顕微鏡で観察した結果、maPEG 部のかさ高さの増加に伴い、DNA 凝縮が抑制され、伸長した形態をとることを確認した。さらに、ナノファイバーとナノロッドポリプレックスについて、培養細胞に対する細胞内取り込みと遺伝子発現効率の評価を行った結果から、maPEG-PLL の分子設計により、ポリプレックスの形態及び転写・翻訳活性の制御が可能であることを明らかとした。

(2) ナノファイバーポリプレックスと脂質で構成される遺伝子導入試薬であるリポフェクタミンを複合化し、非ウイルスベクターとしての機能評価を行った。ナノファイバーポリプレックスにリポフェクタミンを混合した複合体は、均一な粒子に形態変化していることを確認した。この複合体について培養細胞を用いた機能評価を行い、脂質等の他の機能性成分と併用して遺伝子発現を増強することができることを明らかとした。

(3) ナノファイバーポリプレックスへのジスルフィド (SS) 架橋導入による可逆的安定化を行い、細胞内部では SS 架橋が開裂し、効果的な転写・翻訳機能を発揮するポリプレックスを設計した。適切な架橋剤を選択し、ポリプレックス内のリシン残基間へ架橋構造を導入することによりナノファイバーポリプレックスの可逆的安定化が可能であることを確認した。さらに、可逆的安定化の効果として遺伝子発現が向上させることに成功した。

以上の諸成果は、ポリカチオンを基盤とした遺伝子導入材料設計において、DNA の凝縮状態を制御することが機能向上につながる重要な知見を与えるものであり、医用材料化学における学術的・技術的な発展に貢献するところ大である。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と知識を有することを証したものである。学位論文審査委員会は、本論文の審査および最終試験の結果から、博士(工学)の学位を授与することを適当と認める。