

称号及び氏名	博士(工学) 高橋 俊成
学位授与の日付	2007年3月31日
論文名	「 <b>Rational Design of Novel Dendritic Molecules for Efficient Gene Delivery</b> 」 (高効率な遺伝子デリバリーのための新規 dendritic 分子の合理的設計)
論文審査委員	主査 河野 健司 副査 坂東 博 副査 長岡 勉

### 論文要旨

遺伝子導入技術は、生化学、細胞生物学、分子生物学などの基礎研究分野だけでなく、遺伝子治療や再生医療などの先進医療の確立と発展に欠かすことのできない基盤技術である。これらの医療においては、目的遺伝子を標的細胞に導入し、細胞内において遺伝子がコードするたんぱく質を産生させることによって治療効果を得る。導入遺伝子が細胞内においてたんぱく質として発現するためには、遺伝子が標的細胞の核に送達されることが必要である。しかし、遺伝子は自発的に細胞核に到達することはできないため、その到達を促進する運搬システム（ベクター）の利用が必要である。

現在用いられているベクターには、ウイルスベクターと非ウイルスベクターがある。組み換えウイルスを用いるウイルスベクターは、高い遺伝子導入活性を持つ反面、免疫反応の誘導など安全面での問題が指摘されている。一方、非ウイルスベクターは安全性に優れ、調製も容易であるが、遺伝子導入活性がウイルスベクターに比べ著しく低いという欠点がある。従って、安全性が高くしかも高い遺伝子導入活性をもつ非ウイルスベクターの開発が強く望まれている。

これまでに、非ウイルスベクターとして、様々なカチオン性脂質やカチオン性ポリマーが開発されている。これらのカチオン性物質は、負に荷電した DNA との静電相互作用によってリポプレックス（カチオン性脂質-DNA 複合体）およびポリプレックス（カチオン性ポリマー-DNA 複合体）と呼ばれる複合体を形成する。これらの複合体は、エンドサイトーシスと呼ばれる細胞の取り込み機構によって細胞内に侵入して、エンドソームに保持され、その後、細胞質を経て細胞核に到達し、遺伝子を発現に導く。しかし、この過程において、大部分の DNA が細胞内小器官リソソームにおいて分解される。従って、細胞内において目的遺伝子を効率よく発現させるためには、DNA を細胞核内に効率よく到達させることのできるベクターを開発することが必要である。

本論文は、導入遺伝子の発現に強く関わる細胞内の過程であるエンドソームから細胞質への移

行を、複数の機能の相乗作用で強く促進することによって、高効率の遺伝子導入を実現する多機能性遺伝子ベクターを構築することを目的とする。分子構造の精密な制御が可能で、しかも多様な機能を付与するための多数の官能基を有する高分子化合物であるポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマーに着目して、これを基礎とする新規なベクターを構築し、その機能について検討した。

第1章では、本論文の緒言として、研究の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、ジドデシルアミンを出発物質として、アクリル酸メチルとエチレンジアミンを1～4回繰り返し反応させることによって第1世代 (G1)～第4世代 (G4) のPAMAMデンドロン部位と2本のドデシル基からなるデンドロン脂質、DL-G1-2C<sub>12</sub>～DL-G4-2C<sub>12</sub>を合成し、ベクターとしての機能評価を行った。ゲル電気泳動法により、デンドロン脂質が有するDNAとの複合体形成能は、デンドロン部位の世代数の増加とともに増大することを明らかにした。また、これらのデンドロン脂質を用いて、CV1細胞 (アフリカミドリザル由来) へのホタルルシフェラーゼ遺伝子の導入を行い、DL-G1-2C<sub>12</sub>リポプレックスは遺伝子を細胞に導入できないが、DL-G2-2C<sub>12</sub>～DL-G4-2C<sub>12</sub>リポプレックスは遺伝子を細胞に導入できること、また、デンドロンの世代数の増加とともに遺伝子導入活性が増大することを明らかにした。また、デンドロン脂質リポプレックスの遺伝子導入活性に及ぼす膜融合性リン脂質ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE) の添加効果について検討し、DL-G3-2C<sub>12</sub>およびDL-G4-2C<sub>12</sub>リポプレックスの遺伝子導入活性を最大で約10倍向上させることに成功した。そして、デンドロン脂質とDOPEの相乗作用によって、効率のよい遺伝子導入が実現できることを明らかにした。

第3章では、デンドロン脂質-DOPEリポプレックスの遺伝子導入に及ぼす血清の影響について検討した。カチオン/アニオン電荷比 (N/P比) = 5、DOPE/DL-G3-2C<sub>12</sub>比 = 5の組成を有するデンドロン脂質リポプレックスは、血清非存在下において、極めて高い遺伝子導入活性を示した。しかし、このリポプレックスの遺伝子導入活性は、血清存在下において著しく低下した。血清存在下において、リポプレックスの組成とその遺伝子導入活性の相関関係を詳細に検討し、N/P比 = 4、DOPE/DL-G3-2C<sub>12</sub>比 = 10の組成のリポプレックスが良好な血清耐性を有することを明らかにした。また、リポプレックスの血清耐性は、血清たんぱく質との静電相互作用に対するリポプレックスの安定性と相関することを明らかにした。

第4章では、デンドロン脂質リポプレックスのベクター機能に及ぼすアルキル鎖長の影響について検討した。疎水基として2本のオクタデシル基を有するデンドロン脂質DL-G3-2C<sub>18</sub>を合成した。そしてアルキル基の異なる2種類の脂質DL-G3-2C<sub>12</sub>とDL-G3-2C<sub>18</sub>を用いてリポプレックスを調製し、リポプレックスの物性の違いについて検討した。アニオン性多糖ヘパリンによって誘起されるリポプレックスの崩壊について調べ、DL-G3-2C<sub>18</sub>リポプレックスは、DL-G3-2C<sub>12</sub>リポプレックスと比べてより高い安定性を有することがわかった。また、DL-G3-2C<sub>18</sub>はDL-G3-2C<sub>12</sub>と比べて、より小さな粒径のリポプレックスを形成すること、および血清存在下において最大で約650倍高い遺伝子導入活性を示すことがわかった。これらの結果から、デンドロン脂質のアルキル基はリポプレックスの安定性や血清耐性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

第5章では、デンドロン脂質-DOPEリポプレックスによる生体への遺伝子導入を目指し、生体適合性高分子であるポリエチレングリコール (PEG) で表面を覆ったリポプレックスを構築し、その特性を調べた。DL-G2-2C<sub>18</sub>の極性基に4本のPEGを結合したP4-DL、およびDL-G0-2C<sub>1</sub>

gの極性基に1本のPEGを結合したP1-DLを合成し、これらのPEG結合デンドロン脂質を組み込んだリポプレックスの遺伝子ベクターとしての機能について検討した。PEG鎖をもたないデンドロン脂質リポプレックスの粒径は約800nmであったが、P4-DLを含むリポプレックスでは、P4-DL含率の増加とともにその粒径が減少し、P4-DL含率1mol%以上において約250nmとなった。一方、P1-DLをリポプレックスに含有させた場合も、リポプレックスの粒径はその含率とともに減少したが、P1-DL含率8mol%以上においても粒径は約400nmであった。さらに、これらのPEG結合デンドロン脂質を含有するリポプレックスの遺伝子導入活性を調べたところ、P4-DLを含むリポプレックスの方がP1-DLを含むリポプレックスよりも高い遺伝子導入活性を示すことがわかった。これらの結果から、複数のPEG鎖を有するデンドロン脂質を用いることで、良好な遺伝子導入活性と粒径を有し、生体への投与が可能なりポプレックスが得られることを明らかにした。

第6章では、PAMAM デンドリマーが有するエンドソーム緩衝作用と疎水性相互作用の相乗効果によって、高効率で遺伝子導入するベクターを得ることを目的として、疎水性アミノ酸を導入したデンドリマーを合成し、その遺伝子ベクターとしての機能について検討した。64個のアミノ基を末端にもつPAMAM-G4デンドリマーを種々の量のフェニルアラニンと反応させることによって、16、29、46、64個のフェニルアラニン残基を有するデンドリマーを合成した。64個のフェニルアラニンを結合したデンドリマーはpH7.4で水への溶解度が低く、DNAと複合体を形成できなかったが、それ以外のデンドリマーでは、フェニルアラニンの修飾量の増加とともに遺伝子導入活性が増大した。また、64個のフェニルアラニンを有するデンドリマーは弱酸性条件下においてDNAと複合体を形成し、極めて高い遺伝子導入活性を示すことがわかった。このデンドリマーの遺伝子導入活性は、市販試薬と比べても顕著に高いものであった。デンドリマーのもつエンドソーム緩衝作用と疎水性アミノ酸残基による疎水性相互作用を相乗的に作用させることによって、高活性遺伝子ベクターの開発に成功した。

第7章では、本論文で得られた結論の総括を行った。

## 審査結果の要旨

本論文では、高効率な遺伝子デリバリーを実現するための非ウイルスベクターを開発する目的で、樹枝状のデンドリティック構造を有する分子の合成およびこれらを用いた遺伝子ベクターの構築に関する研究をまとめたもので、次のような成果を得ている。

- (1) 種々の世代数のポリアミドアミンデンドロンと二本のドデシル基を有するデンドロン性脂質を合成し、デンドロンサイズとアルキル鎖長を最適化することによって、高効率な遺伝子デリバリーを可能とする遺伝子ベクターが構築できることを示した。
- (2) デンドロン脂質からなるベクターに膜融合性脂質を添加することによって、ベクターの遺伝子導入活性が飛躍的に向上することを見出した。
- (3) デンドロン脂質とDNAの電荷比および脂質組成を最適化することによって、血清存在下において高い遺伝子導入活性をもつ、血清耐性ベクターが構築できることを示した。また、リポプレックスの血清耐性は、血清たんぱく質との静電相互作用に対する、リポプレックスの安定性と相関することを明らかにした。
- (4) 複数のポリエチレングリコール鎖によってベクターを安定化し、しかも緩衝効果によって効率の良い遺伝子導入を行うことのできる新規な遺伝子ベクター用素子として、ポリエチレングリコール修飾デンドロン脂質を合成した。そして、この分子を含有させることによって、血清中において安定性に優れ、しかも高い

遺伝子導入活性を有する遺伝子ベクターが構築できることを示した。

(5) 疎水性アミノ酸であるフェニルアラニンをポリアミドアミンデンドリマーの末端に結合することで、疎水性相互作用と緩衝効果の相乗作用によって極めて高い遺伝子導入効率を実現する遺伝子ベクターを構築することに成功した。

以上の諸成果は、高活性で多機能な遺伝子送達システムに関して、デンドリティックな分子構造の有用性を示すものであり、遺伝子治療や再生医療などの先進医療技術の発展に必要とされる高性能な生医学材料の開発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学識を有することを証したものである。

本委員会は、本論文の審査ならびに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。