

学 位 論 文 題 名

Molecular Designs of Novel Star-shaped Polymers
(Star Vectors) for Application to Gene Delivery Carriers(新規スターポリマー(スターベクター)の分子設計と
遺伝子導入剤への応用に関する研究)

学位論文内容の要旨

遺伝子治療の研究はレトロウイルスベクターによる修復遺伝子治療を中心に行われてきたが、近年、遺伝子自体は治療しない付加遺伝子治療、つまり、一過性の遺伝子発現でも臨床的に価値のある治療プロトコールも多く起案されている。従って、合成ベクターの臨床応用にも十分な可能性が出てきている。我々の研究グループでは数年前より高分子のナノ構造の最適化と臨床応用を目指して研究を続けており、分岐構造を有するスターポリマー(スターベクター)が遺伝子導入ベクターの基本構造として有用であることを見出している。このスターベクターの分子設計に関しては、ジエチルジチオカルバメート分子団の可逆的光解裂を利用したイニフター重合法を採用して研究を重ねてきた。

本論文は序論および総括を含む7章より構成されている。

第2章では、当該イニフター重合法において一般的に使用されていた低圧または高圧水銀ランプによる紫外線光源に含まれる高エネルギー輝線による副反応を極限まで減らすため、温和な近紫外光を使用した光重合法の確立を目指した。その結果、250nm~700nmの範囲の単色光を使用した重合にて370nmの近紫外光で最も効率良く重合が進行することを明らかにした。この温和でかつ高効率な重合方法によって、ジチオカルバメートの不可逆的脱離によるリビング末端の失活を抑制し、安定してポリマー鎖を延長し、異種モノマーのブロック鎖の導入などを高い自由度で行えるようになった。

第3章では、このスターベクターの遺伝子導入活性の増強を狙い、単分散なポリマーをサイズ排除クロマトグラフィーによって分離する技術を確認し、スターベクターの分子量の最適化を精密に行った。遺伝子導入活性に対する分子量依存性はポリプレックスの ζ -電位や粒子径などに寄与し、結果的にN,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドの4分岐型スターベクターでは $M_n=50kDa$ に活性のピークがあることを明らかにした。

第4章では、デンドリマーや分岐型ポリエチレンイミンなどに代表される多分岐型ポリマーで見出されている構造的な優位性をスターベクターへも応用展開する技術を研究した。スターベクターをより枝葉の多い分岐構造とするため、イニフター重合法の利点を生かし、リビング末端活性種を利用した架橋剤を使用しない光架橋法について検討した。研究の結果、スターベクターはポリマー鎖リビング末端を利用した光架橋が可能であり、かつ、その架橋処理は導入活性の向上に有効であることを見出した。

第5章では、イニフター重合法の柔軟性を生かし、異種ポリマー鎖の導入による分子設計を研究した。まず、スターベクターの血清存在下での適用、すなわち、臨床応用を狙い、非イオン性ポリマー鎖の導入によるブロック化を行い、血清中でのポリレックス微粒子の経時的安定化や酵素分解への耐性の向上を研究した。その結果、非イオン性で親水性の N,N-ジメチルアクリルアミドブロック鎖のスターベクターへの導入で臨床応用への可能性が十分にあることを確認することができた。

第6章では、低 pKa カチオン性モノマーを使用してスターベクターを合成し、低 pKa カチオン鎖の有する DNA デコンデンス性への優位性やエンドソーム内のプロトンスポンジ効果の増強を狙い、かつ、中性領域 (細胞培養・生体内条件) における低 pKa カチオン性鎖の欠点である DNA コンデンス力の弱さを温度感応性の疎水的凝集で補う研究を行った。その結果、DNA コンデンスを加温によって達成することが可能であることを見出し、現在、市販の遺伝子導入剤で最高の性能を有する試薬の一つであるリポフェクトアミン 2000 以上の活性を発現させることに成功した。

最後に、本研究ではスターベクターの合成方法としてのイニフター重合法を重合収率やポリマー鎖末端の活性種残存率を最大限で行える最適光源波長を見出した。その結果、末端活性種を利用した光架橋による遺伝子導入活性の向上を達成でき、非イオン性ブロックの導入による斥力効果や感温性ブロックの導入による加温凝集などの第二第三の機能をスターベクターへ付与できることを明らかにした。また、サイズ排除クロマトグラフィーによる単分散スターベクターで、分子設計とは別の概念で遺伝子導入活性の向上が行えることも明らかにし、イニフター重合法による広く柔軟性に富んだ分子設計と合わせることでスターベクターが遺伝子導入剤として臨床応用も含めて十分に可能性を持っていることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主査	客員教授	中山泰秀
副査	教授	高木 睦
副査	教授	棟方正信
副査	教授	中野 環

学位論文題名

Molecular Designs of Novel Star-shaped Polymers (Star Vectors) for Application to Gene Delivery Carriers

(新規スターポリマー(スターベクター)の分子設計と
遺伝子導入剤への応用に関する研究)

遺伝子治療の研究はレトロウイルスベクターによる修復遺伝子治療が中心に行われてきたが、近年、遺伝子自体は治療しない付加遺伝子治療、つまり、一過性の遺伝子発現でも臨床的に価値のある治療プロトコールも多く起案されている。従って、合成ベクターの臨床応用にも十分な可能性が見いだされ、研究が盛んに行われており、今後の発展が待たれている状況にある。

本論文は、このような現況にある合成ベクターについて、高分子のナノ構造の精密設計による細胞レベルでの遺伝子導入活性の向上に関して、ジエチルジチオカルバメート分子団の可逆的光解裂を利用したイニフター重合法を利用して分岐構造を有するスターポリマー(スターベクター)を基本構造とする分子設計を高分子合成化学的に研究し、遺伝子治療につながる有益な細胞内遺伝子導入材を開発することを目的としたもので、以下に示す優れた研究成果が得られている。

分子設計に利用するイニフター重合法において、温和な近紫外光を使用した光重合法の確立を目指して、一般的に使用されていた低圧または高圧水銀ランプによる紫外線光源に含まれる高エネルギー輝線による副反応を極限まで減らすことが検討された。その結果、250nm~700nmの範囲の単色光を使用した重合において、370nmの近紫外光で最も効率良く重合が進行することが明らかにされた。この温和でかつ高効率な重合方法によって、ジチオカルバメートの不可逆的脱離によるリビング末端の失活を抑制し、安定してポリマー鎖を延長し、異種モノマーのブロック鎖の導入などを高い自由度で行うことが可能となった。

このスターベクターの遺伝子導入活性の増強を狙って、単分散なポリマーをサイズ排除クロマトグラフィーによって分離する技術の確立を目指して、スターベクターの分子量の最適化を精密に行った。遺伝子導入活性に対する分子量依存性はポリプレックスの ζ -電位や粒子径などに寄与することが明らかとなり、N,N-ジメチルアミノプロピルアクリルアミドの4分岐型スターベクターでは、 $M_n=50kDa$ に活性のピークがあることが明らかにされた。

デンドリマーや分岐型ポリエチレンイミンなどに代表される多分岐型ポリマーにおいて見出されている構造的な優位性をスターベクターへも応用展開する技術の開発が展開された。スターベクターをより枝葉の多い分岐構造とするため、イニフター重合法の利点を生かし、リビング末端活性種を利用した架橋剤を使用しない光架橋法について検討した。スターベクターはポリマー鎖リビング末端を利用した光架橋が可能であり、かつ、その架橋処理は導入活性の向上に有効であることが見いだした。

イニフター重合法の柔軟性を生かし、異種ポリマー鎖の導入による分子設計を検討した。スターベクターの血清存在下での適用、すなわち、臨床応用を目的に、非イオン性ポリマー鎖の導入によるブロック化を行い、血清中でのポリプレックス微粒子の経時的安定化や酵素分解への耐性の向上を研究した。その結果、非イオン性で親水性の N,N-ジメチルアクリルアミドブロック鎖をスターベクターへ導入することで、臨床応用への可能性が十分にあることが確認された。

低 pKa カチオン性モノマーを使用してスターベクターが合成され、低 pKa カチオン鎖の有する DNA デコンデンス性への優位性やエンドソーム内のプロトンスポンジ効果の増強を目的に、さらに中性領域 (細胞培養・生体内条件) における低 pKa カチオン性鎖の欠点である DNA コンデンス力の弱さを温度感応性の疎水的凝集で補うことを検討した。その結果、DNA コンデンスを加熱によって達成することが可能であることが見いだされ、現在、市販の遺伝子導入剤で最高の性能を有する試薬の一つであるリポフェクトアミン 2000 以上の活性を発現させることに成功した。

これを要するに、著者は、スターベクターの合成方法としてのイニフター重合法を重合収率やポリマー鎖末端の活性種残存率を最大限で行える最適光源波長を見出した。末端活性種を利用した光架橋による遺伝子導入活性の向上を達成し、非イオン性ブロックの導入による斥力効果や感温性ブロックの導入による加熱凝集などの第二第三の機能をスターベクターへ付与できることを明らかにした。また、サイズ排除クロマトグラフィーによる単分散スターベクターで、分子設計とは別の概念で遺伝子導入活性の向上が行えることも明らかにし、イニフター重合法による広く柔軟性に富んだ分子設計と合わせることでスターベクターが遺伝子導入剤として臨床応用も含めて十分に可能性を持っていることを明らかにした。新規合成高分子の設計を通じて、細胞内での遺伝子導入活性の向上について新知見を得たものであり、高分子化学並びに細胞工学に対して貢献するところが大きなものがある。よって著者は、北海道大学博士 (工学) の学位を授与される資格あるものと認める。