

# Development of Extracellular and Intracellular Gene Delivery System for Cancer-selective Polymeric Nanocarrier

中村, 雄太

<https://hdl.handle.net/2324/1806847>

---

出版情報 : 九州大学, 2016, 博士 (工学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

氏 名 : 中村 雄太

論 文 名 : Development of  
Extracellular and Intracellular Gene Delivery System  
for Cancer-selective Polymeric Nanocarrier  
(がん細胞選択的なポリマー型ナノキャリアを指向した  
細胞内外の遺伝子デリバリー技術の開発)

区 分 : 甲

### 論 文 内 容 の 要 旨

本論文では、ポリマー型ナノキャリアを用いたがん細胞選択的な遺伝子デリバリーシステムの実用化に向けて、細胞内外のデリバリーに必要な技術の開発と分子設計の検討を行っている。

ポリマー型ナノキャリアは、精密かつ多様な分子設計に基づいた多機能性により、従来の遺伝子デリバリーシステムの改善ならびに遺伝子治療の実用化に資することが期待されている。従来の研究では、生体適合性ポリマーやがん細胞ターゲティング分子などの組合せにより、がん細胞選択的な遺伝子デリバリーが可能であることを実証されてきた。そこで著者らは、がん細胞選択的な遺伝子発現の制御システムの構築に取り組んでいる。遺伝子発現をがん細胞でだけ活性化し、正常細胞では抑制する機能を開発することができれば、より安全で効率的なナノキャリアによる遺伝子デリバリーが可能となるからである。これまでの研究において、がん細胞特異的に異常活性化したプロテインキナーゼ  $C\alpha$  (PKC $\alpha$ ) を標的とした、がん細胞選択的な遺伝子発現制御システムが確立されている。そこで本論文では、がん細胞選択的な遺伝子発現制御システムの実用化に向けた、1) 全身投与を目指した、ナノキャリア・DNA 複合体安定化技術の開発、2) 合成ステップを含めたより実用的なペプチド担持型ポリマーの検討、3) PKC $\alpha$  応答性に対するペプチド担持型ポリマーのリンカー長の最適化、について検討している。

第1章では、これまでの遺伝子ナノキャリアの現状と問題点を要約した。

第2章では、ペプチド担持型ポリマーの全身投与を指向した、ナノキャリア・DNA 複合体の血中安定化技術を開発している。これまでの研究で、ポリエチレングリコール (PEG) をポリマーに修飾する方法を用いると、ペプチド担持型ポリマーの安定性は向上するものの、複合体の不安定化による発現制御能の抑制、ならびに細胞取り込み効率の低下が起きることが報告されている。そこで、著者は、脂肪酸や疎水性薬剤と血中で非共有結合し、身体中の細胞に運搬する機能をもつ血清アルブミンに着目している。すなわち、高い遺伝子発現効率をもつ直鎖状ポリエチレンジイミン (LPEI) に、血清アルブミンの特異的なリガンドとしてステアリン酸を修飾することで、ナノキャリア・DNA 複合体を血清アルブミンで被覆し、血中安定性を向上できるかを検討している。その結果、DNA とステアリン酸修飾 LPEI、血清アルブミンからなる三元複合体は、生理塩濃度条件でも高い安定性と、赤血球の凝集抑制作用を示した。また、ステアリン酸の修飾量は、ポリマー1分子に対して2分子で安定化に充分であることを明らかにしている。さらに、本ステアリン酸修飾 LPEI は、がん細胞を用いた評価においても、LPEI と同様に、高い細胞取り込みと遺伝子発現効率を示し、血清アルブ

ミンによる安定性の向上と、発現効率が維持されたことから、本技術がペプチド担持型ポリマーへの応用ならびに、全身投与に有用であることを明らかにしている。

第3章では、ペプチド-担持型ポリマーの合成法ならびに分子設計について検討している。これまで開発されてきたペプチド担持型 LPEI は高い PKC $\alpha$  応答性を示したが、ペプチドの直接修飾が難しいため、クロスリンカーの修飾、リンカーとペプチドの結合と多段階の複雑な反応ステップを経っていた。著者は、実用性向上の観点から合成プロセスをより簡便にすることと、PKC $\alpha$  応答性の両立を目指して、新しいポリマーと合成経路を考案している。すなわち、LPEI と同様に高い遺伝子発現効率を有する分岐状ポリエチレンジアミン (BPEI) の末端に存在する第1級アミンに対して、アミド結合を介したペプチドの直接導入を検討している。その結果、ペプチド担持型 BPEI の合成において、反応効率の高い縮合剤を用いることで、70%の転化率でペプチドの導入が可能となることを示し、異なるペプチド導入率をもつペプチド担持型 BPEI を数種類合成し、物性と細胞で評価している。結果として、3 mol%のペプチドの導入率をもつペプチド担持型 BPEI において、100 倍もの PKC $\alpha$  応答性ならびに遺伝子発現効率を実現することに成功している。本結果は、従来のペプチド担持型 LPEI のペプチド導入率 (6~10 mol%) に比べても低い導入率であり、分岐状構造に由来する BPEI の高い電荷密度が、少ないペプチド導入率でも、PKC $\alpha$  に応答しない遺伝子発現効率を効率よく抑制し、優れた性能を実現可能であることを見出している。

第4章では、遺伝子発現の制御能の向上を目指し、PKC $\alpha$  応答性のペプチド担持型 LPEI における遺伝子制御に影響する構造上の因子を検討している。これまでに、ペプチド担持型 LPEI のリンカーの疎水性を上げると、複合体の安定性が向上し、PKC $\alpha$  応答性が 100 倍から 400 倍まで増加することが分かっている。そこで、本研究では、リンカー長について検討を行っている。リンカー長の検討において、親水性のリンカーセグメントを採用し、ペプチド合成時にリンカーの修飾を組み込み、種々の長さのリンカーを有するキャリアの合成に成功し、これまでの疎水性リンカーよりも長いリンカー長の導入にも成功している。これらのキャリアを用いた検討の結果、複合体の形成効率にリンカー長による影響は見られなかったが、複合体形成後の、ヘパリンによる複合体崩壊に対して、リンカー長が長いほど、複合体の崩壊が抑制されることを見出している。また、細胞実験において、長いリンカーをもつペプチド担持型 LPEI は、リンカーがないものに比べて、PKC $\alpha$  応答性が 10 倍改善されることを見出し、リンカー部分の DNA 鎖への絡み合いが重要な因子であることを明らかにしている。

以上要するに、本論文は、がん細胞選択的な遺伝子治療の実現に向けて、PKC $\alpha$  応答的な遺伝子発現を可能にするペプチド担持型ポリマーの実用化に向けた、DNA との複合体の安定化と分子設計の抜本的な見直しに成功している。これらの知見をもとに、細胞内外の様々な課題を一つずつ検討することで、安全で治療効果の高い遺伝子デリバリーを実現することが期待される。