

(論文内容の要旨)

遺伝子（プラスミド DNA）や RNA 干渉用の短い二重鎖 RNA（siRNA）を細胞に導入するための人工（非ウイルス）運搬体として、従来、カチオン性の脂質や高分子、デンドリマーなどが頻用されてきた。ここでの大きな問題の一つはサイズの制御が困難な点である。例えば、カチオン脂質が形成するリポソームは、単独ではよいサイズであっても、DNA や RNA との相互作用において容易に融合・巨大化し、細胞への送達効率が著しく低下する。複合体が巨大化すると細胞への取り込み機構であるエンドサイトーシス（細胞の飲作用）効率が低下し、また、*in vivo* 系では抹消血管の通過にも支障をきたす。このような背景の下、本研究では遺伝子や siRNA の細胞送達における複合体のサイズ制御、特にウイルスサイズへの制御、に焦点をあてている。

本論文は序章および本論 3 章から構成され、遺伝子や siRNA の新規運搬体として大環状骨格を有するオクタアミン誘導体と表面をシリカ架橋したリポソームであるセラソームの遺伝子／siRNA キャリアとしての構造特性と遺伝子発現／抑制効率が記述されている。

序論では遺伝子／siRNA の複合化におけるサイズ制御の意義と問題点がまとめられている。

第 1 章では、長鎖アルキル基を有するカリックスレゾルカレンのオクタアミン誘導体が通常のカチオン性脂質を共有結合で束ねた構造であることを指摘し、これとプラスミド DNA および siRNA との錯形成挙動を詳しく調査した結果を述べたうえで、（1）プラスミド DNA および siRNA がそれぞれ 30 nm サイズ、10 nm サイズのコンパクトな複合体を形成すること、（2）コンパクトなサイズの複合体は容易に細胞に取り込まれ、外来性のプラスミドにコードされた蛍の化学発光タンパク質であるルシフェラーゼや HeLa 細胞のゲノムに組み込まれた内在性の蛍光タンパク質である DsRed2 の発現を効率よく（95%程度）抑制できること、（3）数%の残存活性は細胞の種類やプラスミドと siRNA の導入のタイミング、対象タンパク質が外来性であるか内在性であるかなどの因子には依存しない RNA 干渉現象自体の問題であること、などを明らかにしてい

る。

第 2 章では、表面をシリカ架橋により強化したリポソームであるセラソームと遺伝子（プラスミド DNA）との錯形成挙動を、シリカ架橋されていない脂質が形成するリポソームの挙動を参照に、詳細に検討した結果が述べられ、（1）プラスミドとの複合化において表面強化されたセラソームは融合巨大化せずにウイルスサイズ（約 70nm）を維持するが、参照リポソームは容易に融合し、数百 nm にも達する巨大な複合体を与えること、（2）巨大化する参照リポソームに比べてセラソームの遺伝子導入効率は 10^{2-3} 倍高いこと、（3）活性の高いセラソームは血清の存在下でも有効に機能し（ウイルスサイズを維持し）、また毒性も極めて軽微であること、（4）その結果、セラソームは極めて高効率の遺伝子導入試薬として用いることができること、などを明らかにしている。

第 3 章では、セラソームの siRNA キャリアとしての挙動が述べられている。セラソームはプラスミド DNA との複合化において融合せずウイルスサイズを維持するが、それは低濃度の場合であり、高濃度条件下では伸びたプラスミドに多くのセラソームが数珠状に結合した架橋構造が現れることを、セラソーム系の欠点として述べている。その上で、短い siRNA（約 20 塩基対の二重鎖 RNA で、鎖長は約 7 nm）を用いればそのような架橋巨大化が阻止できるであろうとの発想の基に検討された結果が述べられており、（1）参照リポソームは siRNA との相互作用においても容易に融合し、数百 nm にも達する巨大な複合体を与えるが、セラソームは確かに融合も架橋も起こさず数十 nm のウイルスサイズを維持すること、（2）巨大化する参照リポソーム系は細胞へ効率よく取り込まれず、その結果 RNA 干渉によるタンパク質発現抑制効果が殆ど見られないが、細胞に容易に取り込まれるセラソーム系で RNA 干渉に基づく有効な発現抑制が起きることを示している。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、プラスミド DNA や siRNA の新規運搬体の開発に関する研究成果をサイズ制御の視点からまとめたものであり、得られた成果は次の通りである。

1. 長鎖アルキル基を有するカリックスレゾルカレンのオクタアミン誘導体はカチオン脂質を疎水部分で束ねた構造を有し、プラスミド DNA や siRNA (約 20 量体の RNA 二重鎖) とそれぞれ 30 nm サイズ、10 nm サイズのコンパクトな複合体を形成することを明らかにしている。これを用いることにより、RNA 干渉 (RNAi) に基づくタンパク質の発現抑制を効率よく起こさせることに成功している。

2. 表面をシリカ架橋されたりポソームであるセラソームは通常のリポソームと異なり、プラスミド DNA との複合化において融合せず、約 70 nm のウイルスサイズを維持することを明らかにしている。セラソームをプラスミド DNA の運搬体として用いることにより、プラスミドにコードされた遺伝子の発現効率を飛躍的に高める (10^{2-3} 倍) ことに成功している。

3. セラソームはプラスミド DNA との複合化において融合は起こさないが、高濃度条件下では DNA 依存的に架橋を起こし巨大化する。一方、短い siRNA は広い濃度範囲のセラソームを用いることで融合はもとより架橋を起こすことなく複合化できることを明らかにしている。セラソームを siRNA のキャリアとして用いる高効率タンパク質発現抑制に成功している。

以上、本論文では、遺伝子や siRNA の細胞送達で常に問題となる複合体サイズの巨大化を阻止する新手法が明らかにされている。得られた成果は学術上、実際状寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 20 年 2 月 20 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。