

厚生科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型ベクターの分子設計と
遺伝子導入デバイスの総合開発

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中山 泰秀

平成14（2002）年3月

目 次

I. 総括研究報告書

遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる 次世代型ベクターの分子設計と遺伝子導入デバイ スの総合開発に関する研究	1
--	---

II. 分担研究報告

1. 光反応性機能性ベクターの開発に関する研究 中山泰秀	9
2. 光カチオン発生型水溶性高分子と細胞との相互 作用に関する研究 植田初江	17
3. 遺伝子徐放担体材料の分子設計に関する研究 大屋章二	19
4. 新しい合成高分子系遺伝子導入ベクターと 導入デバイス開発のための生体内吸収性の 合成高分子の開発に関する研究 中山敦好	24
5. 光開裂性化合物を用いた DNA 放出の光制御 による高発現ベクターの開発に関する研究 長崎 健	26
6. 血管内遺伝子導入デバイスの開発に関する研究 西 正吾	28
7. ポリマーを用いた遺伝子治療法の確立に関す る研究 斯波真理子	32
8. 細胞分化誘導と Tissue Engineering HVJ ベクターを用いた新しい遺伝子導入法 の組織工学への応用に関する研究 澤 芳樹	34

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	36
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	39
-----------------	----

総括研究報告書

遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型ベクターの分子設計と
遺伝子導入デバイスの総合開発に関する研究

主任研究者 中山泰秀 国立循環器病センター研究所生体工学 室長

研究要旨 本研究では、新しい合成高分子系のベクターを開発すること、ならびにそれらを有効に病変部に誘導、徐放できるデバイスの開発を同時併行で行っている。合成高分子ベクターとして、光反応性を有する光機能性分子を組み合わせ、遺伝子とのコンプレックス形成過程、ならびに解離過程を任意に制御しうる光操作型材料の基盤分子設計を行い、遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる高い安全性と発現効率を併せ持つ次世代型の高機能性ベクターが開発されつつある。光カチオン発生能を有するマラカイトグリーン、ならびに光解裂能を有するニトロベンジルを使い分け、これらの光反応性基を導入した水溶性高分子やカチオン脂質の合成を行った。In vitro において遺伝子とのコンプレックス形成の光制御、光解離を自由に操ることを可能とし、細胞レベルでの遺伝子発現効率を大幅に向上しつつある。一方、導入法に関しては、ステントと生分解性高分子からなる遺伝子担体との組み合わせによる新しい血管内遺伝子導入デバイスを開発し、遺伝子担体の経時的な分解によって血管内での遺伝子発現を長期間に渡って持続させることを可能とした。また、侵襲の極めて少ない新しい遺伝子導入法として、気管内投与法を提案し、難治性である原発性肺高血圧症への新しい治療法を提供した。さらに HVJ 膜ベクターを用いた遺伝子導入法を確立させ、機能改変させた培養細胞を再構築させ、生体適合性に優れた人工代用物の開発を行い、再生医療への新たな展開を図りつつある。

分担研究者 植田初江
国立循環器病センター病理医長

西 正吾
高槻赤十字病院脳神経外科部長

長崎 健
大阪市立大学大学院工学研究科
助教授

斯波真理子
国立循環器病センター研究所室員

大屋章二
国立循環器病センター研究所室員

中山敦好
産業技術総合研究所関西センター
人間系特別研究体グリーンバイオ
研究グループ主任研究員

澤 芳樹
大阪大学大学院医学系研究科
臓器制御外科 講師

A. 研究目的

本研究は、遺伝子治療に安全性と確実性を与える新しい合成高分子系の遺伝子導入材料（ベクター）を開発し、臨床応用することを到達目標とする。基盤材料となる光反応性材料と生分解性材料の設計、ならびに導入デバイスの設計、導入法の開発を含めて総合的に同時併行で行っている。

1990 年に開始された本格的な遺伝子治療は、当初 ADA 欠損症など遺伝子性疾患に適用が限られていたが、その後様々なストラテジーが工夫され、癌やエイズなど生命を脅かす後天性疾患から病変血管治療など致死性でない疾患までも治療対象に含まれるようになった。しかし、臨床主導型で研究が急速に進められてきたため、ベクター開発の遅れなどを含む技術的な問題（遺伝子導入効率や発現レベルが低い）が浮き彫りにされてきた。その結果、現時点では有効性が確認された遺伝子治療はほとんど無いが、なおも将来的には画期的な医療技術になるとの期待が非常に強く、基盤技術の整備が急務となっている。

これまでベクターにはウイルスが主に使われてき

た。細胞内に進入し自らの遺伝子を発現させる能力を持つウイルスは、原理的には増殖や病原性に関わる遺伝子を治療遺伝子に置き換えることが可能で、治療遺伝子を細胞内に導入できる。また、ウイルスが増殖したり病気を引き起こすことはない。以上の理由でウイルスはベクターとして注目されてきた。中でも最も研究が進んでいるのはレトロウイルスを用いたベクターである。このウイルスは分裂細胞にはよく DNA を導入することができ宿主のゲノムへの挿入が可能であるが、血管のような非分裂細胞への遺伝子導入は困難である。そこで、次に注目されたのはアデノウイルスである。このウイルスは非分裂細胞への遺伝子効率が優れているうえに、遺伝子の発現期間も一過性だが、約一ヶ月と長く血管病変の遺伝子治療ベクターとして期待されている。しかし、高導入効率の反面、抗原性や炎症の誘発を高頻度で起こすことや導入 DNA サイズが限られていることも判明し、臨床用の遺伝子ベクターとして有用性は不明である。

以上のようにウイルスは遺伝子導入のベクターとして用いられてきた。しかし、ウイルスをベクターに用いることが理論的に安全であるとしても細胞内でウイルスが突然変異を起こし病原性を獲得する可能性がある。さらに、体内に入ったウイルスが免疫反応により破壊されてしまうことが理解され始め、実際には遺伝子が半永久的に発現することはなく、何度か投与しなければならぬ。

そこで病原性や免疫反応を誘発しにくい非ウイルス性ベクターの開発が盛んになってきた。この非ウイルス性ベクターは、カチオン性脂質や高分子電解質が主に使われている。また、ベクターに導入できる遺伝子のサイズに制限がなく、生産性が良いことも大きな利点である。

本研究では、光反応性化合物として、光カチオン発生能を有するマラカイトグリーンと光解裂能を有するニトロベンジルエステルを選択し、DNA とのコンプレックス形成と解離の光制御を試みる。これにより、有効な遺伝子の細胞内への取り込みと核内での発現が期待される。

一方、遺伝子導入デバイスに関しては、血管形成術に広く使用されている血管内治療デバイスであるステントをベースとして、新たに設計した生分解性材料の高機能化により遺伝子の包埋、徐放能を付与し、ステント表面をゲル状に皮膜化させた遺伝子導入デバイスを開発する。これより再狭窄を大幅に低減させることが期待される。

また、侵襲の極めて少ない遺伝子導入法として気管内投与法を提案している。これにより肺組織に局限した遺伝子導入が可能となり、原発性肺高血圧症に対して新たな有効な治療法を提供できると期待さ

れる。

さらに、HVJ 膜ベクターを用いて細胞機能改変を行い、これらから再構築したハイブリッド人工血管を作製することにより新しい再生医療の展開が期待される。

B. 研究方法

光機能性材料の分子設計：

光カチオン発生型水溶性高分子は、マラカイトグリーン化モノマー（Diphenyl(4-vinylphenyl)methane leucohydroxide）と N,N-Dimethylacrylamide とのラジカル共重合により合成した。各モノマーの仕込み比を変化させることでマラカイトグリーン部の導入量が 2.9 から 68 %までの 5 種類を得た。生成物の同定は NMR スペクトル測定により行い、分子量の測定はゲル浸透クロマトグラフィーで測定した。光反応性は約 330nm 以下の紫外光を照射し、紫外可視吸収スペクトルを測定することによって行った。DNA とのコンプレックス形成は、動的光散乱測定法を用いて、キュムラント解析により行った。

光解裂型カチオン性脂質の合成は以下に従った。光応答性部位として開裂能を有する o-ニトロベンジル構造をスペーサーとして、4-(N-t-ブチルオキシカルボニル)アミノ-3-ニトロ安息香酸を調製した。アルキル長鎖(n=12,18) 2 本を有する 2 級アミンを疎水部として導入すべく 3 級アミド体に誘導した。Boc-基を除去後、親水部位に塩基性アミノ酸としてリジン・アルギニンを導入した。このようにして光感応部位として o-ニトロベンジル構造を導入した、4 種類の新規光開裂性カチオン脂質を合成した。DNA との集合体形成は透過型電子顕微鏡観察により観察した。また、トランスフェクションは、ルシフェラーゼアッセイによるタンパク定量を行って、単位タンパク量あたりのルシフェラーゼ活性を定量することによって行った。

遺伝子包埋・徐放性生分解性分子設計：

ゼラチンならびにアルブミンへのアクリレート基やスチレン基の導入はゼラチンまたはアルブミンと 4-ビニル安息香酸またはアクリル酸と水溶性カルボジイミドを用いた脱水縮合反応により合成した。

水溶性重合開始剤としてケトピンのセレン酸化によりカルボキシル化カンファキノン合成した。

光ゲル化は、ゼラチンおよびアルブミンマクロマーの水溶液にハロゲンランプからの青色光を照射することにより行った。溶質重量の不溶化率をゲル化率、生成ゲルの単位乾燥重量あたりの吸水重量を膨潤度と定義した。

遺伝子導入デバイスの作製：

カルボキシル化カンファキノンを含むゼラチンマクロマーの水溶液内に市販の金属ステントをディッピングさせステント金属部の周りを薄くコーティングし、照射によりゲル化させてコーティングステントを作製した。遺伝子や薬物等は予め溶液内に混入させることにより生成ゲル内に包埋した。遺伝子導入にはモデルとした LacZ 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを用いて検討した。組織内への薬物の移行性、遺伝子発現の評価はモデル血管組織としたコラーゲンとウシ血管平滑筋細胞から作製したハイブリッド血管を用いて行った。

気管内投与による遺伝子導入：

ポリエチレンイミンなどのポリマーを用い、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼなどの遺伝子との DNA コンプレックスを作製、透過電子顕微鏡写真で性状を観察した。また、特別にデザインした気管内投与装置を用いて マウス気管内に噴霧し、ルシフェラーゼの活性を測定し、肺で遺伝子発現を認める条件を検討した。

HVJ 膜ベクター法による遺伝子導入の応用：

HVJ 膜ベクター法を用いた遺伝子導入によって、成人個体からの採取細胞への細胞分化誘導能の付与、細胞接着能の効率化、細胞環境向上因子の付与を行い、生体適合性に優れたハイブリッド人工血管の作製を行い、動物実験にて評価を行う。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面へ配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に於いて国立循環器病センター内の倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究では、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を行い、説明と理解（インフォームドコンセント）を必ず書面にて確認した上で協力をお願いする。また、遺伝子解析などの研究内容を行う必要がある場合には、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号）を遵守する。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は国立循環器病センター付属の動物管理施設にて適切に一括管理される。

C. 研究結果と考察

光カチオン発生型水溶性高分子の合成と DNA とのコンプレックス形成・解離の光制御：

マラカイトグリーン化モノマーと水溶性モノマーとのラジカル共重合反応によって、マラカイトグリーン部導入率が 2.9 から 68 % の光カチオン発生型水溶性高分子を合成した。

合成高分子は、いずれも水溶液中で紫外光を照射すると 620nm 付近のカチオン発生に由来する吸収スペクトルが増大し、照射によって分子内にカチオンが発生していることが示された。30 秒程度の照射でほぼ全量のマラカイトグリーン部がカチオン化された。

生成したカチオンを遮光下、37℃に放置すると、40 分程で元の中性のロイコ体へと戻った。これを更に紫外光照射すると、再びカチオン化が起こった。この繰り返しは何度も可能であった。

一方、照射によるカチオン生成量は、高分子内へのマラカイトグリーン基の導入率が高い場合には大幅に低下した。光反応性基が高密度化することで、光エネルギーの移動が起こり、イオン化反応が阻害されたと考えられる。従って、以下の実験では導入率の低い高分子を用いて検討を行った。

次に、DNA とのコンプレックス形成について検討を行った。コンプレックス形成するかどうか、並びに形成されたコンプレックスの数と大きさの解析は、動的散乱測定によって行った。共重合体と DNA を混合した場合にはコンプレックスは全く形成されなかった。一方、予め紫外光照射した高分子を DNA と混合すると、散乱強度分布が得られ、コンプレックスの形成が認められた。

実際形成されたコンプレックスを位相差顕微鏡で観察すると、粒子状であり、内部が緑色を呈していたことから、マラカイトグリーン化高分子から構成されていることが分かった。また、走査型電子顕微鏡観察より、コンプレックスはナノ粒子であることが分かった。粒径は先ほどの光散乱測定値のキュムラント解析から約 150nm と得られた。

形成されたコンプレックスは 37℃に 5 時間程度放置してもほとんど粒径に変化無く、また、多分散度は約 0.5 と安定していた。

コンプレックスの形成量はカチオン化された高分子の量に比例すると考えられる。そこで、高分子と DNA との混合溶液に徐々に紫外光を照射し、経時的に動的散乱測定を行った。照射時間の経過と共に粒子の形成量は徐々に増加し、20 秒の照射でほぼ飽和に達した。この時、溶液内に存在する高分子と DNA の約 20 % がコンプレックス形成に寄与した。形成されたコンプレックスは粒径が約 150 nm でほぼ一定であった。照射によりコンプレッ

クスの形成量を調節することができた。

次に、コンプレックスの粒径の制御について検討を行った。高分子内に存在するマラカイトグリーン基の量が多いと、アニオン性の DNA との相互作用点が増えるため、より多くの DNA とコンプレックス形成できると予想される。実際、高分子内のマラカイトグリーン導入率が高くなると、粒径が大きくなった。

また、一定の高分子量に対して作用させる DNA を変化させ、生成するコンプレックスの粒径の変化を測定した。DNA を徐々に加えていくと、粒径は少し増加する傾向を示した。つまり、この場合、高分子あたりに静電相互作用する DNA 量が多くなっていることが示唆された。以上より、高分子内に含まれるカチオン量、並びに高分子と DNA との混合比により、ある程度コンプレックスの粒径が制御できることが分かった。

最後に、形成されたコンプレックスの解離性について検討を行った。カチオン化されたマラカイトグリーンは熱的にロイコ体へ戻ることが知られており、本研究で用いている高分子単独でもこの反応が起こることを確認している。そこで、コンプレックス内でも戻ること、吸光度測定により調べた。時間と共に吸光度は徐々に減少し、ロイコ体へ戻っていることが示された。しかし、高分子に対して DNA 量が少ない場合には、高分子単独の場合と同様にほぼ全てロイコ体へ戻ったが、DNA 量が多い場合には、戻り反応は大幅に抑制された。これは、DNA のリン酸アニオンが水酸基アニオンからの攻撃を防いでいることによるものと考えられる。

ロイコ体への戻り性の良い状態で、形成させたコンプレックスの粒子数の変化を調べた。照射によって形成された粒子の数は数時間内ではほとんど変化無かったが、1日後には約半数に減少した。カチオンが徐々に消失し、形成されたコンプレックスが徐々に解離し、粒子の崩壊が起こったと考えられる。

光解裂型カチオン脂質の合成と DNA とのコンプレックスの光解離によるトランスフェクション効率の向上：

光感応部としてニトロベンジル構造を導入した4種類の新規光解裂型カチオン脂質を合成した。これらをトリス塩酸バッファに分散させた。これを透過型電子顕微鏡で観察すると、疎水性部が大きい場合、約 200~500nm の粒径の脂質集合体（リポソーム）の形成を認めた。

これらのリポソームを用いて遺伝子発現を調べた。光処理を行わない場合でも、KNBN12, KNBN18 等は市販カチオン脂質系遺伝子導入剤（Lipofectin）の5倍以上の効率を示した。また、KNBN12,

RNBN12 は光処理によって効率が倍増した。光開裂残基を持たない類縁体では光照射の有無に関わらずトランスフェクション効率に変化はなかった。MTT法による細胞毒性評価では4つの光開裂性脂質は毒性が強く、特にKNBN12ではLipofectinの場合と比較して細胞生存率が半分以下であった。

細胞毒性の改善で更なる効率の高い脂質の創製が可能になると期待される。ニトロベンジル構造の光開裂反応のトランスフェクション効率向上への関与が示唆され、今後より詳細な遺伝子導入機構の解明を行う必要があると考えられる。

遺伝子徐放担体の分子設計：

ゼラチンへの重合性基の導入は水溶性カルボジイミドを用いた水溶液中での縮合反応により行った。各重合性基の導入量はいずれもゼラチン1分子あたり約30基であった。得られたゼラチンマクロマーはいずれも水に可溶であり、室温下で50%濃度においても高粘稠ではあるが流動性を保った。通常、未修飾のゼラチンでは室温下では濃度約20%が流動性を示す上限の濃度であり、30%では熱可逆的にゲル状態となる。コラーゲンを加熱処理等により構造を解離させ水に可溶化させた熱変性体がゼラチンである。しかし、高濃度や冷温下ではゼラチン鎖の一部が分子間でコラーゲン様のヘリックス構造を形成するため、その部分が架橋点となりゲル形成する。そのため室温下でゼラチン水溶液の濃度を約20%以上に上げることは出来なかった。今回合成したゼラチンマクロマーはゼラチン側鎖にアクリレート基やスチレン基が導入されているため、ゼラチン分子が本来有していたヘリックス構造形成能が阻害され、より高濃度での溶解が可能となったと考えられる。

一方、共架橋により力学的強度を付与する目的で使用してきたPEGマクロマーとの相溶性はこれまで用いてきたベンゾフェノン化ゼラチンなどと同様に悪かった。ゼラチンマクロマーとPEGマクロマーとの総溶質重量が約50%を越えると白濁あるいは層分離を起こした。従って、総溶質重量が約50%以下の範囲内で各要素材料の混合組成比は調節可能であった。

ゼラチンマクロマーの水溶液にカルボキシル化カンファキノンを添加し、可視光を照射すると、アクリレート化ゼラチンではほとんど変化なかったが、スチレン化ゼラチンでは1分の照射でゲルを生成した。疎水性の高いスチレン基が水溶液中において疎水相互作用により会合したことにより効果的に重合が進んだものと考えられる。ゲル化率は溶質の濃度の増加、照射時間の延長に伴って増した。濃度40%のスチレン化ゼラチンに5分照射行くと溶質のほぼ全量がゲル化した。また、スチレン化ゼラチンの組

成の一部を PEG マクロマーに変えるとゲル化率はほとんど変化なかったが、生成したゲルの膨潤度の大幅な低下をもたらした。PEG マクロマーの添加により生成ゲルの架橋密度が上昇したと考えられる。一方、スチレン化アルブミンの硬化性はスチレン化ゼラチンとほぼ同程度であった。しかし、スチレン化アルブミンはゼラチンに比べより高濃度に水に溶解させること、および PEG を混合させることが可能であったため、照射時間 1 分でほぼ完全にゲル化させることができた。

血管内遺伝子導入デバイスの開発：

ステントを遺伝子や薬物を包埋したハイドロゲルでコーティングすることにより薬物徐放機能の付与について検討した。ハイドロゲルの固定化には先に開発したスチレン化マクロマーからなる可視光硬化性材料を利用した。光硬化性材料を用いてステント表面へのハイドロゲル層の固定化を行い、ステントの機械的な拡張機能に加えて、局所での薬物投与や遺伝子導入機能を付与することによる、ステントの高機能化が得られた。

ステント金属表面にコーティングされたハイドロゲルはステント金属とは結合していないが、金属を取り囲んでいるため容易に脱落することは無かった。また、蛋白質や遺伝子を混合した状態においても光ゲル化させることができ、これらは生成したゲル内部に包埋された。アルブミン包埋化コーティングステントを血管モデルとして用いたハイブリッド人工管状組織体内に留置すると時間依存的に組織内への浸透が観察された。包埋された蛋白質が徐々に放出された結果と考える。

また、AdLacZ ウイルスを包埋したコーティングステントにおいては約 3 週間に渡ってほぼ連続的な遺伝子発現が観察された。アデノウイルスの遺伝子発現は一過性であり通常細胞に感染した後、約 1 週間で最大となることが報告されている。従って、ゲル内に包埋されたウイルスは徐々に放出されて、細胞に連続的な感染が起こったことにより、遺伝子発現が長期的に渡って持続したものと考えられる。光硬化性材料の組成の最適化により、より長期間に渡る薬物の徐放や遺伝子導入が可能と考えられる。

気管内投与による組織選択的遺伝子導入：

ポリエチレンイミンと DNA のコンプレックスは、電子顕微鏡で直径 30-50nm の均一な小粒子を認めた。マウス気管内投与により、linear なポリエチレンイミンを用いた DNA とのコンプレックスにより肺に特異的に遺伝子発現を認めた。原発性肺高血圧症モデルラットに対し、アドレノメデュリン遺伝子導入により、治療効果を認めた。

HVJ 膜ベクターを用いた遺伝子導入：

心筋虚血再灌流障害に対する耐性の獲得をめざし、心保存中のドナー心への HVJ-liposome 法による遺伝子導入にて、HSP70 の遺伝子を導入しその効果を検討した。Western blotting にて HSP 遺伝子導入群では明らかに高度の HSP70 の発現が確認された。さらに Langendorff 灌流装置を用いた検討において、37°C・30 分間の虚血後の left ventricular developed pressure の回復率、coronary flow の回復率、CPK 漏出量のいずれもが HSP 遺伝子導入群において非導入群に対し有意に良好であった。HSP70 を用いた心臓に対する遺伝子治療の可能性が示唆されたと考えられる。

また、冠動脈バイパス術等に用いられてきた静脈グラフトは遠隔期に新生内膜肥厚による血管狭窄病変(VGD)を惹起するが、摘出静脈を自家移植する過程で静脈グラフトへの HVJ-liposome 法による遺伝子導入で、VGD における SMC の分化制御を検討した。成熟家兔摘出静脈グラフトにおいて、細胞周期抑制因子 senescent cell-derived inhibitor1(Scd1;p21)を遺伝子導入し、自家移植 2 週間後に内膜肥厚を検討した。Control 群では、グラフト壁全周性に新生内膜が肥厚形成されたのに比し、Scd-1 導入群では内膜肥厚の有意の抑制と PCNA 陽性胎児型平滑筋細胞の有意の減少を認めた。静脈グラフトにおける VGD の抑制には Scd-1 等の細胞周期抑制因子等による遺伝子治療が有効である可能性が示唆された。

さらにヒト大伏在静脈グラフトへの遺伝子導入を試み、CABG 施行時に採取した余剰 SVG(n=10)に、FITC 標識オリゴヌクレオチド (ODN) 及び Luciferase の cDNA を H 法で遺伝子導入し、7 日間組織培養を行った。SVG の内膜及び中膜において損傷はなく、FITC-ODN の SMC の核内局在を認め、組織培養上静中の Luciferase 活性を有意に認めた。

HVJ 膜ベクターを用いた新しい遺伝子導入法は、各種臓器への高効率・非侵襲・連続遺伝子導入が可能であるばかりでなく、DDS としても機能しうる。この導入法をもとに自己組織細胞および細胞外環境の機能向上をはかることが期待できる。

D. 結論

光照射によってカチオンを発生するマラカイトグリーン基を側鎖導入した水溶性高分子は、光照射によって DNA とイオンコンプレックス形成し、37°C に放置すると徐々に崩壊できることが示された。また、ニトロベンジルエステル基を有するカチオン脂質と DNA との複合体は光照射によって複合体の解離を能動的に起こさせることが可能であった。以上

の光反応性物質は、機能性ベクター材料として有用と考える。

また、ゼラチンマクロマーは、遺伝子の包埋・徐放担体として機能し、ステント表面に容易に固定化できることから遺伝子導入デバイスが作製できた。再狭窄防止用の血管内治療デバイスとして有用といえる。

気管内投与法により肺組織に限局した遺伝子導入を低侵襲的に行うことができた。循環器系疾患の中でも難治性の原発性肺高血圧症への新しい治療法の提供となる。

HVJ 膜ベクターを用いて、心筋保護液による心停止中に冠動脈より心臓全体への遺伝子導入法を開発し、実際心臓機能の変換賦活化に成功した。今後、人体に対する安全性や効率向上を含め更なる検討が必要であるが、手技的に臨床応用が容易であり、心臓外科領域における遺伝子治療を展開する新たな可能性を約束するものと思われる。

E. 健康危険情報

特に無し

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Nakayama, J. Y. Kim, S. Nishi, H. Ueno, T. Matsuda, Development of high-performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2001, 57, 559-566.
2. S. Kidoaki, Y. Nakayama, T. Matsuda, Measurement of the interaction forces between proteins and iniferter-based graft-polymerized surfaces with an atomic force microscope in aqueous media, **Langmuir**, 2001, 17, 1080-1087.
3. S. Kidoaki, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive structural change of poly(N-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope, **Langmuir**, 2001, 17, 2402-2407.
4. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts, **Biomacromolecules**, 2001, 2, 856-863.
5. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Material design for artificial extracellular matrix: cell entrapment in poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel, **J. Artif. Organs**, 2001, 4, 308-314.
6. T. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2001, 55, 266-276.
7. H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda, In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2002, 59, 233-245.
8. M. Kikuchi, H. Takita, Y. Nakayama, T. Matsuda, Y. Kuboki, Laser perforated collagen membrane: pore size-dependent bone induction as a new BMP carrier, **J. Hard Tissue Biology**, 2001, 9, 79-89.
9. W. G. Brodbeck, M. S. Shive, E. Colton, Y. Nakayama, T. Matsuda, J. M. Anderson, Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2001, 55, 661-668.
10. 中山泰秀, 松田武久, ステント開発における材料工学的設計, **神経進歩**, 2001, 45, 1026-1033.
11. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda, Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, **Langmuir**, in press.
12. Y. Nakayama, T. Kawada, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, **Biomaterials**, in press.
13. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: Heparin conjugated poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus, **Langmuir**, in press.
14. H. Sonoda, S. Urayama, C. Uyama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Measurement of the compliance of vessels with digital X-ray imaging system, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2002, 60, 191-195.
15. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi, Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model, **Cardiovascular Res.**, in press.

16. 長崎 健、第二世代に突入した合成ベクター開発、化学（2002）印刷中
 17. M. Harada-Shiba, K. Yamauchi, A. Harada, I. Takamisawa, K. Shimokado, K. Kataoka, Polyion complex micelles as vectors in gene therapy-Pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer- **Gene Therapy** in press
 18. R. Sugano, T. Yamamura, M. Harada-Shiba, Y. Miyake, A. Yamamoto. Uptake of oxidized low-density lipoprotein in a THP-1 cell line lacking scavenger receptor A. **Atherosclerosis**. 2001; 158 (2): 351-357.
 19. N. Kawasaki, A. Nakayama, T. Higashi, Y. Maeda, N. Yamamoto, S. Aiba, Studies on Poly[(acrylamide)-co-(ϵ -caprolactone)]: Synthesis, Characterization and Biodegradability, **Macromol. Chem. Phys.**, 202, 2231-2238 (2001)
 20. H. Sashiwa, S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki and S. Aiba, Production of N-Acetyl-D-glucosamine from β -Chitin by Enzymatic Hydrolysis, **Chem. Lett.**, 308-309 (2001)
 21. H. Sashiwa, N. Yamano, S. Fujishima, E. Muraki, N. Kawasaki, A. Nakayama, S. Aiba, Production of N-Acetyl-D-glucosamine from Chitin by Enzymatic Hydrolysis, **キチン・キトサン研究**, 7, 257-260 (2001).
 22. 中山敦好、川崎典起、山本 襄、前田育克、相羽誠一、生分解性ポリエステル合成と生分解性に及ぼす化学構造の影響、**日本化学会誌**、1-9 (2001)
 23. K. Suzuki, Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70 **Basic Research in Cardiology** 2000; 95(5): 397-403
 24. T. Sakaguchi, A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor- κ B in myocardial preservation **Annals of Thoracic Surgery** 2001; 71: 624-630
 25. Y. Kobayashi, Effect of gene transfection of human bcl-2 on graft coronary arteriosclerosis in hamster-to-rat cardiac xenografts **Transplantation Proceedings** 2001; 33: 751-752
 26. H. Ueda, A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats **Cardiovascular Research** 2001; 51: 41-50
2. 学会発表
 1. 奥田かんな、中山泰秀、松田武久、機能性ゼラチンの分子設計:リビングラジカル重合を利用したマルチスチレン化ゼラチンの合成と光ゲル化、第50回高分子学会年次大会(大阪)、2001年5月
 2. 鈴木貞信、平野義明、中山泰秀、松田武久、可視光表面ゲル固定化法の開発:プロトドナーを側鎖に有する親水性高分子の光ゲル化と表面固定、第50回高分子学会年次大会(大阪)、2001年5月
 3. 園田拓道、安井久喬、松田武久、高見沢計一、中山泰秀、二筒型コンプライアント人工血管の開発:移植による組織形態学および力学的変化の検討、高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京)、2001年7月
 4. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、機能性人工細胞外マトリックス設計:感温性ゼラチンゲル内での細胞の長期生存の可能性、高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京)、2001年7月
 5. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、ヘパリン固定化多孔質カバーステントの移植実験—その長期観察—、第39回日本人工臓器学会大会(大阪)、2001年11月
 6. 中山泰秀、高見沢計一、植田初江、澤芳樹、渋川貴規、山中ゆか、松田暉、生体内で成長する人工血管、第39回日本人工臓器学会大会(大阪)、2001年11月
 7. 園田拓道、高見沢計一、中山泰秀、城田利彦、安井久喬、松田武久、二筒型コンプライアント人工血管の開発:移植後の組織形態およびコンプライアンス変化の検討、第39回日本人工臓器学会大会(大阪)、2001年11月
 8. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、機能性人工細胞外マトリックス設計:細胞の長期生存性を与える感温性ゼラチンゲルの分子設計、第39回日本人工臓器学会大会(大阪)、2001年11月
 9. 星川淳人、満洲邦彦、中山泰秀、松田武久、小田弘美、中村耕三、可視光により自己硬化する光反応性ゼラチンは軟骨移植における担体として利用できる可能性がある、第16回日本整形外科学会基礎学術集会(広島)、2001年10月
 10. 星川淳人、織田弘美、中村耕三、満洲邦彦、中山泰秀、松田武久、軟骨細胞移植における担体としてのスチレン化ゼラチンの可能性、第23回日本バイオマテリアル学会、2001年10月
 11. 安田聡、野々木宏、中山泰秀、心血管インターベンションの現状と求められるバイオマテリアル、第23回日本バイオマテリアル学会、2001年10月

12. Kuboki Y, Kikuchi M, Takita H, Nakayama Y, Matsuda T, Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone-induction when used as a new BMP-carrier, 7th ICCBMT (FI), 2001, 11
13. Ohya S, Nakayama Y, Sonoda H, Matsuda T, Management of tissue adhesion prevention and hemostasis by thermoresponsive biopolymers, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11
14. Nishi S, Nakayama Y, Ueda H, Ishikawa M, Matsuda T, Development of a novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization; Application for extracranial aneurysm in *in vivo* experimental model, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11
15. ENHANCEMENT OF TRANSFECTION EFFICIENCY OF CATIONIC POLYAZOBENZENE DENDRIMER-DNA POLYPLEX BY UV IRRADIATION T. Nagasaki, K. Atarashi, N. Yoshida, S. Tamagaki, 28th International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, San Diego, USA (2001.6.23-27)
16. 中山敦好他、ナイロン-4 分解菌 ND-11 によるポリアミド類の分解、高分子討論会、2001、9.
17. 光応答性カチオン脂質を用いたトランスフェクション光制御、長崎 健、谷口晶宣、和田克利、玉垣誠三、第 17 回日本 DDS 学会、豊中 (2001.7.12-13)
18. 光応答性カチオン dendrimer を用いたトランスフェクション光制御、松本 恒平、林 由香、新 和之、玉垣誠三、長崎 健、第 17 回日本 DDS 学会、豊中(2001.7.12-13)
19. PHOTO-ENHANCEMENT OF GENE DELIVERY USING CATIONIC POLYAZOBENZENE DENDRIMER-DNA POLYPLEX, Takeshi Nagasaki, Kohei Matsumoto, Kazuyuki Atarashi, Seizo Tamagaki, 26th International Symposium on Macrocyclic Chemistry, Fukuoka(2001.7.15-20)
20. 光感受性カチオン脂質を含む遺伝子導入剤の開発、長崎 健・谷口晶宣・和田克利、第 16 回生体機能関連化学シンポジウム、千葉 (2001.9.20-21)
21. 新規カチオン性ポリアゾベンゼン dendrimer を用いたトランスフェクション活性光制御、松本恒平・新 和之・長崎 健、第 16 回生体機能関連化学シンポジウム、千葉(2001.9.20-21)
22. 光開裂性カチオン脂質の合成とそのトランスフェクション能、長崎 健・谷口晶宣、第 16 回生体機能関連化学シンポジウム、千葉 (2001.9.20-21)
23. 光分解性カチオン脂質を用いたトランスフェクション、長崎 健・谷口 晶宣、日本化学学会生命化学研究会シンポジウム、横浜(2001.12.13)
24. Polyion complex micelles as vectors in gene therapy. Pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer.
25. 斯波真理子、第 17 回 DDS 学会ワークショップ 遺伝子導入ベクターとしてのポリイオンコンプレックスミセル—*in vitro* および *in vivo* における遺伝子導入—
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得
「血管内拡張器具」中山泰秀、山田進、荒木修一、特許出願中
「イオン結合性生体接着剤」中山泰秀、山田進、荒木修一、特許出願中
「生体管接合材」中山泰秀、山田進、荒木修一、特許出願中
「筋肉注射による遺伝子治療の効果を増強する方法」に関し、特許出願準備中
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

分担研究報告書

光反応性機能性ベクターの開発に関する研究

分担研究者 中山泰秀 国立循環器病センター研究所生体工学部研究機器開発試験室長

研究要旨 遺伝子導入に用いられている合成高分子系ベクターは、ウイルス系ベクターに比べ一般に安全性が高いが発現効率が低いいため、広く臨床応用される障害となっている。遺伝子とベクターとのコンプレックス形成と解離を任意に操作することができれば、発現を制御することが可能となり、高効率化設計の一助となると期待される。一方、マラカイトグリーン(MG)のロイコ体は、紫外光照射によりイオン解離して水酸基アニオンを放出し、MG 分子内にカチオンを発生する熱可逆的なフォトクロミック化合物であり、光生成したイオン対は室温下で徐々に再結合されロイコ体へ戻る。本研究では、MG 基を側鎖に有する水溶性高分子を合成し、これを照射してポリカチオン化させ、ポリアニオンである DNA とコンプレックスを形成できるか、併せて、熱的にロイコ体に戻ることでコンプレックスが解離できるかについて調べ、機能性ベクターへの応用の可能性について検討した。4-ビニル安息香酸と4-プロモ-N,N-ジメチルアニリンから MG 化ビニルモノマーを合成し、これと N,N-ジメチルアクリルアミドとのラジカル共重合反応により MG 化水溶性高分子を得た（MG 基導入量：約 5~70mol%、分子量：約 2~9 万）。合成物は全て水溶性であった。水溶液に紫外光を照射すると、MG 基高導入量体（45mol%以上）を除いて数十秒でほぼ全量の MG がカチオン化され、また、1 時間程度室温に放置すると全て照射前に戻った。繰り返し可逆的に光イオン解離できた。MG 化高分子（導入率：5.2mol%）は未照射の中性体の状態において水溶液中で DNA と混合しても変化なかったが、あらかじめ紫外光を照射しておくことで DNA の添加により粒子が生成することを動的な光散乱測定により認めた。粒子は MG の有する蛍光が観察された。また、散乱強度測定により、照射時間とともに粒子数が増加することが分かった。この際、生成粒子のキュムラント平均粒径は約 150nm でほぼ均質であった。照射によってカチオン化された MG がポリアニオンである DNA と静電相互作用を起こし、MG 化高分子と DNA とのコンプレックスが形成されたと考える。一方、MG 基の導入量、ならびに高分子と DNA との混合比を変化させるとコンプレックス粒径は数百 nm の範囲で変化した。MG 基導入量が少ない高分子から形成されたコンプレックス粒子の数は経日的に減少した。MG のカチオン体は徐々にロイコ体へと戻るため、静電相互作用力が弱くなり形成されたコンプレックスが不安定化され、粒子の崩壊が起こったものと考えられる。コンプレックスの光形成と熱解離の可能性を認め、機能性ベクター開発の基盤材料が提供できた。

研究協力者 梅田真理子
龍谷大学理工学部

庄田香織
国立循環器病センター研究所
生体工学部

斯波真理子
国立循環器病センター研究所

A. 研究目的

非ウイルス性ベクターはポリアニオンである DNA に対してカチオン性脂質やカチオン性高分子電解質を添加しコンプレックスを形成させたものである。高分子量の DNA の電荷は化学量論的にポリマーにより中和され、溶解性が落ちてしまい沈殿、凝集が起こる可能性がある。また、非ウイルス性ベクターを用いて動物細胞内で外来遺伝子を発現させるためにはベクターは DNA のマイナス電荷を消

去すること、DNA 分解酵素から DNA を守ること、DNA を効率良く核へ移行させること、核の中で DNA がベクターから放出され、mRNA が遺伝子情報を読み取れる状態になるなど克服しなければならない点がある。

そこで、親水性基として *N,N*-ジメチルアクリルアミドを、高分子電解質としてマラカイトグリーンを用いた共重合体により、上記の問題点の克服を試みた。

マラカイトグリーンは紫外光を照射すると熱可逆的にイオン解離が起こり、分子内にカチオンを生成するという性質を持つ。このマラカイトグリーンを側鎖に持つ水溶性高分子を合成することで以下のことが期待できる。光照射するとカチオンが発生し、アニオン性である DNA とコンプレックスを形成し DNA のマイナス電荷を消去する。また、親水性基として *N,N*-ジメチルアクリルアミドを用いて共重合させることで溶解性を上げ凝集、沈殿を防ぐ。コンプレックス表面をポリマーが取り囲むため DNA が剥き出しで存在せず、DNA 分解酵素から DNA を守ることができる。また、マラカイトグリーンのカチオンによりベクター表面が正電荷に帯電しているため、負電荷に帯電している細胞表面でエンドサイトーシス(細胞膜の一部が陥入し、外液を包みこんでしまうこと)が起こり、細胞内に入ったベクターはエンドソームとなる。核内で熱的にマラカイトグリーンのカチオンの中性化が起こり、コンプレックスから DNA の放出が速やかに起こる。

本研究では、マラカイトグリーンを側鎖に持つ親水性高分子を合成し、光照射することでコンプレックスを形成させ、熱により DNA を放出させることができる機能性ベクターの開発を目的とした。

B. 研究方法

試薬：

4-Vinylbenzoic acid, 4-Bromo-*N,N*-dimethylaniline は東京化成工業より購入した。Oxalyl chloride, Tetrahydrofuran, ナトリウム、ベンゾフェノン、*N,N*-Dimethylacryl-amide, *n*-Butyl Lithium Hexane Solution, その他の試薬や溶媒は和光純薬工業株式会社(大阪)より購入した。

Methyl 4-vinylbenzoate の合成：

Oxalyl chloride (21.4g, 169mmol, MW. 126.92)に 4-Vinylbenzoic acid (5g, 33.7mmol, MW. 148.16)を氷冷下で攪拌しながら加え、室温で攪拌を続けた。8 時間後、反応溶液をアスピレーターで 2 時間、さらにポンプで一晩減圧し、未反応の Oxalyl chloride を除去した。残留物にクロロホルムを加えて不溶物を濾別し、濾液をエバポレーターで濃縮した。残留物を真空乾燥することにより塩化

4-ビニルベンゾイルを得た。得られた塩化 4-ビニルベンゾイルは精製せずに次の反応に用いた。

塩化 4-ビニルベンゾイルの粗生成物に氷冷下で脱水メタノール (50 ml)を加えて一晩攪拌した後、反応溶液を濃縮して、真空乾燥し Methyl 4-vinylbenzoate を得た。(収量 5.06g 収率 93 %) ¹H-NMR (300MHz, CDCl₃) δ 3.91 (s, 3H, COOCH₃), 5.38(d, 1H, *J*=10.2Hz, *trans*-H of PhCH=CH₂), 5.86 (d,1H, *J*=17.4Hz, *cis*-H of PhCH=CH₂), 6.75(q,1H, *J*=10.8 Hz, PhCH=C), 7.46(d, 2H, *J*=8.7Hz, *o*-H of PhC=C), 7.99 (d, 2H, *J*=8.1Hz, *m*-H of PhC=C)

Diphenyl(4-vinylphenyl)methane leucohydroxide(ビニル(マラカイトグリーン), DVL)の合成：

あらかじめ水酸化カリウムを入れて予備乾燥させた Tetrahydrofuran (THF; 400ml)をデカンテーションにより三口フラスコに移した。その THF に細かく短冊状に切ったナトリウム(約 1.13 cm³)とスパチュラ 1 杯のベンゾフェノンを加えた。溶液をオイルバスにて還流し、溶液が青くなった状態でさらに 1 時間還流した。蒸留により THF を分取し、脱水 THF を得た。以下の反応ではこの THF を用いた。

4-Bromo-*N,N*-dimethylaniline (12.33 g, 61.7 mmol)の THF 溶液(115ml)をアルゴン気流下においてドライアイス/メタノールバス中で -78℃に冷却した。冷却下でその溶液に *n*-butyllithium のヘキサン溶液 (1.6 mol%, 48 ml, 77.0 mmol)と Methyl 4-vinylbenzoate (5.0 g, 30.8 mmol)を含む THF 溶液(67 ml)を加え、反応溶液を攪拌下で室温までゆっくり戻した。さらに室温で一時間攪拌後、反応溶液をエバポレーターで濃縮し、得られた残留物に水(150ml)を加え、1 N HCl で中和した。溶液をジクロロメタン(350ml)で抽出 (3 回)し、抽出液に硫酸マグネシウムを加えて一晩乾燥した。濾過後、エバポレーターで濾液を濃縮し、得られた濃緑色のオイルに 1N NaOH を少量加えたメタノールを加え、生成した淡緑色の固体を濾取した後、真空乾燥し、Diphenyl(4-vinylphenyl)methane leucohydroxide を得た。(収量 4.79 g 収率 42 %) ¹H-NMR (300 Hz, CDCl₃): δ 2.94 (s, 6H, N(CH₃)₂), 5.21 (d, *J*=10.8Hz, 1H, *trans*-H of PhCH=CH₂), 5.72 (d, *J*=16.2Hz, 1H, *cis*, H of PhCH=CH₂), 6.65 (d, *J*=8.1Hz, 4H, *m*-H of NPh), 6.74 (d, *J*=10.8Hz, 1H, PhCH=C), 7.12 (d, *J*=9.0Hz, 4H, *o*-H of NPh), 7.28 (d, *J*=9.0Hz, 2H, *o*-H of PhC=C) 7.34 (d, *J*=9.0Hz, 2H, *m*-H of PhC=C)

DVLとDMAAmの共重合体の合成：

典型例を示す。Diphenyl (4-vinylphenyl) methane leucohydroxide (0.145 g, 0.39 mmol) と *N,N*-Dimethylacrylamide (DMAAm) (3.86 g, 39 mmol) を含むベンゼン溶液に2,2'-アゾビス(イソブチロニトリル) (AIBN, 0.033 g, [モノマー]/[AIBN] = 200) を加えた。そのベンゼン溶液を凍結、脱気、解凍操作を3回繰り返した後、脱気封管し、恒温振とう器を用いて60℃で振とうした。17時間後、反応溶液をエーテル(1 L)に攪拌しながら滴下した後、30分間放置し、析出物を沈殿させた。溶液から上澄み液をデカンテーションにより除去した。沈殿物に再びエーテル(500ml)を加えて1時間攪拌した後、30分間放置し、デカンテーションを繰り返した。沈殿物にヘキサン(500ml)を加えて1時間攪拌し、得られた白色固体のマラカイトグリーン化水溶性高分子を濾取後真空乾燥した。(収量：2.47 g, 収率 61.8%) ¹H-NMR (300 Hz, CDCl₃) δ 2.78-2.90 付近 (PhN(CH₃)₂, CON(CH₃)₂), 6.60-6.65 付近 (*m*-H of NPh), 7.20-7.25 付近 (*o*-H of NPh)。

DNAの合成：

キアゲン miniprep kit と gigaprep kit の合成プロトコールにそって行った。

コンプレックスの作成法：

共重合体 (5 mg, DVLの導入率 5.23%) を含む Tris-HCl Buffer (500 μl, pH 7.4) から 83.8 μl を分取し、Tris-HCl Buffer (5916 μl) で希釈した。その希釈溶液 (1080 μl) に UV-D33S カラーフィルターを通した紫外光 (1.0 mW/cm²) を照射し、pGL3 control プラスミド (920 μl) と混合した。37℃の恒温槽内において分散液の紫外可視吸収スペクトルと動的光散乱(DLS)を測定した。

分析測定方法：

¹H-NMR の測定は、NMR spectrometer (300MHz, Gemini-300, Varian) で測定した(内部標準：TMS (0 ppm)、室温、溶媒：CHCl₃-d)。

紫外可視吸収スペクトルの測定は、Ubest-30 (日本分光工業株式会社、東京) で測定した。

分子量の測定は、ゲル浸透クロマトグラフィー (HLC-8020 (東ソー株式会社、東京) で測定した(流速：0.5 ml/min、カラム温度：40℃)。カラムは Tosoh TSKgel α-3000、α-5000 を用いた。溶離液として DMF を用いた。分子量測定には標準ポリエチレングリコールを用いた。

DLS の測定は、ELS-8000 (大塚電子株式会社) で測定した。

DVL と DMAAm の共重合体の DVL の導入率の算出は、紫外可視吸収スペクトルと ¹H-NMR により求めた。紫外可視吸収スペクトルは各共重合体(1 mg) を含む 0.025 N HCl 溶液(1 ml) の原液を調製し、620 nm 付近の吸収極大波長における吸光度が 0.5 程度になるように希釈した。各溶液の吸収スペクトルを測定し、620nm 付近の吸収極大波長の吸光度を測定し、DVL のモル吸光係数を元にランベルトベールの法則 ($A = \epsilon \cdot c \cdot l$) を用いて算出した。¹H-NMR は積分比より導入率を算出した。

共重合体の光反応性の評価は以下に行った。共重合体 3 (1 mg) を含む水 (1 ml) の原液を調製し、620 nm 付近の吸収極大波長における吸光度が 0.5 程度になるように希釈した。希釈溶液を水酸化ナトリウムと塩酸を用いて pH 7 または 8、9 となるように調製し、UV-D33S カラーフィルターを通して紫外光 (1 mW/cm²) を 5 秒間照射して紫外可視吸収スペクトルを測定した。この紫外光を照射して吸収スペクトルを測定する操作を 620 nm 付近の吸収極大波長が変化しなくなるまで繰り返した。また、共重合体 4、5、6 については各共重合体 (1 mg) を含む 0.025 N HCl 溶液の原液を調製し 620 nm 付近の吸収極大波長における吸光度が 0.5 程度になるように希釈し、さらに pH 7 に調製した後、上記に示した紫外光を照射して紫外可視吸収スペクトルを測定する操作を 620 nm 付近の吸収極大波長が変化しなくなるまで繰り返した。また、吸収極大波長が変化しなくなったところで塩酸ガスをサンプルに吹き込んで酸性にして紫外可視吸収スペクトルを測定した。

共重合体の熱安定性の評価は以下に行った。共重合体 3 (1 mg) を含む水溶液 (1 ml) の原液と共重合体 4 (1 mg) を含む 0.025N HCl 溶液 (1 ml) の原液をそれぞれ調整した。620 nm 付近の吸収極大波長における吸光度が 0.5 程度になるようにそれぞれの溶液を希釈した後、pH 7 に調整し、紫外光 (1 mW/cm²) を UV-D33S カラーフィルターを通して 45 秒間照射した。試料を 37 度に保ちながら紫外可視吸収スペクトルを 5 分おきに測定し、620 nm 付近の吸収極大波長が変化しなくなるまで繰り返した。再び紫外光を照射して吸収極大波長を観測し、これを数回くり返した。また、共重合体 3 を含む希釈した水溶液を pH 11.3 に調整し、上記のように紫外線を照射して 5 分おきに 620 nm 付近の吸収極大波長が変化しなくなるまで繰り返した。

生成したコンプレックスの個数の算出は以下に行った。ラテックス粒子 (粒径 204 nm、10wt%) を含む分散液 (2 ml) の散乱強度をピンホールを最も絞った状態で測定した。その分散液を 2、4、16、32、64 倍希釈して同じ条件で測定した。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面へ配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要におうじて国立循環器病センター内の倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究では、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を行い、説明と理解(インフォームドコンセント)を必ず書面にて確認した上で協力をお願いする。また、遺伝子解析などの研究内容を行う必要がある場合には、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成13年3月29日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号)を遵守する。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research)と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23)に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は国立循環器病センター付属の動物管理施設にて適切に一括管理される。

C. 研究結果と考察

DVLとDMAAmの共重合体の合成:

マラカイトグリーンのビニルモノマーを以下のように合成した。4-ビニル安息香酸にオキサリクロライドを反応させて酸クロライドを生成した後、メチルエステルである4-ビニル安息香酸メチルを得た。この化合物の同定は¹H-NMRを用いて行った。

次に *n*-butyllithium を含む THF 溶液中で 4-ビニル安息香酸メチルと 4-ブromo-*N,N*-ジメチルアニリンを反応させて、マラカイトグリーンのビニルモノマーを得た。このビニルモノマーの同定は¹H-NMRを用いて行った。

マラカイトグリーンのビニルモノマーと DMAAm の共重合体は、AIBN を重合開始剤としてベンゼン溶液中において、60℃の恒温振とう器で 17 時間振とうさせることによりラジカル重合させて行った。共重合体は、エーテル中に 2 回再沈殿させた後、ヘキサンで洗浄し、真空乾燥して得た。

モノマーの仕込み比を変えることにより導入率が約 3~70%の共重合体を得た。

共重合体のマラカイトグリーンの導入率は、紫外可視吸収スペクトルと¹H-NMRより求めた。紫外可視吸収スペクトルは、ランベルトベールの法則よりマラカイトグリーン基の濃度(マラカイトグリーンのモル吸光係数 $\epsilon = 1.42 \times 10^4$)と溶液濃度より算出した DMAAm の濃度の比を求めることにより共重合比を算出した。また、¹H-NMR の積分比よりマラカイトグリーンの導入率を算出した。NMR と UV からそれぞれ算出した導入率は、仕込み率が低

い共重合体は大きく異なるが仕込み率が高い共重合体はほぼ等しくなった。どの共重合体も仕込み率よりマラカイトグリーンの導入率が高くなった。これは、マラカイトグリーンのほうが DMAAm より反応性がよいためと考えられる。

分子量は、各試料(1 mg)を含む DMF 溶液(1 ml)を調製し、ゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)を測定することにより求めた。共重合体 3 だけ分子量が大きくなった。また全体的に分散度も非常に大きくなった。

共重合体の光反応性の評価:

共重合体を含む水溶液を塩酸と水酸化ナトリウムを用いて pH 7 および 8, 9 に調製し光反応性を評価した。

どの pH においても 620 nm 付近に吸光度があり、完全にロイコ体になっていなかった。すべての水溶液は紫外光を照射してすぐに 620 nm 付近の吸光度が変化し、照射後 30~35 秒でほとんど変化しなくなった。その後、塩酸ガスを水溶液に吹き込み酸性にした後で吸光度を測定したが、620 nm 付近の吸光度に変化が見られなかったため、共重合体中のマラカイトグリーンのロイコ体が光照射により完全にカチオン化されたことを示している。

一方、マラカイトグリーンの高導入化共重合体を含む溶液は、pH 7 に調製し、紫外光を照射したが吸光度に変化が見られなかった。しかし、塩酸を水溶液に吹き込み酸性にして吸光度を測定すると 620 nm 付近の吸光度が上がった。

以上より、マラカイトグリーンの導入率が低いと光反応性を示すが、導入率がある程度増えると光反応性を示さないことがわかった。このマラカイトグリーンの導入率が増えると光反応性を示さなくなる原因として、共重合体が水溶液中でミセルとなり、マラカイトグリーンが密集して存在するため、紫外光を照射してもエネルギーが移っていくだけでカチオン化されなかったためと考えられる。

共重合体の熱安定性の評価:

光応答性の評価よりマラカイトグリーン高導入化共重合体については紫外光を照射しても吸光度に変化が見られなかったため熱安定性の評価については低導入化共重合体だけを行った。紫外光(1 mW/cm²)を照射して 620 nm 付近の吸光度が飽和に達したことを確認してから 37℃に保った恒温槽内で 5 分おきに吸光度を測定した。どの共重合体もすぐに吸光度が下がり始めて、約 40 分で吸光度が変化しなくなった。しかし、吸光度は完全に無くならなかった。

pH 7 の水溶液においては紫外光を照射しない状態でも完全にマラカイトグリーンがロイコ体になっ

ていないことから、水溶液を pH 11 に調製しマラカイトグリーンを完全にロイコ体にしてから熱安定性を評価した。紫外光を照射して約 10 分で吸光度がなくなったので、マラカイトグリーンは塩基性では熱的に完全にロイコ体に戻ることが示された。

また、紫外光を繰り返し照射しても、もとの飽和状態に戻り熱的にロイコ体に戻ることが観測された。よって、溶液の pH にかかわらず繰り返し耐久性は良いことが示された。

プラスミドと共重合体とのコンプレックスの粒径測定：

ある粒子は溶液中でブラウン運動により、位置や方位、形態を変化させている。そのため、溶液中の粒子で懸濁している系に散乱光を入射するとその散乱強度は、粒子のブラウン運動により時間的に変化する。動的光散乱（DLS）はこれを利用することで粒子の並進拡散係数を求め、そこから Einstein-Stokes の式 ($d=kT/(3\pi\eta_0D)$)、 d ：流体力学的径（ストークス径）、 k ：ボルツマン定数、 T ：絶対温度、 η_0 ：溶媒の粘度）を用いて粒子径を求める。解析法は 2 つあり、平均粒径と多分散指数を導き出すキュムラント解析と粒径分布を導き出すヒストグラム解析がある。ヒストグラム解析より求める粒径には散乱強度から導き出される分布と個数および重量から導かれる分布がある。個数および重量から導き出される粒径は散乱強度から導かれる分布にそれぞれの係数をかけて求められるため散乱強度より求めた分布の粒径を用いて実験を進めた。

コンプレックスの形成：

マラカイトグリーンのカチオンの個数とプラスミドのアニオンの個数の比 r ($r=[\text{カチオン}]/[\text{アニオン}]$) が 1 となるように分散液を調製し、紫外光を照射せずに DLS を測定した。しかし、測定するのに足りる光量が得られず測定できなかった。一方、同じサンプルに UV-D33S カラーフィルターを通した紫外光 ($1.0\text{mW}/\text{cm}^2$) を 10 秒間照射し、再び DLS を測定した。再測定では、測定できるだけの光量が得られたため、マラカイトグリーンがカチオンとなりコンプレックスが形成したことが示された。キュムラント解析より平均粒径 141.2 nm、多分散指数 0.36、ヒストグラム解析より主生成粒子の粒径 141.9 nm であった。

コンプレックスの粒子数の見積もり：

DLS の散乱強度は粒子の濃度と粒径に影響される。そこで、分散液中に存在する粒子数を知るために標準溶液であるラテックス粒子（204 nm、10wt%）を含む分散液を 2、4、8、16、32、64 倍に希釈し、ピンホールを一番絞った状態で散乱強

度を測定した。分散液に含まれている粒子数を算出し、散乱強度に対してグラフを描くと一次関数となった。粒径が約 200nm の粒子で多分散指数が低いサンプルに限りこの一次関数をもとに同じ条件で散乱強度を測定すると分散液中に含まれる粒子数を見当づけることができる。

プラスミドと共重合体を混合させるタイミング：

共重合体（マラカイトグリーン）の導入率：5.2%）を含む Tris-HCl Buffer（pH7.4）を調製した。紫外光を照射し、マラカイトグリーンをカチオンにしてから Buffer を加えて希釈した後、プラスミドを混合した分散液（1）、もう一方は紫外光を照射し、そこにプラスミドを混合してから希釈した分散液（2）を作った。両方の分散液の時間による DLS を測定した。

分散液（1）は混合した直後から 10 時間までは非常にばらついた粒径となった。一方、分散液（2）は粒径に多少のばらつきがあるものの一晩後の粒径とほとんど変わらず早く安定となった。また、両分散液のコンプレックスとも、一晩後には粒径がほとんど等しくなった。よって、希薄系でカチオンが存在するとき、高濃度でカチオンが存在するときでは、粒径の安定性に差があり、高濃度でカチオンが存在するときにコンプレックス形成させる方がより早く安定になることが示された。

共重合体の選択：

共重合体の光応答性の評価より導入率の高い（45、68%）共重合体は光応答性を示さないので導入率が低い（2.9、4.1、5.2、19%）共重合体を用いてプラスミドとコンプレックスを形成させた。カチオンとプラスミドのアニオンの比が等しくなるように調製し DLS を測定した。

導入率 19%の共重合体とのコンプレックスのキュムラント粒径が約 400 nm、ヒストグラム粒径は約 270 nm と共に最も高くなり粒子数が最も低くなった。導入率が 2.9、4.1、5.2%の共重合体のコンプレックスはキュムラント粒径およびヒストグラム粒径ともに約 150 nm の粒径を形成した。粒子数は各導入率ともに差はなかった。

これまでの各種非ウイルスベクターの研究において粒径が遺伝子の発現効率に大きな影響を及ぼすと報告されており、一般的にその粒径は小さいほうが発現効率が良いと言われている。そのため、本実験において粒径が小さく、粒子数も多数形成する導入率の低い共重合体を用いて実験を進めることにした。

コンプレックスの安定性：

共重合体（マラカイトグリーン）の導入率：

5.2%) を含む Tris-HCl Buffer (pH7.43) に UV-D33S カラーフィルターを通した紫外光 (1.0mW/cm², 150 sec) を照射し飽和状態にした後、プラスミドを混合し DLS を測定した。キュムラント粒径は共重合体とプラスミドを混合した直後から5時間後まで約 150 nm と安定した値を示した。また、多分散指数も約 0.6 とやや高い値を示しているが時間変化では安定していた。一方、生成粒子のヒストグラム粒径は約 110 から約 200 nm まで徐々に増加した。

粒子数の変化：

共重合体 (マラカイトグリーンの導入率：5.2%) を含む Tris-HCl buffer (pH8.2) に UV-D33S カラーフィルターを通した紫外光 (0.75mW/cm²) を照射した。アニオンとカチオンの比が等しくなるようにプラスミドを混合し、各照射時間によりコンプレックスの粒子数の変化を算出した。

照射回数が増えるごとに散乱強度が増加していったため、粒子数も増加した。キュムラント解析より求めた平均粒径は照射回数が増えても約 150 nm とほぼ安定して、多分散指数も約 0.5 で安定した。一方、ヒストグラム解析より求めた粒径は、約 100 nm から約 150 nm とばらつきがあるものの照射回数が増えても、粒径が大きく変化することは無かった。以上より、照射回数が増えるごとに粒子数は増加するが粒径は変化しないことが示された。つまりカチオンの増加にともなって同じ径の粒子が増加していくことが示された。

混合比を変えた時の粒径変化：

共重合体 (マラカイトグリーン基の導入率：5.2%) の量を一定にしてプラスミドの量を増加させ、各比における DLS を測定した。アニオンの量が増えるごとにキュムラント粒径は増加していきヒストグラム粒径は減少していった。

コンプレックス形成への光制御：

本研究の目的は、紫外光を照射して共重合体中のマラカイトグリーン基をカチオンにし、DNA とコンプレックス形成させ、熱でマラカイトグリーン基がロイコ体に戻るによりコンプレックスから DNA を放出させることである。そのため、マラカイトグリーン基のカチオンとプラスミドのアニオンの比 ($r=[\text{カチオン}]/[\text{アニオン}]$) を変化させて、マラカイトグリーンがコンプレックスを形成したあと熱でロイコ体に戻るかを紫外可視吸収スペクトルを用いて調べた。

$r < 1$ のとき吸光度はほとんど下がらなかった。つまりマラカイトグリーンのロイコ体へ戻りが悪

かった。一方、 $r > 1$ のとき吸光度は 40 % まで下がり熱安定性の評価と等しくなった。吸光度は r にかかわらず、2 時間で変化しなくなった。

$r < 1$ のときロイコ体への戻りが遅いのはカチオンに対してアニオンが非常に多く存在するため水酸化物イオンがプラスミドのリン酸基にブロックされマラカイトグリーンがロイコ体に戻りにくいと考えられる。また、 $r > 1$ のときはカチオンが多く存在するためロイコ体に戻りやすいと考えられる。また、照射前と照射後から 4 日後の散乱強度を測定したところ徐々に散乱強度が下がり粒子数が減少していることを示した。

D. 結論

光照射によってカチオンを発生するマラカイトグリーン基を側鎖に導入した水溶性高分子は、光照射によって DNA とイオンコンプレックス形成し、37℃ 下で保持すると徐々に崩壊することを示した。コンプレックス形成量は、照射条件や高分子組成により調節が可能であり、機能性ベクター材料として有用と考える。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

論文発表

27. Y. Nakayama, J. Y. Kim, S. Nishi et al., Development of high-performance stent: gelatinous photogel-coated stent that permits drug delivery and gene transfer, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2001, 57, 559-566.
28. S. Kidoaki, Y. Nakayama, T. Matsuda, Measurement of the interaction forces between proteins and iniferter-based graft-polymerized surfaces with an atomic force microscope in aqueous media, **Langmuir**, 2001, 17, 1080-1087.
29. S. Kidoaki, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive structural change of poly(N-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope, **Langmuir**, 2001, 17, 2402-2407.
30. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts, **Biomacromolecules**, 2001, 2, 856-863.
31. S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Material

- design for artificial extracellular matrix: cell entrapment in poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel, **J. Artif. Organs**, 2001, 4, 308-314.
32. T. Sonoda, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Small-diameter compliant arterial graft prosthesis: design concept of coaxial double tubular graft and its fabrication, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2001, 55, 266-276.
33. H. Okino, Y. Nakayama, M. Tanaka, T. Matsuda, In situ hydrogelation of photocurable gelatin and drug release, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2002, 59, 233-245.
34. M. Kikuchi, H. Takita, Y. Nakayama, T. Matsuda, Y. Kuboki, Laser perforated collagen membrane: pore size-dependent bone induction as a new BMP carrier, **J. Hard Tissue Biology**, 2001, 9, 79-89.
35. W. G. Brodbeck, M. S. Shive, E. Colton, Y. Nakayama, T. Matsuda, J. M. Anderson, Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2001, 55, 661-668.
36. 中山泰秀, 松田武久, ステント開発における材料工学的設計, **神経進歩**, 2001, 45, 1026-1033.
37. Y. Nakayama, M. Sudo, K. Uchida, T. Matsuda, Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization, **Langmuir**, in press.
38. Y. Nakayama, T. Kawada, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, **Biomaterials**, in press.
39. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakayama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: Heparin conjugated poly(*N*-isopropylacrylamide) at one terminus, **Langmuir**, in press.
40. H. Sonoda, S. Urayama, C. Uyama, K. Takamizawa, Y. Nakayama, H. Yasui, T. Matsuda, Measurement of the compliance of vessels with digital X-ray imaging system, **J. Biomed. Mater. Res.**, 2002, 60, 191-195.
41. S. Yasuda, T. Noguchi, M. Gohda, T. Arai, N. Tsutsui, Y. Nakayama, T. Matsuda, H. Nonogi, Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model, **Cardiovascular Res.**, in press.
- 学会発表
26. 奥田かなな, 中山泰秀, 松田武久, 機能性ゼラチンの分子設計: リビングラジカル重合を利用したマルチスチレン化ゼラチンの合成と光ゲル化, 第50回高分子学会年次大会(大阪), 2001年5月
27. 鈴木貞信, 平野義明, 中山泰秀, 松田武久, 可視光表面ゲル固定化法の開発: プロトンドナーを側鎖に有する親水性高分子の光ゲル化と表面固定, 第50回高分子学会年次大会(大阪), 2001年5月
28. 園田拓道, 安井久喬, 松田武久, 高見沢計一, 中山泰秀, 二筒型コンプライアント人工血管の開発: 移植による組織形態学および力学的変化の検討, 高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京), 2001年7月
29. 大屋章二, 中山泰秀, 松田武久, 機能性人工細胞外マトリックス設計: 感温性ゼラチンゲル内での細胞の長期生存の可能性, 高分子学会第30回医用高分子シンポジウム(東京), 2001年7月
30. 西正吾, 中山泰秀, 植田初江, 松田武久, ヘパリン固定化多孔質カバーステントの移植実験—その長期観察—, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
31. 中山泰秀, 高見沢計一, 植田初江, 澤芳樹, 渋川貴規, 山中ゆか, 松田暉, 生体内で成長する人工血管, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
32. 園田拓道, 高見沢計一, 中山泰秀, 城田利彦, 安井久喬, 松田武久, 二筒型コンプライアント人工血管の開発: 移植後の組織形態およびコンプライアンス変化の検討, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
33. 大屋章二, 中山泰秀, 松田武久, 機能性人工細胞外マトリックス設計: 細胞の長期生存性を与える感温性ゼラチンゲルの分子設計, 第39回日本人工臓器学会大会(大阪), 2001年11月
34. 星川淳人, 満洲邦彦, 中山泰秀, 松田武久, 小田弘美, 中村耕三, 可視光により自己硬化する光反応性ゼラチンは軟骨移植における担体として利用できる可能性がある, 第16回日本整形外科学会基礎学術集会(広島), 2001年10月
35. 星川淳人, 織田弘美, 中村耕三, 満洲邦彦, 中山泰秀, 松田武久, 軟骨細胞移植における担体としてのスチレン化ゼラチンの可能性, 第23回日本バイオマテリアル学会, 2001年10月

36. 安田聡、野々木宏、中山泰秀、心血管インターベンションの現状と求められるバイオマテリアル、第 23 回日本バイオマテリアル学会、2001 年 10 月
37. Kuboki Y, Kikuchi M, Takita H, Nakayama Y, Matsuda T, Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone-induction when used as a new BMP-carrier, 7th ICCBMT (FI), 2001, 11
38. Ohya S, Nakayama Y, Sonoda H, Matsuda T, Management of tissue adhesion prevention and hemostasis by thermoresponsive biopolymers, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11
39. Nishi S, Nakayama Y, Ueda H, Ishikawa M, Matsuda T, Development of a novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization; Application for extracranial aneurysm in *in vivo* experimental model, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11
- G. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
- 「血管内拡張器具」中山泰秀、山田進、荒木修一、特許出願中
- 「イオン結合性生体接着剤」中山泰秀、山田進、荒木修一、特許出願中
- 「生体管接合材」中山泰秀、山田進、荒木修一、特許出願中
2. 実用新案登録
- 特になし
3. その他
- 特になし

分担研究報告書

光カチオン発生型水溶性高分子と細胞との相互作用に関する研究

分担研究者 植田初江 国立循環器病センター病理部 医長

研究要旨 紫外光照射によってカチオンを発生するマラカイトグリーン基を側鎖に有する水溶性高分子を合成し、遺伝子の細胞導入の基礎研究として、細胞との相互作用の光制御について検討した。この水溶性高分子はマラカイトグリーン基化スチレン誘導体とアクリルアミドとのラジカル共重合により合成した。カルシウム感受性蛍光色素であるエコーリンを細胞内に導入させ、細胞と高分子との相互作用の程度を蛍光量から算出した。未処理の高分子を細胞懸濁液に添加しても全く変化なかったが、紫外光照射した高分子を添加すると、蛍光が観測された。細胞膜がカチオン化された高分子の添加によって乱され、細胞内へのカルシウムの流入が起こったものと考えられる。蛍光量は紫外光の照射時間や強度によって調節することが可能であり、細胞との相互作用が光によって制御可能であることを示した。遺伝子を導入させる際、この高分子を用いれば、遺伝子導入量を光照射によって制御できると考えられる。機能性ベクター開発の基盤材料が提供できたといえる。

研究協力者 中山泰秀
国立循環器病センター研究所
生体工学部研究機器開発試験室長

A. 研究目的

カチオン性高分子は遺伝子とのコンプレックス形成能を有し、かつアニオン性である細胞膜との相互作用することで、エンドサイトーシス等によって細胞内に取り込まれることが知られている。従って、合成高分子系のベクターは、ほとんどがカチオン性高分子から構成されている。カチオン性が高いと遺伝子と安定したコンプレックスを形成しやすいが、細胞膜とも強く相互作用する可能性があり、血中に投与した場合には、投与部位の組織表面での局所濃度が高くなり、有効に目的部位に送達させることが困難である。カチオンの発生量を任意に調節することが出来れば、血中動態を制御することができ、遺伝子治療の有効性を向上させることができると期待される。

本研究では、紫外光照射によってイオン解離し、分子内にカチオンを発生するマラカイトグリーンの光反応性に着目し、これを分子内に有する水溶性高分子の合成を検討し、細胞膜表面との相互作用が光で制御出来るか検討を行った。相互作用の程度を調

べるために、カルシウム存在下で蛍光を発するタンパク質であるエコーリンを用いた。エコーリンを細胞内に導入した。細胞外にカルシウムを存在させておき、高分子との相互作用が起こり、細胞膜が乱れればカルシウムの細胞内への流入が起こり、蛍光が観測されることになる。

B. 研究方法

マラカイトグリーン誘導体は、光照射によりイオン解離し水酸基アニオンを放出し、分子内にカチオンを生成する。光解離型水溶性高分子（MG-AAm）は、にビニル基を導入したマラカイトグリーン誘導体とアクリルアミドとのラジカル共重合反応により合成した。高分子中への光反応性基の導入率は、弱酸性下において完全に解離させ、吸光度を比較することにより行った。

光照射にはフィルターを装着した高圧水銀灯から290nm以上の紫外光を用いた。

高分子との相互作用の測定はエコーリン法により評価した。細胞は牛大動脈由来血管内皮細胞を用い、DMSO法によりCa²⁺発光性蛋白質エコーリンを細胞内に封入した。高分子のみへ照射する間接照射による相互作用測定は2 mM Ca²⁺、2 mM Mg²⁺を含むPBS緩衝液からなる細胞浮遊液（約105個/mL）とし、37℃、1,000 rpmで暗所にて安定を保った後、1分後一定時間光照射したMG-AAmの1 wt% PBS緩衝液100 mLをマイクロシリンジで注入し、その後6分間の発光を計測し行った。その間、5分後に1% Triton

X-100 100 mL を添加し、残存するエコーリンを発光させて全発光量を測定した。発光量を流入量に換算し、全流入量に対する高分子による流入量の割合を求め、相互作用の強度を評価した。

細胞への直接照射による相互作用は、未照射の MG-AAm と細胞との共存浮遊液に直接光を照射し、作用させた直後に Triton X-100 を注入し、残存するエコーリンを発光させ、細胞のみの場合を対照とし比較評価した。細胞傷害性は高分子と作用させた後、トリパンブルー染色法により測定した。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面へ配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要におうじて国立循環器病センター内の倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。また、ボランティアを必要とする研究では、研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除を行い、説明と理解（インフォームドコンセント）を必ず書面にて確認した上で協力をお願いする。また、遺伝子解析などの研究内容を行う必要がある場合には、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号）を遵守する。

C, D. 研究成果と考察

合成した高分子（MG-AAm）が光イオン解離することは水溶液中での照射により吸収スペクトルが長波長側にシフトし、pH が上昇しアルカリに変化することから確認した。光反応性基を 0.4 mol% 含む MG-AAm を用いた場合、未照射のまま注入してもエコーリンの発光は全く見られなかったのに対し、予め照射した MG-AAm を注入すると、一過性の発光が生じた。細胞内への Ca^{2+} 流入量は照射時間の増加、つまり光解離し生成したカチオン量に比例して増加した。約 5 分以上の照射で飽和に達し、最大流入量の約 23 % の流入が観察された。さらに、注入する高分子濃度を増加させることでも流入量は増加し、10wt% 濃度で最大流入量の 9 割以上の流入が観察された。また、光反応性基含有率 1.6 mol% の MG-AAm を用いた場合、5 分の照射で最大流入量の約 55.5 % と多量の流入が観察された。

これらの結果より相互作用は、光照射時間、高分子の濃度変化、並びに高分子内に含まれる光反応性基の密度により制御可能であることが示された。

次に、細胞と高分子との共存浮遊液への直接照射効果を検討した。高分子のみへの照射実験の結果と同様に、照射時間の増加と共に Ca^{2+} 流入量は増加した。5 分の照射で最大流入量の約 35 %、10 分では

約 60 % が流入しており、照射時間依存性が観察された。

MG-AAm による細胞傷害性の有無を調べた。未照射、照射にかかわらず障害を受けたものは 1 割弱であり、生存能力は保持されていることが確認された。

E. 結論

光カチオン誘起水溶性高分子と細胞との相互作用が光制御できることを明らかとした。本光反応性高分子を用いれば、光照射（外的刺激）を与えることにより、選択的に、特定部位に、特定量の遺伝子を導入できる可能性がある。機能性遺伝子導入ベクターとして有用な材料が開発できたといえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

特になし

学会発表

40. 西正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、ヘパリン固定化多孔質カバーステントの移植実験—その長期観察—、第 39 回日本人工臓器学会大会（大阪）、2001 年 11 月

41. 中山泰秀、高見沢計一、植田初江、澤芳樹、渋川貴規、山中ゆか、松田暉、生体内で成長する人工血管、第 39 回日本人工臓器学会大会（大阪）、2001 年 11 月

42. Nishi S, Nakayama Y, Ueda H, Ishikawa M, Matsuda T, Development of a novel high-performance stent graft with micropores and heparin immobilization; Application for extracranial aneurysm in *in vivo* experimental model, 13th World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

2. その他

特になし