

分担研究報告書

遺伝子徐放担体材料の分子設計に関する研究

分担研究者 大屋章二 国立循環器病センター研究所生体工学部 室員

研究要旨 遺伝子にほとんど障害を与えることなく包埋できる遺伝子徐放担体材料の分子設計を行った。ゼラチンまたはアルブミンの側鎖に重合性基であるアクリレート基またはスチレン基を導入した高分子マクロマーを合成した。アクリレート化ゼラチンは未修飾ゼラチンと同様、室温下において濃度 20wt%以上でゲル状であった。一方、スチレン化ゼラチンは濃度 40wt%まで室温で流動性のある水溶液状態であった。これらは、別に水溶性重合開始剤として合成したカルボキシル化カンファキノンの存在下において、1分程度光照射すると弾力のある透明なヒドロゲルを生成した。ゲル生成能は高濃度化、照射の長時間化により増した。水溶液中においてスチレン基間の会合が起こったことによるものと考えられる。一方、スチレン化アルブミンは濃度 30wt%において5分程度の光照射により硬化したが、生成物は白濁しており脆弱で弾力はほとんど無かった。さらに濃度を上げて硬化性はほとんど変化無かった。また、全てのマクロマーの水溶液はいずれも PEG ジアクリレート（分子量約 1,000）を 10wt%程度混合するとゲル生成能が大幅に向上し、アルブミン誘導体においても透明な弾性ゲルを生成した。可視光照射によってゲル状に硬化させることが可能となり、遺伝子の包埋材料として有用と考えられる。

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

奥田かな  
国立循環器病センター研究所  
生体工学部

舛田 健  
国立循環器病センター研究所  
生体工学部

A. 研究目的

ゼラチンの化学修飾による光機能化により遺伝子や薬物の徐放担体材料、ならびに組織接着剤を含む創傷治癒促進材料、或いは組織工学における人工細胞外マトリックス材料への応用を検討している。これまでゼラチンの側鎖に対し、光反応性基としてベンゾフェノン基を導入することにより紫外光反応性ゼラチンを合成し、その水溶液への紫外光照射によりベンゾフェノン基に発生したラジカル間での再結合、あるいはまた、共存させた二官能性マクロマー（PEG ジアクリレート）とのグラフト共重

合により、架橋剤を用いることなく常温常圧下でゲル形成できる技術を開発した。これらはゲル硬化性や柔軟性に優れていたが、硬化手段として用いた紫外光が与える包埋物への傷害性が問題点として指摘されていた。

本研究では包埋物に与える傷害性の低減を目的として可視光照射によりゲル化できる材料の設計を行った。要素材料としてゼラチンあるいはアルブミンの側鎖に重合性基（アクリレート基やスチレン基）を導入することにより3種類の重合性蛋白質（アクリレート化ゼラチン、スチレン化ゼラチンとスチレン化アルブミン）を分子設計した。これらを水溶液、あるいはPEG ジアクリレートとの混合水溶液とし、水溶性光重合開始剤を用いて可視光照射によるラジカル重合によりゲル化できるか検討した。重合開始剤としてカンファキノンのカルボキシル基を導入したカルボキシル化カンファキノンをを用いた。カンファキノンは歯科領域において光重合レジン可視光重合開始剤として使用されており、これに可視光を照射すると近傍の分子からプロトンの引き抜き反応が起こり、ラジカルを発生させ、重合を開始する。各マクロマーの光硬化性をゲル化率と膨潤度測定から調べ、また、ゼラチンマクロマーについて生成ゲルの力学的物性を引っ張り試験

により、分解性をコラゲナーゼによる酵素分解により調べ、組織接着剤へ応用するための基礎的な評価を行った。

## B. 研究方法

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酸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。

### (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 日文科科学省・厚生労働省・経済産業省告示第一号）を遵守する。

## C. 研究結果

### 重合性蛋白の合成と水溶液の物性：

ゼラチン側鎖へのビニル基の導入は水溶性カルボジイミドを用いたゼラチンとアクリル酸あるいは 4-ビニル安息香酸との縮合反応により行い、アクリレート化ゼラチンとスチレン化ゼラチン（ゼラチンマクロマー）を得た。いずれの場合もゼラチン側鎖のリシン 残基のアミノ基と各ビニル誘導体のカルボキシル基とのエステル結合形成を利用した。アクリレート基の導入量はゼラチン 1 分子（分子量約 95,000）あたり 27.4 個で、スチレン基の導入量は 28.7 個であった。一方、アルブミンへのスチレン基の導入は同様に 4-ビニル安息香酸を用いて水溶性カルボジイミドにより行った。スチレン基の導入量はアルブミン 1 分子（分子量約 66,000）あたり 16.4 個であった。

得られた重合性蛋白質はいずれも水に可溶であった。未修飾のゼラチンの水溶液は温度に応じて可逆的にゲル形成する。濃度約 20%では室温下にお

いて溶液状態であるが、冷却するとゲルとなった。約 30%濃度では室温でもゲル状態となり、約 40%以上では加温しても流動性は得られない。一方、スチレン化ゼラチンの水溶液は室温下で濃度 30%において流動パラフィンと同程度の粘性を示した。濃度を 40%以上に上げると急激に粘性が上昇するが、50%においても流動性は保持された。また、アクリレート化ゼラチンにおいても同様な傾向が認められた。一方、未修飾のアルブミンは室温において濃度 60%程度まで水に溶解させることができ、高粘稠溶液を与える。この溶解性はスチレン化アルブミンにおいてもほぼ同様であった。3種類の重合性蛋白質はいずれもおおよそ 50%濃度まで取り扱い可能な溶液であった。

一方、PEG マクロマーは PEG 鎖の分子量が約 1,000 の場合、約 90%まで水に溶解し、その粘性はゼラチンマクロマーの 30%水溶液より低かった。スチレン化ゼラチンを含む（濃度 40%以下）水溶液に PEG マクロマーを加えると、10%までは均一透明溶液であり、その粘性はスチレン化ゼラチンのみの場合に比べ、少し増加した。PEG マクロマーの成分が 20%を越えると白濁あるいは二層分離が起こり、溶液は不均一となった。この混合溶液系において、均一溶液を与える PEG マクロマーの上限濃度はゼラチン濃度が高い程低下する傾向を示した。また、PEG 鎖の分子量が約 3,000 の場合、その上限濃度はさらに低下した。また、アクリレート化ゼラチンにおいても PEG マクロマーとの相溶性はスチレン化ゼラチンとほとんど変化なかった。ゼラチンマクロマーと PEG マクロマーは共に水溶性であるが両者の水中での相溶性は悪かった。両者の透明均一溶液を得るには両者を合わせた溶質濃度が約 50%以下の場合に限られた。一方、スチレン化アルブミンと PEG マクロマーとの混合水溶液系では、スチレン化アルブミン 60%濃度に 20% PEG マクロマーを添加しても層分離することなく、溶質濃度が 80%程度においても均一溶液を与え、両者の相溶性は良好であった。

### 光硬化性：

水溶性重合開始剤としてケトピン酸の二酸化セレン酸化により得られたカルボキシル化カンファキノンを用いた。これは 460nm に極大吸収波長を有した。照射光源としてフィルターを装着することにより照射波長を 400 から 600nm に絞ったハロゲンランプと 488nm の単色光を発振するアルゴンイオンレーザーを用いた。アルゴンイオンレーザーの照射強度はハロゲンランプの約 2 倍である。

アクリレート化ゼラチンの水溶液（濃度 20%）にカルボキシル化カンファキノンを混合し、ハロゲンランプを照射した。全ての光硬化実験においてカ

ルボキシル化カンファキノンの濃度は溶質重量の 0.5wt%に固定し、プロトンドナーとして *N,N*-ジメチルアミノエチルメタクリレート を 1.5wt% 加えて行った。10 分間照射しても全くゲルは生成しなかった。溶質濃度を 35 % に増加する、あるいはアルゴンイオンレーザーを用いて照射強度を増加させると極く僅かのゲルを生成したが、生成ゲルは膨潤度が極めて高く軟弱であった。一方、同濃度のスチレン化ゼラチンの水溶液ではハロゲンランプの照射においても 1 分間で数十%のゲルを生成した。照射時間を増加させると、ゲル化率は増加し、生成ゲルの膨潤度は減少した。また、同一照射時間で溶質濃度を増加させてもゲル化率は増加した。スチレン化ゼラチン水溶液（濃度 40 %）を 5 分間ハロゲンランプで照射すると溶質のほぼ全量がゲル化され、生成ゲルは膨潤度約 5 で強固であった。また、スチレン化ゼラチンと PEG マクロマーとの混合系とスチレン化ゼラチンの単独系間において、ゲル化率にほとんど差はなかったが、生成ゲルの膨潤度は PEG を添加すると、約 1/2 に減少した。

可視光照射によりラジカル発生能を有する他の化合物とカルボキシル化カンファキノンの重合開始効率をゲル化率を比較することにより評価した。光反応性化合物としてリポフラビン（ビタミン B12）とキサントゲン系色素（エオシン、ローズベンガル、ウラニン）を用いた。スチレン化ゼラチンと PEG マクロマーの混合水溶液にハロゲンランプを 1 分間照射すると、カンファキノンとリポフラビンではともに約 60 % の収率でゲルを与えた。カンファキノンにより生成したゲルの膨潤度はリポフラビンの場合の約 2/3 であった。また、キサントゲン系色素ではいずれもゲル化率は低く、とくにローズベンガルでは 10 % 未満であった。本実験での照射条件下ではカルボキシル化カンファキノンが最も有効に重合を開始した。

#### ゲルの物性（力学的強度と分解性）：

スチレン化ゼラチン水溶液（濃度 40 %）にハロゲンランプを時間を変えて（1、2、5 分）照射し、膨潤度の異なる（膨潤度； 5、14、37）3 種類のゲルを作製した。各ゲルを穴の開いた試料台に固定し、棒で開口部を突き押すことにより、ゲルを引っ張った。1 分照射により得られた膨潤度約 30 のゲルは、ほとんど応力が増加することなく、数%伸張した時点で破断した。一方、膨潤度の低いゲルでは、伸びが増し、高い応力に耐えた。得られた歪み-応力曲線の初期の傾きからゲルの力学的強度（ヤング率）を求めた。膨潤度が低い程ヤング率は高くなる傾向を示した。照射時間を変えることにより生成ゲルの力学的強度を有る程度調節できた。

ゲルのコラゲナーゼ分解性を 1) 膨潤度の違うゲ

ルと 2) PEG 含有量の違うゲルについて比較した。上記で作製したスチレン化ゼラチンのみからなる膨潤度の異なる 3 種のゲルをコラゲナーゼを含む緩衝溶液中で振とうすると、ゲルは全て時間と共に徐々に断片化が起こった。膨潤度の高いゲルの場合、数時間の振とうで細分化され、ゲルはほぼ消失した。ゲルから溶液内への溶出量を溶液内の有機性炭素濃度を測定することにより調べた。全てのゲルにおいて時間と共に溶液内の有機性炭素濃度が増加し、ゲルの分解が進んでいることを示した。膨潤度の高いゲルほど短時間に溶出量が増加したことより、分解は膨潤度の高いゲル程早いといえる。

スチレン化ゼラチンと PEG マクロマーとを組み合わせさせて膨潤度がほぼ同じ（約 10）になるように作製したゲルの 24 時間後の分解量を比較した。ゼラチンのみでは約 80 % が分解されたのに対して PEG マクロマーのみで作製したゲルはほとんど分解されなかった。ゼラチンと PEG を等量含むゲルでは分解量はゼラチンのみの場合の約 1/2 であった。従って、ゲルの分解性はゲルの膨潤度と PEG の含有量によって決定されるといえる。

#### D. 考察

最近ゼラチンやアルブミンといった蛋白質の高濃度水溶液（約 40 %）を架橋剤の添加によりゲル化させる新しい二液性の組織接着剤が市販されている。架橋剤として通常組織固定に用いられているホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドが使用されている。これらはいずれも二液の混合と同時に架橋反応が始まり比較的粘稠であった水溶液は数分程度で高粘稠なゲル状へと硬化し、さらに時間をおくと高強度のゲルへと、時間と共に状態が変化する。従って、ある一定時間内において非常に高い粘着性を発揮する。しかし、使用している架橋剤は生体組織へ作用する可能性があり、組織への接触を防止するように接着剤を塗布するデバイスが工夫されているが、本質的に極めて有害である。生体組織に与える影響を低減させる目的で種々の架橋剤が試されているが、硬化速度の調節などに問題がある。従って、遺伝子や薬物の徐放担体として利用できる非毒性を含む生体適合性を満足する材料は存在しない。

これまで我々は光照射によってゾルからゲルを形成する、ゼラチンをベースにした光反応性材料の分子設計を行い、止血剤などへの応用を検討している。一連の研究過程で紫外光照射によりラジカルを発生する紫外光反応性ゼラチンを開発し、これと二官能性マクロマー（PEG ジアクリレート）との混合水溶液は、上記した組織接着剤の要求性能をある程度満たしたが、照射光源として紫外光を用いているため組織傷害性が指摘された。従って、可視光照

射によりゲル化できる材料の開発が必要と考えられた。そこで、これまで可視光照射によりラジカルを発生するキサンテン系色素（フルオレセイン、エオシン、ローゼンガルなど）をゼラチン側鎖に導入した可視光反応性ゼラチンを分子設計した。しかし、キサンテン系色素は嵩高い疎水性骨格構造を有しているためゼラチン分子内に少量（一分子あたり数個）導入すると水に不溶となった。導入量が低いとゲル硬化性は低かった。

本研究ではゼラチン側鎖に重合性基であるアクリレート基やスチレン基を導入し、水溶性重合開始剤を用いて重合により水溶液を硬化させる系について検討した。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。アクリル酸と 4-ピニル安息香酸を用いることによりゼラチン側鎖のリシン残基のアミノ基と各々のカルボキシル基とのエステル結合形成により、アクリレート基またはスチレン基を導入することができた。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（ゼラチン1分子中のリシン残基数は36.8基）。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。ゼラチンはコラーゲンの熱変性体である。コラーゲンは通常、水不溶性であり、分子が3重らせん形成により剛直な直線構造を形成し、さらに直線的に集合化し高次構造を形成している。この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、高濃度や低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。

一方、重合開始剤として水溶性カンファキノン分子設計した。これはカンファキノンをカルボキシ

ル基を導入し水に可溶化させたのものである。カンファキノンは歯科領域において長年広く使用されており毒性はほとんど無いと判断される。他の水溶性重合開始剤としてリボフラビンやキサンテン系色素が知られており、これらとラジカル重合開始効率を比較すると、本実験の照射条件下ではカンファキノンが最も優れていた。

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。

スチレン化ゼラチンから作製したゲルの力学的強度（ヤング率）はゲルの膨潤度と反比例関係にあり、膨潤度が低い、つまりゲルの含水量が少ない程強固なゲルであった。強度はゲルの架橋密度に対応しているといえる。また、分解性はゲルの膨潤度と比例関係にあり、膨潤度が高い程分解は早かった。ゲルの分解は表面と同時に内部からも起こったことによると考えられる。ゲル内に PEG マクロマー成分が含まれる場合には、PEG 組成が多い程分解は遅くなった。PEG の主鎖はエーテル結合であり、極めて加水分解に対して安定である。従って、ゼラチンと PEG との混合系でのゲルの分解はゼラチン部のみで選択的に起こったといえる。ゼラチンマクロマーと PEG マクロマーとの混合比を調節することで生成ゲルの力学的強度や分解性をある程度調節することが可能であった。

## E. 結論

ゼラチンやアルブミンの側鎖に重合性基を導入することにより重合性蛋白質を合成した。これらの水溶液は水溶性重合開始剤の存在下で重合させることができ、短時間の可視光照射でゲルを生成することができた。遺伝子の徐放担体材料としての応用が可能と考えられる。一方、硬化性をさらに向上さ

せるには溶質濃度をさらに増加できる材料の開発が必要である。そのためには溶液状態に保てる重合性蛋白質の濃度の上限をさらに上昇できる、また、PEG との相溶性を向上できる分子設計が必要と考えられ、蛋白質の低分子量化やゼラチンと PEG とのハイブリッド化について検討している。また、重合性蛋白質の水溶液内に細胞や薬物等を混合しておけば、照射により、生成ゲル内に包埋することが可能であり、人工細胞外マトリックス材料への応用を併せて検討している。

F. 健康危険情報  
特になし

G. 研究発表  
論文発表

42. S. Kidoaki, S. Ohya, Y. Nakavama, T. Matsuda, Thermoresponsive structural change of poly(N-isopropylacrylamide) graft layer measured with an atomic force microscope, **Langmuir**, 2001, 17, 2402-2407.
43. S. Ohya, Y. Nakavama, T. Matsuda, Thermoresponsive artificial extracellular matrix for tissue engineering: hyaluronic acid bioconjugated with poly(N-isopropylacrylamide) grafts, **Biomacromolecules**, 2001, 2, 856-863.
44. S. Ohya, Y. Nakavama, 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.
45. Y. Nakavama, T. Kawada, C. Zheng, S. Ohya, K. Okuda, K. Sunagawa, A novel photocurable insulator material for autonomic nerve activity recording, **Biomaterials**, in press.
46. T. Magoshi, H. Ziani-Cherif, S. Ohya, Y. Nakavama, T. Matsuda, Thermoresponsive heparin coating: Heparin conjugated poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus, **Langmuir**, in press.

学会発表

43. 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
44. 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
45. Ohya S, Nakavama Y, Sonoda H, Matsuda T, Management of tissue adhesion prevention and hemostasis by thermoresponsive biopolymers, 13<sup>th</sup> World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11

H. 知的財産権の出願・登録状況

3. 特許取得  
特になし
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

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

分担研究者 中山 敦好 独立行政法人 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

研究要旨 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の開発のための生体内吸収性の合成高分子の開発研究において、1. 生体内吸収性高分子の合成、2. 合成した高分子の物性評価、3. 合成した高分子のリパーゼ加水分解性評価、の3つにまとめられる。まず、1.の生体内吸収性高分子の合成に関しては、L-ラクチドのホモポリマー（ポリL-乳酸）のブリットルな性質を改善し、フレキシビリティのある柔軟な材料の創製という観点から、L-ラクチド/ラクトン系のコポリエステルを合成した。

A. 研究目的

遺伝子導入ベクターを担持させるための素材開発を行う。本開発により、作成された遺伝子導入ベクターを効率的に必要箇所にて機能を発現させることが可能となる。

B. 研究方法

遺伝子導入ベクターを担持させるための材料開発をラクトン、ラクチドなどの材料を出発物質として開環重合法により各種組成の各種コポリエステルを合成し、その評価をする。

C. 研究結果と考察

具体的にはε-カプロラクトンやδ-バレロラクトン、γ-ブチロラクトンなどのメチレン鎖数の異なるラクトンとの共重合体を各種仕込み比で得た。その結果、ε-カプロラクトンとδ-バレロラクトンの場合、仕込み比と得られたコポリマーの組成比はほぼ比例することがわかり、合成しやすい系といえる。それに対し、γ-ブチロラクトンの場合、コポリマー中のγ-ブチロラクトン含率はかなり制限され、最大でも20数%しか入らなかった。これはγ-ブチロラクトンとそのポリマーとの平衡がモノマー側に偏っている影響と考えられる。L-ラクチド/ラクトン系コポリマーの熱的性質はポリ乳酸の組成に近いもの（ラクトン含率：0-10%）やカプロラクトンやプロピオラクトンのホモポリマーに近いもの（ラクトン含率：90-100%）ではそれぞれの単独重合体に近い性質を示すが、二成分の組成比が近い

例. PLLAのTm: 177°C, Tg: 53°C、10%のCLを含むコポリマーのTm: 160°C, Tg: 45°C

PCLのTm: 58°C, Tg: -73°C、10%の乳酸を含

むコポリマーのTm: 50°C, Tg: -67°C

\* LLA: L-ラクチド, CL: ε-カプロラクトン  
範囲では融点は低下し、かつ融解熱はかなり小さくなり、エラストマー的な物性を示し、両成分が拮抗する範囲では融点は現れない。しかしながら、Tgは両成分のホモポリマーのTgを結ぶ線上で連続的な変化を示した。強度的には、ラクチドリッチなポリマーは適度な柔軟性とともにより30MPa程度の引張り強度を持つしっかりした材料となり、カバーステント材料等のような分野での用途が期待できる。同様の用途に使用可能な材料として、ナイロン-4の合成も行った。ナイロン-4は他のポリアミド類（ナイロン-6やナイロン-66等）と異なり、生分解性を有する。現在、合成したナイロン-4は分子量が低いため十分な強度を発揮しておらず、物性向上に引き続き努力する。一方、ヤング率の低い柔軟な生分解性材料の合成も行った。長鎖メチレン鎖を含むポリマーは高いフレキシビリティが期待されることから、ε-カプロラクトン、δ-バレロラクトン、γ-ブチロラクトン（7~5員環ラクトン）の組合せでできるコポリマーを合成した。組成比50/50前後のものはペースト状のものが得られたが、組成比が10/90等の偏った組成の場合、柔軟な材料が得られた。ポリエステル類の数平均分子量は5万から20万程度のもので多かったが、γ-ブチロラクトンを含むものでは分子量はかなり低く、数千程度のもので多数あった。分子量分布は1.5-2.5程度であった。熱的性質はL-ラクチド/ラクトン系コポリマーと同様の傾向を示すが、組成の違いによる温度変化はTm, Tgともそれほど大きくなく熱的に安定した材料設計が可能となることがわかった。これら柔軟な材料は遺伝子治療用等のコーティングステント材料を想

定している。また、神経電極固定用材料として液状一樹脂の形態変化を伴う材料開発として、ペースト状ポリマーとなるコポリ（ $\epsilon$ -カプロラクトン/ $\delta$ -バレロラクトン）、（50/50）に着目したが、循環器病センター研究所で回転粘度計による粘度測定の結果、37℃：139Pa、40℃：113Pa、50℃：65Pa となり、ドラスティックな変化といえない結果であり、37℃-50℃の温度変化で大きな粘度変化を示す系を探している。合成したポリマーは上記した L-ラクチド、ラクトンを原料とする開環重合で得られるコポリエステル、 $\alpha$ -ピロリドンの重合で得られるナイロン-4 であり、コポリエステル類では <sup>1</sup>H-NMR 解析結果からダイアドもしくはトリアドシーケンスにおいてかなりのヘテロ結合が確認・同定され、統計学的にランダムな配列をもったコポリマーであることがわかった。これは重合時間が十分でない場合、ブロック性の強い材料が得られ、かつ、ホモポリマーと異種モノマーを反応させるとコポリマー化が起こることからポリマー分子鎖間のエステル交換反応によるものと考えている。

得られたポリマーの生分解性は国際標準法である活性汚泥を用いた分解試験（ISO14852）やリパーゼを用いた酵素加水分解法により評価した。活性汚泥は化学物質評価研究機構から提供を受けた標準活性汚泥と下水処理場で入手されるものと両方で行ったがいずれの汚泥でもポリエステル類は分解された。分解は微生物分解によって発生する二酸化炭素をアルカリトラップ（0.025N 水酸化ナトリウム水溶液）に捕集し、一定時間ごとに無気性水溶性炭素量（IC）を定量することにより行った。生分解性（%）は完全無機化されたときの二酸化炭素発生量を理論値として、測定値をこの値で除して得た。IC の測定と同時に分解試験を行っているファーメンター中の水溶性有機物濃度（TOC）も測定し、分解中間生成物の定量も行った。その結果、長鎖メチレン鎖を含むポリエステル類は迅速な生分解を受け、4週で60%以上の生分解性を示した。しかしながら乳酸系のポリエステル類では、分解はかなり遅く、ポリマーの原料モノマーやその組成の影響が大きいことがわかった。このことは逆に、求める生分解性を持つポリマーの分子設計が可能であることを示している。水溶性有機物濃度（TOC）は分解期間全体を通じて比較的低い値を示し、中間生成物は速やかに資化されることがわかった。リパーゼ加水分解試験では純度の高いものを用いると短期間に再現性よく、生分解性が評価でき、酵素加水分解性と活性汚泥分解性の間には相関性が見出された。

#### D. 結論

各種ポリエステルを合成し、その生分解性を調べた。今後、親水性の制御、溶融粘度の低下、生分解性のコントロールなどの観点からポリエーテル鎖の導入によるブロックもしくはランダムコポリエステルエーテルの本プロジェクトへの可能性について検討する予定である。

#### E. 健康危険情報

特に無し

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. N. Kawasaki, A. Nakayama, T. Higashi, Y. Maeda, N. Yamamoto, S. Aiba, Studies on Poly[(acrylamide)-co-( $\epsilon$ -caprolactone)]: Synthesis, Characterization and Biodegradability, **Macromol. Chem. Phys.**, 202, 2231-2238 (2001)
2. H. Sashiwa, S. Fujishima, N. Yamano, N. Kawasaki, A. Nakayama, E. Muraki and S. Aiba, Production of N-Acetyl-D-glucosamine from  $\beta$ -Chitin by Enzymatic Hydrolysis, **Chem. Lett.**, 308-309 (2001)
3. 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)
4. 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の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)

##### 2. 学会発表

1. 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.

#### G. 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

分担研究報告書

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

分担研究者 長崎 健 大阪市立大学大学院工学研究科 助教授

**研究要旨** o-ニトロベンジル構造をスペーサーにもち、親水部に塩基性アミノ酸を導入した新規光開裂性カチオン脂質を合成した。光開裂性脂質は 365 nm の紫外光を照射することで結合の開裂が生じ、その分子集合能が変化した。新規光開裂性カチオン脂質集合体と遺伝子との複合体を形成後、動物細胞に導入したとき、高いトランスフェクション効率が得られた。また、細胞内に複合体を導入後、紫外線照射することでトランスフェクション効率の更なる向上に成功した。

A. 研究目的

従来、遺伝子治療に代表される細胞中に外部遺伝子を導入・発現する方法では、天然のナノパーティクルであるウイルスベクターを利用することが圧倒的に多い。その理由は、導入効率の高さにあるが、コストが高く、サイズの大きい遺伝子の導入に適応できないことや、ウイルス自体の安全性にも問題が残されている。そこで、デンドリマーに代表されるポリマー化合物や脂質の集合体であるリポソームなどのポリカチオンと核酸の複合体から成るナノパーティクルを用いる非ウイルスベクターの高効率化が急務となっている。非ウイルスベクターの効率を向上させるためにはいくつかの問題点を改善する必要があるが、我々はこれまで「核内で如何に複合体を転写出来る核酸分子の状態にするか」に着目し研究してきた。つまり、外部遺伝子を核内に運搬するまでは安定な複合体を形成し、核内では安定性を低下させ遺伝子をリリースするという相反する機能が要求され、単なるナノ粒子ではなく、ナノマシンとしての非ウイルスベクター開発を目的としている。

本研究では脂質分子の中央に光開裂部位を組み込むことにより、カチオン脂質集合体の DNA 複合体形成時に脂質から光照射によるカチオンの開裂を促し、①DNA 親和性の制御により DNA 複合体からの DNA リリースを促進する。②細胞室内輸送小胞膜の不安定化を誘起することにより輸送小胞体からの DNA の脱出を促進する。などにより発現効率を高めることを目的とする。

B. 研究方法

合成：

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。

集合体形成能：

これらの脂質をクロロホルム溶液に溶かし、エバポレーターを用いてガラスチューブの壁面に薄膜を形成させた。その後、ボルテックス、超音波処理によりトリス塩酸バッファ（pH7.5）に分散させて、脂質集合体形成を試みた。透過型電子顕微鏡観察では疎水鎖長の短い親水部アミノ酸がリジンである KNBN12、アルギンである RNBN12 では規則性会合構造は全く見られなかった。一方、疎水性部位が大きな KNBN18、RNBN18 では 200-500 nm のリポソームが観察された。

トランスフェクション：

前日に細胞を経代した 24 穴プレート 1 穴当り 200  $\mu$ l ずつ通常の濃度より 1.25 倍濃い培地を加える。脂質・DNA コンプレックス (C/A=5) 溶液を 50  $\mu$ l 加え、37  $^{\circ}$ C で 3 時間細胞をインキュベートさせる。3 時間後、アスピレーターで培地を取り除いて、新たに培地を 1 穴当り 1 ml ずつ加える。37  $^{\circ}$ C で 48 時間培養。ルシフェラーゼアッセイは Bright-Glo Luciferase Assay System (Promega) を使い、Nano Orange (Molecular Probe) によりタンパク定量を行って単位タンパク量当たりのルシフェラーゼ活性を定量する。光照射効果の評価は 3 時間複合体接触させ培地交換直後に、365nm(3.8



mW/cm<sup>2</sup>)の光を 10min 照射した。

#### 細胞毒性：

MTT 溶液を 62.5 μL 加えて、37 °C で 1 時間培養した。上清を抜き取り、PBS (1mL) で 2 回洗浄後、DMSO (1mL) を加え、10 分間室温でシェーカーで攪拌した。上清の DMSO (0.5mL) に DMSO (0.5mL) を加え 2 倍希釈後、UV 測定 (590 nm) により細胞生存率を見積もった。

#### F. 研究結果

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 (365 nm, 3.6 mW/cm<sup>2</sup>, 10 min) により効率が倍増した。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。

#### G. 考察

合成脂質のリポソーム形成能は疎水部のアルキル鎖長に依存し、疎水性と親水性のバランスの重要性が確認された。MTT 法より光開裂性脂質は細胞毒性は高いものの、トランスフェクション効率が高いという結果が得られた。細胞毒性の改善で更なる効率の高い脂質の創製が可能となることが期待される。また、光開裂性をもたない脂質がトランスフェクション時に光照射効果を示さないのに対して、KNBN12, RNBN12 は光照射により効率が倍増した。O-ニトロベンジル構造の光開裂反応の関与が示唆され、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。

#### H. 結論

細胞内に光開裂性カチオン脂質 / DNA 複合体を導入後、脂質分子の光開裂反応によりトランスフェクション効率を大きく向上できることを見出した。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- H. 「第二世代に突入した合成ベクター開発」  
長崎 健、化学 (2002) 印刷中

##### 学会発表

1. ENHANCEMENT OF TRANSFECTION EFFICIENCY OF CATIONIC POLYAZOBENZENE DENDRIMER-DNA POLYPLEX BY UV IRRADIATION T. Nagasaki, K. Atarashi, N. Yoshida, S. Tamagaki, 28<sup>th</sup> International Symposium on Controlled Release of Bioactive Materials, San Diego, USA (2001.6.23-27)
2. 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)
3. 光応答性カチオンデンドリマー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)
4. PHOTO-ENHANCEMENT OF GENE DELIVERY USING CATIONIC POLYAZOBENZENE DENDRIMER-DNA POLYPLEX, Takeshi Nagasaki, Kohei Matsumoto, Kazuyuki Atarashi, Seizo Tamagaki, 26<sup>th</sup> International Symposium on Macrocyclic Chemistry, Fukuoka(2001.7.15-20)
5. 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)
6. 新規カチオン性ポリアゾベンゼンデンドリマー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)
7. 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)
8. 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)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 4. 特許取得

「遺伝子導入剤」、長崎 健、日本公開特許広報、特願 2001-155029(2001)

##### 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

血管内遺伝子導入デバイスの開発に関する研究

分担研究者 西正吾 高槻赤十字病院脳神経外科 部長

研究要旨 遺伝子徐放担体材料として別に開発したゼラチンマクロマーと光重合開始剤の混合水溶液は高粘性でありステントをディッピングすると、ステントの金属部の周りを薄く皮膜化できた。皮膜の厚さは溶液の濃度や、ディッピング回数により調節できた。これを光照射すると数分以内に溶液はゲル状に硬化した。30wt%の溶液を3分間照射すると約80%の収率でゲルを生成した。照射時間を延長するとゲルの含水量は減少し、強度が増した。バルーンカテーテルにマウントし、バルーンの拡張によりステントを拡大させてもゲル層は剥離や破壊されることなく形状変化に追従した。また、薬物等を含む光硬化性溶液を用いると生成ゲル内に包埋することができた。ハイブリッド血管内にてモデル薬物としたローダミン化アルブミンをゲル内に包埋したコーティングステントを拡大させた。数日培養後に内腔面を蛍光顕微鏡で観察すると薬物の組織内部への移行を認めた。薬物担体として機能した。また、アデノウイルスベクターを包埋させ、1週間培養後に x gal 染色すると組織内部が染色され、遺伝子発現を認めた。遺伝子導入デバイスとして有効と考えられる。

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

てステントのハイドロゲルによるコーティング化を図り、コーティングゲル内への薬物包埋を行い、その放出性を調べる。また、遺伝子導入デバイスへの応用について検討する。

A. 研究目的

血管壁組織内への遺伝子導入を目的とする遺伝子導入デバイスとして、狭窄血管の拡張により血管形成を行うステントの高機能化について検討した。ステントの機能化には、本研究グループ内の分担研究として開発された光硬化性の遺伝子徐放担体材料を用いて行った。

動脈硬化等による狭窄血管の血管形成術として、バルーンカテーテルによる血管拡張法にかわりステント留置法が広く行われてきている。しかし、慢性期における再狭窄の発生は、臨床上未だ大きな問題である。我々は、可視光照射によりゾルからゲルを形成する、ゼラチンをベースにした光反応性材料の分子設計を行った。光反応性材料の要素材料としてゼラチン側鎖にスチレン基を導入したゼラチンマクロマーと、水溶性光重合開始剤であるカルボキシル化カンファキノンとを分子設計した。これらの混合水溶液は可視光を照射すると数分でゲル状に硬化させることが可能であり、薬物等を混合して照射すると、生成ゲル内にそれらを包埋することが可能であった。本研究では、この光硬化性材料を用い

B. 研究方法

光硬化性材料は、ゼラチン側鎖にスチレン基を導入したゼラチンマクロマーと光重合開始剤（カルボキシル化カンファキノン）との混合水溶液から構成される。この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、光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。また、兎頸部にて生体内での遺伝子発現を調べた。

（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、必要に応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. 研究成果

#### ハイドロゲルコーティングステントの作製：

ゼラチンマクロマーとカンファキノンの混合水溶液は粘稠であり、この水溶液内にステントをディッピングすると、ステントの金属部の周りを薄く皮膜化することができた。皮膜の厚さは溶液の濃度や、ディッピング回数により調節できた。この皮膜化ステントに数分間光照射を行った。ステント表面でのゼラチン層の有無を調べるため、赤色色素（ローズベンガル）を用いて染色を行った。照射していない皮膜化ステントを色素水溶液に浸漬させても、ステントに色変化は全く無かったのに対し、光照射した場合、ステントが赤く染色された。光照射により皮膜層がゲル化し、ステント金属部の周りがゲル層でコーティングされたといえる。

SEM 観察すると、ステント金属の間を埋めるように薄いゲル層によるほぼ均一なコーティングを認めた（ゲルのひび割れは SEM サンプル作製時の高真空乾燥操作により生じた）。既報の結果では、30wt%の溶液を3分間照射すると約80%の収率でゲルを生成し、また、照射時間を延長するとゲルの含水量は減少し、強度が増した。ゲルコーティングステントを水中に浸漬させると、ゲルは膨潤したが、ステントから脱落することは無く、比較的強固にステントに固定化された。

ゲルコーティングステントをバルーンカテーテルにマウントした後、バルーンの拡張によりステントを拡大させた。コーティングしたゲル層は剥離や破壊されることなくステントの形状の変化に追従して変形した。拡大形状を SEM 観察すると、金属周りがほぼ均一なゲル層で覆われていることが認められた。

#### 薬物の包埋化：

モデル薬物としてローダミン化アルブミンを用いた。これをゼラチンマクロマーを含むリン酸緩衝

溶液に混合し、ステント周りにディッピングによりコーティングした。これに光照射を行うと、アルブミンを含まない場合と同様にゲルが生成し、ステントの金属部周りをコーティングできた。ステントはローダミン由来の濃い紫色を呈していたことより、生成ゲル内にはローダミンが包埋されたといえる。

一方、既報に従って、繊維芽細胞とコラーゲン冷溶液から、管状モールド中での培養によりハイブリッド管状組織体を作製した。これを血管モデルとして、先に作製したローダミン包埋化ゲルコーティングステントを血管モデルの内部に挿入して、バルーンにより拡張させることによりステントを内壁面に密着して留置した。留置後2日培養した後に、内腔面を観察すると、ステントがハイブリッド組織体の内腔面に密着しており、薄い紫色を呈したハイドロゲル層の存在を認めた。ステントを摘出し、これを共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると、ステント金属の周りで赤い蛍光を認めた。この蛍光はローダミンに由来するものであり、ステント周りにローダミン化アルブミンを含有するハイドロゲル層が残存していることを示した。一方、ステントを取り去ったハイブリッド組織体の表面はほとんど無色であった。しかし、これを共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、赤い蛍光の格子模様を認めた。これはステントの金属部の拡大形状とほぼ一致しており、ステント金属が接していた部分に選択的にローダミン化アルブミンが染み込んでいることを示している。ハイブリッド組織体の断面の蛍光分布を観察すると、数百ミクロンの深さまでアルブミンが浸達していることが分かった。また、留置後5日間培養した後のハイブリッド血管内腔面は、ほとんど紫色は消失していた。先と同様にステントを取り除き、内腔面を共焦点レーザー顕微鏡にて観察すると表面一面に赤い蛍光が観察された。組織体断面においてもほぼ均一な深さで蛍光を発する層を認めた。アルブミンが組織体表面にほぼ均一に染み込んだといえる。ハイドロゲルコーティングステントは薬物の徐放担体として機能するといえる。

#### 遺伝子の導入：

LacZ 遺伝子発現アデノウイルス (AdLacZ) を含む緩衝溶液にゼラチンマクロマーとカルボキシル化カンファキノンを溶解させた。この混合溶液にステントをディッピングした後、光照射によりゲル化させた。先と同様に平滑筋細胞とコラーゲン溶液から作製した管状ハイブリッド組織体の内腔面にコーティングステントを拡張させて留置した。培養7、12、19日目に組織体を取り出し、組織内の $\beta$ -galactosidase の発現量を 5-bromo-4-chloro-indolyl-b-galactosidase を用いて x-gal 染色により観察した。培養期間にかかわらず、組織体はほぼ

均一に濃い青色に染まった。このことよりハイブリッド組織体内の細胞に AdLacZ が感染し、遺伝子発現が起こったといえる。

組織断面を観察すると、組織体内の両表層部に存在する細胞が青く染色された。即ち、約 3 週間に渡って連続した遺伝子発現が起こったといえる。また、AdLacZ を包埋したハイドロゲルコーティングステントを兔総頸動脈内に留置した。留置 1 週間後にステントを含む動脈組織を摘出した。先と同様に x-gal 染色すると、動脈組織内腔面が青く染色された。血流下においてもゲルが剥離することなくステントに固定され、包埋された AdLacZ により血管壁細胞に遺伝子導入することができた。

#### D. 考察

ステントは狭窄血管を機械的に持続して拡張することにより血流を確保する機能を有する血管形成デバイスであり、従来のバルーンによる一時的な血管拡張処置に比べ、拡張効果が持続するため、慢性期に起こる再狭窄を大幅に低下させることができる。しかしながら、ステントのみでは再狭窄の発生を完全に防ぐことはできない。遺伝子や薬物を担持することができれば、ステントは遺伝子や薬物徐放担体としても機能させることが可能となり、再狭窄予防により効果的となると考えられる。このことをめざして、最近、ステントの金属表面への薬物を固定化させたり、あるいは薬物を含む高分子をコーティングするなどの方法により機能化が図られている。

本研究では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我々の研究グループで開発中の可視光硬化性材料を利用した。この光硬化性材料はゼラチン側鎖にスチレン基を導入したゼラチンマクロマーと可視光照射によりラジカルを発生する水溶性光重合開始剤であるカルボキシル化カンファキノンの混合水溶液である。これに可視光を照射すると、カンファキノンのプロトン引き抜き反応により生成したラジカルが、ゼラチンマクロマーのスチレン基のラジカル重合を開始し、ゼラチン分子間が 3 次元的に架橋され、ゲルを生成する。可視光照射により反応させることができることから、別に組織接着剤や細胞包埋化ハイブリッド人工臓器への応用を検討している。本研究でも行ったように薬物等を包埋させることが容易であり、癌治療を目的として患部表面で in situ で抗ガン剤を包埋したハイドロゲルで覆うことによる新しい治療法の開発も併せて検討している。本研究では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の可能性を示した。

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。

#### E. 結論

光反応性材料を利用することによってステントに薬物担持機能並びに遺伝子導入機能をハイドロゲルのコーティング操作により容易に付与することが可能となった。臨床の現場においても容易に作成することが可能であり、臨床医が薬物を自由に選択して、その場で包埋させることができるなどの利点を有している。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- I. 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.

##### 学会発表

46. 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  
47. 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, 13<sup>th</sup> World Congress of International Society for Artificial Organs (Osaka), 2001, 11

- H. 知的財産権の出願・登録状況
5. 特許取得  
特になし
  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

ポリマーを用いた遺伝子治療法の確立に関する研究

分担研究者 斯波真理子 国立循環器病センター研究所 室員

研究要旨 遺伝子導入ベクターとしてポリマーを用いた新しい遺伝子治療法の確立を目的とし、ポリエチレンイミンと DNA との複合体を作製、その物理化学的性質を調べるとともに、*in vivo* での遺伝子導入を行った。遺伝子導入には、侵襲の極めて少ない気管内投与法を提案し、原発性肺高血圧症モデルラットに対し、アドレノメジュリン遺伝子導入を行い、高い治療効果を認めた。循環器疾患の中でも難治性である原発性肺高血圧症に対して新しい治療法の可能性を提供した。

A. 研究目的

本研究では、遺伝子導入ベクターとしてポリエチレンイミンなどのポリマーを用い、肺を標的臓器とした気管内投与による臓器特異的遺伝子導入法の確立を目的とする。安全で発現効率が高く、かつ非侵襲的な遺伝子治療法の開発をめざす。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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、アドレノメジュリン遺伝子導入により、治療効果を認めた。

D. 考察

ポリエチレンイミンは、ウィルスを用いない遺伝子導入ベクターとして有用であることが示された。

E. 結論

Linear なポリエチレンイミンを用い、気管内投与により、肺への特異的な遺伝子導入が可能であった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

論文発表

1. Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Takamisawa I, Shimokado K, Kataoka K. Polyion complex micelles as vectors in gene therapy- Pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer- *Gene Therapy* in press
2. Sugano R, Yamamura T, Harada-Shiba M, Miyake Y, Yamamoto A. Uptake of oxidized low-density lipoprotein in a THP-1 cell line lacking scavenger receptor A. *Atherosclerosis*. 2001; 158 (2): 351-357.

学会発表

1. Harada-Shiba M, Yamauchi K, Kataoka K International Symposium on Polymer Therapeutics. Polyion complex micelles as vectors in gene therapy. Pharmacokinetics and *in vivo* gene transfer.
2. 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-

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

3. その他

「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

分担研究報告書

細胞分化誘導と Tissue Engineering  
HVJ 膜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

分担研究者 澤 芳樹 大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科 講師

研究要旨 HVJ 膜ベクター法を用いた新しい遺伝子導入法により、複数の遺伝子を培養細胞内あるいは生体組織内に導入し、自己組織細胞を導入した人工臓器代用物において、その細胞の機能を向上させ、より生体適合性に優れた人工代用物を開発しつつある。本法を心臓外科領域に応用し、心臓保護液による心停止中に冠動脈より HVJ 膜ベクターを注入する心臓全体への遺伝子導入法を開発し、心臓機能の変換賦活化に成功した。本法は、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。

A. 研究目的

HVJ 膜ベクターによる遺伝子導入により、機能改変された自己の血管壁細胞である血管内皮細胞と平滑筋細胞を導入して、生体血管との力学的適合性を有するハイブリッド人工血管を開発し、さらに細胞外マトリクス及び細胞培養環境を改善するため、各再生因子の遺伝子導入により高発現環境を整備していくことを目標としている。

B. 研究方法

1. HVJ 膜ベクター法を用いた遺伝子導入による、成人個体からの採取細胞における細胞分化誘導および分化制御の検討。
2. HVJ 膜ベクター法を用いた遺伝子導入による細胞接着の効率化および細胞環境向上因子の検討。
3. HVJ 膜ベクター法を用いた遺伝子導入により、生体適合性に優れたハイブリッド人工血管の作成、およびその動物実験。

C. 研究結果

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℃・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。

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。成熟家兎摘出静脈グラフトにおいて、細胞周期抑制因子 senescent cell-derived inhibitor1(Sdi1;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、Sdi-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。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 標識細胞増殖抑制因子(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。

D. 考察

遺伝子導入により高度発現させた HSP70 により心筋虚血耐性の獲得が示唆された。すなわち 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、静脈グラフトにおける VGD の抑制には Sdi-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、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。

#### E. 結論

我々は本法を心臓外科領域に応用し、心筋保護液による心停止中に冠動脈より HVJ-liposome を注入する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、本法は、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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. K.Suzuki Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70 *Basic Research in Cardiology* 2000; 95(5): 397-403
2. T.Saxaguchi A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor- $\kappa$ B in

myocardial preservation *Annals of Thoracic Surgery* 2001; 71: 624-630

3. 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
4. H.Ueda A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats *Cardiovascular Research* 2001; 51: 41-50

##### 学会発表

特になし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 6. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

## 別紙 5

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
Y. Nakayama K. Ji-Youn S. Nishi H. Ueno T. Matsuda	Development of High-performance Stent: Gelatinous photogel-coated Stent that Permits Drug Delivery and Gene Transfer	Journal of Biomedical Materials Research	57	559-566	2001
S. Kidoaki Y. Nakayama T. Matsuda	Measurement of the Interaction forces between Proteins and iniferter-Based Graft-Polymerized Surfaces with an Atomic Forces Microscope in Aqueous Media	Langmuir	17	1080-1087	2001
S. Kidoaki S. Ohya Y. Nakayama T. Matsuda	Thermoresponsive Structural Change of a Poly(N-isopropylacrylamide) Graft Layer Measured with an Atomic force Microscope	Langmuir	17	2402-2407	2001
S. Ohya Y. Nakayama T. Matsuda	Thermoresponsive Artificial Extracellular Matrix for Tissue Engineering: Hyaluronic Acid Bioconjugated with Poly(N-isopropylacrylamide) Grafts	Biomacromolecules	2	856-863	2001
S. Ohya Y. Nakayama T. Matsuda	Material Design for an Artificial Extracellular matrix: Cell Entrapment in poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-Grafted Gelatin Hydrogel	Journal of Artificial Organs	4	308-314	2001
H. 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	Journal of Biomedical Materials Research	55	266-276	2001
H. Okino Y. Nakayama M. Tanaka T. Matsuda	In situ Hydrogelation of Photocurable Gelatin and Drug Release	Journal of Biomedical Materials Research	59	233-245	2002
M. Kikuchi H. Takita Y. Nakayama T. Matsuda	Laser perforated Collagen Membrane: Pore size-Dependent Bone Induction as a New BMP Carrier	Journal of Hard Tissue Biology	9	79-89	2000
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	Journal of Biomedical Materials Research	55	661-668	2001
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	45	1026-1033	2001
Y. Nakayama M. Sudo K. Uchida T. Matsuda	Spatio-resolved hyperbranched graft polymerized surfaces by iniferter-based photograft copolymerization	Langmuir			2002 in press
Y. Nakayama T. Kawada C. Zheng S. Ohya K. Okuda K. Sunagawa	A novel photocurable insulator material for automic nerve activity recording	Biomaterials			2002 in press

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
T. Magoshi H. Ziani-Cherif S. Ohya Y. Nakayama T. Matsuda	Thermoresponsive heparin coating: Heparin conjugated poly(N-isopropylacrylamide) at one terminus	Langmuir			2002 in press
H. Sonoda S. Urayama K. Takamizawa Y. Nakayama C. Uyama H. Yasui T. Matsuda	Compliant Design of Artificial Graft: Compliance Determination by New Digital X-ray Imaging System-Based Method	Journal of Biomedical Materials Research	60	191-195	2002
S. Yasuda T. Noguchi M. Gohda T. Arai N. Tsutsui Y. Nakayama T. Matsuda	Local delivery of low-dose docetaxel, a novel microtubule polymerizing agent, reduces neointimal hyperplasia in a balloon-injured rabbit iliac artery model	Cardiovascular Research			2002 in press
長崎 健	第二世代に突入した合成ベクターの 開発	化学			2002 in press
M. Harada-Shiba K. Yamaguchi A. Harada K. Shimokado K. Kataoka	Polyion Complex Micelles as Vectors for Gene Therapy-Pharmacokinetics and in vivo Gene Transfer	Gene Therapy			2002 in press
R. Sugano T. Yamamura M. Harada-Shiba A. Yamamoto	Uptake of Oxidized Low-density Lipoprotein in a THP-1 Cell Line Lacking Scavenger Receptor A	Atherosclerosis	158	351-357	2001
N. Kawasaki A. Nakayama Y. 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
H. Sashiwa S. Fujishima N. Yamano N. Kawasaki A. Nakayama E. Muraki S. Aiba	Production of N-Acetyl-D-glucosamine from b-Chitin by Enzymatic hydrolysis	Chem Lett		308-309	2001
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
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
K. Suzuki Y. Sawa K. Kagisaki S. Taketani H. Ichikawa Y. Kaneda H. Matsuda	Reduction in myocardial apoptosis associated with overexpression of heat shock protein 70	Basic Res Cardiol	95	397-403	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻名	ページ	出版年
T. Sakaguchi Y. Sawa N. Fukushima M. Nishimura H. Ichikawa Y. Kaneda H. Matsuda	A novel strategy of decoy transfection against nuclear factor-kB in Myocardial preservation	Ann Thorac Surg	71	624-630	2001
Y. Kobayashi N. Fukushima Y. Sawa S. Ohtake G. Matsumiya K. Horiguchi N. Kawaguchi N. Matsuura Y. Kaneda H. Matsuda	Effects of Gene Transfection of Human bcl-2 on Concordant Cardiac Xenografts in Hamster to Rat Model	The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery	49	570-575	2001
H. Ueda T. Nakamura K. Matsumoto Y. Sawa H. Matsuda T. Nakamura	A potential cardioprotective role of hepatocyte growth factor in myocardial infarction in rats	Cardiovascular Research	51	41-50	2001