

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

循環器系疾患治療のための  
次世代遺伝子導入ベクターの創製

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田畑 泰彦

平成 15 (2003) 年 3 月

## 目次

I. 総括研究報告	
循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製 .....	1
田畑 泰彦	
II. 分担研究報告	
1. 次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価 .....	10
田畑 泰彦	
2. 高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発 .....	13
岸田 晶夫	
3. ヒト組み替え DNA 生分解性物質の開発 .....	17
浅原 孝之	
4. 細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用 .....	19
盛 英三	
5. 遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発 .....	21
永谷 憲歳	
6. 遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用 .....	23
清水 達也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	29

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
総括研究報告書

循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製

主任研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

新規な生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる徐放化キャリアをデザイン、作製し、この徐放化キャリアから遺伝子を徐放化させることによって、遺伝子の導入・発現効率を高めること、また、その発現期間がコントロールできることを見出した。また、超高压を用いて微粒子を作製する技術を確認、ポリビニルアルコールからなる微粒子の加工を行った。ゼラチンおよびポリビニルアルコールからなる新規な遺伝子徐放化キャリアの作製条件の検討に加えて、それらのキャリアを用いた血管内皮前駆細胞への遺伝子導入の増強について確認した。加えて、細胞治療と遺伝子治療とを評価できる動物実験モデルの確立を行い、ゼラチン徐放システムによる治療実験を行った。一方、心筋細胞シートの重層化技術を完成し、得られた3次元細胞シートの機能評価を行った。

分担研究者

岸田晶夫 国立循環器病センター研究所  
生体工学部 部長  
浅原孝之 東海大学医学部生理科学 教授  
盛 英三 国立循環器病センター研究所  
心臓生理部 部長  
永谷憲歳 国立循環器病センター  
心臓内科 医師  
清水達也 東京女子医科大学  
先端生命医科学研究所 助手

化するために、遺伝子の徐放が可能でかつ凝集のない微細化遺伝子キャリアを生体吸収性ゼラチン、ヒト遺伝子組み換え型ゼラチンあるいは合成高分子であるポリビニルアルコールから作製する。これらを用いることで遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができ、遺伝子導入血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を実現できる。本研究が実現されることで、安全性が高く、かつ、導入効率が高い理想的な遺伝子導入ベクターが得られ、遺伝子治療の普及を加速する。また、治療機能を有する細胞内に遺伝子を導入することで細胞治療と遺伝子治療の要素を併せもった新しいハイブリッド治療法が提唱できる。また、この遺伝子導入システムは温度応答性基材を用いて作製した細胞シートの機能強化にも利用でき、その組織移植医療への応用を拡大する。

A. 研究目的

本研究の目的は、虚血性心筋症（心筋梗塞、心筋症）や慢性閉塞性動脈硬化症などの血管狭窄病変に対する遺伝子細胞療法のための両親媒性遺伝子ベクターを開発し、これを用いて①血管内投与による高効率な Gene Therapy さらに②血管成長因子等の遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を開発することである。また機能強化した細胞をシート化して移植組織の機能向上を実現する。これまでに遺伝子の発現効率が高まる徐放化キャリアの作製に成功しているが、これをさらに高機能

B. 研究方法

各分担研究者の研究方法の概略について以下にまとめる。詳しくは、分担研究報告書を参照していただきたい。

## 次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。アミノ基導入率はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法によりゼラチンの1級アミンを定量することにより、また、得られたカチオン化ゼラチンの electrophoretic light scattering (ELS) 測定によりゼラチンのカチオン化度を調べた。得られたカチオン化ゼラチンの 10wt%水溶液にグルタルアルデヒドを異なる濃度で加え、攪拌の後、4℃で 12 時間架橋反応を行った。得られたカチオン化ゼラチンハイドロゲルは 100mM のグリシン水溶液で処理され、残存アルデヒド基を化学的にブロックした。ハイドロゲルを蒸留水で洗浄、凍結乾燥することによって乾燥状態の架橋カチオン化ゼラチンを得た。ハイドロゲルの架橋度はハイドロゲルの含水率から評価した。

CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA を Bolton-Hunter 試薬にて放射ヨードラベル化した。このラベル化プラスミド DNA 水溶液にて乾燥カチオン化ゼラチンハイドロゲルを室温、12 時間の条件下で膨潤、<sup>125</sup>I ラベル化プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを作製した。一方、カチオン化ゼラチンを同様の方法で <sup>125</sup>I ラベル化を行った。<sup>125</sup>I ラベル化プラスミド DNA 含浸ハイドロゲルおよび <sup>125</sup>I ラベル化ハイドロゲルを ddY マウスの背部皮下へ埋入した後の残存放射活性の時間変化を調べた。次に、プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス大腿筋肉内に埋入、経時的に筋肉を採取、そのプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。

## 高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発に関する研究

重合度、けん化度の違う三種類の PVA を用いて、超高圧処理を行う試料の調製を行った。PVA

に所定量の超純水を加え、オートクレーブにより完全に融解させることによって、12 種類の PVA 水溶液を調製した。PVA 水溶液に DNA 水溶液を添加後、密封し、40℃において 10000atm で 10 分間処理した。高圧処理における DNA と PVA の相互作用を観察するために電気泳動を行った。

## ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

成人末梢血由来血管内皮前駆細胞 (EPCs) の採取; 末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、血管内皮細胞用培地を用いて単核球中 EPCs を ex vivo にて 7 日間、分化・増幅培養した。

カチオン化ゼラチンハイドロゲルによる DNA plasmid 遺伝子導入; 上記培養 EPCs にカチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いて DNA 結合性正荷電ゼラチン貪食能により GFP 及び VEGF plasmid 遺伝子を導入した。

上記遺伝子導入された EPCs の増殖能・遊走能の検討; 増殖能は MTS assay kit により、遊走能は modified Boyden chamber により行った。

VEGF 遺伝子導入 EPC 移植療法の有効性の検討; 上記 ex vivo にて培養した EPCs を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、放射光血管造影 (Spring8)、Laser Doppler Analysis により 4 週後に評価した。

## 細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

EPCs にカチオン化ゼラチンハイドロゲル-遺伝子 (GFP およびアドレノメデュリン (AM) 遺伝子) 複合体をどん食させ、細胞内での遺伝子発現を GFP 遺伝子で検討し、肺高血圧モデル等で細胞-遺伝子ハイブリッド治療の効果を検討する。

微小血管造影法の開発: 放射光を線源とする微小血管造影法の代替として、病院に設置可能な普及型微小血管造影装置の試作機を作製する。

## 遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ヒト臍帯血から単核球細胞を分離培養し、

EPCs を得た。カチオン化ゼラチンハイドロゲルに AM DNA を結合させ、EPCs と 3 日間の共培養を行った。モノクローリン肺高血圧ラットに、AM 遺伝子を導入した EPCs を静脈内投与して、3 週間後の肺高血圧軽減効果および予後改善効果を検討した。

#### 遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

シート状の細胞の回収には当研究所で開発された温度応答性培養皿を用いた。この培養器材は通常の培養皿上に温度応答性高分子であるポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)を電子線照射により表面修飾したもので、通常の培養温度である 37℃では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32℃以下の低温処理で親水性表面に変化し細胞非接着性となる。この培養皿を使うと、接着した細胞をトリプシンなどの蛋白分解酵素を用いることなく脱着させることが可能である。さらに、細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、低温処理により細胞がその下面の接着因子とともに培養皿から脱着するものの、細胞間の結合は全く解離せず維持されるため細胞をシート状に回収できる。この培養皿状に新生仔ラット心筋細胞を培養し細胞シートを作製した。低温処理により脱着した細胞シートを積層化、電気生理学的解析および組織学的解析を行った。さらに、積層化心筋細胞シートをヌードラット皮下組織に移植、皮膚表面電位を測定、さらに切開してその収縮弛緩、組織像を長期にわたり経時的に観察した。

#### C. 研究成果

各分担研究者の研究成果の概略について以下にまとめる。詳しくは、分担研究報告書を参照していただきたい。

#### 次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

カチオン化反応におけるエチレンジアミンと水溶性カルボジイミド濃度の増加にともないゼラチンへのアミノ基導入率は増加した。ELS 測定により得られたカチオン化ゼラチンが正電荷を

もっていること、また、プラスミド DNA との混合により、カチオン化ゼラチンの正電荷の減少と見かけのプラスミド DNA の分子サイズの減少することがわかった。混合物の電気泳動測定の結果も考慮して、プラスミド DNA がカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックス形成していることを確認した。

生体内におけるカチオン化ゼラチンハイドロゲルの分解性を調べたところ、ハイドロゲルは時間とともに分解していくこと、さらに、その分解がハイドロゲルの含水率の増加とともに速くなることがわかった。ハイドロゲル作製時におけるグルタルアルデヒド濃度の減少とともに、ハイドロゲルの架橋程度は低下し、ハイドロゲルの生体内分解性がその架橋程度をコントロールすることでコントロールできることがわかった。

<sup>125</sup>I ラベル化プラスミド DNA を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを埋入したところ、その残存放射活性は時間とともに減少した。また、その減少はハイドロゲルの分解性によってコントロール可能であった。プラスミド DNA の生体内残存の時間変化は、カチオン化ゼラチンハイドロゲルの生体内残存の時間変化とよく相関していた。

プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス筋肉内に埋入時の埋入部位における遺伝子発現が見られた。水溶液状態でのプラスミド DNA の筋肉内投与後における投与部位での遺伝子発現は、投与 2 日後にピークに達した後、消失した。これに対して、プラスミド DNA をハイドロゲル内に含浸、埋入した場合には、埋入 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間も延長した。この遺伝子発現期間は、プラスミド DNA の徐放期間の延長とともに延長した。プラスミド DNA 含浸ハイドロゲル埋入部位周辺の遺伝子発現を組織学的に観察したところ、ハイドロゲル周辺筋肉におけるプラスミド DNA の徐放期間に対応した遺伝子発現が認められた。

高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発に関する研究

PVA217の希薄溶液(1w/v%以下)を作製し、超高压処理を行った。肉眼的には、ゲルは生成せず、白濁~透明な液体のまま出会った。白濁した溶液を静置あるいは遠心分離したところ、白色沈殿が得られた。これは容易に再分散可能であり、微粒子様の沈殿であることが示唆された。さらに濃度を下げると沈殿の形成は肉眼的には判別不能であったが、濁度測定、あるいは動的光散乱測定により、ナノ~マイクロメートルの微粒子の形成が確認された。PVA ナノ粒子の走査型電子顕微鏡観察を行ったところ、100~200 ナノメートルの比較的粒径の揃ったナノ粒子が形成していた。

この超高压処理を用いた微粒子形成法は、簡便で、特に分散安定剤も不要であり、新しい微粒子調製法として有用であると考えられた。

ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

GFP 遺伝子導入 EPCs の導入効率は、他のウイルス性ベクターと比し、同等以上導入効率であった。また、VEGF 遺伝子導入 EPCs の増殖能・遊走能は非遺伝子導入及び GFP 遺伝子導入 EPCs に比し有意に上昇していた。また、放射光血管造影において、アセチルコリン反応性の血管新生が認められた。また Laser Doppler Analysis では VEGF 遺伝子導入 EPCs 移植群において有意に血流の改善が認められた。

細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

カチオン化ゼラチンハイドロゲル-遺伝子複合体による EPCs への遺伝子導入法を確立した。肺高血圧モデルで、AM 遺伝子により機能強化した EPCs の有効性を確認した。

空間像度 50 ミクロンの普及型微小血管造影装置の一次試作を完成させた。

遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

EPCs はゼラチン/DNA 複合体を貪食し、EPCs 自身への高率の遺伝子導入(76%)が可能であった。AM 遺伝子導入 EPCs は EPCs 単独の 10 倍の AM を分泌し、2 週間以上発現が持続した。経静脈的に投与した EPCs は肺動脈に付着して血管を形成した。AM 遺伝子導入 EPCs の移植は、コントロール群に比べて平均肺動脈圧を有意に低下させ( $24 \pm 2$  vs  $34 \pm 1$  mmHg,  $p < 0.001$ )、生存率を改善させた( $p < 0.001$ )。

遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

低温処理により脱着した心筋細胞シートを重層化したところ 2 枚の細胞シートは同期して拍動し、組織切片にて多数のコネクシン 43 の発現を認めたことより、重層化心筋細胞シート間の形態的および電気的結合が示された。さらに、4 層まで積層化したところ、肉眼レベルで同期して収縮弛緩運動することが確認された。次に、重層化心筋細胞シートをヌードラット皮下組織に移植した結果、ホスト心臓とは異なるグラフト由来の皮膚表面電位が確認された。移植部を切開したところ心筋グラフトが肉眼レベルで自発的に収縮弛緩していた。グラフト内には 2~3 日のうちに多数の毛細血管網新生が確認された。組織切片上、伸展し横紋を有する心筋細胞ならびに細胞間にはデスモゾームやギャップジャンクションを認め心筋様組織が再構築されていた。さらに長期にわたって観察したところ心筋組織がホストラットの成長に伴いその大きさ、厚さ、電気伝達速度、収縮力の増大を示す結果を得た。最終的には最長 1 年までその拍動を維持して生存することを確認した。

D. 考察

薬物の徐放化研究の歴史は古く、これまでに多くの報告がされている。しかしながら、その中でもプラスミド DNA の徐放化の試みは少ない。これらの報告では、生体吸収性高分子キャリア内にプラスミド DNA を包含させ、プラスミド DNA

のキャリア内での単純拡散によりその徐放をコントロールしている。本研究では、これとは異なった徐放メカニズムを提唱している。すなわち、プラスミド DNA をポリイオンコンプレックスにより徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンに相互作用、徐放キャリア内に固定している。この状態ではプラスミド DNA は徐放されず、ハイドロゲルが分解され、カチオン化ゼラチン分子が水可溶化して初めて固定化プラスミド DNA はハイドロゲルから放出される。このシステムでは、徐放化キャリア自身の分解により DNA の徐放パターンをコントロールすることができるので、キャリアのサイズ、表面積などの条件は、プラスミド DNA の徐放には全く影響を与えない。また、これまでのプラスミド DNA 徐放システムとは異なり、プラスミド DNA は水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリイオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。このため、徐放されたプラスミド DNA は遺伝子発現に有利であると考えられる。プラスミド DNA の徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、私たちの徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り徐放キャリアの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらし、本徐放化システムが *in vivo* における遺伝子発現の有力なツールであることがわかった。本研究では、ハイドロゲルは埋入が必要なサイズである。すでに、注射可能なサイズ (10~150 $\mu\text{m}$  直径) カチオン化ゼラチンハイドロゲル粒子の作製とそれらによるプラスミド DNA の遺伝子発現の増強も確認している。これらの研究成果は、期待通りプラスミド DNA の発現増強のための徐放化システムの作製が可能であることを実験的に示したものである。今後はそのサイズをより小さく、しかも凝集しないハイドロゲルシステムの創製を目指す。予備的ではあるが、カチオン化ゼラチンにポリエチレングリコールを結合させることによってプラスミド DNA と相互作用する粒子サイズ

の小さなハイドロゲルの作製ができることを確認している。

超高压状態では、物質間の相互作用の内、水素結合成分が強調されることが報告されている。PVA 自身は水素結合性を側鎖に有しており、その濃厚溶液は短時間の処理でハイドロゲルを形成する。これまでの検討により、PVA ハイドロゲルの生成メカニズムは、まず分子内での水素結合形成による分子の局所的凝縮と粒子形成、それに引き続き粒子間の架橋からなると考えられている。これによれば、溶液の濃度を下げることによって、粒子間架橋を抑制できれば、分子集合体レベルのサイズの微粒子が得られることが推測される。本研究では、この仮定が正しいことを示すことが出来た。特に PVA 分子鎖の分子量分布の狭いものあるいは立体規則性のあるものについて、非常に良好な粒子形成が観察されており、本研究の目標である遺伝子デリバリー用ナノ粒子のみならず、新規な汎用材料としての応用も考えられる。また、超高压処理を行った場合には、PVA の分子量の増大に伴って、分子集合体の形成と思われる泳動パターンが得られた。濃度を高くすると、白濁も観察され、マクロな凝集体の形成も可能であった。動的光散乱の結果からは、単一のピークが得られず、種々の DNA 分子との混合集合体であることが示唆された。PVA は血中に於いて高い補体活性可能を有している。PVA+DNA 複合体を投与することによって、補体第 3 成分以降の蛋白質による修飾を受け、貪食細胞に取り込まれ、内部での遺伝子発現が期待される。

カチオン化ゼラチンハイドロゲルを用いた VEGF 遺伝子導入 EPCs 移植により、マウス重症下肢虚血部位において機能的な新生血管、血流の改善が認められ、カチオン化ゼラチンハイドロゲルは臨床応用を考える上で重要と考えられた。

カチオン化ゼラチンハイドロゲル-遺伝子複合体による遺伝子導入法は非ウイルス性でかつ導入効率が低い。既存のウイルス性ベクターと比較して、安全面で利点があり、一方、遺伝子単独投与法と比べると導入効率と治療効果でより優れ

ている。

今回の研究では、血管内皮細胞へ分化する可能性のある未熟な EPCs に *ex vivo* で遺伝子導入し、体内へ移植した。興味深いことに EPCs はゼラチン/プラスミド DNA 複合体を容易に貪食した。この EPCs の貪食能はウイルスベクターを用いずに高率の遺伝子導入を可能にした。比較的方法も簡便であることから、新たな遺伝子導入法として期待される。EPCs は虚血や外傷によって血管内皮が障害されると、骨髄から末梢血へ動員され、血管内皮障害部位を感知、遊走して血管を再生させると言われている。本研究においても、EPCs は静脈内投与で容易に肺血管に付着して血管を形成した。本研究における肺血管内皮への遺伝子導入はこの未熟な細胞の 1) 障害血管への遊走能、2) 血管内皮再生能を利用したものであると言える。血管拡張因子である AM の遺伝子を導入した EPCs を体内への移植をした結果、肺高血圧ラットの平均肺動脈圧、全肺血管抵抗は著明に低下した。EPCs から分泌された AM がパラクライン的に血管内皮、平滑筋に働いて、肺血管を拡張させた可能性がある。

シート状の心筋細胞の積層化によりシート間に電氣的、形態的な結合ができ全体が同期して拍動したことはさらなる積層化によりより厚く高機能な移植心筋組織作製の可能性を示唆するものであり、心筋症による重症心不全に対する新たな細胞治療法となることが期待される。また遺伝子デリバリーの担体として損失なく効率的に遺伝子デリバリーが可能であると考えられる。

## E. 結論

生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる徐放キャリアとしてハイドロゲルを作製した。この徐放システムは、ハイドロゲルの分解にともなってプラスミド DNA が徐放化し、その発現レベルの増強、徐放化による遺伝子発現期間の延長が可能となった。カチオン化ゼラチンに PEG を結合することにより、予備的ではあるが、プラスミド DNA と相互作用する粒子サイズの小さなハイド

ロゲルの作製ができた。また、超高压を用いて超微細粒子を作製する新しいプロセスを開発し、微粒子状の加工に成功した。血管内皮前駆細胞などの貪食能を有する細胞がプラスミド DNA とカチオン化ゼラチン複合体を貪食し、細胞質内でその貪食した遺伝子の発現が見られるとともに、その発現レベルがウイルスベクターを用いた場合と同じレベルまで高まることを見いだした。この複合体を利用した遺伝子治療と細胞治療を評価できる動物モデルを確立を用いて、ゼラチン遺伝子複合体による治療実験を進めている。また、温度応答基材を利用した心筋細胞シートの重層化技術を完成し、得られた心筋細胞シートが期待通り、機能していることを *in vitro* で確認した。これらの研究成果を基に、微細化したプラスミド DNA を徐放する次世代の遺伝子キャリアシステムを完成すること、加えてその徐放期間をコントロールする。ゼラチン微粒子の超微細化 (<1 $\mu$ m) と両親媒性である PEG とゼラチンを結合させることで血管内投与に耐えうる遺伝子ベクターを開発する。次に、血管新生作用をもつ細胞増殖因子のプラスミド DNA を用いて、動物の血管投与で目的組織内に徐放システムを導入し、それらのシステムの血管新生作用について検討する。また、ヒト遺伝子組み換え型ゼラチン作製システムを構築し、得られたゼラチンを用いた同様の検討を行う。超高压プロセスを用いた遺伝子複合体粒子作製法について、粒子の安定性および遺伝子発現効果に及ぼすプロセス操作の最適化を行う。貪食能をもつ細胞で得られた研究成果を踏まえて、得られた心筋細胞シートへの遺伝子導入についての最適化を行う。これらの研究を通して、優れた特性をもつ徐放システムから、虚血性心疾患あるいは慢性閉塞性動脈硬化症などの動物実験モデルを用いた治療実験を開始する予定である。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表



1. 論文発表

1. Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y, Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. *J. Controlled Release*, 2002, 80:333-343.
2. Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y, Liver targeting of plasmid DNA by pullulan with metal coordination. *J. Controlled Release*, 2002, 83:287-302.
3. Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002, 105:732-738.
4. Kawamoto A, Iwaguro H, Asahara T et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2002, 107:461-468.
5. 國本 聡, 笠原啓史, 浅原孝之, 盛 英三ほか遺伝子による血管新生. ここまで進んだ再生医療の実際(田畑泰彦編), 2003, 羊土社. pp116-123.
6. Akiyama T, Mori H. et al, Acetylcholinesterase Inhibitor Elicits Muscarinic Receptor-Mediated Cholinergic Transmission In The Rat Adrenal Medulla, *Catecholamine Research*, 2002, Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp65-68
7. J.T.Pearson, H.Mori,et.al, Future Investigations of Micro-Macro Level Cardiac Functions Using X-ray Diffraction, *BME* 2002, 16:29-35.
8. T.Kawada, H.Mori,et.al, Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium, *Am J Physiol Heart Cric Physiol* 2002, 283:H2687-H2691.
9. H.Kitagawa, H.Mori,et.al, Effects of Moderate Hypothermia on Norepinephrine Release Evoked by Ouabain, Tyramine and Cyanide *J.Cardiovascular Pharmacology* 2003, 41: S111-S114.
10. E.Sato, H.Mori,et.al, Quasi-monochromatic parallel radiography achieved with a plane-focus x-ray tube *Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences* 2002, 37:23-32.
11. E.Sato, H.Mori,et.al, New X-ray irradiation from weakly ionized linear plasma *Annual Report of Iwate Medical University, School of Liberal Arts and Sciences* 2002,37:13-22.
12. T.Kawada, H.Mori,et.al, Effect of brief ischaemia on myocardial acetylcholine and noradrenaline levels in anaesthetized cats, *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical* 2002, 95:37-42.
13. E.Kuwabara, H.Mori,et.al, Inhomogeneous Vasodilatory Responses of Rat Tail Arteries to Heat Stress:Evaluation by Synchrotron Radiation Miroangiography, *Japanese Journal of Physiolosy* 2002, 52 :403-408.
14. E.Sato, H.Mori,et.al, Fundamental study on parallel beam radiography using a polycapillary plate, *Pro.SPIE* 2002, 4682:298-310.
15. E.Sato, H.Mori,et.al, Quasi-monochromatic radiography using a high-intensity quasi-x-ray laser generator, *Pro.SPIE* 2002, 4682:538-548.
16. H.Kasahara, H.Mori,et.al, Biodegradable Gelatin Hydrogel Potentiates the Angiogenic Effect of Fibroblast Growth Factor 4 Plasmid in Rabbit Hindlimb Ischemia, *JACC* 2003, 41:1056-62.
17. 秋山剛、盛英三、他, 虚血部心臓交感神経終末におけるノルエピネフリン動態, 呼吸と循環 2003、51:269-275.
18. 河合敏昭, 盛英三, 他, 微小血管撮影装置開発と再生血管の可視化, *Radiosotopes* 2003, 52:55-58.
19. 西上和宏, 盛英三, 他, 血管再生療法の未来と画像評価法, *BME* 2002, 16:45-50.
20. 土持 裕胤, 盛英三, 他, 生分解性ゼラチンを用いた遺伝子治療法, *遺伝子医学* 2002,

6:382-385.

21. 佐藤英一, 盛英三, 他, 新 X 線源創製の試みとポリキャピタリーを用いた平行ビーム撮影, 日本写真学会誌 2002, 65:473-479.
  22. 福山直人, 盛英三, 他, ゼラチン-遺伝子複合体を用いた血管新生療法, 循環器科 2002, 51:259-263.
  23. 田中越郎他. 放射光微小血管造影法による再生血管の可視化. 放射光, 2002, 16:30-33.
  24. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Hara H, Asahara T, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* (in press)
  25. Nagaya N, Kangawa K. Ghrelin improves left ventricular dysfunction and cardiac cachexia in heart failure. *Circulation* (in press)
  26. Nagaya N, Okumura H, Uematsu M, et al. Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am J Physiol* (in press)
  27. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Tissue engineering for myocardial regeneration. *J Artif Org.*, 2002, 5:216-222.
  28. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T. Cardiac tissue engineering based on novel cell-sheet manipulation techniques utilizing temperature-responsive culture surfaces. *Tissue Engineering for Therapeutic Use* 6. , 2002, pp57-66.
2. 学会発表
1. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. 第 18 回日本 DDS 学会 (2002.6.21-22 札幌)
  2. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA through metal-coordinated conjugation of pullulan. IUPAC Polymer Conference on the Mission and challenges of Polymer Science and Technology (2002.12.2-5 Kyoto)
  3. 福中泰紀, 岩永一範, 森本一洋, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化率を持つハイドロゲルからの Plasmid DNA の Controlled release. 日本薬剤学会 2002 (2002.3.29-31 静岡)
  4. Aoyama, T., Hosseinkhani, H., Yamamoto, S., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Ultrasound enhancement of gene expression of plasmid DNA complexed with cationized gelatin derivatives. 3rd Asian Symposium on Biomaterials and DDS (2002.4.14-16 Taipei)
  5. 高分子学会第 51 回年次大会 (2002) 予稿集, p.2602
  6. 高分子学会第 51 回討論会 (2002) 予稿集, p.1527
  7. IUPAC-PC2002, Preprints p.591 (2002)
  8. 第 66 回日本循環器学会学術集会 2002.4.25., 岩畔英樹, 増田治史, 浅原孝之 et al. Incorporation of ex vivo expanded VEGF-expressing EPCs into foci of ischemic neovascularization.
  9. 第 79 回日本生理学会 2002.3.29., 岩畔英樹, 増田治史, 浅原孝之 et al. 浅原孝之遺伝子導入後血管内皮前駆細胞の虚血部位への関与について、
  10. American Heart Association 75th, 2002, Chicago
  11. Nagaya N, Horio T, Horio T, et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells.
  12. The 75th Scientific Sessions of American Heart Association, 2002.11.17-20, Chicago, Shimizu T, Yamato M, Isoi Y, Kikuchi A, Okano T. Tissue-Engineered Cardiac Grafts Survive and Preserve Their Beating up to 6 Months in Rat Subcutaneous Tissues. Supplement to *Circulation* Vol.106, No.19, II-464 (2002)
  13. 5th Annual Meeting of the Tissue Engineering Society international, 2002.12.8-10, Kobe. Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T.

Fabrication of multi-layered and neovascularized myocardial tissues by cell sheet engineering. Tissue Engineering Vol. 8, No.6, P1246 PP-197

H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所  
生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

プラスミド DNA を徐放する次世代の遺伝子キャリアシステムをデザイン、創製するための基礎検討を行った。生体吸収性高分子のゼラチンのカルボキシル基にエチレンジアミンを導入することによりカチオン化した。このカチオン化ゼラチンはプラスミド DNA とポリイオンコンプレックスを形成した。カチオン化ゼラチンからなる生体吸収性ハイドロゲル内にプラスミド DNA を固定化した後、ハイドロゲルを生体内に埋入したところ、ハイドロゲルの分解にともなってプラスミド DNA が徐放化された。徐放期間はハイドロゲルの分解期間によりコントロールされ、また、その徐放期間によってプラスミド DNA の発現期間は変化した。

A. 研究目的

本研究の目的は、虚血性心筋症（心筋梗塞、心筋症）や慢性閉塞性動脈硬化症などの血管狭窄病変に対する遺伝子細胞療法のための両親媒性遺伝子ベクターを開発し、これを用いて①血管内投与による高効率な Gene Therapy さらに②血管成長因子等の遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞・遺伝子治療法を開発することである。これまで行われた遺伝子の発現効率の高まる徐放化キャリアの作製の成果を基に、これをさらに高機能化するために、遺伝子の徐放が可能でかつ凝集のない微細化遺伝子キャリアを生体吸収性ゼラチンから作製する。これらを用いることで遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができ、遺伝子導入血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞・遺伝子治療法を実現できる。本研究が実現されることで、安全性が高く、かつ、導入効率が高い理想的な遺伝子導入ベクターが得られ、遺伝子治療の普及を加速できることが期待される。

B. 研究方法

ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。反応時におけるエチレンジアミン、水溶性カルボジイミドの濃度を変化させて、アミノ基導入率の異なるカチオン化ゼラチンを作製した。アミノ基導入率はトリニトロベンゼンスルホン酸（TNBS）法によりゼラチンの1級アミンを定量することにより行った。また、得られたカチオン化ゼラチンの electrophoretic light scattering (ELS) 測定によりゼラチンのカチオン化度を調べた。得られたカチオン化ゼラチンの 10wt%水溶液にグルタルアルデヒドを異なる濃度で加え、攪拌の後、4℃で

12時間架橋反応を行った。得られたカチオン化ゼラチンハイドロゲルは 100mM のグリシン水溶液で処理され、残存アルデヒド基を化学的にブロックした。ハイドロゲルを蒸留水で洗浄、凍結乾燥することによって乾燥状態の架橋カチオン化ゼラチンを得た。ハイドロゲルの架橋度は、ハイドロゲルの膨潤時におけるハイドロゲル重量に対するハイドロゲル内の水の重量パーセント（含水率）を算出することによって評価した。

本実験では、CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA を用いた。このプラスミド DNA を Bolton-Hunter 試薬にて放射ヨードラベル化した。このラベル化プラスミド DNA 水溶液にて乾燥カチオン化ゼラチンハイドロゲルを室温、12時間の条件下で膨潤、<sup>125</sup>I ラベル化プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルを作製した。一方、カチオン化ゼラチンを同様の方法で <sup>125</sup>I ラベル化を行った。<sup>125</sup>I ラベル化プラスミド DNA 含浸ハイドロゲルおよび <sup>125</sup>I ラベル化ハイドロゲルを ddY マウスの背部皮下へ埋入した。所定時間経過後の埋入部位での残存放射活性を測定することによって、体内におけるプラスミド DNA およびその徐放担体であるカチオン化ゼラチンハイドロゲルの残存の時間変化を評価した。次に、プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス大腿筋肉内に埋入、経時的に筋肉を採取、そのプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。それぞれの動物実験はサンプル数 5~6 で行い、ANOVA 法による有意差検定を行った。

（倫理面への配慮）

「京都大学動物実験に関する指針（昭和 63 年総長裁定）」に従い、動物実験に係る再生医科学研究所内諸規則を遵守し、動物愛護に十分配慮し

ながら動物実験を実施した。

### C. 研究成果

カチオン化反応におけるエチレンジアミンと水溶性カルボジイミド濃度の増加にともないゼラチンへのアミノ基導入率は増加した。ELS 測定により得られたカチオン化ゼラチンが正電荷をもっていることを確認した。また、プラスミド DNA との混合により、カチオン化ゼラチンの正電荷は減少した。見かけの分子サイズを動的光散乱測定によって評価したところ、カチオン化ゼラチンとの混合によってプラスミド DNA の分子サイズが小さくなることがわかった。混合物の電気泳動測定の結果も考慮して、プラスミド DNA がカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックス形成していることを確認した。

生体内におけるカチオン化ゼラチンハイドロゲルの分解性を調べたところ、ハイドロゲルは時間とともに分解していくこと、さらに、その分解がハイドロゲルの含水率の増加とともに速くなることがわかった。ハイドロゲル作製時におけるグルタルアルデヒド濃度の減少とともに、ハイドロゲルの架橋程度は低下した。これは含水率の増加とハイドロゲルの酵素攻撃によるゼラチン分子の水可溶化の速度の上昇したことが原因であると考えられる。ハイドロゲルの生体内分解性は、その架橋程度をコントロールすることでコントロールすることができた。

<sup>125</sup>I ラベル化プラスミド DNA を含浸したカチオン化ゼラチンハイドロゲルを埋入したところ、その残存放射活性は時間とともに減少した。また、その減少はハイドロゲルの分解性によってコントロール可能であった。プラスミド DNA の生体内残存の時間変化は、カチオン化ゼラチンハイドロゲルの生体内残存の時間変化とよく相関していた。

プラスミド DNA 含浸カチオン化ゼラチンハイドロゲルをマウス筋肉内に埋入時の埋入部位における遺伝子発現が見られた。水溶液状態でのプラスミド DNA の筋肉内投与後における投与部位での遺伝子発現は、投与 2 日後にピークに達した後、消失した。これに対して、プラスミド DNA をハイドロゲル内に含浸、埋入した場合には、埋入 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間も延長した。この遺伝子発現期間は、プラスミド DNA の徐放期間の延長とともに延長した。プラスミド DNA 含浸ハイドロゲル埋入部位周辺の遺伝子発現を組織学的に観察したところ、ハイドロゲル周辺筋肉におけるプラスミド DNA の徐放期間に対応した遺伝子発現が認められた。

### D. 考察

薬物の徐放化研究の歴史は古く、これまでに多くの報告がされている。しかしながら、その中でもプラスミド DNA の徐放化の試みは少ない。これらの報告では、生体吸収性高分子キャリア内にプラスミド DNA を包含させ、プラスミド DNA のキャリア内での単純拡散によりその徐放をコントロールしている。本研究では、これとは異なった徐放メカニズムを提唱している。すなわち、プラスミド DNA をポリイオンコンプレックスにより徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンに相互作用、徐放キャリア内に固定している。この状態ではプラスミド DNA は徐放されず、ハイドロゲルが分解され、カチオン化ゼラチン分子が水可溶化して初めて固定化プラスミド DNA はハイドロゲルから放出される。このシステムでは、徐放化キャリア自身の分解により DNA の徐放パターンをコントロールすることができるので、キャリアのサイズ、表面積などの条件は、プラスミド DNA の徐放には全く影響を与えない。また、これまでのプラスミド DNA 徐放システムとは異なり、プラスミド DNA は水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリイオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。このため、徐放されたプラスミド DNA は遺伝子発現に有利であると考えられる。プラスミド DNA の徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、私たちの徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り徐放キャリアの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらす、本徐放化システムが *in vivo* における遺伝子発現の有力なツールであることがわかった。本研究では、ハイドロゲルは埋入が必要なサイズである。すでに、注射可能なサイズ (10~150 $\mu$ m 直径) カチオン化ゼラチンハイドロゲル粒子の作製とそれらによるプラスミド DNA の遺伝子発現の増強も確認している。これらの研究成果は、期待通りプラスミド DNA の発現増強のための徐放化システムの作製が可能であることを実験的に示したものである。今後はそのサイズをより小さく、しかも凝集しないハイドロゲルシステムの創製を目指す。予備的ではあるが、カチオン化ゼラチンにポリエチレングリコールを結合させることによってプラスミド DNA と相互作用する粒子サイズの小さなハイドロゲルの作製ができることを確認している。

### E. 結論

カチオン化ゼラチンからなる生体吸収性ハイドロゲルは、その分解とともにプラスミド DNA を徐放化、それに続く遺伝子発現レベルの増強と

発現期間の延長を可能にした。生体吸収性ハイドロゲルを用いたプラスミド DNA の徐放化の概念がうまく作動することがわかったことから、今後はこのシステムの微小化を目指す。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Fukunaka Y, Iwanaga K, Morimoto K, Kakemi M, Tabata Y, Controlled release of plasmid DNA from cationized gelatin hydrogels based on hydrogel degradation. J. Controlled Release, 80:333-343, 2002.
2. Hosseinkhani H, Aoyama T, Ogawa O, Tabata Y, Liver targeting of plasmid DNA by pullulan with metal coordination. J. Controlled Release, 83:287-302, 2002.

##### 2. 学会発表

1. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. 第 18 回日本 DDS 学会 (2002.6.21-22 札幌)
2. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Liver targeting of plasmid DNA through metal-coordinated conjugation of pullulan. IUPAC Polymer Conference on the Mission and challenges of Polymer Science and Technology (2002.12.2-5 Kyoto)
3. 福中泰紀, 岩永一範, 森本一洋, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化率を持つハイドロゲルからの Plasmid DNA の Controlled release. 日本薬剤学会 2002 (2002.3.29-31 静岡)
4. Aoyama, T., Hosseinkhani, H., Yamamoto, S., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Ultrasound enhancement of gene expression of plasmid DNA complexed with cationized gelatin derivatives. 3rd Asian Symposium on Biomaterials and DDS (2002.4.14-16 Taipei)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 研究要旨

新しいプロセスである超高压処理（～10,000気圧）によるポリビニルアルコール（PVA）のナノ粒子形成を確認した。さらに PVA と DNA の混合物に超高压処理を行うことによって、PVA-DNA の分子複合体の形成に成功した。各種の条件設定を行い、形成条件とその機構について検討を加えた。

### A. 研究目的

虚血性心疾患や慢性閉塞性動脈硬化症などに対する遺伝子治療のためには、遺伝子導入とその発現効率の高いベクターの開発が不可欠である。本研究では、徐放能を残した状態で凝集せずに、ウイルスと同じナノメートルレベルの徐放化遺伝子キャリアを開発することを目的として、合成高分子を集合化させる新しい技術の開発とその応用について研究を行った。

これまで我々は高压処理による高水素結合性分子の相互作用を利用した構造体形成について研究を行ってきた（図1）。明らかにしてきた。これは従来用いられていた温度や pH、濃度、電磁場などの外部環境ではなく圧力を用いた独創的な構築方法である。モデル高分子としてポリビニルアルコール(PVA)を用いた場合、高濃度領域(5

～20w/v%)においては成形性の優れたハイドロゲルが形成でき、ナノオーダーで網目構造を有する集合体の構築が確認された。濃度変化における構造の変化を観察したところ、濃度が下がるにつれてナノオーダーの粒子の凝集構造が観察されることから、より低濃度領域では、ナノ微粒子として形成する可能性が考えられた。そこで、本研究の目的の一つとして、高压処理によるナノ粒子形成の可能性について検討した。

さらに、ポリビニルアルコール（PVA）は、DNA 溶液中に存在すると DNA の安定性を向上させることが以前に報告されている。PVA と DNA 間の相互作用も水素結合性のものであると考えられている。そこで、本研究の第二の目的として、超高压処理を行うことにより DNA のさらなる安定化を目的とし、DNA と PVA の集合体形成について検討を行い、遺伝子デリバリーのためのキャリアとしての基礎研究を行った。

### 超高压による集合化

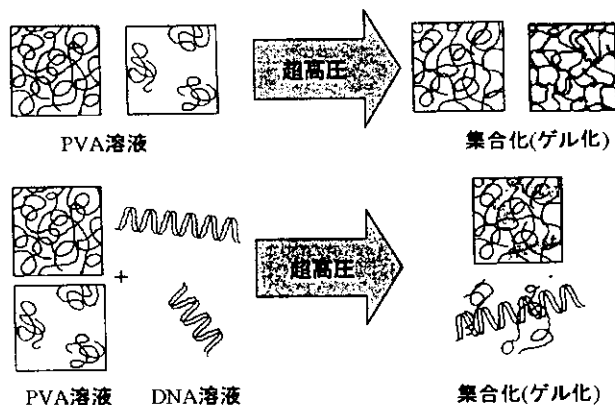


図1 超高压に蹴る集合体形成

### B. 研究方法

#### ○超高压処理を行う試料の調製

重合度、けん化度の違う三種類の PVA を用いた。以下に示す。

polymer	重合度	けん化度	分子量
PVA205	500	88	22000
PVA217	1700	88	74800
PVA124	2400	98.5	105600

PVA に所定量の超純水を加え、オートクレーブにより完全に融解させた。PVAゲルおよびナノ粒子形成観察のためには溶液のみで、DNA+PVA 複合体形成の観察のためには、DNA+PVA 溶液の最終の濃度が1%,0.1%,0.02%, 0.01%, 0.005%, 0.002%, 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001%, 0.00002w/v%になるように12種類のPVA水溶液を調製した。DNAは1K bp Ladder Maker(0.002w/v%)と100 bp Ladder Makerを用いた。PVA水溶液にDNA水溶液を添加後、密封し、40℃において10000atmで10分間処理した。高圧処理におけるDNAとPVAの相互作用を観察するために電気泳動を行った。

#### 泳動条件

ゲル:1%アガロースゲル  
 試料:PVA溶液+1k bp Ladder Maker  
 電圧:100V  
 温度:室温  
 泳動時間:1時間  
 Maker:1K bp Ladder Maker  
 detect:UV(260nm)

#### C. 研究成果

PVA217の希薄溶液(1w/v%以下)を作製し、超高压処理を行った。肉眼的には、ゲルは生成せず、白濁～透明な液体のまま出会った。白濁した溶液を静置あるいは遠心分離したところ、白色沈殿が得られた。これは容易に再分散可能であり、微粒子様の沈殿であることが示唆された。さらに濃度を下げると沈殿の形成は肉眼的には判別不能であったが、濁度測定、あるいは動的光散乱測定により、ナノ～マイクロメートルの微粒子の形成が確認された。図2に希薄溶液より得られたPVAナノ粒子の走査型電子顕微鏡写真(SEM)を示す。100～200ナノメートルの比較的粒径の揃ったナノ粒子が形成していることがわかる。

この超高压処理を用いた微粒子形成法は、簡便で、特に分散安定剤も不要であり、新しい微粒子調製法として有用であると考えられた。

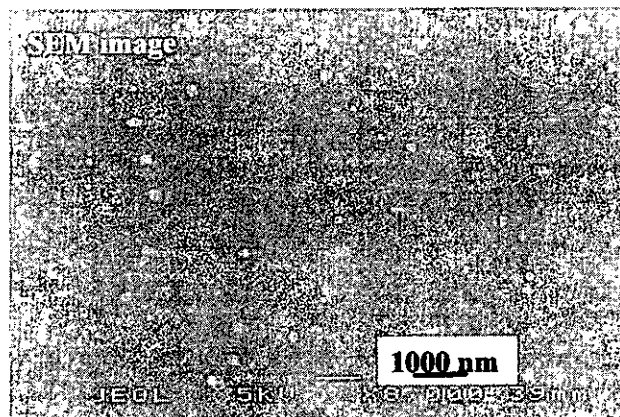


図2 超高压処理(10,000気圧,10分)によって得られたPVAナノ粒子のSEM像

三種類のPVAを用いた結果を下記の図(図3～5)に示した。分子量の低いPVA(205)では変化は超高压処理による泳動パターンの変化は見られなかった。一方、PVA(217)とPVA(124)においてはPVA溶液の濃度が低い場合、高圧処理をしたレーンにおいてのみ高分子量のところにDNAのスポットが出ているのが観察された。これはDNAとPVAが超高压処理をすることにより何らかの相互作用をしたものと考えられる。現段階では推測であるが、DNA(Maker)の溝(groove)にPVAが三重鎖を形成するように水素結合したのではないかと考えられる。しかも一本のPVA鎖が複数のDNAと水素結合することによって泳動結果が高分子量側にシフトしたと考えられる。すなわち、分子量の違うMakerがあるために高分子量のスポットがブロードになっていると考えている。



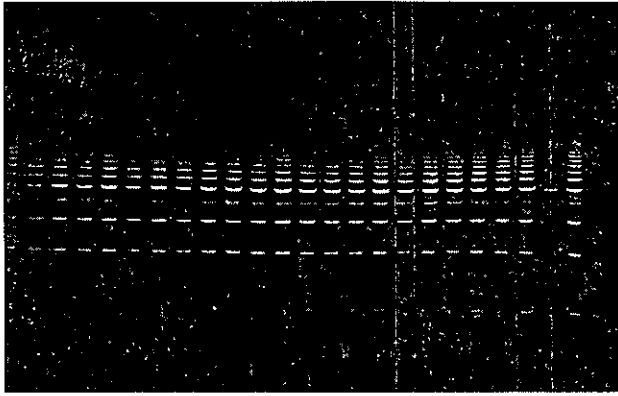


図3 PVA205+DNAの泳動パターン

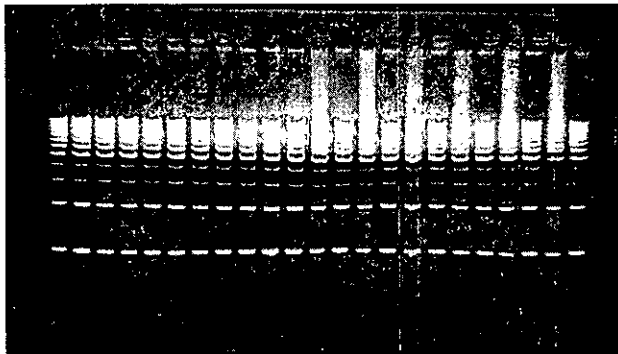


図4 PVA217+DNAの泳動パターン

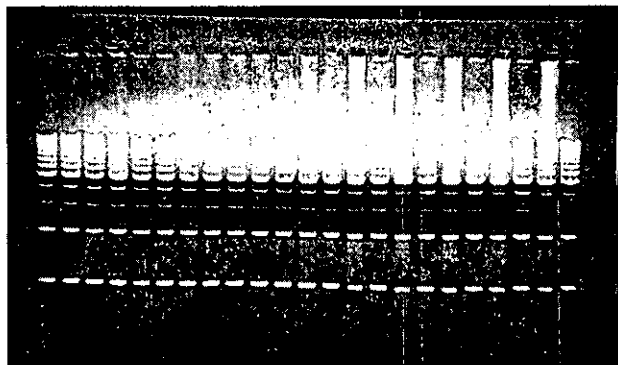


図5 PVA214+DNAの泳動パターン

図3-5のレーンの解説

左から

- Lane1 PVA1w/v%+1k bp Ladder Maker+超高压
- Lane2 PVA1w/v%+1k bp Ladder Maker(コントロール)
- Lane3 PVA0.1w/v%+1k bp Ladder Maker+超高压
- Lane4 PVA0.1w/v%+1k bp Ladder Maker(コントロール)
- .
- Lane11 1K bp Ladder Maker(マーカー)
- .
- Lane22 PVA0.00002w/v%+1kbp Ladder Maker+超高压

Lane23 PVA0.00002w/v%+1kbp Ladder Maker コントロール

-----

100bp Ladder Maker と PVA の相互作用は泳動では変化がなかった。

D. 考察

超高压状態では、物質間の相互作用の内、水素結合成分が強調されることが報告されている。PVA 自身は水素結合性を側鎖に有しており、その濃厚溶液は短時間の処理でハイドロゲルを形成する。これまでの検討により、PVA ハイドロゲルの生成メカニズムは、まず分子内での水素結合形成による分子の局所的凝縮と粒子形成、それに引き続く粒子間の架橋からなると考えられている。これによれば、溶液の濃度を下げることによって、粒子間架橋を抑制できれば、分子集合体レベルのサイズの微粒子が得られることが推測される。本研究では、この仮定が正しいことを示すことが出来た。特にPVA分子鎖の分子量分布の狭いものあるいは立体規則性のあるものについて、非常に良好な粒子形成が観察されており、本研究の目標である遺伝子デリバリー用ナノ粒子のみならず、新規な汎用材料としての応用も考えられる。

DNA との相互作用については、これまでに PVA はポリピロリドンと並んで、DNA との相互作用により酵素分解に対する安定化効果の存在することが報告されている。DNA 二重螺旋には主溝と副溝の2種の溝が存在し、この部位には水素結合性官能基が周辺のみならず排除される形で存在している。従って、いずれかの部分に PVA を積極的に相互作用させることが出来れば、単に混合した場合と比較して、さらに強固な結合による分子集合体が形成し、これが遺伝子デリバリー担体として応用可能ではないかと考えた。本研究では、分子間相互作用の確認を行った。従来から報告されている

PVA+DNA の相互作用については、電気泳動による検討に於いては検出できなかった。これは非常に弱い相互作用であるために、泳動に影響を与えることが無かったと考えられる。一方、超高压処理を行った場合には、PVA の分子量の増大に伴って、分子集合体の形成と思われる泳動パターンが得られた。濃度を高くすると、白濁も観察され、マクロな凝集体の形成も可能であった。動的光散乱の結果からは、単一のピークが得られず、種々の DNA 分子との混合集合体であることが示唆された。PVA は血中に於いて高い補体活性可能を有している。PVA+DNA 複合体を投与することによって、補体第 3 成分以降の蛋白質による修飾を受け、貪食細胞に取り込まれ、内部での遺伝子発現が期待される。

#### E. 結論

PVA 溶液を希釈して超高压処理を行うことにより、容易にナノ粒子が調製できることが明らかとなった。

PVA+DNA 分子集合体の超高压処理による形成が確認された。PVA の分子量、濃度によって形成量やサイズが異なる種々の集合体（ナノ粒子）が得られた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

①高分子学会第 51 回年次大会(2002)

予稿集、p.2602

②高分子学会第 51 回討論会(2002)

予稿集、p.1527

③IUPAC-PC2002, Preprints p.591 (2002)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）  
分担研究報告書

循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製に関する研究  
分担課題：ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

分担研究者 浅原孝之 東海大学医学部生理科学教授

研究要旨 次世代遺伝子導入ベクターとして非ウイルス性 gelatin hydrogel (GHG) を用いて、VEGF 遺伝子導入した血管内皮前駆細胞 (EPCs) 移植療法の虚血性疾患に対する治療有効性及び GHG のベクターとしての有用性を示した。

A. 研究目的

虚血性疾患患者における自己血由来 EPC 移植療法の開発において、高齢患者における自己 EPCs の機能低下が問題となり、ex vivo での安全な血管新生促進遺伝子導入法による EPC 機能強化療法の開発が望まれる。本年度は、非ウイルス性ベクターの GHG を用いて EPC への遺伝子導入効率を検討するとともに、VEGF 発現 plasmid を同ベクターを用いて導入した EPC 移植療法の虚血性疾患に対する治療有効性を検討した。

B. 研究方法

- 1) 成人末梢血由来 EPCs の採取；末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、血管内皮細胞用培地を用いて単核球中 EPCs を ex vivo にて 7 日間、分化・増幅培養した。
- 2) GHG による DNA plasmid 遺伝子導入；上記培養 EPCs に GHG を用いて DNA 結合性正荷電ゼラチン貪食能により GFP 及び VEGF plasmid 遺伝子を導入した。
- 3) 上記遺伝子導入された EPCs の増殖能・遊走能の検討；増殖能は MTS assay kit により、遊走能は modified Boyden chamber により行った。
- 4) VEGF 遺伝子導入 EPC 移植療法の有効性の検討；上記 ex vivo にて培養した EPCs を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、放射光血管造影 (Spring8)、Laser Doppler Analysis により 4 週後に評価した。

C. 倫理面への配慮

末梢血はボランティアに十分なインフォームドコンセントを施し採血した。また、動物実験は東海大学医学部動物倫理委員会の承認を得て、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針及び動物愛護に基づき施行した。

D. 研究成果

GFP 遺伝子導入 EPCs の導入効率は、他の

ウイルス性ベクターと比し、同等以上導入効率であった。また、VEGF 遺伝子導入 EPCs の増殖能・遊走能は非遺伝子導入及び GFP 遺伝子導入 EPCs に比し有意に上昇していた。また、放射光血管造影において、アセチルコリン反応性の血管新生が認められた。また Laser Doppler Analysis では VEGF 遺伝子導入 EPC 移植群において有意に血流の改善が認められた。

D. 考察

GHG を用いた VEGF 遺伝子導入 EPC 移植により、マウス重症下肢虚血部位において機能的な新生血管、血流の改善が認められ、GHG は臨床応用を考える上で重要と考えられた。

E. 結論

虚血性疾患に対し、血管新生促進遺伝子導入による EPC 移植療法を開発する上で、非ウイルス性ベクターは、ウイルス性のそれに比し、倫理面での弊害が少なくより実際の遺伝子導入法として期待される。本研究により、GHG の有用性及び本ベクターを用いた VEGF 遺伝子導入 EPC 移植療法の有用性が示された。

F. 健康危機情報

本研究における GHG の生体安全性は証明されている (Tabata et al., 1999)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwaguro H, Yamaguchi J, Kalka C, Murasawa S, Masuda H, Hayashi S, Silver M, Li T, Isner JM, Asahara T. Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*. 2002, 105:732-738.
- 2) Kawamoto A, Iwaguro H, Asahara T et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2002, 107:461-468.

## 2. 学会発表

1) 第 66 回日本循環器学会学術集会  
2002.4.25., 岩畔英樹、増田治史、浅原孝之  
et al. Incorporation of ex vivo expanded  
VEGF-expressing EPCs into foci of ischemic  
neovascularization.

2) 第 79 回日本生理学会 2002.3.29., 岩畔  
英樹、増田治史、浅原孝之 et al. 浅原孝之  
遺伝子導入後血管内皮前駆細胞の虚血部位へ  
の関与について、

## II. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### I. その他

特記事項なし