

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 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田畑 泰彦

平成 16 (2004) 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 .....	13
田畑 泰彦	
2. 高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発 .....	19
岸田 晶夫	
3. ヒト組み替え DNA 生分解性物質の開発 .....	23
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 .....	25
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 .....	28
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 .....	31
清水 達也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....	33
IV. 研究成果の刊行物・別刷 .....	38

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

プラスミド DNA を徐放するための生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる次世代遺伝子キャリアシステムを作製し、生体内におけるプラスミド DNA の発現レベルと発現期間とが高められることを確認した。さらに、カチオン化ゼラチンにポリエチレングリコール (PEG) を結合させ、プラスミド DNA と混合することによって、プラスミド DNA を含浸した微細化キャリア粒子を作製できた。また、超高压処理による遺伝子-高分子複合体の調製と機能評価およびそれらの担体としての無機ナノ粒子の調製と複合化についての検討を行った。一方、血管内皮前駆細胞 (EPC) への遺伝子導入による細胞-遺伝子ハイブリッド治療について以下の検討を行った。まず、従来の遺伝子導入方法により Hif1- $\alpha$  の血管新生性遺伝子導入した EPC 移植療法の虚血性疾患に対する治療有効性を示した。次に、カチオン化ゼラチンからなる次世代遺伝子キャリアシステムを利用して、*in vitro* で EPC、末梢血単球、マクロファージ、骨髄単核球に高い効率で遺伝子を導入できることを示した。また、カチオン化ゼラチンからなる次世代遺伝子キャリアシステムから強力な血管拡張ペプチドであるアドレノメデュリンの遺伝子を徐放化することによって、血管再生治療が行える可能性を示した。さらに、このアドレノメデュリン遺伝子をカチオン化ゼラチンシステムから徐放化することにより機能強化した EPC を利用した肺高血圧治療の有効性を示した。また、血管再生の評価法として、病院設置型微小血管造影装置を完成させた。一方、細胞移植方法として、単離細胞移植と細胞シート移植とを比較したところ、細胞シートの移植では単離細胞の移植に見られる細胞塊の形成による内部壊死を回避でき、細胞の損失なく効率よく移植できることがわかった。この細胞シート移植法を用いて、EPC を導入した心筋細胞シートを *in vivo* へ移植したところ EPC がシートとともに生着し血管網の形成に寄与しうることを示した。

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研究所  
再生医療部 室長

清水達也 東京女子医科大学  
先端生命医科学研究所 講師

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

A. 研究目的

本研究の目的は、虚血性心筋症（心筋梗塞、心

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。

## 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。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%水溶液に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、攪拌下、4℃で 12 時間の架橋反応を行った。残存アルデヒド基を化学的にブロックするために、カチオン化ゼラチンハイドロゲルを 100mM のグリシン水溶液で処理した。蒸留水で洗浄、凍結乾燥することによって架橋程度の異なる架橋カチオン化ゼラチンを得

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後、経時的に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。

カチオン化ゼラチンのリン酸緩衝溶液 (pH8.5) 中に、片末端メトキシ、片末端活性化エステルをもつポリエチレングリコール (PEG、重量平均分子量: 5,000、日本油脂 (株) から供与) を加え、所定時間、反応させた。PEG 仕込み量を変化させることにより、異なる PEG 導入率をもつカチオン化ゼラチンを得た。PEG 導入率は TNBS 法によるアミノ基の減少から算出した。PEG 導入カチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) とプラスミド DNA とを水溶液中で混合した。両者のポリイオンコンプレックス形成については、dynamic light scattering (DLS) 測定による混合前後のプラスミド DNA の分子サイズ変化、および混合前後のプラスミド DNA の陰イオン交換樹脂への吸着挙動を調べることで評価した。PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックスをマウス筋肉内に投与した後の遺伝子発現についても調べた。

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、けん化度の違う数種類の PVA を用いた。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た。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 水溶液を調整した。DNA は pEGFP-C1 プラスミドベクター (4.7kbp) 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。

次に、分子量の異なる 3 種の PVA と緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードしたプラスミドを FITC でラベルし、種々の比で混合し、超高圧処理 (10,000 気圧) を行った。得られた溶液をそのまま所定の細胞を培養しているウエルに添加し、FITC の発色より複合体の取り込みを、1 日後の GFP の発現により遺伝子発現を評価した。さらに、焼結リン酸カルシウムの結晶のサイズを制御することによって、ナノ粒子化ならびにプラスミド DNA と複合化し、より高い遺伝子導入剤としての応用を試みた。

ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

成人末梢血より血管内皮前駆細胞 (EPC) を単離した。すなわち、末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、EPC 用培地を用いて単核球中 EPC を *ex vivo* にて 7 日間、分化・増幅培養した。次に、培養 EPC にアデノウイルスベクターを用いて Hif1- $\alpha$  遺伝子を導入した。遺伝子導入された EPC の増殖能は MTS assay kit により、basic-FGF に対する遊走能を modified Boyden chamber により行った。

Hif1- $\alpha$  遺伝子導入 EPC 移植療法の有効性を検討するために、*ex vivo* にて培養した EPC を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、Laser

Doppler Analysis により 4 週後に血流量を評価した。

細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

EPC にカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステム (GFP およびアドレノメデュリン遺伝子を含む) を貪食させ、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した。また、血管再生の評価方法として、これまでの放射光を線源とする微小血管造影法に代わる、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した。

遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ウサギ下肢虚血モデルを作製後にアドレノメデュリンプラスミド DNA (500 $\mu$ g)、同量のアドレノメデュリンプラスミド DNA とカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアとの複合体、カチオン化ゼラチン遺伝子キャリアのみを下肢骨格筋内に投与した。1 カ月後に虚血下肢の血流改善度と筋肉内の毛細血管数を比較した。またラット下肢虚血モデルを作製し、アドレノメデュリン (ペプチド) の局所投与及び骨髓単核細胞の移植を同時に行った群の治療効果を、アドレノメデュリン単独投与群、細胞移植単独群と比較した。

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。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4枚を積層化後ヌードラット背部以下組織に移植した。比較対照としてシート4枚に相当する細胞数の心筋細胞浮遊液を対側の背部皮下組織に移植し、経時的に組織像を観察した(H-E, Azan, TUNEL, connexin43)。次に、遺伝子導入のターゲットとしてEPCをラット末梢血より単離培養、DiIで蛍光ラベリング後2枚の心筋細胞シート間に挿入し、in vitroで培養し、背部皮下組織への移植実験を行った。

### 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

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アミノ基導入率の高いカチオン化ゼラチンを作製することができた。ELS測定により、カチオン化ゼラチンが正電荷をもっていること、また、カチオン化ゼラチンとの混合によりプラスミドDNAの負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。次に、DLS測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、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。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、さらに、その分解が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速くなることがわかった。これは、グルタルアルデヒドの濃度の減少にともなって、ハイドロゲルの架橋程度が低下し、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。このように、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が可能であり、その時間変化は、前述の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。これは、体内でプラスミドDNAが、その徐放キャリアであるハイドロゲルの分解性によってコントロールされていることを示している。

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。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。また、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。次に、PEGを導入したカチオン化ゼラチン(PEG-ゼラチン)を用いて、プラスミドDNAとのポリイオンコンプレックス形成について調べた。DLS測定、吸着実験の結果、PEG-ゼラチンとプラスミドDNAとがポリイオンコンプレックスを形成し、そのコンプレックス表面がPEG分子鎖でおおわれていることが示された。これらのPEG-ゼラチン-プラスミドDNAをマウス筋肉内に投与したところ、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

PVA-プラスミドDNA混合溶液を超高圧処理した後に電気泳動を行い、複合体形成を検討した。数種のPVAを用いたが、昨年報告したDNAマーカーの場合と比較すると、より高分子量のPVAを用いなければ複合体は生成しなかった。重合度1500以上のPVAであれば複合体の形成バンドが観察された。この結果より、PVAであれば複合体とDNAの複合体形成には双方の分子量が影響することがわかった。PVA分子はそれ自身で集合体

を形成する能力を有しており、これに DNA が相互作用するのではないかと考えている。

次に、PVA-プラスミド DNA 複合体の細胞内への取り込みについて検討を行った。種々の細胞を用いて検討を行った結果、特に貪食能の高い細胞において、多量に取り込まれていることが明らかとなった。マクロファージ系の樹立細胞である RAW 細胞に PVA-プラスミド DNA 複合体を投与した場合、ほぼすべての細胞が FITC に由来する蛍光を発しており、高い取り込みが実現されていることがわかった。さらに、GFP 遺伝子を用いて遺伝子発現を観察したところ、ほとんどすべての細胞は弱くではあるが、発現していることがわかった。

焼結リン酸カルシウムのナノ粒子の作製を行った。水中への分散性に問題があるため、このままでは遺伝子デリバリー用担体として応用することは困難であったため、表面改質を行って水分散性の向上を試みた。その後、プラスミド DNA を複合化させ、遺伝子取り込みについて検討を行った。細胞を用いた実験によって、無機微小粒子の細胞内への取り込み、および遺伝子導入が確認できた。

#### ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPC の増殖能・遊走能はコントロール遺伝子導入 EPC に比し有意に上昇していた。また虚血組織内の新生血管数は、有意に増加しており、Laser Doppler Analysis では Hif1-alpha 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。

#### 細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

アドレノメデュリン遺伝子を含むカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムを貪食させた EPC は、ラットの肺高血圧モデルで、EPC 単独治療群よりも有意に肺血圧と肺血管抵抗を低下させた。動物の生存期間も延長させた。遺伝子導入

による副作用は認められなかった。次世代遺伝子ベクターによる安全で高率の高い遺伝子導入法が確立された。

一方、空間像度 50  $\mu$ m の普及型微小血管造影装置の最終機を完成させ、動物実験でその有用性を確認した。今後は国立循環器病センターに移設し臨床治験で、再生医療における有用性の評価を行う。

#### 遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ウサギ下肢虚血モデルへのアドレノメデュリン遺伝子導入によって、レーザー Doppler より求めた虚血下肢/健側下肢血流比が有意に改善し、また毛細血管数の有意な増加が認められた。アドレノメデュリンは骨格筋内の Akt をリン酸化し血管新生に働くことが明らかとなった。アドレノメデュリンプラスミド DNA とカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアとの複合体の投与はプラスミド DNA 単独に比べ、骨格筋内のアドレノメデュリンの発現およびその発現期間を持続させ（2週間以上）、強力な血管再生作用を示した。

またアドレノメデュリン投与と骨髄単核細胞移植の併用群では、アドレノメデュリン単独投与群、細胞移植単独群と比較してレーザー Doppler による下肢血流量の増加と毛細血管数の増加を認めた。In vitro ではアドレノメデュリンは骨髄単核細胞のアポトーシスを抑制し、血管内皮細胞への接着、分化を促した。

#### 遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

細胞浮遊液の移植と重層化細胞シートの移植との比較において前者では移植後早期に TUNEL 陽性細胞を認め、7 日目では球状の細胞塊の中央部に壊死組織を認めたのに対し、後者では TUNEL 陽性細胞は認めず経時的にも層状の組織内に壊死組織は認めなかった。また前者では数日してから connexin43 の発現を認めたのに対し、後者では組織内に最初から connexin43 の発現を認めた。また蛍光ラベルした EPC を心筋細胞シート間に挿入し培養後、皮下組織に移植したとこ

る前駆細胞が拍動する心筋組織内に生着して残存していることが確認された。また一部の細胞は管状構造を形成し血管網の再構築に貢献していることが示唆された。

#### 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 を徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成させ、徐放キャリア内に固定化、保持している。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。この徐放メカニズムでは、拡散により徐放を制御している従来法とは違い、キャリアのサイズ、体積あたりのキャリアの表面積などが変化しても、プラスミド DNA の徐放パターンを自由に変えることができる。また、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。そのため、プラスミド DNA の負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミド DNA のみの徐放と比較して、プラスミド DNA の遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックスを形成しているため、プラスミド DNA の DNase による酵素分解に対する抵抗性も向上する。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、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。これらのハイドロゲル粒子においても、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確認している。本年度は、カチオン化ゼラチンに PEG を結合させることによってプラスミド DNA と相互作用できる微細化ハイドロゲル粒子の作製ができることがわかった。この粒子は、プラスミド DNA を内部に含み、外側を PEG 鎖がカバーした高分子ミセル様の構造をもつ。今後は、カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA との相互作用について、より詳しく調べ、ゼラチンの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化のコントロールの検討を進める。

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。ここに水素結合性を有する分子（DNA 等）を添加し、分子集合体の形成が可能である。溶液の濃度を下げ、粒子間架橋を抑制することによって、ナノメートルサイズの遺伝子デリバリー用微粒子が得られた。サイズの大きなプラスミドを用いた場合には、より大きな分子量の PVA を用いる必要があり、PVA と DNA の双方のサイズ効果の存在が確認できた。

PVA-プラスミド複合体の取り込みについては、PVA の高い補体活性化能によるものと考えてい



る。すなわち、PVA+DNA 複合体を投与することによって、補体第3成分以降のタンパク質による修飾を受け、これによって貪食細胞に取り込まれていると思われる。そのため、取り込みに引き続く遺伝子発現では、貪食による食胞内部での遺伝子の分解が優勢になり、細胞質に逃れ出て遺伝子発現するプラスミドが少ないために、低い発現量となったと考えられる。

この食細胞の貪食による食胞への取り込みは、水酸基によることが補体の活性化の研究により明らかになっている。すなわち、水酸基を用いた水素結合を駆動力として遺伝子と複合化させる方法論の場合には、避けて通ることができない。しかし、一般に補体活性化によって活性化された免疫細胞は肺に集積することが知られており、原発性肺高血圧症など、肺特有の疾病の治療においては特別のターゲッティング機構を組み込まなくても自発的に肺に集積するため有用である。そのためには、食胞からの早期の脱出を可能にする方法論を考案する必要がある。食胞からの遺伝子の放出に有効な手段としては、食胞内部の浸透圧を上昇させることによって食胞を破裂させることが考えられる。この目的のために、無機微粒子の応用を考案した。無機粒子を同時に取り込ませることによって、低 pH で一気に溶解させてイオン濃度を上昇させ、浸透圧変化を促す。これに用いる無機ナノ粒子の合成と水分散性を向上させるための表面改質を行った。また、それ自体の遺伝子デリバリー効果について検討したところ、かなりの可能性を有していることが明らかとなった。浸透圧変化を誘発する能力が発揮されれば、細胞膜の透過性を向上させることも考えられ、これを裏付ける結果と考えている。

Hif1- $\alpha$  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た。Hif1- $\alpha$  は血管再生候補遺伝子として有用であると考えられた。

カチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムによる遺伝子導入法は安全でかつ導入効率が高い。アドレノメデュリン遺伝子を EPC へ導入す

ると肺高血圧の低減に有効であった。これは EPC の血管発生（新生）作用を同細胞内で発現するアドレノメデュリンが補完するためと考えられた。確認されたメカニズムのうち、アドレノメデュリンの強い血管拡張作用にもとづく *arteriogenesis* の促進、血管内皮の *apoptosis* 抑制作用、固有の *angiogenesis* 作用などが重要と考えられた。

本研究ではアドレノメデュリンが独自の血管再生作用を有することを明らかにした。さらに非ウイルスベクターであるカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムとアドレノメデュリン遺伝子複合体を投与すると強力な血管再生効果が得られることをウサギ下肢虚血モデルで証明した。虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対して血管再生療法が行われているが、効果が不十分な症例が少なからず存在する。また従来から遺伝子治療に使われてきたウイルスベクターは抗原性・毒性など安全性に問題がある。本研究では、主任研究者らが開発したカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムを遺伝子の非ウイルスベクターとして用いることで安全で強力な血管再生治療を可能にした。本治療法は、正に帯電したカチオン化ゼラチン遺伝子キャリアシステムと負に帯電した DNA とが複合体を形成し、キャリアの分解により内包遺伝子が徐放されるという新しいコンセプトに基づくものである。またアドレノメデュリン投与と骨髄幹細胞移植の併用は、両者の相加効果のみでなく、アドレノメデュリンによる移植細胞のアポトーシス抑制、血管内皮細胞への接着促進、分化促進が関与しており、両者は血管再生に相乗的に働く可能性が示された。この併用療法は重症下肢虚血に対する新たな治療となる可能性がある。

シート状の細胞の移植が単離した浮遊細胞の移植に比べ、壊死や流出をおこすことなく効率的であることが確認された。これは細胞を最初から互いに接着した状態で組織として移植するという新たな細胞デリバリー法の有用性を裏付けるものである。また、EPC をシート内に挿入した形で移植し生着させることが可能になったことが

ら今後、遺伝子導入した EPC について、細胞シートを用いて効率的に移植することが可能になると考えられる。

#### 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。アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンハイドロゲルから徐放することによって、遺伝子の水溶液投与と比較して、虚血動物モデルでの有効な血管新生効果が見られた。カチオン化ゼラチンに PEG を結合することにより、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。また、このキャリアシステムによって、モデル遺伝子の細胞内取り込みを高めることを確認した。EPC 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。今年度では、アドレノメデュリンあるいは Hif1-alpha 遺伝子の EPC への遺伝子導入と虚血疾患治療に対する有効性を確認した。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

ターの開発を進める。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を用いて、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。ゼラチンを用いたシステム、超高压を用いたシステムあるいはそれらの組み合わせたものから、目的 (*in vitro* における遺伝子導入細胞の作製と *in vivo* 内への直接投与) に応じた最適なシステムを決定する。遺伝子キャリアについては、安定性および高機能化のための改質・改良を行う。加えて、幹細胞移植、細胞シート移植と遺伝子徐放システムを組み合わせたハイブリッド治療法について、種々の動物疾患モデルによりハイブリッド細胞-遺伝子治療法の有効性を評価していく。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: *In vitro* gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. *J. Control. Release.*, **86(1)**: 169-182 (2003).
2. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., Tabata, Y.: Tumor targeting of gene expression through metal-coordinated conjugation with

- dextran. *J. Control. Release.*, **88(2)**: 297-312 (2003).
3. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, Y., and Domb, A.J.: Dextran-spermine polycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection. *Gene Therapy*, **11(2)**: 194-203, 2004.
  4. Kushibiki, T., Tomoshige, R., Fukunaka, Y., Kakemi, M., and Tabata, Y.: In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *J. Control. Release*, **90(2)**: 207-216 (2003).
  5. Aoyama, T., Yamamoto, S., Kanematsu, A., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Eng.*, **9(6)**: 1289-1299 (2003).
  6. Matsuda A., Furuzono T., Walsh D, Kishida A., Tanaka J.: Surface modification of a porous hydroxyapatite to promote bonded polymer coatings. *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, **14**: 973-978 (2003).
  7. Masuda H., Asahara T.: Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res.*, **58(2)**: 390-398 (2003).
  8. Yamaguchi J., Kusano K.F., Masuo O., Kawamoto A., Silver M., Murasawa S., Bosch-Marce M., Masuda H., Losordo D.W., Isner J.M., Asahara T.: Stromal cell-derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation.*, **107(9)**: 1322-1328 (2003).
  9. Kitagawa H., Yamazaki T., Akiyama T., Mori H., Sunagawa K.: Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release. *Neurochem. Int.*, **42(3)**: 261-267 (2003).
  10. Kasahara, H., Tanaka, E., Fukuyama, N., Sato, E., Sakamoto, H., Tabata, Y., Ando, K., Iseki, H., Shinozaki, Y., Kimura, K., Kuwabara, E., Koide, S., Nakazawa, H., and Mori H.: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **41(6)**: 1056-1062 (2003).
  11. Nagaya, N., Kangawa, K., Kanda, M., Uematsu, M., Horio, T., Fukuyama, N., Hino, J., Harada-Shiba, M., Okumura, H., Tabata, Y., Mochizuki, N., Chiba, Y., Nishioka, K., Miyatake, K., Asahara, T., Hara, H., and Hori H.: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*. **108(7)**: 889-895 (2003)
  12. Akiyama T., Yamazaki T., Mori H., Sunagawa K.: Inhibition of cholinesterase elicits muscarinic receptor-mediated synaptic transmission in the rat adrenal medulla. *Auton Neurosci.*, **107(2)**: 65-73 (2003).
  13. Sato E., Hayasi Y., Germer R., Tanaka E., Mori H., Kawai T., Obara H., Ichimaru T., Takayama K., Ido H.: Intense characteristic x-ray irradiation from weakly ionized linear plasma and applications. *Med. Imaging Inform. Sci.*, **20(3)**: 154-161 (2003).
  14. Sato E., Hayasi Y., Germer R., Tanaka E., Mori H., Kawai T., Obara H., Ichimaru T., Takayama K., Ido H.: Irradiation of intense characteristic x-rays from weakly ionized linear molybdenum plasma. *Jpn. J. Med. Phys.*, **23(2)**: 123-131 (2003).
  15. Tokunaga N., Yamazaki T., Akiyama T., Sano S., Mori H.: In vivo monitoring of norepinephrine and its metabolites in skeletal muscle. *Neurochem. Int.*, **43(6)**: 573-580 (2003).
  16. Shirai M., Pearson J.T., Shimouchi A., Nagaya N., Tsuchimochi H., Ninomiya I., Mori H.: Changes in functional and histological distributions of

- nitric oxide synthase caused by chronic hypoxia in rat small pulmonary arteries. *Brit. J. Pharmacol.*, **139**: 899-910 (2003).
17. Nagaya N., Okumura H., Uematsu M., Shimizu W., Ono F., Shirai M., Mori H., Miyatake K., Kangawa K.: Repeated inhalation of adrenomedullin ameliorates pulmonary hypertension and survival in monocrotaline rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **285**(5): H2125-2131 (2003).
  18. Tokunaga N., Yamazaki T., Akiyama T., Mori H.: Detection of 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate. *J. Chromatogr. B*, **798**(1): 163-166 (2003).
  19. Sato E., Hayasi Y., Germer R., Tanaka E., Mori H., Kawai T., Ichimaru T., Takayama K., Ido H.: Quasi-monochromatic flash x-ray generator utilizing weakly ionized linear copper plasma. *Rev. Sci. Instrum.*, **74**(12): 5236-5240 (2003).
  20. Tokunaga N., Yamazaki T., Akiyama T., Sano S., Mori H.: Acute limb ischemia does not facilitate but inhibits norepinephrine release from muscle sympathetic nerve endings in anesthetized rabbit. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **42**(Suppl.1): S7-S10 (2003).
  21. 國本 聡、笠原啓史、福山直人、田中越郎、知久正明、永谷憲歳、西上和宏、岩畔英樹、増田治史、浅原孝之、盛 英三. 遺伝子による血管新生. 田畑泰彦編 ここまで進んだ再生医療、pp.116-123、羊土社 (2003) 知久正明、西上和宏、佐藤英一、盛 英三. 放射光および普及型 X 線源を用いた微小血管造影による再生血管の評価. 西村恒彦編 機能・画像代謝診断法と分子画像 pp.177-186、南山堂 (2003).
  22. 藤井隆文、永谷憲歳、徳永宜之、神田宗武、福山直人、田中越郎、田畑泰彦、浅原孝之、盛 英三. ゼラチンによる遺伝子の徐放化と細胞-遺伝子ハイブリッド治療への応用. 田畑泰彦編 ドラッグデリバリーシステム DDS 技術の新たな展開とその活用法、遺伝子医学別冊 pp.194-199、メディカル ドゥ (2003).
  23. Tokunaga N., Nagaya N., Shirai M., Tanaka E., Ishibashi-Ueda H., Harada-Shiba M., Kanda M., Ito T., Shimizu W., Tabata Y., Uematsu M., Nishigami K., Sano S., Kangawa K., Mori H.: Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin. *Circulation*, **109**(4), 526-531 (2004).
  24. Okumura H., Nagaya N., Itoh T., Okano I., Hino J., Mori K., Tsukamoto Y., Ishibashi-Ueda H., Miwa S., Tambara K., Toyokuni S., Yutani C., Kangawa K.: Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Circulation*, **109**(2): 242-248 (2004).
  25. Nagaya N., Kyotani S., Uematsu M., Ueno K., Oya H., Nakanishi N., Shirai M., Mori H., Miyatake K., Kangawa K.: Effects of Adrenomedullin Inhalation on Hemodynamics and Exercise Capacity in Patients With Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*, **109**(3), 351-356 (2004).
  26. Itoh T., Nagaya N., Fujii T., Iwase T., Nakanishi N., Hamada K., Kangawa K., Kimura H.: A combination of oral sildenafil and beraprost ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **169**(1): 34-38 (2004).
  27. 永谷憲歳、再生医療、*Thrombosis Circ.*, **11**(4): 352-357 (2003).
  28. Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.: Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, **24**(13): 2309-2316 (2003).
  29. 清水達也: 細胞シートを用いた心筋の組織工学, 医学のあゆみ, **207**(11): 915-919 (2003).
  30. 清水達也: 心筋, バイオマテリアル-生体材

料一, 21(3): 194-195 (2003).

2. 学会発表

1. Hosseinkhani, H., Tabata, Y. In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. International symposium on fusion of nano and bio technologies (2003.3.9-10 Tsukuba)
2. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
3. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, T., Domb, AJ.: Dextran-Spermine Polycation: An Efficient Non-Viral Vector for In Vivo Gene Transfection, 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2003.7.19-23 Glasgow)
4. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, T., Domb, AJ.: Polymer complexes with DNA for gene therapy. 4th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry (2003.9-5-10 Istanbul)
5. Kushibiki, T., Yamamoto, M., and Tabata, Y.: Body distribution of PEGylated gelatin micelles after intravenous administration. International symposium on fusion of nano and bio technologies (2003.3.9-10 Tsukuba)
6. 櫛引俊宏, 松本邦夫, 中村敏一, 田畑泰彦: NK4 plasmid DNA の徐放化による腫瘍転移抑制効果の増強. 日本薬剤学会第 18 年会 (2003.4.4-6 京都)
7. 櫛引俊宏, 松本邦夫, 中村敏一, 田畑泰彦: 徐放化 HGF/NK4 plasmid DNA による腫瘍膜転移の抑制効果. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
8. Kushibiki, T., Fukunaka, Y., Tomoshige, R., and Tabata, Y.: Controlled release from biodegradable hydrogels enhances *in vivo* expression of plasmid DNA. 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2003. 7.19-23 Glasgow)
9. 櫛引俊宏, 松岡秀樹, 田畑泰彦: ゼラチンとポリエチレングリコールとからなる分子集合体の作製. 第 52 回高分子討論会 (2003.9.24-26 山口)
10. 櫛引俊宏, 友重龍治, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた plasmid DNA の徐放化とその活性増強. 第 24 回日本炎症・再生医学会 (2003.11.26-27 京都)
11. 櫛引俊宏, 藤川智行, 友重龍治, 田畑泰彦: PEG グラフト-カチオン化ゼラチンの構造と遺伝子導入機能. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
12. 友重龍治, 櫛引俊宏, 宮崎 誠, 岩永一範, 森本一洋, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルからの plasmid DNA の徐放. 日本薬剤学会第 18 年会 (2003.4.4-6 京都)
13. 友重龍治, 櫛引俊宏, 宮崎 誠, 岩永一範, 掛見正郎, 田畑泰彦: Plasmid DNA の徐放化に及ぼすゼラチンハイドロゲルのカチオン化の影響. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
14. 友重龍治, 櫛引俊宏, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルによる Plasmid DNA の徐放. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
15. 藤川智行, 櫛引俊宏, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンマイクロスフェアからのプラスミド DNA の *in vivo* 徐放. 第 49 回高分子研究発表会 (2003.7.10 神戸)
16. 藤川智行, 櫛引俊宏, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンマイクロスフェアからのプラスミド DNA の *in vivo* 徐放. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
17. 高分子学会第 52 回年次大会(2003) 予稿集, p.1036

18. 高分子学会第 52 回討論会(2003) 予稿集、  
p.3736
19. 30th CRS, Preprints p.166(2003)
20. 第 13 回バイオ高分子シンポジウム 予稿集、  
p43(2003)
21. Iwaguro H, Iwami Y, Masuda H, Akita GY,  
Kunimoto S, Nakazawa I, Ishikawa T, Gregory R,  
Asahara T. Hypoxia inducible factor-1a gene  
transduction of endothelial progenitor cells for  
vascular regeneration (第 67 回日本循環器病学会  
会)
22. American Heart Association 76th, 2003, Ohland,  
Okumura H, Nagaya N, et al. Adrenomedullin  
infusion attenuates myocardial  
ischemia/reperfusion injury through the  
phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent  
pathway.
23. 日本循環器病学会 第 67 回 2003, Tokunaga  
N, Nagaya N, Shirai M, et al. Adrenomedullin  
Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis  
in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb  
Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector,  
Gelatin.
24. 日本心血管内分泌代謝学会 第 7 回 2003,  
岩瀬 俊、永谷憲歳、藤井隆文、他、アドレ  
ノメデュリン投与と骨髄単核球細胞移植に  
よる下肢虚血血管再生療法
25. 第 6 回組織工学会 シンポジウム「循環器の  
再生医療」 細胞シート工学による心筋組織  
の再構築 清水達也 他

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 を徐放するための生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる次世代の遺伝子キャリアシステムを作製し、それらのキャリアシステムのプラスミド DNA の徐放性と遺伝子発現特性を評価した。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ゼラチンを得た。プラスミド DNA は、カチオン化ゼラチンからなるハイドロゲル内にポリイオンコンプレックスを介して固定化、含浸された。生体内におけるプラスミド DNA の徐放期間ならびにプラスミド DNA の発現期間は、ハイドロゲルの分解期間によりコントロールされた。また、カチオン化ゼラチンにポリエチレングリコール（PEG）を結合させ、プラスミド DNA と混合することによって、プラスミド DNA を含浸した微細化キャリア粒子を作製できた。

#### 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%水溶液に異なる濃度のグルタルアルデヒドを加え、攪拌下、4℃で12時間の架橋反応を行った。残存アルデヒド基を化学的にブロックするために、カチオン化ゼラチン

ハイドロゲルを 100mM のグリシン水溶液で処理した。蒸留水で洗浄、凍結乾燥することによって架橋程度の異なる架橋カチオン化ゼラチンを得た。

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後、経時的に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。

カチオン化ゼラチンのリン酸緩衝溶液 (pH8.5) 中に、片末端メトキシ、片末端活性化エステルをもつポリエチレングリコール (PEG、重量平均分子量：5,000、日本油脂 (株) から供与) を加え、所定時間、反応させた。PEG 仕込み量を変化させることにより、異なる PEG 導入率をもつカチオン化ゼラチンを得た。PEG 導入率は TNBS 法によるアミノ基の減少から算出した。PEG 導入カチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) とプラスミド DNA とを水溶液中で混合した。両者のポリイオ

ンコンプレックス形成については、dynamic light scattering (DLS) 測定による混合前後のプラスミド DNA の分子サイズ変化、および混合前後のプラスミド DNA の陰イオン交換樹脂への吸着挙動を調べることで評価した。PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックスをマウス筋肉内に投与した後の遺伝子発現についても調べた。

#### (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

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アミノ基導入率の高いカチオン化ゼラチンを作製することができた。ELS 測定により、カチオン化ゼラチンが正電荷をもっていること、また、カチオン化ゼラチンとの混合によりプラスミド DNA の負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。次に、DLS 測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、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。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、さらに、その分解が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速くなることがわかった。これは、グルタルアルデヒドの濃度の減少にともなって、ハイドロゲルの架橋程度が低下し、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。このように、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が可能であり、その時間変化は、前述の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。これは、体内でプラスミド DNA が、その徐放キャリアであるハイドロゲルの分解性によってコントロールされていることを示している。

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。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。また、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。次に、PEG を導入したカチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) を用いて、プラスミド DNA とのポリイオンコンプレックス形成について調べた。DLS 測定、吸着実験の結果、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とがポリイオンコンプレックスを形成し、そのコンプレックス表面が PEG 分子鎖でおおわれていることが示された。これらの PEG-ゼラチン-プラスミド DNA をマウス筋肉内に投与したところ、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 を徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成させ、徐放キャリア内に固定化、保持している。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。この徐放メカニズムでは、拡散により徐放を制御している従来法とは違い、キャリアのサイズ、体積あたりのキャリアの表面積などが変化しても、プラスミド DNA の徐放パターンを自由に変えることができる。また、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。そのため、プラスミド DNA の負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミド DNA のみの徐放と比較して、プラスミド DNA の遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックスを形成しているため、プラスミド DNA の DNase による酵素分解に対する抵抗性も向上する。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、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。これらのハイドロゲル粒子においても、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確認している。本年度は、カチオン化ゼラチンに PEG を結合させることによってプラスミド DNA と相互作用できる微細化ハイドロゲル粒子の作製ができることがわかった。この粒子は、プラスミド DNA を内部に含み、外側を PEG 鎖がカバーした高分子ミセル様の構造をもつ。今後は、カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA との相互作用について、より詳しく調べ、ゼラチンの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化のコントロールの検討を進める。

## 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。また、PEG 鎖の導入によって、プラスミド DNA を含む、カチオン化ゼラチンからなる高分子ミセルの形成が認められ、今後は、このシステムからのプラスミド DNA の徐放の制御を目指す。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: In vitro gene

expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, *Pronectin®. J. Control. Release.* **86(1)**: 169-182 (2003)

2. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., Tabata, Y.: Tumor targeting of gene expression through metal-coordinated conjugation with dextran. *J. Control. Release.* **88(2)**: 297-312 (2003)

3. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, Y., and Domb, A.J.: Dextran-spermine polycation: an efficient nonviral vector for in vitro and in vivo gene transfection. *Gene Therapy*, **11(2)**: 194-203 (2003).

4. Kushibiki, T., Tomoshige, R., Fukunaka, Y., Kakemi, M., and Tabata, Y.: In vivo release and gene expression of plasmid DNA by hydrogels of gelatin with different cationization extents. *J. Control. Release.* **90(2)**: 207-216 (2003)

5. Aoyama, T., Yamamoto, S., Kanematsu, A., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Local delivery of matrix metalloproteinase gene prevents the onset of renal sclerosis in streptozotocin-induced diabetic mice. *Tissue Eng.* **9(6)**: 1289-1299 (2003)

6. Kasahara, K., Tanaka, E., Fukuyama, N., Sato, E., Sakamoto, H., Tabata, Y., Ando, K., Iseki, H., Shinozaki, Y., Kimura, K., Kuwabara, E., Koide, S., Nakazawa, H., and Mori H.: Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of FGF4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J. Am. College of Cardiology.* **41(6)**: 1056-1062 (2003)

7. Nagaya, N., Kangawa, K., Kanda, M., Uematsu, M., Hori, T., Fukuyama, N., Hino, J., Harada-Shiba, M., Okumura, H., Tabata, Y., Mochizuki, N., Chiba, Y., Nishioka, K., Miyatake, K., Asahara, T., Hara, H., and Hori H.: Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial

- progenitor cells. *Circulation*. **108(7)**: 889-895 (2003)
2. 学会発表
1. Hosseinkhani, H., Tabata, Y. In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. International symposium on fusion of nano and bio technologies (2003.3.9-10 Tsukuba)
  2. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: In vitro gene expression by cationized derivatives of an artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin®. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
  3. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, T., Domb, AJ.: Dextran-Spermine Polycation: An Efficient Non-Viral Vector for In Vivo Gene Transfection, 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2003.7.19-23 Glasgow)
  4. Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, T., Domb, AJ.: Polymer complexes with DNA for gene therapy. 4th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry (2003.9-5-10 Istanbul)
  5. Kushibiki, T., Yamamoto, M., and Tabata, Y.: Body distribution of PEGylated gelatin micelles after intravenous administration. International symposium on fusion of nano and bio technologies (2003.3.9-10 Tsukuba)
  6. 櫛引俊宏, 松本邦夫, 中村敏一, 田畑泰彦: NK4 plasmid DNA の徐放化による腫瘍転移抑制効果の増強. 日本薬剤学会第 18 年会 (2003.4.4-6 京都)
  7. 櫛引俊宏, 松本邦夫, 中村敏一, 田畑泰彦: 徐放化 HGF/NK4 plasmid DNA による膵癌腹膜転移の抑制効果. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
  8. Kushibiki, T., Fukunaka, Y., Tomoshige, R., and Tabata, Y.: Controlled release from biodegradable hydrogels enhances *in vivo* expression of plasmid DNA. 31st Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2003. 7.19-23 Glasgow)
  9. 櫛引俊宏, 松岡秀樹, 田畑泰彦: ゼラチンとポリエチレングリコールとからなる分子集合体の作製. 第 52 回高分子討論会 (2003.9.24-26 山口)
  10. 櫛引俊宏, 友重龍治, 田畑泰彦: 生体吸収性ハイドロゲルを用いた plasmid DNA の徐放化とその活性増強. 第 24 回日本炎症・再生医学学会 (2003.11.26-27 京都)
  11. 櫛引俊宏, 藤川智行, 友重龍治, 田畑泰彦: PEG グラフト-カチオン化ゼラチンの構造と遺伝子導入機能. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
  12. 友重龍治, 櫛引俊宏, 宮崎 誠, 岩永一範, 森本一洋, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルからの plasmid DNA の徐放. 日本薬剤学会第 18 年会 (2003.4.4-6 京都)
  13. 友重龍治, 櫛引俊宏, 宮崎 誠, 岩永一範, 掛見正郎, 田畑泰彦: Plasmid DNA の徐放化に及ぼすゼラチンハイドロゲルのカチオン化の影響. 第 19 回日本 DDS 学会 (2003.6.19-20 京都)
  14. 友重龍治, 櫛引俊宏, 掛見正郎, 田畑泰彦: 異なるカチオン化ゼラチンハイドロゲルによる Plasmid DNA の徐放. 第 25 回日本バイオマテリアル学会大会 (2003.12.16-17 大阪)
  15. 藤川智行, 櫛引俊宏, 平野義明, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンマイクロスフェアからのプラスミド DNA の *in vivo* 徐放. 第 49 回高分子研究発表会 (2003.7.10 神戸)

16. 藤川智行, 櫛引俊宏, 平野義明, 田畑泰彦:  
カチオン化ゼラチンマイクロスフェアから  
のプラスミドDNAの *in vivo* 徐放. 第25回日  
本バイオマテリアル学会大会(2003.12.16-17  
大阪)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし