

研究要旨

新しい遺伝子デリバリーシステムの開発について、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。

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ている。

これまで我々は高压処理による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）。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新しい方法である。モデル高分子としてポリビニルアルコール(PVA)を用い、遺伝子(DNA)と混合した後に超高压処理を行うと、PVA濃度が下がるにつれて粒子の凝集構造が観察され、より低濃度領域では、ナノ微粒子の形成が確認できた。そこで、本研究の目的の一つとして、高压処理によるPVA-DNA複合体の遺伝子デリバリー担体としての応用について検討した。

さらに、これらの複合体のより高い安定性を実現し、かつ新しい遺伝子デリバリー用担体としての可能性を有している無機ナノ粒子の応用について検討を行った。本研究で検討する複合化の技術はいずれも水素結合性に基いており、水素結合性分子の

遺伝子デリバリーのためのキャリアとしての基礎研究の観点からも検討を行った。

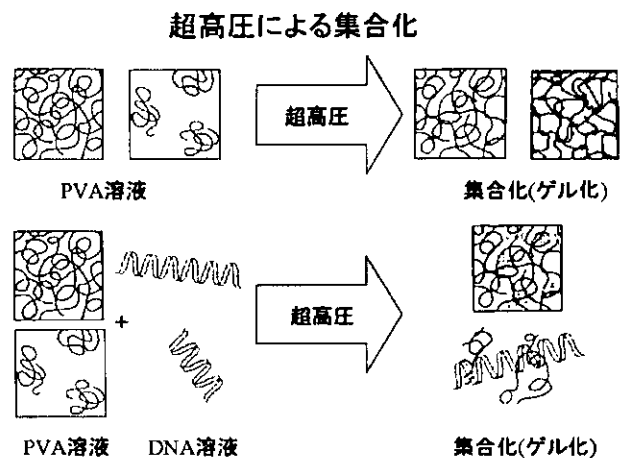


図1 超高压による集合体形成

B. 研究方法

○プラスミド DNA と PVA との複合化

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。高压処理における 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+プラスミドベクター

電圧: 100V

温度: 室温

泳動時間: 1 時間

Maker: 1K bp Ladder Maker

detect:UV(260nm)

○遺伝子発現評価

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、超高压処理(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。

○無機ナノ粒子の調製と評価

リン酸カルシウムの結晶はこれまでも遺伝子導入剤として用いられてきたが、本研究では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、ナノ粒子化し、より高い遺伝子動乳剤としての応用を試みた。作製法の詳細については、権利改善であるため割愛する。遺伝子導入実験は前項に従って実施した。

C. 研究成果

PVA-plasmid 混合溶液を超高压処理した後に電気泳動を行い、複合体形成を検討した。一例を図2に示した。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。

DNA-PVA composite

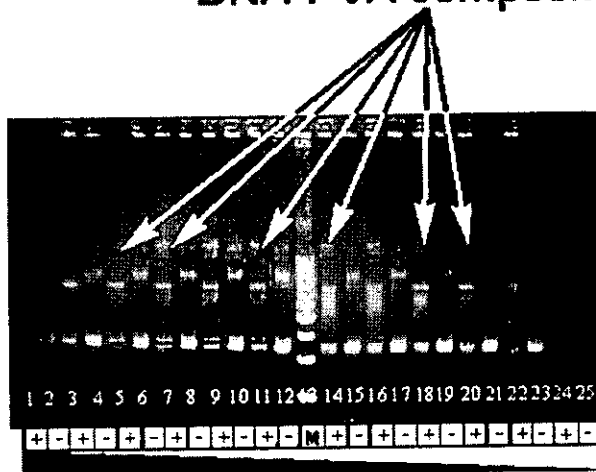


図2 超高压処理を行ったPVA-plasmid混合溶液の電気泳動図

○遺伝子発現評価

まず、PVA-プラスミド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。図3にマクロファージ系の樹立細胞であるRAW細胞にPVA-プラスミド複合体を投与した場合の蛍光顕微鏡写真を示す。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る。

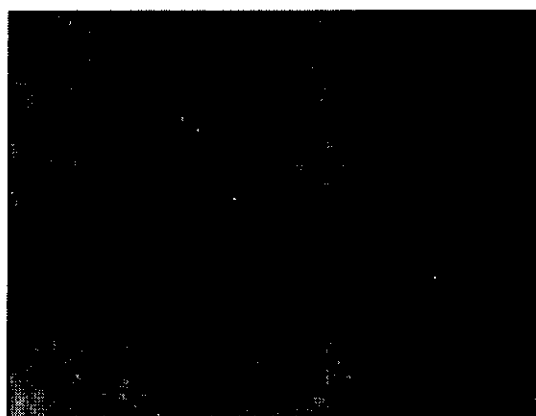


図3 PVA-プラスミド複合体投与後のRAW細胞の蛍光顕微鏡写真

次に遺伝子発現について検討した。GFP が生産されると細胞内で緑色の蛍光が観察される。取り込み後1日の蛍光顕微鏡写真より遺伝子発現を観察した。結果の一例を図4に示す。細胞は図3と同じRAW細胞である。

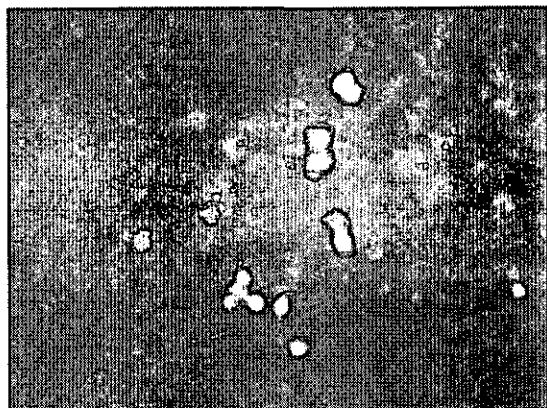


図4 PVA-プラスミド複合体を投与後1日のRAW細胞の蛍光顕微鏡写真

図より明らかなように、細胞内への取り込み量に比べて、GFPの発現量は大幅に少ないことがわかる。ただし、GFPの強度の強く発現している細胞は少ないものの、ほとんどすべての細胞は弱くではあるが、発現している。いずれにせよ、治療を目指した遺伝子デリバリー用ベクターとしては、能力は十分ではない。

○ 無機ナノ粒子の調製と評価

焼結リン酸カルシウムのナノ粒子の作製に成功した。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。結果を図5に示す。図より明らかなように、細胞内に取り込まれた無機粒子が白い光の点として確認でき、微

小粒子の形成と遺伝子導入について確認できた。遺伝子の発現については、蛍光の波長が無機微粒子の散乱と近いいため、正確な評価ができておらず、現在検討中である。

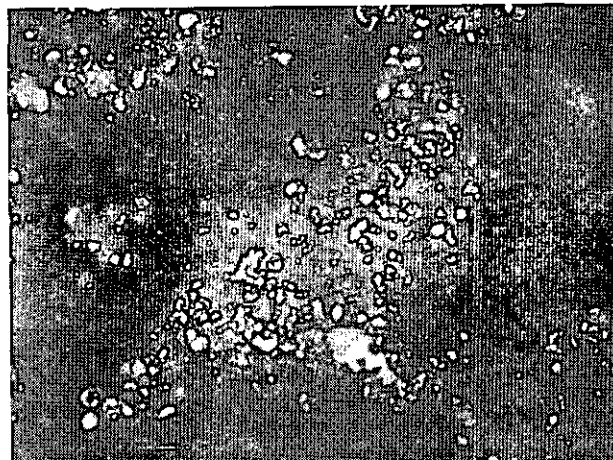


図5 無機ナノ粒子に蛍光ラベル化プラスミドを複合化させ、細胞に投与後1時間の蛍光顕微鏡写真

D. 考察

超高圧状態では、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成分以降の蛋白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なターゲ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。

E. 結論

新しい遺伝子デリバリー用材料として、超高圧処理による PVA-DNA 複合体の調製およびナノポーラスアパタイト粒子の作製を行った。前者は血中投与によって炎症細胞を活性化し、肺への集積を狙い、後者は心筋など局所に注入され、イオン濃度変化によって周辺細胞に取り込まれる機構を想定している。いずれも *in vitro* 評価において高い細胞内取り込みが達成された。今後は、これらのそれぞれの遺伝子デリバリー担体としての性能評価および双方を組み合わせた高機能型の担体の開発について検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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).

2. 学会発表

- ①高分子学会第 52 回年次大会 (2003)
予稿集、p.1036
- ②高分子学会第 52 回討論会 (2003)
予稿集、p.3736
- ③30th CRS, Preprints p.166 (2003)
- ④第 13 回バイオ高分子シンポジウム
予稿集、p43 (2003)

H. 知的財産権の出願・登録状況 準備中

分担研究報告書

分担課題：ヒト組み替え 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)を用による遺伝子導入法の血管再生医療への応用する上で、Hif1-alpha の血管新生性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を検討し、有効性を示した。

A. 研究目的

虚血性疾患における自己血由来 EPC 移植療法の開発において、血管新生促進遺伝子導入 EPC 移植療法の開発が望まれる。VEGF 遺伝子の GHG による導入 EPC の有効性を前年度に示した。さらに、大動物遺伝子導入実験にてその血管再生への応用が示された hypoxia inducible factor1-alpha (Hif1-alpha)の遺伝子導入 EPC 療法の有効性を検討した。

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) Hif1-alpha 遺伝子導入；上記培養 EPCs 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。
- 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、basic FGF に対する遊走能を modified Boyden chamber により行った。
- 4) Hif1-alpha 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、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

Hif1-alpha 遺伝子導入 EPCs の増殖能・遊走能はコントロール遺伝子導入 EPCs 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。

D. 考察

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。

E. 結論

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、VEGF とともに Hif1-alpha 遺伝子も有効なものと考えられる。非ウイルス性ベクターによる VEGF 遺伝子導入 EPC と同じく、

Hif1-alpha も非ウイルス性ベクターによる導入
EPC の有効性を示す予定である。

特記事項なし

F. 健康危機情報

本研究における GHG の成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. Masuda H, Asahara T: Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res.*, **58(2)**: 390-398 (2003).
2. Yamaguchi J, Kusano KF, Masuo O, Kawamoto A, Silver M, Murasawa S, Bosch-Marce M, Masuda H, Losordo DW, Isner JM, 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).

2. 学会発表

Iwaguro H, Iwami Y, Masuda H, Akita GY, Kunimoto S, Nakazawa I, Ishikawa T, Gregory R, Asahara T. Hypoxia inducible factor-1 α gene transduction of endothelial progenitor cells for vascular regeneration
(第 67 回日本循環器病学会)

H. 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

分担課題：細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

研究要旨 次世代高分子ベクター（ゼラチン-遺伝子複合体他）を *in vitro* でヒト末梢血単球、マクロファージ、血管内皮前駆細胞、骨髄単核球に高い効率で遺伝子を導入する技術を開発した。肺高血圧モデルで、adrenomedulin 遺伝子-ゼラチン複合体により機能強化した EPC の有効性を確認した。また、病院設置型微小血管造影装置を完成させた。

A. 研究目的

gelatin- 遺伝子複合体を血管内皮前駆細胞に取り込ませる技術を開発し、血管内皮前駆細胞の遺伝子導入による機能強化を実現する。機能強化した自己血管内皮前駆細胞を病態モデルに投与して細胞-遺伝子ハイブリッド治療を実現する。また再生血管評価のための単色 x 線診断システム（空間解像度 50 μm ）を完成させる。これを用いて閉塞性末梢動脈疾患に対する再生医療の効果を視覚的に評価できるようにする。

gelatin - 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高い。既存のウイルス性ベクターと比較して、安全面で大きな利点があり、一方遺伝子単独投与方法と比べると導入効率において格段に優れている。自己細胞に非ウイルス性の遺伝子導入を行うことにより、拒絶反応のリスクもない画期的な細胞移植治療が実現する。具体的にはadrenomedulin遺伝子を血管内皮前駆細胞に導入し、肺高血圧モデルで治療効果を検討する。

B. 研究方法

1) 血管内皮前駆細胞 (EPC) にgelatin- 遺

伝子 (GFPおよびadrenomedulin遺伝子) 複合体を貪食させ、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する。

2) 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成する。

C. 研究結果

1) gelatin -adrenomedulin 遺伝子遺伝子複合体を貪食させた血管内皮前駆細胞 (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。次世代高分子ベクター（ゼラチン-遺伝子複合体）による安全で高率の高い遺伝子導入法が確立された。

2) 空間像度 50 μm 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。

D. 考察

gelatin- 遺伝子複合体による遺伝子導入法は安全でかつ導入効率が高い。adrenomedullin遺伝子をEPCに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adrenomedullin 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、adrenomedullin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。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

自己EPC細胞に次世代高分子ベクター（ゼラチン）を用いてadrenomedullin遺伝子を導入することで、より成熟した血管再生が実現されることを証明した。普及型微小血管造影装置の完成により下肢虚血疾患に対する血管再生医療の視覚的効果判定が実現される。

班友

福山直人、田中越郎（東海大学医学部）

佐藤英一（岩手医科大学教養部）

G. 研究発表

論文発表

1. 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).
2. 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 fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **41(6)**: 1056-1062 (2003).

3. 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)
4. 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).
5. 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**: 154-161 (2003).
6. 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).
7. 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).
8. 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).

9. 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).
 10. 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).
 11. Sato E., Hayasi Y., Gerner 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).
 12. 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).
 13. 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).
 14. 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).
 15. 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).
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

分担課題：遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

分担研究者 永谷 憲 歳 国立循環器病センター研究所再生医療部 室長

研究要旨

強力な血管拡張ペプチドであるアドレノメデュリンにはさまざまな心血管保護作用があることが知られている。しかし、アドレノメデュリンに血管再生効果があるか否かは知られていない。本研究ではアドレノメデュリン独自の血管再生作用を *in vivo* と *in vitro* で明らかにした。またゼラチンによるアドレノメデュリン遺伝子の徐放化によって強力な血管再生治療が行える可能性を示した。

A. 研究目的

近年、虚血性心疾患や閉塞性動脈硬化症に対する遺伝子治療・再生医療が行われているが、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はウイルスベクターが用いられてきたが、抗原性・毒性などの点で問題が多い。本研究の目的は1) 内因性ペプチドであるアドレノメデュリンの血管再生効果を明らかにする、2) 非ウイルスベクターであるゼラチンを用いたアドレノメデュリン遺伝子治療を開発する、3) 幹細胞移植とアドレノメデュリンの併用投与による新たな血管再生療法を開発することである。

B. 研究方法

兔下肢虚血モデルを作成後にアドレノメデュリンプラスミド DNA (500 μ g)、同量のアドレノメデュリンプラスミド DNA と正電荷ゼラチンの複合体、ゼラチンのみを下肢骨格筋内に投与した。1 ヶ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成し、アドレノメデュリン（ペプチド）の局所投与及び骨髄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。

（倫理面への配慮）

動物実験は日本生理学会の定める動物実験ガイドラインに従って行われた。

C. 研究結果

兔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、レーザードップラー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 を磷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 と正電荷ゼラチン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蛋白発現およびその発現を持続させ（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ドップラー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。

D. 考察

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ゼラチン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兎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生体吸収性ゼラチン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、正電荷に帯電した生体吸収性ハイドロゲルは負に帯電した DNA と複合体を形成し、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。

E. 結論

アドレノメデュリンは独自の血管再生作用を有していることが明らかとなった。またゼラチンによるアドレノメデュリン遺伝子の徐放化によって効果的な血管再生治療が行える可能性が示された。アドレノメデュリンは移植骨髄幹細胞のアポトーシス抑制、血管内皮細胞への接着促進、分化促進にも働くことから、血管再生療法のための

新たな内因性ペプチドとして期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

論文発表

1. 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)
2. 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).
3. 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).
4. 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).

5. 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).
6. 永谷憲歳、再生医療、*Thrombosis Circ.*, **11(4)**: 352-357 (2003).

学会発表

1. 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.
2. 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.
3. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

分担課題：遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

分担研究者 清水 達也 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 講師

研究要旨

本研究では遺伝子導入された細胞のデリバリーシステムとしてばらばらの細胞ではなく細胞をシート状にしてデリバリーすることにより、より効率的な治療法を確立することを目的としている。昨年度までの研究では基本的な細胞シートの作製ならびに積層化法を確立、*in vivo* への生着ならびに長期的な生存を確認した。今年度は単離細胞移植と細胞シート移植の比較検討を行った。その結果、細胞シートの移植では単離細胞のインジェクション時のような細胞塊の形成による内部壊死を回避でき、その結果、細胞の損失なく効率よくデリバリーできることが明らかとなった。また、遺伝子導入のターゲットとして血管内皮前駆細胞を心筋細胞シート内に導入して培養後、*in vivo* へ移植したところ血管内皮前駆細胞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が示された。

A. 研究目的

遺伝子導入された細胞のデリバリーシステムとして遺伝子導入後、その細胞を標的臓器に直接あるいはカテーテルを用いて経皮経管的に移植する方法が考えられる。これら単離細胞のインジェクションによる移植法は既に臨床応用もされておりある程度の効果は期待されるが、血管への流出、移植片の内部壊死など細胞の損失も多くより効率的なデリバリー法の開発が必要となっている。そこでシート状に組織化された細胞の回収および移植が可能となれば、最初から隣接している細胞が互いに接着していることで血管への流出を防ぐことができ、その結果、細胞の損失なく効率よくデリバリーできることが期待される。昨年度の研究により細胞シートの作製および積層化法は確立した。そこで今年度は単離細胞移植と細胞シート移植の比較検討を行うとともに、遺伝子導入のターゲットとして血管内皮前駆細胞を細胞シート内に導入し移植する実験を行った。

B. 研究方法

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。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血管内皮前駆細胞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。実験動物を使用した実験に関しては東京女子医科大学動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的配慮のもとに行った。

C. 研究結果

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血管内皮前駆細胞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ろ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

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、血管内皮前駆細胞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から今後、遺伝子導入した血管内皮前駆細胞を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

温度応答性培養皿を用いて回収した細胞シートの移植の有用性が示された。今後この手法による遺伝子導入細胞のデリバリーを試みる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.; Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials*, **24(13)**: 2309-2316 (2003).
2. 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).
3. 清水達也: 心筋, *バイオマテリアル-生体材料-*, **21(3)**: 194-195 (2003).

2. 学会発表

・ 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

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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	ここまで進んだ再生医療	羊土社	大阪	2003	116-123
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	機能・画像代謝が贈断法と分子画像	南山堂	東京	2003	177-186
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	遺伝子医学別冊・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	メディカルドゥ	大阪	2003	194-199

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
Hosseinkhani, H., Azzam, T., Tabata, Y., 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

Kushibiki, T., Tomoshige, R., Fukunaka, Y., Kakemi, M., 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
Aoyama, T., Yamamoto, S., Kanematsu, A., Ogawa, O., 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
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
Masuda H., Asahara T.	Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration	Cardiovasc Res.	58(2)	390-398	2003
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
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
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., 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

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., Mori H.	Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells	Circulation	108(7)	889-895	2003
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
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
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
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
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

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
Tokunaga N., Yamazaki T., Akiyama T., Mori H.	Detection of 3-methoxy-4-hydroxy phenylglycol in rabbit skeletal muscle microdialysate	J. Chromatogr. B	798(1)	163-166	2003
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
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
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
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

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
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
Shimizu T., Yamato M., Kikuchi A., Okano T.	Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction	Biomaterials	24(13)	2309-2316	2003
永谷憲歳	再生医療	Thrombosis Circ.	11(4)	352-357	2003
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
清水達也	心筋	バイオマテリア ル-生体材料-	21(3)	194-195	2003

20030356

以降は雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。