

# 厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石坂幸人

平成 16 (2004) 年 3 月

## 目 次

### I. 総括研究報告

「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究

石坂幸人 ..... 1

### II. 分担研究報告

1. 「HIV アクセサリー遺伝子 Vpr の機能」に関する研究

志村まり ..... 4

2. 「ブロックポリマーを用いた遺伝子導入システムの開発」に関する研究

片岡一則 ..... 6

3. 「サクシニル化ポリグリシドールを用いた非ウイルス絵性ベクター開発」  
に関する研究

河野健司 ..... 11

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 .....13

IV. 研究成果の刊行物. 別冊 ..... 18

「静止細胞への非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究

主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター

**研究要旨** 非ウイルス性遺伝子導入システムと非分裂細胞に形質転換を誘導できるペプチドを融合させた新しい遺伝子導入システムの開発に向け、基盤研究を行った。即ち HIV-1 由来ペプチド (C45D18) は、蛋白質を胞体内に運搬する機能があり、細胞周期が停止している細胞にも、効率よく核内にトラフィッキングすることが分かった。一方、ポリエチレングリコールとポリリジンからなるブロックポリマーを用いた、安定でかつ効率的な遺伝子導入システムが開発された。これら2つのシステムを融合させることにより、新しい遺伝子導入システムが開発されるものと期待される。

分担研究者：

志村まり(国立国際医療センター、室長)

片岡一則(東京大学工学部、教授)

河野健司(大阪市立大学工学部教授)

#### A. 研究目的

細胞外から胞体内に取り込まれる機能（以下トラフィッキング機能）を HIV-1 遺伝子の一つである Vpr 由来ペプチド（以下 C45D18）に見出した。本年度は、このペプチドと同じくトラフィッキング機能を有する Tat 由来9個のペプチド2者について、作用を比較する。一方、非ウイルス性遺伝子導入システムとして、ポリエチレングリコールとポリリジンからなるブロックポリマーを基盤にさらなる改良を加える。それぞれの特徴を明らかにし、融合させることにより、非分裂細胞への遺伝子導入システムを作成することを目指す。

#### B. 研究方法

##### a. Vpr 由来ペプチドを用いた形質転換法開発

Vpr 由来 27 mer のアミノ酸からなるペプチドを green fluorescent protein(GFP)に結合させる。また Tat 由来ペプチドも同様の方法で GFP に結合させる。それぞれの蛋白質を浮遊系の細胞株である HL-60 に添加し、胞体内への取込を FACS 解析で測定する。トラフィッキングされる場所を明らかにする目的で、共焦点レーザー顕微鏡で、取り込まれた GFP の局在を明らかにする。無血清培地での培養やアフィディコリン（以下 APC）を用いて、細胞周期を停止させた細胞に対して C45D18 結合 GFP を作用させ、胞体内への取込の有無を観察する。

##### b. ブロックポリマーによる遺伝子導入ベクターの開発

1) 細胞内移行を促進する DNA 内包高分子ミセル調製用ブロック共重合体の設計および合成

1つのカチオンユニットに複数のアミンを有する poly(ethylene glycol)-polycation ブロック共重合体 (PEG-X) を設計し、poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) の高分子側鎖アミノリシスによって合成を行った。

2) 高分子ミセル型ベクターの調製

プラスミド DNA (pDNA) 溶液(10 mM Tris-HCl, pH= 7.4)に対し、ブロック共重合体溶液(10 mM Tris-HCl, pH= 7.4)を加え、DNA 濃度が一定で様々な混合比(r:アミノ基の総数/リン酸基の総数)の混合溶液を調製し、動的光散乱法によって平均粒径を、電気泳動光散乱法によってそのゼータ電位を決定した。また、高分子ミセル中における pDNA の凝縮程度は ethidium bromide (EtBr)を用いた dye exclusion assay により評価した。

このシステムを用いて、siRNA を細胞に導入し、その効果を検定する。

##### c. SucPG によるベクターシステムの構築

SucPG は、ポリグリシドールと無水コハク酸を反応させることによって作成した。SucPG と PEI のハイブリッド化は、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性エステル化した SucPG を PEI と反応させることによって調製した。また dendrimer 脂質は、ジドデシルアミンを開始剤として、アクリル酸メチルおよびエチレンジアミンを反応させて種々の世代数のポリアミドアミン dendrimer を極性基とする dendrimer 脂質を合成した。

(倫理面への配慮)

組換え DNA 実験に係わる実験については、それぞれの研究施設の規定に基づいて、研究計画書が審査、承認された後、遂行された。

#### C. 研究成果

##### a. Vpr 由来ペプチドを用いた形質転換

C45D18 を GFP に結合させ、HL-60 細胞の培養液中に添加すると約 70% の細胞が GFP 陽性として検出された。一方、TAT 由来ペプチドを同モルで GFP に結合させても殆ど胞体内に取り込まれることは無かった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて取り込まれた GFP の局在を観察すると、核に一致して認められた。また、細胞分裂を停止させた細胞に対しても C45D18 は、効率良く、培養液中に添加された GFP を核内にまで運搬することが分かった。

## b. ブロックポリマーによる遺伝子導入ベクターの開発

1) DNA 内包高分子ミセルの特性解析 Poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) に高分子側鎖アミノ基を導入し、複数のアミンを 1 つのカチオンユニットに導入した (以下 PEG-X)。PEG-X と pDNA の混合比を最適化することにより、90 nm 程度の平均粒径で単峰性の粒度分布を有する、水溶性の高い会合体が形成されることが動的光散乱法により確認された。また、いずれの会合体も静電的に中性に近いゼータ電位を示したことから、これら会合体の構造は外殻に PEG 層、内核部にポリカチオンセグメントと pDNA からなるポリイオンコンプレックスを有するコア-シェル構造のポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルであることが示唆された。PEG-X を用いた PIC 型の遺伝子ベクターの遺伝子発現効率をルシフェラーゼアッセイにより評価した結果、カチオンユニットに複数のアミンを有する PEG-X を用いた PIC ミセルは、1 種類のアミンのみを有するブロック共重合体からなる PIC ミセルと比較して優位に高い発現効率を示した。特に、カチオンユニットに 1 級アミンと 2 級アミン、若しくは 3 級アミンの組み合わせでアミンが導入された PEG-X を使用した PIC ミセル (PEG-MDPT, PEG-DPT) に於いて顕著な遺伝子発現効率の向上が確認された。これは、カチオンユニット中に導入された比較的高い pKa を有する 1 級アミンが pDNA とのコンプレックス形成に積極的に関与した結果、pKa の低い 2 級若しくは 3 級アミンがその緩衝能を保持したまま PIC ミセル中に導入され、これが poly(ethylene imine) で報告されているようなバッファー効果を惹起し、PIC ミセルのエンドソームから細胞質への移行を促進したためであると考えられる。

PEG-PLL/siRNA ミセルを用いて、siRNA の導入を試みた。外来遺伝子として発現する GL3 遺伝子や、内在性遺伝子である LaminA/C mRNA は、いずれもノックダウンされた。

## c. SucPG によるベクターシステムの構築

本研究では、サクシニル化ポリグリシドールとポリエチレンイミンのハイブリッドポリマ

ーを用いた遺伝子導入を試みた。SucPG 含有量が 41% および 65% である 2 種類の SucPG-PEI ハイブリッド (SucPG (41)-PEI、SucPG (65)-PEI) を合成した。ゲル電気泳動によって、これらのハイブリッドポリマーの DNA との複合体形成について調べたところ、SucPG (65)-PEI は、あまり効率よく DNA と複合体を形成しなかったが、SucPG (41)-PEI は、DNA と複合体を効率よく形成することがわかった。種々の +/- 電荷比においてハイブリッドポリマーと DNA を混合して得られた複合体による HeLa 細胞への遺伝子導入を行った。SucPG (65)-PEI-DNA 複合体は、電荷比にかかわらず、HeLa 細胞へのルシフェラーゼの発現を誘導できなかった。しかし、SucPG (41)-PEI-DNA 複合体は、電気的に中性~正に帯電する組成をもつ場合、効率よくルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導した。最適組成をもつ SucPG (65)-PEI-DNA 複合体は、PEI-DNA 複合体に比べて 40 倍高い遺伝子導入活性を示すことがわかった。PEI はプロトンスポンジ効果によって遺伝子をエンドソームからサイトゾルへ移行させるが、SucPG (65)-PEI は、プロトンスポンジ効果に加えて、SucPG のエンドソーム膜不安定化能による相乗効果によって、さらに効果的に遺伝子がエンドソームからサイトゾルに移行したためと考えられる。

## D. 考察

全世界的にみて非分裂細胞に対する効率的な遺伝子導入を可能にする非ウイルス性ベクターシステムはまだ確立されていない。近年、HIV 改変ベクターを用いた遺伝子導入が行われ、造血幹細胞や神経系細胞への効率的な遺伝子導入が可能になってきた。しかし、一方でレトロウイルスがゲノム DNA に組み込まれる際、がん遺伝子を活性化する可能性が示唆されるに至り、より安全な遺伝子導入システムの開発が必須となっている。将来的にはゲノム DNA に組み込まれない状態でプラスミド DNA を持続的に核内に局在させることにより長期的な遺伝子発現を誘導させることや、プラスミド DNA を特定の部位に組み込むためのシステムを開発することが重要である。今回得られた Vpr 由来ペプチドは、このようなシステム開発において、重要な役割を担うことが期待できる。即ち、今回分担研究として開発されたシステムに加えて、例えばアテロコラーゲン (落谷孝広博士、国立がんセンター) や光重合化合物 (中山泰秀博士、国立循環器病センター) を用いた非ウイルス性遺伝子導入システムと融合させることを試みる予定である。

## E. 結論

高分子を核内へ運搬するペプチドを同定する

一方、スムーズな細胞質移行と定量的な表層リガンド導入による高い標的細胞指向性を兼ね備えた高分子ミセル型遺伝子ベクターの設計指針が明らかとなった。更には、重要な課題である siRNA デリバリーについても本システムが有用であることを示すことが出来た。今後、ペプチドと高分子ナノミセル融合させることにより、幹細胞への新規遺伝子導入システムの開発が期待される。

F. 健康危険情報 特記すべきこと無し。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 134-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, in press.
- 2) Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Yoshida M., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Nuclear export signal in CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* . 316 (1), 226-232, 2004.
- 3) Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.
- 4) D. Wakebayashi, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Kanayama, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: Their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells, *J. Controlled Release*, 95,653-664,(2004)
- 5) M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, Nano-spheres for DNA separation chips, *Nature Biotechnology*, 22(3), 337-340 (2004)
- 6) K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression, *J. Amer. Chem. Soc.*, 126(8), 2355-2361 (2004)
- 7) K. Itaka, A. Harada, Y. Yamasaki, K.

Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, *In situ* single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intracytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine, *J. Gene Med.*, 6(1), 76-84 (2004)

- 8) T. Ishii, H. Otsuka, K. Kataoka, Y. Nagasaki, Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through auto-reduction of auric cation by  $\alpha$ -biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)], *Langmuir*, 20(3), 561-564 (2004)
- 9) N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, K. Kataoka, Novel Cisplatin-Incorporated Polymeric Micelles Can Eradicate Solid Tumors in Mice, *Cancer Research*, 63(24), 8977-8983 (2003)

### 2. 学会発表

- 1) M. Shimura, Y. Ishizaka, Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of HIV-1 VPR. EMBL meeting; Chromatin and Epigenetics, Heidelberg, Germany, 6月, 2003.
- 2) K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multifunctional block copolymers as carrier for gene and drug delivery, Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Palm Coast, USA, 2003.5.14. (招待講演)
- 3) K. Kataoka, Smart polymeric micelles for gene and drug delivery, Distinguished Seminar, Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA, 2003.8.20. (招待)

### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

#### 1. 特許取得

- 1) 片岡一則、金山直樹、位高啓史、福島重人、原田敦史、ポリ(エチレングリコール)ーポリカチオンブロック共重合体 特願 2003-315858 号
- 2) 片岡一則、張祐銅、西山伸宏、イオン性フタロシアニンデンドリマーを内包した高分子ミセル構造体、特願 2003-330725 号
- 3) 菅原美紀、河野健司、高岸徹、サクシニル化ポリグリシドール+ヒルトン脱アセチル化酵素阻害剤配合リポソーム、特願 2003-149722 (2003)
- 4) 小岩井一倫、磯崎正史、坂口奈央樹、河野健司、サクシニル化ポリグリシドール+TRX-20 配合リポソーム、特願 2003-149723 (2003)

#### 2. 実用新案登録

#### 3. その他

「HIV アクセサリー遺伝子 Vpr の機能」に関する研究

分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所難治性疾患研究部

**研究概要** Vpr 発現により誘導されるヘテロクロマチン蛋白質 1 機能異常の分子機構を明らかにした。このような機能は、Vpr の C 末 18 個のアミノ酸配列が重要な役割を担っており、Vpr 由来のペプチドでトラフィッキング機能を示す C45D18 は変異体として、HP1 の機能異常の誘発能はないものと思われる。

#### A. 研究目的

HIV 由来遺伝子 Vpr は患者生体内でのウイルス産生に関与しており、特に潜伏感染期に重要な役割を担う単球・マクロファージ系細胞へのウイルス感染に必須であるということが報告されている。Vpr には様々な機能が認められ、細胞周期異常、アポトーシス、静止細胞からのウイルス産生誘導などが知られている。分担研究者はこれまでの解析から、Vpr によって細胞周期異常に伴って染色体分離異常が誘発されることを見出し、その分子機構を明らかにしてきた。Vpr によるゲノム不安定性は、Vpr の C 末側 18 個のアミノ酸が必須であり、この部分を欠失させると、細胞周期異常の誘発が認められなくなる。また、Vpr をリコンビナント蛋白質として発現精製し、これを培養液中に添加することにより、ゲノム不安定性が誘発されることも見出された。Vpr の本来の役割は、ウイルス産生を正に制御することであることから、染色体分離異常はウイルス産生に関連した細胞内環境の修飾に伴った変化であることが推測される。本年度はこの Vpr により誘導されるゲノム不安定性がクロマチンレベルの変化の結果、生じていることを明らかにした。

#### B. 研究方法

##### 1. Vpr によるクロマチンリモデリング

Vpr 発現細胞としてドキシサイクリン（以下 DOX）で Vpr mRNA の発現を制御することが可能な細胞株、MIT-23 細胞を用いた。DOX を 3 ug/ml の濃度で数日間培養した後、ヒストン H3 の N 末 9 番目のリジン（以下 H3-K9）のアセチル化を特異的に認識する抗体及びヒストンアセチルトランスフェラーゼの一つ p300/CBP の抗体を用いて染色を行った。解析したサンプルとして、凝集した染色体及び間期の核を用いた。

##### 2. ヘテロクロマチン蛋白質 1 の核内からの消失

Vpr 発現下でのヘテロクロマチン蛋白質

1（以下 HP1）の発現をウエスタン法及び免疫染色法で解析した。

##### 3. 核内からの HP1 消失における p300/CBP の役割

Vpr 発現下で HP1 が核内から消失する現象

が p300/CBP の作用に依っていることを明らかにする目的で、p300 の遺伝子に対する siRNA を MIT-23 細胞に導入し、その後の HP1 の発現変化を観察した。SiRNA 導入後の p300 の発現は、p300/CBP に対する抗体を用いた免疫染色法に依った。

##### 4. セントロメア近傍における Vpr と p300/CBP との共局在

Vpr 発現下で調整した染色体に対して、Vpr 及び p300/CBP に対する抗体を用いて免疫染色法による解析を行った。

#### C. 研究結果

Vpr 発現下では H3-K9 のアセチル化が高率に誘導された。即ち、コントロールの状態では M 期において特に強くメチル化が認められるが、Vpr 発現下では、メチル化が減少し、アセチル化の亢進が認められた。

一方、HP1 の核内発現が Vpr が発現することで、著明に減少した。P300 遺伝子の siRNA を導入すると p300 遺伝子産物の発現が認められなくなった。その状態で Vpr を発現させると、HP1 の核内からの消失が著明に阻害された。

Vpr と p300 の染色体上での局在を観察すると、ともにセントロメア近傍に局在し、免疫染色上 2 つのシグナルが重なって検出された。Vpr が発現していない状態では、凝集した染色体上での p300 の発現は検出されなかった。

#### D. 考察

HP1 は H3-K9 がメチル化されると結合し、一方アセチル化されると結合出来なくなる。即ちクロマチンのアセチル化の状態、HP1 のクロマチンへの結合の有無が決定し、H3-K9 がメチル化される結果として、クロマチン構造が強固にバックされ、遺伝子発現が負に制御される。一方、HP1 は遺伝子発現調節に加えて、染色体の分離にも深く関わっている。そして、HP1 がセントロメア近傍に位置することが、娘染色体の正確な分離に必須であり、HP1 を除去すると染色体分離異常が誘発されることが知られている。今回、Vpr 発現下で HP1 が核内から消失していることを見出した。この発見は、Vpr により誘導される染色体分離異常の分子機構を理解する上で、重要な知見であると考えられる。さらに、Vpr によ

る HP1 の核内からの消失は、p300 の siRNA を導入することで、阻止された。このことから、p300 が Vpr による HP1 の機能異常の原因になっていることが強く示唆された。通常の細胞周期の中で、分裂期には、p300 はクロマチン上に局在しなくなる。しかし、Vpr 発現下では、p300 が Vpr とほぼ同じ位置に存在していた。一方、Vpr と p300 は、直接結合することが知られていることから、Vpr と p300 の複合体が、Vpr に引き連れられてクロマチン、特にセントロメア近傍に局在することで、H3-K9 のアセチル化が誘導され、その結果 HP1 がクロマチンから遊離する機序が考えられる。

Vpr は HIV のアクセサリ-遺伝子として、ウイルス産生を促進させる役割を担っている。ウイルス産生誘導の具体的なシナリオはまだ明らかになっていないが、少なくとも今回遺伝子発現に重要なステップとしてのクロマチン構造変化を誘導することが明らかになった。その結果、ゲノム不安定性が誘導され、染色体の数の異常が誘発されると考えられた。

Vpr 由来ペプチド C45D18 は、核内に運搬されることから、Vpr がクロマチンに局在する現象は C45D18 中に含まれる領域に依っている可能性がある。C45D18 が核内に運搬される際に必要な宿主側因子を明らかにすることは、Vpr により誘導される病態を明らかにする上で、重要と思われる。Vpr の細胞周期異常は N 末側 18 のアミノ酸配列が重要であることを以前報告したが、C45D18 はこの部分を欠失している。即ち C45D18 は細胞周期異常を誘発する機能が認められないことが想像されるが、実際、同ペプチドを大量に培養系に添加しても、細胞周期異常は認められていない。

## E. 結論

Vpr 発現により誘導されるヘテロクロマチン蛋白質 1 機能異常の分子機構を明らかにした。このような機能は、Vpr の C 末 18 個のアミノ酸配列が重要な役割を担っており、Vpr 由来のペプチドでトラフィッキング機能を示す C45D18 は変異体として、HP1 の機能異常の誘発能はないものと思われる。

## F. 健康危険情報；特記事項なし

## G. 研究発表

### 1 論文発表

1. Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M. Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. Binding of 14-3-3b but not 14-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B. *J. Cell Sci.*, in press.
2. Uchida, S., Ohtsubo, M. Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K. NUCLEAR EXPORT SIGNAL IN CDC25B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 316, 226-232, 2004.
3. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M. Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata, M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardatio following G2 DNA camage Checkpoint abrogation. *Arch. Biochem. Biophys.* 412, 13-19, 2003.

## 2. 学会発表

1. Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of HIV-1 VPR. EMBL meeting; Chromatin and Epigenetics, Heidelberg, Germany, 6 月, 2003.
2. HIV アクセサリ-遺伝子 VPR によるゲノム不安定性と HP1 $\alpha$  第 25 回日本分子生物学会, 神戸, 12 月, 2003.

## H. 知的所有権の取得状況

「ブロックポリマーを用いた遺伝子導入システムの開発」に関する研究

分担研究者 片岡一則 東京大学大学院工学系研究科

**研究要旨** スムースな細胞質移行と定量的な表層リガンド導入による高い標的細胞指向性を兼ね備えた高分子ミセル型遺伝子ベクターの設計指針が明らかとなった。更には、siRNA デリバリーについても本システムが有用であることを示すことが出来た。以上より、本研究で創製した高分子ミセル型ベクターが遺伝子ならびに核酸医薬デリバリーにおいて、高い臨床応用性を有することが明らかとなった。

A. 研究目的

近年、ナノテクノロジーという百万分の一ミリ規模の超微小スケールでの集積化技術が長足の進歩を遂げつつある。本分担研究で取り組んでいる高分子ナノミセルは、ウイルス（～50 ナノメートル）と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究においては図1に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時 (timing) に、必要な部位 (location) で、必要な診断や治療 (action)」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出する。

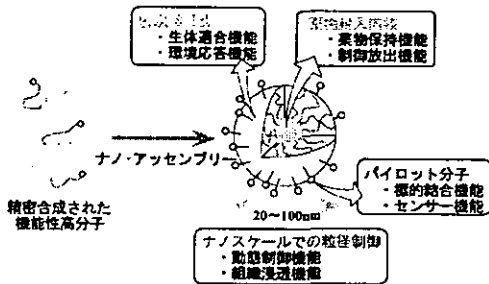


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

体内動態の正確な制御を達成するために、高分子ミセルのサイズ分布は天然のウイルス並みに狭くなるように揃え、かつ遺伝子やオリゴ核酸など、特性の異なる搭載分子に適合するような内核構造設計を達成する（第1世代）。更に、外殻への効率的な標的指向分子（センサー分子）の導入法を確立し、細胞選択的なターゲットイングを可能とする（第2世代）。第3世代高分子ミセルにおいては、細胞内の環境変化に鋭敏に応答するような内核設計を行い、インテリジェント機能を有するナノキャリアシステムとしての有用性を実証する。

B. 研究方法

1) 細胞内移行を促進する DNA 内包高分子ミセル調製用ブロック共重合体の設計および合成

1つのカチオンユニットに複数のアミンを有する poly(ethylene glycol)-polycation ブロック

共重合体 (PEG-X) を設計し、poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) の高分子側鎖アミノリシスによって合成を行った (図2)。

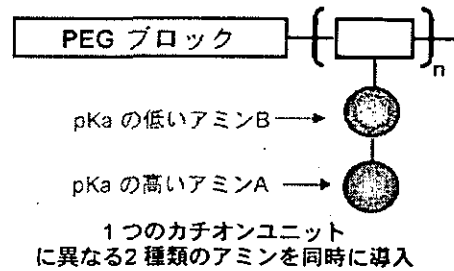


図2 設計を行ったブロック共重合体の概念図

2) 高分子ミセル型ベクターの調製

pDNA 溶液(10 mM Tris-HCl, pH= 7.4)に対し、ブロック共重合体溶液(10 mM Tris-HCl, pH= 7.4)を加え、DNA 濃度が一定で様々な混合比(r:アミノ基の総数/リン酸基の総数)の混合溶液を調製し、動的光散乱法によって平均粒径を、電気泳動光散乱法によってそのゼータ電位を決定した。また、高分子ミセル中における p-DNA の凝縮程度は ethidium bromide (EtBr)を用いた dye exclusion assay により評価した。

3) 高分子ミセル型ベクターの機能評価

発現活性の評価は、培養 293T 細胞を用い、ルシフェラーゼがコードされた pDNA (GL3) の細胞内への導入に基づいた、ルシフェラーゼ生産量を定量することにより評価した。

4) siRNA を内包する高分子ミセルの調製

siRNA サンプル (GL3, GFP, LaminaA/C) は、QIAGEN より購入し、4 $\mu$ M (in 10mM Tris-HCl, pH7.4)に調製して用いた。pDNA complex 調製時と同様に、siRNA 溶液に対し、混合時のカチオン電荷と RNA のアニオン電荷の比が様々な値となるようにブロック共重合体溶液(10mM Tris-HCl, pH7.4)を加え、RNA 濃度一定で様々な混合電荷比 (r) の complex を調製した。



### 5) siRNA transfection

培養細胞に対する siRNA の遺伝子ノックダウン評価は HuH-7 または 293T 細胞を用いて行った。GL3 ルシフェラーゼ遺伝子のノックダウンは、予め GL3 および RL の 2 種のルシフェラーゼ遺伝子を lipoplex を用いて遺伝子導入した細胞に対し、GL3 targeting siRNA を投与することによって行った。GL3 遺伝子ノックダウンは、2 種のルシフェラーゼ遺伝子の発現を dual luciferase assay (Promega) によって定量し、RL の発現を基準にした GL3 発現の変化によって評価した。

内在性遺伝子ノックダウンは、LaminA/C 遺伝子に対して行った。各細胞に対し、siRNA complex を投与し、48 時間のインキュベーション後、各サンプルの RNA を抽出、精製した。Real-time PCR システム (Prism7000, Applied Biosystems) を用いて、LaminA/C および内部標準である GAPDH の mRNA 発現量を定量した。LaminA/C のノックダウンの評価は、GAPDH 発現量を標準とした LaminA/C の相対的発現量として行い、siRNA を投与していない mock 細胞の発現量比 (LaminA/C / GAPDH) を基準として表示した。

siRNA complex の血清中での安定性評価としては、調製した complex を 50% 血清中で 37°C、30min インキュベーションした後、上記と同様に細胞に投与し、そのノックダウン効果を定量した。

### 6) ブロック共重合体末端への定量的リガンド導入法の確立

定量的なリガンド導入を可能にする poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) ブロック共重合体 (PEG-PLL) の合成は、両末端にベンジルアセタール基 (aceBz 基) と 1 級アミノ基を有する PEG 誘導体 (aceBz-PEG-NH<sub>2</sub>) をマクロイニシエーターとして *N*-トリフルオロ-L-リジン *N*-無水カルボン酸 (lysine(TFA)-NCA) のアニオン重合から得るアプローチとした。次に、弱酸処理を施すことによって PEG 末端の aceBz 基をベンズアルデヒド基 (CHO-Bz 基) に変換し、種々リガンドが導入できるようにした。リガンドとしては、ガラクトースレセプターを過剰に発現している肝実質細胞への細胞選択的なターゲティングを可能にするラクトースを選択し、2-アミノエチルラクトースと CHO-Bz 基との間で形成されるイミン結合からブロック共重合体にラクトースを導入した。最後に、PLL 側鎖 TFA 基を弱アルカリ性の水溶液で処理することによって、ラクトースが定量的に導入されたブロック共重合体 (lactose-Bz-PEG-PLL) の合成手法を確立した。構造確認は、GPC 測定及び <sup>1</sup>H、<sup>13</sup>C NMR 測定により行った。

## C. 研究成果

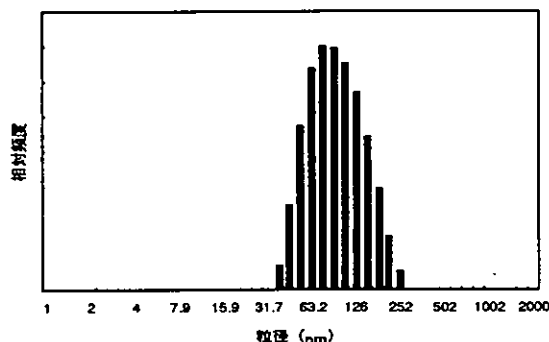
### D. 考察

1) 細胞内移行促進ユニットを側鎖に有するブロック共重合体の合成

poly(ethylene glycol)-poly( $\beta$ -benzyl L-aspartate) に体する種々のアミン試薬による高分子側鎖アミノリシスは、ほぼ定量的に進行し、ポリマー組成が同一でカチオンユニットの構造のみが異なる様々なブロック共重合体群を効率よく合成することが可能であった。尚、ブロック共重合体の構造確認は、<sup>1</sup>H-NMR によりおこない、複数のアミンが 1 つのカチオンユニットに導入されていることを確認した。

### 2) DNA 内包高分子ミセルの特性解析

PEG-X と pDNA の混合比を最適化することにより、90 nm 程度の平均粒径で単峰性の粒度分布を有する、水溶性の高い会合体が形成されることが動的光散乱法により確認された (図 3)。また、いずれの会合体も静電的に中性に近いゼータ電位を示したことから、これら会合体の構造は外殻に PEG 層、内核部にポリカチオンセグメントと pDNA からなるポリイオンコンプレックスを有するコア-シェル構造のポリイオンコンプレックス (PIC) ミセルであることが示唆された。さらに、PIC ミセル内核部の pDNA は、凝縮状



態で内包されていることが EtBr を用いた dye exclusion assay により確認された。

図 3 形成された PIC ミセルの粒度分布

### 3) PEG-X 型高分子ミセルベクターによる遺伝子導入効率の評価

PEG-X を用いた PIC 型の遺伝子ベクターの遺伝子発現効率をルシフェラーゼアッセイにより評価した結果、カチオンユニットに複数のアミンを有する PEG-X を用いた PIC ミセルは、1 種類のアミンのみを有するブロック共重合体からなる PIC ミセルと比較して優位に高い発現効率を示した (図 4)。特に、カチオンユニット

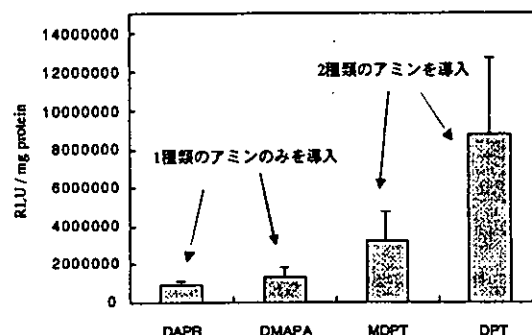


図4 各種 PIC ミセルベクターによる遺伝子導入

に1級アミンと2級アミン、若しくは3級アミンの組み合わせでアミンが導入された PEG-X を使用した PIC ミセル(PEG-MDPT, PEG-DPT)に於いて顕著な遺伝子発現効率の向上が確認された。これは、カチオンユニット中に導入された比較的 pKa の高い1級アミンが pDNA とのコンプレックス形成に積極的に関与した結果、pKa の低い2級若しくは3級アミンがその緩衝能を保持したまま PIC ミセル中に導入され、これが poly(ethylene imine)で報告されているようなバッファー効果を惹起し、PIC ミセルのエンドソームから細胞質への移行を促進したためであると考えられる。

現在検討が行われている、非ウイルス性遺伝子ベクターを *in vivo* へ展開するために克服しなくてはならない課題は幾つか挙げられるが、中でもエンドソームから細胞質への移行促進が重要な課題として考えられている。In vitro における遺伝子導入に於いては、エンドソーム溶解試薬を併用することにより、エンドソームから細胞質への移行を促進させ、発現効率を向上させる手法がとられることがあるが、このエンドソーム溶解試薬は概して毒性が高く、*in vivo* において有効量を投与するという事は現実的ではない。

一方、本手法によって合成された PEG-X を使用して調製した PIC ミセルは、毒性の懸念されるエンドソーム溶解試薬を併用することなく高い遺伝子導入効率を達成している点は注目値する。複数のアミンを一つのカチオンユニットに導入し、コンプレックス形成とバッファー効果の「機能の分担」を促す分子設計は、*in vivo* における非ウイルス性遺伝子ベクターの効率化に有効であると考えられる。

#### 4) siRNA 内包高分子ミセルの調製と遺伝子ノックダウン効率の評価

まず、PEG-PLL/siRNA ミセルを用いた GL3 遺伝子ノックダウンでは、市販の siRNA 専用試薬である RNAiFect による抑制効果にはやや及ばないものの GL3 の発現は 60-70%も抑制された。一方、コンプレックスを形成せず、核酸そのものの状態である naked siRNA では全く発現抑制が見られず、陰性対照の配列である GFP targeting siRNA による発現抑制も見られなかった。従って、PEG-PLL/siRNA ミセルによって、有効な siRNA delivery 及び遺伝子発現抑制が得られたことが示された。

また、エンドソームを溶解させる機能が期待される DPT をカチオン鎖を持つ PEG-DPT ブロック共重合体では、PEG-PLL をさらに上回る遺伝子ノックダウンとなり、特に、 $r=10$  では RNAiFect を上回る 80%近いノックダウンとなった(図5)。

GL3/RL(%)

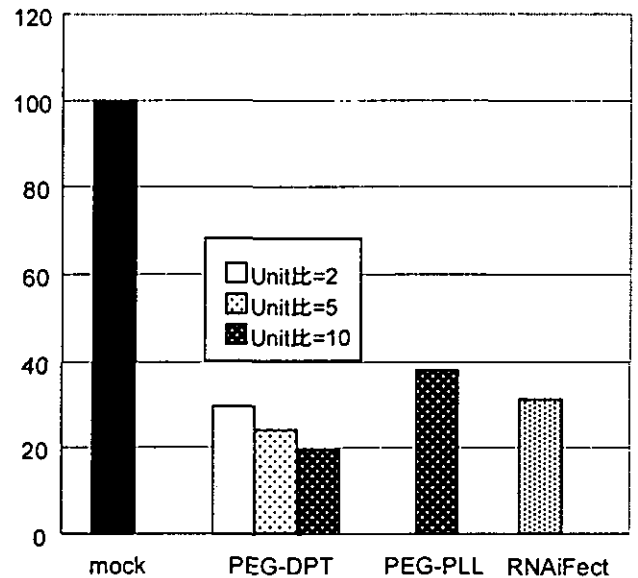


図5 Dual luciferase assay による遺伝子ノックダウン効率の評価

次いで、内在性遺伝子ノックダウンを行った。HuH-7 細胞、293T 細胞いずれにおいても、各 siRNA complex による LaminA/C mRNA の発現抑制が見られた。陰性対照として、GL3 targeting siRNA の評価も RNAiFect 及び PEG-DPT を用いて行ったが、いずれも全く LaminA/C mRNA の発現抑制は見られず、Lamin A/C targeting siRNA による配列特異的な RNAi であることが確認できた。

各 complex の発現抑制の効率として、PEG-DPT は特に  $r=10$  の混合比で非常に効率のよい抑制が見られた(HuH-7 で約 50%, 293T で約 80%)。一方、PEG-PLL/siRNA complex では、発現抑制は軽度であり、これらはルシフェラーゼ遺伝子発現抑制の結果と相関した。

GL3/RL(%)

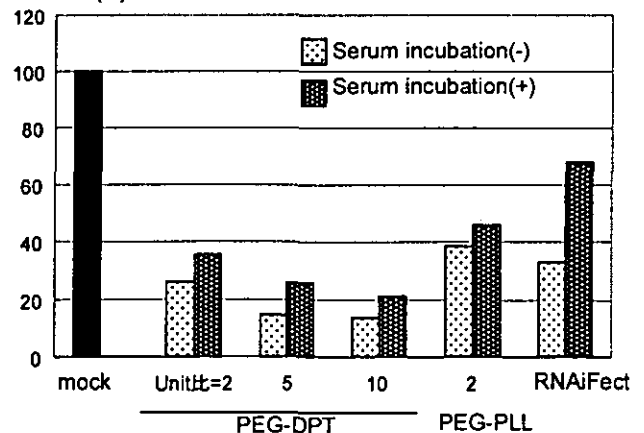


図6 RNAi に及ぼす血清インキュベーション効果

次いで、siRNA delivery の臨床応用に向けて重要な要素となる complex の生理的環境下での安

定性を検討した。ブロック共重合体を用いた系では、GL3 ノックダウン、Lamin A/C ノックダウンいずれにおいても、PEG-DTP 及び PEG-PLL とともに血清中でのインキュベーション後もその遺伝子発現抑制効果は比較的变化が少なく保たれた。一方、lipid-based reagent である RNAiFect ではその発現抑制効果は約 1/2 に減少した (図 6)。

以上より、ブロック共重合体と siRNA との complex 化によって、効率的かつ生理的環境下での安定性に優れた遺伝子ノックダウンが可能であり、臨床応用可能な siRNA delivery system の構築が実現できるものと考えられた。

#### 5) ブロック共重合体末端への定量的リガンド導入法の開発

aceBz-PEG-PLL (TFA) は、aceBz-PEG-NH<sub>2</sub> (数平均分子量 ( $M_n$ )=15, 200) をマクロイニシエーターとして lysine (TFA)-NCA のアニオン重合から得た。GPC 測定結果から、 $M_n$ =32, 000 の高分子が得られ、かつ、分子量分布 (MWD) が 1.13 とブロック共重合体としては非常に分布の狭い高分子であることが確認された。また、<sup>1</sup>H NMR を用いた構造解析から、aceBz 基由来のピークが 1.2ppm にはっきりとしたシグナルとして観察され、かつ PEG 主鎖とのピーク強度比から得られた末端導入率もほぼ定量的なものを与えた。また、aceBz 基は弱酸処理することによって副反応を起すことなく CH<sub>2</sub>-Bz 基に変換された。更に、リガンド導入実験においてもラクトース導入に伴うアルデヒド基由来のピーク (10.06 ppm) の完全な消失と反応に伴うピークシフトからその完全な導入が示唆された。

#### E. 結論

以上、本年度の研究によって、スムーズな細胞質移行と定量的な表層リガンド導入による高い標的細胞指向性を兼ね備えた高分子ミセル型遺伝子ベクターの設計指針が明らかとなった。更には、喫緊の課題である siRNA デリバリーについても本システムが有用であることを示すことが出来た。以上より、本研究で創製した高分子ミセル型ベクターが遺伝子ならびに核酸医薬デリバリーにおいて、高い臨床応用性を有することが明らかとなった。

#### F. 健康危険情報 特記すべきこと無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) D. Wakebayashi, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Kanayama, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: Their preparation and gene

transfecting efficiency against cultured HepG2 cells, *J. Controlled Release*, 95,653-664,(2004)

- 2) M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, Nano-spheres for DNA separation chips, *Nature Biotechnology*, 22(3), 337-340 (2004)
- 3) K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression, *J. Amer. Chem. Soc.*, 126(8); 2355-2361 (2004)
- 4) K. Itaka, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, *In situ* single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intracytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine, *J. Gene Med.*, 6(1), 76-84 (2004)
- 5) T. Ishii, H. Otsuka, K. Kataoka, Y. Nagasaki, Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through auto-reduction of auric cation by  $\alpha$ -biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethyl amino)ethyl methacrylate)], *Langmuir*, 20(3), 561-564 (2004)
- 6) N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, K. Kataoka, Novel Cisplatin-Incorporated Polymeric Micelles Can Eradicate Solid Tumors in Mice, *Cancer Research*, 63(24), 8977-8983 (2003)
- 7) A. Harada, K. Kataoka, Switching by pulse electric field of the elevated enzymatic reaction in the core of polyion complex micelles, *J. Am. Chem. Soc.*, 125(50), 15306-15307 (2003)
- 8) G.-D. Zhang, A. Harada, N. Nishiyama, D.-L. Jiang, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer, *J. Controlled Release*, 93(2), 141-150 (2003)
- 9) T. Matsuya, S. Tashiro, N. Hoshino, N. Shibata, Y. Nagasaki, K. Kataoka, A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive poly(ethylene glycol) tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorometric immunoassay, *Anal. Chem.*, 75(22), 6124-6132 (2003)
- 10) Y. S. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42(38), 4640-4643 (2003)

- 11) Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka, K. Yoshikawa, PEG-PLL block copolymers induce reversible large discrete coil-globule transition in a single DNA molecule through cooperative complex formation, *Macromolecules*, 36(16), 6276-6279 (2003)
- 12) A. Harada, K. Kataoka, Effect of charged segment length on physico-chemical properties of core-shell type polyion complex micelles from block ionomers, *Macromolecules*, 36(13), 4995-5001 (2003)
- 13) K. Itaka, K. Yamauchi, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physico-chemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency, *Biomaterials*, 24(24), 4495-4506 (2003)
- 14) T. Uwatoku, H. Shimokawa, K. Abe, Y. Matsumoto, T. Hattori, K. Oi, T. Matsuda, K. Kataoka, A. Takeshita, Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats, *Circulation Research*, 92(7), e62-69 (2003)
- 15) T. Takahashi et al., Synthesis of novel cationic lipids having polyamidoamine dendrons and their transfection activity, *Bioconjugate Chemistry*, 14, 764-773 (2003)
- 16) K. Kono et al. Fusogenic polymer-modified liposomes for the delivery of genes and charged fluorophores, *Methods in Enzymology*, 373, 422-432 (2003)

## 2. 口頭発表

- 1) N. Nishiyama, K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymer as carrier for gene and drug delivery, American Institute of Chemical Engineering 2003 Annual meeting, San Francisco Hilton, San Francisco, USA, 2003.11.20. (招待講演)
- 2) K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymer as carrier for gene and drug delivery, 2003 MRS Fall Meeting, Sheraton Boston Hotel, Boston, USA, 2003.12.2. (招待講演)
- 3) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nano-carriers for gene and drug delivery, Seminar at Institute of Bioengineering and Nanotechnology (IBN), Singapore, 2003.12.11. (招待講演)
- 4) K. Kataoka, Design of bio-nanointerface for biological application, International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2003), Suntec Singapore International Convention and Exhibition Centre, Singapore, 2003.12.12. (招待講演)
- 5) Nobuhiro Nishiyama, Woo-Dong Jang, — 10 —

- Hiroyuki Koyama, Kazunori Kataoka, Dendrimer Photosensitizer-Incorporated Polymeric Micelles for the Effective Photodynamic Therapy, 227th ACS National Meeting, PMSED Division, Anaheim Convention Center, Hall C Anaheim, CA, 2004.3.31 (口頭発表)
- H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
- 1) 片岡一則、金山直樹、位高啓史、福島重人、原田敦史、ポリ(エチレングリコール)ーポリカチオンブロック共重合体 特願 2003-315858 号
  - 2) 片岡一則、張祐銅、西山伸宏、イオン性フタロシアニン dendrimer を内包した高分子ミセル構造体、特願 2003-330725 号
  - 3) 菅原美紀、河野健司、高岸徹、サクシニル化ポリグリシドール+ヒルトン脱アセチル化酵素阻害剤配合リポソーム、特願 2003-149722 (2003)
  - 4) 小岩井一倫、磯崎正史、坂口奈央樹、河野健司、サクシニル化ポリグリシドール+TRX-20 配合リポソーム、特願 2003-149723 (2003)

「サクシニル化ポリグリシドールを用いた非ウイルス絵性ベクター開発」に関する研究

分担研究者 河野健司 大阪府立大学

研究要旨 エンドソームからサイトゾルへの移行を促し、また核への集積を促進することによって遺伝子発現に導く 2 種類の新規な非ウイルスベクターとして、SucPG-PEI ハイブリッドおよびデンドリマー脂質を開発した。これらのベクターは、膜融合とプロトンスポンジ効果、および核集積効果の相乗作用によって、従来用いられている非ウイルスベクターに比べてより高い遺伝子導入活性を発現することが明らかになった。

A. 研究目的

静止細胞に効率よく外来遺伝子を導入するためには、標的細胞内へ結合した後、細胞質内に遺伝子を効率よく移行させるとともに、遺伝子の核への移行を促進する機能を併せ持つことが必要である。本研究では、膜融合能と核局在化能を併せ持つ新規な非ウイルスベクターとして、(a)膜融合活性高分子および(b)ポリアミドアミンデンドリマーをベースとする 2 種類のシステムを設計した。(a)では、これまでの研究において、我々が開発した、酸性条件下で膜融合活性を発現するアニオン性高分子であるサクシニル化ポリグリシドール(SucPG)と核移行性をもつカチオン性高分子であるポリエチレンイミン(PEI)のハイブリッドポリマーを合成し、このハイブリッドポリマーの遺伝子導入活性について検討した。また、(b)では、核局在化能を持つことが知られているポリアミドアミンデンドリマーに長鎖アルキル基を結合させたデンドリマー脂質を合成し、その遺伝子導入活性について調べた。

B. 研究方法

SucPG は、ポリグリシドールと無水コハク酸を反応させることによって得た。SucPG と PEI のハイブリッド化は、N-ヒドロキシスクシンイミドを用いて活性エステル化した SucPG を PEI と反応させることによって調製した。またデンドリマー脂質は、ジドデシルアミンを開始剤として、アクリル酸メチルおよびエチレンジアミンを反応させて種々の世代数のポリアミドアミンデンドリマーを極性基とするデンドリマー脂質を合成した。ベクターの遺伝子導入活性は、ルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として用いて評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は、大阪府立大学の組換え DNA 実験に係わる学内規定に基づいて遂行された。

C. 研究成果

(a)サクシニル化ポリグリシドール-ポリエチレンイミンハイブリッドポリマー

本研究では、SucPG 含有量が 41%および 65%である 2 種類の SucPG-PEI ハイブリッド (SucPG (41)-PEI、SucPG(65)-PEI) を合成した。ゲル電気泳動によって、これらのハイブリッドポリマーの DNA との複合体形成について調べたところ、SucPG(65)-PEI は、あまり効率よく DNA と複合体を形成しなかったが、SucPG(41)-PEI は、DNA と複合体を効率よく形成することがわかった。種々の +/- 電荷比においてハイブリッドポリマーと DNA を混合して得られた複合体による HeLa 細胞への遺伝子導入を行った。

SucPG-PEI ハイブリッドによる神経芽細胞由来 NB-39-nu 細胞への遺伝子導入について検討した。この細胞に対して特異性を有するリガンドである RBP1 ペプチドを結合した SucPG-PEI-DNA 複合体やリガンドを持たない複合体および PEI-DNA 複合体を調製し、これらの複合体の NB-39-nu 細胞への遺伝子導入活性を調べた。その結果、PEI-DNA 複合体に比べて RBP1 担持 SucPG-PEI-DNA 複合体は顕著に高い活性を示したが、リガンドを持たない SucPG-PEI-DNA 複合体はさらに高い活性を示すことがわかった。リガンドの導入によって SucPG のカルボキシル基が減少するため、その膜不安定化能が減少することが原因と思われる。

(b)ポリアミドアミンデンドリマー脂質

ポリアミドアミンデンドリマーは、分子内に多くの 3 級アミノ基をもつため、プロトンスポンジ効果によって外来遺伝子のエンドソームからサイトゾルへの脱出を促すと同時に、その核への移行を促進する。本研究では、ポリアミドアミンデンドリマーのプロトンスポンジ効果と膜融合性脂質の導入による相乗効果によって、エンドソームからサイトゾルへの遺伝子の移行を強力に促進し、またその核への移行を促すことによって標的細胞を効率よく遺伝子発現に導くベクターとして、2 本の長鎖アルキル基をもつデンドリマー脂質を合成し、その遺伝子導入活性について検討した。デンドリマー脂質-DNA 複合体の遺伝子導入活性に及ぼす膜融合性脂質、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン(DOPE)添加の効果について検討した。その結

果、デンドリマー脂質-DNA 複合体の活性は、DOPE の添加によって 12 倍に高まることがわかった。デンドリマー脂質のプロトンスポンジ効果と DOPE の膜融合能によって、導入遺伝子がエンドソームからサイトゾルに効率よく移行したことによるものと考えられる。これまで広く非ウイルスベクターとして使用されている DC-Chol-DOPE-DNA 複合体と比較したところ、デンドリマー脂質-DOPE-DNA 複合体はより低い細胞毒性と高い遺伝子導入活性を有していることがわかった。

#### D. 考察

SucPG(65)-PEI-DNA 複合体は、電荷比にかかわらず、HeLa 細胞へのルシフェラーゼの発現を誘導できなかった。しかし、SucPG(41)-PEI-DNA 複合体は、電気的に中性～正に帯電する組成をもつ場合、効率よくルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導した。最適組成をもつ SucPG(65)-PEI-DNA 複合体は、PEI-DNA 複合体に比べて 40 倍高い遺伝子導入活性を示すことがわかった。PEI はプロトンスポンジ効果によって遺伝子をエンドソームからサイトゾルへ移行させるが、SucPG(65)-PEI は、プロトンスポンジ効果に加えて、SucPG のエンドソーム膜不安定化能による相乗効果によって、さらに効果的に遺伝子がエンドソームからサイトゾルに移行したためと考えられる。

第 1 世代から第 4 世代のデンドリマーを極性基にもつデンドリマー脂質を合成し、その遺伝子導入活性について調べた。これらのデンドリマー脂質-DNA 複合体による CV1 細胞への遺伝子導入効率は、デンドリマー部位の世代数の増加とともに増大することがわかった。この原因として、世代数の増大とともに分子内に含まれる 3 級アミノ基が増加するため、より強いプロトンスポンジ効果を示すことによると考えられる。

#### E. 結論

本研究においては、エンドソームからサイトゾルへの移行を促し、また核への集積を促進することによって遺伝子発現に導く 2 種類の新規な非ウイルスベクターとして、SucPG-PEI ハイブリッドおよびデンドリマー脂質を開発した。これらのベクターは、膜融合とプロトンスポンジ効果、および核集積効果の相乗作用によって、従来用いられている非ウイルスベクターに比べてより高い遺伝子導入活性を発現することが明らかになった。

F. 健康危険情報 特記すべきこと無し。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

河野健司, 高効率遺伝子デリバリーを目指した機能性ベクターの設計, インテリジェント材料・システム, 12, 9-14 (2003). T. Takahashi et al.,

Synthesis of novel cationic lipids having polyamidoamine dendrons and their transfection activity, *Bioconjugate Chemistry*, 14, 764-773 (2003)  
K. Kono et al. Fusogenic polymer-modified liposomes for the delivery of genes and charged fluorophores, *Methods in Enzymology*, 373, 422-432 (2003)

##### 2. 口頭発表

河野健司, インテリジェントナノキャリアの設計, 第 52 回高分子討論会予稿集, 1215-1216 (2003)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

菅原美紀, 河野健司, 高岸徹, サクシニル化ポリグリシドール+ヒルトン脱アセチル化酵素阻害剤配合リポソーム, 特願 2003-149722 (2003)  
小岩井一倫, 磯崎正史, 坂口奈央樹, 河野健司, サクシニル化ポリグリシドール+TRX-20 配合リポソーム, 特願 2003-149723 (2003)

## 研究成果の刊行に関する一覧表

## 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
該当無し							

## 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
Uchida, S., Kuma, A., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Yamashita, K.	Binding of 14-3-3b but not 134-3-3s controls the cytoplasmic localization of CDC25B: binding site preferences of 14-3-3 subtypes and the subcellular localization of CDC25B.	J. Cell Sci.			in press
Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Hirata, M., Nakagama, H., Matsunaga, T., Yoshida, M., Ishizaka, Y., Yamashita, K.	Nuclear export signal in CDC25B.	Biochem. Biophys. Res. Commun.	316	226-232	2004
Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata, M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., Yamashita, K.	Loss of p53 Induces M-phase retardatio following G2 DNA camage Checkpoint abrogation.	Arch. Biochem. Biophys.	412	13-19	2003

Wakebayashi, D., Nishiyama, N., Yamasaki, Y., Itaka, K., Kanayama, N., Harada, A., Nagasaki, Y., <u>Kataoka, K.</u>	Lactose-conjugated polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: Their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells.	J. Controlled Release	95	653-664	2004
Tabuchi, M., Ueda, M., Kaji, N., Yamasaki, Y., Nagasaki, Y., Yoshikawa, K., <u>Kataoka, K.</u> , Baba, Y.	Nano-spheres for DNA separation chips.	Nature Biotechnology	22(3)	337-340	2004
Miyata, K., Kakizawa, Y., Koyama, H., <u>Kataoka, K.</u>	Block cationic polyplexes with regulated densities of charge and disulfide cross-linking directed to enhance gene expression.	J. Amer. Chem. Soc	126(8)	2355-2361	2004
Iketa, K., Harada, A., Yamasaki, Y., Nakamura, K., Kawaguchi, H., <u>Kataoka, K.</u>	<i>In situ</i> single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intracytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine.	J. Gene Med.	6(1)	76-84	2004
Ishii, T., Otsuka, H., <u>Kataoka, K.</u> , Nagasaki, Y.	Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through auto-reduction of auric cation by $\alpha$ -biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethyl amino)ethyl methacrylate)].	Langmuir	20(3)	561-564	2004
Nishiyama, N., Okazaki, S., Cabral, H., Miyamoto, M., Kato, Y.	Novel Cisplatin-Incorporated Polymeric Micelles Can Eradicate Solid Tumors in Mice.	Cancer Research	63(24)	8977-8983	2003



Sugiyama, Y., Nishio, K., Matsumura, Y., <u>Kataoka, K.</u>					
Harada, A., <u>Kataoka, K.</u>	Switching by pulse electric field of the elevated enzymatic reaction in the core of polyion complex micelles.	J. Am. Chem. Soc.	125(50)	15306-15307	2003
Zhang, G.-D., Harada, A., Nishiyama, N., Jiang, D.-L., Koyama, H., Aida, T., <u>Kataoka, K.</u>	Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer.	J. Controlled Release	93(2)	141-150	2003
Matsuya, T., Tashiro, S., Hoshino, N., Shibata, N., Nagasaki, Y., <u>Kataoka, K.</u>	A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive poly(ethylene glycol) tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorometric immuno-assay.	Anal. Chem.	75(22)	6124-6132	2003
Bae, Y.S., Fukushima, S., Harada, A., <u>Kataoka, K.</u>	Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change.	Angew. Chem., Int. Ed.	42(38)	4640-4643	2003
Yamasaki, Y., Katayose, S., <u>Kataoka, K.</u> , Yoshikawa, K.	PEG-PLL block copolymers induce reversible large discrete coil-globule transition in a single DNA molecule through cooperative complex formation.	Macromolecules.	36(16)	6276-6279	2003
Harada, A., <u>Kataoka, K.</u>	Effect of charged segment length on physico-chemical properties of core-shell type polyion complex micelles from block ionomers.	Macromolecules	36(13)	4995-5001	2003

Itaka, K., Yamauchi, K., Harada, A., Nakamura, K., Kawaguchi, H., <u>Kataoka,</u> <u>K.</u>	Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physico-chemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency.	Biomaterials	24(24)	4495-4506	2003
Uwatoku, T., Shimokawa, H., Abe, K., Matsumoto, Y., Hattori, T., Oi, K., Matsuda, T., <u>Kataoka,</u> <u>K.</u> , Takeshita, A.	Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats.	Circulation Research	92(7)	e62-69	2003
<u>Kono, K.</u> , Takagishi, T.	Fusogenic polymer-modified liposomes for the delivery of genes and charged fluorophores.	Methods in Enzymology.	373	422-432	2003
Kojima, C., Haba, Y., Fukui, T., <u>Kono, K.</u> , Takagishi, T.	Design of Biocompatible Dendrimers with Environment Sensitivity.	Macromolecules	36(7)	2183-2186	2003
Takahashi, T., <u>Kono, K.</u> , Itoh T., Emi, N., Takagishi, T.	Synthesis of Novel Cationic Lipids Having Polyamidoamine Dendrons and Their Transfection Activity.	Bioconjugate Chem.	14	764-773	2003
<u>片岡一則</u>	高分子キャリア	血液・免疫・ 腫瘍	8(2)	112-118	2003
柿沢資訓、 <u>片岡一則</u>	溶液系の自己組織化－超分子ナノカプセルの形成と薬物・遺伝子デリバリーへの展開－	現代科学	387	25-30	2003
<u>片岡一則</u>	医薬を運ぶ高分子ナノマシン－ドラッグデリバリーシステム－	高分子	52(10)	780-781	2003

片岡一則	インテリジェント高分子材料による標的治療型ドラッグデリバリーシステム	化学工学	67(12)	682-685	2003
片岡一則	バイオとマテリアルのフュージョン：バイオマテリアル	学術の動向	9(2)	59-61	2004
片岡一則	ナノ医療フロンティアを目指す高分子材料設計	学術月報	57(2)	115-124	2004
河野健司	高効率遺伝子デリバリーを目指した機能性ベクターの設計	インテリジェント材料・システム	12(2)	9-14	2003
河野健司	温度感受性高分子修飾リポソームの内包物質放出挙動	月刊「高分子加工」別冊		30-36	2003

20030379

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。