

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

遺伝子導入の時間・空間・量を制御できる  
次世代型ベクターの分子設計と遺伝子導入デバイスの  
総合開発

平成15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 中山 泰秀

平成16(2004)年 3月

# 目 次

## I. 総括研究報告書

遺伝子導入の時間・空間・量を制御できる次世代型 _____ 中山泰秀	1
ベクターの分子設計と遺伝子導入デバイスの総合開発	

## II. 分担研究報告書

1. 高効率遺伝子導入ベクターの開発に関する研究 1 : _____ 中山泰秀	29
ブロック鎖を有するスター型高分子遺伝子導入 ベクターの開発	
2. 高効率遺伝子導入ベクターの開発に関する研究 1 : _____ 斯波真理子	55
架橋ミセル型遺伝子導入ベクターの開発と評価	
3. ベクターデリバリーシステムに関する研究 : _____ 根本 泰	61
ナノサイズ磁気ビーズの合成	
4. 遺伝子導入デバイスの化発に関する研究 : _____ 西 正吾	65
血管内遺伝子導入デバイスの開発	
5. ベクターのシステム化に関する研究 : _____ 中山敦好	77
生体内分解性高分子の開発	
6. 遺伝子開発に関する研究 : _____ 山下 潤	85
ES細胞 in vitro 分化誘導系を用いた血管分化関連 遺伝子の同定	
7. 循環器系疾患モデルの作成と血管ホルモン遺伝子細 _____ 伊藤 裕	95
胞治療の開発に関する研究	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 _____	103
---------------------------	-----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____	107
-----------------------	-----

遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる次世代型ベクターの分子設計と  
遺伝子導入デバイスの総合開発

主任研究者：中山泰秀（国立循環器病センター研究所 生体工学部 室長）

研究要旨：

合成高分子系ベクターの分子工学的設計として、1) 骨格設計、2) 機能化設計、3) システム設計に細分要素化して研究を進めた。遺伝子発現の高効率化を目的とする骨格設計として、昨年度開発したスター型カチオン性高分子のカチオン性分岐鎖の末端を非イオン性ブロック化することを行った。ブロック化によって、少ないベクター量で効率良く DNA と錯体形成でき（細胞低傷害性）、形成された DNA 錯体は高密度化でき（酵素分解の阻害）、さらに形成錯体は水溶液中での凝集を大幅に抑制できた（溶液安定性）。カチオン性分岐鎖の非イオン性ブロック化によって合成高分子系ベクターにおいて世界最高レベルの遺伝子発現効率と安定性が獲得された。また、高分子ナノミセルの内核を SS 結合で架橋することで、*in vivo* での血中安定性を向上させると同時に細胞内の還元環境下でベクターから DNA を遊離させることができた。頸静脈投与によって *in vivo* での遺伝子発現を認めた。また、遺伝子の能動輸送化をめざして、磁気誘導化ベクターの開発を行った。体外から磁力を印加することによって、疾患部位へ局在化させ、経時的に DNA を放出させることが可能となると考えられる。その基盤技術として、水酸化鉄をアスコルビン酸と接触させ、定量的に酸化することで径分布の狭いナノ磁気粒子を合成した。遺伝子の局所送達化のために遺伝子治療に特化した血管内治療デバイスとしてステントストラットをポリウレタンフィルムで皮膜化させたカバーステントを開発した。また、被膜フィルムへの生分解性の付与のために、生分解性コポリエステルを分子設計した。共重合組成を変化させることで柔軟性や強度など機械的性質を調節することが可能であった。遺伝子治療に有効な新しい遺伝子の開発を併行して行っており、ES 細胞からの内皮細胞分化に関与する遺伝子群を探索しつつあり、アドレノメジュリン (AM) の有効性などを明らかとした。さらに、臨床研究に向けた準備として、AM トランスジェニックマウスから下肢虚血モデルと脳梗塞モデルを複製し、血流回復や神経再生への AM 遺伝子の有効性を見出した。

分担研究者	
伊藤 裕	京都大学大学院医学研究科 助教授
斯波真理子	国立循環器病センター 研究所バイオサイエンス部 室長
山下 潤	京都大学再生医科学研究所 附属幹細胞医学研究センター 幹細胞分化制御研究領域 室長
中山敦好	(独)産業技術総合研究所 関西センター 主任研究者
西 正吾	高槻赤十字病院脳外科 部長
根本 泰	(株)ブリヂストン 化成品事業本部 研究員

## A. 研究目的

遺伝子治療は、遺伝子を治療すること目的とする修復遺伝子治療と、遺伝子を使うが遺伝子を治療しない付加遺伝子治療の二つの形で行われている(図1)。遺伝子治療のアプローチとしては、1) 外来遺伝子のゲノム内への組み込みによる細胞内での発現、2) アンチセンス法による mRNA の翻訳抑制、3) ゲノム DNA での三重鎖形成による遺伝子の発現制御、4) リボザイムによる mRNA の切断、5)

相同組換えの誘導やポイントミューテーションによる変異遺伝子の修正、などがある。いずれにおいても外来の核酸分子を細胞の核、あるいは細胞質内に効率良く導入する技術が求められている(図1)。

一般的な遺伝子送達システムは治療用遺伝子を含む DNA と、それを運搬するベクターとの複合体として構成されている。これまで多くの遺伝子治療は臨床主導で進められてきており、その際ベクターとして主にウイルスが用いられてきた(図2)。ウイルス系のベクターは発現効率が高い反面、安全性に問題を有しており、副作用による死亡事故例も報告されている(図3)。

一方、ウイルス系に代わる、次世代型のベクターとして合成高分子を含む非ウイルス系ベクターが注目され、近年研究が活発化してきている(図4)。しかし、安全性は高いが、発現効率はウイルスベクターに比べて大幅に低いいため、臨床応用される大きな障害となっている(図5)。

本研究では、合成高分子系ベクターを臨床応用可能な程度に発現効率を高めることを到達目標とする。

本研究での研究体制と研究課題との相関関係を図6に示した。研究課題は、新しい合成高分子系のベクターの開発、ならびにそれらを有効に病変部に誘導、徐放できるデバイスを開発することである(図7)。

初年度は、基盤技術の開発を主目的として、合成高分子系ベクターの分子工学的設計を中心として行い、支援技術として、遺伝子開発と材料開発を行った。また、遺伝子導入デバイスと導入技術の開発を同時併行で進めた。

次年度では、合成高分子ベクターの基本骨格として、ナノレベルの厳密な幾何学的設計を行い、次いで機能化設計として光反応性を

有する光機能性分子を組み込み、遺伝子とのコンプレックス形成過程、ならびに解離過程を任意に制御しうる光操作型材料の基盤分子設計を行い、遺伝子導入の時間・空間・量を厳密に制御できる高い安全性と発現効率を併せ持つ次世代型の高機能性ベクターを開発した。

さらにベクターと遺伝子との複合体を体内で誘導できる金や磁性ナノ粒子を遺伝子の支持担体として開発し、また、局所送達のために血管内治療デバイスや気管内投与デバイスを応用して遺伝子導入に特化した新しいデバイ

スを開発した。その際デバイスの材料や遺伝子の包埋担体材料として生分解性高分子材料を支援材料として開発した。

最終年度は、既に共同出願申請等によって権利化を獲得したベクターならびにデバイス関連の技術の商品化に向けて、企業への技術移転を図りつつ、さらなる遺伝子導入効率の向上のためのベクター分子の最適設計とデバイス設計を行い、遺伝子開発研究を継続した。また臨床応用研究として、動物実験モデル・評価系の構築を行った。

## 遺伝子治療とは

遺伝子治療は、遺伝子を治療することを目的とする修復遺伝子治療と、遺伝子を使うが遺伝子を治療しない付加遺伝子治療の二つの形で行われている。

遺伝子治療のアプローチとしては、

- 1) 外来遺伝子のゲノム内への組込みによる細胞内での発現
- 2) アンチセンス法によるmRNAの翻訳抑制
- 3) ゲノムDNAでの三重鎖形成による遺伝子の発現制御
- 4) リボザイムによるmRNAの切断
- 5) 相同組換えの誘導やポイントミューテーションによる変異遺伝子の修正

いずれにおいても外来の核酸分子を細胞の核あるいは細胞質内に効率良く導入する技術が求められる。

図 1. 遺伝子治療とは

## 遺伝子治療臨床研究に用いられている遺伝子導入法

(Wiley社1998年12月資料)

ベクター	プロトコール		患者	
	数	%	数	%
レトロウイルス	154	42	1,177	38.1
レトロウイルスベクター産生細胞	22	6	424	13.7
レトロウイルス/遺伝子銃	1	0.3	6	0.2
リポフェクション	69	18.8	725	23.5
リポフェクション/AAV	2	0.5	0	0
リポフェクション/アデノウイルス	1	0.3	3	0.1
アデノウイルス	59	16.1	332	10.7
ポックスウイルス	23	6.3	130	4.2
naked DNA	12	3.3	69	2.2
遺伝子銃	4	1.1	35	1.1
アデノ随伴ウイルス (AAV)	3	0.8	36	1.2
エレクトロポレーション	2	0.5	20	0.6
ヘルペスウイルス	1	0.3	0	0
RNA	1	0.3	30	1
その他	6	1.6	101	3.3
不明	7	1.9	1	0
計	367	100	3,089	100
	(>600 2003年)		(>4,000 2003年)	

図2. 遺伝子治療臨床研究に用いられている遺伝子導入法

## ウイルスベクターの特徴

ベクター	収量 (IU/mL)	長所	短所
レトロウイルス	$10^{5-7}$	永続的な遺伝子発現	発ガン性 非分裂細胞に適用不可
アデノウイルス	$10^{10-12}$	高い遺伝子発現 高タイター 非分裂細胞にも適用可	発現が一過性 抗原性
レンチウイルス	$10^{7-8}$	永続的な遺伝子発現 非分裂細胞にみ適用可	発ガン性
アデノ随伴ウイルス	$10^{6-8}$	長期的な遺伝子発現 非分裂細胞でも適用可	挿入遺伝子サイズの制限

図3. ウイルスベクターの特徴

## 非ウイルスベクターの特徴

ベクター	構成	性質
カチオン性リポソーム	DOTMAなどのカチオン性脂質 (Lipofectin, Lipofectamine等)	DNAのサイズに制限がない 生体成分との相互作用を受けやすい 標的指向性が欠如
HVJリポソーム	カチオン性、中性、アニオン性リ ポソームと不活化Sendaiウイルス	DNAのサイズに制限がない 高い細胞融合能 標的指向性の欠如
遺伝子銃	金などのパーティクル	標的組織が限定
生分解性パーティクル	ポリ乳酸などの生分解性ポリマー	DNAの徐放制御が可能 分散安定性が低い 標的指向性が欠如
カチオン性ポリマー	ポリリジン、ポリエチレンジアミン など	DNAのサイズに制限がない リガンドの修飾が容易
naked DNA	DNAのみ	キャリアが不要 標的組織が限定
修飾オリゴ核酸	リガンド修飾DNAやペプチド核酸	利用目的が限定 細胞膜透過性が低い

図4. 非ウイルスベクターの特徴

## 非ウイルスベクターとアデノウイルスベクター の遺伝子発現効率の比較

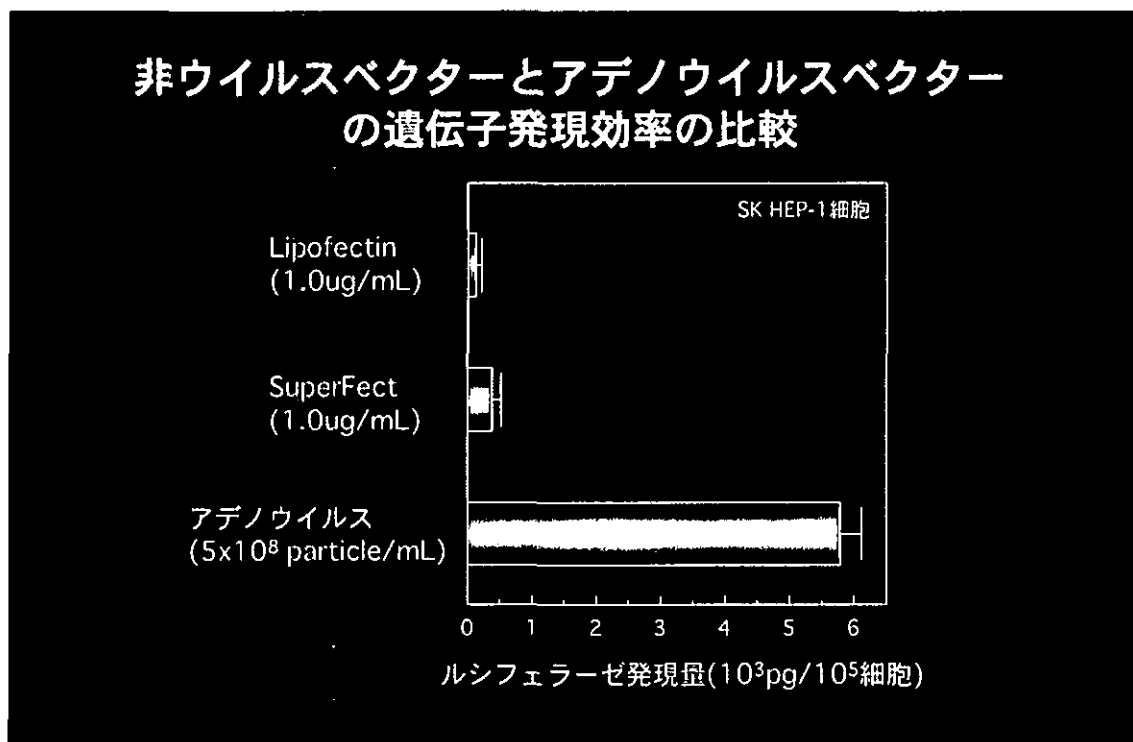


図5. ベクターの発現効率の比較

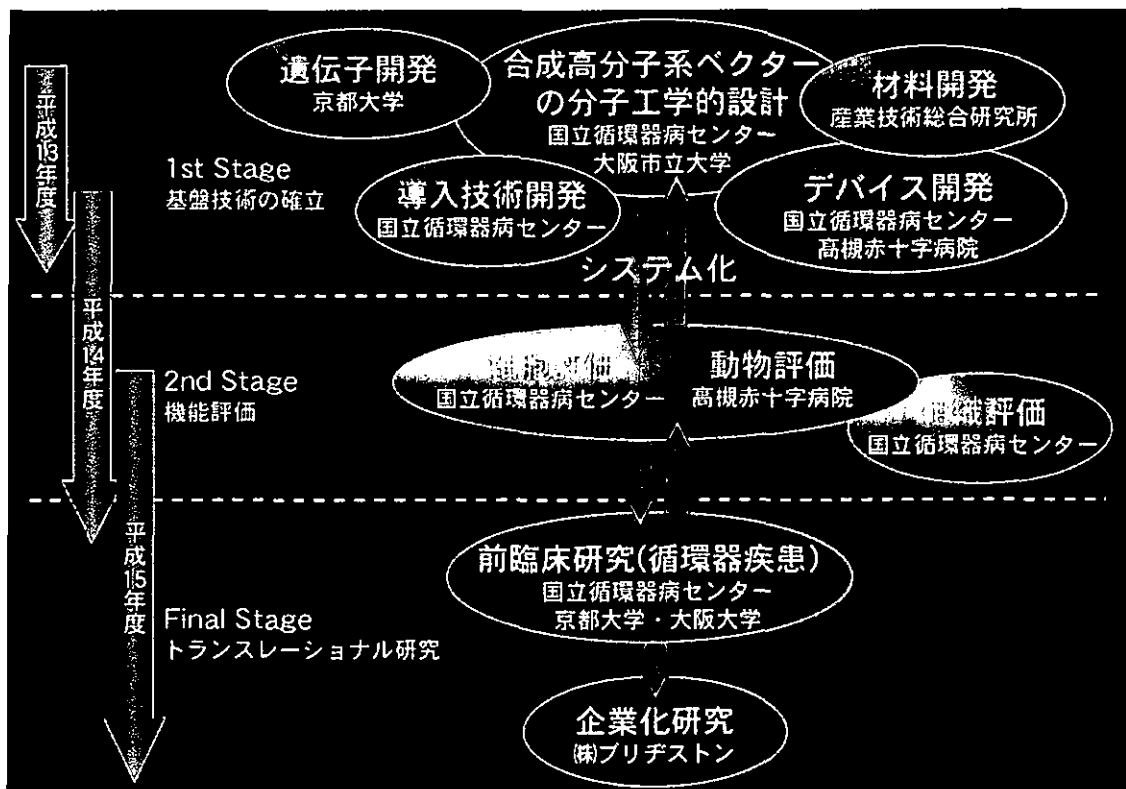


図6. 本研究の研究体制ならびに研究課題の相関関係

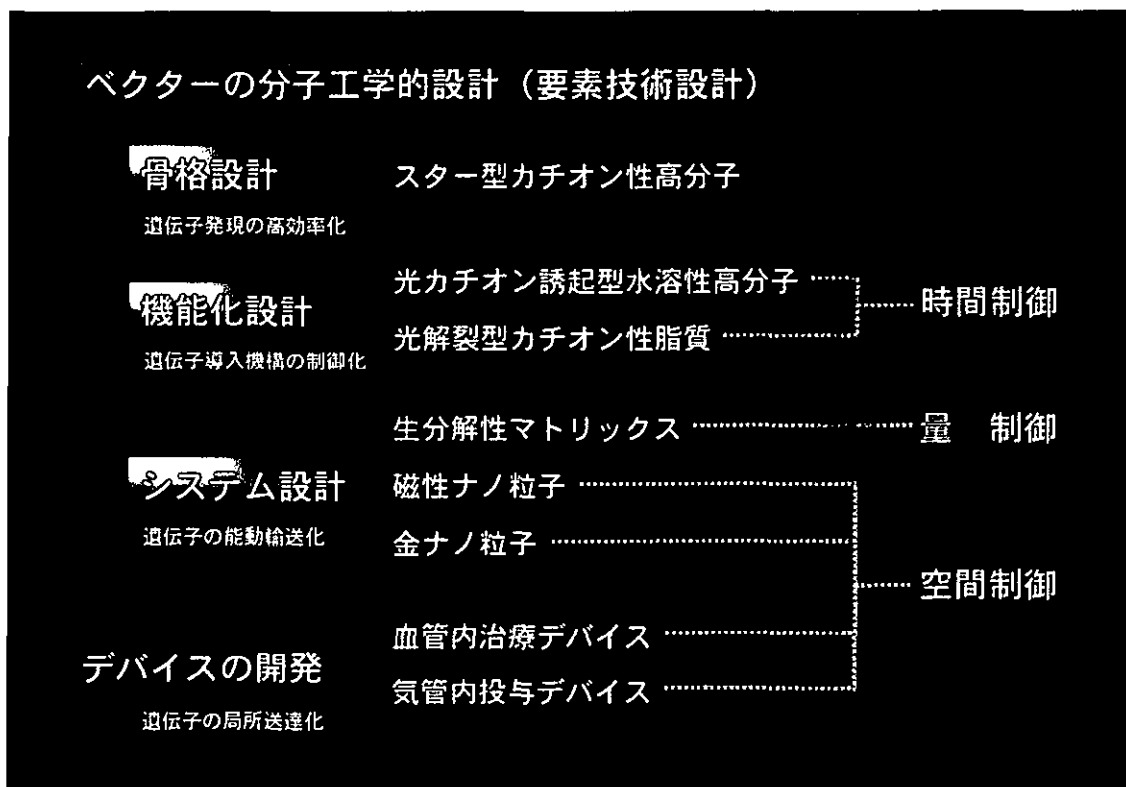


図7. 合成高分子系ベクターの分子工学的設計における要素技術設計項目ならびに開発目標とする遺伝子治療デバイス



## B. 研究方法

### B-1. ベクター分子の骨格設計

Sodium *N,N*-diethyldithiocarbamate trihydrate (6.00 g, 26.63 mmol, Mw. 225.31) を Ethanol (50 mL) に溶解し、

1,2,4,5-Tetrakis(bromomethyl)benzene

(1.00 g, 2.22 mmol, Mw. 449.83) を懸濁し加え、遮光下、室温にて 5 日間攪拌することで、4 個のイニファタ基を有する多イニファタ と して 1,2,4,5-Tetrakis(*N,N*-diethyldithiocarbamyl)benzene を得た。

ついで、得られた多イニファタ (18.08 mg, 0.0249 mmol, Fw. 723.30) の Chloroform 溶液 (400  $\mu$ L) に、DMAPAAm (1.062 g, 6.8 mmol, Mw. 156.23) に加え、Methanol を加えて全量を 20 mL に調整した後、窒素雰囲気下にて紫外光を 30 分間照射することによって 4 分岐型カチオン性高分子を合成した。

最後に、DMAAm (247.7 mg, 0.0025 mol) に先に合成したカチオン性高分子 (62.5 mg, 0.00625 mmol, Mn ca. 10000) を加え Methanol で全量を 5 mL に調整した後、紫外光照射を 30 分間繰り返すことで、分岐鎖がブロック化された、4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) が合成できた。

### B-2. 遺伝子発現実験 (in vitro)

in vitro での遺伝子発現実験は、血管内皮細胞、Cos-1 細胞、HepG2 細胞、THP-1 細胞、血管平滑筋細胞を用いた。それぞれの細胞を 24 穴プレートに培養、10% FCS 存在下にそれぞれの遺伝子錯体を加え、24 時間培養した。さらに 48 時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定し、蛋白質あたりのルシフェラーゼ活性により遺伝子発現を測定した。

### B-3. 遺伝子発現実験 (in vivo)

in vivo での遺伝子発現実験は、アポ E ノックアウトマウス頸静脈よりそれぞれの SS 結合を持った架橋ミセルの注射を行い、1 日後、臓器のルシフェラーゼの活性測定を行った。

### B-3. 遺伝子の機能化設計 :

ポリオキシエチレン(20)セチルエーテルの 0.5M シクロヘキサン溶液 (300mL) に 0.25M 塩化鉄水溶液 (5 mL)、次いで水酸化ナトリウム及びアスコルビン酸の混合溶液を滴下し、pH を約 9 に調整した後、2 時間攪拌を続けた。

この溶液へテトラエトキシエトキシシラン (15mL) を添加した。得られた懸濁液から遠心分離によって沈殿物を得、イソプロピルアルコールで洗浄後、水中で超音波にて分散させ、0.22  $\mu$ m フィルターにて濾過し、濾液を透析チューブで透析して磁気ビーズの懸濁液を得た。

### B-4. カバーステントの作製

レーザー加工により多孔化したポリウレタンフィルムの方側面に光反応性ゼラチン (50mg/mL) をヘパリン (25 mg/mL、164.5units/mg) と混合して塗布 (20 $\mu$ L/cm<sup>2</sup>) し、紫外光照射により固定化した。この塗布・照射操作を 2 回繰り返した後、フィルムの処理面が内腔に向くようにバルーン拡張型ステントの外側に置き、10.0 ナイロン糸にて支持縫合した後、フィルムの断端をジメチルホルムアミドにて溶融接着させることによりカバーステントを作製した。

### B-5. 移植実験

実験はニュージーランド白色家兎 (体重 3~4kg) で行った。作製したカバーステントをバルーンカテーテルにマウントした後、大腿動脈より透視下で総頸動脈に誘導し、バルーン

ンを拡張させてカバードステントを血管内に留置した。3月後、開存性を血管撮影にて評価した。

#### B-6. 分解性高分子の合成

遺伝子導入ベクターを担持させるための材料開発としてラクトン、オキシラン類などを出発物質とした開環重合法によるコポリエステル、コポリエステルエーテル等を合成し、側鎖への官能基の導入による機能化を行った。その性能評価と生体系への適用についても検討した。さらにアミノ酸を原料とするポリアミノ酸（ポリアミド）合成、ブレンド系モデルによる分解挙動解明についても行った。

#### B-7. 遺伝子開発

古典的サブトラクション法による探査に加え、DAN チップを用いたコランスクリプトーム解析と RNAi を用いた遺伝子機能阻害実験を組み合わせて行った。

#### B-8. AM 単独発現 Tg マウスの作製

PAMP が不活化されるよう塩基置換した変異型 AM 遺伝子を用いて AM が単独で過剰発現するトランスジェニックマウス (Tg) マウス

を作成した。ヒト腎臓 cDNA ライブラリーより AM 前駆体 遺伝子 cDNA を増幅し、PAMP コード領域 3' 端のグアニンをシトシンに置換した。

#### B-9. マウス中大脳動脈閉塞脳梗塞モデルの確立と AM による虚血脳での血管、神経再生作用

12 週齢マウスに対し、イソフルレンを用いて吸入麻酔を施行した。頸部正中切開にて左総頸動脈を露出して小孔を作成し、シリコン

コートを施した塞栓子 (8-0 ナイロンモノフィラメント) を挿入した。塞栓子を総頸動脈から内頸動脈に注意深く進め、中大脳動脈起始部を閉塞し、血流の途絶を側頭骨に設置したファイバー血流計にて確認した。20 分後に塞栓子を抜去し、血流の再開を血流計にて確認した。

#### CD. 研究結果と考察

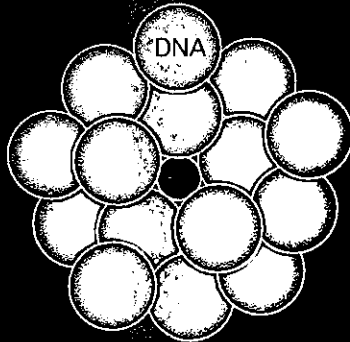
##### CD-1. 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-b-DMAAm) スターベクター

我々は、ベクターの遺伝子発現の高効率化を獲得するための戦略として、ベクター電荷の高密度化を提案している。ベクターの電荷密度を高くできれば、1) 少ない量のベクターで DNA と錯体形成することが可能となるため、カチオン性高分子が細胞に与える傷害性を低減でき、2) 高密度の錯体が形成されることで、酵素からの分解を阻害でき、3) 形成された錯体の凝集が抑制されることで、溶液安定性が向上すること、などが期待された (図 8)。

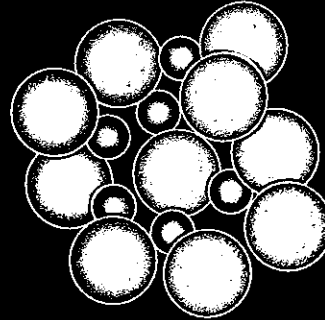
そこで昨年度、ベクターの電荷を高密度化させる分子設計として、分岐構造を有するスター型カチオン性高分子を設計した (図 9)。合成はイニファタ (1 分子で重合開始剤、連鎖移動剤、停止剤の 3 種類の機能を有する化合物) によるリビングラジカル重合法を用いることによって、低い分散度を保ちながら、分子量を厳密に調整しながら重合することによって行った (図 10)。その中で、分子量を約 15000 にそろえたスター型高分子間において遺伝子発現量の比較を行い、分岐数の増加に伴って段階的に発現効率が増加することなど、極めて興味深い知見を得た (図 11)。

本年度は、分岐鎖のブロック化 (図 9) による高発現化と高水溶液安定性をめざした。

## ベクターの設計戦略



高密度電荷ベクター



低密度電荷ベクター

期待される効果

- 1) 少ないベクター量で錯形成 (低細胞傷害性)
- 2) 高密度の錯形成 (酵素分解阻害)
- 3) 錯体の凝集抑制 (溶液安定性)

図 8. 高発現合成ベクターの設計戦略

## 分子ナノアーキテクチャー技術による骨格設計の多様性

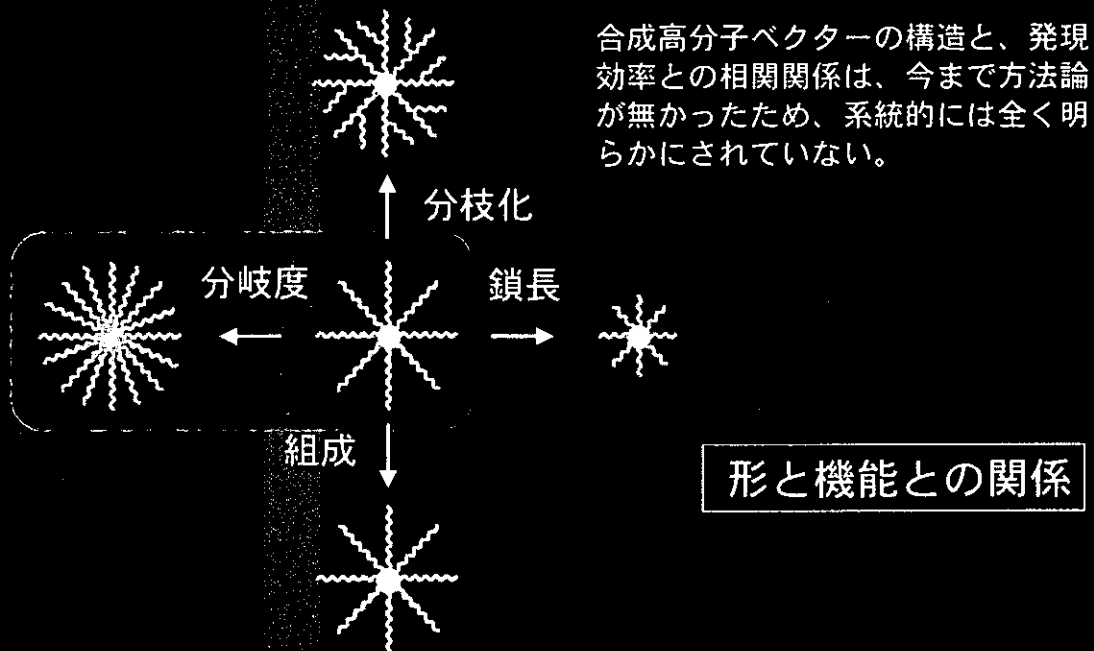


図 9. ベクター分子の骨格構造設計

# ナノ分子構造設計した高分子ベクター (スターベクター)

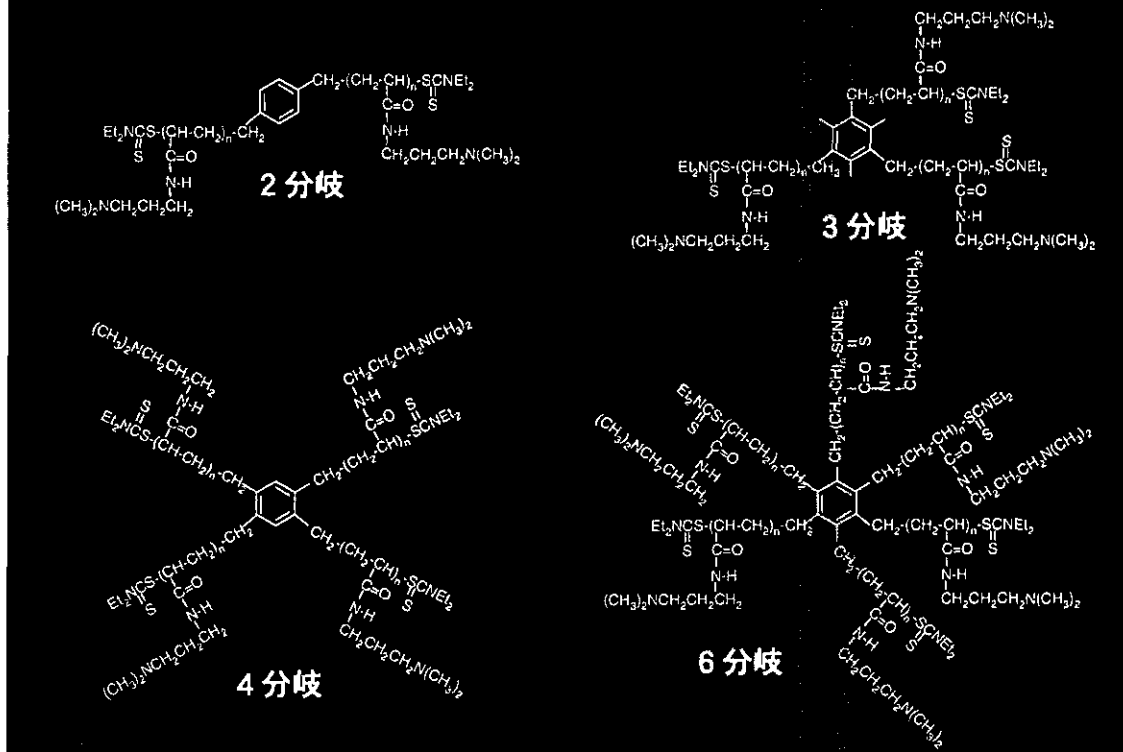


図 10. 合成したスターベクターの分子構造

## 高発現性能の獲得

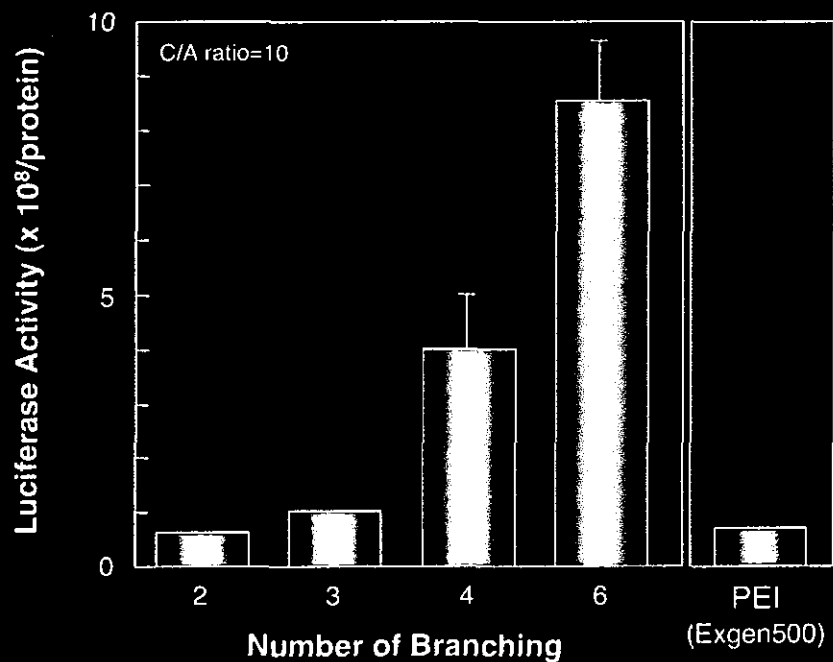


図 11. スターベクター間での遺伝子発現効率の比較

Poly(DMAPAAm)と DMAAm のブロック共重合鎖を有する分岐型ベクターは、図 12 に示す方法で合成した 4 分岐型 Poly(DMAPAAm) を開始剤として用いて、DMAAm をリビングラジカル重合することによって合成した (図 13)。

開始剤濃度、モノマー濃度、照射時間を変化させることによって、分岐鎖の鎖長を任意に設定することが可能であった (図 14)。本研究では、4 分岐型カチオン性高分子の分子量を約 1 万と固定し、グラフトする非イオン性高分子の分子量を 1,000 から 130,000 まで変化したブロック化スターベクターを合成した (図 15)。

遺伝子発現効率は Luciferase 遺伝子を組み込んだ pGL3-control plasmide を用いることにより、その相対発光強度を測定して求めた。トランスフェクション効率の評価は遺伝子ベクターとして市販されている PEI を比較対象として行った。C/A=40 となるように調製した高分子溶液と DNA を混合してポリプレックスを形成させ、トランスフェクションによる遺伝子発現効率を調べた。その結果、ブロック鎖の分子量が大きくなるにつれて発現量も増加していった。これは、細胞内での DNA の放出能が向上したためと考えられる。増加量は、分子量約  $3 \times 10^4$  である Poly(DMAAm)を導入すると Poly(DMAPAAm)のみの場合の約 4.5 倍であった (図 16)。

Poly(DMAPAAm) ( $M_n$ : ca.  $1.0 \times 10^4$ )、DMAAm ( $M_n$ :  $1.65 \times 10^4$ ) を導入した Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) (カチオン部の分子量: ca.  $1.0 \times 10^4$ , ブロック部位の分子量:  $1.65 \times 10^4$ ) および PEI のポリプレックス形成から細胞添加までの経過時間が発現効率に与える影響を調べた。その結果、PEI ではポリプレックスを形成させて、数時間で失活

するのに対し、核である Poly(DMAPAAm)のみでも安定性は増し、さらに非イオン性親水性鎖をブロック化させた Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)では 24 時間後もほとんど失活せず高い活性を維持できた (図 17)。Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)の活性寿命が高かったのは非イオン性かつ親水性である Poly(DMAAm)が導入されたことによって溶液中でのポリプレックス同士の凝集が阻害されたためであると考えられる。

## スター型カチオン性高分子の合成

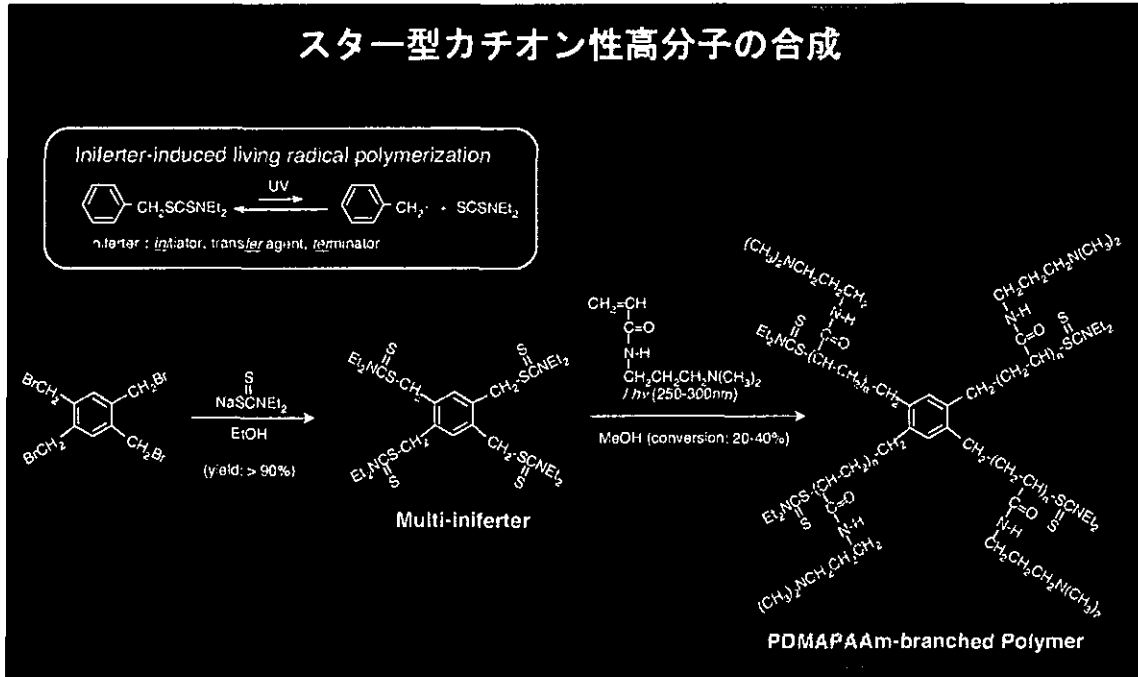


図 12. 4分岐スター型高分子の合成

## ブロック化スター型高分子の合成

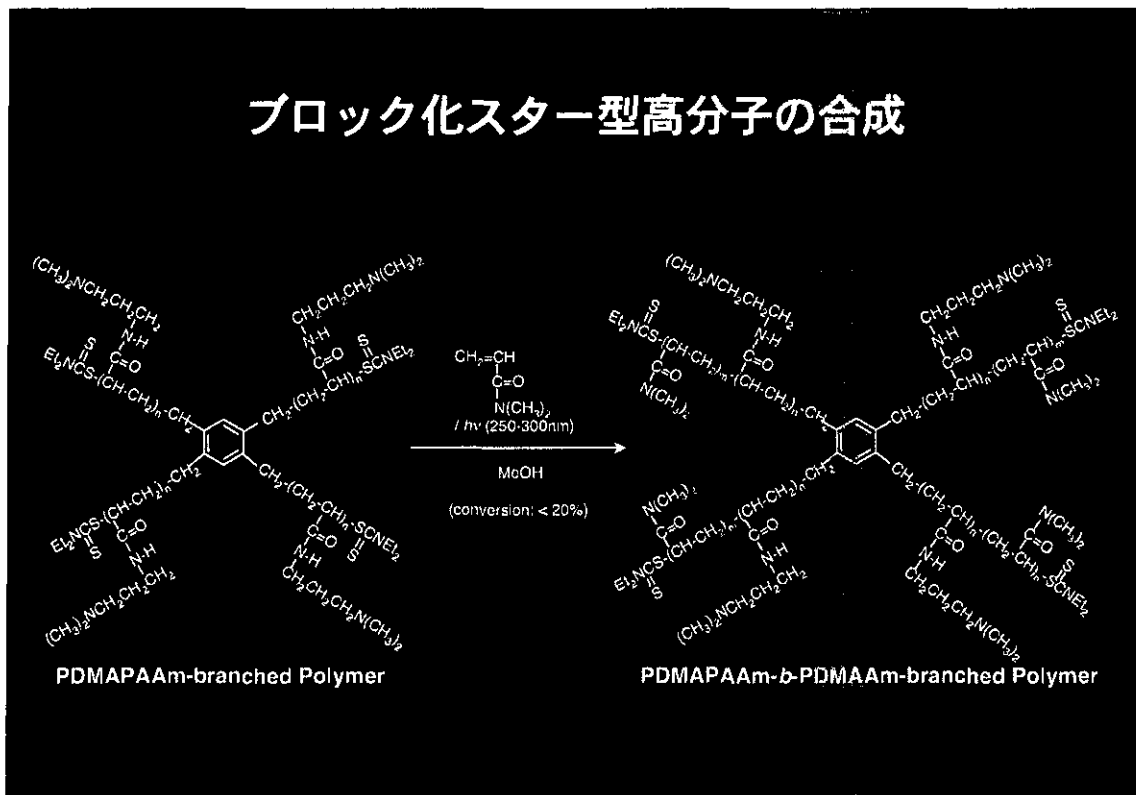


図 13. 4分岐ブロック化スター高分子の合成

### 非イオン性鎖の重合結果

PDMAAm		[DMAAm] irradiation time		block polymer		
Mn (g/mol) <sup>a</sup>	(mM)	(M)	(min)	conv. (%)	Mw <sup>b</sup> (g/mol)	noion/cation
10,000	0.63	0.5	30	5.6	14,700	0.80
10,000	1.25	0.5	30	4.6	12,700	0.45
10,000	2.50	0.5	30	2.9	11,100	0.18
10,000	1.25	1.5	30	5.6	17,100	1.21
10,000	1.25	2.0	30	9.8	26,500	2.80
18,000	1.25	0.5	5	3.5	21,700	0.34
18,000	1.25	0.5	10	6.5	22,400	0.40
18,000	1.25	0.5	15	8.0	25,300	0.66
18,000	1.25	0.5	20	8.8	27,000	0.82
50,000	1.25	0.5	10	13.0	55,600	0.18
50,000	1.25	1.0	10	14.8	65,400	0.49
50,000	1.25	1.5	10	18.7	82,800	1.05

<sup>a</sup> solvent: MeOH, irradiation intensity: 1 mW/cm<sup>2</sup>. <sup>b</sup> determined by combination of GPC (PEO standard) and <sup>1</sup>H NMR.

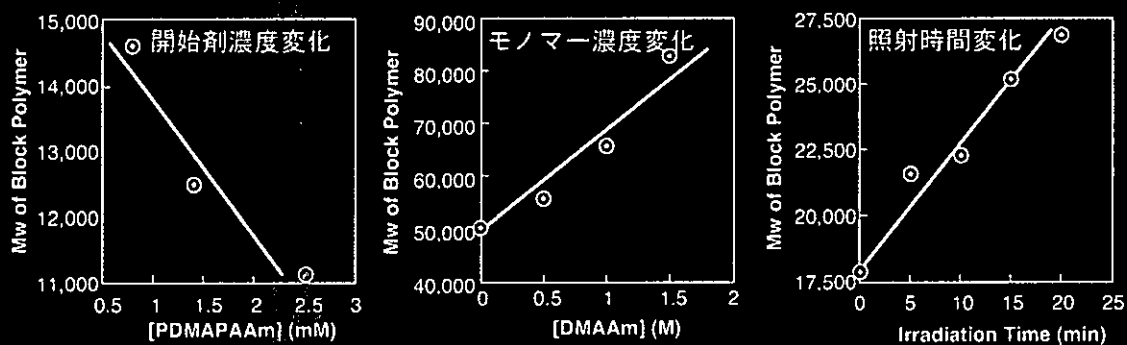


図 14. 4分岐ブロック化スター高分子の合成結果の一部

### ブロック構造化 (分岐鎖の組成の効果)

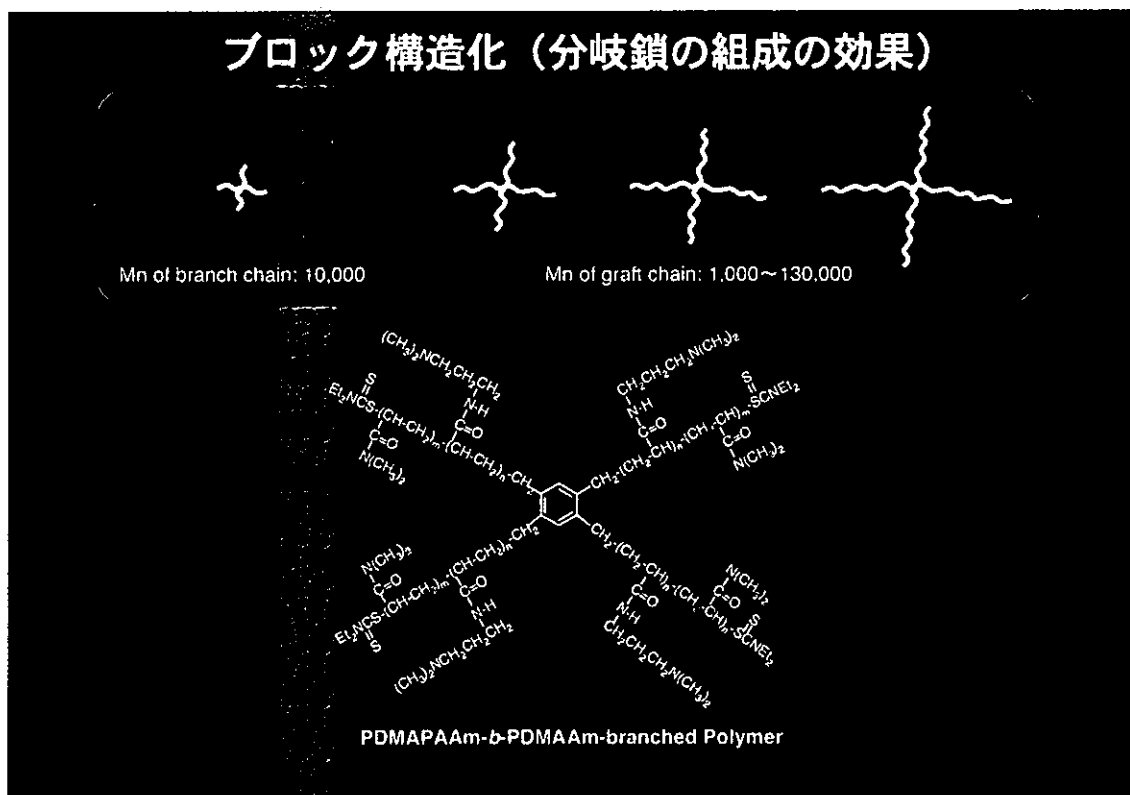


図 15. 合成した4分岐ブロック化スター高分子

### 非イオン性鎖の分子量変化

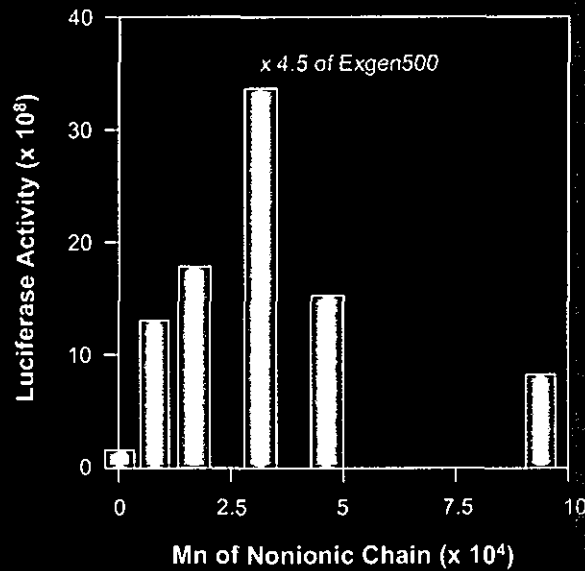


図 16. 非イオン性鎖の鎖長の異なるブロック化スター高分子の発現効率の比較

### ポリプレックスの溶液中での安定性

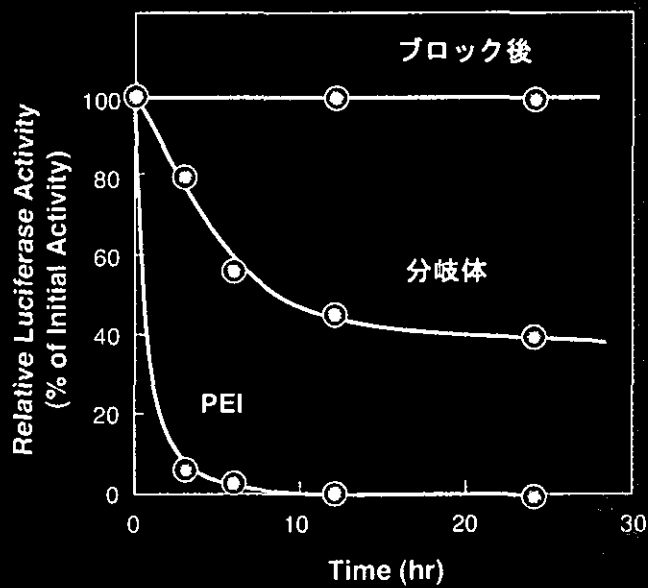


図 17. ブロック化スター高分子ベクターから形成される DNA 錯体の溶液安定性



## CD-2. SS 架橋高分子ナノミセルの開発

SS 架橋高分子ナノミセルの血中安定性を、マウス尾静脈に投与後 30 分の血液から抽出した DNA のサザンブロットィングから調べると、ミセルの内核に SS 結合を 12.7%~28.2% 導入することにより、血中での安定性が増加することが示された。

一方、血管系の細胞を中心に発現効率を比較すると、HepG2 細胞、Cos-1 細胞へは、SS 結合の有無とは関係がなく高い値が得られたが、血管内皮細胞、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 では、SS 結合導入により高値となった (図 18 左)。

また、アポ E ノックアウトマウスに右頸静脈より架橋ミセルを投与すると、28.2%の SS 結合を導入した架橋ミセルでのみ、肝臓での有意な遺伝子発現を認めた (図 18 右)。

これらは、内核に SS 結合を導入したことにより、細胞外では DNA と固く結合し、血中安定性を増したこと、さらに、細胞内では、還元条件下におかれるため、DNA が遊離したことなどが遺伝子発現の上昇に寄与したと考えられる。

さらに、発現効率の高い遺伝子導入ベクターの開発を行い、1 日も早い臨床応用を行いたいと考えている。

## CD-3. ナノサイズ磁気ビーズの合成

合成した磁気ビーズは磁性体の粒子であった。SEM 像より今回合成した磁気ビーズは 10nm 程度のナノ粒子で、粒子径もほぼ均一であった。形状は立方体形であり、 $Fe_3O_4$  単結晶の形状と一致した。また、合成した磁気ビーズはナノ領域の粒子径が水中において安定して維持された。

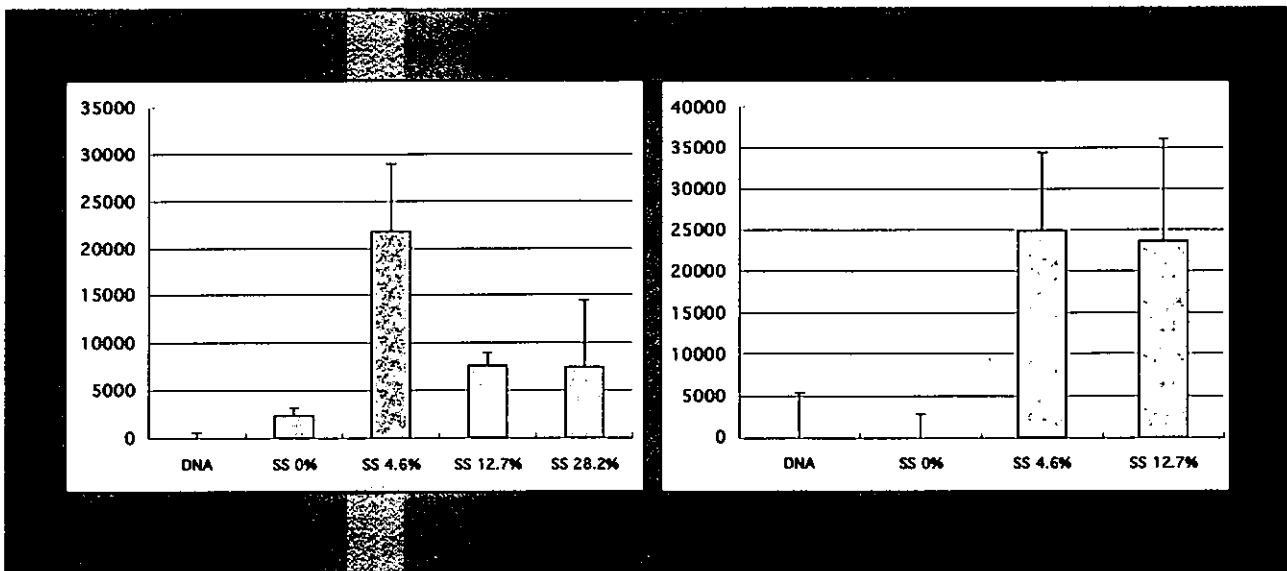


図 18. SS 結合導入による架橋ミセルの血管内皮細胞への transfection (左) とアポ E ノックアウトマウスへの遺伝子導入 (右)

#### CD-4. 血管内遺伝子導入デバイスの開発

カバー材として用いたセグメント化ポリウレタンフィルムをエキシマレーザー加工することにより、高精度で微細加工を行った。作製した多孔化フィルムを顕微鏡下にてバルーン拡張型ステントの外側に巻き縫合固定した後、フィルム断端を溶融接着することによりカバードステントを作製した(図 19)。また、分子設計した光反応性ゼラチンをヘパリンと混合してフィルム表面に塗布した後に光照射すると、ヘパリンを包埋したゼラチンが形成され、フィルム表面に固定化できた。

作製したカバーステントを兎の大腿動脈より挿入した。血管内の操作に関してはフィルムの有無でほとんど差は無く、スムーズであった。バルーンの拡張によりステントを頸部に留置した。カバーの有無で拡張性にほとんど差はなかった。走査型電子顕微鏡で観察すると、カバーの有無にかかわらず、全てコン

フルエントの内皮細胞層での被覆化を認めた。未カバー領域に形成された新生内膜層の厚さは平均 230.6 $\mu\text{m}$ 、カバー領域での厚さは平均 244.3 $\mu\text{m}$  となり、両者の差にほとんど有意さはなかった。

ヘパリンの担体として利用した光反応性ゼラチンに遺伝子を包埋させることで、ステントのカバー材表面に遺伝子を固定化させることが可能と考えられる。血管内遺伝子導入デバイスとして有用と考えられる。

#### CD-5. 生分解性高分子の開発

遺伝子の局所送達化デバイスの遺伝子包埋層ならびにデバイス基材として用いる生分解性材料として、グリシドールと環状酸無水物もしくはラクトンとの共重合によって得られる水酸基を有するコポリマーにオレフィン系側鎖を導入することにより合成した。

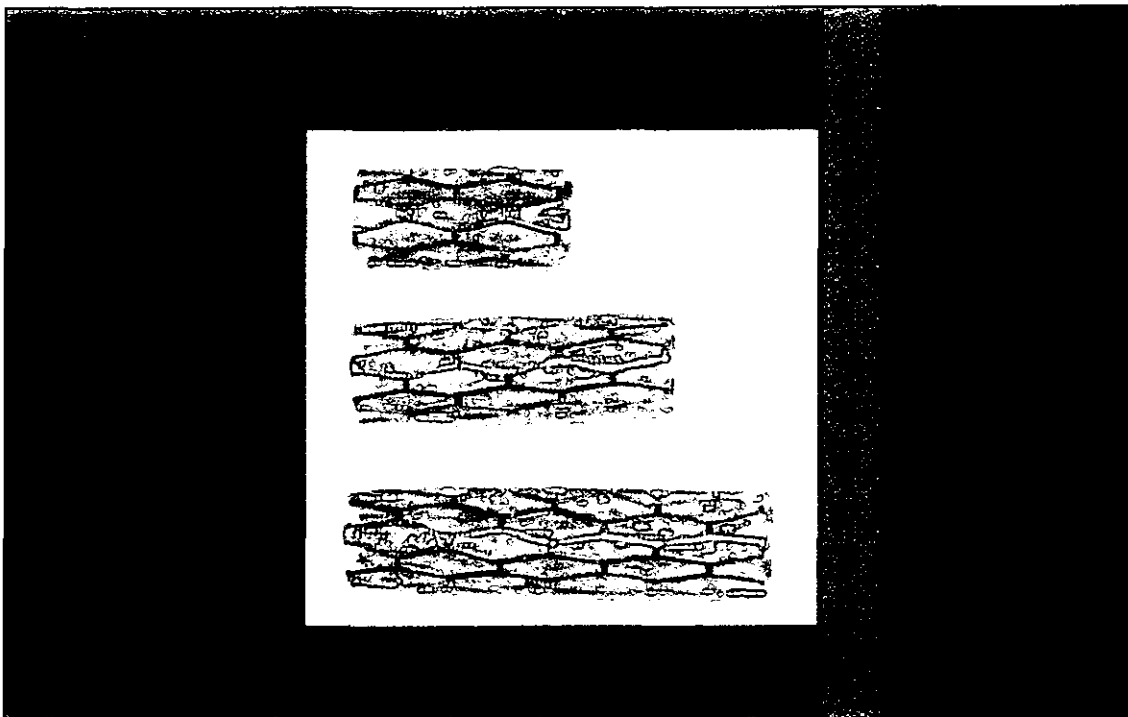


図 19. 開発した血管内遺伝子導入デバイス

## CD-6. 血管分化関連遺伝子の同定

RNAi を ES 細胞の分化途上における任意の時間に作用させ、分化途上における遺伝子機能阻害することにより、分化に關与する遺伝子機能解析を培養細胞のみで行うことのできる新しい *in vitro* 分化実験システムの構築に成功した。ノックアウト動物モデルが不可能なヒトにおける分化研究への応用が期待される。

## CD-7. 循環器系疾患モデルの作成と血管ホルモン遺伝子細胞治療の開発に関する研究

AM は生体内において副腎、心臓、腎臓などに幅広く分布しているが、発生段階においても胎生早期から心血管等に発現し、AM 遺伝子のホモノックアウトマウスは血管構築不全により胎生致死となることから心血管系分化制御因子としての意義が注目されている。

AMTg マウスおよび野生型マウスに、それぞれ大腿動脈結紮下肢虚血モデルを作成し、血流回復能を比較すると、AMTg マウスでの有意な促進効果が認められた。

一方、塞栓子をマウス総頸動脈から内頸動

脈に注意深く進め、中大脳動脈起始部を閉塞することで、虚血脳モデルを作製した。AMTg マウスにおいて、毛細血管密度は野生型と比較して術後 7 日目から有意に増加し、虚血域の脳血流も野生型と比較して有意に増加した。梗塞域の大きさも AMTg マウスで有意に減少した。またグリオーシスも AMTg マウスで軽減していた。AMTg マウスにおいて梗塞後の神経再生の促進も認められた。

さらに、AM によるマウス ES 細胞由来 VPC からの血管内皮細胞への分化誘導作用について検討した。FCS のみで VEGFR2 陽性 VPC を培養した場合には  $\alpha$ SMA 陽性壁細胞が 95% 以上を占め PECAM-1 陽性の内皮細胞はほとんど出現しなかった。一方、FCS に加え VEGF を投与すると PECAM-1 あるいは VE-cadherin が陽性の内皮細胞が全体の約 30% に誘導された。AM によるマウス ES 細胞由来 VEGFR2 陽性 VPC からの血管内皮細胞への分化誘導作用が明らかになった。AM は VEGF との併用において  $10^{-9}\text{M}$ ~ $10^{-6}\text{M}$  の範囲で濃度依存的な PECAM-1 陽性内皮細胞誘導作用を認めた (図 20)。

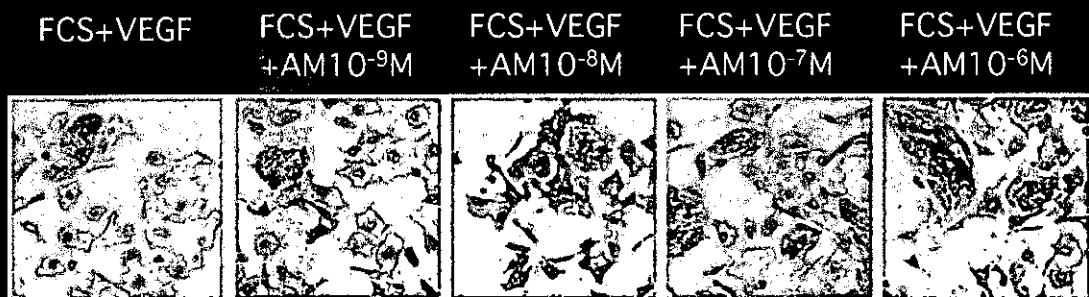


図 20. AM による ES 細胞由来 VPC からの濃度依存的な内皮細胞誘導効果

## E. 結論

本研究の到達目標とした従来に比べ格段に高い遺伝子導入効率を発揮し、かつ安全性の高い合成高分子ベクターの開発に成功した。加えて、ステントと組み合わせることによって、血管壁細胞内に有効に局所発現できる血管内治療用遺伝子導入デバイスの開発にも成功した。従って、当初の研究目標をほぼ達成したと判断される。今後実用化によって、遺伝子治療をより一般的な治療に発展させる原動力となると大いに期待される。本研究は、厚生労働省科学技術政策の「先端科学技術の開発と応用」に合致し、また国際競争力のある治療機器開発につながる点で「医療機器産業ビジョン」に大きく貢献でき、社会的に意義深い研究成果が得られたといえると結論づけられる。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### G-1. 論文

1. Takeshi Masuda, Yasuhide Nakayama, Development of a water-soluble matrix metalloproteinase inhibitor as an intra-arterial infusion drug for prevention of restenosis after angioplasty. **J Med Chem** 46: 3497-3501, 2003
2. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda, Fabrication of micropored elastomeric film-covered stents and acute-phase performances. **J Biomed Mater Res** 64A: 52-61, 2003
3. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Fabrication of drug-eluting covered stents with micropores and differential coating of heparin and FK506. **Cardiovasc Rad Med** 4: 77-82, 2003
4. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda, Embolization of experimental aneurysms using a heparin-loaded stent graft with micropores. **Cardiovasc Rad Med** 4: 29-33, 2003
5. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ueda-Ishibashi, Takehisa Matsuda, Occlusion of experimental aneurysms with heparin-loaded, microporous stent grafts. **Neurosurgery** 53: 1397-1405, 2003
6. Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Photo-control of the interaction between endothelial cells and photo-cation generatable water-soluble polymers. **J Control Release** 89: 213-224, 2003
7. Yasuhide Nakayama, Akiko Furumoto, Satoru Kidoaki, Takehisa Matsuda, Photocontrol of cell adhesion and proliferation by a photoinduced cationic polymer surface. **Photochem Photobiol** 77: 480-486, 2003
8. Hiromichi Sonoda, Keiichi Takamizawa, Yasuhide Nakayama, Hisataka Yasui, Takehisa Matsuda, Coaxial double-tubular compliant arterial graft prosthesis: time-dependent morphogenesis and