

表3-4 DC濃度の変化による4分岐型Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	PDMAAm/PDMAPAAm	Yield (g)	Mn	Conversion (%)
1	0.5	10	30	Methanol	0.18	0.0741	11059	5.6
2	0.5	5	30	Methanol	0.45	0.0537	12700	4.8
3	0.5	2.5	30	Methanol	0.80	0.0434	14727	2.9

Monomer : DMAAm, DC : Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 10000) , Light intensity : 1 mW/cm²

CD.3-2 Monomer 濃度を変化させた場合

Monomer である DMAAm 濃度を 0.5、1.5、2 M に調節することによって 3 種類の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) を得た (表 3-3)。DMAAm 濃度を増加していくに従って、より分子量の大きい Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) が得られることがわかった (図 10)。この反応は、まず開始剤である 4 分岐型 Poly(DMAPAAm) の DC の -S-CS 結合がラジカル開裂した後、ベンジルラジカルが DMAAm 上に連鎖移動して進行する。従って、DMAAm 濃度が大きいほうがベンジルラジカルから DMAAm へのラジカル移動が起こりやすい上、その後の DMAAm との重合においても DMAAm モノマーのラジカルに対する衝突が容易であるため、生成する高分子の分子量は増加すると考えられる。

3.3-3 開始剤濃度を変化させた場合

開始剤である Poly(DMAPAAm) の濃度を 0.625、1.25、2.5 M に増加させることによって 3 種類の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) を合成した (表 3-4)。開始剤濃度を増加していくと、より分子量の小さい Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) が得られることがわかった (図 11)。これは開始剤濃度が大きいと系内に存在する Poly(DMAPAAm) 由来の DC の数が増加

し、反応開始点が増加するためであると考えられる。

CD.4 4分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) の合成 (Poly(DMAPAAm) Mn : ca. 18000 を用いた場合)

Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 18000) と DMAAm のブロック共重合体は図 7 の合成経路に従って行った。4分岐型 Poly(DMAPAAm) と DMAAm の光ラジカルリ

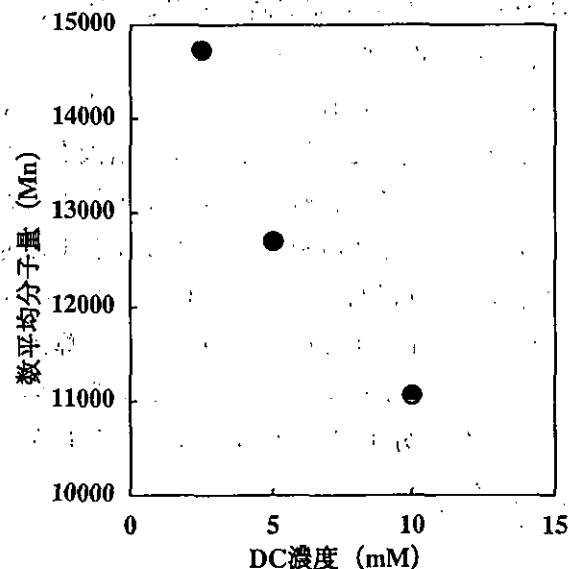


図 11 DC 濃度の変化が 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) の数平均分子量に及ぼす影響

表3-5 紫外光照射時間の変化による4分岐型Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	PDMAAm/PDMAPAAm	Yield (g)	Mn	Conversion (%)
1	0.5	5	5	Methanol	0.34	0.0512	21726	3.5
2	0.5	5	10	Methanol	0.4	0.0812	22420	6.5
3	0.5	5	15	Methanol	0.66	0.0685	25269	8.0
4	0.5	5	20	Methanol	0.82	0.0652	27023	8.8

Monomer : DMAAm, DC : Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 18000) , Light intensity : 1 mW/cm²

表3-6 紫外光照射時間の変化による4分岐型Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	PDMAAm/PDMAPAAm	Yield (g)	Mn	Conversion (%)
1	0.5	5	5	Methanol	0.18	0.277	55678	11.4
2	0.5	5	15	Methanol	0.26	0.267	58023	14.9
3	0.5	5	20	Methanol	0.24	0.290	57502	15.3

Monomer : DMAAm, DC : Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 50000) , Light intensity : 1 mW/cm²

ピング重合の反応条件は、溶媒として Methanol、紫外光照射時間をそれぞれ5、10、15、20分間に設定した。

照射時間の増加にともない分子量も増加することがわかった(図12)。反応溶液をエバポレータにて濃縮し、残渣を再沈殿操作(溶媒: Ether)にて分離精製後、真空乾燥および凍結乾燥を経て目的物を得た。重合比と分子量は¹H-NMR測定(溶媒: D₂O)により算出した(表3-5)。これより、紫外光照射時間の増加にともない分子量も増加することがわかった(図12)。

CD.5 4分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)の合成 (Poly(DMAPAAm) Mn : ca. 50000 を用いた場合)

Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 50000) と DMAAm のブロック共重合体は図5の合成

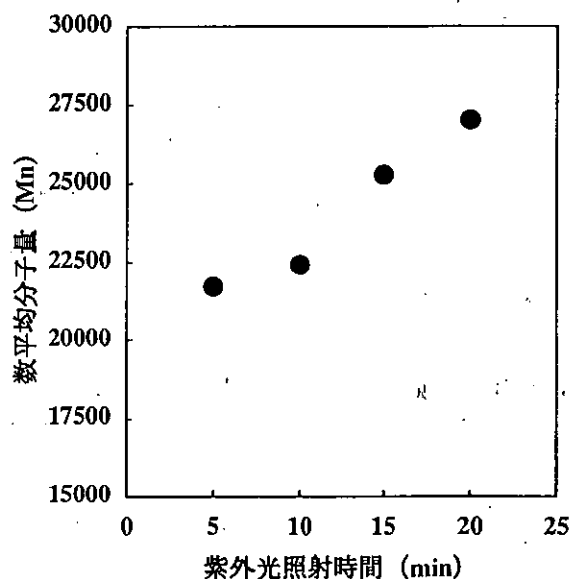


図12 紫外光照射時間が4分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)の数平均分子量に及ぼす影響

表3-7 Monomer濃度の変化による4分岐型Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)合成結果

No.	[Monomer] (M)	[DC] (mM)	Irradiation time (min)	Solvent	PDMAAm/PDMAAAm	Yield (g)	Mn	Conversion (%)
1	0.5	5	10	Methanol	0.18	0.321	55626	13.1
2	1	5	10	Methanol	0.49	0.312	65368	14.8
3	1.5	5	10	Methanol	1.05	0.351	82768	18.7

Monomer : DMAAm, DC : Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 50000) , Light intensity : 1 mW/cm²

経路に従って行った。合成方法はこれまでの操作と同じ方法で行った。反応条件に関しては、紫外光照射時間および Monomer 濃度の影響を検討した。以下にその詳細を述べる。

種類の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)を得た。

CD.5-1 紫外光照射時間を変化させた場合

紫外光照射時間を 5、15、20 分ごとに变化させることによって 3 種類の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)を得た (表 3-6)。この結果から紫外光照射時間を変化しても、生成する Poly(DMAAm)鎖の分子量はほとんど変わらないことがわかった (図13)。

CD.5-2 Monomer 濃度を変化させた場合

Monomer である DMAAm 濃度を 0.5、1.0、2.0 M に調節することによって 3 種類の Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)を得た (表 3-7)。DMAAm 濃度を増加していくことにより、より大きな分子量を有する Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)が得られることがわかった (図 14)。これは、ラジカル発生後は、Monomer 濃度の大きいほうがラジカル種と衝突しやすいためであると考えられる。

これらの結果より、紫外光照射時間および Monomer 濃度を変化させることによって 6...

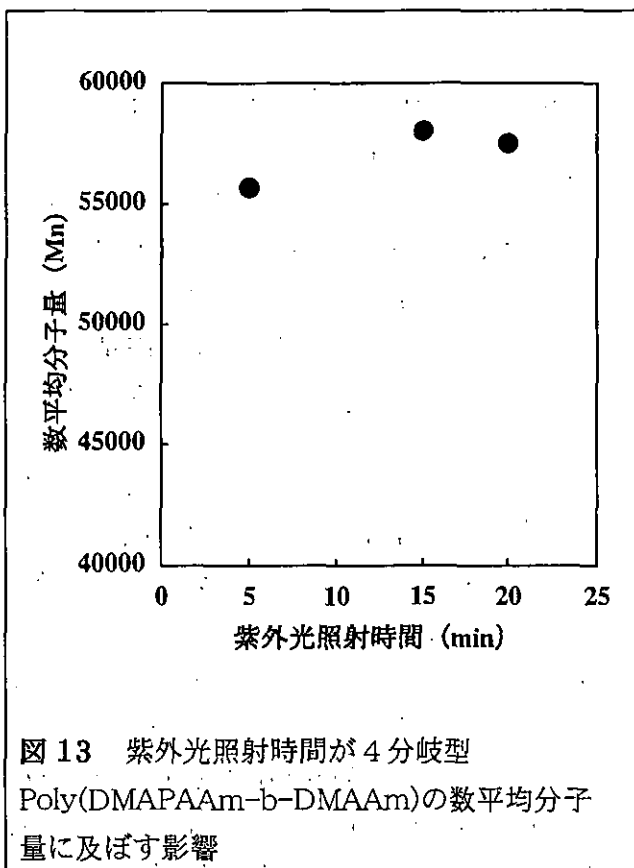


図 13 紫外光照射時間が 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)の数平均分子量に及ぼす影響

CD.6 ポリプレックス形成の評価

Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)は、DNA とポリプレックスを形成している (図 15)。Poly(DMAPAAm)のポリプレックスと比較すると、優れた錯体形成能を有することがわかる。これは非カチオン性部位を外側に有することから Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)は DNA とコンプレックスを作る際、ポリマー間での静電反発が小さいため速やかに錯形成が進行しているのではないかと考えられる。スロット付近に留まっているコンプレックスに EtBr のインターカレーションによる蛍光が見られることから DNA と Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)の相互作用自体は Poly(DMAPAAm)よりも弱いと考えられる。

これに対して、Poly(DMAPAAm) ではコンプレックス形成に時間はかかるが、DNA との相互作用が強いためコンプレックスへの EtBr のインターカレーションが起こらずバンドは消失しないと考えられる (図 15)。

また、ヘパリン存在下における DNA-ポリマー錯体の安定性を見てみると、ヘパリン存在下におけるコンプレックスの安定性は Poly(DMAPAAm)と比較すると少し低いようである。これは非イオン性部位の存在によって Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)内部のカチオンと DNA のアニオンとの静電的相互作用が減少したためであると考えられる (図 16)。

3.7 DNA と Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)とのコンプレックスの粒径測定

ある粒子は溶液中でブラウン運動により、位置や方位、形態を変化させている。そのため、溶液中の粒子で懸濁している系に散乱光を入射するとその散乱強度は、粒子のブラウン運動により時間的に変化する。DLS はこれを利用して粒子の並進拡大係数を求め、

そこから Einstein-Stokes の式 ($d = \sqrt{kt/3\pi\eta_0D}$)、 d : 流体力学的径 (ストークス径)、 k : ボルツマン定数、 T : 絶対温度、 η_0 : 溶媒の粘度) を用いて粒子径を求める。解析法は2種類あり、平均粒径と多分散指数を導き出すキュムラント解析と粒径分布を導き出すヒストグラム解析がある。ヒストグラム解析より求める粒径分布には散乱強度から導き出される分布と個数および重量から導かれる分布がある。個数および重量から導き出される粒径は散乱強度から導かれる分布にそれぞれの係数をかけて求められるため散乱強度より求めた分布の粒径を用いて実験を進めた。

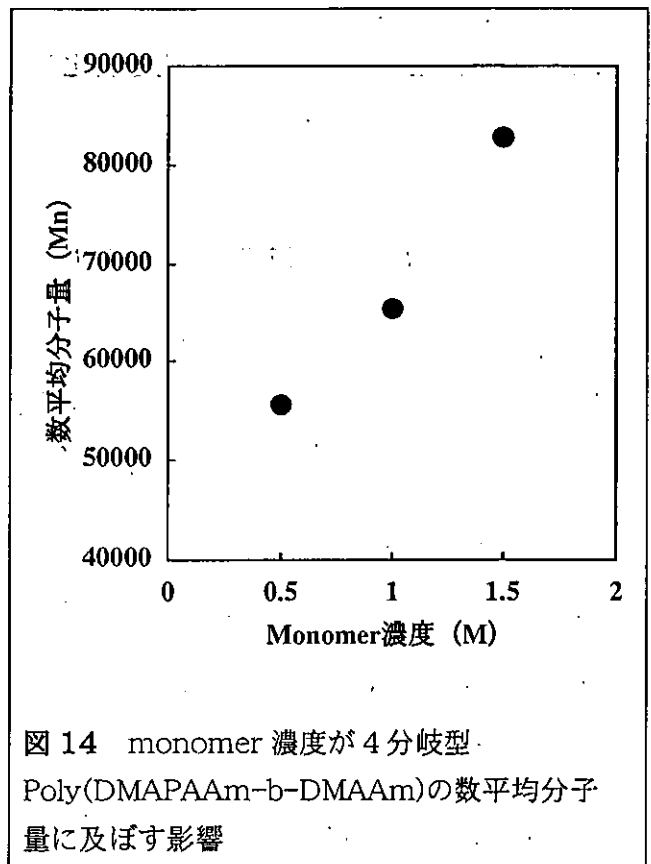


図 14 monomer 濃度が 4 分岐型 Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)の数平均分子量に及ぼす影響

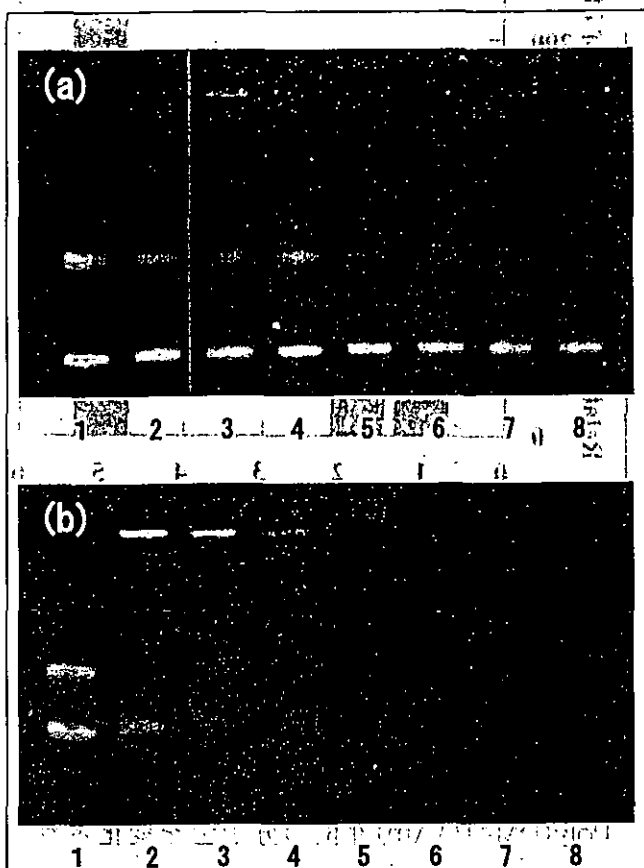


図 15 DNA と Poly(DMAPAAm)ポリプレックス(a)と DNA と Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)ポリプレックス(b)のアガロースゲル電気泳動。Lane 1 は DNA のみ、Lane 2-8 は、それぞれ C/A 比にして 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 4.0 および 5.0 のポリプレックスを含む。

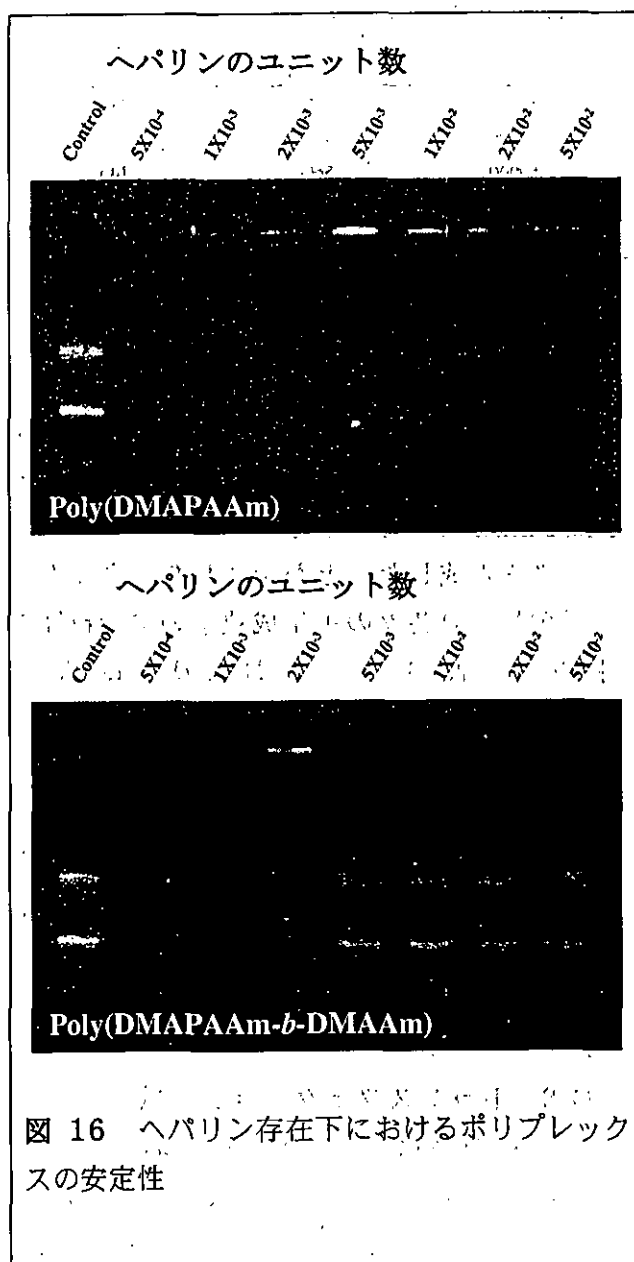


図 16 ヘパリン存在下におけるポリプレックスの安定性

表3-8 DLS測定による平均粒径

Poly(DMAPAAm- <i>b</i> -DMAAm)		平均粒径 (nm)
Poly(DMAPAAm) (Mn ca.)	Poly(DMAAm) (Mn ca.)	
10000	2700	119
10000	4730	110
50000	5600	146
50000	15400	149
50000	32800	171

CD.7-1 コンプレックスの形成

C/A= 40になるように測定溶液を調整し、DLS測定を行った。測定が可能となる光量が検出されたことから、Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)がカチオンとなりDNAとポリプレックスを形成したことが示された。キュムラント解析より各々の主生成粒子の平均粒径を求めた(表3-8)。これより、DNAとPoly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)のコンプレックスの平均粒径は110~170 nmであることがわかった。この値は、一般に報告されている合成ベクターとDNAとのポリプレックスの粒径(100~200 nm)と同程度であり、エンドサイトーシスによって細胞内へと取り込まれることが期待される。

CD.8 トランスフェクション実験

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。

CD.8-1 非イオン性鎖の付与の影響

はじめに、非イオン性部位のPoly(DMAPAAm)への導入は遺伝子発現量にどのような影響をおよぼすのかを調べるため、

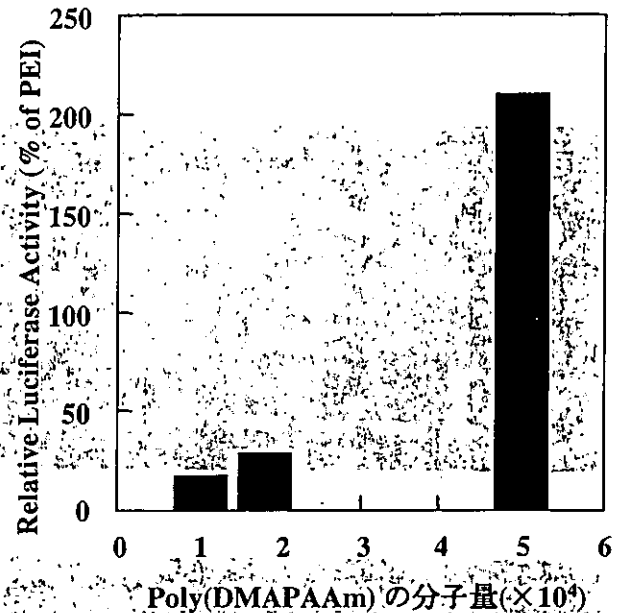


図17 分子量の異なるPoly(DMAPAAm)の活性

Poly(DMAAm)の分子量を一定にし、Poly(DMAPAAm)部位の分子量を変化させてトランスフェクション実験を行うことにした。24 well-plateの1 well当たり、5 μgとなるようにDNA量を調節し、この溶液とC/A=40となるように調整したPoly(DMAPAAm)(Mn: ca. 1.0、1.8、5.0×10⁴)を混合させ、ポリプレックスを形成し、PEIに対する発現量を比較した(図17)。また各々のPoly(DMAPAAm)に5000程度の分子量をもつPoly(DMAAm)を導入した高分子ベクターのPEIに対する発現量を比較した(図18)。その結果、Poly(DMAPAAm)の分子量が小さいものではPoly(DMAPAAm)のみの場合と比較して発現効率は1.6~1.2倍程度、遺伝子発現が活性化された。そこで最もブロック化の効果が大きかったPoly(DMAPAAm)(Mn: ca. 1.0×10⁴)において、どの程度の分子量をも

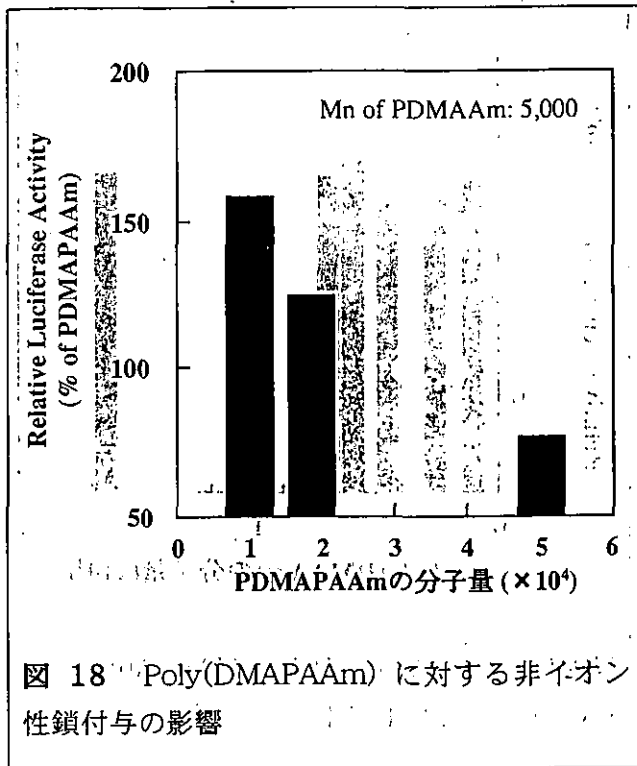


図 18 Poly(DMAPAAm) に対する非イオン性鎖付与の影響

つ Poly(DMAAm)を導入したらよいかを調べるために 7 種類の分子量の異なる Poly(DMAAm)を導入した Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)のトランスフェクション実験を行った。

CD.8-2 非イオン性鎖の分子量の影響

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 1.65×10^4 である Poly(DMAAm)を導入すると Poly(DMAPAAm)の約 3 倍となった(図 19)。最後に、Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)と DNA で形成したポリプレックスの溶液安定性を調べた。

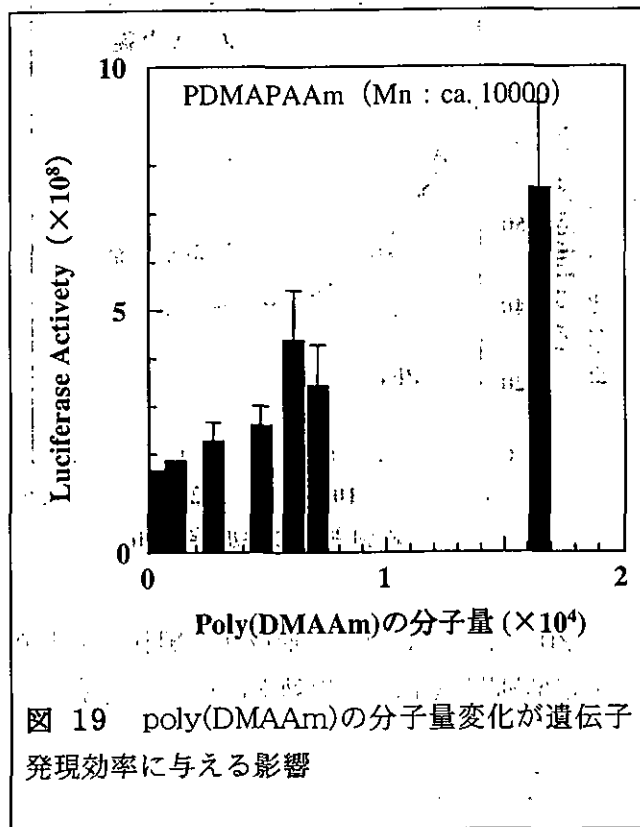
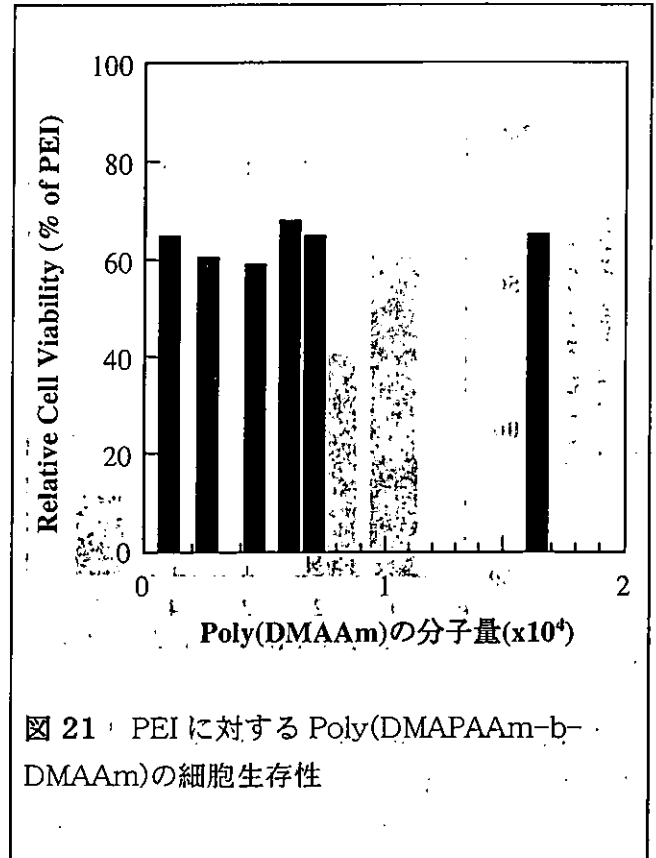
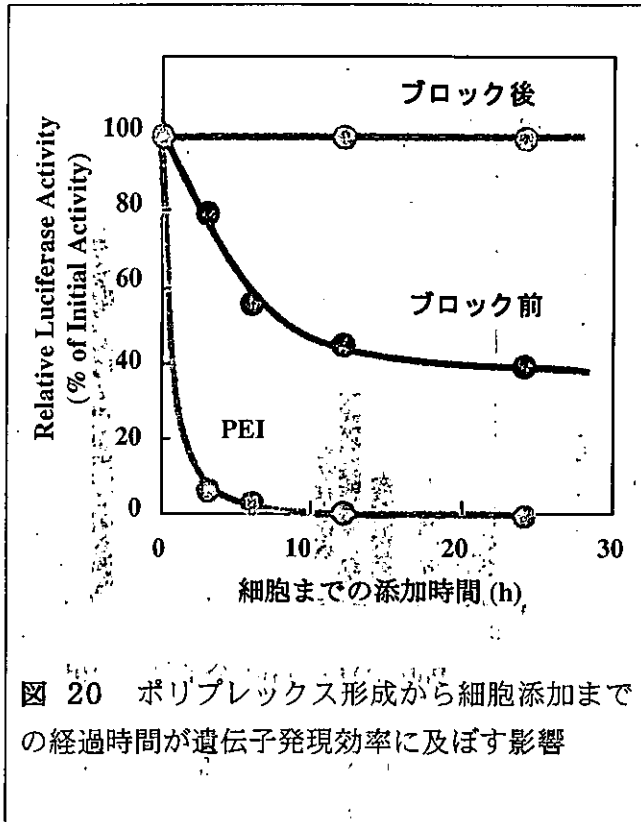


図 19 poly(DMAAm)の分子量変化が遺伝子発現効率に与える影響

CD.8-3 ポリプレックス形成から細胞添加までの経過時間が遺伝子発現効率に及ぼす影響

Poly(DMAPAAm) (Mn : ca. 1.0×10^4)、DMAAm (Mn : 1.65×10^4) を導入した Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm) (カチオン部の分子量 : ca. 1.0×10^4 , ブロック部位の分子量 : 1.65×10^4) 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、数時間で失活してしまうのに対し、核である Poly(DMAPAAm)では安定性は増し、さらに Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)では 24 時間後もほとんど失活せず活性を維持できた(図 20)。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。

CD.9 細胞障害性

細胞障害性はトランスフェクション実験における蛋白量値から算出した。Poly(DMAPAAm-b-DMAAm)は非イオン性である DMAAm を導入していることから表面のカチオン性が減少するため、Poly(DMAPAAm)と比較して細胞障害性が減少することが期待された。しかし、Poly(DMAPAAm-b-DMAAm)の細胞障害性は Poly(DMAAm)の分子量にかかわらず変化は見られなかった。また、Poly(DMAPAAm)、および PEI に関しても大きな差は見られなかった (図 21)。

CD.10 まとめ

光イニフィアトリビングラジカルリビング重合による 4 分岐型カチオン性高分子の合成

Monomer である DMAPAAm 濃度を調節することにより、DMAPAAm の重合度をコントロールしながら比較的分子量分布の小さい (< 2)、4 分岐型カチオン性高分子を合成することがわかった。また、このカチオン性高分子を開始剤として DMAAm によるブロック化反応を行う場合でも、Monomer である DMAAm の濃度を調節することによって制御することができた。

4 分岐型 poly(DMAPAAm-b-DMAAm) と DNA のポリプレックス形成能

Poly(DMAPAAm-b-DMAAm)は DNA と混合直後に安定なポリプレックスを形成し、その粒径は 110~170 nm であった。この値は、

一般的なトランスフェクション用高分子と DNA が形成する錯体の粒径と同じ程度の大きさであった。

4 分岐型ブロック共重合体の細胞障害性および遺伝子発現効率への影響

Poly(DMAPAAm)(Mn : ca. 10000)に非イオン性で親水性である DMAAm を導入した場合、DMAAm の分子量の増加に伴い、遺伝子発現効率も増加した。また、Poly(DMAAm) (Mn : 1.65×10^4) を導入した Poly(DMAPAAm-*b*-DMAAm)と DNA のコンプレックス形成は、24 時間経過後も活性にほとんど変化はなく、Poly(DMAPAAm)、PEI の活性と比較して向上していると言える。細胞障害性は Poly(DMAPAAm)と比較して Poly(DMAAm)の導入分子量に関係なく同程度であった。

E. 結論

分子のナノ骨格設計によって、従来の非ウイルス系ベクターの遺伝子導入効率ならびに安定性を飛躍的に向上させ、実用化レベルに高めることに成功した。

本研究の成果は、既に多数の国内特許を申請し、海外特許を申請準備中である。これらに基づいて企業への技術移転を進行中であり、1、2 年以内に商品化され一般に提供される予定である。

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 compliance changes after implantation. **J Biomed Mater Res** 65A: 170-1781, 2003
9. William G Brodbeck, Gabriela Voskerician, Nicholas P Ziats, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, James M Anderson, In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. **J Biomed Mater Res** 64A: 320-329, 2003
10. Takehisa Matsuda, Junichi Nagase, Akane Ghoda, Yoshiaki Hirano, Satoru Kidoaki, Yasuhide Nakayama, Phosphorylcholine-encapsulated oligomer and block co-oligomer and surface biological reactivity. **Biomaterials** 24: 4517-4527, 2003
11. Cailong Li, Toshinobu Sajiki, Yasuhide Nakayama, Masashi Fukui, Takehisa Matsuda, Novel visible-light-induced

- tissue adhesive composed of multiply strene-derivatized gelatin and poly(ethylene glycol) diacrylate. **J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater** 66B: 439-446, 2003
12. Y Kuboki, M Kikuchi, H Takita, R Yoshimoto, Y Nakayama, T Matsuda, Y Ikada, Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone induction when used as a new carrier. **Connect Tissue Res** 44: 318-325, 2003
 13. Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Keiichi Takamizawa, In vivo tissue-engineered small caliber arterial graft prosthesis consisting of autologous tissue (Biotube). **Cell Transplantation**, in press.
 14. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Geometrical design of luminal surface for microporous covered stents, **Int J Artif Organs**, in press.
 15. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、高機能ステントグラフトによる実験的動脈瘤の閉塞-その有用性と展望-。日本血管内治療学会誌 4: 6-9, 2003
 16. 中山泰秀、ナノバイオエンジニアリングマテリアル、第I編バイオインターフェース、第3章光反応によるバイオマテリアル界面の精密創製。フォロンティア出版 2004年3月
- of novel drug-eluting covered stents with combination of micropores and differential coating of heparin and FK506; **Cardiovascular Radiation Therapy 2003** (Washington DC, Hilton Hotel); 2003年1月27日
2. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Takehisa Matsuda, A heparin loaded stent graft with micropores: Embolization of experimental carotid aneurysms, **Cardiovascular Radiation Therapy 2003** (Washington DC, Hilton Hotel), 2003年1月27日
 3. 中山泰秀、林 美智子、植田初江、バイオチューブ人工血管の開発：ナノ表面化学設計による組織形成制御、第2回再生医療学会（神戸国際会議場）2003年3月11日
 4. 大屋章二、中山泰秀、松田武久、再生医療における3次元人工細胞外マトリックス設計：感温性ゼラチンの分子設計とマトリックス材料としての機能評価、第2回再生医療学会（神戸国際会議場）2003年3月11日
 5. 内藤 洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、中山泰秀、巽 英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、感温硬化性ゼラチンを用いた心筋細胞三次元培養の試み、第2回再生医療学会（神戸国際会議場）2003年3月11日
 6. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、山田 進、北村信夫、ES細胞を導入したハイブリッド型人工血管モデルの開発、第2回再生医療学会（神戸国際会議場）2003年3月11日
 7. Hatsue Ishibashi-Ueda, Yasuhide
- G-2. 学会発表**
1. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, Development

- Nakayama, Shogo Nishi, Histological evaluation of FK506 eluting and polymer covered stents in rabbits, 第67回日本循環器病学会学術集会 (福岡国際会議場) 2003年3月30日
(Circulation Journal, 67 Suppl. I, 353, 2003)
8. Satoshi Yasuda, Shunichi Miyazaki, Yoritaka Ohtsuka, Yasuhide Nakayama, Takehisa Matsuda, Hiroshi Nonogi, Local drug delivery for prevention of post-angioplasty restenosis, 第67回日本循環器病学会学術集会 (福岡国際会議場) 2003年3月28日 (Circulation Journal, 67 Suppl. I, 32, 2003)
 9. Yoritaka Otsuka, Satoshi Yasuda, Norihiko Kotooka, Yasuhide Asami, Hiriyuki Okumura, Yasuhide Nakayama, Hitoshi Nonogi, Local delivery of low-doseONO-4817, a broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor, reduces neointimal hyperplasia coupled with decreased collagen deposition, 第67回日本循環器病学会学術集会 (福岡国際会議場) 2003年3月30日 (Circulation Journal; 67 Suppl. I, 353, 2003)
 10. 大屋章二、木戸秋悟、松田武久、中山泰秀、人工細胞外マトリックス材料の表面ナノ構造・物性解析、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 11. 中山泰秀、林 美智子、植田初江、バイオチューブ人工血管の開発：ナノ表面化学設計は3次元組織構造構築を決定するか、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 12. 根本泰、巽 英介、中山泰秀、水野敏秀、妙中義之、再生医療用スキャホールド材、器質化材料の開発：ハイブリッド型人工臓器、皮下刺入管カフ材への応用、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 13. 林 美智子、高木由美、内田欣吾、斯波真理子、大平望都、中山泰秀、可逆的カチオン発生型水溶性高分子による遺伝子ベクターの機能化：ポリイオンコンプレックス形成に及ぼす分子鎖長と置換基の影響、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 14. 亀尾崇宏、長石 誠、西村 学、平野義明、中山泰秀、エレクトロドナー型親水性高分子の合成と再結合による光ゲル形成、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 15. 長石 誠、斯波真理子、大平望都、平野義明、中山泰秀、多分岐型カチオン性高分子の構造設計と遺伝子ベクターへの応用、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 16. 西村 学、川田 徹、森内隆代、中山敦好、中山泰秀、光硬化性生体絶縁材の開発、第52回高分子学会年次大会 (名古屋国際会議場) 2003年5月28日-30日
 17. 内藤 洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、中山泰秀、巽 英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、組織工学を利用した三次元心筋作成の試み、第19回日本医工学治療学会学術大会 (札幌) 2003年5月16日-18日
 18. 水野敏秀、巽 英介、根本 泰、中山泰

- 秀、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、埋め込み型人工心臓システム使用時における感染防御に有用な新規被覆材の検討、エム・イー学会（札幌コンベンションセンター）2003年6月3日-5日
19. 内藤 洋、武輪能明、水野敏秀、大屋章二、中山泰秀、巽 英介、北村惣一郎、高野久輝、妙中義之、感温硬化性細胞外マトリックスを用いた三次元心筋組織作製、エム・イー学会（札幌コンベンションセンター）2003年6月3日-5日
20. Naito H, Takewa Y, Mizuno T, Ohya S, Nakayama Y, Tatsumi E, Kitamura S, Takano Y, Taenaka Y, Three-dimensional cardiac tissue engineering using a thermoresponsive artificial extracellular matrix, **ASAI0 2003** (Washington DC) 2003年6月19日-23日
21. 中山泰秀、長石 誠、平野義明、大平望都、斯波真理子、遺伝子導入ベクターの幾何学設計：スター型カチオン性高分子の精密分子設計と遺伝子発現、第19回日本DDS学会大会（京都国際会議場）2003年6月19、20日
22. Shogo Nishi, Yasuhide Nakayama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Development of drug-eluting stent graft with micropores (Heparin and FK506), **ESAO2003 XXXth Annual Congress** (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
23. Yasuhide Nakayama, Shogo Nishi, Hatsue Ishibashi-Ueda, geometrical design of luminal surface for microporous covered stents, **ESAO2003 XXXth Annual Congress** (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
24. Michiko Hayashi, Yasuhide Nakayama, Yumi Takagi, Mariko Umeda, Kingo Uchida, Mariko Shiba, Moto Ohira, High performance gene delivery polymeric vector: molecular design of photo-cation generatable water-soluble polymers, **ESAO2003 XXXth Annual Congress** (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
25. Makoto Nagaishi, Yasuhide Nakayama, Mariko Shiba, Moto Ohira, Yoshiaki Hirano, High performance gene delivery polymeric vector: Nano-structured hyperbranched cationic polymers, **ESAO2003 XXXth Annual Congress** (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
26. Naito H, Takewa Y, Mizuno T, Ohya S, Nakayama Y, Tasumi E, Kitamura S, Takano H, Taenaka Y, A thermoresponsive gelatin with hyaluronic acid: in vitro engineering of three-dimensional cardiac tissue, **ESAO 2003 XXXth Annual Congress** (Aachen, Germany)2003年9月3日-6日
27. 安田 聡、宮崎俊一、中山泰秀、野口輝夫、大塚頼隆、松田武久、野々木宏、循環器系領域における治療機器の臨床、現在と将来：進歩する冠動脈インターベンション：より多機能なデバイスの開発、第17回日本エム・イー学会秋季大会、京都2003年10月20-22日
28. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、松田武久、実験的動脈瘤に対する Stent Graft

- の応用-微細孔とヘパリン付与の工夫、第32回日本神経放射線学会、筑波 2003年2月26-28日
29. 西 正吾、中山泰秀、植田初江、森 久恵、湯川弘之、FK506、ヘパリンを付与した Stent graft (DESG)の開発-急性期血栓症と中長期再狭窄予防を目指して、第19回日本脳神経血管内治療学会、2003年11月17-19日
30. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下潤、斉藤裕子、万木貴美、根本泰、北村信夫、実験ツールとしての ES 細胞組み込み型小口径人工血管モデル-生体内 Hemodynamic Stress 下での ES 細胞の動態観察-、第41回日本人工臓器学会大会、仙台 2003年10月30-31日
31. 神田圭一、斉藤祐子、万木貴美、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、北村信夫、未分化 ES 細胞を導入した新しいハイブリッド型超小口径人工血管モデルの開発、第56回日本胸部外科学会総会、東京 2004年11月19-21日
32. 舩田 健、中山泰秀、再狭窄防止を目的とした MMPI ポリマーのステントコーティング剤としての有用性、第25回バイオマテリアル学会、大阪 2003年12月16、17日
33. 亀尾崇宏、大高 敦、西田真美、平野義明、中山泰秀、組織工学用マトリックス材料の設計：再結合を利用した光感受性低侵襲性光ゲル形成、第25回バイオマテリアル学会、大阪 2003年12月16、17日
34. 鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、中山敦好、中山泰秀、神経電極固定剤の開発、光硬化性ポリエステルマクロマーの物性と *in vivo* 評価、第25回バイオマテリアル学会、大阪 2003年12月16、17日
35. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、西田真美、根本 泰、夜久 均、北村信夫、ES 細胞を組み込んだハイブリッド型人工血管モデル、Hemodynamic Stress による分化誘導-第34回日本心臓血管外科学会学術総会、福岡 2004年2月18-20日
36. 神田圭一、中山泰秀、伊藤 裕、山下 潤、根本 泰、西田真美、夜久 均、ES 細胞の生体内 Hemodynamic Stress における動態を観察するためのハイブリッド型人工血管モデルの開発、第3回再生医療学会、幕張メッセ 2004年3月23-25日
37. 内田欣吾、並川 敬、斉藤全亮、林 美智子、中山泰秀、長い共役鎖を持つジアリールエテンの金表面上でのフォトクロミック反応、第84回日本化学会春期年会、関西学院大学 2004年3月26-28日
38. 中山泰秀、血液界面代替デバイスの開発、第8回次世代医療システム産業化フォーラム、大阪 2004年2月13日
39. 中山泰秀、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、ヒューマンサイエンス振興財団講演会、東京 2004年3月5日
40. 中山泰秀、分子ナノアーキテクチャー技術を用いた遺伝子導入ベクターの開発、第3回バイオシグナルの統合と治療応用に関する研究会、大阪 2004年3月19日
- G-3.新聞報道
なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 人工血管、発明者：中山泰秀、林 美智子、高見沢計一、植田初江、出願日：平成15年2月28日、出願番号：特願2003-052512、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
2. ステント、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本泰、出願日：平成15年4月14日、出願番号：特願2003-109168、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
3. ステントの製造方法、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本泰、出願日：平成15年4月14日、出願番号：特願2003-109169、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
4. ステントの製造方法、発明者：中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成15年4月14日、出願番号：特願2003-109167、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
5. ベクター、中山泰秀、長石 誠、斯波真理子、出願日：平成15年4月18日、出願番号：特願2003-114541、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
6. ステントの製造方法及びステント、岡本吉弘、中山泰秀、西 正吾、出願日：平成15年6月16日、出願番号：特願2003-169510、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
7. 核酸複合体及びその製造方法、中山泰秀、大高 敦、根本 泰、出願日：平成15年7月4日、出願番号：特願2003-192140、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
8. ステント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成15年7月24日、出願番号：特願2003-201201、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
9. ステント、中山泰秀、西 正吾、出願日：平成15年7月25日、出願番号：特願2003-201836、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
10. ステント、中山泰秀、西 正吾、根本 泰、出願日：平成15年8月15日、特願番号：2003-286901、国立循環器病センター、(株)ブリヂストン
11. 光硬化性生体吸収材料、中山敦好、中山泰秀、西村 学、鎌田なぎさ、大高 敦、川田 徹、砂川賢二、出願日：平成15年11月7日、特願2003-379012、国立循環器病センター、(独)産業技術総合研究所

高効率遺伝子導入ベクターの開発に関する研究 2 :

架橋ミセル型遺伝子導入ベクターの開発と評価

分担研究者：斯波真理子（国立循環器病センター研究所 室長）

研究要旨

本研究は、安全性が高く、*in vitro* および *in vivo* で発現効率の良いベクターを開発し、臨床応用まで持っていくことを目的とする。新しい遺伝子導入ベクターとして今回は架橋ミセルを用い、*in vitro* および *in vivo* において評価を行った。架橋ミセルは、従来、我々が遺伝子導入ベクターとして遺伝子発現実験を行ってきた、高分子ナノミセルの内核を SS 結合で架橋したものである。架橋することにより、高分子ナノミセルはさらに血中安定性が上昇すること、また、細胞内の還元環境ではベクターが DNA から遊離することが予測された。これらのことから、*in vitro* および *in vivo* での発現効率を上昇するのではないかと考えられ、実験を行った。SS 結合を導入することにより、*in vivo* での血中安定性を上昇することができた。*In vitro* では架橋ミセルにより、HepG2 細胞、Cos-1 細胞、血管内皮細胞、THP-1 細胞への遺伝子導入が可能であった。特に血管内皮細胞および THP-1 細胞では SS 結合の導入により、遺伝子発現の効率の著明な上昇を認めた。また、SS 結合の導入により、頸静脈投与での *in vivo* 遺伝子発現を認めた。

A. 研究目的

遺伝子導入ベクターとしてはアデノウィルスベクター、レトロウィルスベクターが有名であるが、アデノウィルスベクターは治療後の DIC による死亡、レトロウィルスベクターは白血病様症状など、両者ともに深刻な副作用の報告があり、安全な方法であるとは言えない。一方、ポリマーベクターは、安全性に問題のないものも多いが、表面電荷の大きいものは *in vivo* で凝集塊

をつくってしまう。表面電荷が小さいものは水溶性が低く、沈澱を生成してしまうという問題があった。また、ポリマーベクターは、*in vivo* での遺伝子導入・発現効率に問題を有する。我々は、東京大学の片岡らとの共同研究で、これらの問題点を克服するベクターの開発を行っている。これまでに、ポリエチレングリコールとポリ L リジンの共重合体を用いた DNA 複合体である高分子ナノミセルが血中で安定であること、

in vitro および in vivo での遺伝子発現が可能であることを既に報告した。本研究では、さらに高分子ナノミセルの遺伝子発現効率を上昇させるため、SS 結合で PIC ミセルの内核を架橋したベクターを用いた。ミセルの内核を SS 結合で架橋することにより、さらに血中安定性を上昇させること、また、細胞内の還元環境ではベクターが DNA から遊離すると考えられ、in vivo での発現効率を上昇するのではないかと考えられ、ターンオーバースタディ、in vitro および in vivo における遺伝子発現実験を行い、遺伝子導入ベクターとしての評価を行った。

B. 研究方法

B-1. 血中安定性試験

内核を SS 結合で 0%、4.6%、12.7%、28.2% 架橋し、pGL3-Cont を含んだ架橋ミセルを用意し、マウス尾静脈よりそれぞれの割合の SS 結合を内核を持った架橋ミセルを投与した。投与後 30 分の血液を採取し、凍結保存した。血液より DNA を抽出後、電気泳動を行い、サザンブロッティングを行った。ルシフェラーゼ遺伝子をプローブとしてハイブリダイゼーションを行い、血中に残存するルシフェラーゼ遺伝子量および長さから、血中安定性を測定した。

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 SS 結合を持った架橋ミセルを加え、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。

(倫理面への配慮)

研究上で倫理面に配慮すべき研究内容が生じた場合には、必要に応じて各所属施設内での倫理委員会において承諾を受けた上で実施を行う。

全ての動物実験は国際標準規格 Principles of Laboratory Animal Care (National society for Medical Research) と Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (National Institutes of Health Publication No. 86-23) に従って行い、動物愛護に配慮する。飼育は各施設付属の動物管理施設にて一括管理される。

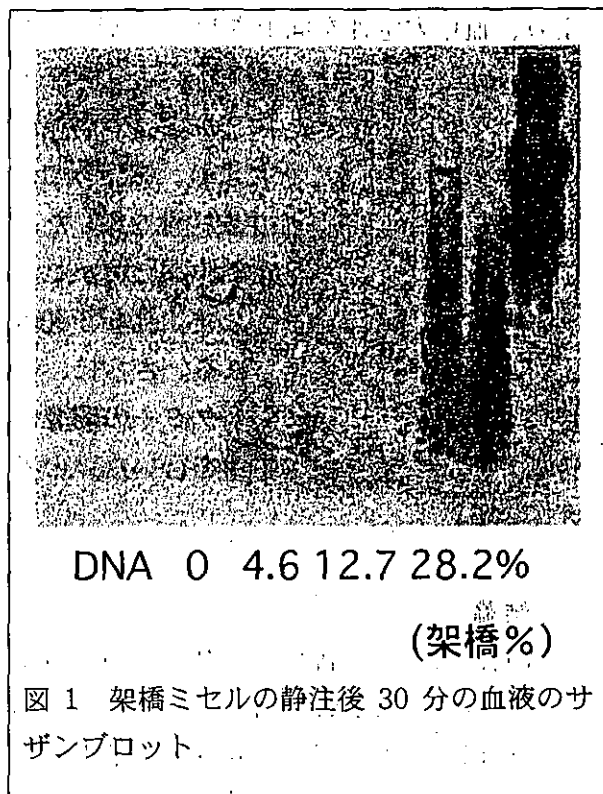


図 1 架橋ミセルの静注後 30 分の血液のサザンブロット

C. 研究結果

C-1. 血中安定性試験

架橋ミセルをマウス尾静脈から投与、30分後に血液を回収し、DNA を抽出、サザンブロッティングを行うと図 1 のようになった。

SS 結合を 12.7%および 28.2%導入した架橋ミセルは、30 分後に血中にインタクトな分子量の DNA を認めた。SS 結合がそれ以下のもの(4.6%)は、30 分後の血液中に DNA が分解した産物を認めた。また、SS 結合を導入しない PIC ミセルは、投与 30 分後の血液中に DNA の存在を認めなかった。ミセルの内核に SS 結合を 12.7%~28.2%導入することにより、血中での安定性を増加させることが示された。

C-2. 遺伝子発現実験 (in vitro)

in vitro での遺伝子導入ベクターとして

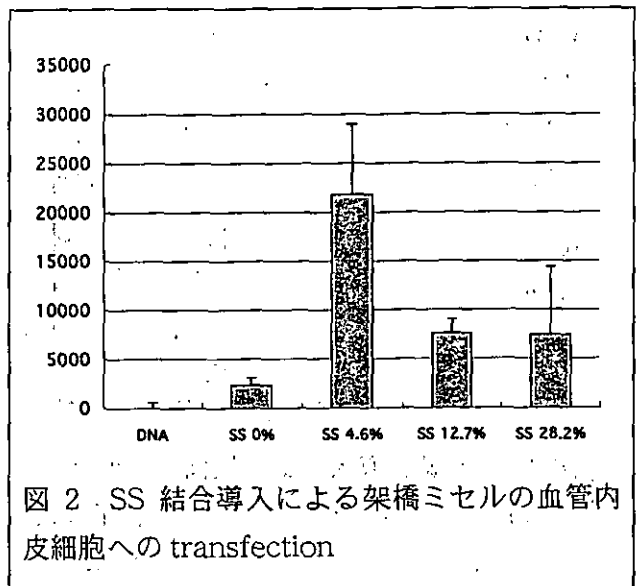


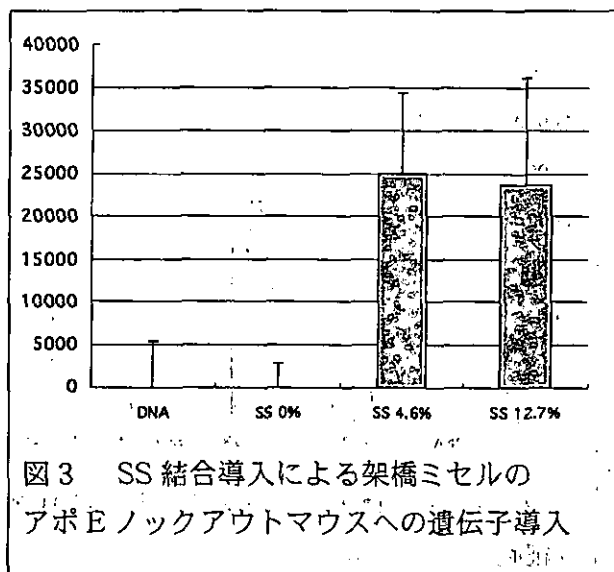
図 2 SS 結合導入による架橋ミセルの血管内皮細胞への transfection

の発現効率を評価するため、血管系の細胞を中心に

細胞株を用いて、in vitro 遺伝子導入、発現実験を行った。HepG2 細胞、Cos-1 細胞への遺伝子導入は、SS 結合の有無とは関係がなく高い値が得られた。一方、血管内皮細胞 (図 2)、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 (図 3) では、SS 結合のないナノミセルでは遺伝子発現は非常に低値であり、SS 結合導入により、遺伝子発現が誘発され、高値となった。以上より、SS 結合を内核に導入することにより、in vitro での遺伝子発現を増加させた。

C-3. in vivo 遺伝子導入実験

アポ E ノックアウトマウスは、血中総コレステロール値が 500~600mg/dl であり、早期の動脈硬化を呈する動物モデルである。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した。投与 24 時間後、各臓器をホモゲナイズし、ルシフェラーゼ活性を測定したところ、28.2%の SS 結合を導入した架橋ミセルでのみ、肝臓でのみ有意な遺伝子発現を認めた。



D. 考察

近年、ウィルスベクターによる遺伝子治療の安全性に疑問が深まる中、ウィルスベクターに代わるベクターとして、カチオン性ポリマーやリポソームに関心が寄せられるようになってきた。しかしながら、これらの合成ベクターとDNAとのポリプレックスは、溶解性、安定性、粒子径、表面電位のコントロールなど解決すべき問題点が多く、ウィルスベクターと同様の機能を持つには至っていない。

我々は、ポリマーベクターの安全性を保ちながら、in vivoでの遺伝子導入を可能とするベクターの開発を行っている。我々がベクターとして用いているのは、ポリカチオンとポリエチレングリコールのブロック共重合体であり、これはこれまでのホモポリマーと違い、ポリカチオンを内核、ポリエチレングリコールを外殻としたナノ粒子を形成し、溶解性、安定性にすぐれている。この高分子ナノミセルの長所を失わずに、さらに血中安定性、遺伝子発現効率の改善を試みた。ポリイオンコンプレックスミセルの内核にSS結合を導入することに

より、血中安定性を向上させ、in vitroおよびin vivoにおいて遺伝子発現効率を上昇させることができた。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。また、細胞内では、還元条件下におかれるため、DNAが遊離することも、遺伝子発現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。

E. 結論

本研究において、新しいベクターが、血中安定性が高く、in vitroおよびin vivoにおける遺伝子発現効率も上昇させることができ、臨床応用に一步近付いたと考えられる。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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*. in press
2. Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S.