

200400049A

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

循環器系疾患治療のための  
次世代遺伝子導入ベクターの創製

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田畑 泰彦

平成 17(2005)年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

循環器系疾患治療のための  
次世代遺伝子導入ベクターの創製

平成 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 田畑 泰彦

平成 17(2005)年 3月

## 目次

I. 総括研究報告	
循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製.....	1
田畑 泰彦	
II. 分担研究報告	
1. 次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価 .....	13
田畑 泰彦	
2. 高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発.....	17
岸田 晶夫	
3. ヒト組み替え DNA 生分解性物質の開発.....	21
浅原 孝之	
4. 細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用 .....	23
盛 英三	
5. 遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発 .....	25
永谷 憲歳	
6. 遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用.....	27
清水 達也	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表.....	29
IV. 研究成果の刊行物・別刷.....	32

循環器系疾患治療のための次世代遺伝子導入ベクターの創製

主任研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

プラスミド DNA を徐放するための生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる次世代の遺伝子キャリアシステムを作製し、それらのキャリアシステムのキャラクタリゼーションとそれらとプラスミド DNA とのコンプレックス形成、ならびに遺伝子発現特性を評価した。ゼラチンのカルボキシル基にエチレンジアミンを導入することによりカチオン化ゼラチンを得た。次に、得られたカチオン化ゼラチンにポリエチレングリコール (PEG) を結合させ、PEG 導入カチオン化ゼラチンを作製した。これらの試料は水溶液中で臨界ミセル濃度を示し、分子サイズ数百ナノメートルの高分子ミセルを形成した。このミセル形成能は、PEG の分子量および PEG 修飾率に依存していた。PEG 修飾カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA とを水溶液中で混合したところ、両者のポリオンコンプレックスからなる微細化粒子が得られた。これらのプラスミド DNA 微細化粒子をマウス皮下に投与した。その結果、遊離のプラスミド DNA に比較して、高い遺伝子発現レベルが認められた。また、超高压処理による遺伝子-高分子複合体の調製と機能評価およびそれらの担体としての無機ナノ粒子の調製と複合化についての検討を行った。一方、血管内皮前駆細胞 (EPC) への遺伝子導入によるハイブリッド細胞-遺伝子治療について以下の検討を行った。次世代遺伝子ベクターを用いて、EPC へ血管内皮増殖因子 (VEGF) の遺伝子を導入した。遺伝子導入された EPC は VEGF を分泌し、自己増殖能が促進された。また、兔下肢虚血モデルで adrenomedulin 遺伝子と次世代遺伝子ベクターとの複合体の血管再生治療効果を確認した。さらに、国立循環器病センターに設置した病院設置型微小血管造影装置の臨床応用を開始した。本装置の安全性と有用性に関して、下肢循環障害患者において血管再生治療前後の 2 度にわたる造影を実施し、検討を行った。最後に、細胞移植方法として、単離細胞移植と細胞シート移植とを比較したところ、細胞シートの移植では単離細胞の移植に見られる細胞塊の形成による内部壊死を回避でき、細胞の損失なく効率よく移植できることがわかった。基本的な細胞シートの作製ならびに積層化法を確立し皮下組織において細胞シート移植が単離細胞移植より効率的に細胞をデリバリー可能であることを示した。昨年までの結果を基にして、今年度は次世代遺伝子ベクターを用いて遺伝子導入可能な細胞である EPC を細胞シートとともに心筋梗塞モデルに移植しその有効性を解析した。その結果、EPC が細胞シートとともに効率的に生着するとともに梗塞部の血管網の再生に寄与し心機能を改善することが示された。

分担研究者

岸田晶夫 東京医科歯科大学

生体材料工学研究所 教授

浅原孝之 東海大学医学部生理科学 教授

盛 英三 国立循環器病センター研究所

心臓生理部 部長

永谷憲歳 国立循環器病センター研究所

再生医療部 部長

清水達也 東京女子医科大学

先端生命医科学研究所 講師

A. 研究目的

本研究の目的は、虚血性心筋症（心筋梗塞、心筋症）や慢性閉塞性動脈硬化症などの血管狭窄病

変に対する遺伝子細胞療法のための両親媒性遺伝子ベクターを開発し、これを用いて①血管内投与による高効率な Gene Therapy さらに②血管成長因子等の遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を開発することである。また機能強化した細胞をシート化して移植組織の機能向上を実現する。これまでに遺伝子の発現効率が高まる徐放化キャリアの作製に成功しているが、これをさらに高機能化するために、遺伝子の徐放が可能でかつ凝集のない微細化遺伝子キャリアを生体吸収性ゼラチン、ヒト遺伝子組み換え型ゼラチンあるいは合成高分子であるポリビニルアルコールから作製する。これらを用いることで遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができ、遺伝子導入血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を実現できる。本研究が実現されることで、安全性が高く、かつ、導入効率が高い理想的な遺伝子導入ベクターが得られ、遺伝子治療の普及を加速する。また、治療機能を有する細胞内に遺伝子を導入することで細胞治療と遺伝子治療の要素を併せもった新しいハイブリッド治療法が提唱できる。また、この遺伝子導入システムは温度応答性基材を用いて作製した細胞シートの機能強化にも利用でき、その組織移植医療への応用を拡大する。

## B. 研究方法

各分担研究者の研究方法の概略について以下にまとめる。詳しくは、分担研究報告書を参照していただきたい。

### 次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。反応時におけるエチレンジアミン、水溶性カルボジイミドの濃度を変化させて、アミノ基導入率の異なるカチオン化ゼラチンを作製した。アミノ基導入率はト

リニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法によりゼラチンの1級アミンを定量することにより行った。また、得られたカチオン化ゼラチンの electrophoretic light scattering (ELS) 測定によりゼラチンのカチオン化度を調べた。

得られたカチオン化ゼラチンのリン酸緩衝溶液 (pH8.5) 中に、片末端メトキシ、片末端活性化エステルをもつポリエチレングリコール (PEG、重量平均分子量：3,000、5,000、および 12,000 日本油脂 (株) から供与) を加え、所定時間、反応させた。PEG 仕込み量を変化させることにより、異なる PEG 導入率をもつカチオン化ゼラチンを得た。PEG 導入率は TNBS 法によるアミノ基の減少から算出した。得られた PEG 導入カチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) の水溶液中における臨界ミセル濃度 (CMC) は、定法である蛍光試薬の強度変化から定量した。また、ELS 測定と dynamic light scattering (DLS) 測定により PEG-ゼラチンの電荷と分子サイズを評価した。PEG の分子量およびその導入率の異なる様々な PEG-ゼラチンと CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA とを水溶液中で混合した。両者のポリイオンコンプレックス形成については、DLS 測定による混合前後のプラスミド DNA の分子サイズ変化、および混合前後のプラスミド DNA の陰イオン交換樹脂への吸着挙動を調べることで評価した。さらに、遺伝子発現レベルを *in vivo* において評価した。すなわち、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックス、コントロールとして遊離プラスミド DNA をそれぞれマウス大腿筋肉内に投与した。経時的に筋肉を採取、そのプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。それぞれの動物実験はサンプル数 5~6 で行い、ANOVA 法による有意差検定を行った。

高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発に関する研究

重合度、けん化度の違う数種類の PVA を用い

た。PVA に所定量の超純水を加え、オートクレーブにより完全に融解させた。DNA+PVA 複合体形成の観察のためには、DNA+PVA 溶液の最終の濃度が 1%, 0.1%, 0.02%, 0.01%, 0.005%, 0.002%, 0.001%, 0.0005%, 0.0002%, 0.0001%, 0.00002w/v% になるように 12 種類の PVA 水溶液を調整した。DNA は pEGFP-C1 プラスミドベクター (4.7kbp) を用いた。PVA 水溶液に DNA 水溶液を添加後、密封し、40°C において 10000atm で 10 分間処理した。

得られた DNA/PVA 複合体の特性解析として、CD 測定、AFM 測定、UV を用いた融点測定、DNA 分解酵素に対する耐性試験、および無細胞タンパク質合成系を用いた発現評価測定を行った。

#### ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

成人末梢血より血管内皮前駆細胞 (EPC) を単離した。すなわち、末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、EPC 用培地を用いて単核球中 EPC を *ex vivo* にて 7 日間、分化・増幅培養した。次に、上記培養 EPC にカチオン化ゼラチンを用いて GFP 及び VEGF plasmid 遺伝子を導入した。遺伝子導入された EPC の増殖能は MTS assay kit により、また、遊走能を modified Boyden chamber により検討した。

上記 *ex vivo* にて培養した VEGF 遺伝子導入 EPC を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、Laser Doppler Analysis により 4 週後に評価、また重傷下肢虚血ラットモデルを用いてアセチルコリンに対する血管反応性を放射光血管造影 (Spring8) にて検討した。

#### 細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

兎の下肢動脈を結紮して下肢虚血モデルを作製した。10 日目に以下の治療を行い、それらの血管再生効果を比較した。

①カチオン化ゼラチン-adrenomedulin 遺伝子複合体治療群

②カチオン化ゼラチン単独投与群。

③カチオン化ゼラチン-LacZ 遺伝子複合体投与群。

また、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製した。吸収線量および散乱線の測定に基づいて安全性を確認した後、3 例の臨床例への応用を実施した

#### 遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ゼラチン-IGF-1 複合体による心筋細胞への抗アポトーシス作用及び心機能改善効果をラット急性心筋梗塞モデルで検討した。

#### 遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

シート状の細胞の回収には当研究所で開発された温度応答性培養皿を用いた。この培養基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°C では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32°C 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、温度効果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。この培養皿上でラットの腹部皮下組織より採取した線維芽細胞と GFP 遺伝子を発現したラットの末梢血より採取した EPC を用いて共培養シートを作製した。温度降下処理 (20°C) により脱着した細胞シート 3 枚を積層化し、心筋梗塞作成 1 週後のヌードラットの梗塞部位上に移植した。比較対照として同数の EPC を心筋内へ局所注入した群及び移植を行わなかった群を作製した。移植後 1 週間毎に心エコーで経時的に心機能を評価し移植 4 週間後に組織像を観察した。

#### C. 研究成果

各分担研究者の研究成果の概略について以下

にまとめる。詳しくは、分担研究報告書を参照していただきたい。

#### 次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

エチレンジアミンと水溶性カルボジイミド濃度の増加にともないアミノ基導入率の高いカチオン化ゼラチンを作製することができた。また、ELS 測定により、カチオン化ゼラチンが正電荷をもっていることを確かめた。カチオン化ゼラチンへの PEG 導入反応においては、用いる PEG の分子量にかかわらず、いずれの PEG においても、ゼラチンに対する PEG の添加量の増加とともに PEG 導入率は増加した。PEG-ゼラチンは、それ自身が水溶液中で CMC をもっていた。その CMC の値は、PEG の分子量とその導入率とに依存していた。PEG 分子量および導入率の増加とともに CMC 値は低下し、より安定な高分子ミセルを形成していることがわかった。そのミセルの分子サイズは数百ナノメートルであり、表面電荷は数 mV であった。次に、得られた PEG-ゼラチンと混合することによりプラスミド DNA の負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。また、DLS 測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、カチオン化ゼラチンとの混合によってプラスミド DNA の分子サイズが小さくなることがわかった。PEG-ゼラチンとの混合の前後におけるプラスミド DNA の電気泳動測定の結果も考慮して、プラスミド DNA が PEG-ゼラチンとポリオンコンプレックスを形成し、微細化粒子ができていることを確認した。コンプレックス形成は、PEG-ゼラチンの PEG の分子量および PEG の導入率に大きく影響された。PEG の分子量とその導入率の増加とともにコンプレックス形成は抑制された。この結果は、ゼラチンに導入された PEG 分子の立体障害により、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA との相互作用が抑制されたことを示している。PEG の導入されていないカチオン化ゼラチンおよび PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックスを陰イオン交換樹脂カラムにアプライしたところ、前者はカラム

内に吸着、溶出されなかったのに対して、後者は吸着されず、溶出された。このことは、後者のコンプレックス表面に PEG 鎖が存在し、陰イオン交換樹脂との相互作用を弱めた結果であると考えられた。以上の結果より、PEG-ゼラチンをプラスミド DNA と混合することによって、内部コアにプラスミド DNA が包含され、表面に PEG 鎖をもつ微細粒子の形成されていることがわかった。また、この微細粒子の形成には、PEG 分子量とその導入率のコントロールとが重要であった。

プラスミド DNA 単独あるいは PEG-ゼラチンとのコンプレックスをマウス筋肉内に注射した後の注射部位における遺伝子発現を調べた。その結果、注射 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、PEG-ゼラチン-プラスミド DNA コンプレックスの場合には、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間においても、数日、延長した。

#### 高分子-遺伝子複合体の新プロセス開発に関する研究

PVA-プラスミド DNA 混合溶液を超高压処理した後に電気泳動を行い、複合体形成を検討した。重合度 1500 以上の PVA で、再現性の良い複合体の形成バンドが観察された。DNA の構造を評価するために CD 測定を行ったところ、DNA 単独では超高压処理されると変性するが、PVA を混合して超高压処理することによって、DNA の構造が安定化されることがわかった。このことは、PVA が DNA/PVA 複合体を形成し、DNA の構造安定性に寄与していることを示している。さらに、DNA/PVA 複合体の AFM 観察を行ったところ、DNA は PVA が絡み合った繊維状の構造をもち、その直径は DNA 単独と比較して約 1.5 倍であることがわかった。

DNA が安定化されているかどうかを調べるために、複合体の熱力学的特性評価として UV を用いた DNA の融点測定を行った。DNA 単独では 56°C 付近に融点が存在する

がこれに PVA を混合しただけでは融点は変化しなかった。しかしながら、超高压処理による DNA/PVA 複合体では、40℃ 付近から徐々に融解曲線が変化し、53℃ に融点を示した。このことは、DNA/PVA 複合体が DNA 単体よりも低い融点を示すことから、低温側で徐々に PVA が DNA から解離し、ほどけた PVA が DNA の融解を促進したことを示唆している。一方、DNA/PVA 複合体の DNA 分解酵素に対する抵抗性を調べたところ、超高压処理によって得られた複合体は優れた耐性を示し、この方法が遺伝子デリバリー法として優れていることが示された。

これまでの検討により、DNA/PVA 複合体は安定であり、遺伝子デリバリー用ベクターとしての優れた特性を有することが明らかになった。しかしながら、昨年度報告したように、細胞内取込は高いものの、発現効率は低い結果が得られている。この原因を推察するために、無細胞蛋白質合成系による検討を行った。その結果、DNA/PVA 複合体は DNA 単体と比較して蛋白質合成量が低下していた。このことは、細胞内での遺伝子発現が低い原因として、DNA/PVA 複合体が安定すぎて解離ができないためであることを示唆している。一方、血清存在下では 20 時間後では蛋白質合成量は低下しているが、DNA/PVA 複合体ではほとんど低下が認められなかった。以上より、超高压処理によって得られる DNA/PVA 複合体は血清中でも安定であり、発現量は低いものの長時間の発現が期待できることが明らかとなった。

#### ヒト組み換え DNA 生分解性物質の開発

GFP 遺伝子導入 EPC の導入効率は、他のウイルス性ベクターと比し、同等以上導入効率であった。また、VEGF 遺伝子導入 EPC の増殖能・遊走能は非遺伝子導入及び GFP 遺伝子導入 EPC に

比し有意に上昇していた。in vivo 実験にて Laser Doppler Analysis では VEGF 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。また、放射光血管造影において、アセチルコリン反応性の血管新生が認められた。

#### 細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

カチオン化ゼラチン-adrenomedulin 遺伝子複合体を食食させた下肢虚血兔では、同遺伝子単独治療群、カチオン化ゼラチン単独治療群よりも有意に下肢血管密度と下肢血流を増加させ、虚血性組織変化を軽減させた。一方、解像度の検討では、チャートにおいて、一般の血管造影では 250  $\mu\text{m}$  が限界であったが、病院設置型微小血管造影装置では、50  $\mu\text{m}$  まで観察できた。臨床応用では、3 例の重症末梢動脈閉塞症に施行し、同日に実施された既存の血管造影法との比較を行った。いずれの例でも既存の血管造影法よりも微細な血管床の観察ができることが確認された。そのうちの 1 例では血管再生治療後に再生したと推測される、新たな血管床の観察が確認された。

#### 遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

ラットの心筋梗塞作製直後にゼラチン-IGF-1 複合体を心筋内に直接注入した。術後 4 週間目に心エコー、心臓カテーテル及び組織学的解析を施行したところ、ゼラチン-IGF-1 複合体投与群は対照群に比較して有為に心拡大及び左室拡張末期圧の増大を抑制し、左室駆出率及び LVdP/dt を増大させた。また、梗塞率を著明に減少させ、ラットの生存率を改善した。また、虚血により誘導される心筋細胞のアポトーシスを抑制した。

#### 遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

心エコー上 EPC-線維芽細胞共培養シート移植群では心機能（左室短縮率）の有意な改善が認められた。EPC 単独注入群に関しても心機能の改善傾向は認められたが、改善度は共培養シート移植群の方が大きかった。組織像では共培養シート移



植群およびEPC単独注入群では移植を行わなかった群と比較し、梗塞部位における血管数が有意に増加していた。また血管増生部位に関してはEPC単独注入群で部分的に局在しているのに対し、共培養シート移植群では一様であった。さらにGFP抗体および血管内皮特異的 isolectin B4 の同時蛍光染色を行ったところ共培養シート移植群において再生した組織内血管網に共染色される血管内皮細胞が多数認められた。

#### D. 考察

薬物の徐放化研究の歴史は古く、これまでに多くの報告がされている。しかしながら、その中でもプラスミドDNAの徐放化の試みは少ない。これらの報告では、生体吸収性高分子キャリア内にプラスミドDNAを包含させ、プラスミドDNAのキャリア内での単純拡散によりその徐放をコントロールしている。本研究では、これとは異なった徐放メカニズムを提唱している。すなわち、プラスミドDNAを徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンとポリイオンコンプレックスを形成させ、徐放キャリア内に固定化、保持している。この状態ではプラスミドDNAは徐放されず、ハイドロゲルが分解され、カチオン化ゼラチン分子が水可溶化して初めて、固定化プラスミドDNAはハイドロゲルから放出される。このシステムでは、徐放化キャリア自身の分解によりDNAの徐放パターンをコントロールすることができる。この徐放メカニズムでは、拡散により徐放を制御している従来法とは違い、キャリアのサイズ、体積あたりのキャリアの表面積などが変化しても、プラスミドDNAの徐放パターンを自由に定めることができる。また、プラスミドDNAは水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリイオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。そのため、プラスミドDNAの負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミドDNAのみの徐放と比較して、プラスミドDNAの遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックス

を形成しているため、プラスミドDNAのDNaseによる酵素分解に対する抵抗性も向上する。プラスミドDNAの徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、私たちの徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り、徐放キャリアの分解にともなうプラスミドDNAの徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらし、本徐放化システムがin vivoにおける遺伝子発現の有力なツールであることがわかった。本研究では、すでに、注射可能なサイズ(10~150 $\mu$ m 直径)カチオン化ゼラチンハイドロゲル粒子の作製とそれらによるプラスミドDNAの遺伝子発現の増強も確認している。これらのハイドロゲル粒子においても、期待通りプラスミドDNAの発現増強のための徐放化システムの作製が可能であることを実験的に確認している。本年度は、プラスミドDNAとポリイオンコンプレックスを形成させるためのカチオン化ゼラチンからなる高分子ミセルをデザイン、作製した。つまり、カチオン化ゼラチンにPEGを化学的に導入し、高分子界面活性剤を調製した。PEG導入カチオン化ゼラチン(PEG-ゼラチン)は、それ自身がCMCを示し、界面活性であった。プラスミドDNAとの混合によって、プラスミドDNAを内部に包含、外部にPEG分子をもつ数百ナノメートルサイズの微細化粒子の形成が確認された。この微細化粒子をマウスに投与したところ、遊離プラスミドDNA水溶液に比べて、より高い遺伝子発現レベルと発現期間の若干の延長が認められた。今後、カチオン化ゼラチンとプラスミドDNAとからなる微細化次世代遺伝子発現システムについて、より詳しく調べ、ゼラチンの分解にともなうプラスミドDNAの徐放化のコントロールをより確実にすることが必要である。

超高压状態では、物質間の相互作用の内、水素結合成分が強調されることが報告されている。PVA自身は水素結合性を側鎖に有しており、その濃厚溶液は短時間の処理でハイドロゲルを形成する。これまでの検討により、PVAハイドロゲル

の生成メカニズムは、まず分子内での水素結合形成による分子の局所的凝縮と粒子形成、それに引き続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。超高压処理によって得られる DNA/PVA 複合体は血清中でも安定であり、DNA 分解酵素に対する耐性を有していることがわかった。一方、長時間の発現が期待できるものの、遺伝子発現量は低いことがわかった。

カチオン化ゼラチンを用いた VEGF 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、カチオン化ゼラチンは臨床応用を考える上で重要と考えられた。

カチオン化ゼラチン-遺伝子複合体による遺伝子導入法は安全かつ導入効率が高く、カチオン化ゼラチン-adrenomedulin 遺伝子複合体の治療により、下肢循環障害モデルで血管床の再生が誘導されることが確認された。これは生体が本来有する血管系前駆細胞などによる血管発生（新生）作用を adrenomedulin 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、adrenomedulin 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。さらに、微小血管造影装置は臨床例の再生血管の評価に資することが確認された。

心筋内へのゼラチン-IGF-1 複合体直接投与は安全で、心筋梗塞後の左室リモデリングの抑制及び収縮力の改善に有効であった。これは半減期の短い IGF-1 がゼラチンの格子構造の中に封入・保護され、組織内でゼラチンが徐々に分解されるのに従って局所に IGF-1 が放出された為、組織内濃度が長期間にわたって維持されたためと考えられた。

共培養シート移植群のほうが EPC 単独注入群

より心機能改善効果が大きいという結果は EPC をシート状の組織として移植することの有用性を示す。これは細胞シートとして移植することにより細胞の損失を減じたことによる効果と考えられる。実際 GFP 抗体および血管内皮特異的 isolectin B4 の同時蛍光染色で示されたように細胞シートとして移植された EPC は梗塞部上で一様な血管網の再生に寄与することで心機能の改善を促進したと推察される。本研究の結果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システムの有用性を裏付けるものである。今後、遺伝子導入した EPC を用いた細胞シート移植により、より有効な治療法の開発も可能になると考えられる。

## E. 結論

生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる徐放キャリアとしてハイドロゲルを作製した。この徐放システムは、ハイドロゲルの分解にともなってプラスミド DNA が徐放化し、その発現レベルの増強、徐放化による遺伝子発現期間の延長が可能となった。アドレノメデュリン遺伝子をゼラチンハイドロゲルから徐放することによって、遺伝子の水溶液投与と比較して、虚血動物モデルでの有効な血管新生効果が見られた。カチオン化ゼラチンに PEG を結合することにより、プラスミド DNA と相互作用する粒子サイズの小さなハイドロゲルの作製ができた。この PEG 結合ゼラチン（PEG-ゼラチン）とコンプレックスしたプラスミド DNA は、マウス筋肉内で遊離のプラスミドに比較して、より高く、より長い期間の遺伝子発現が認められた。また、超高压を用いて超微細粒子を作製する新しいプロセスを開発し、微粒子状の加工に成功した。新しい遺伝子デリバリー用材料として、超高压処理による DNA/PVA 複合体の調製を行い、その安定性について検討を行った。昨年までの検討によって、DNA/PVA 複合体は血中投与によって炎症細胞を活性化し、肺などへの集積化が可能であったが、その発現効率の低さが問題であった。本年度の検討により、従来の遺伝

子ベクターと異なり、長時間細胞内にとどまって、発現を持続するという、新しい機能の存在が示唆された。発現量自体が少ないため、これまで観察出来なかったものと考えられる。よって、評価系を最適化し、少量で効果の高い蛋白質合成を長時間必要とする局面に置いてこのDNA/PVA複合体の効果は最大限に発揮されるものと考えられる。

EPCなどの貪食能を有する細胞がプラスミドDNAとカチオン化ゼラチン複合体を貪食し、細胞質内でその貪食した遺伝子の発現が見られるとともに、その発現レベルがウイルスベクターを用いた場合と同じレベルまで高まることを見いだした。この複合体を利用した遺伝子治療と細胞治療を評価できる動物モデルを用いて、ゼラチン遺伝子複合体による治療実験を進めている。さらに、普及型微小血管造影装置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できることを確認した。虚血性疾患に対し、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、非ウイルス性ベクターは、ウイルス性のそれに比し、倫理面での弊害が少なくより実際の遺伝子導入法として期待される。本研究により、カチオン化ゼラチンの有用性及び本ベクターを用いたVEGF遺伝子導入EPC移植による機能性血管再生療法の有用性が示された。

また、温度応答基材を利用した心筋細胞シートの重層化技術を完成し、得られた心筋細胞シートが期待通り、機能していることをin vitroで確認した。単離細胞のインジェクションによる移植法は既に骨髄由来細胞や筋芽細胞を用いた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を用いれば、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。本年度、EPCと線維芽細胞とを共培養することで重層化細胞シートを作製し、虚血心筋モデルへの移植したとこ

ろ、EPCを加えることによって細胞への血管新生と細胞移植効果がより高まることがわかった。

これらの一連の研究成果によって、微細化したプラスミドDNAを徐放する次世代の遺伝子キャリアシステムに対する分子デザインが完成した。しかしながら、システムにより完成度の高いプラスミドDNAの徐放性の付与が必要である。徐放化システムに血管新生作用をもつ細胞増殖因子のプラスミドDNAを含浸させ、動物の血管投与で目的組織内に徐放システムを導入したところ、それらのシステムの優れた血管新生作用が認められた。超高压プロセスを用いた新しい遺伝子複合体粒子作製法については、粒子の安定性および遺伝子発現効果に及ぼすプロセス操作の最適化も進んだ。EPCにプラスミドDNA含浸ハイドロゲル粒子を取り込ませ、細胞内でプラスミドDNAを徐放したところ、EPCはその生物活性を増強(genetic engineered)されることがわかった。今後は、貪食能をもたない他の幹細胞に対しても、genetic engineering技術を適用し、ハイブリッド細胞—遺伝子治療の概念と有効性をより広め、高めていきたい。

## F. 健康危険情報 特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences, *Pronectin. J. Control. Release.* 97(1): 157-71 (2004).
2. 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 Ther.* 11(2): 194-203 (2004).
3. Kushibiki, T., Matsuoka, H., Tabata, Y.: Synthesis and physical characterization of poly(ethylene glycol)-gelatin conjugates. *Biomacromolecules.*

- 5(1): 202-8 (2004).
4. Kim, SW., Ogawa, T., Tabata, Y., Nishimura, I.: Efficacy and cytotoxicity of cationic-agent-mediated nonviral gene transfer into osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 71A(2): 308-15 (2004).
  5. Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, and Kishida A. Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery. *Mater. Sci. Eng. C*, 24: 797-801 (2004).
  6. Iwami Y, Masuda H, and Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. *J Cell Mol Med.* 8(4): 488-497 (2004).
  7. Ii M, Nishimura H, Iwakura A, Wecker A, Eaton E, Asahara T, Losordo DW. Endothelial Progenitor Cells Are Rapidly Recruited to Myocardium and Mediate Protective Effect of Ischemic Preconditioning via "Imported" Nitric Oxide Synthase Activity. *Circulation*, in press.
  8. Kusano KF, Allendoerfer KL, Munger W, Pola R, Bosch-Marce M, Kirchmair R, Yoon YS, Curry C, Silver M, Kearney M, Asahara T, Losordo DW. Sonic hedgehog induces arteriogenesis in diabetic vasa nervorum and restores function in diabetic neuropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(11): 2102-2107 (2004).
  9. Iwase T, Nagaya N, Fujii T, Itoh T, Ishibashi-Ueda H, Yamagishi M, Miyatake K, Matsumoto T, Kitamura S, Kangawa K. Adrenomedullin enhances angiogenic potency of bone marrow transplantation in a rat model of hindlimb ischemia. *Circulation.* 11: 356-362 (2005).
  10. Fujii T, Nagaya N, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Shirai M, Itoh T, Ishino K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin enhances therapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: H1444-1450 (2005).
  11. Nagaya N, Kangawa K. Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension. *Peptides.* 2511: 2013-2018 (2004).
  12. 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.* 109:526-31 (2004).
  13. 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.* 109:351-6 (2004).
  14. 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.* 109:242-8 (2004).
  15. Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol.* (in press).
  16. 清水達也,岡野光夫. 細胞シート工学を利用した組織再構築 *Bio Clinica* 19:74-78(2004)
  17. 清水達也. 組織工学の心血管病への応用 *分子血管病* 58:58-64(2004)
  18. 清水達也,岡野光夫. 組織工学における血管新生. *血管医学* 5:41-48(2004)
2. 学会発表
    1. Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an

- artificial protein with repeated RGD sequences, Pronectin, cationized. 7th world biomaterials congress (2004.5.17-21 Sydney)
2. Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. The 6th Asian Symposium on Biomedical Materials (2004.7.19-22 Emei)
  3. Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by spermine derivative of dextran combined with ultrasound. 第53回高分子討論会 (2004.9.15-17 札幌)
  4. Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: Perfusion culture combined with plasmid DNA impregnated scaffold enhances gene expression of mesenchymal stem cells. The joint meeting of the Tissue Engineering Society International and European Tissue Engineering Society (2004.10.10-13 Lausanne)
  5. 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを利用した siRNA 発現ベクターによる腎線維化進展抑制. 第20回日本 DDS 学会学術集会 (2004.7.15-16 京都)
  6. Kushibiki, T., Tabata, Y.: Delivery of small interference RNA of transforming growth factor beta I receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society. (2004. 10.11-13 Lausanne)
  7. 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを用いた siRNA の腎間質へのデリバリー. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004.11.15-16 つくば)
  8. Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Delivery of small interference RNA of transforming growth factor beta 1 receptor by cationized gelatin. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB4) and 2nd International Symposium on Fusion of Nano and Bio Technologies (FNB) (2004.11.16-18 Tsukuba)
  9. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 上田祐二, 山岸久一: 生分解性カチオン化ゼラチンを用いたヒト樹状細胞への遺伝子導入. 第25回癌免疫外科研究会. 第26回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング (2004.5.20-21 京都)
  10. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 山岸久一: 樹状細胞を用いた癌免疫療法の効果増強の試みーカチオン化ゼラチンを用いた遺伝子導入ー. 第59回日本消化器外科学会総会 (2004.7.21-23 鹿児島)
  11. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 城潤一郎, 田畑泰彦, 山岸久一: カチオン化多糖類ー遺伝子複合体を用いた癌に対する遺伝子治療. 第42回日本癌治療学会総会 (2004.10.27-29 京都)
  12. 田中基幹, 高田 聡, 富岡厚志, 穴井 智, 松村善昭, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 植村天受, 平尾佳彦: 徐放性 PTEN 遺伝子薬を用いた前立腺癌における放射線感受性増強効果. 第63回日本癌学会 (2004.9.29-10.1 福岡)
  13. 高分子学会第53回討論会予稿集、p. 4304 (2003)
  14. 第7回世界バイオマテリアル会議予稿集、p.35 (2004)
  15. 第7回世界バイオマテリアル会議予稿集、p.713 (2004)
  16. 第20回日本 DDS 学会予稿集 p.288(2004)
  17. 第13回ポリマー材料フォーラム予稿集、p.9(2004)
  18. Regeneration of Heart Muscle by Stem Cell and Gene Therapy “Gene Manipulation for the Enhancement of Stem Cell Therapy”
  19. Franqui Symposium Brussels “Link between

- angiogenesis and neurogenesis: implication for development, disease and treatment.”
20. 30th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Barcelona, Spain “Regenerative therapy with stem cells”
  21. 第3回日本再生医療学会総会 “成体多能性幹細胞の展開”
  22. 第68回日本循環器学会総会・学術集会 “Angiogenesis and Regeneration Medicine in Cardiovascular Medicine”
  23. 第104回日本外科学会定期学術集会 “幹細胞生物学の血管医学への応用”
  24. Cardiovascular Cell and Gene Therapy Conference II, MA “Endothelial progenitor cells for vascular medicine”
  25. Angioplasty Summit 2004, Korea “The Therapeutic Potential of Stimulated Endothelial Progenitor”
  26. Vascular Biology Meeting, Germany “Stem cells growth factors and angiogenesis future treatment strategies”
  27. XIIIth International Vascular Biology Meeting, Toronto “Vascular stem cell/cell transdifferentiation”
  28. 日本炎症・再生医学会 “血管再生治療の現状”
  29. XVIII World Congress International Society for Heart Research, Brisbane “Stem cell biology for vascular regeneration”
  30. Twelfth pulmonary circulation conference, Colorado “Circulating Endothelial Cells in Vascular Repair”
  31. Basic Concepts and Innovative Strategies in Heart Disease, Capri “Endothelial progenitor cell biology and therapeutic regeneration”
  32. Ernst Shering Foundation +Riken Symposium, Kobe “Stem cell biology for vascular regeneration”
  33. Fujii T, Nagaya N, Nishigami K, Ishibashi-Ueda H, Iwase T, Ito T, Yutani C, Sano S, Mori H, Adrenomedullin Enhances Therapeutic Potency of Bone Marrow Transplantation for Acute Myocardial Infarction in Rats, The Annual Scientific Seccion 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
  34. Chiku M, Nishigami K, Mori H, Development of In-house Micro-angiographic System for Visualizing Collateral Micro-vessels Induced by Regeneration Therapy, The Annual Scientific Seccion 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
  35. Mori H, Chiku M, Nishigami K., Tanaka E, Kimura K, Kawai T, Suzuki K, Mochizuki R, Okawa Y, Micro-angiographic system using synchrotron radiation and conventional x-ray source for visualizing angiogenic vessels induced by cardiovascular regeneration therapy, 7th International School and Symposium on Synchrotron Radiation in Natural Science 2004 (Zakopane, Poland), 2004.6
  36. Mori H, Nagaya N, Kangawa K, Tabata Y, Special Program: Plenary Session; Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells, 第68回日本循環器学会総会・学術集会 (東京), 2004.3
  37. Kobayashi H, Shimizu T et al. Fibroblast cell sheets co-cultured with endothelial progenitor cells improve cardiac function of infarcted heart.. The 69<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2004.3 Yokohama
  38. Shimizu T, Okano T. Pulsatile tissue grafts: getting rid of old scaffolds? European Society of Cardiology 2004 2004.8 Munich
3. 著書
- Hidezo Mori/Hikaru Matsuda: Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches. Springer, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

準備中 4件

分担課題：次世代遺伝子キャリアの作製と性質の評価

分担研究者 田畑泰彦 京都大学再生医科学研究所 生体組織工学研究部門 生体材料学分野 教授

研究要旨

プラスミド DNA を徐放するための生体吸収性のカチオン化ゼラチンからなる次世代の遺伝子キャリアシステムを作製し、それらのキャリアシステムのキャラクタリゼーションとそれらとプラスミド DNA とのコンプレックス形成、ならびに遺伝子発現特性を評価した。ゼラチンのカルボキシル基にエチレンジアミンを導入することによりカチオン化ゼラチンを得た。次に、得られたカチオン化ゼラチンにポリエチレングリコール (PEG) を結合させ、PEG 導入カチオン化ゼラチンを作製した。これらの試料は水溶液中で臨界ミセル濃度を示し、分子サイズ数百ナノメートルの高分子ミセルを形成した。このミセル形成能は、PEG の分子量および PEG 修飾率に依存していた。PEG 修飾カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA とを水溶液中で混合したところ、両者のポリイオンコンプレックスからなる微細化粒子が得られた。これらのプラスミド DNA 微細化粒子をマウス皮下に投与した。その結果、遊離のプラスミド DNA に比較して、高い遺伝子発現レベルが認められた。

A. 研究目的

本研究の目的は、虚血性心筋症（心筋梗塞、心筋症）や慢性閉塞性動脈硬化症などの血管狭窄病変に対する遺伝子細胞療法のための両親媒性遺伝子ベクターを開発し、これを用いて①血管内投与による高効率な Gene Therapy さらに②血管成長因子等の遺伝子を導入した血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を開発することである。これまで行われた遺伝子の発現効率の高まる徐放化キャリアの作製の成果を基に、これをさらに高機能化するために、遺伝子の徐放が可能でかつ凝集のない微細化遺伝子キャリアを生体吸収性ゼラチンから作製する。これらを用いることで遺伝子導入効率を飛躍的に高めることができ、遺伝子導入血管内皮前駆細胞などによるハイブリッド細胞-遺伝子治療法を実現できる。本研究が実現されることで、安全性が高く、かつ、導入効率が高い理想的な遺伝子導入ベクターが得られ、遺伝子治療の普及を加速できることが期待される。

B. 研究方法

ブタ皮膚のコラーゲンを酸処理することによって得られたゼラチンのカルボキシル基へエチレンジアミンの片末端アミノ基を水溶性カルボジイミドを用いて縮合反応を行った。反応時におけるエチレンジアミン、水溶性カルボジイミドの濃度を変化させて、アミノ基導入率の異なるカチオン化ゼラチンを作製した。アミノ基導入率はトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法によりゼラチンの 1 級アミンを定量することにより行った。また、得られたカチオン化ゼラチンの electrophoretic light scattering (ELS) 測定によりゼラチンのカチオン化度を調べた。

得られたカチオン化ゼラチンのリン酸緩衝溶液 (pH8.5) 中に、片末端メトキシ、片末端活性化エステルをもつポリエチレングリコール (PEG、重量平均分子量：3,000、5,000、および 12,000 日本油脂 (株) から供与) を加え、所定時間、反応させた。PEG 仕込み量を変化させることにより、異なる PEG 導入率をもつカチオン化ゼラチンを得た。PEG 導入率は TNBS 法によるアミノ基の減少から算出した。得られた PEG 導入カチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) の水溶液中における臨界ミセル濃度 (CMC) は、定法である蛍光試薬の強度変化から定量した。また、ELS 測定と dynamic light scattering (DLS) 測定により PEG-ゼラチンの電荷と分子サイズを評価した。PEG の分子量およびその導入率の異なる様々な PEG-ゼラチンと CMV プロモータをもつ LacZ coding プラスミド DNA とを水溶液中で混合した。両者のポリイオンコンプレックス形成については、DLS 測定による混合前後のプラスミド DNA の分子サイズ変化、および混合前後のプラスミド DNA の陰イオン交換樹脂への吸着挙動を調べることで評価した。さらに、遺伝子発現レベルを *in vivo* において評価した。すなわち、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックス、コントロールとして遊離プラスミド DNA をそれぞれマウス大腿筋肉内に投与した。経時的に筋肉を採取、そのプラスミド DNA 発現を評価した。加えて、ハイドロゲル埋入部位における遺伝子発現を組織学的に観察した。それぞれの動物実験はサンプル数 5~6 で行い、ANOVA 法による有意差検定を行った。

(倫理面への配慮)

「京都大学動物実験に関する指針 (昭和 63 年



総長裁定)」に従い、動物実験に係る再生医科学研究所内諸規則を遵守し、動物愛護に十分配慮しながら動物実験を実施した。

### C. 研究成果

エチレンジアミンと水溶性カルボジイミド濃度の増加にともないアミノ基導入率の高いカチオン化ゼラチンを作製することができた。また、ELS 測定により、カチオン化ゼラチンが正電荷をもっていることを確かめた。カチオン化ゼラチンへの PEG 導入反応においては、用いる PEG の分子量にかかわらず、いずれの PEG においても、ゼラチンに対する PEG の添加量の増加とともに PEG 導入率は増加した。PEG-ゼラチンは、それ自身が水溶液中で CMC をもっていた。その CMC の値は、PEG の分子量とその導入率とに依存していた。PEG 分子量および導入率の増加とともに CMC 値は低下し、より安定な高分子ミセルを形成していることがわかった。そのミセルの分子サイズは数百ナノメートルであり、表面電荷は数 mV であった。次に、得られた PEG-ゼラチンと混合することによりプラスミド DNA の負電荷が減少、弱い正電荷を示すことがわかった。また、DLS 測定によって見かけの分子サイズを評価したところ、カチオン化ゼラチンとの混合によってプラスミド DNA の分子サイズが小さくなることがわかった。PEG-ゼラチンとの混合の前後におけるプラスミド DNA の電気泳動測定の結果も考慮して、プラスミド DNA が PEG-ゼラチンとポリオンコンプレックスを形成し、微細化粒子ができていることを確認した。コンプレックス形成は、PEG-ゼラチンの PEG の分子量および PEG の導入率に大きく影響された。PEG の分子量とその導入率の増加とともにコンプレックス形成は抑制された。この結果は、ゼラチンに導入された PEG 分子の立体障害により、PEG-ゼラチンとプラスミド DNA との相互作用が抑制されたことを示している。PEG の導入されていないカチオン化ゼラチンおよび PEG-ゼラチンとプラスミド DNA とのコンプレックスを陰イオン交換樹脂カラムにアプライしたところ、前者はカラム内に吸着、溶出されなかったのに対して、後者は吸着されず、溶出された。このことは、後者のコンプレックス表面に PEG 鎖が存在し、陰イオン交換樹脂との相互作用を弱めた結果であると考えられた。以上の結果より、PEG-ゼラチンをプラスミド DNA と混合することによって、内部コアにプラスミド DNA が包含され、表面に PEG 鎖をもつ微細粒子の形成されていることがわかった。また、この微細粒子の形成には、PEG 分子量とその導入率のコントロールとが重要であった。

プラスミド DNA 単独あるいは PEG-ゼラチン

とのコンプレックスをマウス筋肉内に注射した後の注射部位における遺伝子発現を調べた。その結果、注射 2 日目から水溶液プラスミド DNA 投与に比較して、PEG-ゼラチン-プラスミド DNA コンプレックスの場合には、有意に高いレベルの遺伝子発現が認められ、その発現期間においても、数日、延長した。

### D. 考察

薬物の徐放化研究の歴史は古く、これまでに多くの報告がされている。しかしながら、その中でもプラスミド DNA の徐放化の試みは少ない。これらの報告では、生体吸収性高分子キャリア内にプラスミド DNA を包含させ、プラスミド DNA のキャリア内での単純拡散によりその徐放をコントロールしている。本研究では、これとは異なった徐放メカニズムを提唱している。すなわち、プラスミド DNA を徐放キャリアを構成するカチオン化ゼラチンとポリオンコンプレックスを形成させ、徐放キャリア内に固定化、保持している。この状態ではプラスミド DNA は徐放されず、ハイドロゲルが分解され、カチオン化ゼラチン分子が水可溶化して初めて、固定化プラスミド DNA はハイドロゲルから放出される。このシステムでは、徐放化キャリア自身の分解により DNA の徐放パターンをコントロールすることができる。この徐放メカニズムでは、拡散により徐放を制御している従来法とは違い、キャリアのサイズ、体積あたりのキャリアの表面積などが変化しても、プラスミド DNA の徐放パターンを自由に定めることができる。また、プラスミド DNA は水可溶化されたカチオン化ゼラチン断片とポリオンコンプレックスを形成した状態で徐放される。そのため、プラスミド DNA の負電荷の中和とその分子サイズの減少などが期待され、従来より報告されてきたプラスミド DNA のみの徐放と比較して、プラスミド DNA の遺伝子発現に有利であると考えられる。また、コンプレックスを形成しているため、プラスミド DNA の DNase による酵素分解に対する抵抗性も向上する。プラスミド DNA の徐放パターンが、その徐放ハイドロゲルキャリアの分解パターンによく対応している実験結果は、私たちの徐放キャリアの設計思想を証明するものであり、期待通り、徐放キャリアの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化が実現している。また、徐放期間の延長が遺伝子発現期間の延長をもたらす、本徐放化システムが *in vivo* における遺伝子発現の有力なツールであることがわかった。本研究では、すでに、注射可能なサイズ (10~150 $\mu$ m 直径) カチオン化ゼラチンハイドロゲル粒子の作製とそれらによるプラスミド DNA の遺伝子発現の増強も確認している。これらのハイドロゲル粒子においても、期待通り

プラスミド DNA の発現増強のための徐放化システムの作製が可能であることを実験的に確認している。本年度は、プラスミド DNA とポリイオンコンプレックスを形成させるためのカチオン化ゼラチンからなる高分子ミセルをデザイン、作製した。つまり、カチオン化ゼラチンに PEG を化学的に導入し、高分子界面活性剤を調製した。PEG 導入カチオン化ゼラチン (PEG-ゼラチン) は、それ自身が CMC を示し、界面活性であった。プラスミド DNA との混合によって、プラスミド DNA を内部に包含、外部に PEG 分子をもつ数百ナノメートルサイズの微細化粒子の形成が確認された。この微細化粒子をマウスに投与したところ、遊離プラスミド DNA 水溶液に比べて、より高い遺伝子発現レベルと発現期間の若干の延長が認められた。今後、カチオン化ゼラチンとプラスミド DNA とからなる微細化次世代遺伝子発現システムについて、より詳しく調べ、ゼラチンの分解にともなうプラスミド DNA の徐放化のコントロールをより確実にすることが必要である。

#### E. 結論

プラスミド DNA とポリイオンコンプレックスを形成するカチオン化ゼラチンに PEG 鎖を導入することによって、プラスミド DNA を含む、カチオン化ゼラチンからなる高分子ミセルの形成が認められた。この高分子ミセルは数百ナノメートルのサイズをもつ微細化粒子であり、*in vivo* において、遺伝子発現レベルの増強を示した。今後は、このシステムをさらに改良を加え、プラスミド DNA の徐放の制御をより確実なものにしていくことが必要である。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Hosseinkhani, H., Tabata, Y.: PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences, *Pronectin*. *J. Control. Release*. 97(1): 157-71 (2004)
- 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 Ther.* 11(2): 194-203 (2004)
- Kushibiki, T., Matsuoka, H., Tabata, Y.: Synthesis and physical characterization of poly(ethylene glycol)-gelatin conjugates. *Biomacromolecules*. 5(1): 202-8 (2004)
- Kim, S.W., Ogawa, T., Tabata, Y., Nishimura, I.: Efficacy and cytotoxicity of cationic-agent-mediated nonviral gene transfer into osteoblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 71A(2):

308-15 (2004)

##### 2. 学会発表

- Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial protein with repeated RGD sequences, *Pronectin*, cationized. 7th world biomaterials congress (2004.5.17-21 Sydney)
- Hosseinkhani, H., Aoyama, T., Ogawa, O., and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by dextran conjugation based on metal coordination. The 6th Asian Symposium on Biomedical Materials (2004.7.19-22 Ermei)
- Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: Tumor targeting of plasmid DNA by spermine derivative of dextran combined with ultrasound. 第 53 回高分子討論会 (2004.9.15-17 札幌)
- Hosseinkhani, H. and Tabata, Y.: Perfusion culture combined with plasmid DNA impregnated scaffold enhances gene expression of mesenchymal stem cells. The joint meeting of the Tissue Engineering Society International and European Tissue Engineering Society (2004.10.10-13 Lausanne)
- 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを利用した siRNA 発現ベクターによる腎線維化進展抑制. 第 20 回日本 DDS 学会学術集会 (2004.7.15-16 京都)
- Kushibiki, T., Tabata, Y.: Delivery of small interference RNA of transforming growth factor beta I receptor by cationized gelatin to prevent interstitial renal fibrosis. Joint Meeting of the Tissue Engineering Society International and the European Tissue Engineering Society. (2004. 10.11-13 Lausanne)
- 櫛引俊宏, 中島奈津紀, 菅井 学, 清水 章, 田畑泰彦: カチオン化ゼラチンを用いた siRNA の腎間質へのデリバリー. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004 (2004.11.15-16 つくば)
- Kushibiki, T., Nagata-Nakajima, N., Sugai, M., Shimizu, A., Tabata, Y.: Delivery of small interference RNA of transforming growth factor beta 1 receptor by cationized gelatin. 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB4) and 2nd International Symposium on Fusion of Nano and Bio Technologies (FNB) (2004.11.16-18 Tsukuba)
- 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博, 阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦, 上田祐二, 山岸久一: 生分解性カチオン化ゼラチンを用いたヒト樹状細胞への遺伝子導入. 第 25 回癌免疫外科研究会. 第 26 回日本癌局所療法研究会ジョイントミーティング (2004.5.20-21 京都)
- 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博,

阿辻清人, 吉村 衛, 友重龍治, 田畑泰彦,  
山岸久一: 樹状細胞を用いた癌免疫療法の効  
果増強の試みーカチオン化ゼラチンを用い  
た遺伝子導入ー. 第 59 回日本消化器外科学  
会総会 (2004.7.21-23 鹿児島)

11. 稲田 聡, 藤原 斉, 窪田 健, 高嶋一博,  
阿辻清人, 城潤一郎, 田畑泰彦, 山岸久一: カ  
チオン化多糖類ー遺伝子複合体を用いた癌  
に対する遺伝子治療. 第 42 回日本癌治療学  
会総会 (2004.10.27-29 京都)

12. 田中基幹, 高田 聡, 富岡厚志, 穴井 智,  
松村善昭, 櫛引俊宏, 田畑泰彦, 植村天受,  
平尾佳彦: 徐放性 PTEN 遺伝子薬を用いた前  
立腺癌における放射線感受性増強効果. 第 63  
回日本癌学会 (2004.9.29-10.1 福岡)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 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。また、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ところ、細胞内への高い取り込み能が確認できた。

これらの複合体のより高い安定性を実現するために、超高压処理による複合体の安定性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。

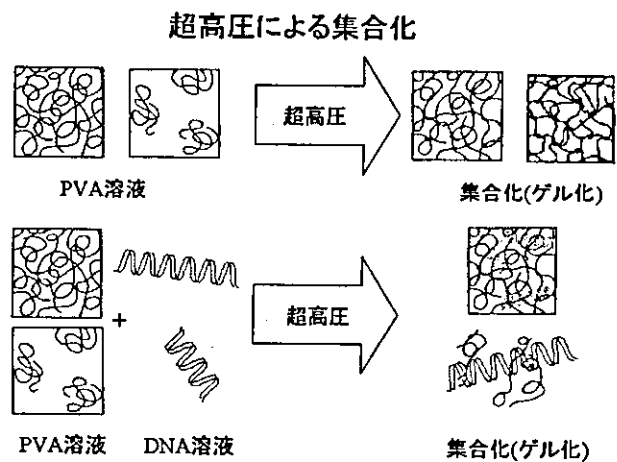


図1 超高压による集合体形成

### 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。

#### ○DNA/PVA 複合体の特性解析

得られた DNA/PVA 複合体の特性解析として、CD 測定、AFM 測定、UV を用いた融点測定、DNA 分解酵素に対する耐