

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。

C. 研究成果

PVA-plasmid 混合溶液を超高圧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。

○CD 測定

DNA の構造を評価するために CD 測定を行った。結果を図 2 に示す。図より明らかなように、DNA は単体で超高圧処理されると CD スペクトルの形が変化することから、構造が変化していることが分かる。これに PVA を混合して超高圧処理すると、

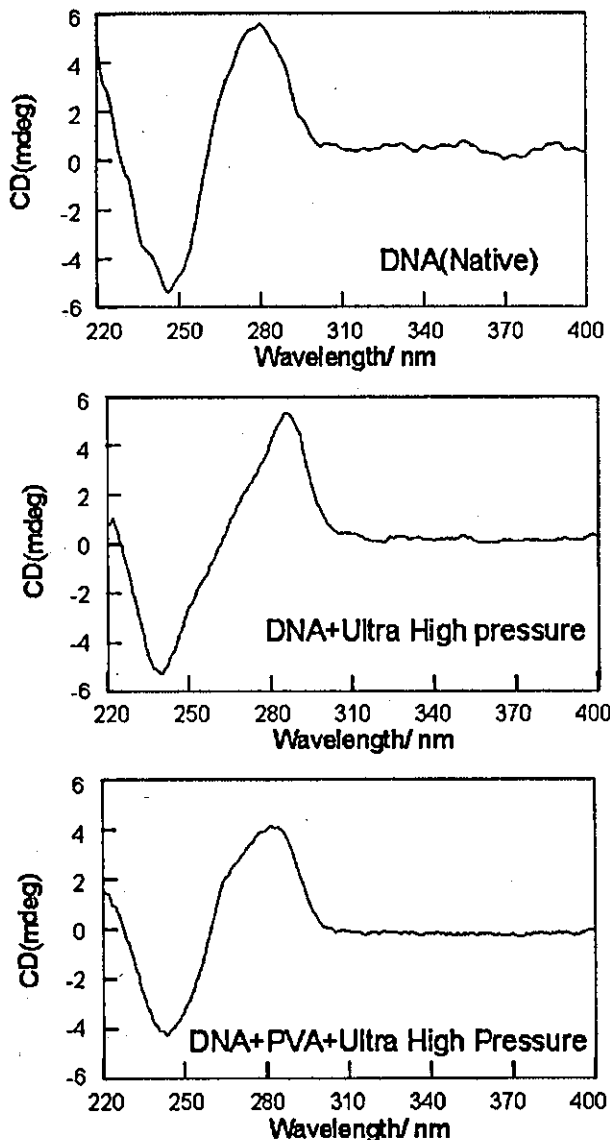


図 2 DNA/PVA 複合体の CD 測定図

Native な状態のスペクトルに近いものが得られ、PVA が DNA/PVA 複合体となることによって、DNA の構造安定性に寄与していることが示された。また、その複合体の形態についても DNA の主溝にはまり込む形が予想される。

○AFM 測定

DNA/PVA 複合体の形態観察法として AFM 測定を行った。結果を図 3 に示す。図中に見える凝集体は目的の複合体と思われ、実際にプラスミド DNA の太さの測定と図中の繊維状の太さの比較から、図中の繊維状のものは DNA の約 1.5 倍の太さがあり、DNA に PVA が絡み合ったものであると考えている。

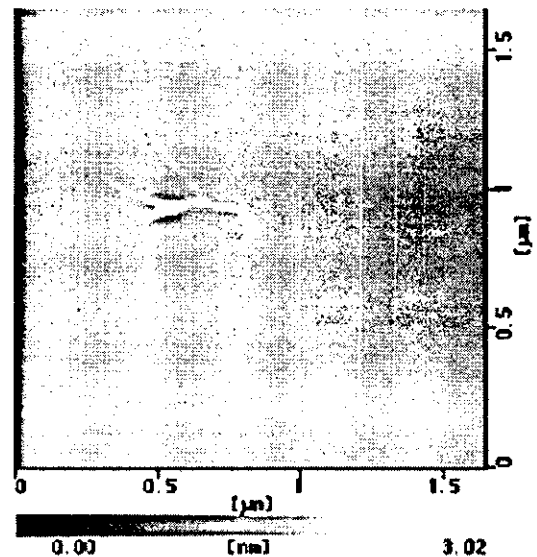


図 3 PVA-プラスミド複合体の AFM 観察像 (複数のプラスミドと PVA が絡み合っていると考えられる)

○UV による融点測定

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。これにより、DNA が安定化されているかどうかの判断が出来ると期待される。結果を図 4 に示す。図より明らか

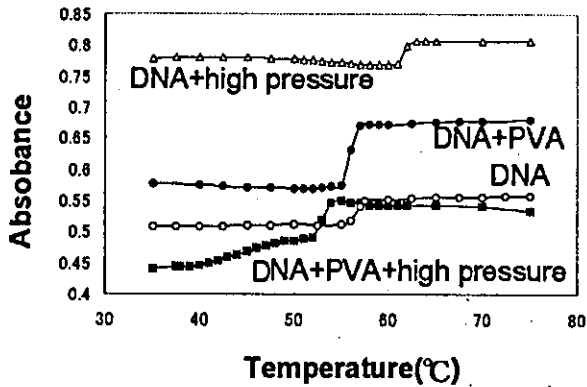


図4 DNA/PVA複合体の融解曲線

なように、DNA単独では56℃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に変化しない。一方、DNA単体に超高压処理を行うと融点が上昇し、これは図2で示したように、構造が変化し、安定性が増したことを示している。一方、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℃に融点を示している。これは、低温側で徐々にPVAがDNAから解離し、DNA単体よりも低い融点を示すことから、ほどけたPVAがDNAの融解を促進したのではないかと考えている。

○ DNA分解酵素に対する耐性試験

DNA/PVA複合体を血中に投与した場合、遺伝子発現に直結する関門は血中のDNA分解酵素による分解からの保護である。前年度に報告した発現効率の低さが、この分解酵素によるものかどうかを検討した。図5に結果を示す。

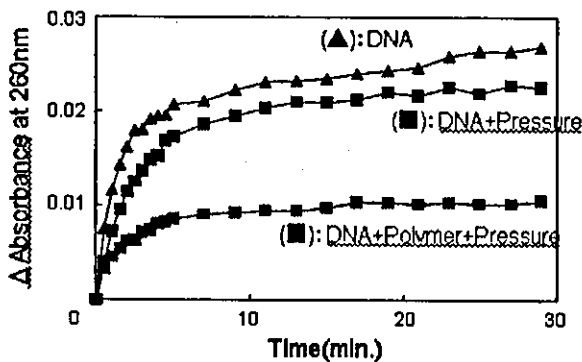


図5 DNA分解酵素に対する耐性測定

図から明らかなように、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。

○ 無細胞蛋白質合成による検討

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。この違い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。結果を図6に示す。

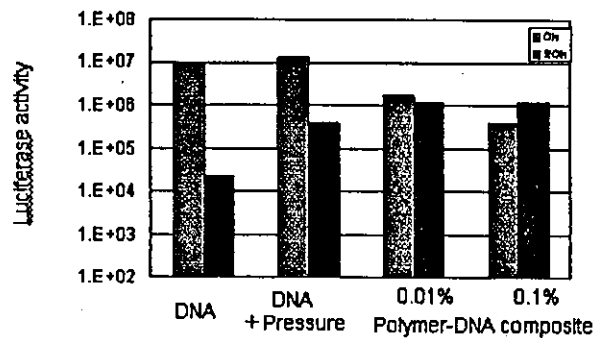


図6 無細胞蛋白質合成系の結果

図より、DNA/PVA複合体(右の2種)はDNA単体と比較して蛋白質合成量が低下していることが分かる(2本の棒グラフの内の左側)。これより、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と考えられる。また、棒グラフの右側をみると、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見られない。これからも、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。

D. 考察

超高圧状態では、物質間の相互作用の内、水素結合成分が強調されることが報告されている。PVA 自身は水素結合性を側鎖に有しており、その濃厚溶液は短時間の処理でハイドロゲルを形成する。これまでの検討により、PVA ハイドロゲルの生成メカニズムは、まず分子内での水素結合形成による分子の局所的凝縮と粒子形成、それに引き続く粒子間の架橋からなると考えられている。ここに水素結合性を有する分子（DNA 等）を添加し、分子集合体の形成が可能である。溶液の濃度を下げ、粒子間架橋を抑制することによって、ナノメートルサイズの遺伝子デリバリー用微粒子が得られた。超高圧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。

E. 結論

新しい遺伝子デリバリー用材料として、超高圧処理による 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。

また、本研究報告では触れなかったが、

昨年に報告した無機微粒子を用いた高発現タイプの DNA/PVA 複合体の開発も継続しており、これら両者を組み合わせることによって、幅広い遺伝子デリバリー用ベクターへの要請に対応できるものと考えている。

今後は、これらのそれぞれの遺伝子デリバリー担体としての性能評価および双方を組み合わせた高機能型の担体の開発について検討を行う予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. T.Kimura, A.Okuno, K.Miyazaki, T.Furuzono, Y.Ohya, T.Ouchi, S.Mutsuo, H.Yoshizawa, Y.Kitamura, T.Fujisato, A.Kishida, Mater. Sci. Eng. C, 24, 797-801, 2004.

2. 学会発表

- ①高分子学会第 53 回討論会(2003)
予稿集、p. 4304.
- ②第 7 回世界バイオマテリアル会議
予稿集、p.35(2004)
- ③第 7 回世界バイオマテリアル会議
予稿集、p.713(2004)
- ④第 20 回日本 DDS 学会予稿集
p.288(2004)
- ⑤第 13 回ポリマー材料フォーラム
予稿集、p.9(2004)

H. 知的財産権の出願・登録状況 準備中

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）
分担研究報告書

分担課題：ヒト組み替え DNA 生分解性物質の開発
分担研究者 浅原孝之 東海大学医学部再生医療科学 教授

研究要旨

次世代遺伝子導入ベクターとして非ウイルス性 gelatin hydrogel (GHG) を用いて、VEGF 遺伝子導入した血管内皮前駆細胞 (EPCs) 移植療法の虚血性疾患に対する機能性血管再生療法としての有効性及び GHG のベクターとしての有用性を示した。

A. 研究目的

虚血性疾患患者における自己血由来 EPC 移植療法の開発において、高齢患者における自己 EPCs の機能低下が問題となり、ex vivo での安全な血管新生促進遺伝子導入法による EPC 機能強化療法の開発が望まれる。本年度は、非ウイルス性ベクターの GHG を用いて EPC への遺伝子導入効率を検討するとともに、VEGF 発現 plasmid を同ベクターを用いて導入した EPC 移植療法の虚血性疾患に対する治療有効性を検討した。

B. 研究方法

- 1) 成人末梢血由来 EPCs の採取；末梢血より密度勾配遠心法を用いて単核球を分離し、血管内皮細胞用培地を用いて単核球中 EPCs を ex vivo にて 7 日間、分化・増幅培養した。
- 2) GHG による DNA plasmid 遺伝子導入；上記培養 EPCs に GHG を用いて DNA 結合性正荷電ゼラチン食食能により GFP 及び VEGF plasmid 遺伝子を導入した。
- 3) 上記遺伝子導入された EPCs の増殖能・遊走能の検討；増殖能は MTS assay kit により、遊走能は modified Boyden chamber により行った。
- 4) VEGF 遺伝子導入 EPC 移植療法の有効性の検討；上記 ex vivo にて培養した EPCs を重傷下肢虚血マウスモデルに静脈内投与し、Laser Doppler Analysis により 4 週後に評価、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。

C. 倫理面への配慮

末梢血はボランティアに十分なインフォームドコンセントを施し採血した。また、動物実験は東海大学医学部動物倫理委員会の承認を得て、ヒトゲノム・遺伝子解

析研究に関する倫理指針及び動物愛護に基づき施行した。

D. 研究成果

GFP 遺伝子導入 EPCs 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 EPCs の増殖能・遊走能は非遺伝子導入及び GFP 遺伝子導入 EPCs 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。

D. 考察

GHG 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、GHG は臨床応用を考える上で重要と考えられた。

E. 結論

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、GHG 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。

F. 健康危機情報

本研究における GHG の成体安全性は証明されている (Tabata et al., 1999)。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwami Y, Masuda H, Asahara T. Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future. J Cell Mol

Med. 2004;8(4):488-97.

2) M Ii, T Asahara, D.W. Losordo et al. Endothelial progenitor cells are rapidly recruited to myocardium and mediate protective effect of ischemic preconditioning via "imported" nitric oxide synthase activity. *Circ.* 2004 (in press).

3) Kusano KF, T Asahara, D.W. Losordo et al. Sonic Hedgehog Induces Arteriogenesis in Diabetic Vasa Nervorum and Restores Function in Diabetic Neuropathy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(11):2102-2107.

F. 学会発表

1) Regeneration of Heart Muscle by Stem Cell and Gene Therapy "Gene Manipulation for the Enhancement of Stem Cell Therapy"

2) Franqui Symposium Brussels "Link between angiogenesis and neurogenesis: implication for development, disease and treatment."

3) 30th Annual Meeting of the European Group for Blood and Marrow Transplantation, Barcelona, Spain "Regenerative therapy with stem cells"

4) 第3回日本再生医療学会総会 "成体多能性幹細胞の展開"

5) 第68回日本循環器学会総会・学術集会 "Angiogenesis and Regeneration Medicine in Cardiovascular Medicine"

6) 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"

7) Cardiovascular Cell and Gene Therapy Conference II, MA "Endothelial progenitor cells for vascular medicine"

8) Angioplasty Summit 2004, Korea "The Therapeutic Potential of Stimulated Endothelial Progenitor"

9) Vascular Biology Meeting, Germany "Stem cells growth factors and angiogenesis future treatment strategies"

10) XIIIth International Vascular Biology Meeting, Toronto "Vascular stem cell/cell transdifferentiation"

11) 日本炎症・再生医学会 "血管再生治療の現状"

12) XVIII World Congress International

Society for Heart Research, Brisbane "Stem cell biology for vascular regeneration"

13) Twelfth pulmonary circulation conference, Colorado "Circulating Endothelial Cells in Vascular Repair"

14) Basic Concepts and Innovative Strategies in Heart Disease, Capri "Endothelial progenitor cell biology and therapeutic regeneration"

15) Ernst Shering Foundation +Riken Symposium, Kobe "Stem cell biology for vascular regeneration"

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

I. その他
特記事項なし

分担研究報告書

分担課題：細胞への遺伝子導入法の開発と循環傷害への応用

分担研究者 盛 英三 国立循環器病センター研究所心臓生理部長

研究要旨 次世代遺伝子ベクター（ゼラチン-遺伝子複合体他）を用いることにより、in vitro でヒト末梢血単球、マクロファージ、血管内皮前駆細胞、骨髄単核球に高い効率で遺伝子を導入する技術を開発した。本年度は兎下肢虚血モデルでカチオン化ゼラチン-adrenomedulin 遺伝子複合体の血管再生治療効果を確認した。また、本院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。

A. 研究目的

カチオン化ゼラチン-遺伝子複合体を血管内皮前駆細胞に取り込ませる技術を開発し、血管内皮前駆細胞の遺伝子導入による機能強化を実現した。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非ウイルス性でかつ導入効率が高い。既存のウイルス性ベクターと比較して、安全面で大きな利点があり、かつ、遺伝子単独投与方法と比べると導入効率において格段に優れている。機能強化したヒト臍帯血由来の血管内皮前駆細胞を病態モデル（ヌードラット）に投与して肺高血圧症に対する細胞-遺伝子ハイブリッド治療法の有効性を昨年の研究で確立した。本年度はこの方法の四肢循環障害の有用性を確認するために、兎の下肢循環障害モデル前臨床試験をで実施する。また再生血管評価のための単色 x 線診断システム（空間解像度50 μ m）の試作機を昨年度に完成させた。本年度はこれを臨床例に応用する。閉塞性末梢動脈疾患に対して再生医療を実施し、その前後の微小血管の変化を本装置で視覚的に評価する。

B. 研究方法

- 1) 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。

- 2) 微小血管造影法の臨床応用：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。

倫理面への配慮：

当センター倫理委員会の審議と承認を得、本検査の合併症効能不利益、利益を説明し、本人および家族の同意の元に本検査を実施した。

C. 研究結果

- 1) 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兎では、同遺伝子単独治療群、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。
- 2) 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 μ 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 μ 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おこなった。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あらたな血管床の観察が確認された。

D. 考察

- 1) カチオン化ゼラチン-遺伝子複合体による遺

伝子導入法は安全でかつ導入効率が高い。カチオン化ゼラチン—adrenomedullin 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 arteiogenesis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。

- 2) 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。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

- 1) 次世代遺伝子ベクター（ゼラチン）を用いて adrenomedullin遺伝子を徐放させることで、血管床の再生が実現されることを証明した。
- 2) 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。

研究協力者：

福山直人(東海大学医学部)
田中越郎 (東京農大)
佐藤英一 (岩手医科大学教養部)

G. 研究発表

論文発表：

1. Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H,.....Mori H, et al: Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*, 109: 351-356, 2004
2. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H,.....Mori H: Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia - Benefits of nonviral vector, gelatin. *Circulation*, 109: 526-531, 2004
3. T.Fujii, N.Nagaya, T.Iwase, S.Murakami, Y.Miyahara, K.Nishigami, H.Ishibashi-Ueda,

M Shrai, T Itoh, K.Ishino, S.Sano, K.Kangawa, H.Mori: Adrenomedullin enhances herapeutic potency of bone marrow transplantation for myocardial infarction in rats. *AJP*, 2004

著書：

Hidezo Mori/Hikaru Matsuda: Cardiovascular Regenerarion Therapies Using Tissue Engineering Approaches. Springer, 2005

学会発表：

海外：

1. 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 Anunual Scientific Seccion 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
2. Chiku M, Nishigami K, Mori H, Development of In-house Micro-angiographic System for Visualizing Collateral Micro-vessels Induced by Regeneration Therapy , The Anunual Scientific Seccion 2004, American College of Cardiology (New Orleans, USA), 2004.3
3. Mori H, Chiku M, Nishibami 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
4. 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

準備中 3件

分担研究報告書

分担課題：遺伝子導入細胞を用いた肺高血圧治療法の開発

分担研究者 永谷 憲歳 国立循環器病センター研究所再生医療部部長

研究要旨

昨年生分解性ゼラチンを遺伝子のベクターとして、*in vitro* でヒト血管内皮前駆細胞や骨髄単核球に効率よく導入する技術を確立した。生分解性ゼラチンは核酸やタンパク質と複合体を形成し、生それらを体内で徐放する性質を持つことから、強力な抗アポトーシス作用を持つインスリン様成長因子 (IGF-1) をゼラチン内に封入し、虚血心筋組織内に直接投与することにより、高い心筋保護効果を示すことを明らかにした。

A. 研究目的

インスリン様成長因子 (IGF-1) は様々な細胞の増殖、生存及び分化に関わるポリペプチドであり、特にその強力な抗アポトーシス作用で知られる。虚血性及び拡張型心筋症モデルにIGF-1を全身投与すると、心筋細胞のアポトーシスを抑制し、心筋細胞の肥大を促進することにより高い心筋保護効果を持つことが証明されている。しかし、IGF-1の半減期が短いために標的組織内で有効濃度を長期間保つことが難しく、高用量を連日皮下投与する必要があった。また、局所での機能蛋白発現を強化するために、従来はウイルスベクターを用いた遺伝子治療が試みられてきたが、ウイルス感染の危険性や効果の不安定性の為に臨床応用は困難である。本分担研究では、蛋白徐放効果をもつ生分解性ゼラチンにIGF-1を封入してゼラチン-IGF-1複合体を作製した。これを虚血心筋内へ直接投与し、IGF-1の心機能改善効果の向上を図った。

B. 研究方法

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。

C. 研究結果

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と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。

D. 考察

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。

E. 健康危険情報

なし。

F. 結論

蛋白徐放効果をもつ生分解性ゼラチンにIGF-1を封入して心筋内投与し、虚血組織内のIGF-1濃度を長期間に維持することで、心筋梗塞による心筋細胞のアポトーシスを抑制し、左室リモデリングの抑制、収縮力の改善を示した。この生分解性ゼラチンを用いたIGF-1の徐放治療は、虚血性心疾患に起因する心不全治療に対する新しい治療戦略となりうる。

研究協力者

宮原義典 (国立循環器病センター研究所心臓生理部)
盛英三 (国立循環器病センター研究所心臓生理部)

G. 研究発表

論文発表

1. 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*. 2005;11: 356-362.
2. 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*. 2005;288: H1444-1450.
3. Nagaya N, Kangawa K. Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension. *Peptides*. 2004; 2511: 2013-2018.
 4. 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*. 2004;109:526-31.
 5. 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*. 2004;109:351-6.
 6. 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*. 2004;109:242-8.
 7. Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S. Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy. *Am J Physiol*. (in press)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

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）
分担研究報告書

分担課題：遺伝子導入細胞の組織移植用シートへの応用

分担研究者 清水 達也 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 講師

研究要旨

本研究では遺伝子導入された細胞のデリバリーシステムとしてシステムとして単離細胞ではなく細胞シートを用いてデリバリーすることにより、より効率的な治療法を確立することを目的としている。昨年度までの研究では基本的な細胞シートの作製ならびに積層化法を確立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。今年度はゼラチンハイドロゲルを用いて遺伝子導入可能な細胞である血管内皮前駆細胞（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。

A. 研究目的

ゼラチンハイドロゲルを用いて遺伝子導入可能な細胞である血管内皮前駆細胞（EPC）のデリバリーシステムとして標的臓器に直接あるいはカテーテルを用いて経皮経管的に移植する方法が考えられる。これら単離細胞のインジェクションによる移植法は既に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。そこで本研究ではEPCと線維芽細胞を共培養することで重層化細胞シートを作成し、虚血心筋モデルへの移植、その効果を解

析した。

B. 研究方法

シート状の細胞の回収には当研究所で開発された温度応答性培養皿を用いた。この培養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℃では疎水性表面となり細胞接着性であるが、32℃以下の低温処理で親水性表面に変化し細胞非接着性となる。細胞を密に培養し細胞が互いに接着した状態では、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℃）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成した。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。実験動物を使用した実験に関しては東京女子医科大学動物実験に関する指針に従い、ヘルシンキ宣言の精神を尊重して十分な倫理的配慮のもとに行った。

C. 研究結果

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

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

温度応答性培養皿を用いた細胞シート移植法は細胞のより効率的な移植を可能とし今後の再生医療に大きく貢献するものと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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)
- 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)
- 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

- Kobayashi H, Shimizu T et al. Fibroblast cell sheets co-cultured with endothelial progenitor cells improve cardiac function of infarcted heart.. The 69th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. 2004.3 Yokohama
- Shimizu T, Okano T. Pulsatile tissue grafts: getting rid of old scaffolds? European Society of Cardiology 2004 2004.8 Munich

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
Nagaya N, Fukuyama N, Tabata Y, Mori H.	Potential of Regenerative Therapy by Non-Viral Vector, Gelatin Hydrogel	Mori H, Matsuda H.	Cardiovascular Regeneration Therapies Using Tissue Engineering Approaches	Springer	東京	2005	17-30

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hosseinkhani H, Tabata Y.	PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences Pronectin.	J. Control. Release.	97(1)	157-171	2004
Hosseinkhani H, Azzam T, Tabata Y, Domb AJ.	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.	Biomacromolec ules.	5(1)	202-8	2004
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
Kimura T, Okuno A, Miyazaki K, Furuzono T, Ohya Y, Ouchi T, Mutsuo S, Yoshizawa H, Kitamura Y, Fujisato T, Kishida A.	Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery	Mater. Sci. Eng. C	24(6-8)	797-801	2004
Iwami Y, Masuda H, Asahara T.	Endothelial progenitor cells: past, state of the art, and future	J Cell Mol Med.	8(4)	488-497	2004

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
Nagaya N, Kyotani S, Uematsu M, Ueno K, Oya H, Nakanishi N, Shirai M, Mori H, Miyatake K, Kangawa K.	Effects of adrenomedullin inhalation on hemodynamics and exercise capacity in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension	Circulation	109(3)	351-356	2004
Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H.	Adrenomedullin gene transfer induces therapeutic angiogenesis in a rabbit model of chronic hind limb ischemia: benefits of a novel nonviral vector, gelatin	Circulation	109(4)	526-531	2004
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(3)	H1444- H1450	2005

Nagaya N, Kangawa K.	Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension.	Peptides	25(11)	2013-2018	2004
Okumura H, Nagaya N, Itoh T, Okano I, Hino J, Mori K, Tsukamoto Y, Ishibashi-Ueda H, Miwa S, Tambara K, Toyokuni S, Yutani C, Kangawa K.	Adrenomedullin infusion attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway.	Circulation	109(2)	242-248	2004
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	111(3)	356-362	2005
Nagaya N, Mori H, Murakami S, Kangawa K, Kitamura S	Adrenomedullin: angiogenesis and gene therapy.	Am J Physiol			in press
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(10)	74-78	2004
清水達也	組織工学の心血管病への応用	分子血管病	58(1)	58-64	2004
清水達也	組織工学における血管新生	血管医学	5(6)	41-48	2004



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Journal of Controlled Release 97 (2004) 157–171

Journal of
controlled
release

www.elsevier.com/locate/jconrel

GENE DELIVERY

PEGylation enhances tumor targeting of plasmid DNA by an artificial cationized protein with repeated RGD sequences, Pronectin®

Hossein Hosseinkhani, Yasuhiko Tabata*

Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, 53 Kawara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

Received 25 August 2003; accepted 13 February 2004

Available online 17 April 2004

Abstract

The objective of this study is to investigate feasibility of a non-viral gene carrier with repeated RGD sequences (Pronectin F⁺) in tumor targeting for gene expression. The Pronectin F⁺ was cationized by introducing spermine (Sm) to the hydroxyl groups to allow to polyionically complex with plasmid DNA. The cationized Pronectin F⁺ prepared was additionally modified with poly(ethylene glycol) (PEG) molecules which have active ester and methoxy groups at the terminal, to form various PEG-introduced cationized Pronectin F⁺. The cationized Pronectin F⁺ with or without PEGylation at different extents was mixed with a plasmid DNA of LacZ to form respective cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes. The plasmid DNA was electrophoretically complexed with cationized Pronectin F⁺ and PEG-introduced cationized Pronectin F⁺, irrespective of the PEGylation extent, although the higher N/P ratio of complexes was needed for complexation with the latter Pronectin F⁺. The molecular size and zeta potential measurements revealed that the plasmid DNA was reduced in size to about 250 nm and the charge was changed to be positive by the complexation with cationized Pronectin F⁺. For the complexation with PEG-introduced cationized Pronectin F⁺, the charge of complex became neutral being almost 0 mV with the increasing PEGylation extents, while the molecular size was similar to that of cationized Pronectin F⁺. When cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes with or without PEGylation were intravenously injected to mice carrying a subcutaneous Meth-AR-1 fibrosarcoma mass, the PEG-introduced cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complex specifically enhanced the level of gene expression in the tumor, to a significantly high extent compared with the cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes and free plasmid DNA. The enhanced level of gene expression depended on the percentage of PEG introduced, the N/P ratio, and the plasmid DNA dose. A fluorescent microscopic study revealed that the localization of plasmid DNA in the tumor tissue was observed only for the PEG-introduced cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complex injected. We conclude that the PEGylation of cationized Pronectin F⁺ is a promising way to enable the plasmid DNA to target to the tumor for gene expression. © 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Tumor targeting; Enhanced gene expression; Pronectin; Cationization; PEGylation

* Corresponding author. Tel.: +81-75-751-4121; fax: +81-75-751-4646.
E-mail address: yasuhiko@frontier.kyoto-u.ac.jp (Y. Tabata).

1. Introduction

One of the major goals for *in vivo* gene therapy is to achieve the specific delivery of gene to a target tissue. For such successful gene delivery, there are many issues to be overcome. The *in vivo* gene expression depends on the body distribution of DNA intravenously injected which is greatly influenced by anatomical feature of tissue/organ and the interaction manners with biological fluids, extracellular matrix (ECM), and cells.

The simple injection of plasmid DNA solution only shows a very low efficiency of gene transfection. When a plasmid DNA is intravenously injected without any combination of the carrier vector, 60–70% of plasmid DNA injected is cleared up from the blood circulation by Kupffer cells [1,2]. In addition, the plasmid DNA is enzymatically degraded in the blood circulation [3]. On the other hand, even if a plasmid DNA is complexed with the vector, it is well recognized that the molecular size and surface charge of complex obtained affect the body fate of plasmid DNA. For example, the complex of plasmid DNA with cationic liposomes is mainly accumulated in the lung, liver, and spleen [4–8]. As one trial to change the body fate, the liposome surface has been modified by polymers, such as poly(ethylene glycol) (PEG) and other hydrophilic polymers [9–12]. This modification enabled the plasmid DNA to prolong the half-life in the blood circulation. For the gene delivery study, various cationic polymers and lipids have been used to form the complex with plasmid DNA. The size, charge, and surface characteristics of complexes have great influence on the fate of plasmid DNA in the body as well as the property to protect the plasmid DNA from enzymatic degradation [3,5,13–19].

There are several researches on the gene therapy for tumor. A promising therapeutic result was initially reported for melanoma by the intratumoral injection of a plasmid DNA–liposome complex [20]. Based on research results by various tumor-bearing animal models, the *in vivo* tumor gene therapy by the plasmid DNA complexed with non-viral vectors was not really successful [21,22]. As one trial, the targeting of plasmid DNA to the tumor has been experimentally performed [23,24]. The ligands for tumor cell receptors have been incorporated into the vector materials of plasmid DNA to expect the natural receptor-mediated

endocytosis. One of the practically available ligands is transferrin, an iron-transporting serum glycoprotein which binds to a receptor expressed strongly on the surface of most proliferating cells, such as erythroblasts and tumor cells [25]. For example, tumor targeting of a plasmid DNA was achieved through complexation with low-molecular-weight polyethylenimine (PEI) covalently coupled to transferrin [26]. Chemical modification of liposomes surface by monoclonal antibodies or other targeting moieties specific to tumor cells has been proposed for the tumor-specific delivery of plasmid DNA [27–33].

The newly formed vasculature in the tumor tissue has a high substance permeability compared with that of normal tissues, while lymphatic systems are immature in the tumor tissue. These anatomical features enable macromolecules and liposomes to accumulate and remain in the perivascular regions of solid tumors for a longer time period than in the normal tissue, which is referred as the enhanced permeability and retention (EPR) effect [34–36]. It has been demonstrated that conjugation with water-soluble polymers, such as poly(vinyl alcohol), poly(ethylene glycol), and dextran, increases the accumulation of drugs in the tumor tissue as well as prolongs their life-time in the blood circulation [37–45]. This passive drug targeting is supposed not only to facilitate the tumor therapeutic effect, but also to attenuate the adverse effects, because the amount of drugs associated with non-targeted tissues is acceptably reduced. It has been demonstrated that the PEGylation of drugs and plasmid DNA–vector complexes suppressed their interaction with plasma components and erythrocytes and prolonged the circulated period in the blood, resulting in the enhanced therapeutic effects and gene expression in the tumor tissue even after systemic administration [46–54].

The basic idea of research approach with non-viral vectors is not only to neutralize the negative charge of plasmid DNA, but also to condense the DNA size by polyion complexation with various polymers and liposomes of positive charge [55–58]. It is likely that the plasmid DNA complex condensed in size and having a positive charge effectively interacts with cells to accelerate the internalization, resulting in the enhanced efficiency of gene transfection. However, since this complex–cell interaction is based on the simple and nonspecific electrostatic force, a more efficient and cell-specific cell transfection cannot be

always expected. One of practically possible ways to improve this limited situation is to take advantage of cell receptor systems which play an important role in the specific cellular uptake of several substances. In this study, we selected and used a ligand specific to the cell receptor as the non-viral vector of plasmid DNA. The sequence of RGD (arginine-glycine-aspartic acid) has been discovered as a cell attachment moiety in various adhesive proteins present in the extracellular matrix (ECM), and found in many proteins, such as fibronectin, collagen type 1, vitronectin, fibrin, and Von Willebrand Factor [59]. It has been well recognized that the sequence interacts with various types of integrin receptors. There are several ports on the synthesis of polymers incorporating the RGD sequence [60]. Some polymers comprised of repeated blocks of RGD sequence have been genetically synthesized to assess their therapeutic effects [61,62]. Pronectin® is an artificially synthesized protein which has a silk-like protein (SLP) backbone into which the amino acid sequence with an inherent ability for biological recognition is introduced. Among them, Pronectin F consists of two types of oligopeptide blocks, a SLP sequence of six amino acids and a human fibronectin (FN) sequence of 17 amino acids including RGD [63,64]. The SLP sequence gives Pronectin F structural stability, thermal and chemical resistance, and the nature susceptible to the adsorption to hydrophobic surfaces, while the FN sequence contributes to the activity of biologically specific cell adhesion [65]. One RGD sequence is configured into nine times of repeating SLP sequence and localized on the surface of Pronectin F molecules. This is because the Pronectin F possesses the nature to enhance the cell attachment through interaction of the repeated RGD sequence with the integrin receptor of cells. Pronectin F has been explored as a coating reagent of cell culture dishes. The Pronectin F coating is found to promote the adhesion of more than 50 types of animal cells onto the surface of polymer substrates, like polystyrene, polyester, and Teflon, because of the RGD sequence [62]. It is possible that Pronectin F is readily adsorbed onto the polymer surface based on the hydrophobic interaction force. Pronectin F is not water-soluble since the SLP sequence forms strong hydrogen bonds intermolecularly. To break the bonds, the hydroxyl groups of Pronectin F serine

residues are chemically modified by introducing dimethylaminoethyl groups to make Pronectin F water-soluble (Pronectin F⁺). This Pronectin F⁺ is water-soluble and has 13 of RGD sequences in one molecule which contribute to the strong cell adhesion via the integrin receptors. The integrin is a membrane protein which is apparently always present on angiogenic, or newly growing, blood vessels but rarely on established ones. Various studies in recent years have shown that $\alpha_v\beta_3$ integrin is up-regulated on angiogenic endothelial cells, and can therefore be considered as a target molecule [66]. The integrin, $\alpha_v\beta_3$, has another quality that would turn out to be convenient; it can propel viruses or other small particles into cells. Their crucial role in tumor growth-related angiogenesis and their location in the body make angiogenic endothelial cells to be an important candidate of target cells for therapeutic intervention [67]. Many molecules specifically expressed by tumor endothelial cells have been proposed as target molecules for vascular targeting strategies [68]. The integrin $\alpha_v\beta_3$ was previously identified as a target molecule on angiogenic endothelium [69]. It can interact with various RGD sequence-containing extracellular matrix components [70]. Peptides containing this RGD sequence in a constrained configuration inhibited angiogenesis based on induction of endothelial cell apoptosis in tumors and inflammatory sites [71,72]. Tumor vasculature can be targeted by non-viral vector containing an RGD sequence, which binds to $\alpha_v\beta_3$ and $\alpha_v\beta_5$ integrins on angiogenic endothelial cells.

This study was undertaken to investigate feasibility of Pronectin F⁺ with RGD sequences in targeting a plasmid DNA to the tumor tissue for gene expression. To give the Pronectin F⁺ cationized charges necessary for the formation of polyion complexation with the plasmid DNA, spermine (Sm) was introduced into the hydroxyl group of serine residues in Pronectin F⁺. Cationized Pronectin F⁺ with different extents of aminization was prepared by changing the conditions of amine introduction. The cationized Pronectin F⁺ was then reacted with PEG and mixed with a plasmid DNA encoding LacZ in aqueous solution to assess the zeta potential and molecular size of cationized Pronectin F⁺-plasmid DNA complexes with or without PEGylation. Following intravenous injection of the complexes of cationized Pronectin F⁺ with or without

PEGylation and plasmid DNA to mice, the gene expression in the tumor was compared with that in other tissues to assess the tumor targetability from the viewpoint of gene expression level and histological examination.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Pronectin F⁺ (molecular weight (Mw)=110,000) was kindly supplied from Sanyo Chemical Industries, Ltd., Kyoto, Japan. Succinimidyl succinate-methoxy PEG (MEC-PEG, molecular weight (Mw)=5250) was kindly supplied from Nihon Oil Fat, Tokyo, Japan and was used as obtained. Spermine (Sm) was purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan and was used as obtained. 2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS), and β -alanine were purchased from Nacalai Tesque, Kyoto, Japan and was used without further purification. As coupling agents, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride salt (EDC) and *N,N'*-carbonyldiimidazole (CDI), and DNA MW Standard Marker (1-kb DNA Ladder) were obtained from Dojindo Laboratories, Kumamoto and Takara Shuzo, Co. Ltd., Shiga, Japan, respectively. Rhodamine B isothiocyanate (RITC) was obtained from Sigma-Aldrich Japan K.K., Tokyo, Japan.

2.2. Preparation of plasmid DNA

The plasmid DNA used was the expression vector consisting of the coding sequence of LacZ and a SV40 promoter inserted at the upstream (pSV-LacZ, 7931 bp). The plasmid DNA was amplified in a transformant of *E. coli* bacteria and isolated from the bacteria by Qiagen Maxi kit-25 (Qiagen K.K., Tokyo, Japan). The absorbance ratio at the wavelength of 260 to 280 nm for purity assessment of plasmid DNA obtained was measured to be between 1.8 and 2.0.

2.3. Preparation of cationized Pronectin F⁺

Cationized Pronectin F⁺ with different extents of aminization was prepared by introduction of Sm into

the hydroxyl group of serine residues in Pronectin F⁺ based on the conventional CDI method [73]. Briefly, varied amounts of Sm together with varied amounts of CDI were added to 5 ml of dehydrated dimethyl sulfoxide containing 5 mg of Pronectin F⁺. The reaction solution was agitated at 25 °C for 20 h to introduce Sm residue to the hydroxyl groups of Pronectin F⁺, followed by dialysis against double-distilled water (DDW) for 2 days and freeze-dry to obtain the Sm-derivatives of Pronectin F⁺. The molar percentage of Sm introduced into the hydroxyl groups was quantitated by the conventional TNBS method [74] based on the calibration curve prepared by using β -alanine.

2.4. Preparation of PEG-introduced cationized Pronectin F⁺ and the complexation with plasmid DNA

PEG-introduced cationized Pronectin F⁺ with different extents of PEGylation was prepared by introduction of succinimidyl succinate-methoxy PEG (MEC-PEG) into the amine group of Sm residue in Pronectin F⁺. Briefly, varied amounts of MEC-PEG were added to 10 ml of dehydrated dimethyl sulfoxide containing 10 mg of Pronectin F⁺. The reaction solution was agitated at 25 °C for 16 h to introduce MEC-PEG to the terminal amine group of Sm residue of Pronectin F⁺, followed by dialysis against DDW for 2 days and freeze-drying to obtain PEG-introduced cationized Pronectin F⁺. The molar percentage of PEG introduced into the amine groups was quantitated by the conventional TNBS method [74] based on the calibration curve prepared by using β -alanine.

Complexation of cationized Pronectin F⁺ with or without PEGylation with the plasmid DNA was performed by simple mixing the two materials at various charge ratios in aqueous solution. Briefly, 150 μ l of 0.1 M phosphate-buffered saline solution (PBS, pH 7.4) containing 10, 50, 100, 200, 300, 400, and 500 μ g of cationized Pronectin F⁺ with or without PEGylation was added to the same volume of PBS containing 10 μ g of plasmid DNA. The solution was gently agitated at 37 °C for 30 min to form cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes with or without PEGylation. The charge ratio (N/P) was presented as the molar ratio of cationized Pronectin F⁺ nitrogen to plasmid DNA phosphate. Therefore, the N/P ratios of 0.25,

0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, and 2.3 were chosen for the following experiments of cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complex.

2.5. Electrophoresis of cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes with or without PEGylation

Cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes with or without PEGylation of different extents were prepared at various N/P ratios according to the same procedure as described above. The complex samples were electrophoresed for 40 min at 100 V in 0.75 wt.% of agarose gel by 45 mM Tris–Borate and 1 mM EDTA buffer (pH 8.0). The gel was stained with 0.5 mg/ml ethidium bromide solution for 30 min to visualize the localization of plasmid DNA with a Gel Doc 2000 (Bio-Rad Laboratories, Tokyo, Japan).

2.6. Measurement of dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic light scattering (ELS)

The complexes of cationized Pronectin F⁺ with or without PEGylation and plasmid DNA at various N/P ratios were prepared by the similar procedure described above. Every solution was filtered through a 0.45 μm filter (Millex-HV, Millipore) prior to mixing. The mixed plasmid DNA and cationized Pronectin F⁺ with or without PEGylation was placed in a DLS cell and DLS measurement was carried out using a DLS-DPA-60HD instrument (Otsuka Electronic Co. Ltd., Osaka, Japan) equipped with an Ar⁺ laser at a detection angle of 90° at 37 °C for 30 min and performed three times for every sample. The corresponding hydrodynamic radius, R_s , can be calculated from Einstein–Stokes' equation: $R_s = kT/3\pi\eta D$, where k is the Boltzman constant, T is the absolute temperature, η is the solvent viscosity, and D is translational diffusion coefficient obtained from the DLS measurements. In the present study, the autocorrelation function of samples was analyzed based on the cumulants method and the R_s value was automatically calculated by the equipped computer software and expressed as the apparent molecular size of samples.

ELS measurement was carried on an ELS-7000AS instrument (Otsuka Electronic Co. Ltd., Osaka, Japan) for mixed plasmid DNA and cationized Pronectin F⁺ with or without PEGylation aqueous solution at 37 °C

and an electric field strength of 100 V/cm. The ELS measurement was done three times for every sample. The zeta potential (ζ) was automatically calculated using the Smoluchowski equation based on the electrophoretic mobility measured $u:\zeta = 4\pi\eta u/\varepsilon$, where η and ε are the viscosity and the dielectric constant of the solvent, respectively.

2.7. In vivo experiments

Meth-AR-1 fibrosarcoma cells (6×10^7 cells/ml RPMI-1640 culture medium) maintained by the in vivo passage in the intraperitoneal cavity of CDF₁ male mice, aged 5–6 weeks (Oriental Bioservice, Kyoto, Japan), were subcutaneously inoculated at a volume of 0.02 ml into back of male CDF₁ mice (6 weeks). All the experimental procedures were performed according to the specifications of Guideline for Animal Experiments of Kyoto University.

CDF₁ mice carrying a tumor mass of 5 mm in the average diameter on the back subcutis received an intravenous injection of PBS or that containing free plasmid DNA, cationized Pronectin F⁺, PEG-introduced cationized Pronectin F⁺, and cationized Pronectin F⁺–plasmid DNA complexes with or without PEGylation in a volume of 200 μl. After intravenous injection of the complexes or other agents to mice, mice were sacrificed with cervical dislocation, and the blood sample was taken out directly from the heart by syringe aspiration and the organs of mice were taken 2 days later, washed with PBS, frozen in liquid nitrogen, and stored at –85 °C. The organ samples were subjected to the gene expression assay.

2.8. Evaluation of gene expression

For evaluation of gene expression, β-galactosidase activity was measured by use of Invitrogen kit (Invitrogen Co., CA, USA). Briefly, the tumor and organ samples were immersed and homogenized in the lysis buffer (0.1 M Tris–HCl, 2 mM EDTA, 0.1% Triton X-100) at the lysis buffer volume (ml)/sample weight (mg) ratio of 4 to 1 in order to normalize the influence of weight variance on the β-galactosidase assay. The sample lysate (2 ml) was transferred to a centrifuge tube, followed by freeze-and-thaw three times and centrifugation at 14,000 rpm at 4 °C for 5

min. The supernatant (30 μ l) was mixed with 70 μ l of 4 mg/ml *o*-nitrophenyl β -D-galactopyranoside (ONPG) aqueous solution and 200 μ l of cleavage buffer (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, and 1 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, pH 7) in a fresh microcentrifuge tube. After incubation at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min, 500 μ l of 1 M sodium carbonate solution was added to the solution mixture. The solution absorbance was measured at the wavelength of 420 nm for β -galactosidase activity. Each experiment was done for three mice independently unless mentioned otherwise.

2.9. Fluorescent microscopic observation

For the fluorescent labeling of plasmid DNA, the pSV-LacZ and RITC were mixed in 0.2 M sodium carbonate-buffered solution (pH 9.7) at 4 $^\circ\text{C}$ for 12

h at both the concentrations of 1 mg/ml. Then, the reaction mixture was applied to gel filtration of a PD 10 column (Amersham Pharmacia Biotech K.K., Tokyo, Japan) to separate the non-reacted RITC from the RITC-labeled pSV-LacZ, followed by ethanol precipitation for collection.

Aqueous solution of 2 mg/ml RITC-labeled plasmid DNA (50 μ l) was mixed with 40 μ l of cationized Pronectin F^+ with or without PEGylation at the N/P molar ratio of 2.3 for the complex of PEG-introduced cationized Pronectin F^+ -plasmid DNA. After intravenous injection of the complexes, the tumor was taken 2 days later and embedded in Tissue-Tek (OCT Compound, Miles Inc., IN, USA). The cryosections (5- μm thickness) of the tumor samples were prepared to view the fluorescent localization of plasmid DNA on Olympus AX-80 fluorescence microscope equipped with Olympus

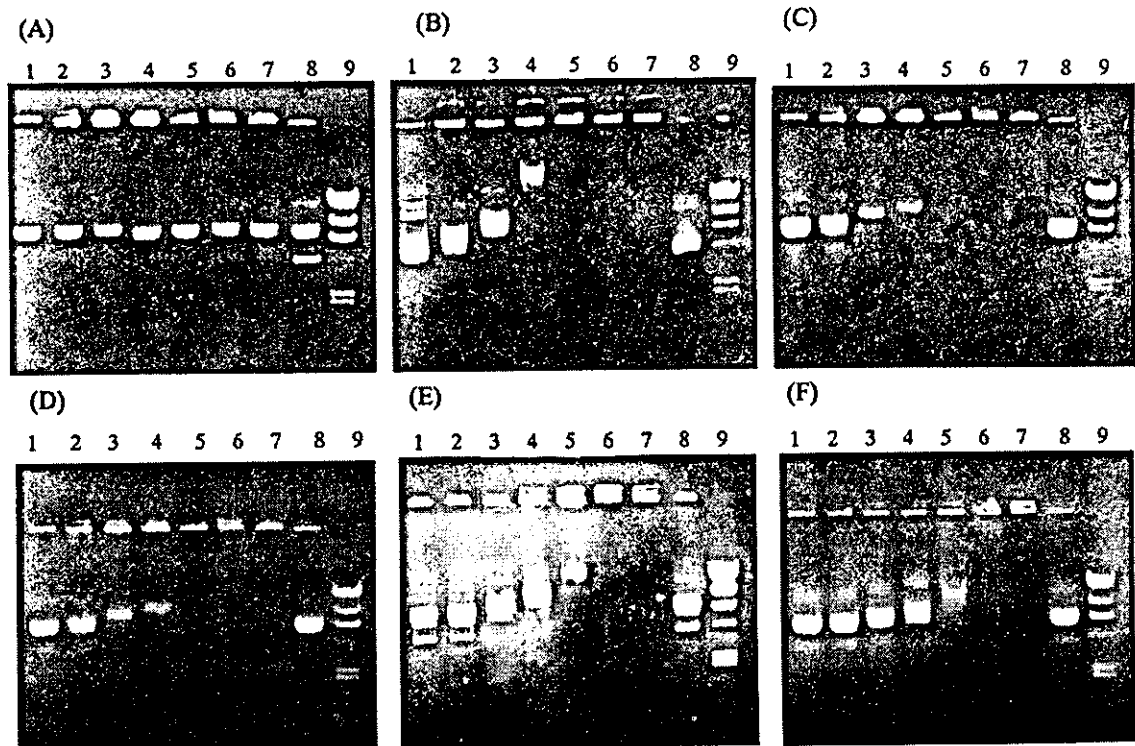


Fig. 1. Electrophoretic patterns of plasmid DNA complexes with Pronectin F^+ , cationized Pronectin F^+ , and PEG-introduced cationized Pronectin F^+ with different extents of PEGylation and different charge ratios (N/P) of cationized Pronectin F^+ to plasmid DNA: (A) original Pronectin F^+ , (B) cationized Pronectin F^+ , (C) PEG-introduced cationized Pronectin F^+ (5.1 mol% introduced), (D) PEG-introduced cationized Pronectin F^+ (10.1 mol% introduced), (E) PEG-introduced cationized Pronectin F^+ (20.1 mol% introduced), and (F) PEG-introduced cationized Pronectin F^+ (50.1 mol% introduced). Lanes 1–7: the N/P molar ratios of 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, and 2.3. Lane 8: free plasmid DNA. Lane 9: DNA marker.