

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

高中性脂肪血症に関わる新規遺伝子の探索と機能解析
高中性脂肪ウサギのプロテオーム解析

分担研究者 友池仁暢（国立循環器病センター病院長）

研究要旨

高中性脂肪血症は、メタボリックシンドロームの重要な所見の1つであり、その動脈硬化発症のリスクとして注目を集めつつある。しかしながら高中性脂肪血症は、動脈硬化の発生や進展への関わりメカニズムや遺伝的背景には不明な点が多い。我々は、高中性脂肪血症の病因と病態生理を解明するため、WHHL ウサギより、高度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)と軽度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGL)の分離に成功した。昨年度の本研究成果により、肝臓組織のプロテオーム解析によって TGH と TGL の肝臓での蛋白質発現の違いを検討し、TGH に発現を認めず、TGL に発現しているスポットが Carboxylesterase であり、TGL に発現を認めず TGH に発現しているスポットが Acyl CoA dehydrogenase であることがわかった。TGH と TGL の大きな違いは、血中中性脂肪値と脂肪組織量である。TGH は、TGL に比べて脂肪組織量が少なく、体重も少ない。本年度の研究では、TGH および TGL の脂肪組織を用いてプロテオーム解析を行った。TGL および TGH の脂肪組織を用いた二次元電気泳動では、約 110 個のスポットを得た。これらのスポットのうち、TGH と TGL で蛋白質の発現量に大きな違いのあるスポットについて、質量分析計 (MS-MS) を用いて分析を行った。TGH に比して TGL に多く発現しているスポット 3 個は、20 alpha-dehydrogenase、Annexin A2、Peroxiredoxin 2 であることが同定された。

研究協力者
国立循環器病センター研究所
バイオサイエンス部
斯波真理子
前田律子
薬理部
南野直人
佐々木一樹
桑原大幹
山形大学医学部
附属動物実験施設
伊藤恒賢

A. 研究目的

高中性脂肪血症は、メタボリックシンドロームの症候の重要なものであり、動脈硬化の危険因子の重要な因子として認識されてきている。しかしながら、高中性脂肪血症の病因について、多くはわかっていない。我々は、高中性脂肪血症の遺伝的背景、病態、および動脈硬化発生、進展への関わりなどを探るため、著明な高中性脂肪血症を呈する新しい動物モデルの作製に成功した。我々は、高中性脂肪血症を呈する WHHL ウサギを選択的に交配することにより、高度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)と軽度の高中性脂肪血症を呈するライン(TGL)を分離したのである。

TGL は、通常の本日本白色ウサギに比し、血清中性脂肪値はやや高値であり、一方、TGH は空腹時においても著明な高中性脂肪血症を呈していた。TGL と TGH は中性脂肪代謝を除く他の遺伝的背景が均一であることから、高中性脂肪血症の影響や原因遺伝子群の探索に適している。また、WHHL ウサ

ギのホモ接合体をバックグラウンドとしているので、著明な高 LDL コレステロール血症を呈し、動脈硬化発症、進展のモデル動物としても適当であると考えられる。昨年度の本研究成果により、肝臓組織のプロテオーム解析によって TGH と TGL の肝臓での蛋白発現の違いを検討し、TGH に発現を認めず、TGL に発現しているスポットが Carboxylesterase であり、TGL に発現を認めず TGH に発現しているスポットが Acyl CoA dehydrogenase であることがわかった。TGH と TGL の大きな違いは、血中中性脂肪値と脂肪組織量である。TGH は、TGL に比べて脂肪組織量が少なく、体重も少ない。本年度の研究では、TGH および TGL の脂肪組織を用いてプロテオーム解析を行った。

B. 研究方法

1. 脂肪組織サンプルの採取と調製

ペントバルビタールを静注して、TGL および TGH を麻酔し、脂肪組織を切り出し、細切後、液体窒素中で凍結、 -70°C に保存した。サンプル調製時には、ホモゲナイズ用バッファー(40 mM Tris、4% CHAPS、8 M urea)に浸し、ポリトロンを用いてホモゲナイズした。

2. 二次元電気泳動

一次元電気泳動は、Immobiline[®] (Amersham) pH 3-10 を用い、12 時間の膨潤の後、50 V 1 時間、100 V 1 時間、800 V 8 時間、等電点電気泳動を行った。ストリップを DTT 10 mg/ml 含有平衡化バッファー中に浸して平

平衡化し、ヨードアセトアミド 25 mg/ml 含有平衡化バッファーに浸して平衡化した。平衡化したストリップを DAL T 12.5 ゲルにセットし、6W で 18 時間、二次元目の電気泳動を行った。電気泳動後、ゲルを 10% 酢酸、40% エタノール中で固定、クマシーブリリアントブルー染色を行い、スキャナーを用いて画像ファイルとした。

3. 質量分析計用サンプルの調製

ゲルから目的のスポットを切り出し、脱色液(50% アセトニトリル、25 mM 重炭酸アンモニウム)中で脱色し、アセトニトリルで脱水後、プロテアーゼ溶液(100 µg/ml トリプシン、5% アセトニトリル、0.1% octyl-β-glucoside、100 mM NH₄HCO₃)を加え、37°C で 18 時間反応させた。Zip Tip を用いて脱塩後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。

4. 質量分析計による分析

マトリックス支援レーザー脱離イオン化/飛行時間型質量分析計(MALDI-TOF MS)および MS-MS による分析を行った。

(倫理面への配慮)

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、動物愛護に配慮した。飼育は各施設付属の動物管理施設

にて一括管理されている。

C. 研究結果、考察

それぞれのウサギから脂肪組織を採取し、二次元電気泳動を行ったところ、図 1 および図 2 のようにそれぞれ約 110 個のスポットを認めた。



図 1. TGL の脂肪組織の二次元電気泳動

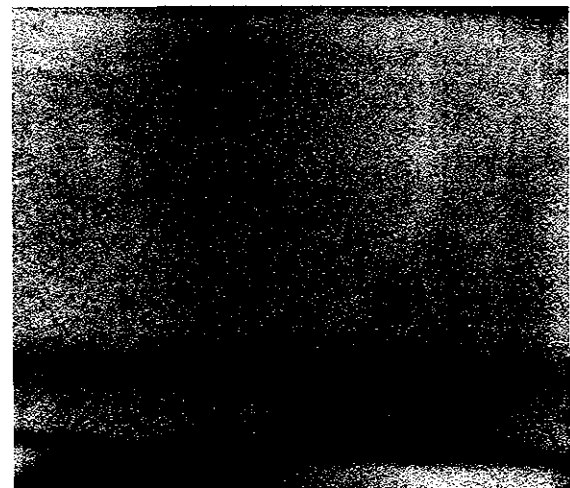


図 2. TGH の脂肪組織の二次元電気泳動

このスポットを Imagemaster Lab Scan を用いて解析し、濃さに大きな違いのあるスポットをピックアップした。二次元電気泳動パターンそれぞれの拡大写真を図3と4に示す。

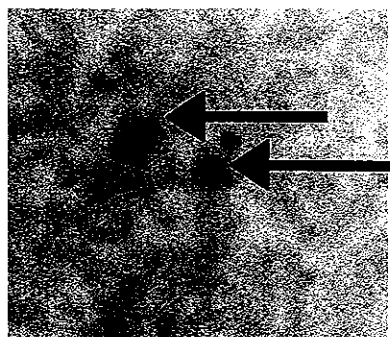


図3. TGLの脂肪組織の二次元電気泳動拡大図

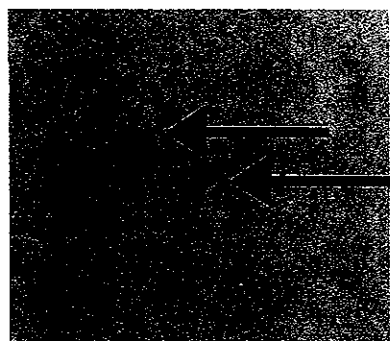


図4. TGHの脂肪組織の二次元電気泳動拡大図

図3の上の矢印は、TGLでは大きなスポットが認められたが、図4のTGHでは小さい薄いスポットとして認められた。図3の下の方の矢印は、スポットが認められるが、図4のそれに相当する部位にはスポットを認めない。さらにこのスポットを含む数個のスポットの部分のゲル

を切り出した。脱色し、トリプシンによるゲル内消化を行い、脱塩の操作の後、質量分析計用サンプルプレートにスポットした。MALDI-TOF-MSを用いてトリプシンによる切断されたペプチドフラグメントの解析を行った。図3の上の矢印のスポットの解析により、図5のようなマススペクトルを得た。

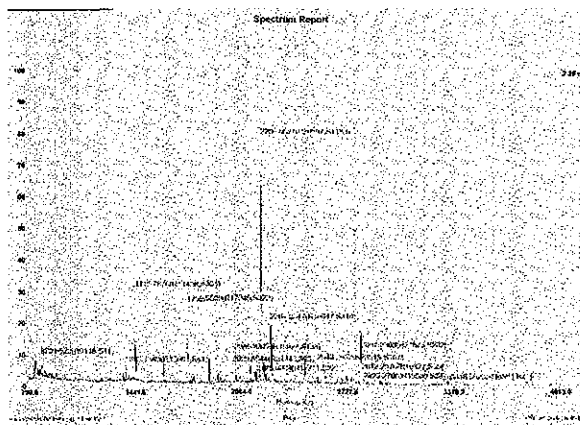


図5. マススペクトル

データベース検索をしたところ、このペプチドフラグメントのパターンは、既知の蛋白質のものではないことがわかった。ウサギの蛋白質のデータベースが、ヒトやマウスのもとは異なり、充実していないためであると考えられた。また、MALDI-TOF-MS法で得られるデータは、トリプシン消化により切断されたペプチドフラグメントの長さであるので、切断されるアルギニンおよびリジンの位置が種差によって異なるため、ヒトのデータに合致しない可能性も考えられた。次に、MS-MSを用いて同じサンプルを解析した。MS-MSは、シーケンスの情報も得られることから、MALDI-TOF-

MS より多くの情報が得られると考えられた。MS-MS により、GIVLVAYSALGSHR のペプチドが、ウサギの 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase とマッチし、Probability Based Mowse Score が 60 (38 以上で同定と判断出来る) であった(図 6)。

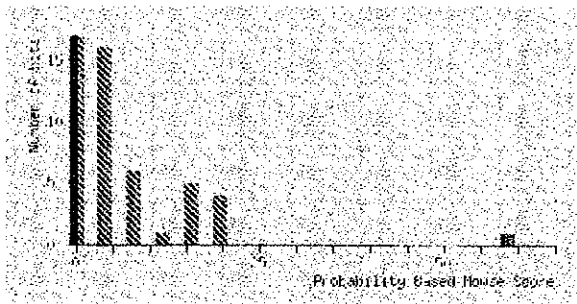


図 6. Probability Based Mowse Score

また、図 3 の下の矢印のスポットは、MS-MS により、8 つのペプチドが Annexin A2 と一致し、Probability Based Mowse Score は 108 であった。さらに、TGL に多く発現していたスポットは、Peroxioredoxin 2 であることが 3 つのペプチドが一致し、Probability Based Mowse Score が 83 であることから、同定された。以上より、TGL と TGH の脂肪組織において、発現量に差異のある蛋白質 3 つが同定された。

現在、ノックアウトマウスやトランスジェニックマウスなど、遺伝子を操作して疾患モデル動物を作製できる。しかしながら、マウスは cholesterol ester-transfer protein (CETP) を欠損しているため、ヒトの動脈硬化進展モデルにはなりにくい。ウサギは CETP を有し、そのリポ蛋白代謝がヒトに似通っている

ため、動脈硬化のモデルとして適当と考えられる。我々は、WHHL ウサギから、高中性脂肪血症を呈するライン(TGH)を得た。TGH は、著明な高コレステロール血症に加え、高中性脂肪血症も呈している。最近我々は、TGH が TGL および日本白色ウサギに比し、アセチルコリンに対する内皮依存性弛緩反応が低下していることを報告した (Life Sciences, 74, 1487-1501, 2004)。これは、高コレステロール血症をベースにした高中性脂肪血症の、血管内皮機能への作用が明らかになったもので、このモデル動物の有用性を示すものと考えられる。

本研究で、TGL の脂肪組織に多量に発現し、TGH の脂肪組織に発現を少ない蛋白質が 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase、Annexin A2、Peroxioredoxin 2 であると同定された。20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase は、プロゲステロンを 20alpha-hydroxy progesterone に異化して不活性化する過程を担っている、胎盤、卵巣、肝臓、脂肪組織に存在する蛋白である。肥満の個体の内臓脂肪に多く存在することも知られている。脂肪組織量の少ない TGH に、この蛋白の発現が低いことをあわせると、TGH の病態に関連が深いと考えられる。Annexin A2 は、胎盤において phospholipase A2 の阻害作用活性をもつことから同定され、後に ubiquitous に存在する蛋白であることがわかった。Annexin A2 ノックアウトマウスでは、フィブリンの沈着が阻害されること、plasminogen activator 依存性 plasmin 合成が阻害されることが知られている。Peroxioredoxin は、酸

化ストレスによって発現誘導される蛋白であり、ubiquitous に存在する。Pero xiredoxin ノックアウトマウスでは、脾腫、血中の reactive oxygen species (ROS)の増加が報告されている。これらの蛋白の TGH の病態への関与に関し、さらに検討が必要である。

脂肪組織での発現蛋白質を解析することにより、さらに病態の把握に重要な蛋白質を知ることができる。また、動脈硬化巣での蛋白質の発現を解析することにより、動脈硬化の発症のメカニズムにまでせまることができるのではないかと考えられる。

D. 結論

高脂血症ウサギの脂肪組織のプロテオーム解析を行い、興味ある知見を得た。

E. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性はない。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsunaga T, Takasaki S, Masakane I, Okazaki M, Tomoike H. Changes in lipoprotein profile after selective LDL apheresis.

Intern Med. 2004 Aug;43(8):760.

2. Sakata T, Mannami T, Baba S, Kokubo Y, Kario K, Okamoto A, Kumeda K, Ohkura N, Katayama Y, Miyata T, Tomoike H, Kato H. Potential of free-form TFPI and PAI-1 to be useful markers of early atherosclerosis in a Japanese

general population (the Suita Study): association with the intimal-medial thickness of carotid arteries. *Atherosclerosis*.

2004 ;176(2):355-60.

3. Okada K, Minamino T, Tsukamoto Y, Liao Y, Tsukamoto O, Takashima S, Hirata A, Fujita M, Nagamachi Y, Nakatani T, Yutani C, Ozawa K, Ogawa S, Tomoike H, Hori M, Kitakaze M. Prolonged endoplasmic reticulum stress in hypertrophic and failing heart after aortic constriction: possible contribution of endoplasmic reticulum stress to cardiac myocyte apoptosis. *Circulation*. 2004;110(6):705-12.

4. Takiuchi S, Mannami T, Miyata T, Kamide K, Tanaka C, Kokubo Y, Koyama Y, Inamoto N, Katsuya T, Iwai N, Kawano Y, Ogihara T, Tomoike H. Identification of 21 single nucleotide polymorphisms in human hepatocyte growth factor gene and association with blood pressure and carotid atherosclerosis in the Japanese population. *Atherosclerosis*. 2004;173(2):301-7.

5. Miyamoto T, Takeishi Y,

Tazawa S, Inoue M, Aoyama T, Takahashi H, Arimoto T, Shishido T, Tomoike H, Kubota I. Fatty acid metabolism assessed by ¹²⁵I-iodophenyl 9-methylpentadecanoic acid (9MPA) and expression of fatty acid utilization enzymes in volume-overloaded hearts. *Eur J Cl*

in Invest. 2004;34(3):176-81.

6. Asano Y, Takashima S, Asakura M, Shintani Y, Liao Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogai A, Fukushima T, Oikawa Y, Okazaki Y, Kaneda Y, Sato M, Miyazaki J, Kitamura S, Tomoiike H, Kitakaze M, Hori M.

Lamrl functional retroposon causes right ventricular dysplasia in mice. Nat Genet. 2004;36(2):123-30.

7. Shishido T, Tasaki K, Takeishi Y, Takasaki S, Miyamoto T, Itoh M, Takahashi H, Kubota I, Ito T, Katano Y, Wakabayashi I, Tomoiike H. Chronic hypertriglyceridemia in young watanabe heritable hyperlipidemic rabbits impairs endothelial and medial smooth muscle function. Life Sci. 2004;74(12):1487-501.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1. 発明の名称：アポリポロタン A5 遺伝子多型のハプロタイプを利用した高脂血症の発症リスクの予測法

発明者：小久保 喜弘、宮田 敏行、友池 仁暢

出願番号:特願 2004-30265

2. 発明の名称：遺伝子多型と生活習慣との組み合わせを利用した動脈硬化症のリスクの診断法

発明者：小久保 喜弘、岡山 明、宮田 敏行、友池 仁暢、神出 計、河野 雄平

出願番号:特願 2004-255405

3. 発明の名称：遺伝子多型と生活習慣との組み合わせを利用した高血圧症のリスクの診断法

発明者：小久保 喜弘、岡山 明、宮田 敏行、友池 仁暢、神出 計、河野 雄平

出願番号:特願 2004-255361

4. 発明の名称：GPR91,99 の遺伝子多型を利用した動脈硬化診断

発明者：小久保 喜弘、岡山 明、宮田 敏行、友池 仁暢、神出 計、河野 雄平

出願番号:特願 2005-036011

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

生活習慣病モデルとしての食後高脂血症家兎における
平時の血中脂質並びにインスリン動態

分担研究者 伊藤恒賢（山形大学医学部 教務職員）

研究要旨

私たちがヒト生活習慣病のモデル動物の開発を目的として作出したウサギ（食後高トリグリセリド血症家兎（PHT; Postprandial Hyper Triglyceridemia））を用いて、若齢時の平時の血中脂質動態と血糖・インスリン動態を対照と比較検討した。PHT の TG 値並びに CHO 値は対照に比較して有意に高値を示し、食事開始 15～18 時間後を頂値とする日内変動を認めたが、対照には認めなかった。血糖値では、PHT と対照はほぼ同様の値で推移したが、血中インスリン値では、PHT は対照に比較して 2.5 倍～8 倍の顕著な高値を示した。従って、PHT は平時においても食後高脂血症を示す事、その変動は食後 15～18 時間後を頂値とした日内変動である事、さらに PHT は若齢から高インスリン血症を示す事が明らかとなった。PHT に脂質代謝異常と耐糖能異常に加え、高インスリン血症を認めたため、PHT はヒトの虚血性心疾患と生活習慣病との関係を解明する研究や、マルチプルリスクファクター症候群（MRFS; Multiple Risk Factor Syndorome）の研究のための有用なモデルである事が示唆された。

A. 研究目的

食後高トリグリセリド(TG)血症家兎（PHT; Postprandial Hyper Triglyceridemia）は、食後に TG の異常高値を示す家兎である。PHT は脂質代謝異常に加え、耐糖能異常が認められるため、

ヒトの虚血性心疾患と生活習慣病との関係や、マルチプルリスクファクター症候群（MRFS; Multiple Risk Factor Syndorome）の研究のための有用なモデルと考えられる。

私たちは、PHT の食後 TG につい

て、一定時間の絶食後に給餌し、食事開始 24 時間後の TG 値を測定し評価するシステムを確立している。しかし、動脈硬化等、虚血性心疾患の発症には、平時の TG 値が重要であると考え、今回は PHT の平時の血清脂質成分値を経時的に測定し、脂質動態並びに血糖・インスリン動態について対照と比較検討した。

B. 研究方法

供試動物は 6~8 ヶ月齢の PHT と JW が雄各 5 匹である。PHT と JW はともに自家繁殖により作出され、制限給餌下（2 ヶ月齢まで 60 g/日、2 ヶ月齢以降は 120 g/日）で飼育された。これらの動物に通常の飼育形態と同様にウサギ用固形飼料（ラボ R グロワー；日本農産工業(株)）を 120 g/匹の割合で正午に給餌（0 時）し、以後 3 時間おきに 24 時まで計 9 回（0,3,6,9,12,15,18,21,24 時）の採血を行った。飲水は自由摂取とした。採血は耳動脈より 1 ml 採取し、速やかに血漿に分離した後、SPOTCHEM EZ SP-4430（アークレイ社製）を用いて、総コレステロール（CHO）、トリグリセリド（TG）、血糖（GLU）を測定した。また、血中インスリンの測定には、ウサギ用インスリン測定キット（(株)森永生物科学研究所）を用いた。さらに各採血時間に餌の残量を測定し、2 群の摂食パターンを比較検討した。

C. 研究結果

体重では PHT 群（ 3.06 ± 0.04 kg：平均値±標準誤差）と JW 群（ 3.20 ± 0.10 kg）の両群とも同様の値であった（図 1）。摂食のパターンもほぼ同様であり、

2 群とも 120 g の給餌量を摂食開始から 9~18 時間で完食した（図 2）。PHT 群の TG 値は 0 時（ 244.4 ± 37.0 mg/dl）から 6 時まで同様の値で推移し、15 時に頂値（ 1134.0 ± 100.3 mg/dl）を示した後、24 時（ 491.6 ± 282.0 mg/dl）には漸減した。一方、JW 群では 0 時の値（ 38.0 ± 5.1 mg/dl）以降、ほぼ同様の値で推移し、9 時（ 76.0 ± 4.0 mg/dl）に頂値を認めたが、PHT 群の変動に比較して軽微なものであった（図 3）。PHT の TG 値は JW に比較して 0 時には 6.4 倍、15 時には 22.4 倍、24 時には 14.7 倍と顕著に高い値を示した。CHO 値は PHT 群の 0 時（ 58.6 ± 13.9 mg/dl）以降、6 時から値が増加し、18 時に頂値（ 116.8 ± 13.9 mg/dl）を示した後に 24 時には 0 時とほぼ同様の値（ 66.4 ± 26.7 mg/dl）に戻った。一方、JW 群の CHO 値は 0 時の値（ 15.2 ± 4.2 mg/dl）から 24 時の値（ 14.0 ± 3.9 mg/dl）まで変動を認めなかった（図 4）。PHT の CHO 変動は TG の変動に酷似していた。血糖値は 2 群とも 0 時から 24 時までほぼ同様な値で推移したのに対し（図 5）、血中インスリン値は、PHT 群が JW 群に比較して約 2.5 倍から 8 倍の顕著な高値を示した（図 6）。

図 1 体重

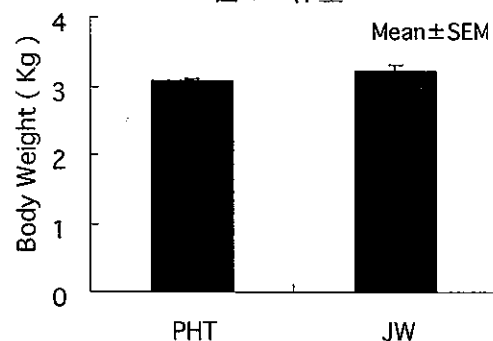


図2 給餌後の餌残量

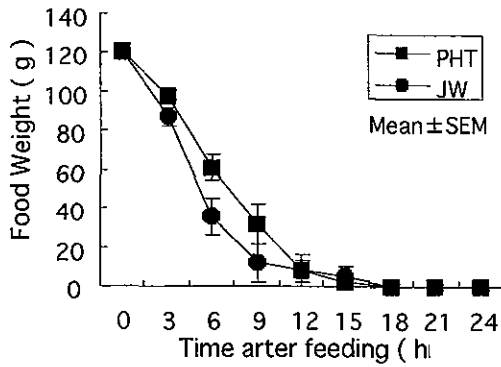


図6 平時インスリン値

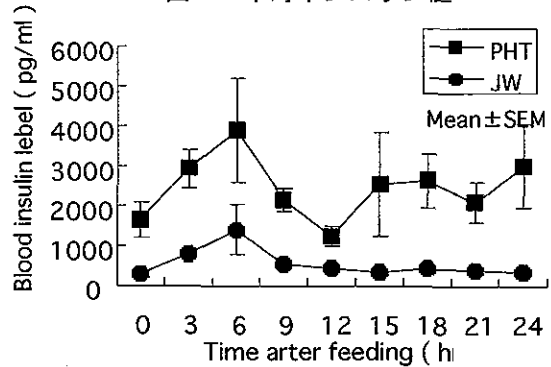


図3 平時トリグリセリド値

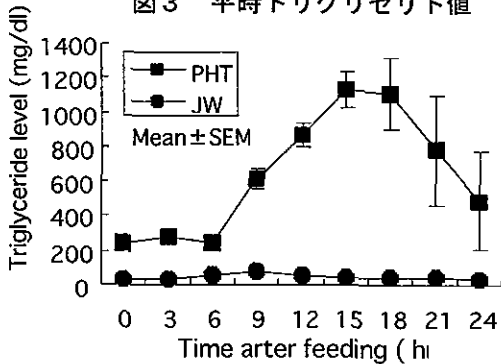


図4 平時コレステロール値

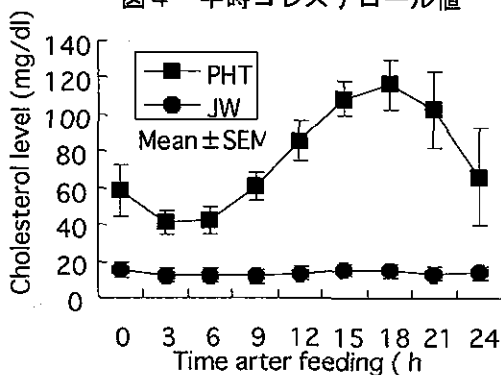
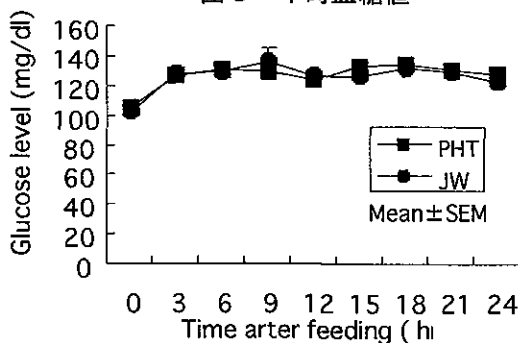


図5 平時血糖値



D. 考察

私たちは PHT の食後高脂血症の評価を、絶食後に給餌し、給餌してから 24 時間後の TG 値を測定する事によって得ていた。今回の結果から、120g のウサギ用普通食の制限給餌環境下 (平時) においても、PHT の TG 値が食後に大きく変動する事が示された。さらに、TG の変動と同調するように CHO 値の変動も認められた。しかし、JW においては、血中脂質成分値 (TG 値と CHO 値) に、平時の変動は認められなかった。従って、PHT の平時の脂質動態は、JW と全く異なる動態を示すことが明らかとなった。一方、平時の血糖値と血中インスリン値を 2 群で比較した結果、血糖値は違いを認めなかったが、インスリン値は PHT で顕著高く、この結果から、PHT が 6 カ月齢の若齢には既に高インスリン血症を示すことが今回新たに明らかとなった。

E. 結論

PHT は平時に血中脂質の異常高値を含む食後の変動と高インスリン血症を示した。PHT はヒト生活習慣病の病態モ

デルとしてきわめて有用な動物である事が示された。

15-16, 平成16年11月27日

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tomoko Shimoda, Akira Ishihata, Tsunekata Ito, Kazuo Owada, Tomomi Aita, Mikako Kaga, Yumi Katano: Progression of Atherosclerosis and Femoral Arterial Blood Pressure In Heritable Hypertriglyceridemic Rabbits. Yamagata Med J, 23(1), 23-32, 2005
2. 伊藤恒賢, 大和田一雄, 友池仁暢: 実験技術; 食後高トリグリセリド血症 (PHT) 家兎の開発経緯と生活習慣病モデルとしての有用性, 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.), 125 巻 5 号, ○-○, (2005), (印刷中)

2. 学会発表

1. 伊藤恒賢, 大和田一雄, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎 (PHT) のインスリン抵抗性, (2004), 日本実験動物科学・技術ながさき 2004 第 38 回日本実験動物技術者協会総会講演要旨集, 長崎市, 329-329, 平成16年5月21日
2. 伊藤恒賢, 秦 正充, 三ツ口陽子, 大和田一雄, 友池仁暢: 食後高トリグリセリド血症家兎 (PHT) の平時 TG 値, (2004), 日本実験動物技術者協会平成16年度奥羽・東北支部合同勉強会講演要旨集, 仙台市,

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（健康科学総合研究事業）
分担研究報告書

低 HDL 血症に関わる新規遺伝子の検索と機能解析
ABCA1 およびその近縁関連遺伝子の機能と反応機構

分担研究者 横山信治（名古屋市立大学大学院医学研究科教授）

研究要旨

1) ABCA1 遺伝子の発現制御。細胞内遊離コレステロールレベルの主要制御機構であるコレステロールエステル化酵素 ACAT の阻害剤と PPAR α アゴニストのフィブラートが、LXA/RXR を介する機序により ABCA1 の発現制御を行うことを直接証明した。2) ABCA1 ノックアウトマウスの系が確立し、LCAT-KO マウスや ARH-KO マウスとの交配による二重欠損に於ける病態の研究を開始した。また ABCA7 の発現を検討し、網内系細胞の多い臓器に於ける代償性発現増加が認められた（予備実験成績）。3) apoA-I とそれ以外の両親媒性ヘリックスペプチド（アポリポ蛋白質や SAA など）による ABCA1 と ABCA7 を介した HDL 新生を検討し、いずれも HDL 新生が起こることが確認された（発表準備中）。

A. 研究目的

末梢細胞はコレステロールを異化することが出来ず、細胞内ステロール代謝平衡を維持するためには、細胞外に搬出されねばならない。動脈硬化巣の細胞に蓄積したコレステロールを減少させるためには、或いは蓄積を積極的に防ぐには、この細胞内コレステロールの搬出システムに頼ることになる。このためのコレステロールの自由拡散と並ぶ主要な機構が、アポリポ蛋白質と細胞の ABCA1 蛋白質の相互作用による HDL の新生反応である。そして、ABCA1 の機能不全は低 HDL 血症の主要な原因の一つであることが明らかにされつつある。本研究の目的は

この反応の機序を解明し、反応の賦活化とそれによる低 HDL 血症の改善により動脈硬化症予防の手段とすることである。

B. 研究方法

1) この反応の細胞側の主要因子である ABCA1 蛋白質の活性の制御を、転写・翻訳レベルの面から検討した。2) ABCA1-KO マウスの背景遺伝子を系代繁殖により C57Bl/6 に統一して確立した。これにより対照実験の精度を挙げ、LCAT-KO マウスとの交配で二重欠損マウス系を確立した。また ARH-KO との二重欠損マウスの作成を準備中である。3) ABCA1 と ABCA7 による HDL 新生反応

を各種ヘリックス型両親媒性蛋白質を用いて検討した。

C. 研究成果と考察

1) ABCA1 転写の促進

ABCA1 は細胞内コレステロール量を検知して転写レベルで発現増加が起こる。この結果コレステロールエステル化酵素 ACAT の阻害による ABCA1 の発現増加を昨年引き続き検証した。ACAT 阻害剤に加え、ACAT 遺伝子の欠損によっても ABCA1 遺伝子の活性化が起こることを明らかにした (Journal of Lipid Research 45; 1943-1951, 2004)。臨床的に抗高脂血症剤として広く用いられているフィブラートによる HDL の上昇は血漿トリグリセリドの低下により CETP 反応を介して起こるが、この薬剤が ABCA1 の発現調節に直接関連するか否かを検討した。複数の株細胞で apoA-I による HDL 新生が増大し、ABCA1 の転写と蛋白質の増加が認められ、これはレポーターアッセイにより LXR に依存する反応と認められた (Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology (2005) in press)。

2) ABCA1 欠損マウスの整備・確立と二重欠損マウスの準備と検討

ABCA1 の生理的役割を検討するために、欠損マウスの確立を図った。Jakson Laboratory から DBA マウスを遺伝子背景にもつ ABCA1-KO マウスを得、我々の他の遺伝子改変マウスとの対照実験を容易にするためその遺伝子背景を系代交配により C57Bl/6 に変更を完了した。これと非特異的細胞コレステロール搬出系の障害を持つ LCAT-KO マウスを交配し、ABCA1/

LCAT 二重欠損マウスを確立して、詳細を検討中である(本年度学会発表予定)。また LDL 受容体の機能発現を制御する ARH との二重欠損マウスの確立の準備に入っている。

3) ABCA1 と ABCA7 による HDL 産生機構
昨年度 ABCA7 が ABCA1 と同様 HDL 新生反応を媒介できることを示した。この反応の詳細を検討中である。ApoA-I と apoA-II による HDL 新生を検討し、ABCA1 によってはコレステロールに富んだ直径 13 nm の大型の HDL とコレステロールに乏しい直径 10 nm の小型の HDL が産生されるが、ABCA7 によっては後者しか産生されず、ABCA1 が細胞コレステロール搬出に置いてより効率的な機構を備えていることが分かった (論文投稿中)。また血漿アミロイド蛋白質 A (SAA) による HDL 新生を検討し、他のアポリポ蛋白質と同様の HDL 新生能を有することが明らかになった (論文投稿準備中)。

E. 結論

ABCA1 とその近縁関連遺伝子の発現調節機能と反応機構を研究し、その HDL 新生に於ける役割を明らかにした。

F. 健康危険情報

本研究では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. Cheng-Ai Wu, Maki Tsujita, Michi Hayaishi, and Shinji Yokoyama. Probucol Inactivates ABCA1 in Plasma Membrane for its

Function to Mediate Apolipoprotein Binding and HDL Assembly and for its Proteolytic Degradation. *J. Biol. Chem.* (2004) 279: 30168-30174

2. Hidehisa Yamagata, Yusen Chen, Hiroyasu Akatsu, Kouzin Kamino, Jin-ichi Ito, Shinji Yokoyama, Takayuki Yamamoto, Kenji Kosaka, Tetsuro Miki, Ikuko Kondo. Promoter polymorphism in FGF1 gene increases risk of definite Alzheimer's disease *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2004) 321: 320-323

3. Yoshio Yamauchi, Catherine C. Y. Chang, Michi Hayashi, Sumiko Abe-Dohmae, Patrick C. Reid, Ta-Yuan Chang and Shinji Yokoyama. Intracellular Cholesterol Mobilization Involved in the ABCA1/Apolipoprotein-Mediated Assembly of High Density Lipoprotein in Fibroblasts. *J. Lipid Res.* (2004) 45: 1943-1951.

4. Jin-ichi Ito, Hao Li, Yuko Nagayasu, Alireza Kheirollah and Shinji Yokoyama. Apolipoprotein A-I Induces Translocation of Protein Kinase-C α to a Cytosolic Lipid-Protein Particle in Astrocytes. *J. Lipid Res.* (2004) 45: 2269-2276.

5. Mariko Harada-Shiba, Atsuko Takagi, Kousuke Marutsuka, Sayaka Moriguchi, Hiroaki Yagyu, Shun Ishibashi, Yujiro Asada, and Shinji Yokoyama. Disruption of autosomal recessive hypercholesterolemia gene shows different phenotype in vitro and in vivo. *Circulation Res.* (2004) 95: 945-952.

6. Maki Tsujita, Cheng-Ai Wu, Sumiko Abe-Dohmae, Shinichi Usui, Mitsuyo Okazaki, and Shinji Yokoyama. On the Hepatic Mechanism of HDL Assembly by the

ABCA1/ApoA-I Pathway. *J. Lipid Res.* (2005) 46: 154-162.

7. Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Rui Lu, Alireza Kheirollah Michi Hayashi and Shinji Yokoyama. Astrocytes produce and secrete fibroblast growth factor-1 that promotes production of apoE-high density lipoprotein in a manner of autocrine action. *J. Lipid Res.* in press.

8. Shinji Yokoyama. HDL can be a more effective target than LDL for primary prevention of coronary heart disease in Japan: An attempt for estimation of treatment-effectiveness. *Atherosclerosis* in press.

9. Reijiro Arakawa, Norimasa Tamehiro, Tomoko Nishimaki-Mogami, Kazumitsu Ueda and Shinji Yokoyama. Fenofibric acid, an active form of fenofibrate, increases apoAI-mediated HDL biogenesis by enhancing transcription of ABCA1 gene in an LXR-dependent manner. *Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol.* in press.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

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
Yasuhide Nakayama, Takeshi Masuda, Makoto Nagaishi, Michiko Hayashi, Moto Ohira, Mariko Harada-Shiba,	High Performance Gene Delivery Polymeric Vector: Nano-Structured Cationic Star Polymers (Star Vectors).	Current Drug Delivery	2	53-57	2005
Mariko Harada-Shiba, Atsuko Takagi, Kousuke Marutsuka, Sayaka Moriguchi, Hiroaki Yagyu, Shun Ishibashi, Yujiro Asada, Shinji Yokoyama	Disruption of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia Gene Shows Different Phenotype in Vitro and in Vivo	Circulation Research	95	945-952	2004
Noriyuki Tokunaga, Noritoshi Nagaya, Mikiyasu Shirai, Etsuro Tanaka, Hatsue Ishibashi-Ueda, Mariko Harada-Shiba, Munetake Kanda, Takefumi Ito, Wataru Shimizu, Yasuhiko Tabata, Masaaki Uematsu, Kazuhiro Nishigami, Shunji Sano, Kenji Kangawa, Hidezo Mori	Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia	Circulation	109	526-531	2004
Tomohito Matsunaga, Satoshi Takasaki, Ikuto Masakane, Mitsuyo Okazaki, Hitonobu Tomoike	Changes in Lipoprotein Profile after Selective LDL Apheresis	Internal Medicine	43	760	2004
Shin Takiuchi, Toshifumi Mannami, Toshiyuki Miyata, Kei Kamide, Chihiro Tanaka, Yoshihiro Kokubo, Yuko Koyama, Nozomu Inamoto, Tomohiro Katsuya, Naoharu Iwai, Yuhei Kawano, Toshio Ogihara, Hitonobu Tomoike	Identification of 21 Single Nucleotide Polymorphisms in Human Hepatocyte Growth Factor Gene and Association with Blood Pressure and Carotid Atherosclerosis in the Japanese Population	Atherosclerosis	173	301-307	2004

Tetsuro Shishido, Katsunari Tasaki, Yasuchika Takeishi, Satoshi Takasaki, Takuya Miyamoto, Makoto Itoh, Hiroki Takahashi, Isao Kubota, Tsunekata Ito, Yumi Katano, Ichiro Wakabayashi, Hitonobu Tomoike	Chronic Hypertriglyceridemia in Young Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits Impairs Endothelial and Medial Smooth Muscle Function	Life Sciences	74	1487-1501	2004
Tomoko Shimoda, Akira Ishihata, Tsunekata Ito, Kazuo Owada, Tomomi Aita, Mikako Kaga, Yumi Katano	Progression of Atherosclerosis and Femoral Arterial Blood Pressure In Heritable Hypertriglyceridemic Rabbits	Yamagata Med	23	23-32	2005
Cheng-Ai Wu, Maki Tsujita, Michi Hayashi, Shinji Yokoyama	Probucol Inactivates ABCA1 in the Plasma Membrane with Respect to Its Mediation of Apolipoprotein Binding and High Density Lipoprotein Assembly and to Its Proteolytic Degradation	The Journal of Biological Chemistry	279	30168- 30174	2004
Hidehisa Yamagata, Yusen Chen, Hiroyasu Akatsu, Kouzin Kamino, Jin-ichi Ito, Shinji Yokoyama, Takayuki Yamamoto Kenji Kosaka Tetsuro Miki Ikuko Kondo	Promoter Polymorphism in Fibroblast Growth Factor 1 Gene Increases Risk of Definite Alzheimer's Disease	Biochemical and Biophysical Research Communications	321	320-323	2004
Yoshio Yamauchi, Catherine C.Y. Chang, Michi Hayashi, Sumiko Abe-Dohmae, Patrick C. Reid, Ta-Yuan Chang, Shinji Yokoyama	Intracellular Cholesterol Mobilization Involved in the ABCA1/apolipoprotein -Mediated Assembly of High Density Lipoprotein in Fibroblasts	Journal of Lipid Research	45	1943-1951	2004

Jin-ichi Ito, Hao Li, Yuko Nagayasu, Alireza Kheirollah, Shinji Yokoyama	Apolipoprotein A-1 Induces Translocation of Protein Kinase C α to a Cytosolic Lipid- Protein Particle in Astrocytes	Journal of Lipid Research	45	2269-2276	2004
Maki Tsujita, Cheng-Ai Wu, Sumiko Abe-Dohmae, Shinichi Usui, Mitsuyo Okazaki, Shinji Yokoyama	On the Hepatic Mechanism of HDL Assembly by the ABCA1/apoA-1 Pathway	Journal of Lipid Research	46	154-162	2005
Jin-ichi Ito, Yuko Nagayasu, Rui Lu, Alireza Kheirollah, Michi Hayashi, Shinji Yokoyama	Astrocytes Produce and Secrete FGF-1, which Promotes the Production of apoE- HDL in a Manner of Autocrine Action	Journal of Lipid Research	46	679-686	2005

High Performance Gene Delivery Polymeric Vector: Nano-Structured Cationic Star Polymers (Star Vectors)

Yasuhide Nakayama^{1,*}, Takeshi Masuda¹, Makoto Nagaishi¹, Michiko Hayashi¹, Moto Ohira² and Mariko Harada-Shiba²

¹Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, ²Department of Bioscience, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

Abstract: Nano-structured hyperbranched cationic star polymers, called star vectors, were molecularly designed for a novel gene delivery non-viral vector. The linear and 3, 4 or 6 branched water-soluble cationic polymers, which had same molecular weight of ca. 18,000, were synthesized by iniferter (initiator-transfer agent-terminator)-based photo-living-radical polymerization of 3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide, initiated from respective multi-dithiocarbamate-derivatized benzenes as an iniferter. All polymers produced polyion complexes 'polyplexes' by mixing with pDNA (pGL3-control plasmid), in which the particle size was ca. 250 nm in diameter [the charge ratio < 2/1 (vector/pDNA)] and ca. 150 nm (the charge ratio > 2.5/1), and the ζ -potential was ca. +10 mV (the charge ratio > 1/1). When COS-1 cells were incubated with the polyplexes 12h after preparation under the charge ratio of 5/1, higher gene expression was obtained as an increase in branching, with a little cytotoxicity. The relative gene expression to the linear polymer was about 2, 5, and 10 times in 3-, 4-, and 6-branched polymers, respectively. The precise change in branching of polymers enabled the control of the gene transfer activity.

Keywords: Non-viral vector, star polymer, polyplex, branched polymer, gene transfection, molecular design.

INTRODUCTION

The cationic polymers, which can generate nano-particles by formation of polyion complexes 'polyplexes' with DNA irrespective of its size and kind, are highly expected as one of the major materials for non-viral vectors [1-4]. However, the primary obstacle toward implementing an effective gene therapy using the cationic polymers remains their relatively inefficient gene transfection *in vivo* than virus vectors.

To achieve an enhancement of gene transfection using cationic polymers, numerous studies have been performed by various approaches; e.g., the chemical synthetic engineering approach in which the kind and composition of the polymers are modified [5,6], biochemical approach in which targeting ligands such as galactose, mannose, transferring, or antibodies into the polymers [7-11], functional molecular engineering approach in which stimulus-response polymers with light and thermal reactivity are designed as high performance vectors [12-14], and physical engineering approach in which physical stimulation with electroporation, gene gun, ultrasound and hydrodynamic pressure are provided at the transfection [2,15,16]. However, few studies in the molecular structure of cationic polymers, which are usually synthesized by conventional radical polymerization, has been reported, except for the effects of changes in the polymer chain length and composition of polymers [17-20] and complex multi-branching polymers, of which structural analysis is impossible [21-24]. Since precise molecular

design, including the molecular weight and three-dimensional structure, by conventional radical polymerization was quite difficult in general, the systematic structure-dependency of cationic polymers in gene transfection has not been established.

In this study, for examination of the effects of the molecular structure on gene expression we designed novel cationic polymers with star-shaped and symmetric structure, which is determined by 2-parameters, the degree of branching and chain length. Molecular design was performed by the iniferter (acts as initiator-transfer agent-terminator)-based photo-living-radical polymerization method pioneered by Otsu *et al.* [25-30]. An iniferter, benzyl *N,N*-diethyldithiocarbamate (DC) is dissociated into a benzyl radical and a dithiocarbamyl radical by ultraviolet light (UV) irradiation. The reaction involving an *N,N*-diethyldithiocarbamyl radical favors chain termination with a growing polymer chain radical end rather than a reaction with a vinyl monomer, whereas a benzyl radical reacts with a vinyl monomer to produce a polymer. These reactions proceed only during irradiation. Therefore, the chain length of the growing polymer is controlled by irradiation condition such as irradiation time or light intensity and the composition of the solution. We previously used the living radical polymerization for designing of various surface graft architectures [31-34] controlling the chain length, block graft chain, gradient chain length and regionally graft polymerized pattern surface. As the first step of the study, star polymers of the same molecular weight at a precise degree of branching of 0, 3, 4, and 6 were synthesized. The effects of the degree of branching on gene expression by measuring the luciferase activity were examined.

*Address correspondence to this author at the Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan; Tel: +81-6-6833-5012; Fax: +81-6-6872-8090; E-mail: nakayama@ri.ncvc.go.jp

MATERIALS AND METHODS

Materials

Benzyl chloride, 2,4,6-tris(bromomethyl)mesitylene, 1,2,4,5-tetrakis(bromomethyl)benzene, and hexakis(bromomethyl)benzene were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI). Sodium *N,N*-diethylthiocarbamate and *N,N*-dimethylaminopropyl acrylamide were purchased from Wako Pure Chemical Ind. Ltd. (Osaka, Japan). Solvents and other reagents, all of which were of special reagent grade, were obtained from Wako and used after conventional purification. Plasmid DNA (pGL3-control), which contains the firefly luciferase gene, was obtained from Promega Inc., (Tokyo, Japan). ExGen 500 [poly(ethylene imine)] was obtained from Euromedex Inc., (Cedex, France).

Synthesis of Cationic Star Polymers

Cationic polymers including linear and three types of star polymers with 3, 4, or 6 branches per molecule were prepared by iniferter-based photo-living-radical polymerization of 3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide as a monomer from respective iniferters such as benzyl *N,N*-diethylthiocarbamate, 2,4,6-tris(*N,N*-diethylthiocarbamylmethyl)mesitylene, 1,2,4,5-tetrakis(*N,N*-diethylthiocarbamylmethyl)benzene, and hexakis(*N,N*-diethylthiocarbamylmethyl)benzene, which were obtained by *N,N*-diethylthiocarbamylation from respective benzyl halogenate derivatives such as benzyl chloride, 2,4,6-tris(bromomethyl)mesitylene, 1,2,4,5-tetrakis(bromomethyl)benzene, and hexakis(bromomethyl)benzene.

The general preparation method of iniferter is followed. An ethanol solution (10 ml) of chloromethyl benzene (4.8 g, 38 mmol) was added to an ethanol solution (50 ml) of sodium *N,N*-diethylthiocarbamate (10.3 g, 46 mmol) at 0°C. After the mixture was stirred at room temperature for 24 h, the resulting sodium chloride was separated by filtration. The filtrate was concentrated under reduced pressure. The residue was added into 150 ml of water and extracted with ether (200 ml x 2) and washed successively with deionized water (100 ml x 3), followed the separation of the organic layer, drying over MgSO₄, condensation to give benzyl *N,N*-diethylthiocarbamate: yield, 17.6g (93%); ¹H NMR (DMSO-*d*₆ with Me₄Si) δ 7.34 (m, 5H, C₆H₅), 4.54 (s, 2H, CH₂-S), 4.05 (q, 2H, N-CH₂), 3.73 (q, 2H, N-CH₂), 1.28 (m, 6H, CH₂CH₃).

The general procedure of iniferter-induced photo-living-radical polymerization is followed. A methanol solution (20 ml) of benzyl *N,N*-diethylthiocarbamate (24 mg, 0.1 mmol) and 3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide (3.9 g, 25 mmol) was placed into 50 ml quartz crystal tube. A stream of dry nitrogen was introduced through a gas inlet to sweep the tube for 5 min or more. The solution was then irradiated for 30 min with a 200 W Hg lamp (SPOT CURE, USHIO, Tokyo, Japan) in nitrogen atmosphere at 20–25 °C. Light intensity was set to 1 mW/cm² at the wavelength of 250 nm (UVR-1, TOPCON, Tokyo, Japan). The reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was dissolved in a small amount of methanol. The precipitate, obtained by the addition of a large amount of ether, was separated by filtration. Reprecipitation was performed in the

methanol-ether system. The last precipitate was dried in a vacuum to yield poly[3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide] as a white powder. The molecular weight, determined by GPC analysis, was 18,000 g mol⁻¹. ¹H NMR (DMSO-*d*₆ with Me₄Si) δ 7.60 (br, 1H, N-H), 3.22 (br, 2H, NH-CH₂), 2.30 ((br, 2H, N(CH₃)₂-CH₂), 2.15 (br, 6H, N-CH₃), 1.65 (br, 2H, CH₂-CH₂).

General Methods

GPC analysis was carried out on a RI-8012 (TSK_{gel} α-3000 and α-5000; Tosoh, Tokyo, Japan) after calibration with standard polyethylene glycol samples. The eluent was *N,N*-dimethylformamide. ¹H-NMR spectra were obtained on a Valian Gemini-300 (300 MHz) spectrometer (Tokyo, Japan). All ¹H-NMR spectra were recorded in DMSO-*d*₆ solutions using tetramethylsilane as the internal standard. Dynamic light scattering (DLS) measurements were carried out using a DLS-8000 instrument (Otsuka Electronics, Tokyo, Japan). An Ar ion laser (λ₀ = 488 nm) was used as the incident beam. The sample was prepared by direct mixing of pDNA solution and the polymer in Tris-HCl buffer (pH 7.4). The DNA concentration of the mixture was then adjusted to 23 μg cm⁻³.

Cell Culture and Transfection

COS-1 cells (ca. 3 x 10⁴ cells per well) were seeded prior to treatment in 24-well plates and grown for 24 h in DMEM (Gibco, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) containing 10% fetal calf serum (Hyclone Laboratories Inc., Logan, UT), penicillin (200 units/ml, ICN Biomedicals Inc., Aurora, OH), and streptomycin (200 mg/ml, ICN) in an atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C. Transfections were performed with 0.5 μg of plasmid DNA (pGL3-control) in 24-multi well dishes in 0.2 ml of OPTI-MEM I (Gibco). After 3 h of incubation, the cells were washed once with PBS, and cultured in 1 ml of DMEM containing 10% fetal calf serum for an additional 48 h. The medium was removed and the cells were washed twice with PBS. The cells were lysed with 0.2 ml of cell lysis buffer (Promega, Madison, WI) and mixed by vortexing. The lysate was centrifuged at 15,000 rpm for 1 min at 4 °C and 5 μl of the supernatant was analyzed for luciferase activity using a Luminous CT-9000D (Dia-latron, Tokyo, Japan) luminometer. The relative light unit/s (RLU) were converted into the amount of luciferase (pg) using a luciferase standard curve, which was obtained by diluting recombinant luciferase (Promega) in lysis buffer. The protein concentrations of cells lysates were measured by Bio-Rad protein assay (BIO-RAD, Hercules, CA) using bovine serum albumin as a standard. The expressed luciferase represented the amount (mole quantity), which is standardized for total protein content of cell lysate. The data are presented as means±S.D. (n=5).

Cytotoxicity

Cytotoxicity was assessed by cell viability assay using WST-8 method (Dojindo, Kumamoto, Japan). COS-1 cells were seeded 24 h prior to treatment in 96-well plates at 5,000 cells per well. Cells were treated with the same conditions used for luciferase assays, with a volume of 6.2 μl of the transfection mixture including 0.124 μg of pDNA added to

each well. Cells were treated with the appropriate conditions for 3 h, washed once with PBS, and cultures in 50 μ l of DMEM (Gibco) containing 10% fetal calf serum for an additional 24 h. Each well was added with 10 μ l of WST-8 reagent (5 mmol/l). After 2 h of incubation at 37 $^{\circ}$ C, absorbance at 450 nm was read in a BIO-RAD microplate reader (Model 680). The data are presented as means \pm S.D. (n=5).

RESULTS AND DISCUSSION

Preparation of Cationic Star Polymers

Four kinds of cationic polymers, consisting of one linear polymer and three star polymers precisely controlled the degree of branching to 3, 4, and 6, were molecularly designed (Fig. 1). The polymers were synthesized by the iniferter living radical polymerization using respective initiators, multi-dithiocarbamate-derivatized benzenes, which were prepared corresponding to the degree of branching. As the monomer, a cationic vinyl monomer with tertiary amino residues, 3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide was used. Since polymerization could proceed only during irradiation, the chain length of the polymers could be easily controlled by the irradiation condition and the composition

of the solution. One linear and three kinds of star polymers with a molecular weight of about 18,000 with low polydispersity of about 1.5, irrespective of the degree of branching, were obtained. Therefore, the chain length in the polymers was set to about 6,000 with a degree of branching of 3, about 4,500 with a degree of branching of 4, and about 3,000 with a degree of branching of 6.

Polyplex Formation

When aqueous solutions of all obtained branched cationic polymers with same molecular weight were mixed with a Tris-HCl buffered saline of pDNA, marked high scattering intensity in quasi-elastic (dynamic) light scattering (DLS) measurements was immediately observed regardless of the degree of branching, indicating polyplexes formation from all cationic polymers. It was considered that the polyplexes formed by electrostatic interactions are same as other cationic polymeric vectors. The particle sizes of the polyplexes were measured using DLS. The DLS measurements showed that the cumulant diameter of the polyplexes was about 250 nm at a charge ratio less than 2/1 (vector/pDNA) and decreased to about 150 nm at a charge ratio more than 2.5/1(vector/pDNA). However, the particle

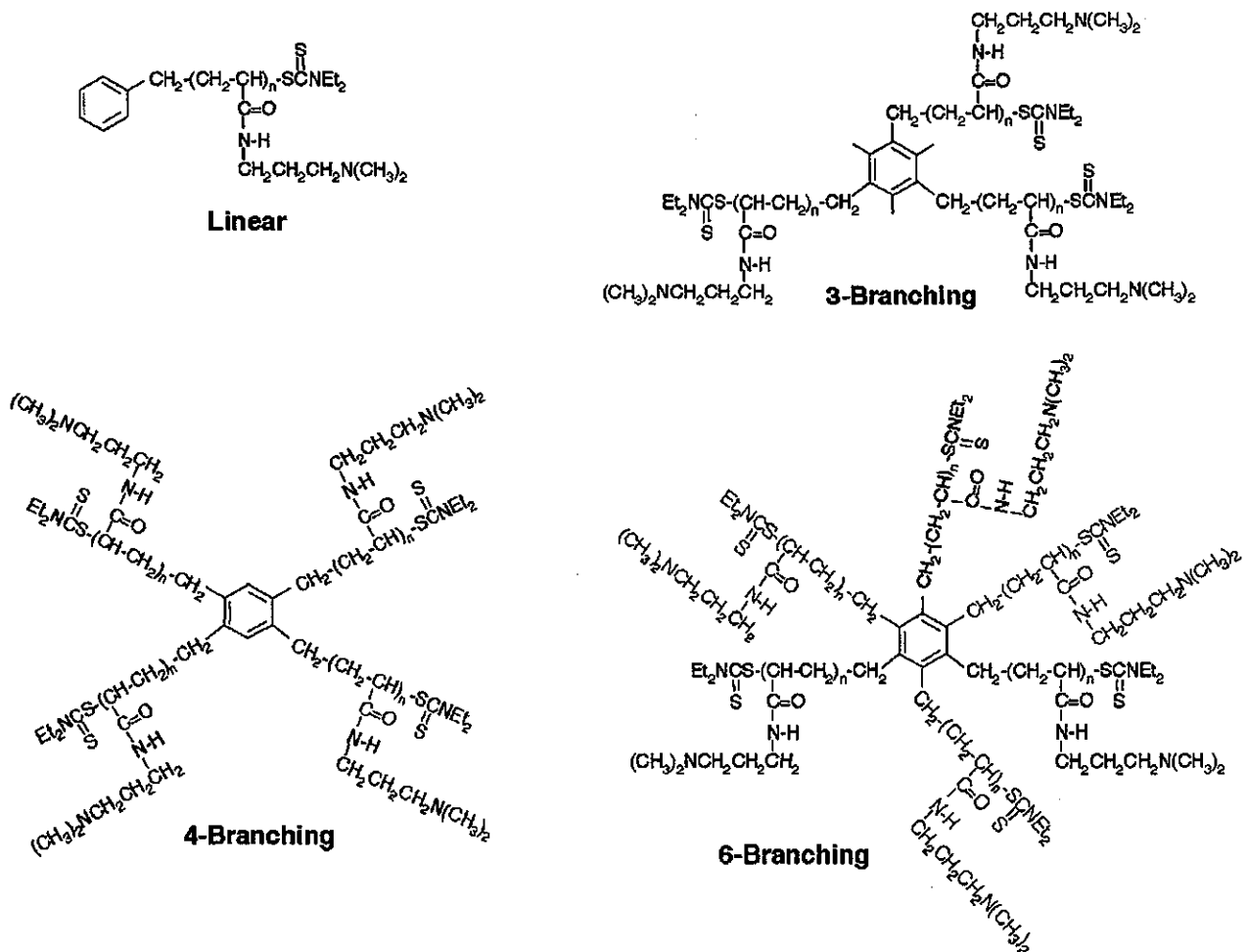


Fig. (1). Structural formulas of the star polymers, which were synthesized by iniferter-induced photo living radical polymerization of 3-(*N,N*-dimethylamino)propyl acrylamide from the respective multi-iniferters, *N,N*-diethyldithiocarbamate-derivatized benzenes.