

厚生労働科学研究研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業

ナノ無機・有機複合塩を用いた遺伝子送達システムの開発

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木村 剛

平成18年（2006）年 4月

目次

I. 総括研究報告	
ナノ無機・有機塩を用いた遺伝子送達システムの開発	----- 1
木村 剛	
II. 分担研究報告	
1. pH応答性ナノHAp粒子の調製に関する研究	----- 1 1
古菌 勉	
2. ナノHAp粒子／水素結合性高分子／DNA複合体の創出と 細胞への遺伝子送達に関する研究	----- 2 1
木村 剛	
III. 研究成果の観光に関する一覧表	----- 3 5
IV. 研究成果の刊行物・印刷	----- 3 7

ナノ無機・有機塩を用いた遺伝子送達システムの開発

主任研究者 木村 剛 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所助手

研究要旨

非ウイルス型遺伝子ベクターとして求められる要素である低毒性・高遺伝子導入効率を兼ね備えた遺伝子ベクターを創出するため、超高压技術を用いた、ナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの創製について詳細な検討を行った。ナノ無機粒子をハイブリッド化することで遺伝子導入率が改善された。

分担研究者

- (1) 木村 剛・東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 助手
- (2) 古蘭 勉・国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 室長

A. 研究目的

ナノメディシン研究領域における遺伝子送達システム(Gene Delivery System: GDS)の開発の必要性は高く、重要課題の一つである。GDS 開発においては、低い細胞傷害性、高い遺伝子導入効率を兼ね備える遺伝子ベクターが望まれている。これまで、種々の無機塩、カチオン性脂質・ポリマーが用いられてきたが、未だ達成されていない。現在の主流のカチオン性物質においては、比較的高い遺伝子発現効率を示すものの、カチオン性に由来する細胞傷害性が問題となっている。そこで本研究では、細胞傷害性の低減を主眼に静電的相互作用を介さない遺伝子ベクターの創出のための要素技術開発を行っている。これまで、6,000 気圧以上の超高压下では水素結合が強調されることに着目し、ポリビニルアルコール (PVA) と DNA の混合系を超高压処理(10,000 気圧)することにより、PVA/DNA 複合体が得られることを明らかにした。

得られた複合体は、水素結合を介した相互作用で形成されているため、細胞障害性の軽減が示された。更なる発現効率の向上を目指し、エンドソームからの脱出を促進するために無機塩の複合化法を考案した。エンドソームは、ライソゾームとの融合により pH が低下するため、pH に応答して溶解する無機塩を用いることで、浸透圧ショックが起り、エンドソームが破壊されると考えられる。本研究では、DNA と種々の水素結合性高分子と無機塩から構成される「DNA/高分子/無機塩複合体」を超高压法により創出し、低毒性、高遺伝子導入効率な新規ナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの開発を目的とする。複合化する水素結合性高分子としては、PVA に加えてポリエチレングリコール、多糖類を選択し、無機塩としては、溶解性、安定性および複合体形成能を考慮して、ハイドロキシアパタイト(HAp)のナノ粒子を選択した。

本年度は、1) pH 応答性ナノ HAp 粒子の調製、2) 水素結合性高分子/DNA 複合体の調製について詳細に検討し、さらに、3) ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製と細胞への遺伝子導入を検討した。

B. 研究方法

1) pH 応答性ナノ HAp 粒子の調製に関する検討

ナノ HAp 粒子の調製は、改良型マイクロエマルジョン法にて行った。本法は、焼結処理をすることで結晶が成長する。そこで、仮焼行程の有無、温度、時間を調節することで、サイズ、形態、結晶化度の制御を試みた。走査型顕微鏡 (SEM) を用いて得られたナノ HAp 粒子のサイズ、形状を観察した。ナノ HAp 粒子の pH 応答性については、異なる pH 溶液での溶解性を検討した。調製したナノ HAp 粒子は、長期放置により分散性が低下し、凝集・沈殿するため、水素結合性高分子と DNA との複合体の形成における安定性の低下につながると考えられた。そこで、水素結合性高分子、DNA との混合法について検討した。具体的には、ナノ HAp 粒子、水素結合性高分子、DNA の混合時において、水素結合性高分子溶液、DNA (サケ白子 DNA) 溶液の濃度、添加順序、また、超音波処理の有無、時間、さらに、加温処理等について種々の条件にて検討した。ここでは、水素結合性高分子として PVA を用いた。種々の方法で混合した溶液を光学顕微鏡、SEM にて観察した。さらに、得られた混合液に超高压印加処理 (10000 気圧、37℃、10 分間) を施し、ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体を調製し、分散性、安定性とナノ HAp の性質との関係について検討した。

2) 水素結合性高分子/DNA 複合体の調製に関する検討

水素結合性高分子として、PVA に加え、すでに医療用で用いられている合成高分子であるポリエチレングリコール (PEG)、多糖類であるデキストラン (DEX) を、また、多糖類としてプルラン (PUL)、血漿に存在するタンパク質であるアルブミン、イムノグロブリン G (IgG) を用いた。DNA としては、形状、分子量の異なるラダー DNA、サケ白子 DNA、プラスミド DNA を用いた。それぞれの水溶液を種々の濃度で調製し、混合した後、超高压

印加処理 (10000 気圧、37℃、10 分間) を施した。また、DNA 溶液を加温することで DNA の二重鎖を解き、その後のアニーリング時に水素結合性高分子を混合し、より水素結合性高分子と DNA の相互作用を容易にさせる方法も試みた。得られた溶液を、アガロースゲル電気泳動、熱融解測定、CD 測定などの物理化学的手法や、SEM、原子間力顕微鏡 (AFM) などにより検討し、複合体の諸物性について検討した。また、水素結合阻害剤である尿素混合系において超高压印加処理を施し、複合体形成阻害を検討することで、相互作用の様式を確認した。

3) ナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製と培養細胞への遺伝子導入に関する検討

DNA としては、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーターの下流に、ルシフェラーゼ (Luc)、グリーンフルオレスセントプロテイン (GFP) 遺伝子を有するプラスミド DNA を用いた。それらは、大腸菌 (JM109) に形質転換し、培養、増殖したのち、プラスミド DNA 精製キット (QIAGEN) を用いて精製した。種々の割合で、ナノ HAp 粒子、水素結合性高分子を混合し、超音波処理にてナノ HAp 粒子を分散させ、DNA 溶液と混合した。混合液に超高压印加処理 (10000 気圧、37℃、10 分間) を施した。得られた処理溶液を、SEM、AFM 観察、アガロースゲル電気泳動にて、ナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の形成と物性について検討した。

細胞への遺伝子導入では、細胞としてサル腎由来の COS7 細胞、マクロファージ様の RAW264 細胞、ラット、ブタ骨髄由来の骨髄細胞を用いた。ナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を細胞上清に添加し、所定時間の培養後、遺伝子導入効率を計測した。GFP 発現の蛍光強度あるいは Luc 発現の蛍光強度を測定し、細胞数あるいは細胞由来のタンパク質量にてノーマライズし、遺伝子導入効率とした。また、蛍光標識したプラス

ミド DNA を用いて、細胞内送達について蛍光顕微鏡観察にて検討した。さらに、無細胞系の *in vitro* transcription/translation システムを用いてプラスミド DNA の転写・翻訳について検討した。

ナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体は水素結合を介する複合体であることから、細胞内に導入された複合体の転写・翻訳促進として、加温処理を試みた。

C. 研究結果

1) pH 応答性ナノ HAp 粒子の調製に関する検討

骨、歯などの硬組織への代替インプラント材料として用いられるセラミック材料は、アルミナ (Al₂O₃)、ガラス、リン酸カルシウム (ハイドロキシアパタイト (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: HAp)、β-三リン酸カルシウム (Ca₃(PO₄)₂: β-TCP)) などの様々な物質が検討されているが、遺伝子導入材料としては、リン酸カルシウムが主流である。リン酸カルシウムと DNA との共沈殿物による細胞への遺伝子導入法は、特殊な機器、試薬を使用しないため *in vitro* での一般的な遺伝子導入法の一つとなっている。その一方で再現性が低く、また、高分子、脂質などの他の遺伝子導入材料と比べて導入効率は依然として低い。この原因の一つとして、リン酸カルシウムの結晶成長を制御できないため、さまざまな形態、サイズの共沈殿物が得られることが挙げられる。リン酸カルシウムは、その結合状態により様々な種類があり、水中での溶解性は異なる。これらの物性が遺伝子導入効率を大きく左右することが知られており、微小粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少する。そこで本研究では、安定かつ均一に分散するナノサイズのリン酸カルシウム粒子としてナノ HAp 粒子を利用した。これまで、HAp ナノ粒子の粒径と形態制御については、分担研究者の古菌は独自にマイクロエマルジョン法を改良して、球状、ロッド状構造体を成したナノスケールにて粒径制御可能な HAp 単結晶体の合成法を提案している。本手法は、800℃の焼結行程に

より高結晶化度のナノ HAp 粒子が得られる。

また、本研究では、ナノ HAp 粒子を単独で用いるのではなく、水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させる、すなわち、ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体として用いる。現在、細胞内への遺伝子送達における最大の障壁として、細胞内遺伝子送達メカニズムのうちエンドサイトーシスを介して取り込まれた DNA が分解される過程が挙げられる。これまで、この過程における DNA 分解の抑制法として、クロロキン、膜透過性ペプチド、膜融合性ペプチドなどが研究されているが、それぞれ、合成化合物、ウイルスの一部分であるため、その利用制限は大きいと考えられる。そこで本研究では、生体成分の一つである HAp を用いた。HAp は、pH5 付近で溶解されることが知られており、また、エンドサイトーシス経路においては、ライソゾームとの融合により pH5.5 に低下する過程が存在する。これらの事から、本研究では次の様な作業仮説を立てた。ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体がエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた後、ライソゾームとの融合により pH が低下するため、pH に応答して HAp が溶解し、その浸透圧ショックにより、エンドソームが破壊され、有意な遺伝子発現がなされると考えた。このような無機・有機ハイブリッド型の遺伝子デリバリーは少なく、これまで、片岡らにより開発された高分子ミセルの内核でリン酸カルシウム結晶を形成させる方法のみである。プラスミド DNA のみではなく、短鎖のオリゴ DNA および siRNA の内包が可能であり、いずれも粒径数百ナノメートルのミセルが形成される。この有機・無機ハイブリッドナノミセルの細胞質内へのデリバリーおよび核移行が示され、siDNA の導入による顕著な遺伝子ノックダウンが培養細胞系において確認されている。これは先に述べたように、エンドソームの pH が 5.5 であり、リン酸カルシウムの溶解によって核酸分子の効率的なエンドソームエスケープがなされたと考えられている。しかしながら、無機塩の溶解制御には至っておらず、遺伝子発現の制御を行うためには結晶化度の制御

を要すると考えられる。

このことから本研究では、pH に応答して溶解するナノ HAp の調製を試みた。焼結行程の温度、時間を変化させることで、酸溶解性の異なるナノ HAp が得られた。得られたナノ HAp 粒子の走査型電子顕微鏡観察では、ほぼ均一なナノサイズを有することが分かった。しかしながら、ナノ HAp 粒子は、エタノール中での分散性は高いが、水中での分散性は低かった。これはナノ HAp 粒子が単結晶体であり、一粒子内に陰性および陽性の面を有して凝集しやすい性質のためである。分散性と遺伝子導入効率の相関については、微小粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少することが知られている。また、本研究では、ナノ HAp 粒子を水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させるため、より高分散性であることが望ましく、今後の課題である。

水溶液中での分散性を高めるため、超音波処理を施した。処理後のナノ HAp 粒子の分散性は高いが、放置時間の延長に伴いナノ HAp 粒子は凝集し、沈殿が生じた。そこで新たな方法として、系中の溶液の粘性を向上させた状態で超音波処理する方法を提案した。ここで、粘性溶液として、DNA と複合化させるための水素結合性高分子溶液を選択し、複合化行程の一つとして組み入れた。水素結合性高分子として、これまでに DNA との複合化が確認されている PVA を用いた。具体的には、所定濃度の PVA 水溶液を調製し、ナノ HAp を添加後、超音波処理を施した。この時、超音波処理時間を変化させ、分散性を検討した。用いる PVA 濃度は高濃度であると高粘性であり、分散性は低下し、至適濃度範囲としては 0.01~1% であった。この範囲では、比較的安定かつ高分散であり、超音波処理時間の延長に伴う分散性の向上が認められ、長期放置した場合でも分散性は維持された。超音波処理行程は、ナノ HAp 粒子単独の場合と PVA 溶液中での場合に有意な差異は示されず、PVA の分解を考慮してナノ HAp 粒子単独で超音波処理を施すことにした。さらに、得られた高分散なナノ HAp 粒子-PVA 溶液に DNA を添加した

時、より高濃度の DNA 溶液の場合に分散性の向上が示された。得られた高分散性混合溶液を超高圧処理（10000気圧、37℃、10分間）した後においても分散性は維持されていた。

2) 水素結合性高分子/DNA 複合体の調製に関する検討

負に帯電する DNA は、負電荷表面を有する細胞膜との相互作用が困難であり、また、細胞内に導入された場合でも、DNA 分解酵素により切断される。このため、従来から遺伝子導入試薬として正電荷物質が用いられ、静電的相互作用を介して形成される複合体細胞による遺伝子導入が行われている。しかしながら、正電荷に由来する細胞傷害性が懸念されるため、本研究では、正電荷物質を用いずに複合体を形成させる方法として、超高圧状態における水素結合の強調に着目した超高圧印加法による水素結合性高分子/DNA 複合体の調製を検討した。これまで、水素結合性高分子である PVA と DNA との混合液への超高圧印加処理（10000気圧、37℃、10分間）では、複合体の形成が確認されている。今年度は、本手法の更なる応用展開として、種々の水素結合性高分子を用いて DNA との複合化についての基礎検討を行った。

合成高分子であるポリエチレングリコール（PEG）とDNAとの複合化を検討したところ、複合体の形成が示された。PEGは、既存の医療利用されている高分子であり、複合体のin vivoでの利用に期待できる。さらに、多糖類であるプルラン（PUL）との複合化にも成功した。同様に、既存の医療利用されている多糖であるデキストラン（DEX）との複合体も得られた。DEXとの複合体の場合、複合体形成は、用いるDEXの分子量、濃度に依存し、中程度の分子量のDEXを低濃度で用いた場合に複合体が得られた。今回、アガロースゲル電気泳動解析において、スメアーバンドの出現にて複合体形成としていることから、低分子量のDEXでは、DNAと複合体を形成した場合でも十分

なスメアーバンドとして出現されなかったと思われる。一方、高分子

量のDEXの場合は、DEX自体が多分岐しているため、1つのDNAに多数の分子が相互作用できなかったため、スメアーバンドとして複合体が検出されなかったと考えられる。また、高濃度領域においては、DNAとの相互作用以上に、DEX自身の分子集合体の方が形成し易くなったのではないかと考えている。以上の結果から、複合体形成には、用いる分子量、分岐数等の影響を考慮する必要があることが分かった。

次に、PEG-DEX混合系について検討した。PEG、DEXの単成分溶液では、互いに透明な溶液であり、超高压印加処理による変化は目視では観察されず、いずれも透明溶液のままであった。PEGとDEXを混合により溶液は青白色に変化し、高分子量のDEXを用いた場合にこの現象は顕著に観察された。一般に、高分子量のPEGとDEXとの混合液では、水性二相が形成されることが知られているが、今回用いたPEG、DEXは低分子量であるためマクロな二相は形成されず、エマルジョンが形成され、その散乱により青白色を呈したと考えている。さらにPEG/DEX混合液への超高压印加処理では、高分子量のDEX(75, 000, 150, 000)を用いた場合に水性二相を形成し、下相(DEX相)が青白色を呈した。より高い分子量のDEX(Mw=500, 000)を用いると、超高压を印加しない場合でも分子量6, 000と8, 000のPEGとで水性二相を形成することから、この現象は超高压によるDEX単独あるいはPEGとの多成分構造体の形成に伴う見かけの分子量の増加による水性二相形成と考えられる。DLS測定を行った結果、いずれの場合も粒子径の増加が観察され、超高压印加による新規多成分構造体が形成したと考えられる。このPEG/DEX複合体にさらにDNAを形成させる検討を行った。ここでは、DNAとしてプラスミドDNAを用いた。DNAを混合した場合でも、高分子量のPEG-DEX系では、下層での散乱が生じた。この下層溶液をアガロースゲル電気泳動した結果、スメアーなバンドは観察されず、複合体の形成は確

認できなかった。これは、PEG-DEX集合体の形成にDNAが寄与されなかったと考えられ、PEG-DEXとDNAの相互作用を亢進させるため、加温処理を試みた。しかしながら、この場合においてもDNAとの複合体は確認できなかった。この原因としては、用いたDNAの分子量が影響していると考えられる。すなわち、PEG-DNA混合液では、DEX-DNA混合液では、直鎖状のラダーDNAを用い、PEGDEX-DNA混合液では、環状のプラスミドDNAを用いていたことで、それぞれの複合体形成能が異なっていたと考えられる。実際の応用としては、プラスミドDNAも考えているため、今後の課題とする。

次に、タンパク質とDNAとの複合体について、タンパク質として、アルブミン、IgGを用いた。アルブミンでは顕著なDNA複合体は示されなかったが、IgGではDNAとの複合体が得られた。また、DNA分解酵素の一つであるDNase Iを用いて、非酵素反応条件にてDNAとの複合体を試みたところ、DNAは分解されず、複合体が形成された。

以上をまとめると、超高压印加処理による複合体形成には、用いる水素結合性高分子の分子量、多分岐度、および、用いるDNA分子の分子量、形状が影響することが明らかとなった。すなわち、用いるDNA分子の種類により、水素結合性高分子を使い分ける必要があり、DNAとしては、オリゴDNA、プラスミドDNAなど多種に渡ることから、これらについては、今後の検討課題とする。

上記より、水素結合性高分子/DNA複合体が得られたことから、培養細胞への遺伝子送達について検討した。細胞として、マクロファージ様の貪食能の高いRAW 264細胞、SV40抗原を有するサル腎由来のCOS 7細胞を用いた。細胞内送達を確認するため、蛍光標識したDNAを用い、超高压印加処理により複合体を得た。得られた水素結合性高分子/DNA複合体溶液を10%の血清を含む細胞上清に添加し、種々の期間培養し、蛍光顕微鏡にて複合体の細胞内送達を観察した。DNAのみの場合では、細胞内蛍光は観察されなかったが、PVA/DNA複合体では蛍光を発光する細胞が観察され、PVA

／DNA複合体のRAW 264細胞への取り込みが示された。同様に、PEG／DNA複合体、DEX／DNA複合体でも、細胞への取り込みが示された。しかしながら、細胞内でのDNAの分布を詳細に観察したところ、細胞核での蛍光発光は観察されず、細胞核へのDNAの移行は示されなかった。

また、遺伝子発現については、ほとんど発現効率の上昇は示されなかった。これは、先の細胞内移行性試験にて核内への移行が示されなかった結果と一致する。おそらく、エンドサイトーシスを介した細胞内取り込み機構のうち、エンドソームにてDNAが分解されたと考えられる。そこで、DNA分解酵素耐性試験を行った結果、DNA分解酵素が少ない場合は、水素結合性高分子／DNA複合体の有意な分解耐性が示されたが、多い場合に顕著な分解耐性は示されなかった。この結果は、酵素暴露時間の増加に伴い顕著となり、暴露時間の延長に伴いDNAは分解されやすくなった。したがって、エンドソームからの複合体の遊離あるいはエンドソームの失活を要する。

3) ナノ HAp 粒子／水素結合性高分子／DNA 複合体の調製に関する検討

エンドソームを早期に破壊させるため、ナノ HAp 粒子を含有した水素結合性高分子／DNA 複合体、すなわち、ナノ HAp 粒子／水素結合性高分子／DNA 複合体の創製を行った。これまでの研究では、エンドソーム阻害剤としてクロロキンや、膜透過性ペプチド、膜融合性ペプチドなどが研究されている。クロロキンは、塩基性物質であり添加することで、エンドソームとライソゾームの融合後の pH 低下を抑制し、DNA 分解酵素の活性を抑制する。一方、膜透過性ペプチド、膜融合性ペプチドは、エンドソーム膜を貫通あるいは融合することで、DNA の細胞質移行を促進する。これらは、細胞への添加時に助剤として用いられているものであるが、最近では、遺伝子ベクター自身がエンドサイトーシス破壊機能を有するものもある。ポリエチレンイミンやアミドアミンデンドリマー

である。これらは、弱塩基性物質であり、低 pH にてプロトン化できる。したがって、エンドソーム内へ集積してきたプロトンをポリカチオンが消費し、pH の低下を抑制することになり、そして、エンドソーム内へ塩化物イオンの流入を伴ったプロトンの集積が続くことにより、浸透圧が増大する。その結果、エンドソーム内外の浸透圧のバランスがくずれ、遂にはエンドソームが崩壊し、内包物を細胞質内へ放出すると考えられている。これをプロトンスポンジ効果という。しかしながら、これらは、細胞障害性を有する合成化合物、正電荷物質、あるいはウイルスの一部分であるため、その利用制限は大きいと考えられる。そのため本研究では、生体成分であり、pH 低下により溶解性を示す HAp を採用した。このようなエンドサイトーシス破壊を目的とした研究として、これまでに、片岡らにより開発された高分子ミセルの内核でリン酸カルシウム結晶を形成させる方法がある。プラスミド DNA のみではなく、短鎖のオリゴ DNA および siRNA の内包が可能であり、いずれも粒径数百ナノメートルのミセルが形成される。この有機・無機ハイブリッドナノミセルの細胞質内へのデリバリーおよび核移行が示され、siDNA の導入による顕著な遺伝子ノックダウンが培養細胞系において確認されている。これは先に述べたように、エンドソームの pH が 5.5 であり、リン酸カルシウムの溶解によって核酸分子の効率的なエンドソームエスケープがなされたと考えられている。しかしながら、無機塩の溶解制御には至っておらず、そこで、本研究では、遺伝子発現の制御を行うために、結晶化度、酸溶解性を制御したナノ HAp 粒子を用いた。

ナノ HAp 粒子との複合化では、上記の用に、ナノ HAp 粒子を分散させるために超音波処理を施し、PVA 溶液を添加し、再度超音波処理により分散させたのち、DNA 溶液と混合させた。その混合液と超高压印加処理（10000気圧、37℃、10分間）した。得られた複合体の走査型電子顕微鏡観察では、超高压誘起 PVA 粒子では、滑らか表面を有した約200～500nmの粒子が見られる。

一方、超高压誘起 PVA/HAp 粒子では、その表面の凹凸が観察され、さらに HAp 粒子と考えられる微小な粒子が見られる。これらの結果より、ナノ HAp 粒子を内包した PVA/DNA 複合体が超高压印加処理により得られることが明らかとなった。

得られたナノ HAp/PVA/DNA 複合体の DNA 酵素耐性を検討するため、10%血清存在下において、20時間放置した。その後、*in vitro* 転写・翻訳系にて評価した。DNA 単独の場合は、転写・翻訳はなされず発現強度の著しい減少が認められた。一方、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体の場合、10%血清の暴露前では、DNA 単独に比して発現強度の低下、すなわち、複合体形成による転写・翻訳抑制がなされたと考えられるが、その発現強度の低下レベルは、PVA/DNA 複合体の場合とほぼ同程度であったことから、ナノ HAp 粒子含有による発現抑制ではなく、PVA との複合化によるものと考えられる。さらに、血清暴露による発現強度の低下はほとんどなく、これらの事から、細胞内での十分な発現が期待できる。

次に、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体、ナノ HAp/PEG/DNA 複合体の細胞による取り込みについて検討した。上記と同様に蛍光標識した DNA を用いた。DNA 単独では、蛍光を示す細胞は観察されず、取り込まれなかったと考えられる。ナノ HAp/PVA/DNA 複合体およびナノ HAp/PEG/DNA 複合体においては、蛍光を発する細胞が多く見られ、細胞による取り込みがなされた。また、核で蛍光を発する細胞も確認された。

細胞内送達メカニズムを検討するため、細胞上清添加5時間後に観察を行った。この場合においても、蛍光を発する細胞が確認できており、ナノ HAp 粒子を含有することで早期の細胞内取り込みがなされたと考えられる。おそらく、作業仮説であるナノ HAp 溶解に伴うエンドサイトーシスの破壊と、また、ナノ HAp 含有による複合体の比重の向上による沈降係数の上昇によるものと考えられる。そこで、エンドサイトーシス経路での細胞内送達であるかを確認するため、エンドサイトーシスマーカーである FITC-Dextran を用いて検討した。そ

の結果、DNA を標識した蛍光色と FITC-Dextran の蛍光色の位置がほぼ一致していた。このことから、エンドサイトーシスを介した細胞内送達であることが確認できた。しかしながら、ナノ HAp の溶解によるエンドサイトーシス破壊は装置の検出限界を超えていたため観察できなかった。

以上のことから、ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体の細胞内送達能が確認でき、*in vitro* 遺伝子導入を検討した。緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだプラスミド DNA を用い、10%血清存在下にて細胞上清に複合体を添加し、所定時間培養後、緑色発光を有する細胞の頻度により発現能を評価した。それぞれ、DNA 単独、PVA/DNA 複合体、ナノ HAp/DNA 複合体、では、緑色蛍光を示した細胞は観察されなかった。DNA 単独では、細胞内に遺伝子が送達されなかったためと考えられる。また、PVA/DNA 複合体については、細胞内に遺伝子送達されるものの、DNA 分解酵素による分解あるいは転写・翻訳抑制によると考えられる。また、HAp/DNA 複合体での細胞内取り込みが確認されていることから、DNA 分解酵素による分解のために遺伝子発現がなされなかったと考えられる。一方、ナノ HAp/DNA 複合の場合は、有意な遺伝子発現が認められた。PVA/DNA 複合体にナノ HAp 粒子を混合した場合、また、超高压印加処理を行っていないナノ HAp 粒子、PVA、DNA の混合液では遺伝子発現が示されなかったことから、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体を形成することが重要であり、本研究の作業仮説がある程度立証できたと考えられる。

しかしながら、市販の遺伝子導入剤である、リポフェクタミン2000と比較する依然としてその発現効率は低かった。この結果について、以下の2, 3の検討を行った。

まず、核への移行が示されたにも関わらず、その発現がなされていないことから、超高压処理を行った時の DNA の高次構造変性が導入遺伝子の発現に影響したのではないか？について検討した。DNA 単独溶液、超高压処理した DNA 単独溶液、PVA と DNA の混合溶液、PVA/DNA 複合体溶液の

それぞれを円偏光二色性 (CD) スペクトル測定し、そのスペクトル変化から高次構造を評価した。超高压処理によって DNA の高次構造が変化していることが分かった。しかしながら、PVA/DNA 複合体の場合、DNA の高次構造変化は示されなかった。以上の結果から超高压印加処理による高次構造変化が PVA/DNA 複合体の低い遺伝子導入効率の原因ではないことが分かった。超高压処理後の DNA が生理活性を発揮するかについて無細胞系による蛋白質合成反応によって検討した。超高压印加処理後の単独 DNA では、高次構造は変化しているが、十分なタンパク質生成がなされた。一方、PVA/DNA 複合体では、そのタンパク質生成は抑制された。これは、DNA 分解酵素による分解抑制を示した結果に一致し、PVA と複合化することで、酵素の認識が阻害されていると考えられる。すなわち、PVA との複合化は、メリットとして DNA 分解酵素耐性の付与、デメリットとして導入遺伝子の発現阻害に寄与することが明らかとなった。

導入遺伝子の発現を向上させる方法として、加温処理を提案した。PVA/DNA 複合体は、水素結合を介して相互作用しているため、熱による相互作用の緩和が容易である。まず、加温温度を検討するため、PVA/DNA 複合体の水素結合緩和温度を決定するため、PVA/DNA 複合体の融解温度 (T_m) 測定を行った。DNA および PVA と DNA の混合液の超高压未処理の場合、融解温度の変化は認められなかった (約 5.7°C) が、DNA の超高压処理した場合は融解温度が上昇した (約 6.2°C)。これは超高压処理によって DNA の塩基対間での水素結合に変化が生じ、結合エネルギーが強くなったためと考えられる。また、DNA/PVA 複合体では、 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 付近のブロードな変化と約 5.4°C のシャープな変化が観察され、後者が 5.4°C 付近は DNA 二重らせんの解離であり、前者の $40\sim 50^\circ\text{C}$ にかけての融解温度は未知であり、複合体からの DNA 解離であると考えられる。そこで、加温温度を 42°C に設定した。 42°C は、細胞内でヒートショックプロテインが産生され始める温度

である。PVA/DNA 複合体への加温処理により解離される DNA は転写・翻訳されるかどうかを検討するために、PVA/DNA 複合体を 42°C で加温処理し、その後、無細胞系による蛋白質合成反応によって検討した。加温処理した PVA/DNA 複合体でのタンパク質生成が顕著に向上した。そこで、細胞への遺伝子導入における加温処理の効果を検討した。一般的にガン細胞 (ほとんどの樹立系細胞) は熱耐性が小さく、少しの加温にて細胞は破壊される。そこで、樹立系のガン細胞ではなく、初代の培養系細胞として、骨髄由来細胞を用いた。骨髄細胞は、幹細胞として最近注目されている細胞である。骨髄由来細胞の上清にナノ HAp/PVA/DNA 複合体を添加し、 42°C の加温処理を施した。その結果、有意な遺伝子導入効率の向上が示された。

D. 考察

超高压印加処理により得られる水素結合性高分子/DNA 複合体は、細胞への遺伝子導入能を有するものの、導入遺伝子の発現活性は低かった。この原因の一つとして、エンドソームでの DNA 分解が考えられ、分解抑制のために、水素結合性高分子/DNA 複合体へのナノ HAp 粒子の含有を提案した。調製法を検討することで、ナノ HAp 粒子を含有するナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を得ることに成功した。この複合体を用いて、*in vitro* 培養細胞への遺伝子導入を行った結果、遺伝子導入効率の向上が示された。このように全ての素材が既存の医療利用素材からなる遺伝子ベクターはこれまでになく、全く新しいものであると考えられる。しかしながら、市販の遺伝子導入剤に比してその発現活性は低く、更なる改良を要した。そこで水素結合に着目し、加温処理による発現効率の向上を試みた。その結果、遺伝子発現活性の上昇が顕著に示された。本手法は水素結合性を最大限に利用した、他の遺伝子ベクターでは達成されないものと考えられる。

E. 結論

本年度は、1) pH 応答性ナノ HAp 粒子の調製、2) 水素結合性高分子/DNA 複合体の調製について詳細に検討し、さらに、3) ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製と細胞への遺伝子導入を検討した。これらについては、ほぼ達成されたと考えている。しかしながら、その最適化には達しておらず今後の課題である。最適化としては、ナノ無機粒子として、HAp だけでなく他の無機物質を用いたり、また、分子量の異なる水素結合性高分子を用いたり、側鎖官能基の異なる高分子を用いて検討する。また、今年度は、主にプラスミド DNA の送達と細胞内発現を主眼に検討を行ってきたが、今後は、オリゴ DNA、siRNA などの低分子量の核酸分子の送達への応用展開を考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiyuki Moritan, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery, Journal of Artificial Organs, submitted
- 2) 木村剛、古菌勉、岸田晶夫、遺伝子導入におけるセラミック材料～リン酸カルシウムを中心に～、遺伝子医学 MOOK 5 号「先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー ウイルスを用いない遺伝子導入法の材料、技術、方法論の新たな展開」原島秀吉、田端泰彦編、印刷中

2. 学会発表

- 1) Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo,

Hidekazu Yoshizawa, Kozo Miyazaki, Toshiya Fujisato and Tsutomu Furuzono, Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier, Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, p471, メンフィス

- 2) 木村剛、南広祐、岩井彩夏、森反俊幸、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压処理により形成した PVA/DNA ハイドロゲルからの DNA 徐放解析、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.1, p214, 2005、横浜
- 3) Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida, Gene delivery using hydrogen bonding polymer-DNA complex prepared by ultra high pressure, 32nd Annual meeting & exposition of the controlled release society transactions, p614, 2005、マイアミ
- 4) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた水素結合性高分子/DNA 複合体によるトランスフェクションスケジューリングの可能性、第 15 回 バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集、p25-26、2005、東京
- 5) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用、第 49 回日本学会議材料研究連合講演会講演論文集、p341、2005、京都

- 6) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压法によるナノ無機粒子／高分子コンポジットの調製と遺伝子キャリアーへの応用、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5199-5200, 2005、山形
- 7) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、ナノ無機粒子を内包した超高压誘起PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5201-5202, 2005、山形
- 8) 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超静水圧処理による分子集合体の開発、第46回高圧討論会、第46回高圧討論会講演要旨集、p141、2005、室蘭
- 9) 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製、第14回ポリマー材料フォーラム講演予稿集、p171、2005、東京
- 10) 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と生医学材料としての応用、第27回バイオマテリアル学会大会予稿集、p227、2005、京都
- 11) 三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起多成分系高分子複合体による遺伝子送達、第5回日本再生医療学会総会抄録、p221、2006、岡

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
基盤特許として、
特願 2005-052965
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

pH 応答性ナノ HAp 粒子の調製に関する研究

分担研究者 古菌 勉 国立循環器病センター研究所先進医工学センター室長

研究要旨

ナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの創製のための無機材料としてナノ HAp 粒子を選択し、pH 応答性ナノ HAp 粒子の調製に関して検討した。また、無機・有機複合化における諸条件について詳細に検討した。酸溶解性の異なるナノ HAp 粒子が得られ、ナノ HAp 粒子と高分子との複合化に成功した。

A. 研究目的

骨、歯など硬組織は、リン酸カルシウムを主成分とする無機物質から構成されている。これまで、セラミック材料は、アルミナ (AlO₂)、ガラス、リン酸カルシウム (ハイドロキシアパタイト (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ : HAp)、β-三リン酸カルシウム (Ca₃(PO₄)₂ : β-TCP)) など様々な無機材料が代替インプラント材料として検討されている。遺伝子導入材料としては、リン酸カルシウムが主流である。リン酸カルシウムは、DNA との混合により共沈殿物が形成され、細胞に取り込まれる (リン酸カルシウム法)。このリン酸カルシウム法は、特殊な機器、試薬を使用しないため培養細胞への *in vitro* 遺伝子導入法として一般的な方法の一つとなっている。しかしながら、再現性が低く、また、高分子、脂質などの他の遺伝子導入材料と比べて導入効率は依然として低い。この原因の一つとして、DNA との混合時に形成されるリン酸カルシウム結晶を制御できないため、さまざまな形態、サイズの共沈殿物 (粒子) が得られることが挙げられる。リン酸カルシウムの結合状態により様々な種類があり、水中での溶解性は異なることが知られている。サイズ、溶解性などの物性が遺伝子導

入効率を大きく左右することが報告されており、サイズの微小な粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少する。

そこで本研究では、安定かつ均一形状を有するナノサイズのリン酸カルシウム粒子としてナノ HAp 粒子を利用した。これまで、HAp ナノ粒子の粒径と形態制御については、分担研究者の古菌は独自にマイクロエマルジョン法を改良し、球状、ロッド状構造体を成したナノスケールにて粒径制御可能な HAp 単結晶体の合成法を提案している。本手法は、800℃の焼結行程により高結晶化度のナノ HAp 粒子が得られる。一般的に、HAp は、骨や歯のような硬組織に対する親和性だけでなく、軟組織に対しても親和性があることが知られてきた。この軟組織親和性の全容は明らかになっていないが、生体内へのインプラント初期に接着性タンパク質や成長因子などが HAp 表面に強く吸着するであろうことは容易に推察される。

また、本研究では、従来のリン酸カルシウム法のようにナノ HAp 粒子を単独で用い、DNA と複合化させるのではなく、水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させる、すなわち、ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体として用いる。この理

由は以下に述べる。現在、細胞内への遺伝子送達における最大の障壁として、遺伝子送達過程うちエンドソームでの DNA 分解過程が挙げられている。これまで、この過程における DNA 分解の抑制法として、クロロキン、膜透過性ペプチド、膜融合性ペプチドなどが研究されているが、それぞれ、合成化合物、ウイルスの一部であるため、その利用制限は大きいと考えられる。そこで本研究では、生体成分の一つである HAp を用いた。HAp は、pH5 付近で溶解されることが知られており、また、エンドサイトーシス経路においては、ライソゾームとの融合により pH5.5 に低下する過程が存在する。これらの事から、本研究では次の作業仮説を立てた。ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体がエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた後、ライソゾームとの融合により pH が低下するため、pH に応答して HAp が溶解し、その浸透圧ショックにより、エンドソームが破壊され、有意な遺伝子発現がなされることが考えられた。このような無機・有機ハイブリッド型の遺伝子デリバリーは少なく、これまで、片岡らにより開発された高分子ミセルの内核でリン酸カルシウム結晶を形成させる方法のみである。プラスミド DNA のみではなく、短鎖のオリゴ DNA および siRNA の内包が可能であり、いずれも粒径数百ナノメートルのミセルが形成される。この有機・無機ハイブリッドナノミセルの細胞質内へのデリバリーおよび核移行が示され、siDNA の導入による顕著な遺伝子ノックダウンが培養細胞系において確認されている。これは先に述べたように、エンドソームの pH が 5.5 であり、リン酸カルシウムの溶解によって核酸分子の効率的なエンドソームエスケープがなされたと考えられている。

以上より、本年度は、pH 応答性のナノ HAp 粒子の調製と、超高压印加処理によるナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製について詳細に検討した。

B. 研究方法

ナノ HAp 粒子の調製は、改良型マイクロエマルジョン法にて行った。本法は、焼結処理をすることで結晶が成長する。そこで、仮焼行程の有無、温度、時間を調節することで、サイズ、形態、結晶化度の制御を試みた。走査型顕微鏡 (SEM) を用いて得られたナノ HAp 粒子のサイズ、形状を観察した。また、ナノ HAp 粒子の pH 応答性について、種々の pH 溶液での溶解性を検討した。調製したナノ HAp 粒子は、長期放置により分散性が低下し、凝集・沈殿するため、水素結合性高分子と DNA との複合体の形成における安定性の低下につながると考えられた。そこで、水素結合性高分子、DNA との混合法について検討した。具体的には、ナノ HAp 粒子、水素結合性高分子、DNA の混合時において、水素結合性高分子溶液、DNA (サケ白子 DNA) 溶液の濃度、添加順序、また、超音波処理の有無、時間、さらに、加温処理等について種々の条件にて検討した。ここでは、水素結合性高分子として PVA を用いた。種々の方法で混合した溶液を光学顕微鏡、SEM にて観察した。さらに、得られた混合液に超高压印加処理 (1000 気圧、37℃、10 分間) を施し、ナノ HAp/水素結合性高分子/DNA 複合体を調製し、分散性、安定性とナノ HAp の性質との関係について検討した。

C. 研究結果

リン酸溶液とカルシウム溶液と DNA 溶液の混合により形成されるリン酸カルシウム/DNA 共沈殿法は、簡便かつ安価で行えるため、細胞培養への *in vitro* 遺伝子導入の一般的な手法となっている。しかしながら、再現性が低く、また、カチオン性高分子、カチオン性脂質などの他の遺伝子導入材料と比べて導入効率は依然として低いことから、*in vivo* 遺伝子導入に用いられていない。この原因の一つとして、生成されるリン酸カルシウムの結晶性を制御できないため、さまざまな形態、サイズ、物性の共沈殿物 (粒子) が得られることが挙げられる。これらの物性は遺伝子導入効率を

大きく左右し、サイズの微小な粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少すると報告されている。そこで本研究では、物性の制御されたナノサイズのリン酸カルシウム粒子としてナノ HAp 粒子を利用した。これまで、分担研究者の古菌は独自にマイクロエマルジョン法を改良し、球状、ロッド状構造体を成したナノスケールにて粒径制御可能な HAp 単結晶の合成法を提案している。

また、本研究では、HAp は pH5 付近で溶解されることに着目し、水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させることで、pH5.5 のエンドサイトーシス内で HAp が溶解し、浸透圧ショックによりエンドサイトーシスが崩壊され、DNA の細胞質内移行がなされ、遺伝子導入効率が向上すると考えている。このため、pH 応答性、すなわち、pH=7 付近の生理的条件では粒子（結晶）を形成し、pH=5 付近に pH が低下することで溶解するナノ HAp 粒子の調製について検討した。

改良型マイクロエマルジョン法では、球状、ロッド状のナノ HAp 粒子が得られる。本法では 800°C での焼結行程があり、これにより HAp が高結晶化される。図 1、2 には、球状、ロッド状の焼結したナノ HAp 粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。球状では、約 100nm のナノ HAp 粒子が、ロッド状では、軸長約 200~400nm、直径 100nm の円筒のナノ HAp 粒子が得られた。

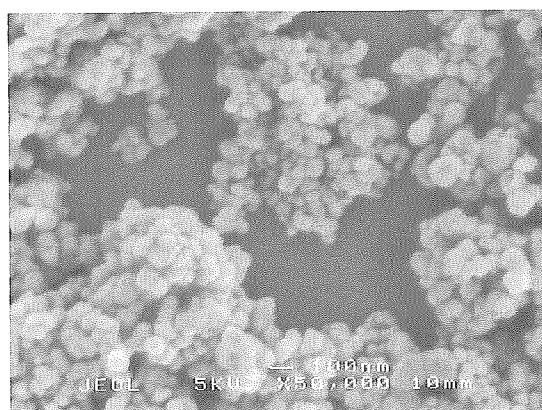


図 1、球状のナノ HAp 粒子の SEM 写真（焼結）

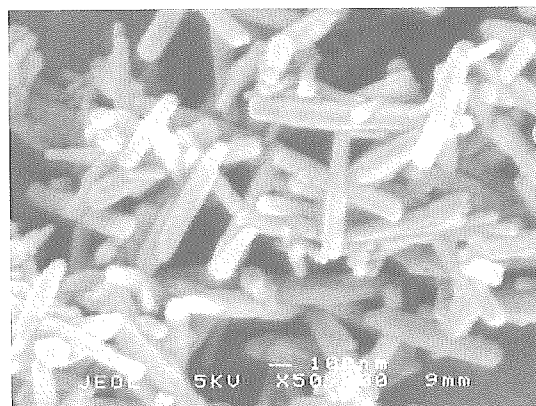


図 2、ロッド状のナノ HAp 粒子の SEM 写真（焼結）

また、図 3、4 には、未焼結の球状、ロッド状のナノ HAp 粒子の走査型電子顕微鏡写真を示す。焼結した場合とほぼ同様であり、球状では、約 50nm のナノ HAp 粒子が、ロッド状では、軸長約 200~400nm、直径 100nm の円筒のナノ HAp 粒子が得られた。これらの粒子は、IR 測定にて HAp であることを確認している。

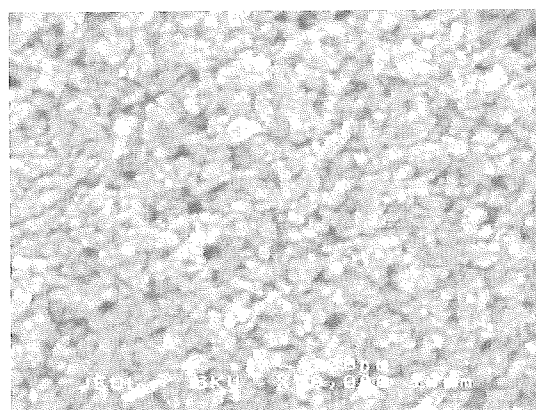


図 3、球状のナノ HAp 粒子の SEM 写真（未焼結）

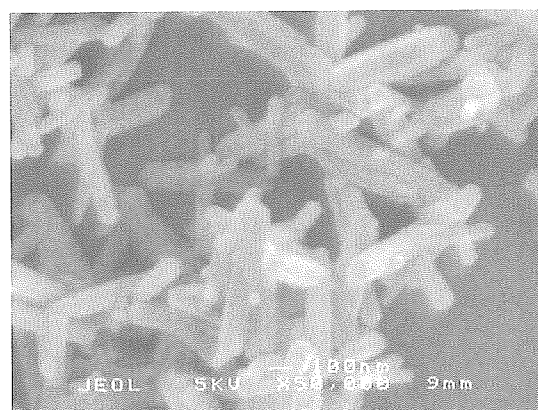


図 4、ロッド状のナノ HAp 粒子の SEM 写真（未焼結）

次に、ナノ HAp 粒子に pH 応答性を付与するため、結晶化度の異なる低結晶化ナノ HAp 粒子、中結晶化ナノ HAp 粒子、高結晶化ナノ HAp 粒子を調整した。それぞれの酸溶解性の結果を図 5 に示す。上段が pH=7 の溶液、中段が pH=5 の溶液、下段が pH=3 の溶液の結果である。高結晶化ナノ HAp 粒子では、pH を低下させた場合でも溶解しにくく、pH=3 にすることで溶解した。中結晶化ナノ HAp 粒子においては、pH=5 では完全には溶解しないがほとんどが溶解し、pH=3 にて完全に溶解した。低結晶化ナノ HAp 粒子は、pH=5 で完全に溶解した。これらの結果から、酸溶解性は結晶化度に依存し、結晶化度が低い程、溶解しやすい傾向があることが分かった。これらのナノ HAp 粒子を用いることで、本研究の目的であるナノ HAp 粒子の溶解によるエンドソーム破壊制御はある程度なされると考えられる。

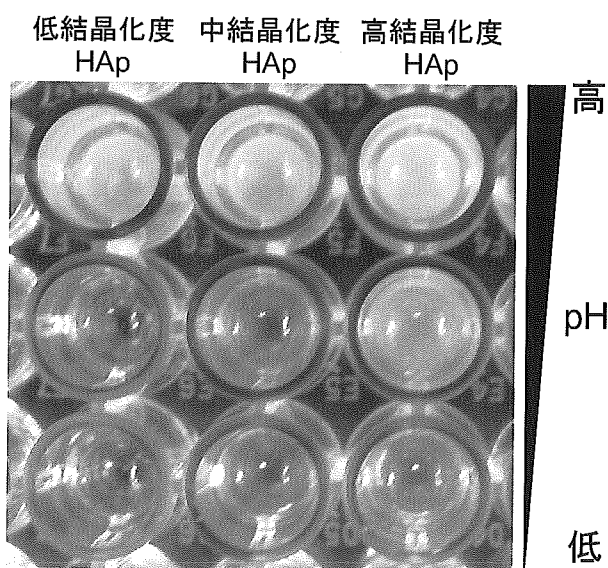


図 5、結晶化度の異なるナノ HAp の酸溶解性

得られたナノ HAp 粒子は、最終的に水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させる。このためには、分散性が高い方が望ましく、ナノ HAp 粒子の分散性について検討した。ナノ HAp 粒子は、エタノール中では高分散性を示し、ある程度の長期放置にしても凝集、沈殿は示されなかった。しかし、水中においては、凝集、沈殿されやすかった。これ

は、以下のように考えられた。ナノ HAp 粒子の電子線回折像から、得られたナノ HAp 粒子は単結晶であり、その長軸は HAp 格子の c 軸に沿って伸張していることが分かっている。また、その電子線回折パターンは [010] ゾーンに相当し、TEM 像における HAp の広い面がユニットセルの a 面、そして狭い面が c 面に帰属された。ここで HAp の a 面がカルシウムイオンリッチであり、また c 面がリン酸イオンリッチな面とされている。これらの結果は、面による粒子 1 個における電荷の制御が可能であることを示しているとともに、凝集しやすい性質であることも示している。

また、球状、ロッド状を比較した場合、球状に比べロッド状の分散性は低かった。これは、上記の考察したように、カルシウム面、リン酸面が制御されたロッド状のナノ HAp 粒子では、類似した性質が面として露出しているため、互いに相互作用し易くなっていると考えられる。さらに、未焼結なナノ HAp 粒子に比べ、焼結したナノ HAp 粒子での分散性の低下が示された。図 6、図 7 にその結果を示す。図 6 では、一部で球状のナノ HAp 粒子の凝集が見られるが、その大部分は分散されていることが分かる。一方、図 7 のロッド状のナノ HAp 粒子では、大部分が凝集していることが分かる。以上のことから球状の未焼結のナノ HAp 粒子を用いることにした。

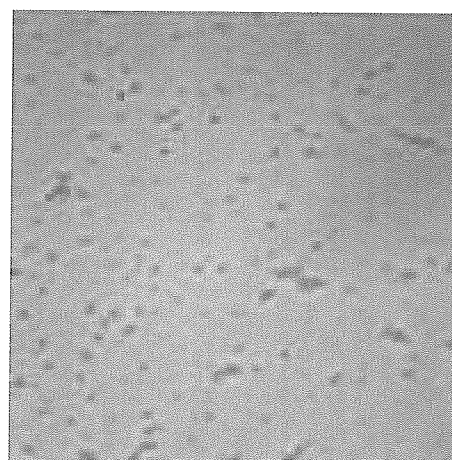


図 6、球状のナノ HAp 粒子（未焼結）の分散性

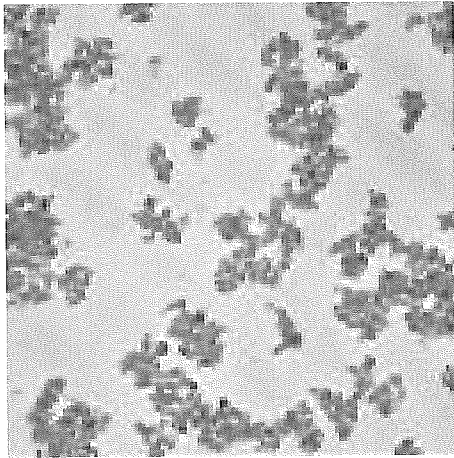


図7、球状のナノ HAp 粒子（焼結）の分散性

より分散した HAp 溶液を得るために、一般的な手法である超音波処理による高分散ナノ HAp 溶液の調製を試みた。超音波処理後の早期の段階では、高い分散を示していたが、放置時間の延長に伴い凝集、沈殿された。そこで、粘性溶液での超音波処理を行った。ここでは、粘性溶液として高分子溶液を選択した。最終的にナノ HAp 粒子は、水素結合性高分子と DNA との複合体に含有させる必要があるためである。まず、水素結合性高分子として、これまで超高压印加により DNA との複合体形成が確認されているポリビニルアルコール (PVA) を用いて検討した。種々の濃度の PVA 水溶液を調製し、ナノ HAp 粒子を添加、混合後、超音波処理を施した。この時、超音波処理時間を変化させ、分散性を検討した。PVA 溶液は、低濃度であると低粘性であり、高濃度であると高粘性である。高濃度になるに従って分散安定性は向上したが、さらに高濃度（高粘度）になると分散性は低下した。至適 PVA 濃度範囲としては 0.01~1% であった (図8)。この範囲では、比較的安定かつ高分散であり、超音波処理時間の延長に伴う分散性の向上が認められ、長期放置した場合でも分散性は維持された (図9)。PVA の粘性に加え、PVA のリン酸カルシウム (HAp) との親和性が高いことも影響していると考えられる。PVA の側鎖官能基であるヒドロキシル基とカルシウムが相互作用していると考えられる。

超音波処理行程についても検討したが、ナノ HAp 粒子単独の場合と PVA 溶液中での場合には

意な差異は示されなかったが、より分散性の向上を目的とし、ナノ HAp 粒子単独および PVA 溶液混合後の2度の超音波処理を施すことにした。

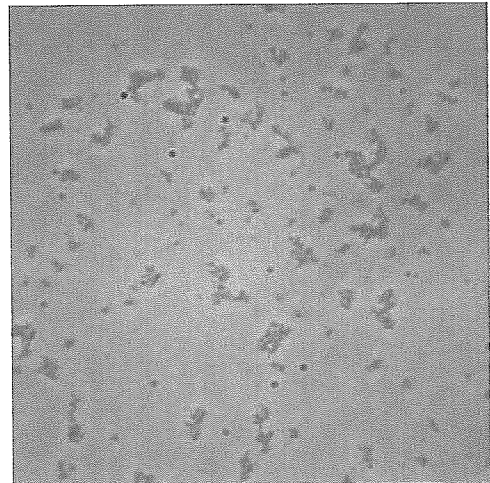


図8-1、球状のナノ HAp 粒子（未焼結）の分散性における PVA 濃度の影響 (0.001%)

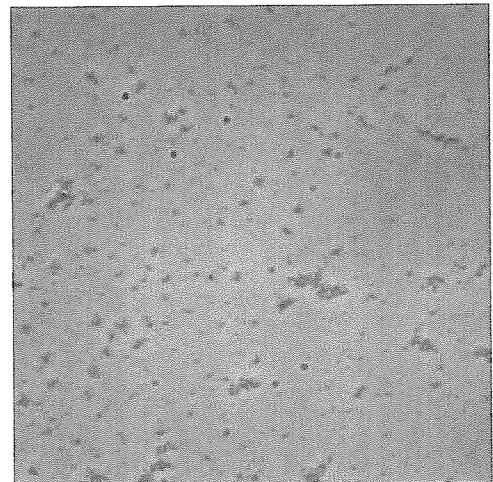


図8-2、球状のナノ HAp 粒子（未焼結）の分散性における PVA 濃度の影響 (0.1%)

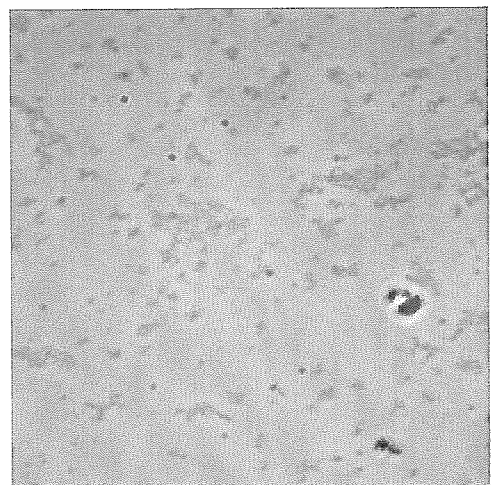


図9-1、球状のナノ HAp 粒子（未焼結）の分散性における超音波処理時間の影響 (3 min)

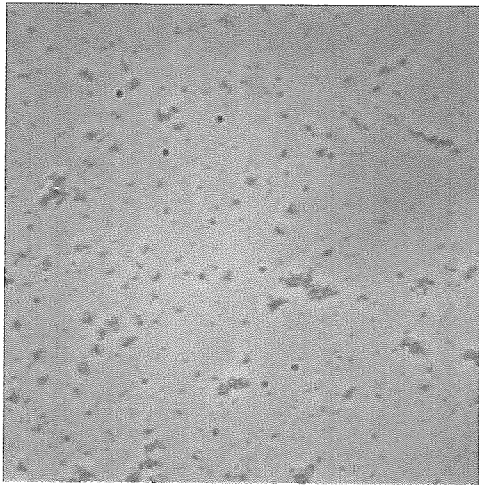


図9-2、球状のナノ HAp 粒子（未焼結）の分散性における超音波処理時間の影響（20 min）

さらに、得られた高分散なナノ HAp 粒子-PVA 溶液に DNA を添加した時、より高濃度の DNA 溶液の場合に分散性の向上が示された（図10）。

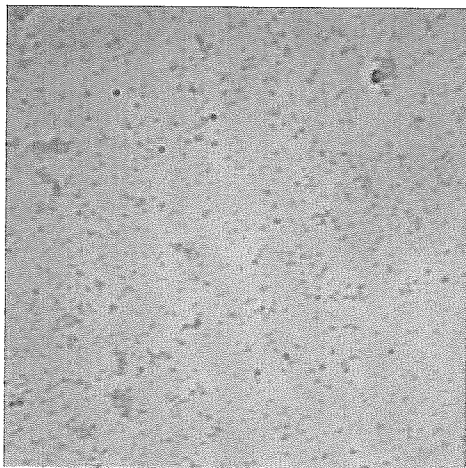


図10、球状のナノ HAp 粒子（焼結）の PVA/DNA 溶液中での分散性

これは、従来のリン酸カルシウム法では、高濃度 DNA であるほど凝集、沈殿しやすい結果と異なる。リン酸カルシウム法の場合、カルシウムと DNA のリン酸基が静電的に相互作用し、さらにリン酸が相互作用することで凝集が形成されていく。一方、HAp の場合、すでにリン酸カルシウムの結晶であり、そのサイズは大きく、その表面の電荷が凝集に強く影響すると考えられる。すなわち、表面のカルシウム面とリン酸面が互いに相互作用す

る。しかし、DNA を添加した場合、表面のカルシウム成分に DNA が相互作用し、その結果、HAp の表面は負に帯電し、凝集が抑制されたと考えられる。したがって、DNA の添加によるナノ HAp 粒子の分散性の向上は、DNA のナノ HAp 粒子表面への相互作用により、ナノ HAp 粒子同士の相互作用が阻害されたためと考えられる。

得られた高分散性混合溶液を超高压処理（10000気圧、37℃、10分間）した後においても分散性は維持されていた。詳細については次章で報告する。

D. 考察

以上より、本年度の目的である pH 応答性ナノ粒子の創製についてはある程度達成されたと考えられる。今回は生体適合性を考慮して HAp を選択したが、in vivo での種々のタンパク質、多糖類との相互作用については不明な点が多い。たとえば、接着性タンパク質との相互作用の観点からみると、一般的に HAp の特性として、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) がカーボネート含有 HAp に強く吸着しやすいこと、および線維芽細胞から放出される細胞接着性タンパク質であるフィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンおよびコラーゲンが吸着しやすいことが知られている。ただし、これらの場合、二次粒子からなる HAp 焼結体との相互作用から検討されているため、HAp 結晶表面が接着性タンパク質の吸着にどのように相互作用しているのか明確ではない。

また、本研究では、ナノ HAp をエンドサイトーシス経路のエンドソームの破壊を行うための助剤として位置づけており、そのため、細胞内機構についても詳細な検討を要する。具体的には、エンドソーム内での溶解性の実証や溶解後のエンドソーム破壊メカニズム解析（浸透圧ショック）などが挙げられる。また、現在は、エンドサイトーシス経路にて取り込まれたのち、pH の低下に伴いナノ HAp 粒子が溶解され、エンドサイトーシス破壊が誘発されると考えられるが、その後の細胞安定

性やカルシウムイオンチャネルなどへの作用についての検討を要する。これについては、一般的なエンドソーム破壊剤であるクロロキンなどの細胞毒性が指摘されていることから今後の重要な課題である。

従って、次年度以降は、リン酸カルシウムを主成分とするナノ HAp 粒子の物性と生体機能との相関について検討する必要がある。具体的には、細胞機能解析として、エンドソームトレーサーを用いた細胞内機構解析を蛍光顕微鏡観察にて行い、また、細胞内機能の安定性については、細胞内カルシウム濃度指示薬を用いて行う。ナノ HAp 粒子の物性と細胞機能との相関を詳細に検討することで、pH 応答性ナノ HAp 粒子の最適化を行い、さらに炭酸カルシウム、リン酸マグネシウムなどの他の無機物質の本法への展開を試み、より生体適合性の高いエンドサイトーシス破壊剤としての検討を行う。

一方、分散安定性の高いナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体が作製され、当初の目的がある程度達成されたと考えられる。今後は、得られたナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の物性評価を、DLS 測定、ゼータ電位測定、TEM 観察、電気泳動法などの物理化学的測定にて詳細に行うとともに、上記で作製するより pH 応答性の高いナノ HAp 粒子、あるいはナノ無機粒子を用いて、遺伝子ベクターとしてのポテンシャル向上を目的とする。

E. 結論

遺伝子導入における最大の障壁とされるエンドソームでの DNA の分解抑制を目的として、ナノ HAp 粒子によるエンドソーム破壊機構を発案し、pH 応答型のナノ HAp 粒子の調製について検討を行った。改良型マイクロエマルジョン法の行程調整により、形態、サイズの制御されたナノ HAp 粒子の調製に成功し、さらに、異なる酸溶解性を有するナノ HAp 粒子が得られた。これらは、当初の目的の pH 応答型のナノ HAp 粒子と考えられる。

また、ナノ HAp 粒子を含有する水素結合性高分子/DNA 複合体、すなわち、ナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を超高圧印加処理により得るための調製条件を検討した。ここで特に問題となったのがナノ HAp 粒子の水中での分散安定性であった。高分子溶液、DNA 溶液との混合、さらに超音波処理により、比較的安定かつ均一な状態の分散溶液が得られ、長期間それらを維持することに成功した。この状態の混合液への超高圧印加処理により、分散性の維持されたナノ HAp 粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体が得られた。

上記の技術を用いて、炭酸塩などの他の無機物質の水素結合性高分子/DNA 複合体への含有が可能であると考えられ、新しい無機/有機コンポジット材料調製法と言える。今後は、より pH 応答性の高いナノ無機粒子の調製とナノ無機/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製について詳細に検討するとともに、得られる複合体の物性と遺伝子導入メカニズムを詳細に検討することで、遺伝子導入効率の相関について検証し、低毒性・高遺伝子導入効率なナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターを創製していく。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiyuki Moritan, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery, Journal of Artificial Organs, submitted
- 2) 木村剛、古菌勉、岸田晶夫、遺伝子導入におけるセラミック材料～リン酸カルシウムを中心に～、遺伝子医学 MOOK 5号「先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入

テクノロジー ウィルスを用いない遺伝子導入法の材料、技術、方法論の新たな展開」原島秀吉、田端泰彦編、印刷中

2. 学会発表

- 1) Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Kozo Miyazaki, Toshiya Fujisato and Tsutomu Furuzono, Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier, Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, p471, メンフィス
- 2) 木村剛、南広祐、岩井彩夏、森反俊幸、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压処理により形成した PVA/DNA ハイドロゲルからの DNA 徐放解析、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.1, p214, 2005、横浜
- 3) Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida, Gene delivery using hydrogen bonding polymer-DNA complex prepared by ultra high pressure, 32nd Annual meeting & exposition of the controlled release society transactions, p614, 2005、マイアミ
- 4) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた水素結合性高分子/DNA 複合体によるトランスフェクションスケジューリングの可能性、第15回バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集、p25-26、2005、東京
- 5) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた新規無機粒子／水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用、第49回日本学会議材料研究連合講演会講演論文集、p341、2005、京都
- 6) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压法によるナノ無機粒子／高分子コンポジットの調製と遺伝子キャリアーへの応用、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5199-5200, 2005、山形
- 7) 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、ナノ無機粒子を内包した超高压誘起 PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5201-5202, 2005、山形
- 8) 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製、第14回ポリマー材料フォーラム講演予稿集、p171、2005、東京
- 9) 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と生医学材料としての応用、第27回バイオマテリアル学会大会予稿集、p227、2005、京都
- 10) 三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起多成分系高分子複合体による遺伝子送達、第5回日