

218 超臨界技術を利用した再生医療用スキャフォールド調製 Application of Supercritical Fluid techniques to The Processing for Regenerative Tissue Scaffold

○ 寺田堂彦 (医療機器センター)
吉田謙一 (先端医療振興財団)
船本誠一 (国立循環器病センター)
永谷憲歳 (国立循環器病センター)
北村惣一郎 (国立循環器病センター)

澤田和也 (大阪成蹊短大)
正 岸田晶夫 (東京医科歯科大)
藤里俊哉 (国立循環器病センター)
中谷武嗣 (国立循環器病センター)

Dohiko TERADA, JAAME, 3-42-6 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo
Kazuya SAWADA, Osaka Seikei College, 3-10-62 Aikawa, Higashiyodogawa-ku, Osaka
Ken'ichi YOSHIDA, FBRJ, 2-2 Minatojimaminami-tyo, Chuo-ku, Kobe, Hyogo
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kandasurugadai, Chiyoda-ku, Tokyo
Seiichi FUNAMOTO, Toshia FUJISATO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI, and
Soichiro KITAMURA,
National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita-shi, Osaka

1. はじめに

わが国では、現在年間1万件を超える心臓弁置換術が行われている。そのうち、7割は機械弁による置換であるが、継続した抗凝固剤の服用などQOL上の問題を抱えている。一方、3割で使用されるブタ組織をグルタルアルデヒドで固定化した異種生体弁は、化学的に処理されているため、種々の構造的劣化の問題が指摘されている。これらの諸問題を解決する新たな手段として、心臓弁組織からドナー由来細胞を除去(脱細胞化)したマトリックスをスキャフォールドとして利用する試みが注目を集めている。脱細胞化手法として最も代表的なものは、界面活性剤水溶液や酵素活性を利用し、細胞成分を洗浄除去する方法である。しかしながら、細胞毒性を有する界面活性剤の残存や、細胞成分の完全除去については未だ多くの問題点が残されている。

そこで本研究では、従来の脱細胞化手法に代わる新たな手段として、超臨界流体抽出法の適応を検討した。本手法では、二酸化炭素を媒体として用いることにより、移植時に問題となる化学物質の組織内残存を無視することが可能になる。さらに、処理における抽出物の分析が、組織を破壊することなく個々に実施可能になるため、個体差の大きな生体組織の脱細胞化度を、移植前に個別に評価可能となる。その結果、移植における組織片のレシピエントに対する安全性も大きく向上することが期待出来る。本発表では、二酸化炭素系エントレーナを共存させ、処理条件を変化させた場合の脱細胞化効果、および生体組織の力学特性への影響について検討した結果を報告する。

2. 実験方法

生体由来試料として用いた組織は、ブタ大動脈(1株)ジャパンファーム)である。

超臨界流体処理は、定容高圧容器を用い、所定の振とう条件下において、圧力、温度および処理時間を変化させて行った。また、脱細胞化に対するエントレーナ効果を調べるため、エタノールを所定量共存させ処理を行った。

脱細胞化評価は、移植後の免疫反応や石灰化と密接に関連すると考えられる、DNAおよびリン脂質の残存により評価した。DNA残存は組織染色法により行い、組織内残存リン脂質の評価は既報¹⁾に準じて化学分析により行った。

力学特性は、動脈の内周方向についての引張試験を行い評価した。ただし、試料は超臨界流体処理によって脱水されるため、処理後、生理食塩水に浸漬し、4℃で2日間以上吸水させた後に引張試験を行なった。

3. 結果と考察

図1に、処理温度および処理時間一定の条件下において、処理圧力を変化させて超臨界二酸化炭素処理を行った際の組織内残存リン脂質量変化を示した。図から明らかにように、

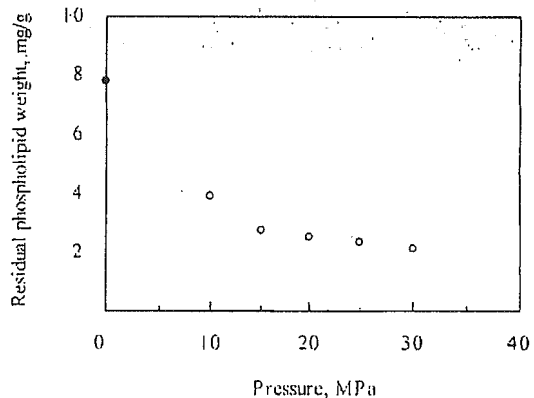


Fig. 1 The dependence of residual phospholipid weight on the supercritical fluid pressure in extraction process (the treatment time and the temperature are constant, 60 min and 37℃, respectively). The solid circle means the control value.

処理圧力の増加に伴い、残存リン脂質量は大きく減少している。また、およそ15MPa程度の処理圧力以上では、脱リン脂質効果に大きな差が見られない。これらの結果より、用いた試料に含有される疎水性のリン脂質は、圧力15MPa程度に相当する二酸化炭素密度にて、十分に溶媒和され溶解除去されることがわかる。これらの結果は、細胞膜や核膜を形成するリン脂質の二酸化炭素系への溶解により、親水性の核成分であっても同系において物理的な洗浄要因により除去可能なことを示唆している。また、処理時間を変化させ同様の検討を行ったところ、極めて短時間で脱細胞化が可能なことも確認された。

これらの試料について、ヘマトキシリン-エオシン染色による評価を行ったところ、核の残存も認められなかった(図2)。細胞膜成分の溶解によって、DNAなどの細胞成分も物理的に組織外部へ拡散したためと考えられる。これは、リン脂質の組織内含有量の低下とも矛盾せず、本手法によって生体組織内部からドナー由来細胞を除去することが可能であることを示唆する結果であるが、残存DNAはたとえ微量であっても免疫反応を引き起こすため、今後、残存DNA量を定量評価する必要がある。

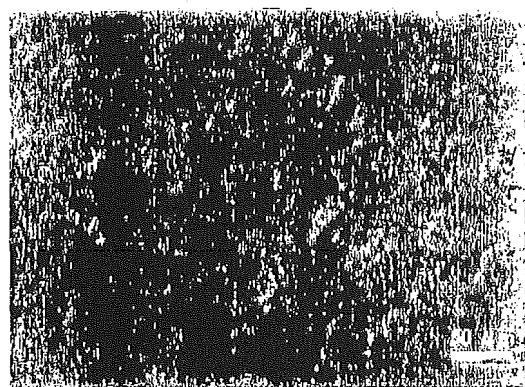


Fig.2 Hematoxylin and eosin stain of the aorta treated in the supercritical fluid. The treatment conditions are 37 °C, 25 MPa and 60 min.

図3に、処理温度および処理時間一定の条件下において、圧力を変化させて超臨界二酸化炭素処理を行なった際の重量残留率と、その後の吸水処理による重量回復後の重量残留率を示した。超臨界流体処理によって試料は脱水されるため、処理後の重量残留率は70~80%であったが、処理圧力に関わらず吸水処理後の重量は初期重量に対して85%程度までにはしか回復しなかった。これは、タンパクの変性によって水和出来る部位が減少したためと考えられる。

図4に、処理温度および処理時間一定の条件下において、圧力を変化させて超臨界二酸化炭素処理を行なった際の、応力-歪み曲線の変化を示した。超臨界流体処理によって引張

強さは増大した。超臨界流体雰囲気中でコラーゲンなどの構造タンパクに変性が生じたためと考えられる。

本発表では、超臨界二酸化炭素系での脱細胞化作用機構や、処理条件の差による影響等を検討した結果についても報告する。

参考文献

- (1) 澤田和也ら、平成17年度繊維学会秋季研究発表会要旨集

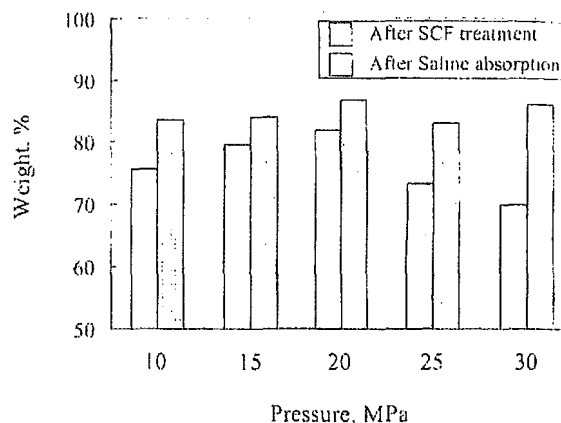


Fig.3 The residual weight after SCF treatment and recovered weight after saline absorption. SCF treatment temperature and time are 37 °C and 60 min respectively.

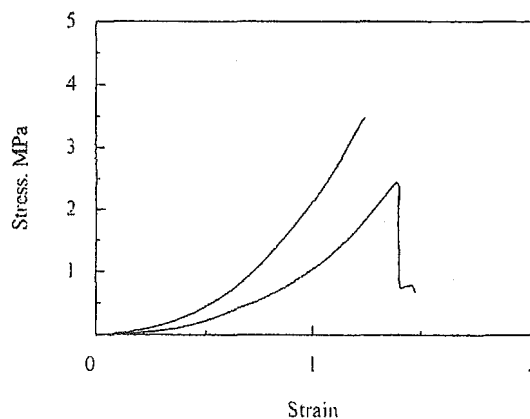


Fig. 4 Stress-Strain curves of control and SCF treated samples. SCF treatment condition is 37 °C, 30 MPa and 60 min.

219 脱細胞組織のエタノール処理による力学特性への影響

Influence to the mechanical properties of the decellularized tissues
by ethanol treatment

○ 江橋 具 (国立循環器病センター)
吉田 謙一 (先端医療振興財団)
永谷 憲蔵 (国立循環器病センター)
藤里 俊哉 (国立循環器病センター)

船本 誠一 (国立循環器病センター)
正 岸田 晶夫 (東京医科歯科大学)
中谷 武嗣 (国立循環器病センター)

Tomo EHASHI, Seiichi FUNAMOTO, Noritoshi NAGAYA, Takeshi NAKATANI,
Toshia FUJISATO, National Cardiovascular Center, Fujishirodai, Suita, Osaka
Ken'ichi YOSHIDA, The Foundation for Biomedical Research and Innovation, Kobe
Akio KISHIDA, Tokyo Medical and Dental University

【緒言】

国内の心疾患による死亡者数は、悪性新生物について第2位と非常に高い死因のひとつとなっている。重篤な心疾患の治療法には、心臓や組織の移植による置換型治療が有効であるものの、我が国で臓器移植法が施行されてから心臓移植はわずか数十例であるとともに、組織移植に関してもドナー不足という問題が残っている。

近年、心筋梗塞などの再生医療型治療として、心筋の損傷部位に、患者から摘出した骨髄細胞や骨格筋の前駆細胞である筋芽細胞を、直接注入移植することにより心機能が回復したとの報告がなされた¹⁾。しかし、この方法は、細胞の生着率が低かったり、細胞同士のコミュニケーションが発達しないため、効率が悪いことが問題となっている。一方、筋芽細胞をディッシュ上で単層培養したのち非酵素作用により剥離した、筋芽細胞シートを心臓に移植する研究も行われ、注入による細胞移植よりも良好な結果が得られたことも報告されている²⁾。この場合、より組織に近い細胞を移植するために、細胞シートを積層する方法も行われているが、厚みを増すと内部の細胞への酸素などの供給が低下するため、厚さが100 μm と薄いものに限られてくる。したがって、より大きな患部を治療できる移植片を構築することは困難であると言える。

本研究では、厚みのある再生医療型筋移植片として、細胞の足場となる生体組織由来のスカフォールドを作製することを目的に、超高静水圧印加処理を用いる筋組織の脱細胞処理を行った。生体組織由来のスカフォールドを動物移植した場合に細胞膜成分であるリン脂質が残留していると、移植片の石灰化が誘発されるといわれていることから、脱細胞処理の過程でリン脂質を減少させるためにエタノールを使用し、処理のタイミングなどが組織の力学特性に及ぼす影響を調べた。

【方法】

食用ブタ心臓の心室筋を厚さ1.6 mmの板状にスライスし、超高静水圧印加処理を行い、組織内の細胞を破壊した。このときの処理条件は、10,000 atmの圧力を10分間、10℃の温度で行った。組織に残った細胞成分を除去するために洗浄を行ったのちH.E.染色を行い、組織学的に脱細胞されているかを観察した。さらに引張り試験を行って、作製したスカフォールドの力学特性を未処理の生体組織と比較した。

実験1 超高静水圧印加処理時に組織を浸漬する溶媒による力学特性への影響を調べた。組織を浸漬する溶媒は、通常のPBS(-)と、エタノール(50%、60%、70%、80%)を使用し、コントロールとしての未処理の心筋と比較した。

実験2 超高静水圧印加処理時は、通常通り組織をPBS(-)に浸漬して行い、その後の洗浄工程でエタノールを用いた。リン脂質は70%以上のエタノールで除去されるといわれていることから、80%エタノールを用いたものと、高濃度エタノールによる急激な脱水が影響するかどうかを確認するため、50%から80%まで10%ずつ濃度を上昇させる洗浄を行った。また、エタノール洗浄を行わないものと、未処理の心筋を比較として用いた。

【結果と考察】

脱細胞処理した組織のH.E.染色では、いずれの処理条件においても組織内の細胞核は染色されず、細胞は残留していないことが確認された。また、組織内の空隙率も比較的高いことがわかった。一例として、Fig. 1に超高静水圧処理時に溶媒としてPBS(-)を用い、洗浄工程で80%エタノールを使用した組織の観察結果を示した。

引張り試験を行った結果、超高圧印加時にエタノールを用いた場合には(実験1)、施圧直後の破断荷重はコン

コントロールや PBS (-) を用いた場合の 2 倍以上に上昇したが、洗浄処理後はいずれもほぼ同等の値であった。施圧直後の弾性率は、施圧時にエタノールを用いた場合にコントロールや PBS を用いたものより 4 倍以上高かったにもかかわらず (Fig. 2)、洗浄処理後は、施圧時に 80% エタノールを用いたものが、コントロールとほぼ同等の値を示した (Fig. 3)。

施圧後の組織洗浄におけるエタノール処理条件による弾性率への影響については (実験 2)、エタノール処理の有無にかかわらず、施圧直後の弾性率よりも 3 倍以上高い値を示し、未処理の組織よりも上昇していることがわかった。

これらの結果から、作製したスキャフォールドは未処理の組織よりも弾性率が上昇する傾向が見られたものの、高い空隙率を保持していることや生体内での引張りにも耐えうる十分な強度を維持していることから、再生型筋組織を構築するための細胞の足場として利用できる可能性が示唆された。今後、これらのスキャフォールドを用いて実際にいくつかの種類の細胞を三次元培養し、生体外での筋組織の構築を目指す予定である。

【謝辞】

本研究の一部は、厚生労働科学研究費、科学技術振興調整費及び知的クラスター創成事業の補助を受けて行われた。

【文献】

- 1) Menasche P. Skeletal myoblast transplantation for cardiac repair. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2004; 2(1): 21-28.
- 2) Momon IA et al., Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005; 130(3): 646-653.

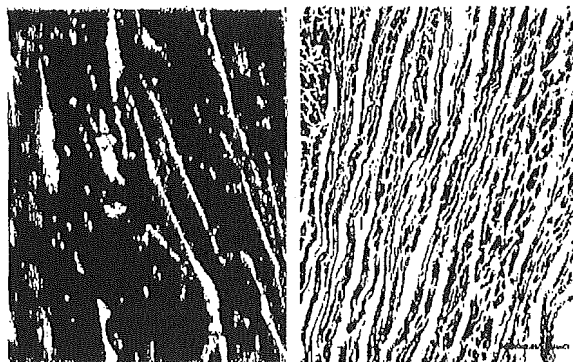


Figure 1. HE staining of the cardiac muscle (a) before and (b) after the decellularization treatment by ultrahigh pressure. Bars: 200 μ m.

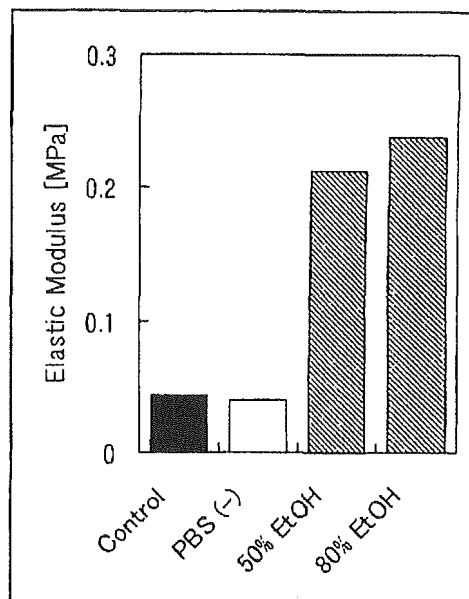


Figure 2. Elastic modulus of the cardiac muscle tissues just after the ultrahigh pressure treatment.

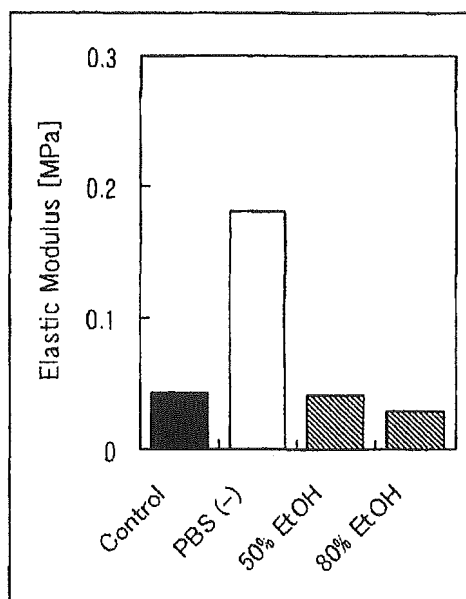


Figure 3. Elastic modulus of the cardiac muscle tissues after the ultrahigh pressure treatment followed by washing process.

O-7-4 ミニブタへの同種脱細胞化動脈の移植における残存リン脂質の影響

鳴海敏行¹、黒岩貴文¹、湊谷謙司¹、吉田謙一²、船本誠一¹、寺田彦彦³、森反俊幸⁴、永谷憲哉¹、藤里俊哉¹、岸田晶夫⁵、中谷武嗣¹

¹国立循環器病センター、²先端医療振興財団、³医療機器センター、⁴鈴鹿医療科学大学、⁵東京医科歯科大学

脱細胞化組織を用いた再生型組織移植では、移植後に患者細胞が浸透することで、自己修復の機転や患者の成長に伴う組織の成長が期待できる。既に、米国企業やドイツの研究グループによって、脱細胞化同種あるいは異種心臓弁・血管組織の臨床例が報告されつつある。しかしながら、移植後早期の不全例も明らかとなっており、不十分な脱細胞化処理が原因ではないかとの指摘もある。我々は、独自技術による脱細胞化処理法（パワーグラフト法）を開発し、動物実験によってその有効性を検討している。今回は、脱細胞化組織の残存リン脂質の影響について検討した。ドナーとなるクラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）から下行大動脈を採取した。超高压及び洗浄処理を行うことで、組織内細胞を除去した。さらに、アルコール処理にて残存リン脂質を除去した。同種ミニブタに置換移植した後、所定期間経過後に摘出し、組織学的に評価した。昨年度のミニブタ同種移植実験においては、肺動脈置換移植では有効な成績が得られたが、下行大動脈置換移植では石灰化や狭窄の所見が認められた。残存リン脂質の除去処理を施したところ、移植後3ヶ月で石灰化はスポット状に僅かに認められたものの、かなり抑制されていた。また、狭窄も見られなかった。移植後の石灰化は、残存リン脂質の影響が大きいと考えられた。

O-7-7 超高静水圧処理法によるバイオスキャフォールドの調製における圧力印加条件の検討

村越彩子¹、大富美智子¹、吉田謙一²、船本誠一³、南 広祐⁴、木村 剛⁵、藤里俊哉⁶、岸田晶夫⁵、中谷武嗣⁶、北村惣一郎⁶

¹東邦大学 理学部生物分子科学科、²先端医療振興財団、³国立循環器病センター研究所 再生医療部、⁴ヒューマンサイエンス振興財団、⁵東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、⁶国立循環器病センター

[緒言] 再生医療においては、スキャフォールドの開発が重要である。我々は、生体組織から細胞を除去したバイオスキャフォールドの開発を行っている。細胞除去法として、圧力印加により細胞を破壊し、洗浄により細胞残渣等を除去する超高静水圧処理法を考案し、脱細胞化血管、弁の調製を検討している。本法は、細胞除去率が高く、細菌、ドナー由来の内在性遺伝子が排除可能であり、生体力学特性も維持される利点を有する。本研究では、初期温度、圧力印加速度などの圧力印加条件の組織構造への影響について検討した。[実験] 成体ブタの大動脈から10mm×10mmの血管試料を調製した。冷間等方圧加圧装置（株）神戸製鋼所）を用いて、様々な初期温度、印加速度、時間にて10000気圧の圧力印加した。組成の異なる洗浄液による所定の時間の浸透洗浄により細胞残渣等を除去した。処理標本の組織断面を顕微鏡観察、電顕観察にて細胞除去、組織構造を評価した。ラット皮下埋入実験を行った。[結果と考察] 印加プロフィール（初期温度、昇圧・保持・減圧時間）の異なる条件で超高静水圧を印加し、所定期間にて洗浄した。HE染色処理標本では、いずれの場合も細胞核の除去が示された。また、長時間の印加においても組織構造は保持されていた。ラット皮下埋入実験についても合わせて報告する。厚生労働省科学研究費ならびにヒューマンサイエンス振興財団研究費の補助を受けて行われた。

P-087 超臨界流体抽出による生体組織の脱細胞化

澤田和也¹、寺田彦彦²、吉田謙一³、船本誠一⁴、藤里俊哉⁴、岸田晶夫⁵、永谷憲哉¹、中谷武嗣¹、北村惣一郎¹

¹大阪産業短期大学 総合生活学科、²医療機器センター、³先端医療振興財団、⁴国立循環器病センター、⁵東京医科歯科大学

動物より抽出された心臓弁をバイオスキャフォールドとして応用するため、超臨界流体抽出法を応用した脱細胞化の可能性について検討を行った。用いる媒体やエントレーナを選択し、脱DNAや脱リン脂質効果について詳細な検討を行い、最適な処理条件の決定を試みた。また、超臨界流体処理による生体組織の力学安定性も同時に評価した。本報では、従来の脱細胞化手法による効果と超臨界流体抽出による効果を比較しながら発表を行う。

P-092 非石灰化を目指したエラスチン除去バイオスキャフォールドの作製

緒方裕之¹、寺田彦彦²、澤田和也³、吉田謙一⁴、船本誠一¹、藤里俊哉¹、岸田晶夫⁵、永谷憲哉¹、中谷武嗣¹、北村惣一郎¹

¹国立循環器病センター研究所、²財団法人医療機器センター、³大阪産業短期大学、⁴先端医療振興センター、⁵東京医科歯科大学

現在、我が国では年間に1万件を超える心臓弁置換手術が行われており、機械弁、もしくはブタ組織をダクルアルデヒド(GA)で固定化した異種生体弁が用いられている。しかし、機械弁はQOL上の問題を抱え、異種生体弁では石灰化などの問題を抱えている。我々は、再生型人口弁や血管の開発を目指し、脱細胞化したブタ組織の同種移植実験を行っているが、移植後の石灰化も認められており、移植組織の石灰化は抑制すべき課題の一つである。この原因や機構は未だ解明されていないが、生体組織内の構造タンパク質であるエラスチンが関与しているという報告がある。そこで、ブタ大動脈組織内部からエラスチン分解酵素を用いてエラスチンを選択的に除去したバイオスキャフォールドの作製について検討を行った。ブタ大動脈をGA水溶液により固定化処理し、その後、エラスターゼ(エラスチン分解酵素)によりエラスチンの分解除去を行った。GA水溶液の濃度、及び処理時間を調節することによって、エラスチンは安定化されずに酵素分解性を保持し、酵素的手法により分解除去が可能であった。また、エラスチンの除去に伴い組織構造が弛緩し、ドナー由来細胞もHE染色では染色されなかった。本方法により、血管組織から石灰化の原因とされるエラスチンを除去することが可能である。エラスチン除去された組織は、石灰化を生じない再生医療用バイオスキャフォールドとしての利用が期待出来る。

P-093 放射線照射を前処理とした生体組織の脱細胞化処理

松本誠一¹、吉田謙一²、菊池正博³、小林泰彦⁴、藤里俊哉¹、山岡哲二¹、岸田晶夫³、中谷武嗣¹

¹国立循環器病センター 再生医療部、²先端医療振興財団、³東京医科歯科大学、⁴日本原子力研究開発機構

我々は、ミニブタ心臓弁や血管、心臓、気管、軟骨等組織から細胞及びウイルス等のドナー由来成分を除去した脱細胞化組織の開発を行っている。脱細胞化組織はそのまま移植用組織として使用することの他、テラーモード型として自己細胞や幹細胞等を組み込むための生体スキャフォールドとして利用することができる。既に、独自技術として超高圧印加処理を用いた脱細胞化方法を報告しているが、今回は、放射線照射処理を用いた脱細胞化方法について検討した。摘出した食用ブタあるいはミニブタ大動脈をPBSに浸漬し、10Gyから1000Gyの範囲でγ線を照射した。続いて、PBSをベースとする洗浄液にて2週間洗浄した。照射直後と洗浄後の処理組織を組織学的に観察すると共に、組織内残留DNA量を測定した。種々のγ線量による細胞除去について組織学的に検討したところ、γ線未照射の組織では洗浄後も組織内に核の残存がみられたが、照射線量が増えるにつれて組織内の核の残存が減少していた。また、残存DNAについても、100Gy以上では大幅に減少する傾向が見られた。これらのことから、γ線照射を前処理とする脱細胞化処理方法は、生体スキャフォールドの作成に有効であることが示唆された。

P-149 超高静水圧処理法による脱細胞化骨・骨髓組織の調製と組織再構築の検討

橋本良秀¹、川喜田正夫¹、吉田謙一²、松本誠一³、木村剛⁴、藤里俊哉¹、岸田晶夫⁴、中谷武嗣⁵、北村惣一郎³

¹工学院大学 工学部、²先端医療振興財団、³国立循環器病センター 研究所 再生医療部、⁴東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、⁵国立循環器病センター

【緒言】我々は、ドナー由来細胞を除去した生体組織を細胞足場として利用するバイオスキャフォールドの開発を行っている。細胞除去法として超高静水圧印加と洗浄を組み合わせた超高静水圧処理法を考案した。本法は、血管・弁においては、細胞除去効率が高く、また、細菌、ドナー由来の内因性遺伝子も排除可能であった。本研究では、骨・骨髓組織への超高静水圧処理による骨バイオスキャフォールドの調製と新たな細胞による組織再構築について検討した。【実験】成体ブタの大腿骨（直径約30mm）を購入し、大腿骨体を種々の厚みに切断した。超高静水圧印加装置（株）神戸製鋼所を用いて超高静水圧印加によりドナー由来細胞を破壊し、洗浄により組織内の細胞残渣等を除去した。処理後の組織を組織学的に観察することで脱細胞化を評価した。脱細胞化組織に新たな細胞を播種、培養することで組織再構築を検討した。【結果と考察】超高静水圧処理した骨・骨髓組織は、目視観察では顕著な変化は見られず、骨髓腔内においても組織構造は維持されていた。細胞除去を組織切片標本のヘマトキシリン・エオジン染色にて評価した結果、骨および骨髓において細胞は除去されており、骨・骨髓組織においても本法の有用性が示された。得られた脱細胞化骨・骨髓組織への細胞播種による組織再構築についてあわせて報告する。厚生労働省科学研究費ならびに科学技術振興調整費の補助を受けて行われた。

P-094 ミニブタ置換移植におけるコラーゲン製人工血管への細胞浸潤

黒岩貴文¹、鳴海敏行¹、笹山典久²、湊谷謙司¹、吉田謙一³、松本誠一¹、森反俊幸⁴、白数昭雄²、永谷憲蔵¹、藤里俊哉¹、中谷武嗣¹、高野久輝²

¹国立循環器病センター、²ニプロ株式会社、³先端医療振興財団、⁴鈴鹿医療科学大学

現在、臨床にて使用されている人工血管は、年間約5万本が使用され、事実上完成段階にある。しかしながら、小口径や感染部位では自家血管やホモグラフトが使用される他、小児患者では成長性を得られないため、再生型人工血管の開発が望まれる。我々は、コラーゲン製の人工血管について、動物実験にて検討を行っている。コラーゲン製人工血管は、主として移植後に浸潤してきた線維芽細胞等による分解・置換を受け、吸収性人工材料とは異なった吸収並びに組織再生プロファイルを示すと考えられる。今回は、ミニブタを用いた置換移植実験において、人工血管への細胞浸潤について検討した。架橋コラーゲン膜を丸めて作成した長さ約2.5cm、内径約6mmのコラーゲン製人工血管を、クラウン系ミニブタ（株）ジャパンファーム）の下行大動脈に置換移植した。所定期間経過後に摘出し、組織学的に評価した。また、人工血管周囲にテフロン製シートによるラッピングを施したものと比較した。移植後の破断等は見られなかった。移植2ヶ月後に摘出したところ、細胞の浸潤は良好で、内腔面への血栓付着も見られなかったが、試料中央部で内膜の増殖によると思われる肥厚化が認められた。これに対し、ラッピングを施したものでは、細胞の浸潤は抑制されていたが、肥厚化は認められなかった。

P-152 再生型筋組織の構築を目的とした脱細胞化筋スキャフォールドの作製

江橋 具¹、松本誠一¹、吉田謙一²、岸田晶夫³、永谷憲蔵¹、藤里俊哉¹

¹国立循環器病センター 研究所、²先端医療振興財団、³東京医科歯科大学

【目的】筋摘出術や事故などによって筋肉を失った患者に対する治療法として、筋組織の移植が行われる。このとき、患者の移植片を摘出した部位は再生するものの、筋力の低下や組織損傷により患者のQOLは著しく低下する。本研究では、脱細胞化した動物組織をスキャフォールドとして用いた再生型筋組織について検討した。【方法】ブタ筋組織をミリメートルオーダーの厚さにスライスして、超高静水圧印加処理後、洗浄工程により細胞を除去して脱細胞化骨格筋スキャフォールドを作製した。スキャフォールドに播種するための筋芽細胞は、ブタ腎部骨格筋を細切したのちトリプシン消化により組織をばらばらにし、フィルターで結合組織を除去することで遊離した。注射器によるマイクロインジェクション法や遠心操作法などを用いてスキャフォールドに筋芽細胞を播種し、一定期間静置培養後、スキャフォールド内に生着した細胞数を測定した。【結果と考察】ブタ腎部から遊離した細胞は骨格筋特異的なデスミンを発現しており、ディッシュによる単層培養により良好に増殖・分化培養ができたことから、筋芽細胞であることが確認できた。超高静水圧印加処理を用いて作製した脱細胞化骨格筋スキャフォールドは、筋芽細胞が良好に生着・培養できた。このことから、再生型筋組織を作製できる可能性が示唆された。

130

STATIC CARDIOMYOPLASTY WITH SYNTHETIC ELASTIC NET SUPPRESSES VENTRICULAR DILATATION AND DYSFUNCTION AFTER MYOCARDIAL INFARCTION IN THE RAT

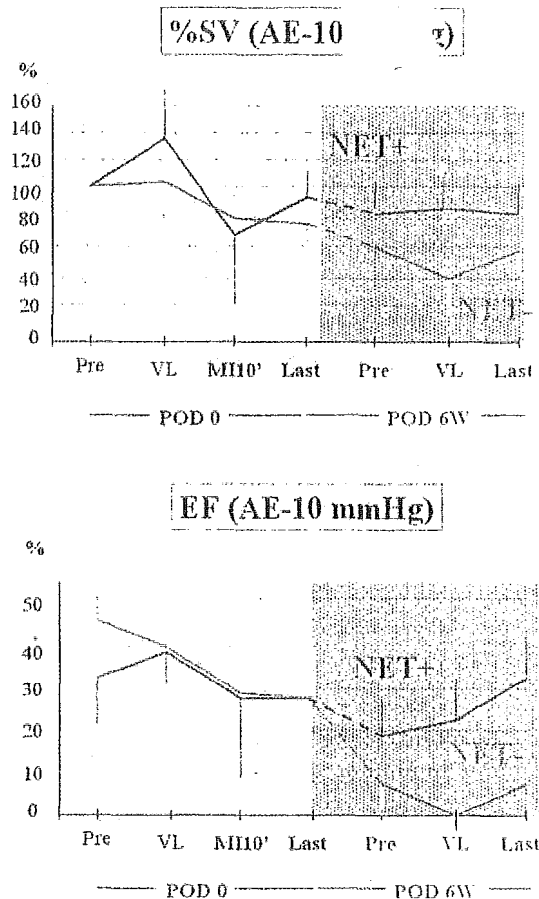
A.T. Kawaguchi,¹ A. Kishida,² T. Yamaoka,³ ¹Cardiovascular Surgery, Tokai University, Isehara, Kanagawa, Japan; ²Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan; ³Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan

Background: Rapping around the heart may prevent left ventricle (LV) from dilatation but may also interfere with diastolic relaxation. We develop a synthetic net with a dual elasticity; more elastic under a low tension and less elastic with an increasing tension, and tested its effect after induced myocardial infarction in the rat.

Methods: Pressure-volume (PV) relationships were successively analyzed before (PRE), after intravenous volume load (VL), and 10 minutes after occlusion of the left anterior descending artery (MI10'). Rats were then randomized into groups receiving synthetic net around the heart (NET+, n=6) and only partially behind LV (NET-, n=6) and underwent the same PV studies 6 weeks later. End-diastolic and end-systolic PV relationships were defined and LV size and function compared under standardized loading conditions.

Results: Increase in LV end-diastolic and end-systolic volumes were significantly suppressed 6 weeks later in NET+ rats, resulting in significantly preserved stroke volume (Figure: SV) and ejection fraction (Figure: EF) 6 weeks after MI. Presence or absence of net did not yield significant hemodynamic compromise under acute volume load 6 weeks after MI.

Conclusion: Static cardiomyoplasty using synthetic elastic net significantly suppress LV dilatation and dysfunction without restriction immediately and late after MI in the rat. Net material and elasticity need to be adjusted for optimal girdling effect, greatest benefits with least functional compromise.



ポリプレックスによる遺伝子導入機構

○ 山岡哲二^{1,2}、橋本朋子²、北川達哉²、村上章²

1 国立循環器病センター研究所生体工学部

2 京都工芸繊維大学繊維学部高分子学科

yamtel@ri.ncvc.go.jp

近年、ウィルスベクターの危険性が懸念され、非ウィルスベクターに対する期待が高まっている。現在は、ex vivo 遺伝子導入法が主流であるが、臓器の細胞などをターゲットとする場合、外来遺伝子を直接生体に投与するin vivo直接遺伝子導入の実現が強く望まれている。そこで、体内動態制御が容易なカチオン性高分子が期待されているが、その発現効率はいまだ極めて低く、さらなる改良が強く望まれている。

非ウィルスキャリアーの役割 一般的に、遺伝子導入機構を図1に示した。キャリアーとなるカチオン性分子は、静電的作用によってDNA分子を凝縮し、粒子径約 100nm の微粒子状複合体を形成する。ポリプレックスと呼ばれるこの複合体は、エンドサイトーシスにより細胞に取り込まれ、小胞に包まれて細胞内を移行すると考えられている。さらに、導入されたDNAはライソソームから脱出して細胞質に移行し、さらに核内にまで輸送されなければならない。

近年、これらのステップにおける効率を向上させる試みが精力的に進められているが、それに続く、転写効率に関してはほとんど研究されていない。この転写効率こそが、遺伝子導入法におけるファイナルステップである。

ポリカチオンの化学構造の影響 我々の研究グループでは、化学構造の異なる数十種類のポリカチオンを用いて遺伝子導入実験を行った。その結果、ある共通の化学構造を有するポリカチオンのみが高い遺伝子発現を誘導した。すなわち、ポリカチオンが3級(あるいは4級)カチオン基、および水酸基やアミド基などの非電荷親水基を有することが必須である^{1,2)}。いずれの化学構造も、ポリプレックスの物理化学的性質および動的性質を大きく変化させることによって、細胞内におけるポリプレックスの転写効率を大きく向上させる³⁾。すなわち、例え、従来の非ウィルスベクターを用いて、効率よく外来遺伝子を細胞核内に導入できたとしても、この転写効率という最大かつ最終のバリアーをクリアしない限り有効な非ウィルスベクターとは成り得ないことを示している。

さらに、最近、ポリプレックスを形成するポリカチオン分子自身の自己組織化能や、細胞内シグナルにตอบสนองしてDNA分子を放出する刺激応答性などを制御することによっても、転写効率を飛躍的に向上させることが可能となったので併せて発表する。

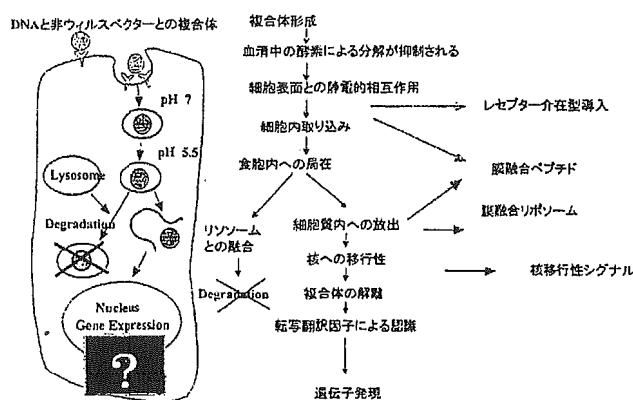


図1 非ウィルス性遺伝子キャリアーを用いた細胞への遺伝子

2Pa175

In vitro 組織再生を目的としたスキャホールド内細胞への遺伝子導入

京工繊大繊維¹⁾, 国循セ研²⁾ ○北川達哉^{1,2)}・小堀哲生¹⁾・村上 章¹⁾・山岡哲二²⁾

<緒言> *In vitro*で均一な組織を再構築化させる場合の様々な障壁が指摘されている。スキャホールド全体への均一な細胞播種は容易でなく、細胞増殖に伴うスキャホールド深部でのネクロシスも深刻な問題となっており、さらに、十分な細胞増殖速度も得られていない。そこで、血管組織の再構築を目的として、灌流型バイオリアクターを用いた多孔質スキャホールドへの細胞の動的播種法の確立と、灌流培養の諸条件が組織の再構築に与える影響を検討した。一方、スキャホールドから細胞増殖因子タンパクを徐放化する組織再生が多くなされているが、タンパク製剤の安定性に問題があり長期間の効果は期待できない。我々は、タンパクより安定なプラスミドに注目し、スキャホールドからの放出挙動と、スキャホールド内に存在する細胞への遺伝子導入システムを検討した。

<実験> 凍結乾燥法により、ポリ-L-乳酸 (PLLA; Mw=130,000) の中空多孔質スキャホールドを製作した。灌流条件下での細胞播種の可能性を検討するために、様々な濃度 ($0.05 \sim 2.0 \times 10^6$ cells/ml) の NIH/3T3 細胞、または、平滑筋細胞(AOSMC)懸濁液を、 $1.1 \sim 11.0$ mL/cm² min の灌流速度にてスキャホールドへ送液した。24 時間後に、接着細胞数とスキャホールド内の接着細胞の分布状態を評価した。また、細胞増殖実験では、細胞をスキャホールドへ灌流播種後、引き続き灌流培養を 7 日間行い、細胞増殖率および、スキャホールド内部での細胞分布状態を比較した。24 時間ごとに培養液を交換し、養分と酸素の有効濃度を維持した。さらに、灌流条件下での遺伝子導入に用いるキャリアー分子として、スキャホールドと疎水的に相互作用可能な疎水性基を付与した poly(DMAPAA-coMPC-co-stearylacrylate)を合成した。様々な手法によりキャリアー/プラスミド DNA 複合体をスキャホールドに担持させ、その徐放性の検討、および、灌流条件下での細胞への遺伝子導入能について検討した。

<結果・考察> 最適 (1.1 mL/cm² min) な灌流速度で細胞を播種することで、播種効率はほぼ 100% となり、さらにスキャホールドの表面から深部まで均一に播種することに成功した。細胞を播種後、様々な流速で 7 日間灌流培養した結果、灌流速度 4.0 mL/cm² min では、7 日間で約 22 倍に細胞が増殖した。さらに、速度を上昇させるとスキャホールドから細胞が剥離し、最適な灌流速度が組織の再構築に極めて重要であることが示唆された。一方、静置培養では、培養 3 日目以降では細胞は増殖しなかった。さらに、スキャホールド表面のみでしか細胞は増殖しておらず、壁厚が 1.0 mm で十分な連通孔を有するスキャホールドでさえ、深部では、養分および酸素の供給不足のために細胞死に至ることを示している。

スキャホールド内に播種した細胞への遺伝子導入においては、疎水性基を有するカチオン性高分子キャリアーを用いることで、遺伝子/バクテリヤ複合体の徐放化が可能となった。また、その導入効率はポジティブコントロールの PEI と同程度であった(図 1)。放出された複合体が周囲の細胞へ効率よく導入できることが示され、灌流培養下におけるトータルシステムの有用性が強く示唆された。



Fig.1 X-gal staining of PLLA scaffold lumen with after 1.1 mL/cm² min perfusion cell seeding for 48h.

Complexes were PEI/plasmid(A), and p(D-M-S)/plasmid(B).

Gene transfer on biodegradable porous scaffolds for tissue engineering

Tatsuya KITAGAWA^{1,2}, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA² (¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, JAPAN, and ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, JAPAN)

¹Tel : +81-75-724-7823, Fax : +81-75-724-7800, E-mail : seijo@kit.ac.jp

Keyword: Gene delivery / Porous scaffold / perfusion bioreactor

Abstract: Tissue engineering is very promising strategy to cure tissue defects, but there is not well-established system to achieve the three-dimensional tissue regeneration *in vitro*. In the present study, the effect of oxygen concentration and perfusion rate of medium on the attachment and growth of cells inside the biodegradable PLLA scaffolds using a novel bioreactor were investigated. It was found that 1.1 mL/cm² min perfusion rate is the optimum condition for cell attachment onto the PLLA scaffold and that 4.0 mL/cm² min perfusion rate is adequate for cell growth. Moreover, we tried to establish a novel system for tissue regeneration, which is composed of the incorporation of plasmid DNA into the scaffolds, subsequent sustained release, and direct gene transfer to cells on the scaffolds. The burst phenomenon of DNA was strongly suppressed by use of cationic polymers with hydrophobic groups as gene carriers.

1Pg191

カチオン性／疎水性両親媒性ミセルによる遺伝子導入

¹京工繊大繊維、²国循セ研、³京府医○橋本朋子^{1,2}、小林由美子¹、松田修³、小堀哲生¹、村上章¹、山岡哲二²

【緒言】高い発現を示す非ウイルス性遺伝子キャリアーのための最適な分子設計は未だ定まっていな
い。我々は、これまでに、従来のポリカチオン分子に親水性基を付与し、ポリプレックスのコンパク
ションを抑制することで、遺伝子導入機構の最終ステップである転写因子によるポリプレックス認識
効率を飛躍的に向上させることに成功してきた。本研究では、全く相反する化学修飾、すなわち、ポ
リカチオン分子に疎水基を結合させることによる遺伝子導入効率の向上を目指した。従来より、細胞
膜との親和性向上を目指した疎水基の利用に関する検討が報告されているが、我々は、カチオン基と
疎水基による両親媒性が織りなす疎水化ポリカチオン分子の自己組織化構造が導入遺伝子の細胞内被
転写翻訳効率に与える影響に焦点をあてて検討を進めた。

【実験】カチオン性セグメントとして、アルギニンやリジンからなるオリゴペプチド、および、分子
量約 25000 の直鎖状ポリエチレンジアミン(PEI)などの従来型ポリカチオンを、また、疎水性セグメント
として、飽和脂肪酸、オリゴ乳酸、および、オリゴロイシンを選択し、様々な組み合わせの両親媒性
キャリアー分子を合成した。得られた両親媒性キャリアーの水溶液中での自己組織化構造は、疎水ブ
ローブであるピレンを用いた蛍光法、および、AFM 観察により検討した。また、pCMV-Luc との複合
体形成能をアガロースゲル電気泳動で確認したうえで、ポリプレックスのコンパクションの程度をエ
チジウムブロマイドの蛍光強度測定にて、さらに、その安定性（ポリプレックスの解離し易さ）はポ
リビニル硫酸カリウム添加によるポリイオン交換反応にて評価した。これらのキャリアー分子を用い
て、*in vitro* クロロキシン処理法により pCMV-Luc を COS-1 細胞へ導入することで、上記の諸因子が発現
効率に与える影響について考察した。

【結果・考察】合成した両親媒性のキャリアーは、水溶液中で、疎水性基をコアとしたミセル様の会
合体を形成していることが示された。例えば、KRRRKRRRKRRRC の N 末端に疎水セグメント Leu_n
を結合させた場合、十分な疎水性を有する Leu₁₂ を結合させた場合に高分子量の自己組織体が GPC に
よって確認され、ピレンプローブ法にて求めた臨界ミセル濃度(CMC)は、0.16g/L であった。また、直
鎖状ポリカチオンに疎水基を導入した場合にも、その導入率に依存してミセル構造を形成することが
AFM より明らかとなった。これらとプラスミド DNA とのポリプレックスは、プラスミド DNA がミセ
ル状ポリカチオンを取り巻くような形状をとっていると考えられる。両親媒性のキャリアーを用い遺
伝子導入を行った場合、カチオンセグメントのみの場合よりも有意に高い発現効率の向上が示された。
直鎖状ポリカチオンの場合には、自己組織化構造を形成することでプラスミド DNA とのエンタングル
メントが緩和され、ポリプレックスの解離が容易となり、細胞内被転写効率が向上することで発現効
率が有意に高くなったと考えている。一方、比較的低分子量のカチオン性オリゴマーの場合では、自
己組織化ミセル構造をとることによるみかけの分子量の増加が与える影響が大きくなり、この分子量
増加が発現効率の向上をもたらしたのではないかと考えられる。

Gene transfer with cationic/hydrophobic amphiphilic micelles

Tomoko HASHIMOTO^{1,2}, Yumiko KOBAYASHI¹, Osamu MAZDA³, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹,
and Tetsuji YAMAOKA² (¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology,
Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, JAPAN, ²Department of Biomedical Engineering, National
Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, JAPAN, and ³Kyoto
Prefectural University of Medicine, Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-0841, JAPAN)

¹Tel : +81-75-724-7823, Fax : +81-75-724-7800, E-mail : seiho@kit.ac.jp

Keyword: gene transfer / amphiphilic / transcription efficiency / micelle

Abstract: An optimum molecular design of effective non-viral gene carriers has not been clarified yet. In the
present work, we are focusing on the last step of the gene transfer, the recognition by the transcription factors in
cells. We synthesized various amphiphilic-type non-viral gene carriers and investigated the relationship between
their self-organization structures in aqueous media and the transcription efficiency *in vitro*. The amphiphilic
carriers were found to lead to the improved gene expression resulted from the adequate strength of polyplexes
and their easy disassembly.

2Pb176

HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの軟組織再生能の評価

¹京工繊大繊維、²国循セ研○中村友亮^{1,2}、小堀哲生¹、村上章¹、山岡哲二²

<緒言>

近年、軟組織再生用スキャホールド材料として、組織親和性に優れたコラーゲン、もしくはその複合体が広く研究されているが、生体由来であるために抗原性等の問題が指摘されている。本研究では、コラーゲンに代わる、安全性に優れた合成高分子材料を用いた軟組織再生を達成することを目的とし、優れた骨再生スキャホールドであるポリ乳酸と、ポリエーテルのブロック共重合化により、柔軟性を有するポリ乳酸誘導体ハイドロゲルを作製後、ハイドロキシアパタイト(HAp)と複合化し、*in vitro*における細胞接着・増殖性の評価を行った。さらに、ラット皮下に埋入することで、組織浸潤性とカプセル化よりその組織親和性を評価した。

<実験>

Oligo L-lactic acid(OLLA)、polyethylene glycol(PEG)、および 1,10-decanedicarboxylic acid(DDA)に、溶媒として diphenyl ether、触媒として tin(II)oxide を加えて、180℃、30mmHg 下で直接脱水重縮合法により、様々な組成の OLLA/PEG マルチブロック共重合体を合成した。凍結乾燥法によりスポンジ形状ハイドロゲルを作製後、物性評価として、引張試験、*in vitro*加水分解実験を行った。交互浸漬法¹⁾により、HAp 複合化ハイドロゲルとし、*in vitro*における細胞播種実験を行った。続いて、一定期間ラット皮下に埋入し、ハイドロゲル内部への組織浸潤を顕微鏡で観察した。

<結果・考察>

表1に示す OLLA/PEG マルチブロック共重合体の合成に成功した。得られたスポンジの物性評価の結果、軟組織に類似した柔軟性、生体吸収性を有し、また、PEG 組成を変化させることで、力学的強度、分解挙動を制御できることが確認された。HAp 複合化ハイドロゲルの細胞播種実験、ラット皮下埋入実験の結果、HAp 複合化、および PEG 組成の上昇とともに、細胞接着・増殖性、組織浸潤性が顕著に向上することが確認された。以上より、HAp 複合化 OLLA/PEG マルチブロック共重合体ハイドロゲルの軟組織再生用スキャホールドとしての有用性が示唆された。

Table 1. Results of multiblock copolymerization of OLLA, PEG, and DDA

Polymer	Feed ratio OLLA/PEG (wt/wt)	Composition ^a OLLA/PEG (wt/wt)	Yield(%)	Mn ^b	Mw ^b	Mw/Mn	Multiblock Index ^c
LE(m)-10	90/10	89/11	71	34000	58000	1.69	1.7
LE(m)-20	80/20	78/22	59	33000	51000	1.56	3.5
LE(m)-30	70/30	67/33	78	28000	37000	1.33	4.3
LE(m)-40	60/40	58/42	77	17000	22000	1.26	3.3

a: Determined by ¹H-NMR.

b: Determined by GPC with THF as eluent, using polystyrenes standards.

c: Repeating number of [PLLA-PEG] diblock segments calculated from the composition and Mn.

1) T. Taguchi, A. Kishida, M. Akashi, Chem Lett 1998:8:711-2

Soft Tissue Regeneration Using Novel Biodegradable Hydrogel /HAp Composite Materials.

Yusuke NAKAMURA^{1,2}, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA²

(¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute)

Tel: +81-75-724-7823, Fax: +81-75-724-7800, E-mail: seijo@kit.ac.jp

Key Word: OLLA / PEG / multiblock copolymer / soft tissue / regeneration / hydroxyapatite

Abstract: Antigenicity of collagen or its composite has been pointed out for the scaffold in soft tissue regeneration. We have been trying to achieve the soft tissue regeneration using various synthetic polymer scaffolds. In this study, we prepared composite materials of OLLA/PEG multiblock copolymer hydrogels with various PEG compositions and hydroxyapatite(HAp). These materials were processed into porous structure, seeded with NIH/3T3 cells, and their attachment and proliferation were evaluated *in vitro*. They were also implanted into rat subcutaneous tissues for assessing tissue regeneration activities *in vivo*. The higher HAp deposition of hydrogels with larger PEG contents caused better results both *in vitro* and *in vivo*.

(10) 5/25-26

1Pf174

ポリリシン - ポリ乳酸 AB ジブロック共重合体ミセルと
プラスミド DNA との相互作用関西大工 大矢裕一・○金平光司・有村英俊・大内辰郎
京工繊大繊維 橋本朋子、国立循環器病セ 山岡哲二

<緒言>

近年、治療用遺伝子を生体内の特定部位へ配送する非ウイルス性の遺伝子配送用キャリアーとしてカチオン性ポリマーの開発が進められている。アニオン性のプラスミド DNA と安定なポリプレックスを形成するためには高分子量のカチオン性ポリマーを用いる必要があるが、カチオン性ポリマーとプラスミド DNA との相互作用が強すぎると、細胞に取り込まれた後でポリプレックスが解離しにくく、遺伝子発現効率が低くなるという懸念がある。我々はこれまでに、側鎖にアミノ基やカルボキシル基を有するポリリシン - ポリ乳酸 AB ジブロック共重合体やポリアスパラギン酸 - ポリ乳酸 AB ジブロック共重合体とその両親媒性構造により水溶液中で自己会合し、表面に電荷を有するポリペプチドセグメントが集積化したコア - シェル型の生分解性高分子ミセルを形成することを見出している^{1,2)}。そこで本研究では、表面に短いポリリシンセグメントが集積化した生分解性カチオン性ミセルの調製を行い、得られたミセルを遺伝子配送用キャリアーとして評価するためにプラスミド DNA とのポリプレックス形成能に関して検討した。このミセルは表面に正電荷が集積化しているため、低分子量でもプラスミド DNA と安定なポリプレックスを形成し、細胞に取り込まれた後でコアのポリ乳酸部分の分解によりミセルが崩壊すると、集積化していない低分子量のポリリシンセグメントではプラスミド DNA を保持できず、ポリプレックスが崩壊してプラスミド DNA が解離するので、高い遺伝子発現効率を示すことが期待できる。

<実験>

側鎖アミノ基が 4 級化されたポリリシン - ポリ乳酸 AB ジブロック共重合体(Plys⁺-b-PLA-[m, n]: m, n はそれぞれリシンユニットおよびラクチドユニットの重合度)の合成および表面に正電荷を有するミセルの調製を行った^{1,2)}。得られたミセルとプラスミド DNA とを種々のカチオン/アニオン(C/A)比で混合し、ポリプレックス形成能に関して検討した。さらに、種々の C/A 比で混合したポリプレックスを pH 7.4, 37°C でインキュベートし、所定時間後のポリプレックスの安定性についても検討した。

<結果・考察>

得られたミセルはプラスミド DNA と C/A 比が 2 以上で安定なポリプレックスを形成することが示唆された(Fig. 1A)。また、C/A 比が 2 の場合、ポリプレックス形成 5 日後に形成したポリプレックスが崩壊して、プラスミド DNA がリリースされることが示唆された(Fig. 1B)。

- 1) H. Arimura, Y. Ohya, T. Ouchi, *Macromol. Rapid Commun.*, **25**, 743(2004).
- 2) H. Arimura, Y. Ohya, T. Ouchi, *Biomacromolecules*, in press.

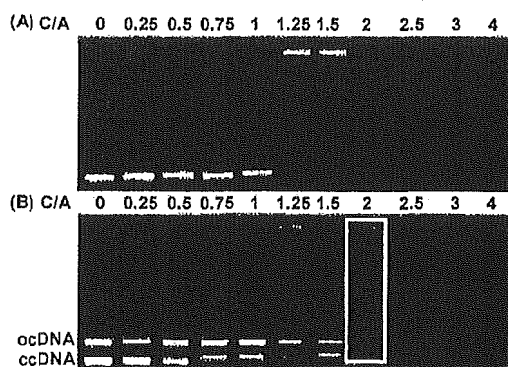


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of polyplexes formed between PLYS⁺-b-PLA-[9, 21] biodegradable cationic micelles and plasmid DNA after (A) 0 day, and (B) 5 day.

Interaction between Plasmid DNA and Polymeric Micelles Prepared from Polylysine-block-Polylactide AB-Type Diblock Copolymer

Yuichi OHYA¹, Kouji KANEHIRA¹, Hidetoshi ARIMURA¹, Tatsuro OUCHI¹, Tomoko HASHIMOTO², and Tetsuji YAMAOKA³ (¹Faculty of Engineering, Kansai University, 3-3-35 Yamate-cho, Suita, Osaka 564-8680, Japan, ²Faculty of Textile Science, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan, ³Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

¹Tel: +81-6-6368-0818, Fax: +81-6-6339-4026, E-mail: yohya@ipcku.kansai-u.ac.jp

Key Word: polymeric micelle / polylactide / polyplex formation / biodegradable / diblock copolymer / gene delivery

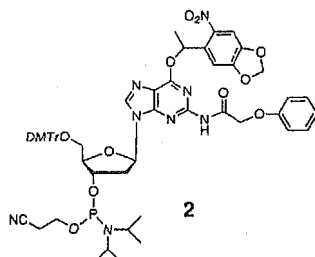
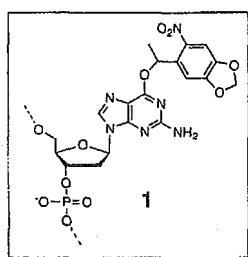
Abstract: Polylysine-block-polylactide amphiphilic diblock copolymer was synthesized. Biodegradable polymeric micelles having positively charged surfaces were prepared from the obtained diblock copolymer by dialysis method. Polyplex formation behavior between plasmid DNA and the biodegradable positively charged polymeric micelles and stability of the polyplex were investigated.

2Pe167

光切断性保護基をグアニン塩基部位に持つ
アンチセンス核酸の合成とその二重鎖形成能の光誘導¹京工繊大繊維・²帝京科学大理工・³国立循環器病センター 生体工
○岩瀬 礼子²・福井 宇内¹・小堀 哲生¹・山岡 哲二³・村上 章¹

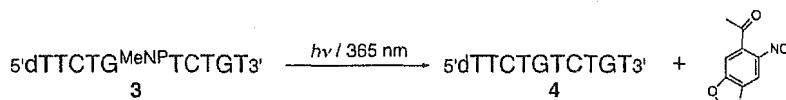
[目的] アンチセンス核酸による遺伝子発現制御を光照射により時間や場所を特定して誘導する方法は、遺伝子機能の解明において新たな手段を提供すると考えられる。そこで、アンチセンス核酸のグアニン塩基部位に光切断性保護基を導入し(1)、それを用いて標的遺伝子との二重鎖形成を光誘導する方法の構築を目的とした。光切断性保護基には、核酸への損傷が少ない 365nm の光照射で除去可能なメチルニトロピペロニル(MeNP)基を用いた。

[結果・考察] まず、O6 位に MeNP 基を持つデオキシグアノシンホスホロアミダイト誘導体(2)をデオキシグアノシンから 7 工程で合成した(全収率 12%)。これを用いて MeNP 基を含む DNA 10 量体(MeNP-ODN: 5'-dTTCTG^{MeNP}TCTGT3')を得た。MeNP-ODN を用いて MeNP 基の光切断反応を検討した結果、365nm の紫外光(トランスイルミネーター; 2.5mW/cm²)を 5 分間照射することで MeNP 基を 98%切断できることが分かった。次に、MeNP-ODN の二重鎖形成能の光誘導を、UV 融解温度(T_m 値)測定により検討した。MeNP-ODN と相補鎖 RNA との二重鎖の T_m 値(16℃)は、天然型 DNA 10 量体と相補鎖 RNA との二重鎖の T_m 値(41℃)より 25℃減少した。一方、MeNP-ODN と相補鎖 RNA の混合溶液に 365nm の紫外光を 5 分間照射した後の T_m 値は、天然型 DNA と相補鎖 RNA との二重鎖の T_m 値と同じ値となった。以上の結果から、グアニン塩基部位に MeNP 基を持つ修飾アンチセンス核酸は、その二重鎖形成能を短時間の光照射で誘導できることが判明した。

Table 1. Values of T_m for MeNP-ODN with the complementary RNA

	T _m (°C)	ΔT _m (°C)
unmodified ODN	41	-
MeNP-ODN	16	-25
MeNP-ODN (UV irradiation)	41	0

Measurement: 10mM phosphate buffer (pH7.0), 1.0M NaCl. Concentration of total oligonucleotides: 2 μM. Condition of UV irradiation: transilluminator (hν 365nm, 2.5 mW/cm², r.t., 5min)



Synthesis of antisense oligonucleotides containing a photocleavable protecting group on a guanine base and their photoinduced duplex formation

Reiko IWASE², Udai FUKUI¹, Akio KOBORI¹, Tetsuji YAMAOKA³, and Akira MURAKAMI¹ (¹Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan, ²Department of Biosciences, Teikyo University of Science and Technology, 2525 Yatsusawa, Uenohara, Yamanashi 409-0193, Japan, ³Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

²Tel: +81-554-63-4411, Fax: +81-554-63-4431, E-mail: iwase@ntu.ac.jp

Key Word: photocleavable protecting group / deoxyguanosine derivative / antisense oligonucleotide / methylnitropiperonyl group / regulation of duplex formation

Abstract: An antisense oligonucleotide containing a methylnitropiperonyl (MeNP) group at O6 position of deoxyguanosine (MeNP-ODN) was synthesized to induce the duplex formation by UV irradiation. The MeNP group was removable by UV irradiation at wavelength of 365nm for 5min. The duplex of the MeNP-ODN with the complementary RNA was significantly unstable compared with the unmodified ODN-RNA duplex. After UV irradiation to the mixture of the MeNP-ODN with the complementary RNA, the T_m value was same as that of the unmodified duplex. These results suggest that the RNA binding ability of the MeNP-ODN can be induced by photocleavage of the MeNP group.

2Pe197

細胞機能解析チップの開発 (II)
微小空間における細胞の刺激応答解析

島津製作所基礎研 ○務中達也・叶井正樹・阿部浩久・中西博昭・早大理工 庄子習一、

国立循環器生体工 山岡哲二、京工繊大 坂本隆・小堀哲生・村上章

<緒言>生物のゲノム構造が次々と明らかにされつつある中で、今後は遺伝子の発現が実際の細胞系においてどのように機能するかを時系列に解析することが重要となってきた。一方、近年 μ TAS (micro total analysis systems) を利用した極微小空間における分析システムの開発が盛んに行われており、これらの技術を適用したマイクロチップを用いることで、極微量しか得ることのできないサンプルの測定、並列化によるハイスループット分析、多数の細胞の平均値ではない各細胞個々の機能解析、局所刺激による細胞応答の観測等が可能になると期待されている。そこで我々は、マイクロチップ中の微小空間で細胞を培養し、マイクロバルブを用いて定量的な刺激を与えた際の細胞応答を B/F 分離なしに経時的に測定可能なシステムを開発することで、生体高分子が担う細胞機能の経時的解析を行うことを目的としている。具体的には、顕微鏡下で蛍光時間分解偏光解消法を適用して夾雑蛍光を除去しながら経時的な測定を可能とするシステムを開発してきた。今回は、マイクロバルブを用いて細胞に刺激を与えた際の応答 (タンパク質の放出等) について測定した結果について報告する。

<実験と結果> Fig. 1 に今回我々が使用したマイクロチップの SEM 写真と断面図を示す。Si 基板をエッチングして直径 1mm 深さ 0.3mm の円柱状の穴を形成した後、上部は poly(dimethylsiloxane) と、下部はパイレックスガラスと接合して体積が 240nL の微小培養室を作製した。本報告では、ハイブリドーマが産生する抗体 (IgG) を検出するために、抗体と特異的に結合する Protein_A を Ru(II) 錯体で標識した蛍光プローブを用いた。はじめに血清飢餓状態で 1 日間培養し抗体の産生を抑制したハイブリドーマ細胞をマイクロチップの微小培養室に導入し、次にマイクロバルブにて 10%FBS を含む DMEM 培地を 240nL 導入した時点から刺激開始時間とし、その後 4 時間の抗体産生量を顕微鏡下で蛍光時間分解偏光解消法にて経時的に測定した。蛍光異方性値は培地等からの夾雑蛍光を除去するため発光後 50nsec-100nsec における蛍光偏光強度の値を用いて計算した。結果を Fig. 2 に示す。コントロールとして血清なしの培地を同様の方法で 240nL 導入した場合 (□) に比べて、血清で刺激した場合 (●) においては、ハイブリドーマ細胞から時間とともに抗体産生が開始されていることが観測できた。

<謝辞>本研究は生研センター「新事業創出開発事業」の委託により行われた。ハイブリドーマ (12-1B6) は理研細胞開発銀行より提供を受けた。

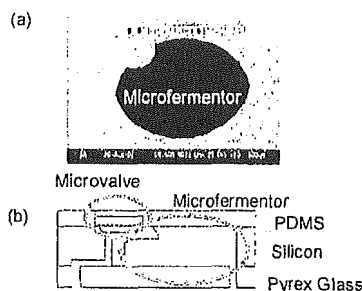


Fig. 1 (a) SEM image (b) Schematic cross view of the integrated microfermentor.

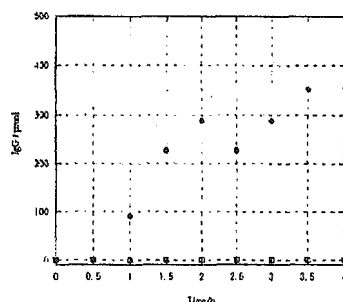


Fig. 2 Antibody production of the hybridoma cells.

Development of the cell analysis chip (II)

Tatsuya MUNAKA^{1,2}, Masaki KANAI^{1,4}, Hirohisa ABE¹, Hiroaki NAKANISHI¹, Takashi SAKAMOTO², Akio KOBORI², Tetsuji YAMAOKA³, Shuichi SHOJI⁴, and Akira MURAKAMI² (¹Technology Research Laboratory, Shimadzu Corporation, 3-9-4, Hikari-dai, Seika-cho, Soraku-gun, Kyoto, 619-0237, Japan

²Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8585, Japan ³Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, 565-8565, Osaka, Japan ⁴Major in Nanoscience and Nanoengineering, Waseda University, 3-4-1, Okubo, Shinjuku, Tokyo, 169-8555, Japan)

¹Tel: +81-774-95-1650, Fax: +81-774-95-1619, E-mail: munaka@shimadzu.co.jp

Key Word: micro total analysis systems/ time-resolved luminescence anisotropy analysis / cell analysis

Abstract: In recent years, cell analysis has attracted increased attention in bioanalytical and biotechnological applications. On the other hand, microchip techniques, which are called micro total analysis systems (μ TAS), have been developed especially in chemical and biochemical analysis fields. We took advantage of a feature of μ TAS and developed a system that can detect a small amount of the protein released by a cell without bound/free (B/F) separation protocol and with high sensitivity. In this report, we describe the continuous monitoring of immunoglobulin G (IgG) production of hybridoma cells stimulated by the serum.

2Pf168

新規光架橋型アンチセンス核酸の開発(II)

糖環 2'位ソラレン修飾型アンチセンス核酸の合成とその機能

○ 樋口 麻衣子¹、小堀 哲生¹、岩瀬 礼子²、山岡 哲二³、村上 章¹¹京都工芸繊維大・繊維、²帝京科学大・理工、³循環器病セ研

[緒言] 疾患に関連する遺伝子の探索とその機能の解明が進み、たった1塩基の遺伝子の変異が重大な疾患の原因となる例も報告されてきた。これら変異遺伝子の発現を特異的に制御できれば、副作用のない疾患の治療につながる。本研究では、点突然変異遺伝子から転写される mRNA を特異的に制御することを目的とし、新規アンチセンス核酸の開発を行なった。UVA(365nm)照射によりピリミジン塩基に特異的に架橋する光架橋分子ソラレンを持つアンチセンス核酸を開発した。我々は既に、5'末端にソラレンを修飾した光架橋型アンチセンス核酸 (Ps-oligo) を開発し、UVA 照射により子宮頸がん細胞の増殖を抑制することを報告している¹⁾。しかし、5'末端に修飾したソラレンはフレキシビリティが高く、配列非特異的に架橋する可能性を否定できない。そこで今回、配列特異性の向上を狙い、ソラレンを導入する位置として糖環 2'位を選択した (2'-Ps-oligo)。さらに、最も光架橋効率の良い 2'-Ps-oligo を開発するために糖環 2'位とソラレンをつなぐ種々のリンカーを持つ 2'-Ps-oligo を分子設計、合成し、それぞれの 2'-Ps-oligo と相補的な oligo-RNA が形成する二重鎖の構造評価と光架橋効率の検討を行った。

[実験および結果] アデノシンの糖環 2'位に、2種類のリンカーを介して 4,5',8-Trimethylpsoralen を導入したアデノシンモノマーユニットを合成した。このモノマーユニットをオリゴヌクレオチド (15mer) に導入し、メチレンリンカー型 2'-Ps-oligo (2'-Ps-met) とアミドメチレンリンカー型 2'-Ps-oligo (2'-Ps-amd) を得た。2'-Ps-oligo と相補的な oligo-RNA (match-RNA) との T_m を測定した結果、同配列をもつ天然型核酸 (15mer, T_m=67°C) に比べ、2'-Ps-met では ΔT_m=-4°C、2'-Ps-amd では ΔT_m=-10°C と、2'-Ps-amd の方が 2'-Ps-met よりも不安定な二重鎖を形成していることがわかった。二重鎖形成時のソラレンの挙動を調べるために、蛍光分光法による解析を行なった。ソラレンは塩基間にインターカレートすることで蛍光強度が減少することが報告されている²⁾。2'-Ps-met の場合、oligo-RNA との二重鎖形成により蛍光強度が減少したが、逆に 2'-Ps-amd では蛍光強度が増加した。このことから、それぞれが形成する RNA との二重鎖において、ソラレンの存在位置は異なり、2'-Ps-amd に比べ、2'-Ps-met ではソラレンがより二重鎖の内部に位置することが示唆された。以上より、リンカーを変えることで、ソラレンの存在位置を制御することができることが示唆された。発表では、光架橋実験の結果も含め報告する。

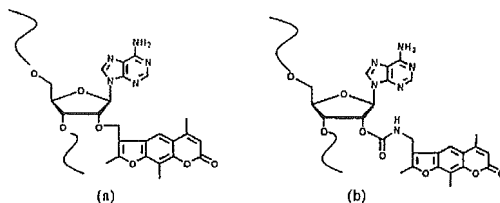


Figure. Structure of (a) 2'-Ps-met (b) 2'-Ps-amd

1) Murakami, A., Yamayoshi, J., Iwase, R., Yamaoka, T. and Wake, N. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13(2001) 25-34.2) Salet, C., Bensasson, R. *Biochem. Biophys. Acta.*, (1980) 379-383.

Development of new photo-sensitive antisense oligonucleotides(II)

Synthesis and properties of 2'-psoralen-conjugated oligonucleotides

Maiko HIGUCHI¹, Akio KOBORI¹, Reiko IWASE², Tetsuji YAMAOKA³ and Akira MURAKAMI¹

(¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan. ²Department of Biosciences, Teikyo University of Science and Technology, 2525 Yatsusawa, Uenohara, Katsuragi-gun, Yamanashi 409-0193, Japan. ³Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan)

¹TEL&FAX: +81-75-724-7849, E-mail: akiram@kit.ac.jp(A.Murakami)**Keyword:** Antisense oligonucleotide / Inhibition of gene expression / Psoralen / Photo-crosslink / Point mutation

Abstract : In order to selectively regulate the expression of the gene having a point mutation, the photo-sensitive antisense oligonucleotides were adopted. Two types of photo-sensitive oligonucleotides whose 2'-OH was modified with psoralen were synthesized (2'-Ps-oligo). One is the 2'-Ps-oligo which has a methylene linkage between 4'-position of 4,5',8-trimethylpsoralen and 2'-oxygen of adenosine, 2'-Ps-met. Another is 2'-Ps-oligo which has an amidomethylene linkage, 2'-Ps-amd. The fluorescence intensity of the 2'-Ps-amd was increased by the hybridization with the complementary oligo-RNA, although the fluorescence intensity of the 2'-Ps-met was reduced. These results suggest that the molecular design of the linker arm could be a crucial issue of the photodynamic antisense therapy.

[210] Intracellular Disassembly and Transcription Efficiency of Polyplexes Delivered into Cells Using Novel Self-Assembling Gene Carriers

Tetsuji Yamaoka, Tomoko Hashimoto, Tatsuya Kitagawa, Akira Murakami. *Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan; Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan*

Various nonviral gene vectors, which simultaneously form polyplexes with DNA through electrostatic interaction, have been proposed so far. The mechanism of the polyplex-mediated gene transfer is thought to follow the general endocytotic process. Therefore, many researches have been focusing on each step during the intracellular trafficking to improve their efficiencies. For example, (1) interaction with plasma membrane, (2) internalization into the cells, (3) escape from the endosome, and (4) trafficking to nuclei have been widely studied. We have recently established some systems, with which introduced polyplexes were efficiently delivered into nuclei. Even in these systems, some non-viral carriers were found to lead to high gene transfection and the others could not. According to this finding, we focused on the last step following nuclear localization, that is, disassembly of the complexes and DNA recognition by the transcription factors.

The transcription of the transgene may require the disassembly, but the polyion complexes are hard to be dissociated at the usual physiological condition. One possible mechanism is the polyion interexchange reaction between complexes and another polyanion, by which intact DNA is released from the polyplexes. We found that polycations having abundant nonionic hydrophilic groups lead higher gene expression. These groups seem to impart hydrophilic nature to the complexes and suppress the undesired compaction since they would not be involved in the complex formation, resulting in the easy disassembly of the polyplexes.

In the present study, we have newly synthesized various self-assembling non-viral carriers composed of assembling components and cationic water-soluble polymeric components. The correlation of compaction tendency and disassembling feature of their polyplexes and the transgene expression efficiency in vitro were studied. One of the self-assembling non-viral carriers we developed was hydrophobic group-bearing linear water soluble polycations, poly(dimethylaminopropyl acryl amide-co-acrylamide). The copolymers with adequate amount of hydrophobic groups were found to form partial-micelle structure above their CMC, and this structure strongly suppress polyplex compaction and also facilitate the DNA release via polyion interexchange reaction. The improved disassembly of the polyplexes in living cells was successfully confirmed using fluorescence resonance energy transfer (FRET) between FITC-labeled gene carrier and Cy3-labelled plasmid DNA. FRET efficiency was greatly reduced in the case of partial-micelle carries, indicating intracellular disassembly, while the unmodified carrier shows FRET phenomenon as well as in buffer solution. Unmodified copolymers In vitro transfection efficiency of the novel type carriers in HepG2 cells were found to be greatly enhanced by this easy-disassembling nature of the polyplexes.

Keywords: Gene Transfer; New Technologies; Non-Viral Gene Transfer

Date: Thursday, June 02, 2005

Session Info: Poster Session: Molecular Conjugates (4:00 PM-7:30 PM)

Presentation Time: 04:00 PM

Room: Exhibit Hall 2

[Close Window](#)

2C06

幹細胞特異的スキャホールドの評価

(国立循環器病センター・研究所) ○山岡哲二,
(京工繊大・織) 樋上智一, 内田 翔, 村上 章

〔緒言〕 未分化で多分化能を有する造血幹細胞は、患者本人から採取することが可能であるために、血管再生をはじめとして様々な組織再生への応用が期待されている。現在、モノクローナル抗体を用いた磁気ビーズ法や、蛍光剤を用いた FACS 法により骨髓細胞から造血幹細胞のみを取り出して利用する試みがなされているが、操作が困難であり必ずしも臨床に適した方法ではない。そこで、造血幹細胞を選択的に吸着する生体吸収性スキャホールドを開発することで、採取した骨髓細胞を直接播種して、移植できる治療システムの構築を目指した。

〔実験〕すでに血管再生用スキャホールドとして用いられているポリ(L 乳酸-co ε カプロラクトン)の多孔質体の表面を、1N の NaOH で 30 分間加水分解することで表面にカルボキシル基を導入した。1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでカルボキシル基を活性化後、抗ヒト CD34 マウス IgG 抗体を固定化し、スキャホールド表面に残存した活性化カルボキシル基は、2-アミノエタノールでキャッピングした。固定化された抗体量は、ホースラディッシュペルオキシダーゼで標識された抗マウス IgG ギート IgG 抗体を用いて間接的に定量した。この抗体修飾スキャホールド上に、CD34 抗原マーカーをもつヒト白血球由来の KG-1a 細胞 2×10^6 個/50ml を流速 0.05ml/min で播種し、接着した細胞数は、WST-1 法により計数した。比較のために、未処理スキャホールドおよびコントロールスキャホールドにも同様に細胞播種した。

〔結果と考察〕スキャホールド上に固定化された抗体量は、30ng/スキャホールド程度であった。図 1 に、各スキャホールド上に接着した細胞数を示している。KG-1a 細胞は浮遊細胞であるので、未処理およびコントロールスキャホールド上に認められた細胞は、非特異的に多孔質構造にトラップされたものと考えられる。そこで、孔径と連通孔構造を制御することでこの非特異的トラップを抑制した。図 1 より明らかなように、抗体固定化スキャホールド上には、他の約 4 倍の細胞が吸着した。さらに、CD34 陽性/陰性混合細胞懸濁液系においては、スキャホールド上への目的細胞の高い濃縮効果を発揮することがフォローサイトメーターを用いた検討から明らかとなった。

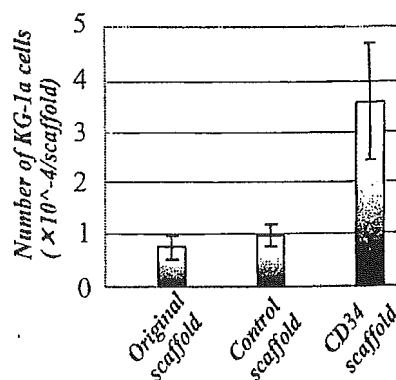


Fig.1 Number of KG-1a cells adhered on the original, control scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, and capped with 2-aminoethanol), and CD34 scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, reacted with anti-CD34 mouse IgG antibody, and capped with 2-aminoethanol). 2×10^6 KG-1a cells were seeded and cultured for 3hrs.

Development and evaluation of novel biodegradable porous scaffolds with the stem cell-specific adhesion, Tetsuji YAMAOKA, Tomokazu HIGAMI, Shō UCHIDA, Akira MURAKAMI, Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujisirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, Tel: +81-6-6833-5012 ext. 2637, FAX: +81-6-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

E-6

ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾による細胞接着性亢進

京工繊大繊維¹・国立循環器病センター研究所²○内田 翔^{1,2}・北川達哉^{1,2}・小堀哲生¹・村上 章¹・山岡哲二²

【緒言】生体吸収性かつ非毒性であるポリ乳酸系スキャホールドの細胞親和性を改善するためには、フィブロネクチン由来の細胞接着性ペプチドとして広く知られている RGD ペプチドによる表面修飾が有効である。しかしながら、反応性の高い側鎖官能基をもたないポリ乳酸の表面修飾は困難である。我々は、これまでに、表面加水分解などの化学反応による化学修飾法を開発してきた。本研究では、RGD 配列を含むオリゴペプチドのN末端にオリゴ-L-乳酸(OLLA)が結合したブロック共重合体を用いた新たなスキャホールドの表面修飾法を開発した。この両親媒性ブロック共重合体とポリ乳酸との混合溶液からスキャホールドを成型することで、スキャホールド表面に細胞接着性オリゴペプチド鎖が集積する。オリゴ乳酸セグメントとポリ乳酸との親和性により、ブロック共重合体の溶出は抑制され、細胞接着性表面修飾が達成されると期待される。

【実験】細胞接着性の RGD 配列を含むオリゴペプチド/オリゴ乳酸ブロック共重合体の化学構造を図1に示した。固相合成によりオリゴペプチドを合成し、続いて、別に合成した OH 末端をアセチルキャップしたオリゴ-L-乳酸(acOLLA)とのカップリングを行った。得られたオリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド共重合体とポリ乳酸の混合溶液からキャスト法によりフィルムを作製し、フィルム上に 6×10^4 cells/cm² の NIH/3T3 細胞を播種し、1、6 時間培養後に接着細胞数を計数した。

【結果・考察】図2には、細胞播種1、6時間後の接着細胞数を示した。オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド共重合体で修飾したフィルム上には、オリジナルの PLLA フィルムの約2倍の細胞接着が認められた。また、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド共重合体修飾フィルムを PBS 中に24時間浸漬した時の、オリゴ-L-乳酸-RGD オリゴペプチド共重合体の溶出率は添加量に対してわずか6%であった。これらの結果は、作製したフィルム表面に、RGD オリゴペプチドセグメントが安定に存在できること、および、リガンド特異的に細胞の接着性が向上することを示している。

さらに、RGD オリゴペプチド鎖長及びオリゴ-L-乳酸鎖長が修飾効率に与える影響についても併せて報告する。

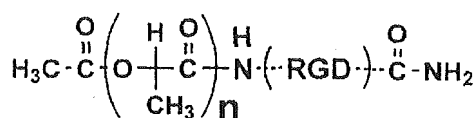


Fig.1 Chemical structure of acOLLA-co-RGD oligo peptide block copolymer.

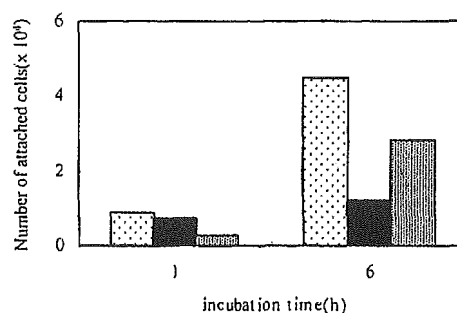


Fig 2. Attachment of NIH/3T3 cells on PS dish (□), PLLA original film (■), and RGD modified film (▨). Cells were seeded at 6×10^4 cells/cm², and cultured for 1 and 6 h at 37°C.

E-8

糖環 2'位に光架橋性基を持つアンチセンス核酸による RNA 結合能の評価

京工繊大繊維¹・国立循環器病センター²○樋口 麻衣子¹, 青木 幸一¹, 小堀 哲生¹, 山岡 哲二², 村上 章¹

【緒言】 疾患関連遺伝子の発見や分子病態解明が進み、正常遺伝子の 1 塩基の変異(点突然変異)が重篤な疾患の原因となることがわかってきた。これら変異遺伝子の発現を特異的に制御できれば、副作用のない疾患の治療につながる。従来のアンチセンス核酸では 1 塩基の変異を検出する能力が不十分であり、変異遺伝子だけでなく正常遺伝子をも制御してしまうことを防ぎ得ない。

本研究では高い配列選択性を持つアンチセンス核酸の開発を目的とし、制御分子として光架橋型アンチセンス核酸を用いた。我々はこれまでに、5'末端に光架橋性分子ソラレンを修飾した光架橋型アンチセンス核酸(5'-Ps-oligo)が、UVA 照射により効率良く子宮頸がん細胞の増殖を抑制することを報告している¹⁾。さらに我々は、より高い配列選択性を求めるために、2'位にメチレンリンカーを介してソラレンを導入したアンチセンス核酸(2'-Ps-met)を開発し、その光架橋特性を報告した²⁾。本研究では 2'-Ps-oligo の光架橋効率の向上を目的とし、ソラレンの 4'位と糖環 2'位を結ぶリンカー長を伸ばした、アミドメチレンリンカーを介したソラレン修飾アンチセンス核酸(2'-Ps-amd)をデザインし、合成した。2'-Ps-amd の RNA との二重鎖形成能、およびその光架橋特性について、2'-Ps-met との比較を行ったので報告する。

【実験】 2'-Ps-amd のモノマーユニットとして、アミドメチレンリンカー型のソラレン修飾アデノシンの合成を行った。3',5'位をシリルエーテル基、N⁶位をベンゾイル基で保護したアデノシンの 2'位水酸基を、N,N'-カルボニルジイミダゾールで活性化し、4'-Aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen を導入した。このソラレン修飾アデノシンを固相合成法によりオリゴヌクレオチドに導入し、2'-Ps-amd を得た。2'-Ps-met および 2'-Ps-amd と、相補的な oligo-RNA (match-RNA)との二重鎖安定性を調べるため、UV 融解曲線から T_m 値を算出し、評価した。また、match-RNA との二重鎖形成時におけるソラレンの挙動を蛍光分光法により解析した。さらに、2'-Ps-met および 2'-Ps-amd と match-RNA、もしくは配列中に 1 塩基 mismatch を含む oligo-RNA (mismatch-RNA)との UVA (365nm)照射による光架橋効率と配列選択性を、RPLC と変性 PAGE により評価した。

【結果と考察】 match-RNA との T_m 値を評価した結果、同配列をもつ天然型核酸(15mer, T_m=67℃)に比べ、2'-Ps-met では ΔT_m=-4℃、2'-Ps-amd では ΔT_m=-10℃となり、2'-Ps-amd と match-RNA との二重鎖は 2'-Ps-met と match-RNA との二重鎖よりも不安定であることがわかった。2'-Ps-oligo 中のソラレン由来の蛍光は、その環境の変化に応じて強度を変える。蛍光分光測定の結果、2'-Ps-met は match-RNA を添加した場合、蛍光強度の減少が見られたのに対し、2'-Ps-amd の場合は、match-RNA 添加により、蛍光強度が増大した。ソラレンは、二重鎖間にインターカレートすると、蛍光強度が減少する³⁾ことから、2'-Ps-amd に比べ 2'-Ps-met の方が二重鎖のより内部にソラレンが位置していると考えられる。2'-Ps-amd の光架橋特性を比べた結果、2'-Ps-amd は match-RNA、mismatch-RNA とともに光架橋しなかった。これは、2'-Ps-amd が match-RNA との二重鎖を形成した時に、ソラレンが二重鎖の内部に位置せず、標的ウラシルとの分子間距離が遠ざかったためと考えられる。

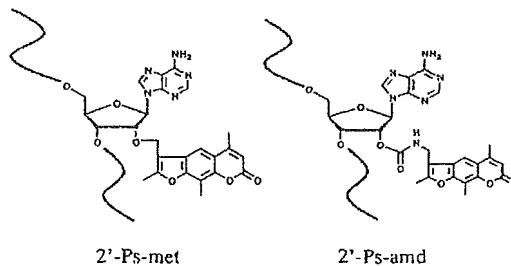


Figure. Structure of 2'-Ps-oligo

- 1) Murakami, A., Yamayoshi, A., Nishida, J., Iwase, R., Yamaoka, T. and Wake, N. *Eur. J. Pharm. Sci.*, (2001) 13,25-34.
- 2) 山口寛誠、山吉麻子、岩瀬礼子、山岡哲二、村上章(2002)日本化学会第 81 回春季年会予稿集, 944, 3F5-27
- 3) Salet, C., Bensasson, R. *Biochem. Biophys. Act.*, (1980) 607, 379-383

E-10

ガラクトース修飾ポリマーの構造最適化による 導入遺伝子発現効率の向上

京工繊大繊維¹・国立循環器病センター研究所²○近藤 千晶^{1,2}, 北川 達哉^{1,2}, 橋本 朋子^{1,2}, 小堀 哲生¹, 村上 章¹,
山岡 哲二²

【緒言】ウイルスキャリアーは発現効率が非常に高いことが特徴であるが、2, 3の事故例により、ウイルス本来のもつ生物学的危険性が懸念されている。一方、非ウイルスキャリアーは、安全性やコストの面において利点があるが、ウイルスキャリアーに比べて発現効率の低さが課題である。非ウイルスキャリアーに関する様々な研究の中で、近年、目的とする遺伝子を目的とする細胞に確実に導入できる「細胞特異的な遺伝子導入」に注目が集まっている。本研究では、非ウイルスキャリアーとして様々な組成のガラクトース修飾ポリマーを合成し、肝細胞表面レセプター介在型遺伝子導入における導入遺伝子の発現効率とキャリアーの組成の相関性について検討した。

【実験方法】ガラクトース残基を側鎖に有する重合性モノマーの 6-O-vinyladipoyl- α -methyl-D-galactoside を酵素触媒 (ALP (alkaline protease)や Biopraser 等) によって合成し、カラムにより精製した。得られた重合性ガラクトースエステルと、カチオン性モノマー (DMAEMA; (2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)、あるいは、DMAPAA; (N-[3-(dimethylamino)propyl]acrylamide)) とを DMSO 中で、AIBN を開始剤として、65°C、

4 時間ラジカル共重合させ、組成の異なる poly(Gal-co-DMAEMA) と poly(Gal-co-DMAPAA) を合成した。それぞれ Gal_xD_y および Gal_xD'_y (x, y はガラクトースモノマーユニット、およびカチオンユニットの mol%) と示す。ホタルのルシフェラーゼ遺伝子をコードした pCMV-Luc プラスミド DNA との複合体を、アシアログリコプロテインレセプターもつ HepG2 細胞にクロロキン処理法により導入して、ルシフェラーゼ発現量および細胞毒性を定量した。

【結果と考察】ほぼ同等の組成を有する共重合体で比較した場合、poly(Gal-co-DMAEMA) の発現効率のほうが poly(Gal-co-DMAPAA) よりも高い発現効率を示した。その原因の一つとして、DMAEMA の pKa が 7.5 であるのに対して DMAPAA の pKa が 10.4 であることから、Hennink らが報告¹⁾しているように、食胞内での緩衝能に基づくことが考えられる。図 1 から明らかなように、poly(Gal-co-DMAEMA) に関しては、Gal を 18mol% 含む Gal18D82 が最も高い発現効率を示した。Gal の割合が多い場合には DNA との複合体形成能が低下し、また、Gal の割合が低い場合には、有効なレセプター介在型遺伝子導入機構が働かなかったために、この最適値が観察されたのであろう。しかしながら、用いたモノマーの反応性比が大きく異なることから目的とする組成の共重合体の合成が困難であるので、重合性ガラクトースエステルの構造を改良することで、糖修飾率と発現の相関性についてさらに詳細に検討を進めている。

【参考文献】1) W.E. Hennink, J.-Y. Cherng, P. van de Wetering, H. Talsma, *J. Control. Release*, 59, 49 (1997)

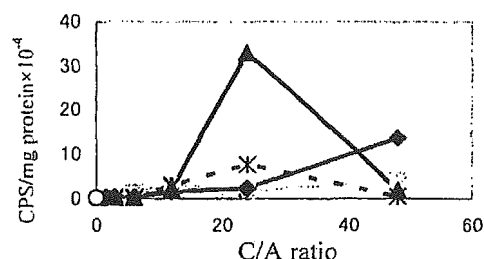


Fig 1. Transfection efficiency of (■)Gal31D69, (◆)Gal75D25, (▲)Gal18D82, (*)Gal14D86, and (○)naked DNA against HepG2 cells.