

厚生労働科学研究費補助金

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木村 剛

平成19年（2007）年 4月

厚生労働科学研究費補助金

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木村 剛

平成19年(2007)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応答性ナノ無機粒子の調製に関する研究	----- 9
古菌 勉	
2. ナノ無機粒子／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	----- 17
木村 剛	
III. 研究成果の観光に関する一覧表	----- 33
IV. 研究成果の刊行物・印刷	----- 37

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要素技術に関する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効率が改善された。

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

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障害性が問題となっている。そこで本研究では、細胞障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、ライソソ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これ、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。

昨年度は、(1) pH 応答性ナノ HAp (ハイドロキシアパタイト:リン酸カルシウム) 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。

本年度は、(1) 炭酸・リン酸塩を用いた組成制御によるナノ無機粒子の pH 応答性の向上、(2) 水性二相系を利用した水素結合性高分子/DNA 複合体のサイズを制御、(3) DNA の構造変化へ

の圧力印加の影響、さらに、(4) ナノ無機粒子／水素結合性高分子／DNA 複合体の調製と細胞への遺伝子送達を検討した。

(1) の「炭酸・リン酸塩を用いた組成制御」については、pH 応答性ナノ無機粒子の創出を目的とした。本研究では、ナノ無機粒子を水素結合性高分子／DNA 複合体に含有させ、エンドサイトーシス経路の pH 低下時に pH 応答的にナノ無機粒子を溶解させることで、エンドソーム小胞を崩壊させ、細胞内に導入するストラテジーをとっている。昨年度は、ナノ HAp 粒子の pH 応答性を結晶性のコントロールにより制御した。本年度は、更なる pH 応答性の向上を目指し、炭酸・リン酸混合系のナノ無機粒子の調製について検討した。

(2) の「水性二相系を利用した水素結合性高分子／DNA 複合体のサイズを制御」については、昨年度は種々の水素結合性高分子／DNA 複合体形成において、様々なサイズの複合体が得られ、サイズ分布による遺伝子導入効率への影響が考えられた。そこで、本年度は、水性二相系を用いた複合体形成について検討した。水性二相とは2種の水溶性高分子が互いの不適合性のより、相分離する現象である。一般的な水性二相系としては、PEG-dextran 系である。それぞれ臨床利用されていることから、本研究で採用した。PEG-dextran 系の水性二相は、用いる分子の分子量、濃度、温度、pH、塩濃度などの外部環境に強く依存することが知られているが、圧力の影響は検討されていない。そこで、種々の分子量の PEG、Dextran を用いて、圧力印加による水性二相形成について検討した。特に、低分子量の PEG、Dextran では、マイクロエマルジョンが形成されることが知られており、超高压印加により安定化によりサイズ制御された複合体が得られると考えられる。

(3) の「DNA の構造変化への圧力印加の影響」については、タンパク質、多糖への圧力印加により、構造変化することが知られていることから、DNA への圧力印加の影響を詳細に検討した。

(4) の「ナノ無機粒子／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」につい

ては、(1) にて調製された pH 応答性ナノ無機粒子を用いた超高压印加による複合体の調製と細胞への送達について検討した。

B. 研究方法

(1) pH 応答性ナノ無機粒子の調製に関する検討

pH 応答性ナノ無機粒子の調製は、昨年度の改良型マイクロエマルジョン法よりも簡便な湿式法にて行った。本法は、焼結処理を行わずにナノ無機粒子を調製する方法である。昨年度の結果から遺伝子送達においては焼結処理を施さないナノ HAp にて良好な結果が得られていることから採用した。pH 応答性を付与するためにより溶解性の高い炭酸塩の導入を検討した。炭酸・リン酸の混合比を変化させた炭酸・リン酸溶液とカルシウム溶液を混合し、湿式法によりナノ無機粒子を調製した。走査型顕微鏡 (SEM) を用いて得られたナノ無機粒子のサイズ、形状を観察した。ナノ無機粒子の pH 応答性については、塩酸を用いた滴定により検討した。

調製したナノ無機粒子は、ナノサイズ特性である長期放置による分散性の低下により、凝集・沈殿する。この性質は、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思われた。そこで、水素結合性高分子である PVA、PEG を用い、ナノ無機粒子の分散性について検討した。種々の濃度の PVA 溶液、PEG 溶液、PVA-PEG 混合溶液を調製し、ナノ無機粒子を添加し、その分散性について検討した。

(2) 水性二相系を利用した水素結合性高分子／DNA 複合体のサイズを制御

水性二相系としては、PEG-dextran 系、PEG-Pulluran系、PEG-PVA系にて検討した。種々の分子量、濃度の PEG、PVA、Dextran、Pulluran 水溶液を調製し、各溶液を PEG 溶液と等量ずつ混合した。超高压処理 (10000 気圧、25°C、10 分間) を施した後、マクロ観察、DLS 測定、NMR 測定、DSC 測定、旋光度測定にて評価した。また、水素

結合性を確認するために水素結合阻害剤である尿素を添加し、同様の超高压処理を施し、マクロ観察した。

(3) DNAの構造変化への圧力印加の影響

DNA 構造への圧力印加の影響を検討するため、DNA 単独溶液（ラダーDNA、プラスミドDNA）に種々の圧力強度、時間、温度にて高压処理を施した。CD 測定、UV 測定、DLS 測定により構造変化を検討した。また、DNA 塩基対にインターカレートすることで蛍光強度が上昇するエチジウムブロマイドを用いて、高压前後の蛍光強度変化を測定することで塩基対形成への影響を検討した。さらに、DNA 機能への高压印加の影響を検討するために、ウサギ網状赤血球由来の無細胞系転写・翻訳システムを用いて、DNA 機能の一つである転写・翻訳について高压処理前後のルシフェラーゼ活性を検討した。

(4) ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製と細胞への遺伝子送達

水素結合性高分子として、PVA、PEG を用いた。種々の濃度の PVA 溶液、PEG 溶液を調製し、作製した pH 応答性ナノ無機粒子溶液と混合し、超音波処理を施した。さらに、DNA を混合し、その直後に超高压処理（10000気圧、37℃、10分間）を施した。処理溶液の動的光散乱測定、融点測定、SEM 観察により複合化の確認を行った。得られた複合体の細胞内送達を検討するため、プラスミド DNA を赤色蛍光剤のローダミン、緑色蛍光剤の FITC にて標識し、複合化を行った後に、細胞上清に添加し、蛍光顕微鏡にて細胞内取り込み観察を行った。また、得られた画像から、細胞内取り込みの定量を行った。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。

C. 研究結果

(1) pH 応答性ナノ無機粒子の調製に関する検討

今年度は、pH 応答性の向上を目的として、リン酸カルシウムのみでなく炭酸カルシウムの調製を検討した。ナノ無機粒子調製時に、炭酸とリン酸の含有量を変化させることで得られるナノ無機粒子の pH 応答性の制御を試みた。また、ナノ無機粒子調製法としては、改良型マイクロエマルジョン法よりも簡便である湿式法にて調製した。炭酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。また、炭酸リン酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液とリン酸2水素アンモニウム水溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。さらに、リン酸カルシウム粒子は、リン酸2水素アンモニウム水溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。得られたリン酸カルシウム粒子、炭酸リン酸カルシウム粒子、炭酸カルシウム粒子はいずれの場合も白色沈殿していた。リン酸を含有する場合は、炭酸に比べその沈殿は抑制されていた。走査型電子顕微鏡観察を行った結果、リン酸カルシウム系、炭酸リン酸カルシウム系では、ナノサイズの無機粒子が得られた。その形態は、リン酸カルシウム粒子で球状、炭酸リン酸カルシウム粒子では、棒状であった。それぞれのサイズは、リン酸カルシウム粒子で約30~50nmと測長可能であったが、炭酸カルシウム粒子は不可能であった。一方、炭酸カルシウム系では、ナノサイズの粒子形成はなされておらず、巨大な炭酸塩の結晶体が得られた。おそらく、炭酸ナトリウムの結晶体であると考えられる。

ナノ無機粒子の酸溶解性試験では、炭酸カルシウムは、pH7 付近にて溶解され始め、pH5.5 では完全に溶解されており、リン酸カルシウム粒子においては、pH5.5 付近では溶解されず、pH5 以下にて溶解され、炭酸リン酸カルシウム粒子においては、pH6 付近にて溶解され始め、pH5.5 では約70%が溶解された。最適化には至っていないが、炭酸含有量を調整することで、更なる pH 応答性の向上も考えられる。

(2) 水性二相系を利用した水素結合性高分子/

DNA 複合体のサイズを制御

PEG-Dextran のエマルジョン形成に着目し、エマルジョン形成下にて超高压処理を施すことで、エマルジョン内で水素結合が形成され、安定した集合体の形成がなされると仮説を立てた。臨床利用の考慮し、比較的高い生体適合性の高分子を選択し、PEG 溶液と PVA 溶液、PEG 溶液と Dextran 溶液、PEG 溶液と Pulluran 溶液の超高压印加処理時の二相分離形成について検討した。

10%PEG溶液、10%Dextran溶液を調製し、超高压印加処理(10000気圧、10分間、25℃)を施した。いずれのPEG溶液およびDex溶液においても目視観察での状態変化は認められず透明溶液のままであった。次に、PEG溶液とDex溶液の等量を混合し、超高压印加処理を施した。PEG6000-Dex40,000混合液は、超高压処理前では透明溶液であったが、超高压処理により二相分離が形成された。下相(PEGリッチ相)の下部(相分離境界の上)にて青白色の散乱が認められた。PEG6000/Dex40,000複合体が形成されることで見かけの分子量が増加したためと考えられる。混合溶液中に相互作用していないPEGとDexは、互いに反発し相分離を形成する。一方、混合溶液中で弱く相互作用したPEGとDex分子は超高压印加により水素結合が強調され、安定化された複合体が形成されたと考えられる。詳細な会合状態は明らかではないが、PEGリッチな(Dex 1分子当たりのPEG会合数が高い)複合体が形成されたために複合体がPEG相に存在したものと考えられる。PEG6000-Dex60,000混合液では、超高压処理前にて若干散乱した溶液が得られた。これは、高分子量のDexは、PEGと反発し易いためエマルジョンを形成したと考えられる。超高压処理後は二相分離が形成され、下相(Dexリッチ相)全体で散乱が見られ、特に下相の上部(相分離境界の下)にて強い散乱が示された。PEG6000/Dex60,000複合体が形成されたと考えられる。Dexのエマルジョン形成後にPEGと会合したため、PEG会合数は先のPEG6000/Dex40,000複合体に比べ少ないと考えられ、Dexリッチ相に複合体が存在したと考えられ

る。また、Dex相の上部に強い散乱が見られた理由としては、用いたDexの分子量分布が大きく、得られるエマルジョンと複合体のサイズ分布が大きくなったためと考えられる。PEG6000-Dex100,000混合液も、超高压処理前にて青白色の散乱を示す溶液が得られ、超高压処理をすることにより二相分離が形成された。超高压処理後では、散乱は下相全体で認められた。これは、ほぼ均一なエマルジョンが形成されたと考えられる。

PEG6000/Dex60,000 複合体、PEG6000/Dex100,000 複合体の DLS 測定により複合体のサイズを測定した。超高压処理前のPEG6000 溶液の PEG 分子の慣性運動半径は約 2.8nm であり、ほぼ理論値と同様であった。また、Dex60,000 および Dex100,000 もそれぞれ約 6.2nm、6.3nm であった。超高压処理後のサイズに変化は示されなかった。一方、PEG6000-Dex60,000 混合溶液では、エマルジョン形成により約 90nm にて検出された。また、PEG6000-Dex100,000 混合液においては約 220nm のエマルジョンが検出された。超高压処理後では二相分離が形成されることから、それぞれの相の DLS 測定を行った。PEG6000-Dex60,000 混合溶液の上相では、約 3.5nm のサイズで検出された。PEG 分子と考えられる。下相では、約 330nm のサイズの粒子が検出され、PEG6000/Dex60,000 複合体の形成が示された。また、PEG6000-Dex100,000 混合溶液の上相でも、約 3.4nm の PEG 分子が検出され、下相にて約 320nm の PEG6000/Dex100,000 複合体が検出された。以上より、サイズ制御された複合体調製への可能性が示された。

(3) DNA の構造変化への圧力印加の影響

プラスミド DNA の機能の一つである発現機能を中心に、高压処理されたプラスミド DNA の構造と機能について検討した。超高压印加処理した DNA のピークがわずかに高波長側にシフトし、CD スペクトルに若干の違いが見られた。タンパク質に比べ DNA は剛直であり、CD 測定では長鎖 DNA の構造変化は検出されにくく、今回の CD ス

ペクトルの若干の変化は、超高压印加処理によるプラスミド DNA の構造変化を強く示唆すると考えられる。プラスミド DNA は環状でコンホメーションの歪みが大きいため、圧力の影響を受けやすいと考えられる。動的光散乱(DLS)測定にて検討した結果、超高压印加処理によりプラスミド DNA のサイズが小さくなることがわかった。また、500~700nm あたりのサイズはオープンサークルであり、100nm あたりのサイズはスーパーコイルであると考えられる。超高压印加処理すると 500~700nm 付近のピークが消失し、100nm 付近のピークが大きくなり、20~30nm 付近に新たなピークが得られ、全体的にスペクトルが左にシフトした。これは、DNA が凝縮したと考えられる。超高压印加処理により得られた 100nm 付近の新たなピークは、未処理時のオープンサークルプラスミド DNA とほぼ同じであり、これまでに高压印加処理によりスーパーコイル分率が高くなる報告があることから、スーパーコイル化がなされた事が考えられるが明らかではない。印加圧力強度の影響について検討するため、5000気圧、8000気圧、10000気圧の異なる圧力強度にて5分間の高压処理を pT7-Luc に施し、DLS 測定を行った。5000気圧、5分間の圧力印加では未処理との変化が見られなかった。一方、8000気圧、10000気圧と圧力の増加により、プラスミド DNA のサイズ減少が示された。さらに、高压印加処理時間の影響を調べるため、10000気圧にて、1、5、20分間の超高压印加を施し、DLS 測定を行った。印加処理時間を延長に伴うプラスミド DNA のサイズの減少が示された。印加処理時間5分と20分では、DNA サイズに十分な差異は認められず、20分の処理にて最小サイズの DNA 凝縮がなされたと考えられる。以上の結果から、DNA の高压凝縮が強く示唆され、より詳細な解析を行うため、DNA のインターカレーターの一つであるエチジウムブロマイドを用いた蛍光強度測定を行った。DNA 塩基対数と等量のエチジウムブロマイドを添加し、3000気圧、5000気圧、8000気圧、10000気圧にて5分間の超高压

処理を施した後、蛍光強度測定を行った。3000気圧、5分間の圧力印加の蛍光強度は、未処理との変化が認められなかった。5000気圧、8000、10000気圧と印加圧力強度の上昇に伴う蛍光強度の減少が示された。これは DNA の構造変化によりエチジウムブロマイドが外れたことによると考えられる。一方、DNA 結合試薬は他のコンホメーションに比べて B 型構造で最大親和性を示すと報告されており、高压処理により A 型、Z 型にコンホメーション変化が起こったとも考えられる。現在のところ、エチジウムブロマイドが外れたのか、あるいは、親和性が弱まっただけなのかは明らかでない。

(4) ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製と細胞への遺伝子送達

pH 応答性ナノ無機粒子を用い、超高压印加処理による pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体による細胞内送達について検討した。pH 応答性ナノ無機粒子は、エンドソームを早期に破壊させるために用いている。生体成分であり、pH 低下により溶解性を示すため、pH 低下時には浸透圧の増大によるエンドソーム破壊により細胞内送達が可能となる。

超高压印加処理による pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の形成を DLS 測定により検討した。まず、種々の分子量の PVA を用い、超高压印加処理前の DLS 測定を行った結果、分子量の増加に伴う慣性半径の増加が示された。次に、それぞれの PVA 水溶液に超高压印加処理を施し、DLS 測定を行った結果、いずれの場合も、超高压印加処理することで粒子径の増加が認められた。粒子径は PVA の濃度に依存し、濃度の増加に伴う粒子径の増加が認められ、濃度による粒子径の制御が可能であった。さらに、DNA を混合した後、超高压印加処理し、DLS 測定を行った結果、PVA 水溶液への超高压印加処理により得られる PVA 粒子に比べて、PVA と DNA の混合液への超高压印加処理により得られた粒子のサイズは増加した。また、DNA 単独で見られたピークが消失して

おり、超高压印加によるPVAとDNAの複合化が示された。pH応答性ナノ無機粒子をPVAとDNAとの混合液に加え、超高压印加処理を施した結果、PVA/DNA複合体以上のサイズを有する粒子が検出され、pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体が得られたと考えられる。

pH 応答性ナノ無機粒子/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。細胞内送達を確認するため、ローダミンにて蛍光標識した DNA を用い、超高压印加処理により複合体を得た。DNA のみの場合では、細胞内蛍光は観察されなかったが、pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体では蛍光を発光する細胞が観察され、pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の COS7 細胞への取り込みが示された。それぞれの細胞内への取り込みを画像から定量したところ、リン酸カルシウム粒子に比して、炭酸・リン酸カルシウム粒子での取り込みの増加が示された。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 の移行は示されず、また、十分な遺伝子発現も示されなかった。今度の課題として、遺伝子発現の向上を挙げる。

D. 考察

リン酸・炭酸カルシウム粒子を用いることで、目的とする pH=5.5 にて溶解する pH 応答性ナノ無機粒子が得られた。リン酸に比べ、炭酸の溶解性が高いため溶解制御が可能であったと考えられる。また、炭酸のみではナノ無機粒子は得られず、炭酸とリン酸の混合比がナノ無機粒子形成に強く影響することが分かった。また、高分子溶液と混合することでナノ無機粒子の分散安定性の向上が認められ、ナノスケールのナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体も超高压印加により得られた。今後は、pH 応答性ナノ無機粒子が細胞内取り込み過程にて十分に作用するかについては、今後詳細に検討する必要がある。また、本研究では、ナノ無機粒

子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、細胞へのダメージを考慮する必要がある、水素結合性高分子/DNA 複合体へのナノ無機粒子の含有量についても検討の必要がある。

超高压印加処理にて pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体が得られた。本手法は、プロセス工学を用いており、これまでの化学的手法によるものとは本質的に異なり、全くの新しい手法でありと言える。得られたナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体は、十分な細胞内取導入が示されことから、遺伝子ベクターとしても有用性が示された。しかし、細胞内に遺伝子が早期に送達されるものの、導入遺伝子の発現活性は低かった。これは、PVA と DNA の相互作用が強く、細胞内で十分に機能しなかったと考えられる。超高压印加条件を制御することで PVA と DNA の相互作用がコントロールできることから、次年度は、細胞内での効率良い遺伝子の被転写・翻訳を目指す。

E. 結論

本年度は、(1) pH 応答性ナノ無機粒子の調製 (2) 水性二相系を利用した水素結合性高分子/DNA 複合体のサイズを制御、(3) DNA の構造変化への圧力印加の影響、さらに、(4) ナノ無機粒子/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。最適化に際し、複合体の細胞内挙動を詳細に解析する必要がある。次年度は、これらを重点的に解析し、最適化を行う。また、細胞内への導入は効率的になされていることから、オリゴ DNA、siRNA などの低分子量の核酸分子の送達への応用を行う。さらに、複合体は低細胞傷害性であることから、in vivo 動物試験への展開を考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiyuki Moritan, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato and Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds with ultra high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery, Journal of Artificial Organs, in press
- 2) Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Gene Transfection Using Inorganic Particle/PVA/DNA Complexes Prepared by Ultra High Pressure Technology, Molecular Therapy, 2006, 13, suppl. 1, pS75
- 3) 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～、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、遺伝子医学MOOK 5号、2006、p75-78
- 4) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gel, Biomaterials, 2007, 28, 1-8
- 5) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida. Influence of cross-linking on physicochemical and biological properties of collagen-phospholipid hybrid gel, Trans. Mater. Res. Soc. Jpn., 2006, 31, No.2, 735-738
- 6) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio

Kishida, Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, Biomaterials, in press, Online published 14 March 2007

2. 学会発表

- 1) 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機／高分子コンポジットを用いた細胞への遺伝子導入、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム要旨集、pO-1
- 2) 仁部洋一、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、エンドソーム遊離促進を目指したナノHAp/PVA /DNA複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2056, 2006
- 3) 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、PEG／多糖水性二相系への超高压処理による新規構造体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p956, 2006
- 4) 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、遺伝子導入能を有する超高压誘起ナノ無機粒子／高分子／DNA複合体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2055, 2006
- 5) 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、DNA/RNA構造制御を目指した超高压印加処理とその応用、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.2, p5288-9, 2006

- 6) Miura, Y, Kurita, K, Nam, K, Mutso, S, Yoshizawa, H, Fujisato, T, Kimura, T, Kishida, A, Preparation of Hydrogen Bonding Polymer Structures Using Ultra High Pressure Technology as Drug Carrier, Abstract for AIChE
- 7) 木村剛、小粥康充、岡田正弘、古菌勉、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起 PVA/DNA 遺伝子ベクターへの無機塩付加による遺伝子導入促進、第 28 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、p286
- 8) 木村剛、三浦義之、栗田公夫、吉澤秀和、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫、高压印加による PVA ハイドロゲルの作製と物性評価、第 18 回高分子ゲル研究討論会講演要旨集、p39-40
- 9) 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機/高分子ハイブリッドベクターによる遺伝子導入における細胞内動態の検討、Drug Delivery System, 21, p292, 2006
- 10) 木村剛、堀内可奈、栗田公夫、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高压凝縮 DNA の構造・機能解析と遺伝子導入への応用、再生医療、6、Suppl、p301、2007

G. 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

pH 応答性ナノ無機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無機粒子を選択し、pH 応答性ナノ無機粒子の調製に関して検討した。ナノスケールのリン酸・炭酸カルシウム粒子が得られ、pH 応答性を検討した結果、pH5.5 付近での有意な溶解が示され、目的の pH 応答性ナノ無機粒子が開発された。

A. 研究目的

リン酸カルシウムを主成分とする骨、歯など硬組織に対する代替移植材料として、従来からリン酸カルシウム（ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp）、 β -三リン酸カルシウム（ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: β -TCP）など様々な無機材料が検討されており、その生体適合性は高い。また、無機材料は遺伝子導入材料としても利用されており、リン酸カルシウムが主流となっている。DNA 溶液と水酸化カルシウム溶液を混合し、その後、リン酸緩衝液と混合することによりリン酸カルシウム/DNA 共沈殿物が形成される。その共沈殿物がエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれ、遺伝子が導入される（リン酸カルシウム法）。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研究室レベルの培養細胞への *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、遺伝子導入の再現性が低く、また、高分子、脂質などの他の遺伝子導入材料と比べてその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/DNA 共沈殿物の不均一性が考えられる。共沈殿物の生成時には、産生されるリン酸カルシウム結晶の生成制御

がなされず、さまざまな形態、サイズのリン酸カルシウム/DNA 複合体が得られる（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、その物性は異なる）。それら複合体は安定化ために凝集し、不均一な凝集体が形成される。不均一凝集体の生成が再現性の低下の一因となり、また、細胞内への取り込み、あるいは、細胞内で遺伝子発現の低再現性、低効率の原因となると考えられている。これまで、リン酸カルシウム/DNA 複合体・凝集体のサイズ、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、導入効率は、微小なサイズの場合に高く、凝集化に伴い減少する。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無機粒子の創製を目的の一つとした。

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無機粒子と DNA とを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、ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体として用いる。この理由を以下に述べる。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、生体成分から構成される無機粒子を用いることとした。無機粒子の利用にあたり、エンドサイトーシス経路ではライソゾームとの融合による pH の低下 (pH=5.5 以下) が知られていることから、pH5 付近で溶解される無機粒子を創製することを目的とした。作業仮説としては、ナノ無機粒子/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る pH 低下に応答して無機粒子が溶解し、その浸透圧ショックにより、エンドソームが破壊され、遺伝子導入が促進される。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。

平成 17 年度は、分担研究者の古菌らが発案した改良型マイクロエマルジョン法により HAp の形状および結晶性 (溶解性) 制御を行った。球状、ロッド状の HAp 粒子が得られ、結晶化を促進する焼結行程の有無によりナノ HAp 粒子の酸溶解性の制御に成功した。

本年度は、さらなる pH 応答性の向上を目的として、炭酸塩およびリン酸塩から構成されるナノ無機粒子の調製について検討した。さらに、得られた pH 応答性ナノ無機粒子を用い、超高圧印加

処理によるナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製について検討した。

B. 研究方法

昨年度は、改良型マイクロエマルジョン法にてナノ HAp 粒子の調製を行い、焼結しないハイドロキシアパタイトに遺伝子導入時の効率的な送達が可能であった。このことから、従来から用いられている焼結行程を有さない湿式法によりナノ無機粒子の調製を行った。湿式法は、酸性溶液とカルシウム溶液の二液を混合し、攪拌することで無機粒子を調製する方法である。酸性溶液としては、リン酸 2 水素アンモニウムおよび炭酸ナトリウムを用いた。それぞれの溶液を所定の混合比で総濃度 100mM の水溶液を作製し、硝酸カルシウム水溶液 (終濃度: 42mM) と混合し、室温あるいは 80°C にて反応させた。得られたナノ無機粒子を走査型顕微鏡 (SEM) にて観察し、IR にて成分同定を行った。また、ナノ無機粒子の pH 応答性について、塩酸を用いた滴定を行った。滴定は、カルシウムテストワコーにより溶解されたカルシウムの定量を行った。

調製したナノ無機粒子は、長期放置により凝集・沈殿の形成のために分散性が低下し、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、ナノ無機粒子、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 および PEG を用いた。さらに、得られた混合液に超高圧印加処理 (10000 気圧、37°C、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ため、*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。このことから、本研究では、物性の制御されたナノスケールの無機粒子の応用を検討した。また、本研究では、得られたナノ無機粒子を水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させて用いる。ナノ無機粒子を含有する水素結合性高分子/DNA 複合体は、エンドサイトーシス経路を介して細胞内に取り込まれると考えられ、エンドサイトーシス過程の pH5.5 への低下時にナノ無機粒子が溶解されれば、浸透圧ショックによりエンドソームが崩壊され、効率良く細胞質内に遺伝子が移行されると考えられる。従って、ナノ無機粒子が求められる機能としては、pH に応答した溶解性を有することである。以上のことから、pH 応答性ある均一形状のナノ無機粒子の創製について検討した。

昨年度は、改良型マイクロエマルジョン法にて得られるリン酸カルシウムの結晶制御を仮焼行程の有無によりナノ HAp 粒子の pH 応答性のコントロールを行った。結果、仮焼行程を施さないナノ HAp 粒子にて、エンドサイトーシス過程の pH 低下時の pH=5.5 付近で有意な溶解が示されたことから、従来の湿式法でのナノ無機粒子の調製を行った。

今年度は、pH 応答性の向上を目的として、リン酸カルシウムのみでなく炭酸カルシウムの調製を

検討した。ナノ無機粒子調製時に、炭酸とリン酸の含有量を変化させることで得られるナノ無機粒子の pH 応答性の制御を試みた。また、ナノ無機粒子調製法としては、改良型マイクロエマルジョン法よりも簡便である湿式法にて調製した。炭酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。また、炭酸リン酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液とリン酸 2 水素アンモニウム水溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。さらに、リン酸カルシウム粒子は、リン酸 2 水素アンモニウム水溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。得られたリン酸カルシウム粒子、炭酸リン酸カルシウム粒子、炭酸カルシウム粒子の写真を図 1 に、査型電子顕微鏡写真を図 1、2、3 に示す。リン酸カルシウム系、炭酸リン酸カルシウム系では、ナノサイズの無機粒子が得られた。リン酸カルシウム粒子は、球状の形態をとっていたが、炭酸リン酸カルシウム粒子は、棒状形態をとっていた。それぞれのサイズ測長を SEM 写真から行った結果、リン酸カルシウム粒子径は、約 30~50 nm と測長可能であった。炭酸カルシウム粒子は、互いに会合していたため測長不可能であったが、リン酸カルシウム粒子に比べ、小さい粒子であった。ナノ粒子の特性により会合体が得られ易くなったと考えられる。一方、炭酸カルシウム系では、ナノサイズの粒子形成はなされておらず、巨大な炭酸塩の結晶体が得られた。おそらく、炭酸ナトリウムの結晶体であると考えられる。



図 1. 湿式法により調製したナノ無機粒子

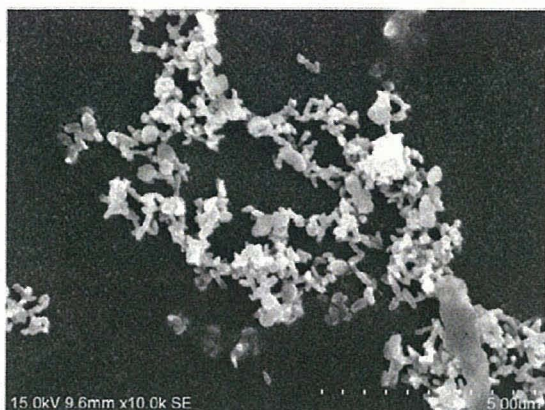


図 1、リン酸カルシウム粒子の SEM 写真



図 2、炭酸リン酸カルシウム粒子の SEM 写真

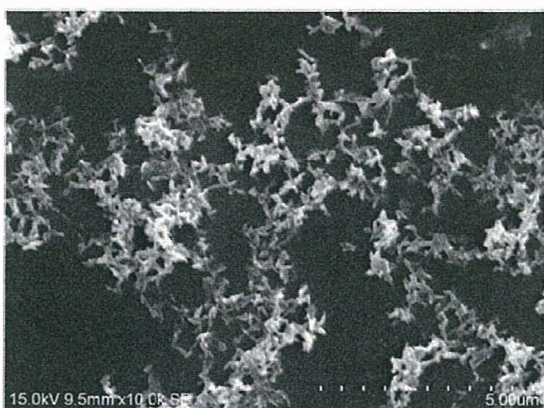


図 3、炭酸カルシウム粒子の SEM 写真

得られたナノ無機粒子の酸溶解性試験の結果を図 4 に示す。炭酸カルシウム系では、pH7 付近にて溶解され始め、pH5.5 では完全に溶解されていた。一方、リン酸カルシウム粒子においては、pH5.5 付近では溶解されず、pH5 以下の pH にて溶解された。また、炭酸リン酸カルシウム粒子においては、pH6 付近にて溶解され始め、pH5.5 では約 70%

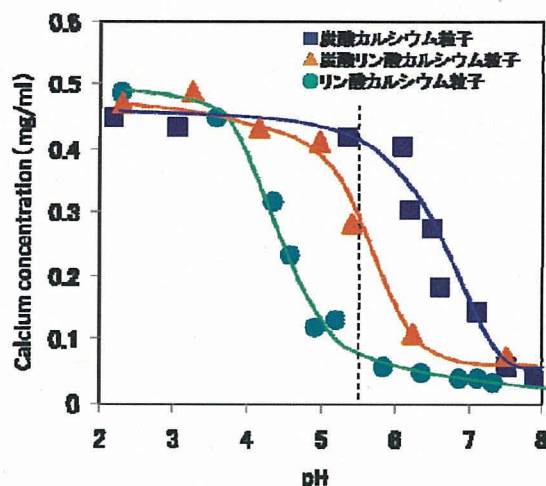


図 4. ナノ無機粒子の酸溶解滴定

が溶解された。この結果は、炭酸を含有することで、リン酸カルシウム粒子の酸溶解性を制御することができることを示唆している。炭酸含有量を調整することで、更なる pH 応答性の向上も考えられる。この炭酸リン酸カルシウム粒子を用いることで、本研究の目的であるナノ無機粒子の溶解によるエンドソーム破壊制御がある程度なされると考えられる。

次に、より分散したナノ無機粒子溶液を得るために、一般的な手法である超音波処理による高分散ナノ無機粒子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昨年度と同様に選択した。最終的にナノ無機粒子は、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、ポリビニルアルコール (PVA)、およびポリエチレングリコールを用いて検討した。PVA 水溶液あるいは PEG 溶液にリン酸カルシウム粒子あるいはリン酸・炭酸カルシウム粒子を添加し、混合した後、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。一方、PEG 溶液は、PVA 溶液に比べ粘性は低かった。PVA 溶液の場合、高濃度になるに従

って分散安定性は向上したが、さらに高濃度になると分散性は低下した。至適 PVA 濃度範囲としては 0.001~0.1%であった。昨年度に比して低濃度になったが、これは、用いるナノ無機粒子の濃度を低下させたためと考えられる。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。PVA の粘性に加え、PVA のリン酸カルシウム (HAp) との親和性が高く、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。

また、PVA と PEG の混合系においては、凝集・白濁したナノ無機粒子溶液が透明になった。分散性が著しく向上した結果であると考えられる。PVA と PEG の混合溶液では、水性二相分離が形成されることが知られていることから、この水性二相系がナノ無機粒子の分散性に影響したと考えられる。

D. 考察

リン酸・炭酸カルシウム粒子を用いることで、目的とする pH=5.5 にて溶解する pH 応答性ナノ無機粒子が得られた。リン酸に比べ、炭酸の高い pH での溶解性が高かったため、ナノ無機粒子の溶解制御が可能であったと考えられる。また、炭酸のみではナノ無機粒子は得られず、炭酸とリン酸の混合比がナノ無機粒子の形成に強く影響することが明らかとなった。さらに、高分子溶液と混合することでナノ無機粒子の分散安定性の向上が認められ、ナノスケールのナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体も超高压印加により得られた。今後は、pH 応答性ナノ無機粒子が細胞内取り込み過程にて十分に作用するかについては、今後詳細に検討する必要がある。また、本研究では、ナノ無機粒子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、細胞へのダメージを考慮する必要がある。具体的には、ナノ無機粒子の溶解に伴うエンドソームの浸透圧崩壊であることから、溶解に伴い細胞内カルシウム

濃度が向上することが考えられ、これによるイオンチャンネルへの影響が考えられ、水素結合性高分子/DNA 複合体へのナノ無機粒子の含有量についての検討が必要である。プレリミナリーな実験ではあるが、蛍光色素を用いたエンドソーム内での溶解性について検討を始めており、今後、細胞障害性、エンドソーム破壊能、細胞安定性、カルシウムイオンチャンネルなどへの作用について詳細に検討する。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と考えられる。

次年度は、ナノ無機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、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。

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、ナノ無機粒子によるエンドソーム破壊機構を提案し、pH 応答型のナノ無機粒子の調製について検討を行った。湿式法を用いて、炭酸・リン酸カルシウムの混合を行うことで、pH 応答性の高いナノ無機粒子の調製に成功した。これらは、当初の目的の pH 応答型のナノ無機粒子と考えられる。

また、上記のナノ無機粒子を用いたナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体が超高压印加により得られ、目的の複合体作製の手法が開発できた。

今後は、細胞への導入試験にて得られる結果のフィードバックにより、pH 応答性を精密に制御し、ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の最適化について詳細に検討する。これにより、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, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato and Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds with ultra high pressurization and controlled release of DNA from the hydrogels for gene delivery, Journal of Artificial Organs, in press
 - 2) Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Gene Transfection Using Inorganic Particle/PVA/DNA Complexes Prepared by Ultra High Pressure Technology, Molecular Therapy, 2006, 13, suppl. 1, pS75
 - 3) 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～、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、遺伝子医学MOOK 5号、2006、p75-78
 - 4) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gel, Biomaterials, 2007, 28, 1-8
 - 5) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida. Influence of cross-linking on physicochemical and biological properties of collagen-phospholipid hybrid gel, Trans. Mater. Res. Soc. Jpn., 2006, 31, No.2, 735-738
 - 6) Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, Biomaterials, in press, Online published 14 March 2007
2. 学会発表
 - 1) 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機／高分子コンポジットを用いた細胞への遺伝子導入、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム要旨集、pO-1
 - 2) 仁部洋一、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、エンドソーム遊離促進を目指したナノHAp/PVA /DNA複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2056, 2006
 - 3) 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、PEG／多糖水性二相系への超高压処理による新規構造体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p956, 2006
 - 4) 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、遺伝子導入能を有する超高压誘起ナノ無機粒子／高分子／DNA複合体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2055, 2006
 - 5) 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、DNA/RNA構造制御を目指した超高压印加処理とその応用、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.2, p5288-9, 2006
 - 6) 木村剛、小粥康充、岡田正弘、古菌勉、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、

超高压誘起 PVA/DNA 遺伝子ベクターへの
無機塩付加による遺伝子導入促進、第 28
回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、
p286

- 8) 木村剛、南広祐、六雄伸悟、吉澤秀和、岡
田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超
高压誘起無機／高分子ハイブリッドベク
ターによる遺伝子導入における細胞内動態
の検討、Drug Delivery System, 21, p292,
2006

G. 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

ナノ無機粒子／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

分担研究者 木村 剛 東京医科歯科大学生体材料工学研究所助手

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、超高压印加処理によるpH応答性ナノ無機粒子／水素結合性高分子／遺伝子の複合化について詳細な検討を行った。また、高压印加によるDNAの構造・機能解析を行った。pH応答性ナノ無機粒子／水素結合性高分子／DNA複合体が得られ、培養細胞への有意な遺伝子送達がなされた。また、高压印加によるDNA凝縮が示され、効率的な遺伝子発現がなされることが明らかとなった。

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。

遺伝子ベクターは、ウイルス感染によるウイルスベクターとウイルスを用いない非ウイルスベクターに大別される。米国RAC承認プロトコールの70%以上がウイルスベクター法を採用しており、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルスなどが用いられている。ウイルスによる遺伝子導入効率は高く有効であるが、導入遺伝子のサイズ制限や作製法の煩雑性などが問題として挙げられる。また、1999年12月に米国で実施された遺伝子治療研究において、過剰量のアデノウイルスの投与による免疫反応が原因とされる事故が起こった。そこで、近年、安全かつ高効率な非ウイルス遺伝子ベクターの開発が切望されている。

非ウイルスベクターは、安全性が高く、合成・操作が容易であり、比較的長期保存できる点で有用であるが、ウイルスに比べ遺伝子導入効率が低

いことから、遺伝子治療への実用化の障壁となっている。また、導入効率の低いベクターでは頻回投与が余儀なくされ、患者への身体的、経済的負担が大きい。従って、遺伝子導入効率の向上が非ウイルス遺伝子ベクター開発における最大の課題である。

DNAは負に帯電しているため、非ウイルス遺伝子ベクターとしては、従来から正電荷物質が選択されている。無機、有機のほとんどの正電荷物質は、DNAと静電的相互作用を介して複合体を形成する。中でも、比較的高い遺伝子導入効率を示す正電荷物質は、カチオン性リポソームやカチオン性ポリマーである。これらのうちいくつかは、すでに臨床研究段階のものもあり、その開発は進んでいる。しかしながら、本質的にカチオン性に由来する細胞障害性が問題となっている。すなわち、DNAを細胞内に送達するための正電荷物質が細胞表面との相互作用により細胞本来の機能が発現しにくくなっている。

そこで本研究では、細胞障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た。静電的相互作用を介さない相互作用としては、水素結合に着目し

た。DNA自身も水素結合を介して二重鎖形成していることから天然の水素結合性高分子と言える。水素結合を介したDNAとの複合体形成技術として、高圧技術を採用した。高圧技術は、無機・有機科学、医療、食品分野等で幅広く利用されており、例えば、人工ダイヤモンドの合成や食品の加工、滅菌に用いられている。また、圧力は、タンパク質の変性に関する熱力学パラメータの一つとして学術的研究がなされている。クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などを介して様々な構造と機能を有するタンパク質は、圧力印加によりそれらの相互作用が変化し、全体として変性する。タンパク質変性の研究から得られた知見として、高圧下における相互作用は、疎水性相互作用が弱まり、水素結合が強調される。そこで我々は、この水素結合性の強調に着目し、水素結合性高分子への圧力印加による新規構造体の創出について検討を行った。これまで、水素結合性高分子としてポリビニルアルコール (PVA) を選択し、超高压印加処理 (10000気圧) を施した場合、水素結合を介したナノ粒子、微粒子、ゲルなどの様々な構造体が得られた。さらに、DNAの混合系においても、超高压印加処理によりPVA/DNA複合体が得られることが明らかとなった。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おり、細胞上清への添加により、細胞内送達が示された。この時、細胞障害性はほとんど示されなかった。

昨年度は、超高压印加法のさらなる広範な応用を目的として、種々の水素結合性高分子とDNAの複合体について検討した。用いた水素結合性高分子として、これまでのPVAに加え、すでに臨床応用されている合成高分子のポリエチレングリコール (PEG)、多糖のデキストラン (Dextran)、プルラン (Pulluran)、タンパク質のアルブミン、イムノグロブリンG (IgG) などを検討し、それぞれのDNA複合体に成功した。しかしながら、得られる水素結合性高分子/DNA複合体にサイズ分布がみられ、遺伝子導入効率への影響も懸念される。そこで今年度は、水素結合性高分子/DNA複合体

のサイズ制御を目的とし、水性二相系を用いた複合体形成法の基礎的検討を行った。水性二相系にて形成されるマイクロエマルジョンに着目し、超高压によるエマルジョン内の水素結合性高分子間の水素結合形成による複合体の制御である。

次に、核酸への高圧印加による核酸の構造・機能変化について検討した。核酸の高圧構造変化はこれまでも検討されているがその数は少ない。2量体のDNA (poly(dG-C)₂) への6000気圧の圧力印加では、A型からZ型にらせん構造が変化する。また、RNA (poly(rG-C)₆) においても、B型からZ型に構造変化する。さらに、核酸の機能変化については、リボザイム (RNA) への圧力印加により、リボザイムが構造変化し、その結果、RNA切断活性が低下することが報告されている。以上のように、核酸の構造と機能には密接な関係があり、本研究では、DNAの圧力印加による構造変化と機能の関係について詳細に検討した。

さらに、細胞への遺伝子導入の高効率化について検討した。得られた複合体は、水素結合を介しているためエンドサイトーシス経路にて細胞に取り込まれたのちのエンドソームからの遊離機構が備わっておらず、細胞に取り込まれた後の細胞質移行が難しいと考えられる。そこで本研究では、エンドソームからの遊離を促進させるために、ナノ無機粒子との更なる複合体を提案した。細胞への遺伝子導入経路の一つであるエンドサイトーシス経路では、エンドソームのライソゾームとの融合時にpHが5.5になる。このため、ナノ無機粒子を複合体に含有させることで、エンドサイトーシスにより取り込まれた複合体は、カルシウムイオンなどを溶解し、エンドソーム内にて浸透圧ショックが引き起こり、エンドソームが破壊されると考えられる。昨年度は、ナノ無機粒子としてリン酸カルシウムのナノHAp粒子を調製し、DNAの細胞質移行促進効果について検討した。今年度は、ナノHAp粒子に加え、pH応答性を向上させた炭酸カルシウム、炭酸リン酸カルシウムから成るpH応答性ナノ無機粒子を用い、ナノ無機粒子を含有するナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の