

調整について詳細に検討し、その複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入について検討した。

B. 研究方法

(1) 水性二相系を用いた複合体のサイズ制御に関する基礎検討

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。

(2) DNA構造への高压印加の影響

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。

(3) pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製と細胞内送達

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は、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、作製したリン酸カルシウム粒子、炭酸リン酸カルシウム粒子、リン酸カルシウム粒子溶液と混合し、超音波処理を施した。超音波処理を施すことで高分散性溶液が得られることが昨

年度の研究にて明らかとなっている。さらに、DNAを混合し、その直後に超高压処理(10000気圧、37°C、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。

C. 研究結果

(1) 水性二相系を用いた複合体のサイズ制御に関する基礎検討

2種の水溶性高分子から成る水溶液の相分離現象が知られている(水性二相分離)。これは、高分子の不適合性(incompatibility)により高分子同士が混合されないために起こると考えられている。代表的な水性二相系は、PEGとDextranであり、上相がPEGリッチ相、下相がDextranリッチ相となる。水性二相形成に影響する要因としては、分子量、濃度、温度が挙げられ、高濃度、高分子量の場合に水性二相分離が起こり易いことが報告されている。一方、低分子量、低濃度においては水性二相形成が起こらず、エマルジョンとして存在する。本研究では、こ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。

代表的な水性二相系であるPEG-Dextran系にて超高压印加効果を検討した。分子量の影響を検討するため、種々の分子量のPEGとDextranを用いた(表1)。各試料をGPC測定し、標準PEGを用いて分子量換算した。PEGでは、ほぼ記載分子量と同程度であったが、Dextranでは、記載分子量に比

べて低分子量であった。標準PEGの換算であり、また、用いたカラムの排除分子量が200000であることから、低い分子量で算出されたと考えられる。

表1 用いたPEG、Dextran

物質	記載分子量	GPC測定
PEG6000	6000	5,200
PEG8000	8000	6,800
Dex40,000	32,000-45,000	19,300
Dex60,000	60,000-90,000	40,300
Dex100,000	100,000-200,000	52,900
Dex500,000	500,000	233,000

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。超高压処理前後の各溶液の

写真を図1～図9に示す。

PEG6000-Dex40,000混合液は、超高压処理前では透明溶液であったが（図1）、超高压処理により二相分離が形成された（図2）。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。複合体の形成機序としては、以下のように考えられる。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（Dex1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。

次に、PEG6000-Dex60,000混合液は、超高压処理前にて若干散乱した溶液が得られた（図3）。

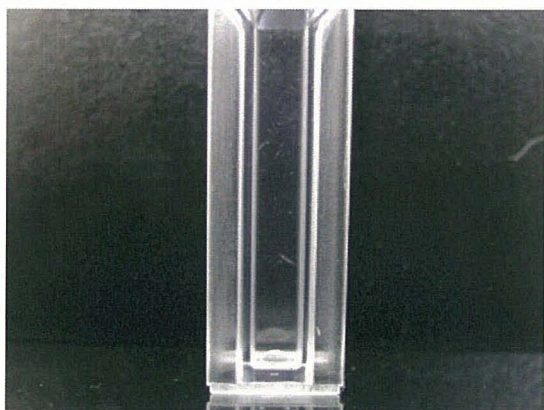


図1、PEG6000-Dex40,000混合液

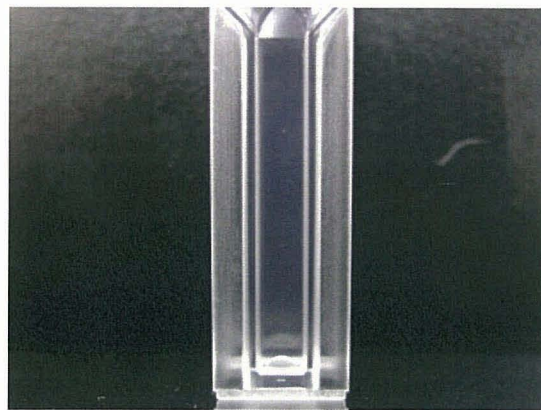


図3、PEG6000-Dex60,000混合液

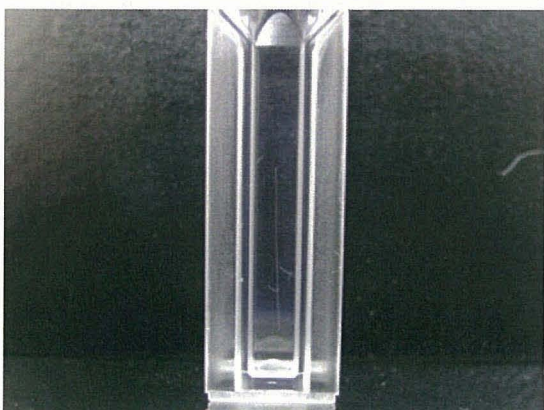


図2、超高压処理したPEG6000-Dex40,000混合液

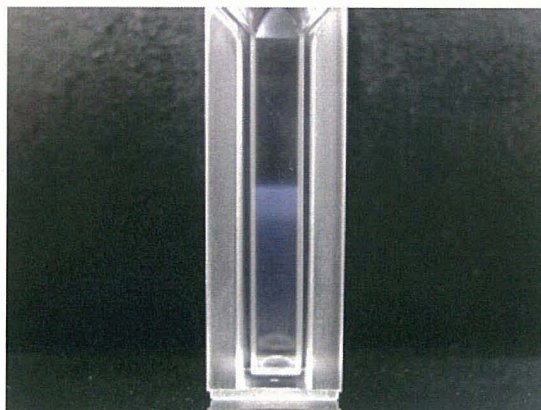


図4、超高压処理したPEG6000-Dex60,000混合液

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（図4）。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（図5、6）。超高压前の散乱は、PEG6000-Dex60,000混

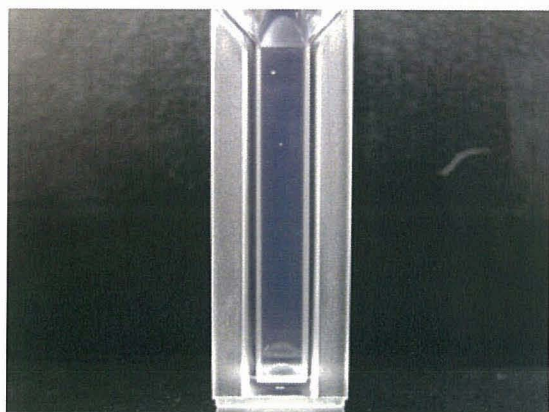


図5、PEG6000-Dex100,000混合液

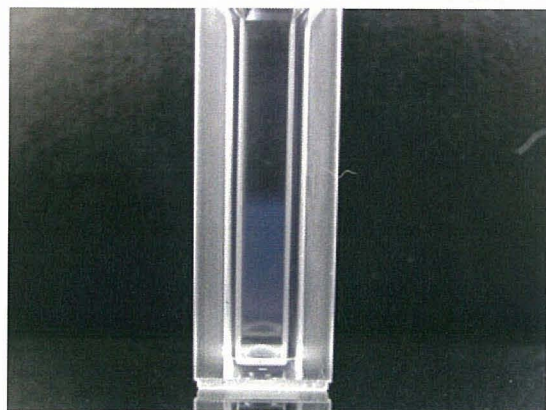


図6、超高压処理したPEG6000-Dex100,000混合液

合液に比べて強く、DexとPEGの相分離傾向が示された。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-Dex500,000混合液では、超高压処理前に白濁したエマルジョン状態であり、放置することで、二相分離が形成された（図7、8）。それぞれに超高压処理を施した結果、いずれも二相

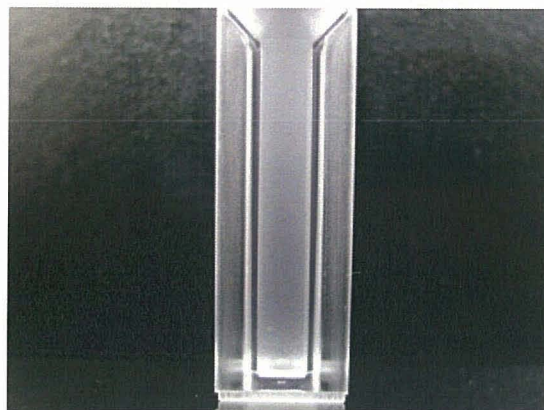


図7、PEG6000-Dex500,000混合液

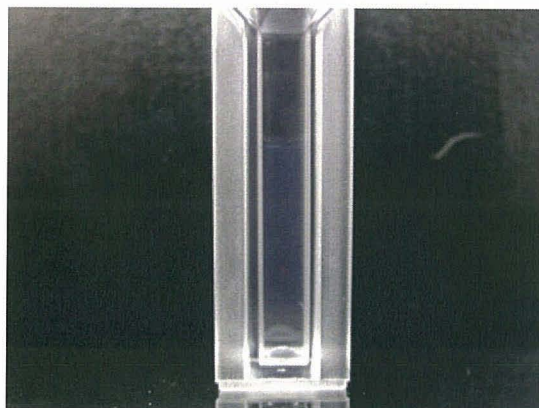


図8、PEG6000-Dex500,000混合液

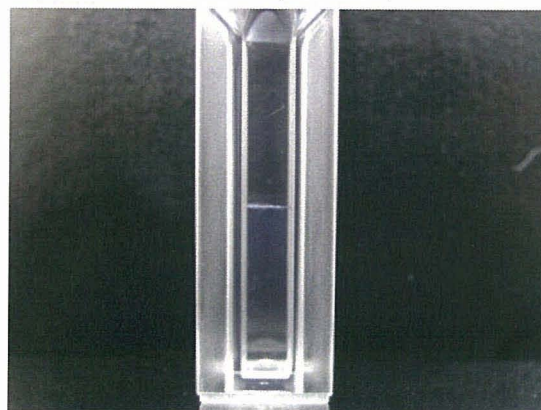


図9、超高压処理したPEG6000-Dex500,000混合液

分離が形成された。これらの場合、上相においては散乱が見られず、下相にて散乱が見られた。詳細な検討を行うために、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。結果を表2、図10に示す。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。

表2、DLS測定結果

Polymer	Non-UHP	UHP
PEG6000	2.8±0.2	2.6±0.1
Dex60,000	6.2±0.2	6.3±0.2
Dex100,000	6.3±0.1	
<hr/>		
PEG6000 -Dex60,000	3.5±0.3	3.5±0.1 (upper phase) 326.8±8.9 (lower phase)
PEG6000 -Dex100,000	218.3±3.1	3.4±0.1 (upper phase) 322.6±12.9 (lower phase)

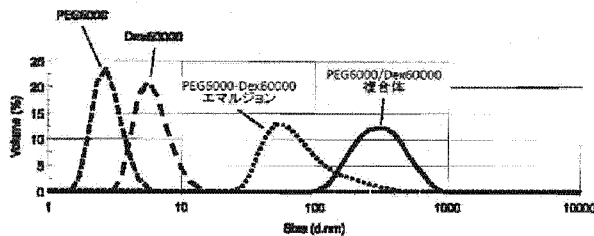


図10、DLS測定結果

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。ここで、PEG6000/Dex60,000系では複合体が下相上部に集積していた（図4）のに対し、PEG6000/Dex100,000系では複合体が下相全体に存在していた。これらのサイズはほぼ同じで

あることから、PEG6000/Dex60,000複合体はPEGリッチな会合状態であり、PEG6000/Dex100,000では、Dexリッチな会合体であることが推察される。

また、PEG/Dex複合体である事を確認するために、超高压処理前の混合液および超高压処理後の上相下相溶液それぞれのNMR測定を行った。超高压処理前の混合液では、PEGとDexに帰属されるピークが示された。一方、超高压処理後の上相においては、PEGに帰属されるピークのみが示され、下相では、PEGとDexの両方に帰属されるピークが示された。これらの結果よりPEG/Dex複合体が形成されたと考えられる。

さらに、PEG/Dex複合体が水素結合を介して形成されたどうかを検討するために、水素結合阻害剤である尿素添加系にて超高压処理を施した。その結果、水性二相分離は形成されず、得られた複合体は水素結合を介していることが明らかとなった。さらに、DLS測定を加熱下で行った結果、検出されるサイズは昇温に伴い減少した。以上の結果から、水性二相系マイクロエマルジョンを用いることにより、水素結合性高分子複合体のサイズを制御できることが明らかとなった。

(2) DNA構造への高压印加効果

従来より、圧力印加によるタンパク質の構造変化（変性）に関する検討がなされている。タンパク質は、クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などの相互作用が複雑に介して様々な構造と機能を有しており、圧力印加によるそれらの相互作用変化により構造が変化し、機能が失活されると考えられている。一方、DNAやRNAなどの核酸への圧力印加に関する報告としては、圧力印加によるコンホメーション変化が報告されている。6,000気圧の圧力印加により、B-DNAはZ-DNAへコンホメーション変化し、6,080気圧でA-DNAはZ-DNAへコンホメーション変化する。一方、RNAは、6,000気圧でもA-RNAからZ-RNAへのコンホメーション変化が起こらない。しかし、5M NaCl存在下では6,000気圧の圧力印加にてA-RNAがZ-RNAにコンホメーション変化す

ることが報告されている。また、RNA機能への圧力の影響として、リボザイムが検討されている。リボザイムとはRNA鎖の切断などの触媒活性をもつRNA、すなわちRNA触媒のことである。リボザイムは遺伝病などの遺伝子発現がかかわる疾患の治療薬として現在期待され研究が進められている。その一つにヘアピン型リボザイムがあり、その触媒活性への圧力印加の影響に関する研究がされている。リボザイムに高圧処理した場合、圧力の増加に伴い自己切断反応率が減少する。さらに、実験から計算された反応の活性化量は、一般的なタンパク質酵素の活性量と同じであり、触媒作用中のRNA分子の圧縮を表すという報告がされている。また、環状DNAであるプラスミドDNAが1600気圧の圧力印加にてスーパーコイルを形成する報告がある。また、プラスミドDNA pUC18は400MPaで、pBR322は200MPaで融解条件において高い安定性を得ることが報告されている。高圧処理により水素結合が安定し、水素結合を安定する圧力の大きさは、プラスミドDNAのサイズ、GC含有量に影響されるのではないかと示唆されている。一方、800MPaで印加処理した場合のpBR322では、無処理のpBR322よりも吸光度が増大し、超高压下では水素結合が弱まる可能性も示唆される。これらの構造変化は、DNAの機能（複製、被転写・翻訳など）に影響されると考えられるが検討されていない。そこで本研究では、プラスミドDNAの機能の一つである発現機能を中心に、高圧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。

プラスミドDNAとしては、T7 プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpT7-Lucを用いた。pT7-LucをDNase, RNase Free Waterで20 μ g/mlに調製して用いた。超高压印加装置(Dr. CHEF;(株)神戸製鋼所)を用いて高圧印加処理を行った。高圧印加処理条件のうち、印加圧力、時間を変化させた。図11には、10000気圧、10分間の超高压処理を施したpT7-LucのCDスペクトルを示す。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

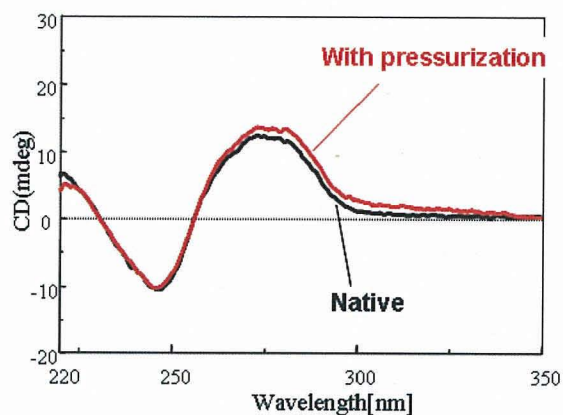


図11. 未処理pT7-Lucと10,000気圧、10分間の超高压処理したpT7-LucのCDスペクトル

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いため、圧力の影響を受けやすいと考えられる。

次に、融解温度(T_m)測定の結果を図12に示す。測定波長は、260nmである。DNAの T_m は、DNA塩基対の50%が解離する温度を指す。従って、 T_m は用いたDNAの塩基数により変化し、低塩基数ほど低い T_m 値を示し、高塩基数ほど高い T_m 値を示す。今回用いた装置は温度を100℃までしか上げることができないため、pT7-Lucの融解温度を測定することができなかった。

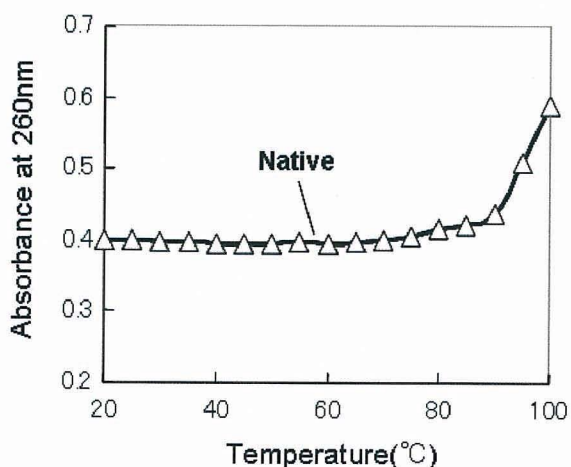


図12. 未処理pT7-Lucの T_m 測定

そこで、動的光散乱(DLS)測定にて検討することとした。DLS測定結果を図13に示す。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。

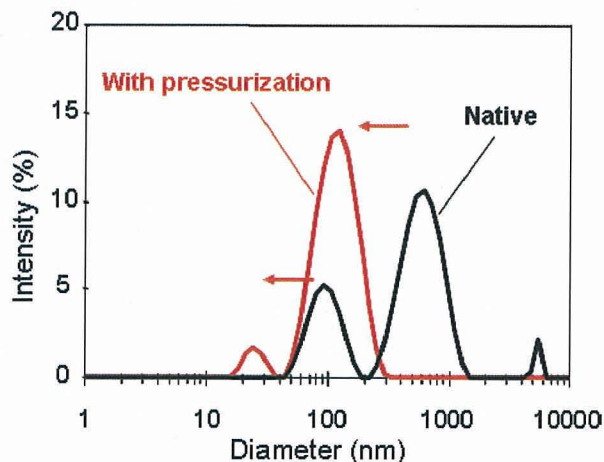


図13. 未処理pT7-Lucと10,000気圧、10分間の超高压処理したpT7-LucのDLS測定

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。結果を図14、表3に示す。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。

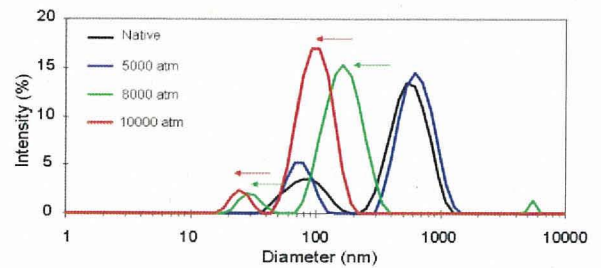


図14. 種々の圧力強度により処理したpT7-LucのDLS測定

表3. 種々の圧力強度により処理したpT7-LucのDLS測定

Pressure (atm)	Diameter of plasmid DNA (nm)	
	Peak 1	Peak 2
Native	80.4 ± 8.5	559.4 ± 71.1
5000	82.4 ± 15.9	637.7 ± 77.8
8000	32.9 ± 7.6	167.6 ± 21.3
10000	25.4 ± 1.7	108.0 ± 8.7

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。結果を図15、表4に示す。1、5、20分と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。

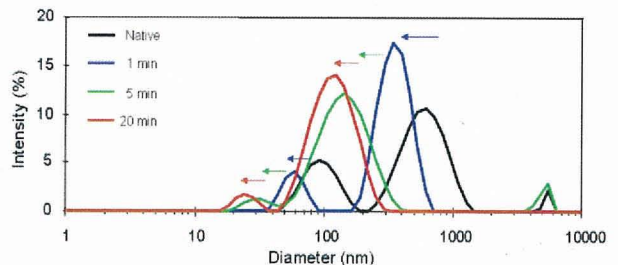


図15. 種々の圧力処理時間により処理したpT7-LucのDLS測定 (10000気圧)

表4. 種々の圧力処理時間により処理したpT7-LucのDLS測定

Time (min)	Diameter of plasmid DNA (nm)	
	Peak 1	Peak 2
Native	94.8 ± 3.0	658.7 ± 162.8
1	59.6 ± 8.5	360.0 ± 32.2
5	33.0 ± 4.8	159.7 ± 6.7
20	27.2 ± 2.5	127.3 ± 9.5

以上の結果から、DNAの高圧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。結果を図15に示す。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、高圧処理により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。

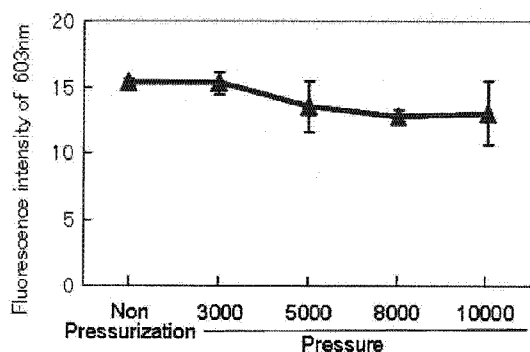


図15. 各圧力における蛍光強度(印加時間:5分)

(3) 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導入

一般的に非ウイルス型遺伝子ベクターとしては正電荷物質が選択される。これらは、負に帯電するDNAと複合体を形成し、DNA分解酵素耐性を示す。このことから、非ウイルス型遺伝子導入ベクターとして用いられる。代表的な正電荷物質としては、カチオン性リポソーム・脂質とカチオン性高分子である。カチオン性リポソーム・脂質は、リン脂質二重膜を形成し、DNAを内包するタイプと、DNA周辺に微小リポソームが相互作用するタイプがあり、DNA分解酵素耐性を示す。両者とも非ウイルス型遺伝子ベクターの中でも培養細胞系で高い遺伝子導入効率を示し、一部では臨床研究段階にあるものもあるが、遺伝子導入効率はウイルスベクターに劣り、大量の遺伝子を必要とする。また、遺伝子発現は一過性であるため、頻回を余儀なくされ、患者への負担は大きい。また、in vivo系においては、腎臓などに集積することが知られており、頻回投与は困難であると考えられる。さらに、高分子量のDNAでの利用は困難であり、分子量制限がある。一方のカチオン性高分子は、用いるDNAの分子量制限がなく、簡便な合成、操作性と比較的高い遺伝子導入効率を示すことから、従来から培養細胞系にて用いられている。しかしながら、得られる複合体の物性と遺伝子導入効率との相関が明らかにされておらず、また、カチオン性由来の本質的な細胞障害性が懸念されている。

これらのことから、本研究では、非電荷高分子を用いることとした。非電荷高分子を用いた遺伝子送達に関する研究は少ない。これまでに行われている方法としては、核酸分子のインターカレーター分子を用いて複合化させる方法や、核酸分子のリン酸基と水素結合を介して行われるが、遺伝子治療については現実的ではない。我々は非電荷高分子とDNAとの複合化技術として、超高压技術を採用した。これまで高圧技術は、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、学術的研究としては、圧力印加によるタンパク質変性が一般的であり、ここから得られた知見として、水素結合の強調性がある。DNA自身も水素結合を介して二重鎖形成がなされていることから、他の水素結合性高分子とも水素結合を介して複合体が得られる可能性があるため超高压技術を採用した。

昨年度は、ナノHAp粒子とPVAとDNAの複合体について検討し、ナノHAp粒子/PVA/DNA複合体の形成とそれらの細胞内送達を示された。本年度は、今回開発した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。これまで、エンドソーム機能の阻害剤としては、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分解酵素の活性が抑制される。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。たとえば、ポリエチレンジンやアミドアミンデンドリマーである。これらは、2級アミンを有した弱塩基性物質であり、低いpHにてアミンのプロトン化が起こる。したがって、エンドソーム内へ集積してきたプロトンがポリカチオンが消費し、pHの低下を抑制することになり、続いて、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ナノ無機粒子を開発した。このようなエンドサイトーシス破壊を目的とした無機物質の利用研究としては、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。DNAを内包する高分子ミセルにリン酸カルシウム溶液を添加し、放置することでリン酸カルシウム結晶を生成させる。この方法では、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による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、この手法では、無機塩の溶解制御には至っておらず、また、操作も煩雑であり滅菌性など問題点を残している。その点、本研究では、高分子/DNA複合体を形成された後にリン酸カルシウム結晶を生成するのではなく、すでに結晶化されたリン酸カルシウムを用いることと、遺伝子発現の制御を行うために、pH応答性を制御したナノ無機粒子を用いている。

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(図16~18)。分子量の増加に伴う慣性半径の増加が示された。

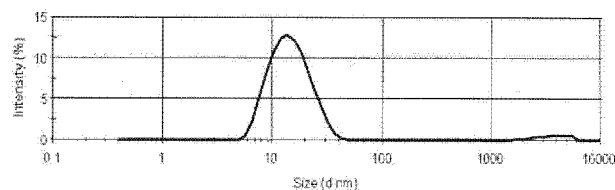


図16. PVA105水溶液のDLS測定

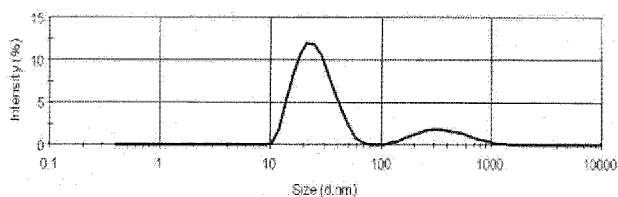


図 1 7. PVA105水溶液のDLS測定

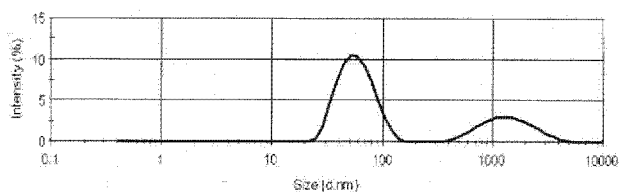


図 1 8. PVA105水溶液のDLS測定

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（図 1 9、2 0）。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。

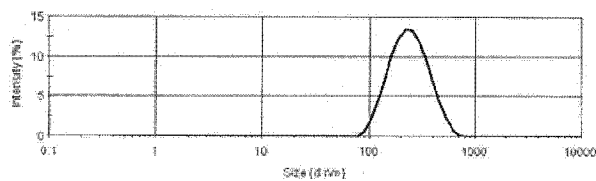


図 1 9. 超高压印加処理を施したPVA117水溶液のDLS測定

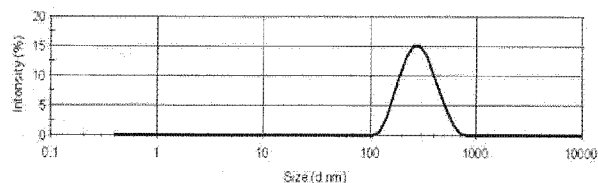


図 2 0. 超高压印加処理を施したPVA140水溶液のDLS測定

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（図 2 1、2 2）。また、コントロールとして、DNA溶液のDLS測定も行った（図 2 3）。

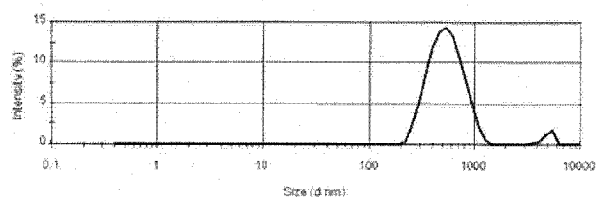


図 2 1. 超高压印加処理を施したPVA117/DNA水溶液のDLS測定

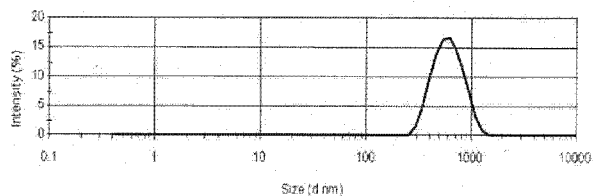


図 2 2. 超高压印加処理を施したPVA140/DNA水溶液のDLS測定

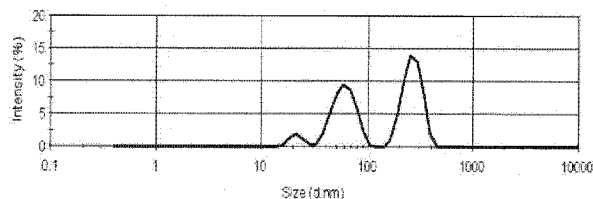


図 2 3. DNA水溶液のDLS測定

いずれの場合も、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。ただ、pH応答性ナノ無機粒子の添加量の増加により、pH応答性ナノ無機粒子に由来するピークも検出され、複合体の最適化が必要と考えられる。

上記より、水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。細胞として、SV40抗原を有するサル腎由来のCOS7細胞を

用いた。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。得られたpH応答性ナノ無機粒子／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、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(図24)。

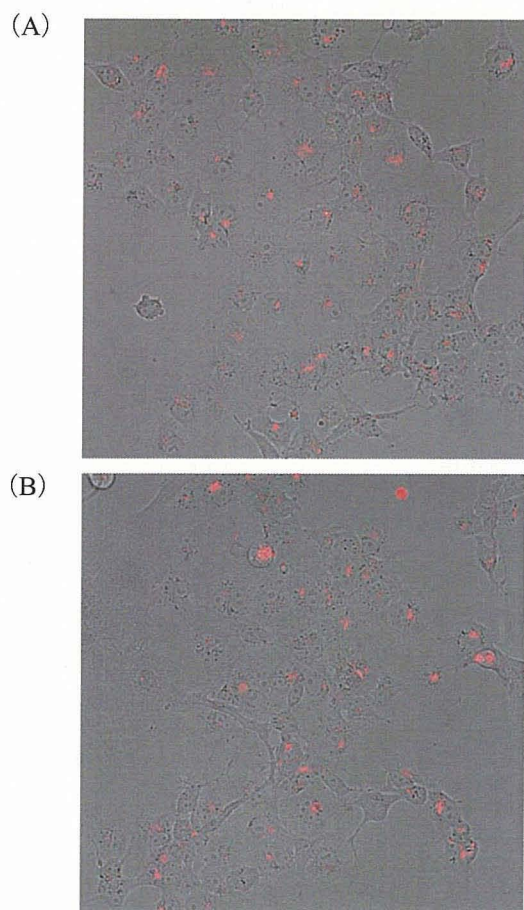


図24. ナノ無機粒子／PVA／DNA複合体の細胞内送達 (A) 炭酸・リン酸カルシウム粒子、(B) リン酸カルシウム粒子

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(図25)。

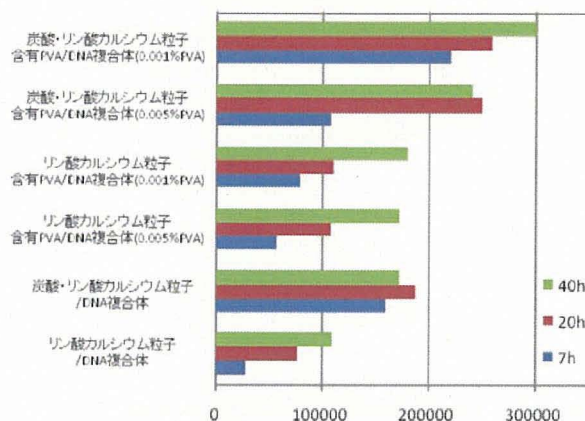


図25. ナノ無機粒子／PVA／DNA複合体の細胞内送達量

また、高濃度PVAに比べ低濃度PVAにて取り込みの増加が見られ、細胞内導入における粒子サイズの影響が明らかとなった。

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。エンドサイトーシスを介して複合体は細胞内に取り込まれた後に、複合体として存在していたため、十分な核内移行および被転写・翻訳がなされなかったと考えられる。

細胞内導入後の核内移行性、被転写・翻訳効率の向上については、現在、水素結合性複合体の特徴を活かした加温法による複合体からのDNA放出を考案し、ある程度の効果が示されている。更なる効果向上のため、加温法条件設定や複合体からのDNA放出など詳細に検討する必要がある、PVA／DNAハイドロゲルを用いたゲルからのDNAの放出を詳細に検討した。

超高压印加処理によりPVA／DNAゲルを調製し、PBSに浸漬した後、放出されるDNAを定量した。従来のPVAゲルの調製法である凍結融解法をコントロールとして用いた。凍結融解法に比べ、超高压印加処理法にて得られたPVA／DNAゲルの場合に、DNAの放出は抑制された。水素結合を

介して相互作用しているものと考えられる。水素結合を超高圧印加処理条件により制御可能と考え、種々の条件の超高圧印加処理にてPVA/DNAゲルを調製し、放出試験を行った。超高圧印加処理条件としては、温度(10、37℃)、圧力(8000、10000気圧)、時間(5、10、20分間)を変えて行った。37℃では、5分間の超高圧印加処理に比べ、10分間の超高圧印加処理の場合に放出量の増加が認められたが、20分間の超高圧印加処理では、更なる増加は示されなかった。処理温度を低下させた場合、10分間の処理では差異は認められなかったが、20分間の処理では有意な放出量の増加が認められた。一方、超高圧印加処理の圧力を8000気圧にした場合、放出量の低下が示された。以上の結果から、PVA分子同士の相互作用とPVAとDNAの相互作用について超高圧印加処理条件を変えることでコントロールできることが明らかとなった。

D. 考察

超高圧印加処理にて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。超高圧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)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、(2)DNAの構造変化への圧力印加の影響、さらに、

(3)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)については、超高圧処理によりPEG/Dex複合体の形成が確認され、(2)については、DNA構造変化が超高圧処理により誘起され、機能の向上が認められた。(3)については、ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体が得られ、効率的な遺伝子送達を示された。次年度は、本年度の知見を元に複合体の遺伝子導入ベクターとしての最適化を目指した細胞内での複合体の挙動解析を行い、十分な遺伝子発現を目指す。

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、

- 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,*
- 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、
高圧凝縮 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

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
7) 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	2006
8) 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,	2056	2006
9) 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,	956	2006
10) 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	2055	2006
11) 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.54, No.2	5288-5289	2006
12) 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 of AIChE			2006
13) 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		286	2006

14) 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、	高圧印加による 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		39-40	2006
15) 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おける細胞内動態の検討	Drug Delivery System,	21,	292	2006
16) 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	高圧凝縮 DNA の構造・機能解析と遺伝子導入への応用	再生医療	6、Suppl	301	2007

遺伝子医学 MOOK 5

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

別刷

株式会社 メディカルドゥ

9. 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-

木村 剛・古蘭 勉・岸田晶夫

セラミック材料のうちリン酸カルシウムを用いた培養細胞への遺伝子導入法（リン酸カルシウム法）は、研究室レベルでの一般的な手法である。細胞傷害性が低く、操作も容易であるが、再現性や導入効率が低いため、その利用は限られる。これらの諸問題に対して詳細な検討がなされ、サイズや溶解性などの遺伝子導入効率への影響が明らかとなりつつある。最近では、ナノテクノロジーによる導入効率の改善や再生医療における遺伝子導入が注目されており、これらの進歩について概説する。

はじめに

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 (Al_2O_3)、ガラス、リン酸カルシウム [ハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: 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大半を占める。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が1970年代に開発され、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1つとなっている。しかしながら、導入効率、安定性、再現性が低いことから、その利用は限られる。最近、これらの問題を解決する手段として、ナノテクノロジーを利用したリン酸カルシウムナノ粒子による遺伝子導入法が考案されている。また、再生医療において他の足場材料（スキャフォールド）との組み合わせによる遺伝子導入が注目されている。ここでは、リン酸カルシウムに重点

を置き、遺伝子導入材料としての合成および物性、さらに遺伝子導入効率との関係について考察したい。

I. リン酸カルシウム法

リン酸カルシウム法は、DNAをリン酸および Ca^{2+} 水溶液に混合することでリン酸カルシウム/DNA共沈殿を形成させ、それを細胞に取り込ませて遺伝子を導入する方法である。リン酸カルシウムを用いた遺伝子導入は、1973年にGrahamらが報告したリン酸カルシウムとアデノウイルスDNAとの共沈殿物による細胞への導入に始まる¹⁾。その後、プラスミドDNA、ヒト由来細胞の全DNAなどの遺伝子の細胞への導入が報告され、広く用いられるようになった。しかし、導入効率は低く、グリセロール処理や浸透圧ショック法など様々な改良がなされた。Okayamaらは、微小なリン酸カルシウム/DNA共沈殿物を形成させ、それをコアとして培地中で結晶成長させながら細胞に取り込ませる方法を考案し、その結果、種々の細胞での導入効

key words

リン酸カルシウム、ハイドロキシアパタイト、結晶、マイクロエマルジョン、エンドソーム、有機・無機ハイブリッド、再生医療、ナノテクノロジー、ナノ粒子、ナノミセル

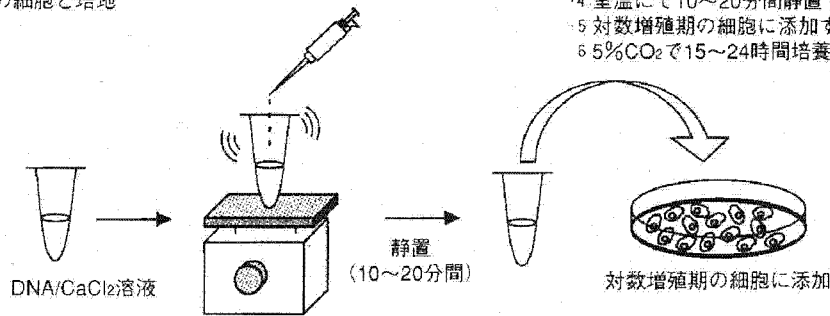
図① リン酸カルシウム法による培養細胞への遺伝子導入 (文献2より)

<用意>

- 2.5M CaCl₂: フィルター滅菌後-20°Cで保存
- 2×BBS (BES buffered saline): 50mM BES [N, N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid], 280mM NaCl, 1.5mM Na₂HPO₄ (pH 6.95) (2×HBSでもよい)
- 滅菌水: 超純水をフィルター滅菌
- DNA: 1mg/ml溶液
- 対数増殖期の細胞と培地

<操作>

- ① 2.5M CaCl₂をフィルター滅菌したMilliQ水で10倍希釈する。
- ② 20~30 μgのDNAを調製した0.25M CaCl₂ 0.5mlにて溶解する。
- ③ ボルテックスをかけながら2×BBSを0.5ml滴下する。
- ④ 室温にて10~20分間静置する。
- ⑤ 対数増殖期の細胞に添加する。
- ⑥ 5%CO₂で15~24時間培養する。



率が改善された²⁾。この方法は、現在の一般的プロトコルとなっている (図①)。リン酸カルシウム法は、特殊な機器を必要とせず、安価な試薬で簡便に行えるが、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、様々な形態・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 (図②)³⁾。Yangらは、様々なpHにおける共沈殿物の形態変化をTEM観察した⁴⁾。pH6.48, 6.82, 6.91, 7.01では個々に分散した微小な球状粒子が形成されるが、pH 7.12, 7.25, 8.13, 10.01では不規

則な凝集塊が観察され、微小なpH変化が共沈殿物の形成に強く影響することが明らかとなった。また、サイズと遺伝子導入効率の相関が示され、微小粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集に伴い導入効率は減少する⁵⁾。これは、リン酸カルシウム結晶の細胞への導入がエンドサイトーシスによるためであり⁶⁾、大きな凝集塊では十分に細胞に導入されないことが原因であると考えられている。

II. リン酸カルシウムナノ粒子

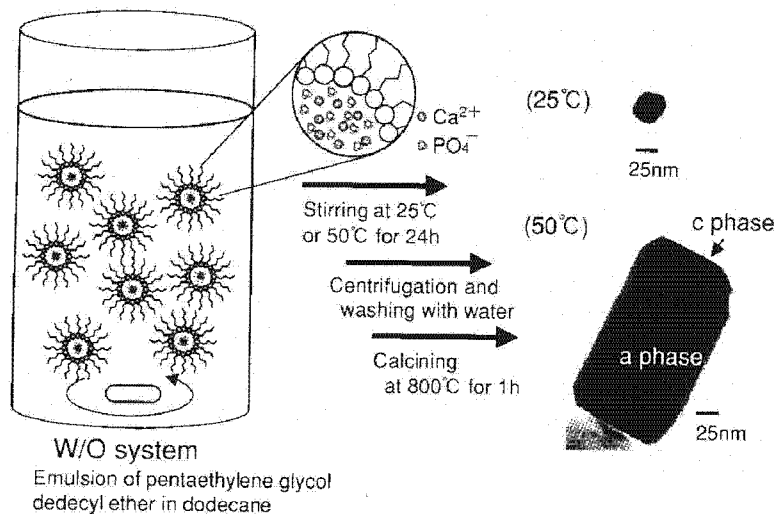
上述のように微小なリン酸カルシウム/DNA共沈殿物により効率よい遺伝子導入が達成されることから、安定かつ均一に分散したナノサイズのリン酸カルシウム/DNA複合体の創製が試みられている。著者らは、ナノスケールでサイズを制御したHApの合成法を考案した⁷⁾。合成法と得られたHApナノ粒子1個のTEM像を図③に示す。結晶化反応の温度が25°Cでは球状、50°Cではロッド状のHAp粒子が調製され、温度コントロールによりHApナノ粒子のサイズおよび形態を制御することが可能である。また、電子線回折パターン解析では、a面、c面の形成が確認された。a面はカルシウムリッチ、c面はリン酸イオンリッチな面とされており、結晶成長制御による粒子1個における電

図② リン酸カルシウムの種類と水中での溶解性 (文献3より改変)

種類	化学式
一リン酸カルシウム	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ · H ₂ O
リン酸4カルシウム	Ca ₄ P ₂ O ₉
三リン酸カルシウム	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂
二リン酸カルシウム	CaHPO ₄ · 2H ₂ O, CaHPO ₄
リン酸4カルシウム	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ · 5H ₂ O
三リン酸カルシウム	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂
ハイドロキシアパタイト	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂

溶解度: 大 (上) → 小 (下)

図3 マイクロエマルジョン法によるハイドロキシアパタイトの調製 (文献8より)



Reprinted from Journal of Materials Science Letters, 20, 2001, 111-114. Effect of reaction temperature on the morphology and size of hydroxyapatite nanoparticles in an emulsion system, Furuzono T, et al., figure 4. Copyright 2001, with permission from Springer Netherlands.

荷の制御が可能であることを示している。現在、これらを用いた遺伝子導入を検討している。また、MozumdarらによりプラスミドDNAを内包するリン酸カルシウムのナノ粒子も開発されている¹¹⁾。ヘキサン中に界面活性剤である sodium bis (ethyl-hexyl)-sulphosuccinate のマイクロエマルジョンを分散させ、CaCl₂ とプラスミドDNAを添加したA液、Na₂HPO₄ とプラスミドDNAを添加したB液を作製し、A、B液を混合後、数時間反応させることでナノ粒子が形成される。得られたDNAを含有するナノ粒子は約80nmのサイズを有し、XRD測定により粒子の一部がHAp構造であることが明らかとなった。in vitro 遺伝子導入では、市販の高分子系遺伝子導入剤である PolyFect[®] 以上の導入効率が示されている。同様の合成法でリン酸マグネシウム、リン酸マンガンとプラスミドDNAとのナノ粒子も調製される¹²⁾。Akaikeらは、カルシウムがマグネシウムに置換され、結晶成長が抑制されることに着目し、ナノサイズのリン酸カルシウム-マグネシウム/DNA 共沈殿物を調製し、遺伝子導入効率の改善に成功している¹³⁾。さらに、Kataokaらは、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を考案した¹⁴⁾。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nm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、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。脂質/DNAの粒子やヒストンH1/DNA複合体においても、リン酸カルシウム共存下において遺伝子発現効率の向上が示され、リン酸カルシウムのエンドソームエスケープ能が示唆されている¹⁵⁾。

ナノテクノロジーの導入により安定かつ均一なナノサイズのリン酸カルシウム粒子の調製が可能となり、またエンドソーム破壊を促進する機能を有することが示唆され、今後、他の素材とのハイブリッド化あるいは助剤としての発展が期待できる。

Ⅲ. 再生医療におけるリン酸カルシウムと遺伝子導入

再生医療におけるリン酸カルシウムによる遺伝