

## 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

○木村剛<sup>1)</sup>・小粥康充<sup>2)</sup>・岡田正弘<sup>3)</sup>・古菌勉<sup>3)</sup>・  
六雄伸悟<sup>4)</sup>・吉澤秀和<sup>4)</sup>・藤里俊哉<sup>5)</sup>・岸田晶夫<sup>1)</sup>

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ大阪 古菌プロジェクト、3) 国立循環器病センター研究所 生体工学部、4) 岡山大学、環境理工学部、5) 国立循環器病センター研究所 再生医療部

### 1. 緒言

エンドサイトーシス経路を介する非ウイルス遺伝子デリバリーでは、エンドソームから細胞質への移行が重要となる。これまで、エンドソームの酸性化をトリガーとし、エンドソーム膜を破壊する遺伝子ベクターの分子設計が行われてきた。膜破壊性のカチオン性両親媒ペプチド、ヒスチジン含有ペプチド、あるいは、プロトンスポンジ効果を誘導するカチオン性ポリマーなどである。遺伝子導入促進は達成されているが、そのカチオン性由来する細胞傷害性が問題として残る。一方、リン酸カルシウムなどの無機塩とDNAとの共沈殿物がエンドソームの酸性下で溶解され、エンドソームからの遺伝子の遊離が報告されているが、その再現性、安定性は低い。我々は、細胞障害性の低減を目的に、非電荷ポリマーであるポリビニルアルコール (PVA) を用い、超高压印加法にて誘起されるPVA/DNA複合体の遺伝子ベクターとしての応用を検討している。細胞内導入は達成されるが、有意な遺伝子発現は認められなかった。本研究では、PVA/DNA複合体への無機塩の付加による遺伝子導入促進について検討した。

### 2. 実験

無機塩として、ハイドロキシアパタイト (HAp) を用いた。改良型マイクロエマルジョン法により、形状および酸溶解性の異なるHApを調製した。HAp濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高压処理装置 ((株)神戸製鋼所) を用いて37°C、10,000 atmの超高压処理を施し、HAp含有PVA/DNA複合体を得た。得られた複合体の物性を光学・電子顕微鏡観察、DSC測定にて解析した。蛍光ラベル化プラスミドDNAを用いて、COS7細胞への遺伝子導入・発現を検討した。

### 3. 結果と考察

所定濃度のPVA水溶液にHApを添加し、超音波処理により高分散溶液を得た。DNA溶液を混合し、超高压印加処理を施した。SEM観察では、PVA/DNA複合体に比べ、HApを混合した複合体の表面での凹凸が観察され、PVA/DNA複合体へのHApの含有が明らかとなった。また、得られたHAp含有PVA/DNA複合体溶液のpH滴定により、HApの酸溶解性が確認された。蛍光ラベル化DNAを用いて細胞内導入について検討した結果、HAp含有PVA/DNA複合体の有意な細胞内導入が示された。HAp含有による有意な遺伝子発現が示されたが、市販の遺伝子導入剤に比して低く、更なる改善が必要である。本研究は、厚生労働省科学研究補助金の助成を受けて行われた。

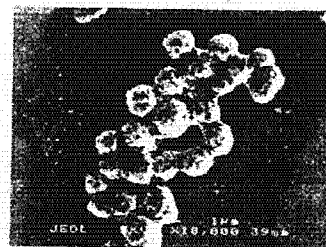


Fig. SEM image of PVA/DNA complexes containing HAp.

## Enhancement of gene transfection using PVA/DNA complex containing inorganic salts formed by ultra high pressure treatment

Tsuyoshi KIMURA<sup>1)</sup>, Yasumichi KOGAI<sup>2)</sup>, Masahiro OKADA<sup>3)</sup>, Tsutomu FURUZONO<sup>3)</sup>, Shingo MUTSUO<sup>4)</sup>,  
Hidekazu YOSHIZAWA<sup>4)</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>5)</sup> and Akio KISHIDA<sup>1)</sup>

1) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,  
2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan

2) Innovation Plaza Osaka, Japan Science and Technology Agency, Osaka, Japan.

3) Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute

4) Department of Material and Energy Science, Okayama University

5) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,

National Cardiovascular Center Research Institute

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida\_fm@tmd.ac.jp

## P5 高圧印加による PVA ハイドロゲルの作製と物性評価

(東医歯大生材研) ○木村剛, (日大院理工) 三浦義之, (日大院理工) 栗田公夫,  
(岡山大環境理工) 吉澤秀和, (国立循環器七) 藤里俊哉,  
(物材機構) 小林尚俊, (東医歯大生材研) 岸田晶夫

### 【緒言】

高圧技術は、無機・有機科学、医療、食品分野などの幅広い分野で利用されている。特に、食品分野においては、タンパク質の熱変性とは異なる変性が圧力により誘起され、原料を反映した風味、色合であり、滅菌も可能であることから高圧食品として注目されている<sup>1)</sup>。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、圧力印加によりそれら相互作用が変化し、変性が誘起されると考えられている。一般的には、高圧下では、疎水性相互作用が弱まり、水素結合性が強調されることが報告されている<sup>2)</sup>。そこで、我々はこの点に着目し、水酸基を有する水素結合性高分子への圧力印加による水素結合を介する新規構造体の創出について検討した。対象として、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリエチレングリコール (PEG)、アガロース、デキストランを用いて、それらの水溶液を種々の条件下での静水圧処理を施した結果、PVA にてハイドロゲルが得られた。本研究では、PVA ハイドロゲルの作製および物性について詳細に報告する。

### 【実験】

PVA(重合度: 1700, 鹸化度: 99.8%)の水溶液およびジメチルスルホキシド(DMSO) / 水 (DMSO : 水 = 80 : 20) 混合溶液を様々な濃度で調製した。高圧処理装置 (Dr.CHEF ; (株)神戸製鋼所) を用いて、種々の温度 (25~40℃)・圧力 (1000~10000気圧)・時間 (0~30分) にて高圧処理を行った。また、一般的な PVA ハイドロゲルの作製方法である凍結融解法によっても PVA ハイドロゲルを作製した。得られた PVA ハイドロゲルのマクロ・ミクロ観察、透過度、膨潤度、力学強度測定にて物性解析を行った。

### 【結果と考察】

まず、5% PVA 溶液への圧力処理を施圧時間 10 分間にて様々な圧力強度で検討した。印加圧力の上昇に伴い白濁溶液、粘調な溶液と変化し、6000気圧以上にて脆弱なハイドロゲルとなり、10000気圧において成形性の良い白色のハイドロゲルが得られた。次に、一定の圧力強度にて異なる時間で圧力処理を施した。施圧時間の増加に伴うハイドロゲル形成が示された。さらに、用いる PVA 水溶液の濃度を変化させた場合、より高濃度の PVA 溶液の場合にハイドロゲルが得られた (図1)。これらのゲルは、加熱により溶解したことから水素結合性の物理ゲルで

### Ultra high pressure technology for controlling the structure of DNA/RNA

Tsuyoshi KIMURA<sup>1</sup>, Yoshiyuki MIURA<sup>2</sup>, Kimio KURITA<sup>2</sup>, Hidekazu YOSHIZAWA<sup>3</sup>, Toshiya FUJISATO<sup>4</sup>, Hisatoshi KOBAYASHI<sup>5</sup> and Akio KISHIDA<sup>1</sup>. (<sup>1</sup> Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan, <sup>2</sup> Nihon University, <sup>3</sup> Okayama University, <sup>4</sup> National Cardiovascular Center Institute Research, <sup>5</sup> National Institute of Materials Science) Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

**Abstract:** PVA hydrogel was obtained by high hydrostatic pressurization at more than 6000 atm for 10min. The formation of the PVA hydrogels was dependent on pressuring time and strength and the higher strength and longer time of pressurization induced the gelation of PVA. Also, PVA with higher concentration tended to form the hydro gel. It was clear that the obtained hydrogels was mediated by hydrogen bonding interaction. This simple technology

あることが示唆された。そこで、水素結合阻害剤である尿素を系中に添加し、高圧処理を施した結果、尿素濃度の上昇に伴いゲル化の阻害がみられ、3 Mの濃度にてハイドロゲルは形成されなかった。以上より、PVA ハイドロゲルの形成ドライビングフォースは水素結合であることが明らかとなった。従来から PVA ヒドロゲルの調製方法として凍結融解が知られている。しかしながら、凍結融解法では、高圧ゲルと同等の力学強度を得るために約10日間を要する。このことから本手法の有用性が示された。また、PVA ハイドロゲルを走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察した。凍結融解法、超高圧印加法にて調製した PVA ハイドロゲルを凍結乾燥した後に SEM 観察を行った。その結果、凍結融解ゲルでは繊維状構造がみられ、一方の高圧ゲルはメッシュ構造を有していた。これは、ハイドロゲルの形成過程が凍結融解法と超高圧法で異なることを示唆している。高圧ゲルの形成過程を検討するため、5~20%PVAを1000気圧、5分間にて高圧処理を施し、それぞれの膨潤度を測定した。濃度上昇に伴い、直線的に膨潤度は減少し、濃度上昇による架橋率の増加が示された。また、10%PVA溶液への7000~10000気圧、5分間の施圧により得られた PVA ハイドロゲルでは、圧力強度の増加に伴う膨潤度の減少が示された。さらに、ハイドロゲルが形成されない10%PVA溶液への5000気圧、5分以下の施圧条件では、施圧時間の減少に伴う粒子サイズの減少がDLS測定により示された。以上の結果から、圧力印加によりPVAが集合化し、圧力強度、時間、用いるPVA濃度の上昇に伴い、集合体サイズが増加し、ハイドロゲルが形成されたと考えられる。

上記に示した PVA ハイドロゲルは、白色のゲルであった。従来より、DMSO と水の混合溶媒とする PVA 溶液を冷却することにより合成される PVA ゲルは、透明性が高く、機械的強度にも優れていることが知られている。凍結融解は、 $-20^{\circ}\text{C}$ にて2時間インキュベートし、室温にて30分間放置し、これを1サイクルとして計10サイクルを繰り返した。得られたゲルは、透明性を有していた。一方、高圧印加によっても透明な PVA ハイドロゲルは得られた。発表では、種々の条件による PVA ゲル形成について検討し、また、力学強度、透過性等の物性についても詳細に検討したので報告する。

#### 【謝辞】

本研究は、厚生労働省科学研究費ならびに文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

#### 【参考論文】

- 1) 生物と食品の高圧科学、林 力丸編、さんえい出版、1993年
- 2) E.Do, A. Shimizu, N. Kitabatake, Food Hydrocoll. 5, 409-425, 1991

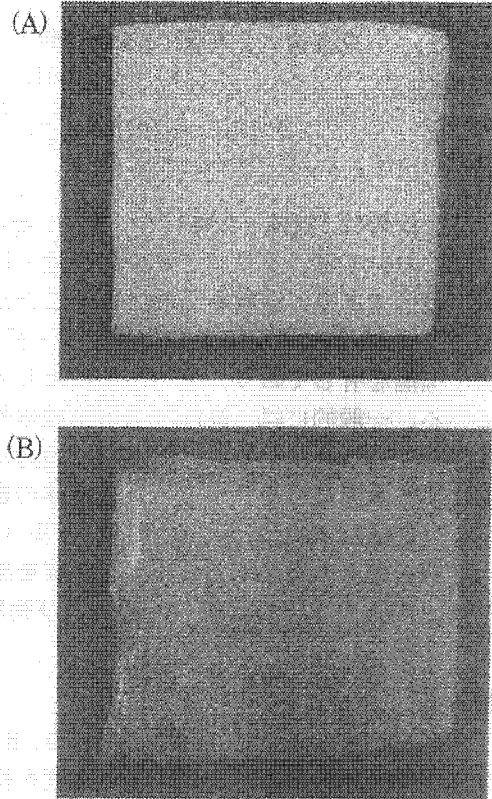


Fig1. (A)圧力処理により得られたPVAヒドロゲル。10 w/v% PVA水溶液を調整し、10,000気圧で5分間処理した。(B)凍結融解法により得られたPVAヒドロゲル。

## 1-C-9

### 非分裂細胞の核膜突破のための新戦略

上藤 亜沙子、秋田 英乃、箕浦 ありさ、山口 雅也、増田 智也、Khalil Ikramy、小暮 健太朗、原島 秀吉

北海道大学大学院 薬学研究所

人工ベクターによる非分裂細胞への遺伝子導入法は核内移行が律速となり、発現効率が低いという問題点を抱えている。本研究では、従来の「核膜孔経路」とは全く異なる遺伝子導入経路として、ベクターを構成する脂質と核膜との融合に基づいた「核膜孔を介さない経路」を提唱する。本戦略の実現には、エンドソーム膜、核膜と多段階に融合する事が必須であり、各々の膜融合に最適な脂質組成の膜が正しい順序で多重化されている必要がある。本研究では、ポリカチオン/DNA凝集体をコアとし、内膜に核膜、外膜にエンドソーム膜と融合するのに最適な脂質組成の脂質膜でコーティングし、さらに分解経路を回避可能なマクロピノサイトシス経路を介して取り込ませるためにオクタアルギニン(R8)を外膜に修飾した脂質膜多重型MEND(T-MEND)を創製した。本T-MENDは免疫系の非分裂細胞に高い遺伝子発現活性を有する事から、核膜融合を介した遺伝子デリバリー戦略が有効である事が示された。

## 1-C-10

### 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

木村 剛<sup>1</sup>、南 広祐<sup>1</sup>、大塚 伸悟<sup>2</sup>、吉澤 秀和<sup>2</sup>、岡田 正弘<sup>3</sup>、古菌 勉<sup>3</sup>、藤里 俊哉<sup>4</sup>、岸田 晶夫<sup>1</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所、<sup>2</sup>岡山大学 環境理工学部、<sup>3</sup>国立循環器病センター研究所先進医学センター生体工学部、<sup>4</sup>国立循環器病センター研究所先進医学センター再生医療部

我々は、超高压により誘起される水素結合型の高分子/DNA複合体を用いた遺伝子送達について検討している。これまで、ポリビニルアルコール(PVA)とDNAの複合体の細胞内送達は達成されたが、十分な遺伝子発現は認められなかった。そこで、エンドソームの遊離促進を目指し、低pHで溶解される無機物質とハイブリッド化した無機/高分子/DNA複合体を考案し、遺伝子導入効率の向上が示された。本研究では、更なる導入効率の向上を目指し、細胞内動態について検討した。無機物質としてハイドロキシアパタイト(HAp)を用い、種々の高分子とDNAとのハイブリット化を超高压処理により行い、HAp/高分子/DNA複合体を得た。蛍光ラベル化DNAを用いた細胞内導入観察では、エンドサイトーシスを介した導入が示された。経時観察では、無機ハイブリッド化複合体の場合に早期の細胞内導入が観察され、遺伝子導入効率における導入速度の影響が示唆された。

P-383 マウス羊膜幹細胞の特性および組織形態学的検討

吉田 淑子<sup>1</sup>, 藤 賛<sup>1</sup>, 岡部 素典<sup>1</sup>, 戸田 文香<sup>1</sup>,  
米田 徳子<sup>2</sup>, 野上 真紀子<sup>3</sup>, 樋口 収<sup>4</sup>, 二階堂 敏雄<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>富山大学大学院大学医学薬学研究所再生医学, <sup>2</sup>同産婦人科,  
<sup>3</sup>同整形外科, <sup>4</sup>同小児科

我々はこれまでヒト羊膜に幹細胞が存在することを報告してきた。さらに詳細に研究を進める上でマウスにおける実験系を樹立するために、マウス羊膜内に存在する幹細胞の同定を試み、その特性について、組織学的に検討した。

【材料と方法】マウスはC57BL/6およびICRマウスを使用した。幹細胞の増殖能をみるためにBrdUを妊娠、7、9、10、12、14日目のマウスに一回投与し、妊娠17~19日目に羊膜を採取した。採取羊膜は光学および電子顕微鏡用の材料として凍結切片や伸展標本等を作製した。Stem cell markerとしてalkaline phosphatase (ALP), Oct3/4, Sca-1, Nanog, SSEA-1, FGFを、分化markerとしてcytokeratin抗体を用いた免疫染色を施した。

【結果及び考察】マウス羊膜はヒトと比較し著しく薄い膜状構造を呈し、単層の羊膜上皮細胞とそれを裏打ちする間葉系細胞で構成されていた。免疫染色の結果、ALPの染色性はほとんど認められず、羊膜のほとんどの細胞がSca-1(+)を示した。SSEA-1(+)BrdU(+)およびSSEA-1(+), cytokeratin(+)という二重陽性を示す細胞は存在したが、cytokeratin(+)でBrdU(+)の細胞は認められなかった。Cytokeratinに陽性を示す細胞は分化した羊膜上皮であると考えられた。以上、今回の実験によりマウスの羊膜にも上皮と間葉系の細胞が存在することが明らかであり、BrdU(+)SSEA-1(+)の細胞群に幹細胞が含まれている可能性が示唆された。

P-385 マウス羊膜から幹細胞の分離

藤 賛<sup>1</sup>, 吉田 淑子<sup>1</sup>, 岡部 素典<sup>1</sup>, 戸田 文香<sup>1</sup>,  
樋口 収<sup>2</sup>, 野上 真紀子<sup>3</sup>, 米田 徳子<sup>4</sup>,  
二階堂 敏雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>富山大学大学院大学医学薬学研究所再生医学, <sup>2</sup>同小児科, <sup>3</sup>同整形外科, <sup>4</sup>同産婦人科

Previously, we showed that human amniotic epithelial and mesenchymal cell insulin-producing cells, or myocardial cells. The aim of this study is to isolate stem cells (ASE) from mouse amniotic membranes and to assess their characteristics. The cells with stem cell marker such as SSEA-1 (+) and/or BrdU (+) were existed in the mouse amnion membrane. On the base of these results, we isolated of ASE from the amnion membrane by using MACS or FACS. The cells were isolated with 0.25% trypsin and 0.075% collagenase and stained with anti BrdU, SSEA-1, and cytokeratin (CK) antibodies to confirm the origin. By using the FACS, isolated cells were divided into four classes by the intensity of the SSEA-1 expression and the size of the cells. These were SSEA-1(-)/small, SSEA-1(-)/large, SSEA-1(+)/large, and SSEA-1(+)/small. The cells in the latest class account for 0.5% in all cells and stained positively with anti BrdU antibody, but negative with anti CK antibody. BrdU(+) cells were small size and stained with SSEA-1(+) and CK (-), suggesting that cells surface markers and the cells size are useful for defining mouse ASE from amnion membranes.

P-384 ヒト上皮腫瘍細胞株に由来するがん幹細胞の分離とその性質

ナイラ マホモティ, 宮崎 正博, 片岡 健, 許 南浩  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野

Recently accumulating evidence increasingly validates the cancer stem cell hypothesis that tumor cells are composed of a rare cell population with some stem cell properties and the remaining majority population. The cancer stem cells are considered to possess self-renewing capacity, thus showing higher tumorigenicity, and to be resistant to chemotherapeutic agents and/or radiation. In the present study, we examined possible utility of Rh-123 for isolation of cancer stem cells. Rh-123 negative cells were isolated from a human prostate cancer cell line (PC3) that expresses the multidrug resistance gene (MDR1) encoding a transmembrane efflux pump p-glycoprotein. The percentage of Rh-123-negative cells in PC-3 cell line was 1-2% at the first sorting. Doubling time of the Rh-123 negative cells was shorter than that of the positive cells. By immunostaining, stem cell markers such as SSEA-4 and SOX-2 were detected in the Rh-123 negative cells but not in the positive counterparts. Therefore, the Rh-123 negative cells may be candidate for cancer stem cells in PC-3 cell line.

P-386 高圧凝縮DNAの構造・機能解析と遺伝子導入への応用

木村 剛<sup>1</sup>, 堀内 可奈<sup>2</sup>, 栗田 公夫<sup>3</sup>, 南 広祐<sup>4</sup>,  
六雄 伸悟<sup>3</sup>, 吉澤 秀和<sup>3</sup>, 藤里 俊哉<sup>4</sup>, 岸田 晶夫<sup>4</sup>

<sup>1</sup>東京医科歯科大学生体材料工学研究所, <sup>2</sup>日本大学理工学部,  
<sup>3</sup>岡山大学環境理工学部, <sup>4</sup>国立循環器病センター研究所再生医療部

【緒言】遺伝子あるいはタンパク質導入による細胞の高次機能化技術は、再生医療分野における重要課題の一つである。非ウイルス遺伝子導入の主流は、正電荷物質との複合化によりDNAを凝縮させて細胞に導入する手法であるが、正電荷に由来する細胞障害性が問題となる。本研究では、新たなDNA凝縮法として高静水圧凝縮法を考案し、DNA構造に及ぼす圧力印加の影響と機能解析について詳細に検討した。

【実験】遺伝子として1kbラダーDNA、プラスミドDNAを用いた。高静水圧印加装置を用いて、温度10、40℃、圧力3,000、6,000、8,000、10,000気圧、時間1、5、10、20分間と異なる条件にて高静水圧処理を行った。処理液をTm測定、CD測定、アガロースゲル電気泳動、DLS測定にて解析した。また、高圧処理によるDNAの機能解析として、ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳、核酸分解酵素を用いた分解性試験により検討した。さらに、培養細胞への遺伝子導入を試みた。

【結果と考察】高静水圧印加後のDNAのDLS測定より、DNAの凝縮が確認できた。また、Tm測定、CD測定にて構造変化が示された。高圧凝縮DNAでは、分解酵素耐性と転写・翻訳活性の向上が示され、遺伝子送達への応用の可能性が示唆された。本研究は、厚生労働省科学研究費および文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。