

Fig. 9. Effects of H_2O_2 , NO, and adenosine on I/R-induced MI in dogs in vivo. A: I/R-induced left ventricular infarct size in dogs in vivo. C, control. B: plot of infarct size expressed as a percentage of the risk area and regional collateral flow during I/R. ** $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs. L-NMMA (L) or Cat or 8-SPT; ## $P < 0.01$ vs. L + TEA or L + Cat.

(27), increase in intracellular Ca^{2+} concentration after ischemia (28), and H_2O_2 production by inflammatory cells (5). Furthermore, an inhibitor of NO synthesis [N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)] or that of K_{Ca} channels (charybdotoxin) partly inhibits the protective effect on myocardial infarct size (22). Liu et al. (14) demonstrated that peroxynitrite inhibits K_{Ca} channel activity in human coronary arterioles during I/R. This mechanism might contribute to impaired H_2O_2 -mediated dilation in I/R where NO synthase activity is increased in the presence of excess of O_2^- . In the present study, inhibition of H_2O_2 or NO alone did not significantly increase myocardial infarct size compared with control conditions (Fig. 9). These results suggest that H_2O_2 and NO exert cardioprotective effects against the development of myocardial infarction in a compensatory manner.

Recently, we have demonstrated that the expression of eNOS protein is decreased in the ischemic myocardium, which is improved by a selective Rho-kinase inhibitor, hydroxyfasudil, during coronary I/R injury in dogs in vivo (36). Furthermore, a physiological concentration (2 μ mol/l) of H_2O_2 improved the recovery of both cardiac contractile function and energy metabolism after I/R in perfused rat heart (37). In the present study, the expression of eNOS protein was decreased in the ischemic myocardium, which was increased by catalase during I/R injury (Fig. 7). All these mechanisms may be involved in the beneficial effects of H_2O_2 on the I/R-induced myocardial injury. It is also conceivable that I/R reduces endothelial tetrahydrobiopterin levels in coronary vessels and impairs eNOS function (30).

Limitations of the study. Several limitations should be mentioned for the present study. First, we did not examine coronary vasodilatation in response to SOD/SOD mimetic (e.g., Tempol) or peroxynitrite inhibitor (e.g., ebselen) after I/R. However, because of the complex interactions among the oxygen species, we consider that both Tempol and ebselen also affect H_2O_2 metabolism by scavenging superoxide anions and peroxynitrite, respectively. Second, in addition to catalase, endogenous glutathione peroxidase (GSH) also plays an important role in removing H_2O_2 , and NO also could be a substrate for endogenous catalase (1). However, in the present study, we used exogenous catalase

to remove H_2O_2 to examine the role of the reactive oxygen species. Third, the exact source of vascular H_2O_2 production remains to be elucidated (e.g., the endothelium, smooth muscle, or cardiomyocytes). Fourth, while we were able to demonstrate the production of H_2O_2 using fluorescent microscopy with DCF, we were unable to quantitatively measure the H_2O_2 production because DCF detects H_2O_2 , $ONOO^-$, and $HOCl$ as well. Fifth, we were unable to find smaller arterioles because of the limited spatial resolution of our CCD intravital microscope. If we had an intravital camera with higher resolution, we would be able to observe coronary vasodilator responses of smaller arterioles.

Clinical implications and conclusions. During coronary I/R, microemboli of atherosclerosis debris and platelet plugs are released into the coronary microcirculation, particularly at revascularization with thrombolysis and/or percutaneous coronary intervention. Thus preexisting coronary endothelial dysfunction with various risk factors may be an important determinant for I/R injury in acute myocardial infarction. The synthesis and/or action of endothelium-derived NO are impaired under various pathological conditions, such as hypertension, hyperlipidemia, and diabetes mellitus (26, 34). In hypertension, K channel activities are increased in a compensatory manner with reduced NO activity (13). The present results suggest that NO and H_2O_2 compensate each other to cause coronary vasodilatation during I/R injury in vivo.

In conclusion, we were able to demonstrate that endogenous H_2O_2 , in cooperation with NO, plays an important cardioprotective role in coronary I/R injury in vivo. The present findings may have important clinical implications because H_2O_2 -mediated mechanisms substantially contribute to endothelium-dependent vasodilatation in coronary I/R in vivo.

GRANTS




This work was supported in part by grants from the Japanese Ministry of Education, Science, Sports, Culture, and Technology, Tokyo, Japan (Nos. 13307024, 13557068, 14657178, 15256003, 16209027, 16300164), and the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the Organization for Pharmaceutical Safety and Research of Japan.

REFERENCES

1. Antunes F, Han D, and Cadenas E. Relative contributions of heart mitochondria glutathione peroxidase and catalase to H₂O₂ detoxification in vivo conditions. *Free Radic Biol Med* 33: 1260–1267, 2002.
2. Bauersachs J, Hecker M, and Busse R. Display of the characteristics of endothelium-derived hyperpolarizing factor by a cytochrome P450-derived arachidonic acid metabolite in the coronary microcirculation. *Br J Pharmacol* 113: 1548–1553, 1994.
3. Cabell F, Weiss DS, and Price JM. Inhibition of adenosine-induced coronary vasodilation by block of large-conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267: H1455–H1460, 1994.
4. Campbell WB, Gebremedhin D, Pratt PF, and Harder DR. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as an endothelium-derived hyperpolarizing factor. *Circ Res* 78: 415–423, 1996.
5. Chandrasekar B, Colston JT, de la Rosa SD, Rao PP, and Freeman GL. TNF- α and H₂O₂ induce IL-18 and IL-18R β expression in cardiomyocytes via NF- κ B activation. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1152–1158, 2003.
6. Chen G, Suzuki H, and Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from blood vessels. *Br J Pharmacol* 95: 1165–1174, 1988.
7. Edwards G, Dora KA, Gardener MJ, Garland CJ, and Weston AH. K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries. *Nature* 396: 269–272, 1998.
8. Ehring T, Krajcar M, Baumgart D, Kompa S, Hummelgen M, and Heusch G. Cholinergic and α -adrenergic coronary constriction with increasing ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 268: H886–H894, 1995.
9. Feletou M and Vanhoutte PM. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine smooth muscle. *Br J Pharmacol* 93: 515–524, 1988.
10. Gao Y and Vanhoutte PM. Effects of hydrogen peroxide on the responsiveness of isolated canine bronchi: role of prostaglandin E₂ and I₂. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 263: L402–L408, 1992.
11. Hayabuchi Y, Nakaya Y, Matsuoka S, and Kuroda Y. Hydrogen peroxide-induced vascular relaxation in porcine coronary arteries is mediated by Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Heart Vessels* 13: 9–17, 1998.
12. Huang A, Sun D, Carroll MA, Jiang H, Smith CJ, Connetta JA, Falck JR, Shesely EG, Koller A, and Kaley G. EDHF mediates flow-induced dilation in skeletal muscle arterioles of female eNOS-KO mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H2462–H2469, 2001.
13. Liu Y, Hudetz AG, Knaus HG, and Rusch NJ. Increased expression of Ca²⁺-sensitive K⁺ channels in the cerebral microcirculation of genetically hypertensive rats: evidence for their protection against cerebral vasospasm. *Circ Res* 82: 729–737, 1998.
14. Liu Y, Terata K, Chai Q, Li H, Kleinman LH, and Gutterman DD. Peroxynitrite inhibits Ca²⁺-activated K⁺ channel activity in smooth muscle of human coronary arterioles. *Circ Res* 91: 1070–1076, 2002.
15. Masumoto A, Hirooka Y, Shimokawa H, Hironaga K, Setoguchi S, and Takeshita A. Possible involvement of Rho-kinase in the pathogenesis of hypertension in humans. *Hypertension* 38: 1307–1310, 2001.
16. Matoba T, Shimokawa H, Nakashima M, Hirakawa Y, Mukai Y, Hirano K, Kanaide H, and Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in mice. *J Clin Invest* 106: 1521–1530, 2000.
17. Matoba T, Shimokawa H, Kubota H, Morikawa K, Fujiki T, Kunihiro I, Mukai Y, Hirakawa Y, and Takeshita A. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in human mesenteric arteries. *Biochem Biophys Res Commun* 290: 909–913, 2002.
18. Mehta JL, Nichols WW, Donnelly WH, Lawson DL, and Saldeen TG. Impaired canine coronary vasodilator response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion. *Circ Res* 64: 43–54, 1989.
19. Miura H, Bosnjak JJ, Ning G, Saito T, Miura M, and Gutterman DD. Role for hydrogen peroxide in flow-induced dilation of human coronary arterioles. *Circ Res* 92: e31–e40, 2003.
20. Mori H, Haruyama Y, Shinozaki H, Okino H, Iida A, Takanashi R, Sakuma I, Hussein WK, Payne BD, and Hoffman JI. New nonradioactive microspheres and more sensitive X-ray fluorescence to measure regional blood flow. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 263: H1946–H1957, 1992.
21. Morikawa K, Shimokawa H, Matoba T, Kubota H, Akaike T, Talukder MA, Hatanaka M, Fujiki T, Maeda H, Takahashi S, and Takeshita A. Pivotal role of Cu,Zn-superoxide dismutase in endothelium-dependent hyperpolarization. *J Clin Invest* 112: 1871–1879, 2003.
22. Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Liao Y, Takashima S, Asakura M, Mori H, Shinozaki Y, Hori M, and Kitakaze M. Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart. *J Am Coll Cardiol* 40: 998–1005, 2002.
23. Rubanyi GM and Vanhoutte PM. Oxygen-derived radicals, endothelium, and responsiveness of vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 250: H815–H821, 1986.
24. Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, Arakawa S, Horike H, Komai N, Sasaki T, Tsujioka K, Makino H, and Kashihara N. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 288: F1144–F1152, 2005.
25. Shimokawa H, Yasutake H, Fujii K, Owada MK, Nakaie R, Fukumoto Y, Takayanagi T, Nagao T, Egashira K, Fujishima M, and Takeshita A. The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulations. *J Cardiovasc Pharmacol* 28: 703–711, 1996.
26. Shimokawa H. Primary endothelial dysfunction: atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 31: 23–37, 1999.
27. Siegel G, Emden J, Wenzel K, Mironneau J, and Stock G. Potassium channel activation in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol* 311: 53–72, 1992.
28. Steenbergen C, Murphy E, Levy L, and London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ Res* 60: 700–707, 1987.
29. Taylor HJ, Chaytor AT, Evance WH, and Griffith TM. Inhibition of the gap junctional component of endothelium-dependent relaxations in rabbit iliac artery by 18- α glycyrrhetic acid. *Br J Pharmacol* 125: 1–3, 1998.
30. Tiefenbacher CP, Chilian WM, Mitchell M, and Defily DV. Restoration of endothelium-dependent vasodilation after reperfusion injury by tetrahydrobiopterin. *Circulation* 94: 1423–1429, 1996.
31. Traverse JH, Chen Y, Crampton M, Voss S, and Bache RJ. Increased extravascular forces limit endothelium-dependent and -independent coronary vasodilation in congestive heart failure. *Cardiovasc Res* 52: 454–461, 2001.
32. Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, Yamamori S, Ohno K, Hosaka H, and Kajiya F. In vivo observation of subendocardial microvessels of the beating porcine heart using a needle-probe videomicroscope with a CCD camera. *Circ Res* 72: 939–946, 1993.
33. Yada T, Hiramatsu O, Kimura A, Tachibana H, Chiba Y, Lu S, Goto M, Ogasawara Y, Tsujioka K, and Kajiya F. Direct in vivo observation of subendocardial arteriolar responses during reactive hyperemia. *Circ Res* 77: 622–631, 1995.
34. Yada T, Goto M, Hiramatsu O, Tachibana H, Toyota E, Nakamoto H, Ogasawara Y, Matsuda H, Arakawa K, Hayashi K, Suzuki H, and Kajiya F. In vivo visualization of subendocardial arteriolar response in renovascular hypertensive hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H1785–H1792, 2003.
35. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Goto M, Ogasawara Y, and Kajiya F. Hydrogen peroxide, an endogenous endothelium-derived hyperpolarizing factor, plays an important role in coronary autoregulation in vivo. *Circulation* 107: 1040–1045, 2003.
36. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Tanaka E, Shinozaki Y, Mori H, Kiyooka T, Katsura M, Ohkuma S, Goto M, Ogasawara Y, and Kajiya F. Beneficial effect of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *J Am Coll Cardiol* 45: 599–607, 2005.
37. Yaguchi Y, Satoh H, Wakahara N, Katoh H, Uehara A, Terada H, Fujise Y, and Hayashi H. Protective effects of hydrogen peroxide against ischemia/reperfusion injury in perfused rat hearts. *Circ J* 67: 253–258, 2003.

Naoto Fukuyama
Etsuro Tanaka
Yasuhiko Tabata
Hisanori Fujikura
Masao Hagihara
Hiromi Sakamoto
Kiyoshi Ando
Hiroe Nakazawa
Hidezo Mori

Intravenous injection of phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/ biodegradable gelatin complex promotes angiogenesis in a rat myocardial ischemia/reperfusion injury model

Received: 18 April 2006
Returned for 1. revision: 21 June 2006
1. Revision received: 11 September 2006
Returned for 2. revision: 
2. Revision received: 
Accepted: 9 October 2006
Published online: 

N. Fukuyama (✉) · H. Fujikura ·
M. Hagihara · K. Ando · H. Nakazawa
Depts. of Physiology, Internal Medicine
and Center for Regenerative Medicine
Tokai University School of Medicine
Isehara, 259-1193, Japan
Tel.: +81-463/93-1121
Fax: +81-463/93-6684
E-Mail: fukuyama@is.icc.u-tokai.ac.jp

E. Tanaka
Dept. of Nutritional Sciences
Tokyo University of Agriculture
Tokyo, Japan

Y. Tabata
Research Center for Biomedical
Engineering
Kyoto University
Kyoto, Japan

H. Sakamoto
Genetics Division
National Cancer Center Research Institute
Tokyo, Japan

H. Mori
National Cardiovascular Center Research
Institute
Suita, Japan

Abstract Conventional gene therapies still present difficulties due to poor tissue-targeting, invasiveness of delivery, method, or the use of viral vectors. To establish the feasibility of using non-virally ex vivo transfected phagocytes to promote angiogenesis in ischemic myocardium, gene-transfection into isolated phagocytes was performed by culture with positively charged gelatin impregnated with plasmid DNA. A high rate of gene transfection was achieved in rat macrophages and human monocytes, but not in mouse fibroblasts. The efficiency was $68 \pm 11\%$ in rat macrophages and $78 \pm 8\%$ in human monocytes. Intravenously injected phagocytes accumulated predominantly in ischemic tissue ($13 \pm 8\%$) and spleen ($84 \pm 6\%$), but negligibly in other organs in rodents. The efficiency of accumulation in the target ischemic tissue reached more than 86% on direct local tissue injection. In a rat model of myocardial ischemia-reperfusion, intravenous injection of fibroblast growth factor 4 (FGF4)-gene-transfected macrophages significantly increased regional blood flow in the ischemic myocardium ($78 \pm 7.1\%$ in terms of flow ratio of ischemic/non-ischemic myocardium) compared with intravenous administration of saline ($36 \pm 11\%$) or non-transfected macrophages ($42 \pm 12\%$), or intramuscular administration of naked DNA encoding FGF4 ($75 \pm 18\%$). Enhanced angiogenesis in the ischemic tissue we confirmed histologically. Similarly, intravenous injection of FGF4-gene-transfected monocytes enhanced regional blood flow in an ischemic hindlimb model in mice ($93 \pm 22\%$), being superior to the three other treatments described above (38 ± 12 , 39 ± 15 , and $55 \pm 12\%$, respectively).

Phagocytes transfected ex vivo with FGF4 DNA/gelatin promoted angiogenesis. This approach might have potential for non-viral angiogenic gene therapy.

Key words angiogenesis – cells – gene therapy – growth substances – ischemia

Abbreviations and acronyms

ANOVA = analysis of variance
FGF4 = fibroblast growth factor-4
GFP = green fluorescent protein
pI = isoelectric point

Introduction

Conventional gene therapies still require improvement with regard to transfection efficiency and safety [1, 2], as well as tissue targeting [3], despite recent advances. Achievement of a high transfection rate often requires a viral vector, but the safety of the viruses has not yet been

established [4–6]. Conventional non-viral vectors seem to be inferior to viral ones in transfection efficiency, except for nucleofection [7, 8]. Conventional gene therapy using a viral vector can induce inflammation in the gene-transduced tissue [9]. Moreover, *in vivo* gene-delivery to the localized target tissue usually necessitates invasive approaches. For example, direct gene-transfection to cardiomyocytes requires surgical operation [10] or cardiac catheterization [11, 12]. On the other hand, *in vivo* gene-transfection is less invasive, but tissue-targeting by intravenous injection is difficult to achieve [3].

Macrophages accumulate in ischemic tissue based on the mechanism of immune response (chemotaxis) [13]. This suggests that intravenous transplantation of macrophages may target the ischemic tissue *in vivo*. Tabata *et al.* previously reported that gelatin particles are phagocytized by macrophages [14, 15]. The isoelectric point (pI) of gelatin can be changed by modification of its residues, and positively charged gelatin can be impregnated with negatively charged substances [16] such as nucleic acid [17]. Thus, gelatin may be suitable as a vector for transfecting phagocytes *ex vivo*.

We describe here a study aimed at examining the feasibility of a new concept for less invasive, cell-based gene therapy, by means of *ex vivo* gene transfection into isolated phagocytes (macrophages and monocytes) using a non-viral vector, gelatin, followed by intravenous injection of the transfected phagocytes. The present method has significant advantages over conventional cell-based gene delivery [18, 19], in that the intravenously injected cells (phagocytes) not only produce protein from the transfected gene, but have a tissue-targeting ability.

Methods

This study was performed in accordance with the Guideline of Tokai University School of Medicine on Animal Use, which conforms to the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (DHEW publication No. (NIH) 86-23, Revised 1985, Offices of Science and Health Reports, DRR/NIH, Bethesda, MD 20205).

Animals

A total of 121 Fisher rats (male, 10 weeks old, Clea Japan Inc., Tokyo) and 61 nude SCID mice (male, 6 weeks old, Shizuoka Animal Center, Shizuoka, Japan) were used. Rats were anesthetized by inhalation of diethyl ether for harvesting macrophages and with isoflurane (1.5–3%) for thoracotomy, after which they were mechanically ventilated with a mixture of oxygen and nitrous oxide. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (40 mg/kg).

A model of myocardial ischemia-reperfusion injury

was prepared in 41 rats. The remaining 80 rats were used for collecting activated macrophages. The heart was exposed via thoracotomy, and the proximal left anterior descending coronary artery was ligated [20] for 180 min, followed by reperfusion. A model of hindlimb ischemia was prepared in 61 mice. The left femoral artery was ligated and resected [21].

Cells

Macrophages were obtained from 80 rats. Thioglycolate (4%, 8 ml) was injected into the peritoneal cavity, and after 4 days, peritoneal macrophages were collected [22]. Monocytes were obtained from peripheral blood of healthy volunteers. Leukocyte-rich plasma was obtained by dextran 500 sedimentation and layered onto Nycoprep 1.068 (Nycoprep, Birmingham, UK). The monocyte-containing layer was aspirated, washed twice and allowed to adhere to the dish for 90 minutes. Fibroblasts (NIH 3T3, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) were also used. The cells were resuspended in RPMI 1640 medium (Sigma) containing 5% heat-inactivated fetal calf serum and cultured for 7–14 days. The cell viability and type were determined by trypan blue exclusion and by immunostaining using anti-macrophage antibody up to 14 days.

Genes and vector

Complementary DNA (cDNA) of green fluorescent protein (GFP), Renilla luciferase or human hst1/FGF4 (FGF4) [17] was inserted into the expression vector pRC/CMV (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and the constructs were designated as pRC/CMV-GFP, pRC/CMV-luciferase and pRC/CMV-HST1-10, respectively. Preparation and purification of the plasmid from cultures of pRC/CMV-GFP-, pRC/CMV-luciferase-, or pRC/CMV-HST1-10-transformed *Escherichia coli* were performed by equilibrium centrifugation in cesium chloride-ethidium bromide gradients.

Gelatin was prepared from porcine skin [14]. After swelling in water the gelatin particles used in this study were spheroids with a diameter of approximately 5–30 μm , water content of 95%, and pI of 11. Gelatin (2 mg) was incubated with 50 μg of the plasmid for 7 days at 4 °C to make a gelatin-DNA complex [14].

Experimental protocols

Ex vivo gene transfection Macrophages, monocytes, and fibroblasts (1×10^6) were cultured with the gelatin-DNA complex (2 mg of gelatin plus 50 μg of DNA) for 14 days on a culture dish (100 mm in diameter). Gene ex-

pression of GFP was evaluated by fluorescence microscopy and fluorescence-activated cell sorting. Luciferase activity in the cell lysate was evaluated with a photon counter system after cell lysis [23].

Organ distribution of phagocytes injected intravenously and directly into ischemic muscle To examine tissue-targeting by intravenous injection of transfected phagocytes, the distribution of the cells into organs was evaluated by immunohistochemistry. In the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury, the GFP-gene-transfected macrophages (1.0×10^6 each) were injected into the superficial dorsal vein of the penis at the initiation of reperfusion ($n=7$ and 5 , respectively). In the mouse model of hindlimb ischemia, the GFP-gene-transfected monocytes (1.0×10^6) were injected into the caudal vein 14 days after induction of ischemia ($n=5$). To examine the tissue-targeting by direct local injection of transfected phagocytes, the distribution of the cells into organs was also evaluated. In the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury ($n=7$) and the mouse model of hindlimb ischemia ($n=5$), the same numbers of transfected macrophages and monocytes were directly injected into ischemic myocardium and ischemic skeletal muscle, respectively. Tissue samples were obtained 24 hours after cell administration. Each tissue was homogenized and cytopsin was performed. Immunohistochemical analysis was done with anti-GFP antibody (CLONTECH, USA. GFP-monoclonal antibody). GFP positive macrophages were counted in each tissue and expressed as a percentage of total GFP-positive cells.

Amelioration of ischemia by intravenous injection of angiogenic gene-transfected phagocytes The angiogenic effect of intravenously injected FGF4-gene-transfected phagocytes on the ischemia models was evaluated. In the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury, FGF4-gene-transfected macrophages ($n=5$), non-transfected macrophages (1.0×10^6 each) ($n=5$), or saline ($n=5$) were injected into the superficial dorsal vein of the penis, or naked FGF4-DNA ($50 \mu\text{g}$) was injected directly into the ischemic myocardium ($n=5$), at the initiation of reperfusion. Fourteen days after the cell administration, blood flows in the ischemic and non-ischemic regions in the heart were evaluated with a non-contact laser Doppler flowmeter (FLO-N1, Omegawave Corporation). Then, tissue samples were obtained and histological analysis was performed. In a mouse model of hindlimb ischemia, just after induction of ischemia, FGF4-gene-transfected monocytes ($n=15$), non-transfected monocytes ($n=8$) (1.0×10^6 each), or saline ($n=10$) were injected into the caudal vein, or naked FGF4-DNA ($50 \mu\text{g}$) was injected directly into the ischemic muscle ($n=12$). Fourteen days after induction of ischemia, blood flows in the limbs were evaluated with

the noncontact laser Doppler flowmeter (FLO-N1, Omegawave Corporation).

Histology

Ten micrometer sections were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. Two sections were used for H.E. staining and azan staining, and eight sections were used for immunohistochemical staining. Immunohistochemical staining was performed by an indirect immunoperoxidase method. Anti-GFP antibody, anti-Mac1 antibody (BMA Biomedicals Ag, Switzerland), and anti-CD31 antibody (Serotec, UK) were used as primary antibodies. Mac1-antigen is specific to macrophages/monocytes. Anti-Ig, peroxidase-linked species-specific F(ab')₂ fragments (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., UK), were used as a secondary antibody. Double staining was performed with alkaline staining and peroxidase staining. The vessel density stained with von Willebrand factor-antibody was calculated by morphometric assessment in one 16 randomly selected fields of each heart and expressed as number/mm².

Statistical analysis

Data are presented as mean values \pm SD. Differences were assessed by using ANOVA (analysis of variance) with the Scheffe's multiple comparisons test. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Ex vivo gene transfection

We studied whether genes could be transfected into isolated rat macrophages, human monocytes, and mouse fibroblasts ex vivo by using gelatin. Transfection of the GFP gene into isolated rat macrophages (Figs. 1A and B) and human monocytes (Figs. 1C and D), but not into mouse fibroblasts (data not shown), was achieved by culture with gelatin-DNA complex for 14 days. The gene transfection efficiency into rat macrophages was $68 \pm 11\%$ (30 experiments, Fig. 2A) and that into human monocytes was $78 \pm 8\%$ (30 experiments) as determined with a fluorescence activated cell sorter. Sequential analysis after luciferase-gene transfection into rat macrophages revealed high expression after 14 days of culture (Fig. 2B).

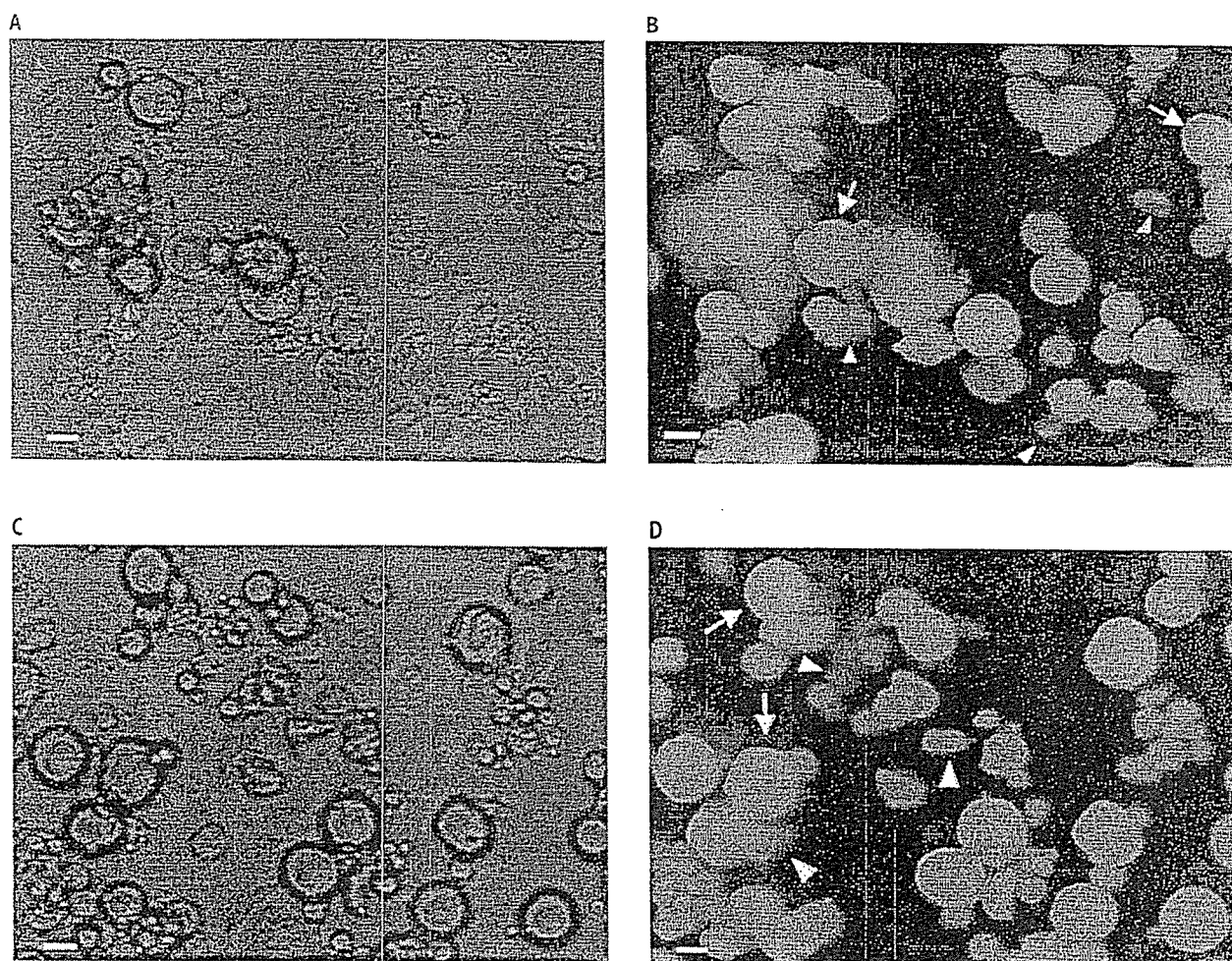


Fig. 1 Fluorescent presentation of ex vivo gene transfection with gelatin-DNA complex in macrophages/monocytes as well as fibroblasts. Rat macrophages (A and B) and human monocytes (C and D) were cultured with gelatin-GFP-gene complex for 14 days. Transmittance microscopic images (A and C) and fluorescence images (B and D) of the cells are shown. Macrophages (B) and monocytes (D) show fluorescence due to GFP. Arrowheads indicate GFP-expressing cells. Arrows indicate gelatin particles themselves. Bars = 20 μ m

Organ distribution of phagocytes injected intravenously or directly into ischemic muscle

We studied quantitatively whether intravenously injected luciferase-gene-transfected phagocytes could target ischemic tissues (the third and fifth columns from the left in Table 1). In non-ischemic rats, the injected macrophages were recognized almost exclusively in the spleen ($98 \pm 4\%$) ($n = 7$, the second column in Table 1). In non-ischemic mice, similar results were observed ($n = 7$, data not shown). In a rat with myocardial ischemia-reperfusion injury, some of the intravenously injected macrophages were incorporated into the heart (the third column in Table 1). The incorporation into the post-ischemic pericardium amounted to $13 \pm 6\%$ ($n = 7$) (non-ischemic rats $0 \pm 0\%$, $n = 7$, Table 1). The incorpo-

rated cells expressed GFP (Fig. 3). Fibrosis with inflammatory infiltrates was recognized in the anterior wall of the left ventricle, extending to the interventricular septum (Figs. 3A and B). These infiltrates were mainly polymorphonuclear leukocytes and macrophages (Figs. 3C and D). Approximately 20% of the macrophages showed GFP-positivity in this area (Figs. 3E and F). Similar tissue-targeting by intravenously injected monocytes was confirmed in a mouse model with hindlimb ischemia ($13 \pm 7\%$, $n = 7$, the fifth column in Table 1). Furthermore, we studied whether local intramuscular injection increased the degree of tissue targeting (the fourth and sixth columns from the left in Table 1). After direct injection of phagocytes into ischemic muscle, $86 \pm 10\%$ and $88 \pm 6\%$ of the cells remained in the target tissue in the two models. Thirteen and 11% of phagocytes in-

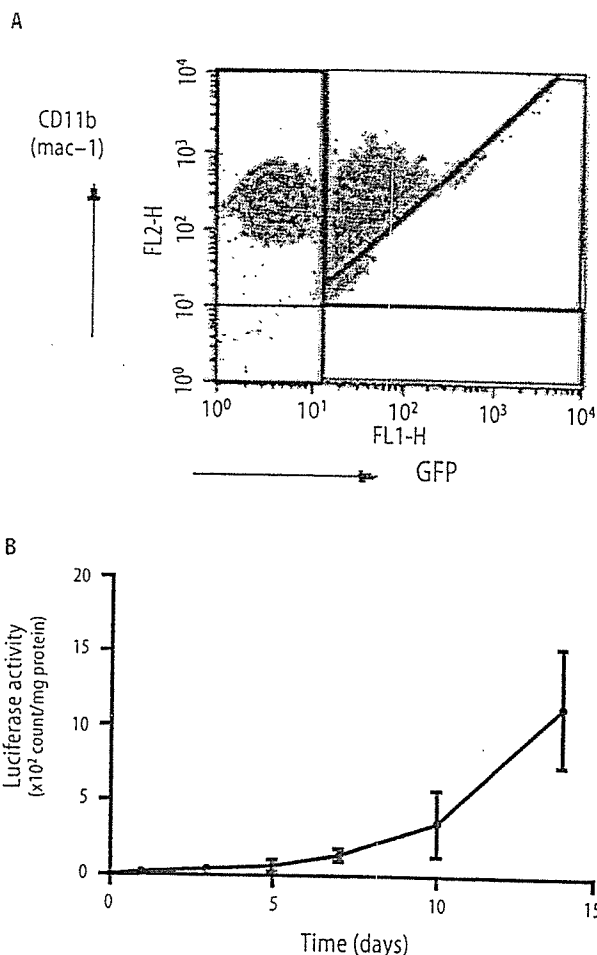


Fig. 2 Quantitative assessment of gene transfection into rat macrophages. (A) Fluorescence-activated cell sorting analysis of transfected macrophages done on day 14 of culture with reference to GFP-positive and Mac1-positive cells. (B) Sequential changes of luciferase activity in cultured macrophages in the presence of luciferase-gene-gelatin complex. Values are mean \pm SD. The number of experiments is shown in parentheses

jected into the cardiac or hindlimb muscle migrated to the spleen. In the other organs, accumulation of phagocytes were negligible.

Amelioration of ischemia by intravenously injected angiogenic-gene-transfected phagocytes

In the rat model with myocardial ischemia-reperfusion injury, we studied the angiogenic effect of intravenously injected macrophages transfected with fibroblast growth factor 4 (FGF4) gene by using gelatin. Intravenous injection of these macrophages (1.0×10^6) significantly increased the regional blood flow in the ischemic myocardium ($78 \pm 7.1\%$, $n = 8$, in terms of flow ratio of

Table 1 Organ distribution of phagocytes injected into the vein and into local tissue

Organ	Normal i.v. (7 rats)	Myocardial injury i.v. (7 rats)	Myocardial injury i.m. (7 rats)	Hindlimb ischemia i.v. (7 mice)	Hindlimb ischemia i.m. (7 mice)
Heart	0 \pm 0	13 \pm 6	86 \pm 10	0 \pm 0	0 \pm 0
Hindlimb muscle	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	13 \pm 7	88 \pm 6
Spleen	98 \pm 4	84 \pm 6	13 \pm 10	84 \pm 6	11 \pm 6
Lung	1 \pm 2	1 \pm 1	1 \pm 2	1 \pm 2	1 \pm 1
Liver	1 \pm 2	1 \pm 1	1 \pm 1	1 \pm 2	1 \pm 1
Brain	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Kidney	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Intestine	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Each value shows a distribution ratio (%) into organs of transfected macrophages/monocytes (mean \pm SD). *i.v.* intravenous injection into the vein; *i.m.* direct injection into the jeopardized muscle

ischemic/non-ischemic myocardium) compared with the other three treatments ($P < 0.05$, ANOVA), that is, intravenous administration of saline ($35 \pm 10\%$, $n = 8$), intramuscular administration of naked DNA encoding FGF4 ($50 \mu\text{g}$, direct intramyocardial injection after thoracotomy) ($58 \pm 5.3\%$, $n = 8$), and intravenous administration of the same number of non-transfected macrophages ($42 \pm 12\%$, $n = 8$) (Fig. 4A). Histological analyses revealed angiogenesis in the ischemic tissue after the administration of transfected cells (Figs. 4B and C). Similar results were observed in the mouse model with hindlimb ischemia. Intravenous injection of FGF4-gene-transfected monocytes (1.0×10^6) enhanced regional blood flow in the ischemic leg (Fig. 4D). The increase of blood flow in the mice with transfected monocytes ($93 \pm 22\%$ in terms of flow ratio of ischemic/non-ischemic leg) was significantly larger than those obtained with the other three treatments described above (38 ± 12 , 55 ± 12 , and $39 \pm 15\%$, $P < 0.05$, ANOVA). Neither lymph node swelling in any part of the body nor pathologic change in the spleen or lung, such as angioma or abnormal immune response, was found in any of the animals.

Discussion

The advantages of the present method are as follows. First, genes can easily be transfected into phagocytes (macrophages/monocytes). In preliminary experiments, we found that genes can also be transfected into endothelial progenitor cells [25]. Compared with other transfection method, the transfection efficiency was high ($68 \pm 11\%$) and it is not necessary to use a potentially hazardous viral vector [2, 26, 32]. Second, the phagocytes can target the pathologic tissues by chemotaxis even after intravenous injection, and higher tar-

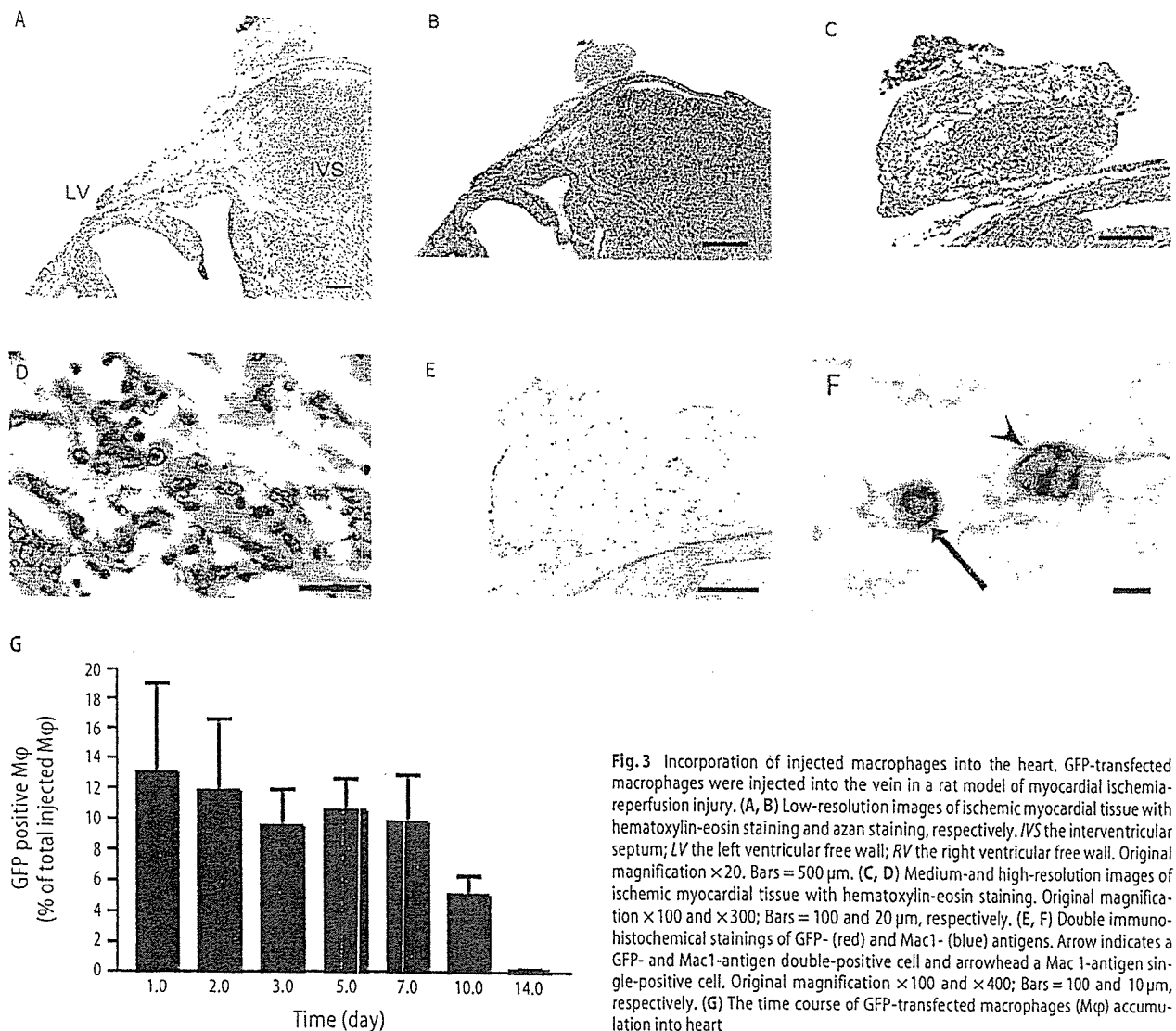


Fig. 3 Incorporation of injected macrophages into the heart. GFP-transfected macrophages were injected into the vein in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. (A, B) Low-resolution images of ischemic myocardial tissue with hematoxylin-eosin staining and azan staining, respectively. *IVS* the interventricular septum; *LV* the left ventricular free wall; *RV* the right ventricular free wall. Original magnification $\times 20$. Bars = 500 μm . (C, D) Medium- and high-resolution images of ischemic myocardial tissue with hematoxylin-eosin staining. Original magnification $\times 100$ and $\times 300$; Bars = 100 and 20 μm , respectively. (E, F) Double immunohistochemical stainings of GFP- (red) and Mac1- (blue) antigens. Arrow indicates a GFP- and Mac1-antigen double-positive cell and arrowhead a Mac 1-antigen single-positive cell. Original magnification $\times 100$ and $\times 400$; Bars = 100 and 10 μm , respectively. (G) The time course of GFP-transfected macrophages (M ϕ) accumulation into heart

getting is available if they are administered locally. The injection is repeatable. We confirmed that the angiogenic gene-transfected phagocytes enhanced angiogenesis after ischemia-reperfusion injury in rat heart and ameliorated ischemia in a mouse hindlimb model.

The injected phagocytes migrated into pathologic tissues, presumably in response to the release of cytokines such as monocyte chemoattractant protein 1 by injured endothelial cells [27]. Adhesion molecules such as P-selectin [28] are probably involved in the recruitment of phagocytes to the vessel wall. The injected phagocytes also migrated to the spleen, but no pathologic change was found in the spleen.

The present method has several advantages over conventional methods of cell-based gene therapy such as fi-

broblast-based and smooth muscle cell-based approaches [18, 19, 33, 34]. For example, monocytes do not aggregate in vessels, while fibroblasts or smooth muscle cells cannot be injected intravenously because of aggregation. The transfected phagocytes not only synthesize protein from the transfected gene, but also are partially targeted to the impaired tissue. In addition, the transfection rate was better than those of methods such as lipofection, viral vectors and electroporation [26, 29]. The newly developed technique of nucleofection has a transfection efficiency of 40–70% [30], which is similar to that of our method, but our procedure is easier to use [30, 31]. Further, the therapeutic effect obtained here was superior to that of conventional gene therapy which we reported previously, i.e., intramuscular injection of

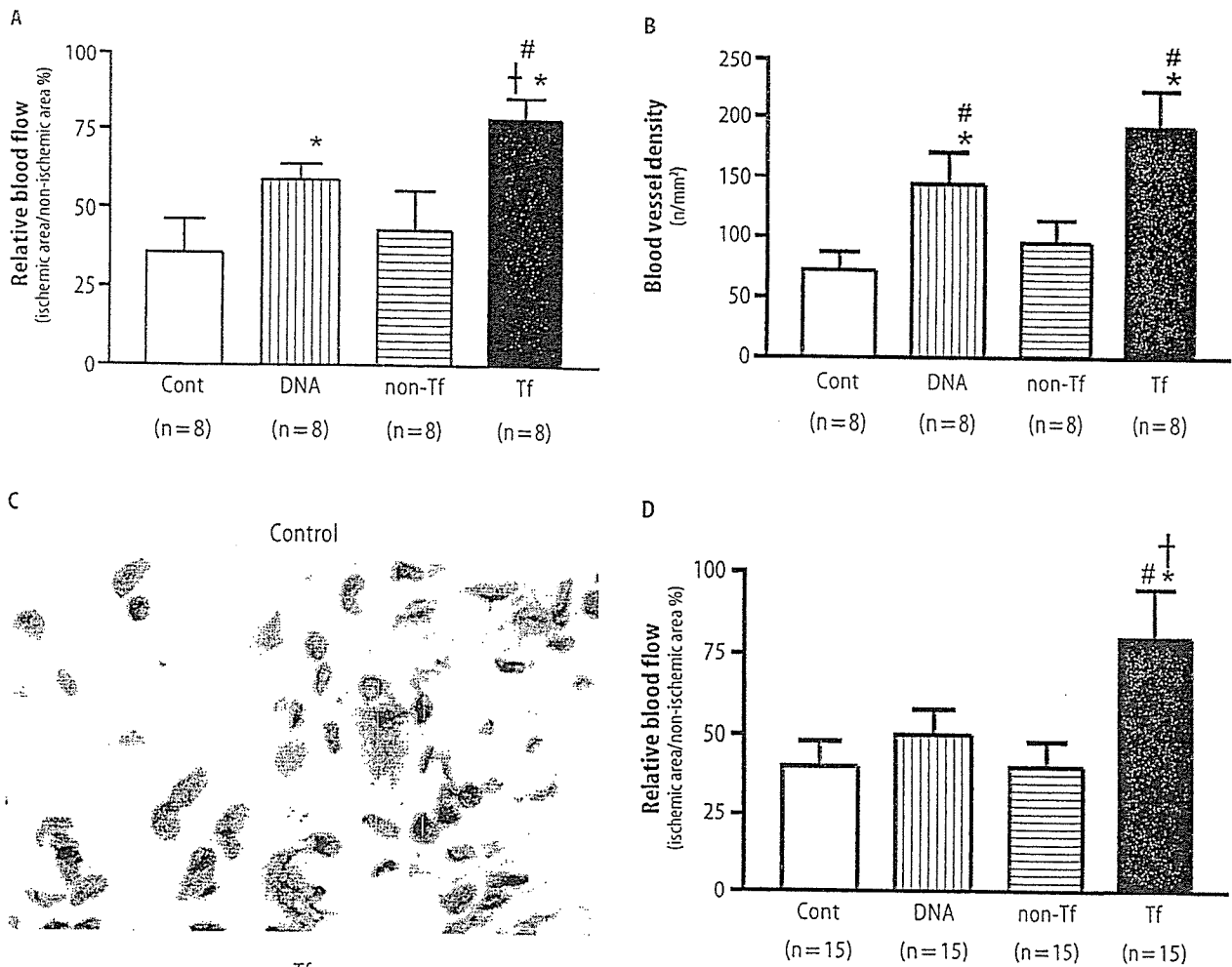


Fig. 4 Therapeutic effects of angiogenic-gene-transfected phagocytes on ischemia. FGF4-transfected macrophages were injected into the vein or naked DNA encoding FGF4 was injected directly into the myocardium in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury (A–C). FGF4-transfected monocytes were injected into the vein or naked DNA encoding FGF4 was injected directly into the ischemic muscle in a mouse model of hindlimb ischemia (D). (A) Relative blood flow in the ischemic myocardium. Each flow represents a relative value with respect to non-ischemic region. The number of animals is shown in parentheses. (B) Quantification of vessel density in the ischemic myocardium. The number of observation fields is shown in parentheses. (C) Immunohistochemical staining in the ischemic myocardium with anti-CD31 antibody. (D) Relative blood flow in the ischemic leg. Each flow represents a relative value with respect to non-ischemic leg. The number of animals is shown in parentheses. Control represents animals injected with saline into the vein; *DNA* naked DNA encoding FGF4 was injected directly into the ischemic muscle; *non-Tf* non-transfected phagocytes were injected intravenously, *Tf* FGF4-gene-transfected phagocytes were injected intravenously. Values are mean \pm SD. $P < 0.05$ vs *Cont, †DNA, and #non-Tf (ANOVA)

naked DNA, in ischemia models of heart and leg [17]. The major disadvantage of our method is the cell preparation time of 2 weeks before therapy can be started, and further work is needed to speed up this process.

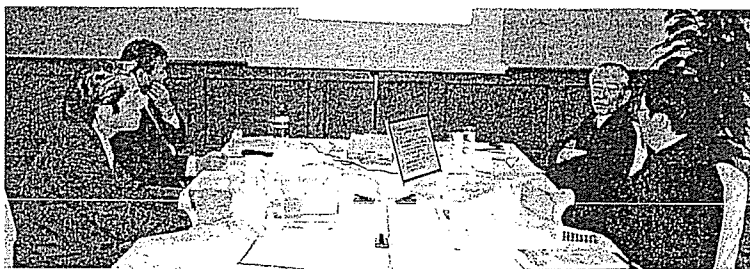
Acknowledgements The authors wish to thank Jobu Itoh, Yoshiko Shinozaki, and Takayuki Hasegawa for their technical work.

References

- Pfeifer A, Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2:177–211
- Watson DJ, Kobinger GP, Passini MA, Wilson JM, Wolfe JH (2002) Targeted transduction patterns in the mouse brain by lentivirus vectors pseudotyped with VSV, Ebola, Mokola, LCMV, or MuLV envelope proteins. *Mol Ther* 5:528–537
- Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Guo Y, French BA (2001) Gene therapy with extracellular superoxide dismutase protects conscious rabbits against myocardial infarction. *Circulation* 103:1893–1898
- Ferber D (2001) Gene therapy. Safer and virus-free? *Science* 294:1638–1642
- Kay MA, Glorioso JC, Naldini L (2001) Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics. *Nat Med* 7:33–40
- Isner JM (2002) Myocardial gene therapy. *Nature* 415:234–239
- Nishikawa M, Hashida M (2002) Nonviral approaches satisfying various requirements for effective *in vivo* gene therapy. *Biol Pharm Bull* 25:275–283
- Schakowski F, Buttgeit P, Mazur M, Mazur M, Marten A, Schottker B, Gorschluter M, Schmidt-Wolf IG (2004) Novel non-viral method for transfection of primary leukemia cells and cell lines. *Genet Vaccines Ther* 2:1
- Tomasoni S, Benigni A (2004) Gene therapy: how to target the kidney. Promises and pitfalls. *Curr Gene Ther* 4:115–122
- Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM (1998) Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 98:2800–2804
- Kornowski R, Leon MB, Fuchs S, Vodovotz Y, Flynn MA, Gordon DA, Pierre A, Kovesdi I, Keiser JA, Epstein SE (2000) Electromagnetic guidance for catheter-based transendocardial injection: a platform for intramyocardial angiogenesis therapy. Results in normal and ischemic porcine models. *J Am Coll Cardiol* 35:1031–1039
- Laitinen M, Hartikainen J, Hiltunen MO, Eranen J, Kiviniemi M, Narvanen O, Makinen K, Manninen H, Syvanne M, Martin JE, Laakso M, Yla-Herttuala S (2000) Catheter-mediated vascular endothelial growth factor gene transfer to human coronary arteries after angioplasty. *Hum Gene Ther* 11:263–270
- Ramsay SC, Weiller C, Myers R, Cremer JE, Luthra SK, Lammertsma AA, Frackowiak RS (1992) Monitoring by PET of macrophage accumulation in brain after ischaemic stroke. *Lancet* 339:1054–1055
- Tabata Y, Ikada Y (1987) Macrophage activation through phagocytosis of muramyl dipeptide encapsulated in gelatin microspheres. *J Pharm Pharmacol* 39:698–704
- Tabata Y, Ikada Y (1988) Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers. *J Biomed Mater Res* 22:837–858
- Ikada Y, Tabata Y (1998) Protein release from gelatin matrices. *Adv Drug Deliv Rev* 31:287–301
- Kasahara H, Tanaka E, Fukuyama N, Sato E, Sakamoto H, Tabata Y, Ando K, Iseki H, Shinozaki Y, Kimura K, Kuwabara E, Koide S, Nakazawa H, Mori H (2003) Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J Am Coll Cardiol* 41:1056–1062
- Xie Y, Yang ST, Kniss DA (2001) Three-dimensional cell-scaffold constructs promote efficient gene transfection: implications for cell-based gene therapy. *Tissue Eng* 7:585–598
- Panetta CJ, Miyauchi K, Berry D, Simari RD, Holmes DR, Schwartz RS, Caplice NM (2002) A tissue-engineered stent for cell-based vascular gene transfer. *Hum Gene Ther* 13:433–441
- Gidh-Jain M, Huang B, Jain P, el-Sherif N (1996) Differential expression of voltage-gated K⁺ channel genes in left ventricular remodeled myocardium after experimental myocardial infarction. *Circ Res* 79:669–675
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM (1994) Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 93:662–670
- Ribeiro RA, Flores CA, Cunha FQ, Ferreira SH (1991) IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunology* 73:472–477
- Fukuyama N, Ichimori K, Su Z, Ishida H, Nakazawa H (1996) Peroxynitrite formation from activated human leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 224:414–419
- Mori H, Haruyama S, Shinozaki Y, Okino H, Iida A, Takanashi R, Sakuma I, Hussein WK, Payne BD, Hoffman JI (1992) New nonradioactive microspheres and more sensitive X-ray fluorescence to measure regional blood flow. *Am J Physiol* 263:H1946–H1957
- Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H (2003) Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 108:889–895
- Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Matschinsky F, Markmann JF, Raper SE, Wilson JM (2004) Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 15:211–219
- Leonard EJ, Yoshimura T (1990) Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). *Immunol Today* 11:97–101
- Ikeda Y, Young LH, Lefer AM (2002) Attenuation of neutrophil-mediated myocardial ischemia-reperfusion injury by a calpain inhibitor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1421–H1426
- Veit K, Boissel JR, Buerke M, Grosser T, Meyer J, Darius H (1999) Highly efficient liposome-mediated gene transfer of inducible nitric oxide synthase *in vivo* and *in vitro* in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 43:808–822
- Maasho K, Marusina A, Reynolds NM, Coligan JE, Borrego F (2004) Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *J Immunol Methods* 284:133–140
- Mertz KD, Weisheit G, Schilling K, Luers GH (2002) Electroporation of primary neural cultures: a simple method for directed gene transfer *in vitro*. *Histochem Cell Biol* 118:501–506
- Lei Y, Haider HK, Shujia J, Sim ES (2004) Therapeutic angiogenesis; Devising new strategies based on past experiences. *Basic Res Cardiol* 99:121–132
- Ott HC, McCue J, Taylor DA (2005) Cell-based cardiovascular repair: The hurdles and the opportunities. *Basic Res Cardiol* 100:504–517
- Koch KC, Schaefer WM, Liehn EA, Ramos C, Mueller D, Schroeder J, Dimassi T, Stopinski T, Weber C (2006) Effect of catheter-based transendocardial delivery of stromal cell-derived factor 1 α on left ventricular function and perfusion in a porcine model of myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 101:69–77

座 談 会

ナノメディシン・プロジェクト —厚生労働省指定型ナノメディシン・ プロジェクトを中心に—



【写真左より馬場嘉信先生、盛 英三先生、菅 弘之先生、杉町 勝先生】

出席者（発言順）

菅 弘之	国立循環器病センター研究所/司会
盛 英三	国立循環器病センター研究所心臓生理部
馬場 嘉信	名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻応用化学分野
杉町 勝	国立循環器病センター研究所先進医工学センター循環動態機能部

■ はじめに；厚生労働省指定型ナノメ ディシン・プロジェクトの概要説明

菅 本日は「ナノメディシン (nanomedicine)・プロジェクト」というテーマで厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクトを中心に、このプロジェクトに深くかかわっていらっしゃる先生方にお集まりいただき、お話を伺いたいと思います。

まずはじめに、「ナノメディシン・プロジェクト」の概要について説明いたします。ナノメディシン・プロジェクトは、2002年（平成14）年から5年間の予定で、厚生労働科学研究萌芽の先端医療技術推進研究として開始されました。指定型研究と公募型研究からなり、指定型研

究では、国立高度専門医療センター（循環器病，がん，精神神経，成育医療，国際医療），国立医薬品食品衛生研究所，財団法人医療機器センターなどの厚生労働省関係機関や大学，民間企業などの研究者が積極的に産学官連携をし，研究をおこなっています。そして，そのプロジェクトリーダーを私が務めさせていただいております。

プロジェクトは，本日ご参加いただいている盛英三先生が中心となっておこなっている超微細画像（ナノイメージング），杉町勝先生が中心となっておこなっている微小医療機器・操作技術開発（ナノデバイス），そして国立国際医療センターの山本健二先生が中心となっておこなっている薬物搬送システム（drug delivery system：DDS），馬場嘉信先生が研究協力者としてご参加されて



菅英三先生

国立循環器病センター研究所長/
厚生労働省指定型ナノメディ
ン・プロジェクトリーダー

すが・ひろゆき
1941年、岡山県生まれ。
1960年、岡山朝日高等学校卒業。
1966年、岡山大学医学部医学科
卒業、医学士。
1970年、東京大学大学院医学系
研究科博士課程修了、医学博士。
東京医科歯科大学医用
機材研究所生体計測講座助手。
1971～1973年、米国留学 Johns
Hopkins 大学医学部生体工学教
室 Postdoctoral Fellow。
1975～1978年、米国留学 Johns
Hopkins 大学医学部生体工学教
室 Assistant Professor。

1978～1982年、国立循環器病センター研究所心臓生理学部長。
1982～1991年、同研究所循環動態機能部長。
1991～2000年、岡山大学医学部生理学第二講座教授。
2000年より現職。
専門：循環生理学、とくに心臓生理学および医用工学。なお、ナノメ
ディン関連では、拍動心臓内のクロスブリッジ動態のX線回折研究。
研究テーマ：心臓力学および心臓エネルギー学の統合的分析。
趣味：旅行、ドライブ、電気電子工作。
好きな言葉：初志貫徹、余人をもって代え難し、など。
E-mail: hsuga@ri.ncvc.go.jp
Emax & PVA Club HP: <http://www.eonet.ne.jp/~emaxpva/>

おり、医療機器センターの長谷川慧重先生が中心となっ
ておこなっている基盤データベース研究・技術評価の4
本の柱からなっています。スタート時より府省連携、省
庁横断、医工連携、産学官連携などの方針に沿って進め
ております。

プロジェクトは現在5年目です。2006年度いっぱい
で、この指定型研究はひとまず終わりを告げますが、2006
年度から第3期科学技術基本計画にも沿ってプロジェク

トを進めております。

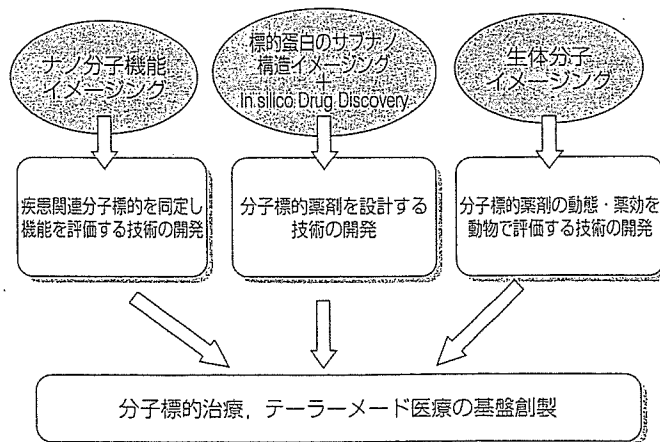
■ ナノイメージングの目的、進捗状況、 具体的成果

1) 分子標的治療の基盤としてのナノレベルイメージ ング

菅 先生 それでは、まず、盛先生から「ナノレベルイメー
ジングによる分子の機能および構造解析」についてご説
明ください。

盛 先生 われわれの研究テーマは「ナノレベルイメー
ジング」というものです。ナノレベルイメージングをいい
かえますと「蛋白質の超微細画像技術」となります。
この蛋白質の超微細画像技術、これは機能と構造の両
面をもっておりますが、これを中核として、将来求めら
れている分子標的医療の基盤技術を創製しようというも
のです。このなかに含まれるものは、蛋白質の構造イ
メージング、蛋白質の機能イメージング、そして、大
動物を用いた分子イメージングが包含されています。

図①に示すように、個別にみていきますと、1番左のナ
ノ分子機能イメージングでは、分子の機能を可視化する
ことによって疾患関連分子を治療の標的として同定する
ことを目的とします。そして、標的蛋白質のサブナノ構造
イメージングと、*in silico*のドラッグディスカバリーを
組み合わせますと、分子標的薬剤を設計する基盤技術が
できます。このようにしてつくられてきた分子標的薬剤



図① 分子標的治療、テーラーメイド医療の基盤創製
(盛英三先生よりご供与)

を大動物レベルで検証する技術が生体分子イメージングです。これらの3つの基盤技術を融合させることで、分子標的治療、あるいはテーラーメイド医療の基盤をつくらうと考えています。

本日は、分子構造イメージングを中心に説明させていただきます。分子標的薬剤の例として挙げますのは、ノバルティスファーマ株式会社が開発した、慢性白血病の治療薬グリベック®です。慢性白血病では、白血球において、ATPのリン酸基が特定のチロシン残基をリン酸化することによって基質の活性化がおこなわれます。このシグナルが下流に伝達されていくことによって、白血球の白血病化が起ります。

グリベック®は、チロシンキナーゼのATP結合部位に構造特異的に設計されており、選択的に白血球発症にかかわるチロシンキナーゼに結合します。これによってATPが結合による基質のリン酸化が起らなくなり、白血球の白血病化が阻止されることになります。このような構造特異的にデザインされた薬剤は標的蛋白に特異的に結合しますので、副作用が少なく、効率のよい治療効果をもつことが知られています。

2) 薬剤設計の基盤となる分子構造イメージング

盛 岡 われわれは、基本疾患関連の標的となる蛋白の構造をまず解析し、その活性中心の構造に適合する薬剤を設計するという事を通じて、分子標的治療薬の開発に資するようになりたいと考えています。その1例として、心筋の収縮の調節をしているトロポニンの構造と、その構造から導かれる創薬の可能性について説明します。

本誌特集の私の稿にある図 (p.18 図⑥) は、われわれの分担研究者である武田壮一研究員が3年ほど前に“Nature”誌に発表したトロポニンのコアドメインの構造です。トロポニンは3つのドメインからなっています。図の赤い部分が収縮全体を調節しているトロポニンCと呼ばれる部分、黄色い部分がトロポミオシンに結合するトロポニンT、そして青い部分がトロポミオシンをアクチンフィラメントに結び付けているトロポニンIというドメインです。

この図は、カルシウム (Ca²⁺) が結合していわゆる興奮状態にあるトロポニンのコアドメインの構造です。ト



もり ひでぞう

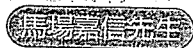
国立循環器病センター研究所心臓生理部長/厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクト ナノイメージング主任研究者

もり・ひでぞう
慶應義塾大学医学部卒業、慶應義塾大学大学院医学研究科修了。
慶應義塾大学医学部・助手、国立埼玉病院循環器科医長、東海大学医学部講師・助教授を経て、国立循環器病センター研究所心臓生理部長 (2000年10月)、大阪大学大学院医学系研究科招聘教授、東海大学医学部非常勤教授を兼務 (2004年4月)。
研究テーマ：微小循環、再生医療、ナノメディシン。

ロポニンIの一部がトロポニンCに結合しています。この状態では、このトロポニンIのアクチンフィラメントに対する抑制作用がとれていますので、アクチンフィラメントとミオシンの滑り運動が始まっている状態の構造を示しています。Ca²⁺センシタイザー (calcium sensitizer) と呼ばれているいくつかの薬剤が知られています。これらの薬剤がトロポニンに結合すると、心筋ファイバーのCa²⁺—張力関係が左側にシフトします。すなわち、Ca²⁺感受性の亢進が起こることが知られています。

この複合体の構造を詳細にみてみます。トロポニンCにCa²⁺センシタイザーが結合するとトロポニンCが開いた構造をとり、トロポニンIが結合しやすくなります。すなわち、トロポニンIによるアクチンフィラメントの滑り運動の抑制機構が外れやすくなるということになります。

このようなメカニズムでCa²⁺感受性の亢進が起こるわけですが、このように原子レベルでの複合体の構造がわかってくると、Ca²⁺センシタイザーがトロポニンCのどのアミノ酸残基と相互作用を起こしているのかを調べることもできます。従来のCa²⁺センシタイザーの問題点は、トロポニンCに選択的に結合するだけではないということです。フォスフォジエステラーゼやカルモジュリンなど、ほかの蛋白ともこれらの薬剤が結合してしまうということでした。これは、見方を変えれば、作用が特異化されていない、すなわち副作用を起こしやすいという原因になっているわけです。蛋白構造に基づいて薬剤設計をすれば、トロポニンCだけに選択的に結合する薬剤の設計ができる可能性があります。すなわち、低Ca²⁺



名古屋大学大学院工学研究科化学・生物工学専攻応用化学分野/厚生労働省指定型ナノメディシン・プロジェクト 基礎データベース作成研究協力者

ばば・よしのぶ
1958年、熊本県生まれ。
1977年、熊本県立人吉高等学校卒業。
1981年、九州大学理学部化学科卒業。
1986年、九州大学大学院理学研究科化学専攻博士課程修了。
日本学術振興会特別研究員。
大分大学教育学部助手。
1988年、大分大学教育学部講師。
1990年、神戸女子薬科大学薬学部講師。

1996年、神戸薬科大学薬学部助教授。
1997年、徳島大学薬学部教授。
2002年、産業技術総合研究所単一分子生体ナノ計測研究ラボ長併任。
2004年、名古屋大学大学院工学研究科教授。
2005年、産業技術総合研究所健康工学研究センター副センター長(バイオナノ研究統括)併任。
現在に至る。
専門：応用計測化学，マイクロ・ナノ科学。
研究テーマ：次世代バイオナノデバイスの創成，テーラーメイド医療，1分子・1細胞操作。
ナノバイオテクノロジーが医学に貢献できるような研究分野に育っていくことを夢見ています。
研究室 HP : <http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/index.html>

で収縮を高めることができる理想的なCa²⁺センシタイザーの設計に道を開く可能性があると考えています。

トロポニンの構造解析は肥大型心筋症 (HCM)，拡張型心筋症 (DCM) といわれる難治性の心筋の治療法開発につながる可能性があります。これらの疾患は患者さんをしばしば心臓移植に追い込むことで知られています。HCM では、トロポニンに遺伝子異常が高頻度に認められるということも知られています。HCM の変異トロポニン蛋白をつくり、それを導入したスキンドファイバーでCa²⁺—張力関係を調べてみますと、Ca²⁺感受性の亢進、すなわち、Ca²⁺—張力関係の左方へのシフトが生じます。一方、収縮力の低下で知られるDCMのミュータントを導入しますと、右方シフト、すなわちCa²⁺感受性の低下を起こす方向に、このCa²⁺—張力関係が移動します。

これらのCa²⁺感受性の異常が心筋症の発症と密接にかかわっているものだとすると、これらの変異蛋白の構造を補正するような薬剤、変異蛋白に特異的な薬剤を設計すれば、HCMにおける異常な心筋肥大を正常の心筋の状態に戻すという夢のような治療の開発も夢ではない

のではないかと考えています。

次の例として、細胞膜にあり、ナトリウムイオンと水素イオンを交換しているイオン交換輸送体の制御因子の構造解析の結果について説明します。ソディウム・プロトン・エキスチェンジャー (sodium-proton exchanger/sodium-hydrogen exchanger : NHE) は細胞膜にあり、細胞中の水素イオンをくみ出すことにより、細胞内のイオン環境をアルカリ性に傾いた方向に保つ役割があります。NHE がはたらくためには、その細胞内ドメインにカルシニューリン B ホモログス・プロテイン (calcineurin B homologous protein : CHP) が結合する必要があります。この物質が結合して初めて、このナトリウムとプロトンの交換機序がはたらきはじめるのです。

このCHPにはさまざまなアイソフォームが知られています。CHP1はさまざまな組織に存在しています。一方、CHP2は癌細胞に特異的に発現します。細胞内のイオン環境がアルカリ性に保たれると細胞増殖が誘導されます。ですから、このCHP2に特異的に結合するような薬剤を開発し、このNHEのはたらきを制御することで、癌の増殖を抑制できる可能性があると考えています。

本誌特集の私の稿にある図 (p.16 図④ BC) は、われわれが構造解析したCHP2とNHEの細胞内ドメインの複合体の細胞とX線回折像です。NHEの細胞質ドメインの一部がCHP2にはまり込む構造を確認しました。この構造に特異的に結合する薬剤を開発することができれば、CHP2がNHEと結合できなくなることを通じて、NHEのイオン交換作用を癌細胞で特異的に制御することができます。すなわち、その癌細胞の増殖を抑える可能性がみえてくるわけです。

次に、ADAMファミリー蛋白と非常に相同性をもった蛇毒の構造解析の結果を紹介します。これらの構造解析から、血管内皮のアポトーシスのメカニズム、あるいは血栓形成のメカニズムについて大きな進展が得られる可能性があります。また、このほかにも6本のαヘリックスから構成されるBAR (Bin-Amphiphysin-Rvsp) ドメインという構造をもった蛋白質群を3つの構造を解析しています。

3) 分子機能イメージング

盛 分子機能イメージングの紹介に移ります。サイクリック AMP を介して血管内皮細胞の細胞間接着が増強されるメカニズムとして、従来はプロテインキナーゼ A を介した機構が知られているだけでした。国立循環器病センター研究所循環器形態部の望月直樹先生のグループは、FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) と呼ばれる、細胞内の分子を可視化する方法を用いてサイクリック AMP を介した新たな細胞間接着の増強メカニズムを示しました。

FRET 現象が陽性の部分、Rap1 と分子の活性化を可視化することに成功しました。細胞の接着部位で選択的に Rap1 が活性化されていることが、この FRET イメージングでわかりました。つまり、従来のプロテインキナーゼ A を介した経路のほかに、Rap1 を介して細胞間接着が増強されるというメカニズムを示すことができました。

これらの機能イメージングの総括から、Rap1 を標的とした細胞間接着の増強作用をめざした治療、たとえば、肺水腫に対する血管透過性の治療などを制御するような治療法が生まれてくる可能性があります。

生体分子イメージングにつきましては、PET (positron emission tomography) を用いて、開発された薬剤の動態を大動物で調べる、あるいは大動物レベルでその分子メカニズムを可視化するということによって、いわゆる前臨床研究の面で創薬に役立つイメージング研究ができるのではないかと考えています。

このように、分子機能イメージング、構造イメージング、生体分子イメージングの3つをあわせて推進することによって、分子標的治療、テーラーメイド医療の基盤創製に資するものと考えます。

菅 ありがとうございます。何か、ご質問などありますでしょうか。

馬場 最初の構造イメージングのところですが、あれはやはりシンクロトロン放射光のような光でなければできないのでしょうか。

盛 蛋白質の結晶をつくり、シンクロトロン放射光を用いた X 線回折法によって構造解析をするというのが主流だと思います。

最近では、核磁気共鳴法を用いた構造解析法も可能になってきました。この方法の場合には、分子量が2万ですとか2万5千ぐらいのものが上限になります。大きな蛋白質の構造解析や、あるいは複合体の構造解析などでは、核磁気共鳴法は放射光を使った結晶構造解析法にまだ一歩劣るところがあるのではないかと考えています。

杉町 やはり複合体の結晶をみるというのが、かなり大事なのですね。

盛 創薬をするうえで、複合体の結晶をみるのが大事です。一部の蛋白質は非常に硬い構造をしていますので、複合体をつくってもつくらなくてもあまり形が変わらないというものがあります。ところが、先ほど紹介したような、Ca²⁺センシタイザーが結合するカルモジュリンなどの蛋白質は非常に柔らかい構造をしています。リガンドに対して自分自身の形を変えるという特性をもっています。このようなことを考えますと、やはり複合体の構造解析はどうしても必要になると思います。

菅 これは国際的な競争力という観点では、わが国は今どのくらいの位置にいるのでしょうか。

盛 米国では「蛋白 5000」、わが国では「蛋白 3000」という、網羅的に蛋白質の構造を解析しようというプロジェクトが動いています。これらは医療応用に特化していません。ヒト以外の蛋白質や疾患に関連していない蛋白質も対象となります。われわれのプロジェクトは、医療機関のなかで疾患に関連した蛋白質を標的にして構造解析を試みています。このような研究活動は国内にはほとんどないでしょうし、海外でもそれほどの数があるとは思えません。医療に特化した構造解析、構造に基づく創薬という意味では、まだ十分闘う条件が残っているのではないかと思います。

菅 ありがとうございます。

■ ナノデバイス (バイオニック) の目的, 進捗状況, 具体的成果

菅 には、次は「ナノデバイス (バイオニック) の目的, 目標, 進捗状況, 具体的成果の説明」を杉町先生、ご解説いただけますでしょうか。



杉町 勝

国立循環器病センター研究所先進
医工学センター循環動態機能部
長/厚生労働省指定型ナノメデ
ィン・プロジェクト ナノデバイス
主任研究者

すぎまち・まさる
1959年、佐賀市生まれ。
1984年、九州大学医学部卒業。
1992年～、国立循環器病センター
研究所・血行動態研究室長。
2004年～、同循環動態機能部長。
現在に至る。
専門：循環器内科、生体医用工学。
研究テーマ：循環バイオニック医
学。

1) ナノデバイス治療の必要性

杉町 図実(杉町)は治療に使うようなデバイスというのは、形としてはナノにはなりようがありません。ですから、そのなかに使われている技術としてナノテクノロジーを使っていこうということがナノデバイスの1つの方向性です。

ナノを推し進めるにあたって、厚生労働省として何を目標に進めていくかは、やはり医療に結び付いていくものだろうと思います。そういった意味で、われわれは、最終的には疾患の治療に使える、できる限り小さなデバイスをつくることだと思います。そして、そのなかにナノテクノロジーで開発した技術を入れていくことをめざしています。

なぜデバイス治療が必要かといいますと、重症慢性疾患の治療には、薬に加えて、治療機器を植え込んで長期間持続的な治療をおこなうことが必要になるであろうということが、1つのポイントです。

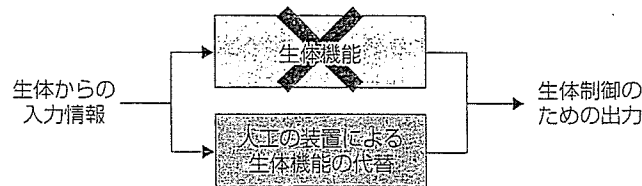
2番目は、このような植え込み機器はできるだけナノデバイス化したほうが侵襲が少なくなるわけですが、その実現に必要な技術として、できる限り小さい回路で通信を効率的におこなうということ、また生体燃料電池などを用いた電源の小型化の問題があります。そして、わが国が得意とする半導体技術の応用として、回路のできる限りの微小化、省電力化もポイントとなってきます。さらにそれらに加えてどんな治療をおこなうかということもポイントになってきます。これは、植え込み治療機器を植え込んでしまうと勝手に作動するわけだから、ある程度、自動的あるいは自律的な治療の論理が必要であるということです。

2) バイオニック治療論理

杉町 図実(杉町)は、この自律治療ということの論理をわれわれは以前から開発しており、「バイオニック治療論理」と名づけています。たとえば、起立性低血圧がひどい方で、起きるだけで血圧が下がってしまうという方の血圧安定化、あるいは慢性心不全の調節異常というものを是正する、などの治療ができるようになります。

現在は、ペースメーカーのようなかたちで心臓から

喪失した生体機能の代替



異常化した生体機能の是正

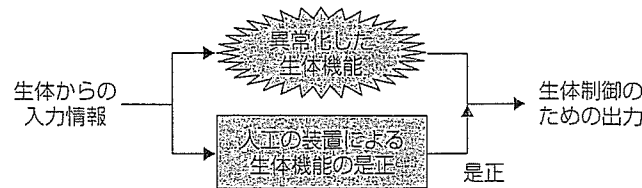
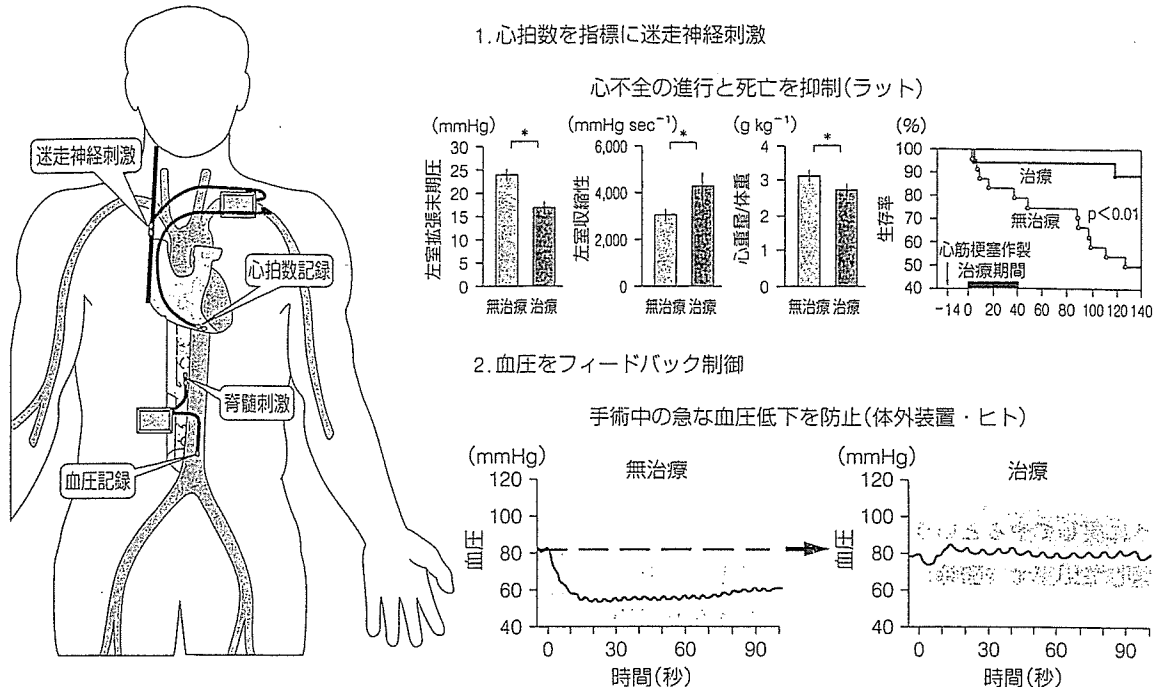


図22 バイオニック医学
(杉町勝先生よりご供与)



図② ナノ化すべきデバイス；循環治療バイオニックデバイス (杉町勝先生よりご供与)

データを取り神経を刺激する、あるいは血圧を測定して脊髄を刺激するといったものをつくっている段階です。まず、迷走神経を刺激することによって慢性心不全の調節異常を改善するという方法では生存率の飛躍的な改善がみられておりますし、また、血圧を感知して脊髄を刺激するという方法では、たとえばヒトでも、手術中に血圧をピタリと安定させるということができています(図②)。

3) ナノデバイスの開発状況

杉町 図これらに必要な技術として、われわれは東北大学大学院工学研究科の西澤松彦先生と共同で生体燃料電池を開発しておりますが、燃料電池でも、生体の材料だけを使うということをめざしています。そうしますと、基本的には酵素ですので、体温で動きます。これは容易に想像できることですが、グルコースを酸化して電力を得るということなのです。

ある程度の電力の確保の見通しが立ってきたので、現在、さらに改良を進めているのですが、問題は起電力がやや低いということ、また、やはり電極が小さいので、

非常に内部抵抗が大きく、電流が取れないということです。当然、酵素の安定性などということも問題になってきます。ところが、こういったものは通常の電池の溶液を入れる部分がなくて良いので、実際のところ、非常に小型化はできるはずだと考えています。

次に、通信に関しましては、最近、携帯電話などで使われている周波数拡散通信というものをもっと高度にしたUWB(Ultra Wide Band)通信を今後使う予定にしています。これを使いますと、電力が少なくすみ、隣りに同じような通信があっても干渉せず、そして情報がたくさん伝えられる、という3つの特徴があります。

生体内では電波を容易に吸収するという問題、あるいは、生体内のいろいろな境界領域で反射が起こるという問題がありましたが、検討した結果、5cm程の距離であれば通信できますので、たとえば心臓と神経の間といったように、ある程度の距離の通信は可能であろうという見通しが立っています。

また、回路自体をどのようにして小さくしていくかですが、先ほどの電池の技術と通信の技術ができれば、ペースメーカーなども回路自体はある程度小さくできるとい

う見通しが立っています。カスタムメイドでなく既存のものでも約7mm角ぐらいにはできると考えています。最近はやりの心臓再同期療法もこれで可能となり、好きなところにペースメーカーを置き、ペーシングができるということが、できるようになるだろうと思います。

治療論理に関しては、先ほどいいましたが、生体自体も自分自身から情報を得て、それに応じて調節をしているわけですが、たとえば、起立性低血圧の場合には、生体機能がはたらかないという点を人工の装置で代わりにおこなう装置、逆に、慢性心不全のような場合には、生体機能はありますが異常になっているので、ある程度正常のほうに戻してやるということを自動的におこなう装置を開発しています(図③)。

植え込み治療機器はできる限りナノデバイス化し、治療につなげていくことが求められています。現在、さまざまな必要な基盤技術を開発中です。そして、肝心の治療の論理も同時に開発中であり、これらを合体させていこうと考えています。

菅 図ありがとうございます。ご質問はございますか。

盛 図植え込み型のナノデバイスを使った場合に、患者さん自身が制御装置をオンにする、オフにする、といったような操作をしなければいけない事態が生じるのではないのでしょうか。血管外の組織のどこかにあるデバイスを制御する方法として、次のような方法が思い浮かびます。舌下錠のようなものを飲む、粘膜から吸収されて血管の中に入って組織へたどり着き、血管外のデバイスに何らかの作用をするという方法です。このような制御手段として、ナノマテリアルが必要となってくるのではないのでしょうか。

そのような「制御」という局面でのナノマテリアルが、杉町先生のこのナノデバイスの治療システムにおいては今後、大事な役割をしていくと考えますが、いかがでしょうか。

杉町 図そうですね。ある意味、DDSとの融合という形になるのだらうと思います。指令をおこなうのに、現在、想定しているのは、確かに電波という物理的な方法だけですが、いろいろな方法がありうらと思います。たとえば、化学的な指令を与えるという方法もあるでしょうし、

あるいは、極端にいうと、遺伝子治療との組み合わせということになってくるのかもしれない。

盛 図電波は遠くから飛ばせるという利点がありますが、反対に、悪意の人からの電波が飛んできたり、誤った電波が飛んでくると誤作動するという危険性があるため、やはり最後のところで、患者さん自身が自分の体調をみながら、システムを操作する安全弁がいるのではないかと思います。そのため、やはりナノマテリアルやナノDDSと先生のこのプロジェクトの融合という側面を促進する必要が出てくるのではないかと思います。

杉町 図そうですね。大変貴重なご意見だと思います。

馬場 図この研究を進めるにあたって、1番のネックとなっているのはどんなことでしょうか。

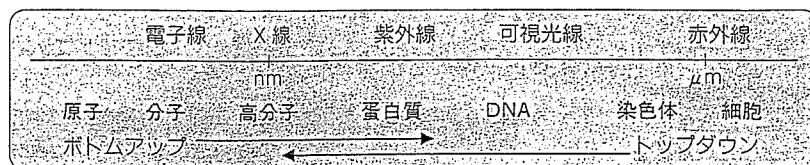
杉町 図1番ネックとなっていることの1つは、企業との連携だと思います。ナノメディシン・プロジェクトでも、課題の1つとして挙げていますが、今後、世界を舞台に開発をおこなっていくなかで、企業との連携は不可欠になると思います。企業の側にも、どのような利益があるのかということ積極的に啓蒙していくことが必要だと思います。

馬場 図3つ目のバイオニック治療論理は、私は部外者ですが、非常にわかりやすい論理だと思います。いかにナノテクノロジーをナノメディシン領域に使っていくかという意味では、非常にシンボリックな論理になるのではないかと思います。これは、血圧安定化以外のところでも、同様な論理がはたらくのではないかと思います。

■ 創薬関係などのナノメディシン国際情勢、シーズとニーズのマッチング

菅 図では、次は馬場先生に、外部からの研究協力者という立場として、また創薬関係など国際情勢にも非常に詳しいので、そのあたりを踏まえて、シーズ・ニーズ・マッチングを含めてお話しただけですでしょうか。

馬場 図ナノテクノロジーの研究はここ数年間でかなり進展しています。この図④はもう先生方には釈迦に説法で恐縮ですが、最近はこのナノサイズの領域のなかでも、図に挙げておりますように、いくつかのかなり特徴的な現象が発見され、かつ、それを理論的にも説明できるよう



- 100~800 nm 溶液物理化学で説明できない現象
- 200~500 nm 可視光の波長の2分の1~4分の1, フォトニック結晶
- 1~100 nm 分子集合体・生体分子, パリティの非保存
- 1~10 nm 電子波と同程度か小さい構造, 量子ドット

量子ビーム, 量子もつれ, 量子テレポーテーション

図④ ナノテクノロジーの今後の方向
(馬場嘉信先生よりご供与)

になってきております。さらには、ナノメディシンのような領域に展開可能だとする論文が、ここ1~2年の間に“Nature”誌, “Science”誌等のかなり重要なジャーナルに発表されています。このあたりのことについて、まず少し簡単にご説明いたします。

まず、ナノデバイスのような非常に小さい空間をつくる場合、これまでのナノテクノロジーでは、半導体で構造をつくり、その中を、半導体ですから電子を動かすわけです。しかし、これを医療、ナノメディシンの分野で使おうとしますと、当然、ヒトの生体の中は全部、溶液の反応で進んでいますので、溶液を入れることになるわけです。1 μm 以上の構造中の溶液反応は、19~20世紀初頭に確立された物理化学でかなり説明できるのですが、800 nm 以下になってまいりますと、通常、19世紀に確立された、われわれが大学で最初のうちに習うような物理化学で説明できない現象がかなり出てきます。

通常は、800 nm というのは、溶液の主要な成分である水に対してはきわめて大きい構造ですので、当初はこのサイズでそのような現象は起きないだろうと考えていたのですが、われわれも含めていくつかの実験データで、800 nm を切ってくると、今までの物理化学ではどうも説明できない現象が現れています。もしうまくこのことが説明できるようになりますと、細胞の中や、さらには核の中で起こっている現象をより正確に知るというような、そういう技術につながるのではないかと考えています。

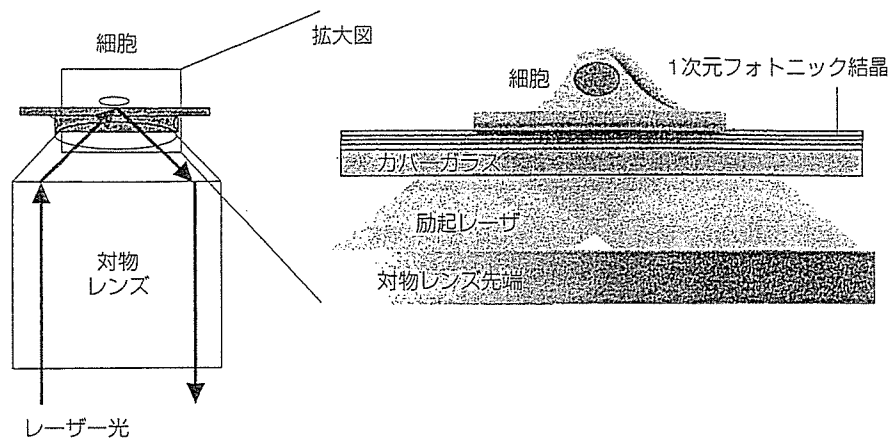
つい最近も、ハーバード大学のグループが、単一細胞

の中の蛋白質の発現状況で、これまでの方法では調べられなかったこと調べることに成功したという論文を“Nature”誌¹⁾で発表しているなど、かなり大きな展開をみせています。

そして、もう少し小さな200~500 nmのサイズは、先ほどの盛先生のイメージングでも使われているような可視光程度、ヒトの目にみえる光の波長の大体2分の1から4分の1程度のサイズです。実は、このぐらいの構造では光そのものを自由に操ることができます。

図⑤はフォトニック結晶という材料ですが、たとえば、一番簡単なフォトニック結晶は、屈折率の違う材料を光の波長の半分ぐらいの厚みで積層し、その積層した先に、ある光が届かないギャップをつくります。ギャップによって光の強度は最大100倍ぐらいに上がります。これはまだナノメディシンの分野に使われていませんが、実は、この研究は日本は非常に盛んで、“Nature”誌²⁾、“Science”誌³⁾にてよく発表されている領域です。今後、非常に大事になってくると思います。

光ファイバーが一番わかりやすい例なのですが、もともとは光通信に光を自由に曲げたり反射させたりということは今まで難しかったのですが、光ファイバーでかなりできるようになりました。さらにこのフォトニック結晶で光の波長の2分の1程度の小さい構造をつくりますと、光子1個を操作したり、光を90°に曲げるなど、いろいろな角度で曲げたり、それから、光をうまく制御するということに使えるようになります。ここ数年で、この分野もかなり進歩してきており、近い将来ナノメ



図④ 1次元フォトニック結晶—エバネセント光顕微鏡の原理
(馬場嘉信先生よりご供与)

ディシンの分野でも利用されることになると思います。

さらに小さいものでは、蛋白質やDNA、分子集合体、生体分子など1~100 nmのサイズになります。

これに関連して、図④にあるパリティの非保存を説明しますと、まず、パリティの保存とは、左右対称のことで、たとえば、蛋白質やDNAでアミノ酸を合成したときに、D体とL体が1対1でできることです。このことは、1950年頃までは「常識」でしたが、実は、1950年代の末に「パリティの非保存」が実証されました(1957年ノーベル物理学賞)。原子あるいは素粒子のレベルでは、現代ではその素粒子の「パリティの非保存」が物理学者の常識となっていますが、最近、分子のレベルでも同じらしいということがわかってきました。

パリティの非保存とは、要するに、アミノ酸を合成したときに、D体とL体が通常1対1でできるものが、その比が崩れるという状態です。どちらかが多くできるということになるのですが、そのエネルギー差はきわめて小さく、実際、現在のわれわれの技術ではほとんど検出できません。

パリティの非保存は、理論的にはこの数年間でかなり実証されてきているようですが、まだ実験が非常に困難です。ただ、分子集合体や生体分子といったものを使うと、実験ができそうだということが最近わかりつつあります。今後、薬の合成などに使える技術になるかもしれません。

さらに小さくなってくると、1~10 nmサイズの量子

ドットになります。電子そのものが波の性質をもっていますが、それと同程度か小さい構造です。当初は、量子ドットの材料は、半導体用に考えられていました。そういう意味では、ナノメディシンへの応用はあまり考えられておらず、カドミウムのようなかなり毒性の強いものが大半でした。近年、この量子ドットの理論的なことが少しわかってまいりまして、毒性のない材料でもちゃんと光るという結果が出てきました。それも、とくに1~10 nmの領域での理論的な研究が出てきており、かなり進展しつつあると思います。

先ほど、盛先生のところでもFRETの話が出てまいりましたが、最近、量子ドットの領域ではやはりBRETというもので、これは「バイオルミネッセンス・リゾナンス・エナジー・トランスファー (bioluminescence resonance energy transfer)」の略なのですが、量子ドットにバイオ発光するような酵素をつけてやりますと、量子ドットは、普通、例えば紫外線を当てると光ることなのですが、そうではなくて、そのバイオルミネッセンスを起こす物質が細胞の中にあると、それが反応して発光して、その光で量子ドットが光ります。外から光を当てなくていいのです。

しかも、その光を赤外線領域、あるいは近赤外線領域にしてやりますと、皮膚のかなり下のほうの細胞でも一かなりといいましても、真ん中は見えないと思うのですが、表面ではなくても、ある程度、中のところでも光が透過して見えるというようなものも、これもつい最近、