

2Pb176

HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの軟組織再生能の評価

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

<緒言>

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

<実験>

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

<結果・考察>

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

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

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

a: Determined by ¹H-NMR.

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

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

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

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

Yusuke NAKAMURA^{1,2}, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA²(¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan ²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute)¹Tel: +81-75-724-7823, Fax: +81-75-724-7800, E-mail: seiyo@kit.ac.jp

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

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

1Pf174

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

<緒言>

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

<実験>

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

<結果・考察>

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

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

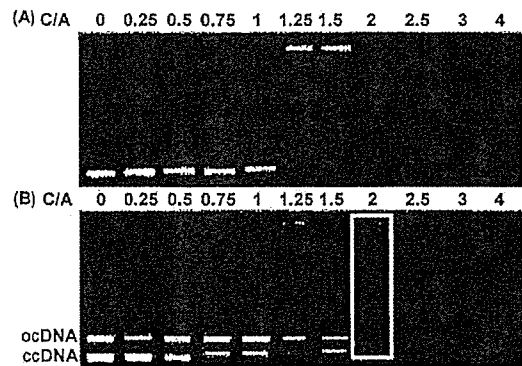


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of polyplexes formed between PLys⁺-b-PLA-[9, 21] biodegradable cationic micelles and plasmid DNA after (A) 0 day, and (B) 5 day.

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

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

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

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

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

2Pe167

光切断性保護基をグアニン塩基部位に持つ アンチセンス核酸の合成とその二重鎖形成能の光誘導

¹京工繊大繊維・²帝京科学大理工・³国立循環器病セ 生体工
○岩瀬 礼子²・福井 宇内¹・小堀 哲生¹・山岡 哲二³・村上 章¹

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

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

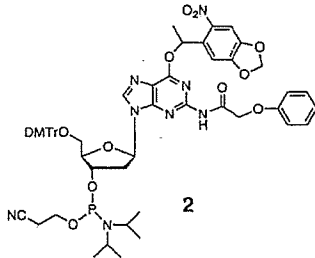
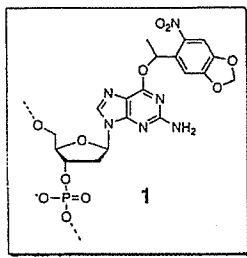
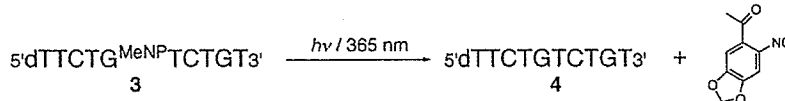


Table 1. Values of T_m for MeNP-ODN with the complementary RNA

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

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



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

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

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

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

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

2Pe197

細胞機能解析チップの開発 (II)
微小空間における細胞の刺激応答解析島津製作所基盤研 ○務中達也・叶井正樹・阿部浩久・中西博昭、早大理工 庄子習一、
国立循環器生体工 山岡哲二、京工繊大織 坂本隆・小堀哲生・村上章

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

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

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

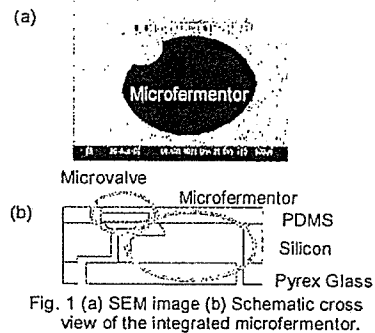


Fig. 1 (a) SEM image (b) Schematic cross view of the integrated microfermentor.

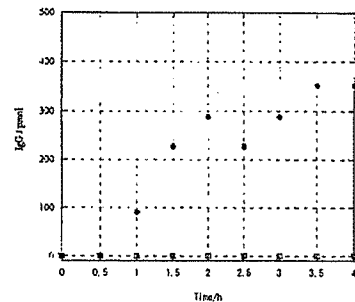


Fig. 2 Antibody production of the hybridoma cells.

Development of the cell analysis chip (II)

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

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

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

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

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

2Pf168

新規光架橋型アンチセンス核酸の開発(II)

糖環 2'位ソラレン修飾型アンチセンス核酸の合成とその機能

○ 樋口 麻衣子¹、小堀 哲生¹、岩瀬 礼子²、山岡 哲二³、村上 章¹

¹京都工芸繊維大・繊維、²帝京科学大・理工、³循環器病セ研

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

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

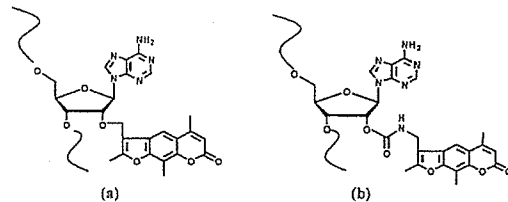


Figure. Structure of (a) 2'-Ps-met (b) 2'-Ps-amd

- 1) Murakami, A., Yamayoshi, J., Iwase, R., Yamaoka, T. and Wake, N. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13(2001) 25-34.
- 2) Salet, C., Bensasson, R. *Biochem. Biophys. Acta.*,(1980) 379-383.

Development of new photo-sensitive antisense oligonucleotides(II)

Synthesis and properties of 2'-psoralen-conjugated oligonucleotides

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

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

¹TEL&FAX : +81-75-724-7849, E-mail : akiram@kit.ac.jp(A.Murakami)

Keyword: Antisense oligonucleotide /Inhibition of gene expression / Psoralen / Photo-crosslink / Point mutation

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

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

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

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

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

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

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

Date: Thursday, June 02, 2005

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

Presentation Time: 04:00 PM

Room: Exhibit Hall 2

Close Window

2C06

幹細胞特異的スキャホールドの評価

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

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

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

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

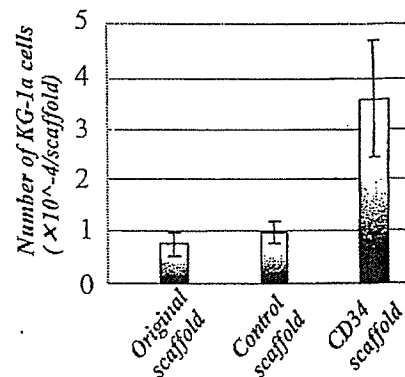


Fig.1 Number of KG-1a cells adhered on the original, control scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, and capped with 2-aminoethanol), and CD34 scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, reacted with anti-CD34 mouse IgG antibody, and capped with 2-aminoethanol). 2×10^6 KG-1a cells were seeded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

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

E-6

ポリ乳酸スキャホールドの表面修飾による細胞接着性亢進

京工繊大繊維¹・国立循環器病センター研究所²

○内田 翔^{1,2}・北川達哉^{1,2}・小堀哲生¹・村上 章¹・山岡哲二²

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

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

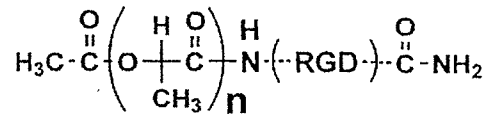


Fig.1 Chemical structure of acOLLA-co-RGD oligo peptide block copolymer.

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

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

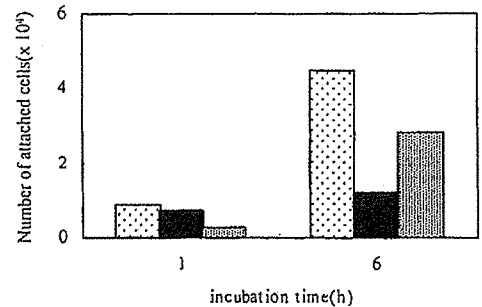


Fig 2. Attachment of NIH/3T3 cells on PS dish(□), PLLA original film(■), and RGD modified film(▨). Cells were seeded at 6×10^4 cells/cm², and cultured for 1 and 6h at 37°C.

E-8

糖環 2'位に光架橋性基を持つアンチセンス核酸による RNA 結合能の評価

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

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

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

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

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

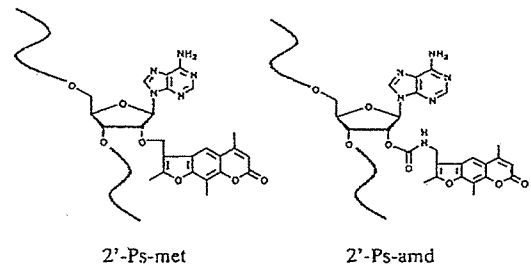


Figure. Structure of 2'-Ps-oligo

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

E-10

ガラクトース修飾ポリマーの構造最適化による
導入遺伝子発現効率の向上

京工織大繊維¹・国立循環器病センター研究所²

○近藤 千晶^{1,2}, 北川 達哉^{1,2}, 橋本 朋子^{1,2}, 小堀 哲生¹, 村上 章¹,
山岡 哲二²

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

【実験方法】 ガラクトース残基を側鎖に有する重合性モノマーの 6-O-vinyladipoyl- α -methyl-D-galactoside を酵素触媒 (ALP (alkaline protease)や Biopraser 等) によって合成し、カラムにより精製した。得られた重合性ガラクトースエステルと、カチオン性モノマー(DMAEMA; 2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)、あるいは、DMAPAA; (N-[3-(dimethylamino)propyl]acrylamide)) とを DMSO 中で、AIBN を開始剤として、65°C、4 時間ラジカル共重合させ、組成の異なる poly(Gal-co-DMAEMA)と poly(Gal-co-DMAPAA)を合成した。それぞれ Gal_xD_y および Gal_xD'_y(x,y はガラクトースモノマーユニット、およびカチオンユニットの mol%)と示す。ホタルのルシフェラーゼ遺伝子をコードした pCMV-Luc プラスミド DNA との複合体を、アジアログリコプロテインレセプターもつ HepG2 細胞にクロロキン処理法により導入して、ルシフェラーゼ発現量および細胞毒性を定量した。

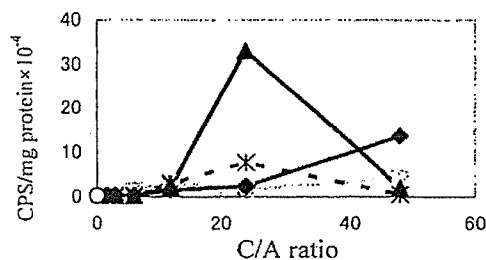


Fig 1. Transfection efficiency of (■)Gal31D69, (◆)Gal75D25, (▲)Gal18D82, (*)Gal14D86, and (○)naked DNA against HepG2 cells.

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

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

両親媒性ペプチド系キャリアーの遺伝子導入効率に関する考察

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

【緒言】 近年、高発現を示すウイルス法に対する安全面での懸念が大きくなり、より安全性の高い非ウイルス法への期待が高まってきている。しかし、発現効率が低い非ウイルス法においては、高発現効率を達成する必要がある。人工キャリアーにはポリマーや脂質、合成ポリペプチド、あるいは、それらを化学修飾したものが考案されている。一般的に、DNAと静電的相互作用する塩基性部位と機能を担う部位から構成され、特に、ペプチド性キャリアーは、そのアミノ酸配列を変えることにより諸物性を制御できる利点がある。当研究室では、DNAとコンプレックスを形成するためのカチオン性基の他に疎水基をもつキャリアーが高発現を示すことを報告してきた。本研究では、Arg₄、Arg₈およびArg₁₂に、疎水基としてステアリン酸(4s, 8s, 12s)、あるいはオリゴ-L-乳酸(4o, 8o, 12o)を導入した両親媒性化合物を評価した。

【実験】 Fmoc 固相合成法により塩基性ペプチドである Arg₄、Arg₈および Arg₁₂ を合成し、続いて、ステアリン酸あるいはオリゴ-L-乳酸 (OLLA) を導入して、両親媒性化合物を得た。その組成は元素分析によって確認した。各サンプルの D-MEM 溶液を C/A=1, 2, 4, 8, 16, 32 となるように段階希釈し、100ng/5μl の p-CMV-ZLuc 溶液 35μl と混合し、37°C、30min インキュベートした (最終 DNA 濃度: 100ng/10μl)。このポリプレックス溶液 10μl を 40μl の D-MEM とともに 96 穴プレートに播種した 1×10⁴ の COS1 細胞に添加した。続いて 20%クロロキン溶液を 50μl 加え、37°C で 5h インキュベートし、さらに 40h インキュベートした。細胞溶解液を 50μl 加え、プレートシールをして 37°C、30min インキュベートし、20μl を用いて ARVO 社 96 穴プレートリーダーにて発光測定した。

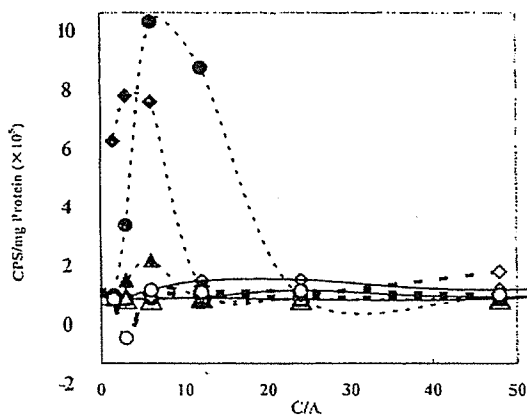


Fig. 1. Transfection efficiency of (▲)4s, (◆)8s, (●)12s, (△)4o, (◇)8o, (○)12o, (※)Arg₄, (♠)Arg₈, (⊕)Arg₁₂, and (■)naked DNA in COS-1 cells. Reporter gene expression is given as CPS per milligram protein.

C/A is the ratio of cation(of carrieres) to anion(of DNA).

【結果と考察】図1にポリプレックスの電荷比がルシフェラーゼ発現に与える影響を示した。ステアリン酸の導入により顕著に発現が向上し、またペプチド鎖長が長いほど高い発現が認められた。これらのステアリル化オリゴペプチドは、水中にてミセルを形成していることが確認され、分子間自己組織化によりカチオン基が集積したことが発現効率の向上につながったと考えられる。一方、オリゴ-L-乳酸導入サンプルでは、その加水分解性のために発現効率の向上が得られなかった。さらに、高分子量ポリアルギニンを用いた結果とも併せて、自己組織化と発現効率の関係について考察する。

P b-25

シチジンの2'位にピレンを持つ蛍光核酸プローブによる
RNAの検出京工繊大繊維¹ 国立循環器病センター研究所²村上 章¹, 〇繁澤 麻紗子¹, 坂本 隆¹, 小堀 哲生¹, 山岡 哲二²

【緒言】 近年、ゲノム解析によって明らかになった遺伝子情報の機能を解析する手法が重要性を増してきており、とりわけ、細胞内に存在する種々のRNAを検出する手法が求められている。我々はこれまでに、RNAと二重鎖形成することで蛍光スペクトルに変化を生じる蛍光標識核酸プローブの開発を行ってきた¹⁾。また、2'-ピレン修飾ウリジン (Upy)を2分子有する2'-O-メチルRNAオリゴマー (OMUpy2)は、RNAと二重鎖形成することにより480nm付近にブロードな蛍光発光を示すことを報告した²⁾。このピレン修飾核酸プローブに塩基配列の多様性を持たせ、その適用範囲を広げることを目的として、新たに2'-ピレン修飾シチジン (Cpy)を2分子有する2'-O-メチルRNAオリゴマー (OMCpy2)を合成した。本発表ではこのプローブの蛍光特性および、UpyとCpyを組み合わせた配列を持つプローブの蛍光特性について報告する。

【実験・結果】 2'-O-(1-pyrenylmethyl)cytidine (Cpy)のホスホロアミダイト誘導体を合成し³⁾、OMCpy2プローブ16量体(5'-CGCpyCpyUGCUUCACCACC-3')を固相ホスホロアミダイト法により得た。次に、OMCpy2に相補的なオリゴRNA (cORN)及び相補的なオリゴDNA (cODN)を添加した時の蛍光スペクトルを測定した。480nmでの相対蛍光強度は、OMCpy2が一本鎖の場合では2.2、cORNを添加した場合は55.9、cODNを添加した場合は5.1となり、OMCpy2はcORNと二重鎖を形成することで、480nmでの蛍光強度を大幅に増大させることが明らかになった。次いで、CpyとUpyが連続した配列を持つ2'-O-メチルRNAオリゴマー(OMCpyUpy)を合成し、cORN及びcODNを添加した時の蛍光スペクトルを測定した。その結果、OMCpyUpyはOMUpy2やOMCpy2と同様に、cORNと二重鎖を形成することで480nmでの蛍光強度を大幅に増大させることが明らかになり、RNA検出が可能であることが示唆された。

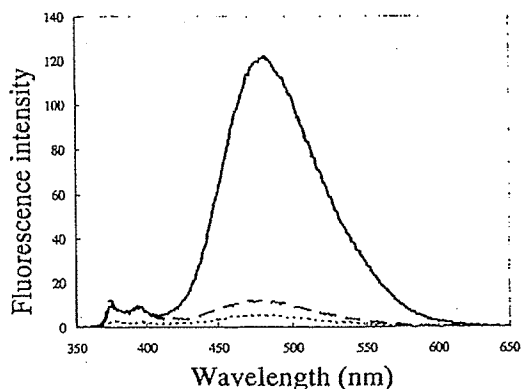


Fig.1 Fluorescence spectra of OMCpy2 (.....), equimolar mixture of OMCpy2 and cORN (—), and equimolar mixture of OMCpy2 and cODN (---).

[OMCpy2]=[cORN]=[cODN]=0.75 μ M
Buffer: 10mM phosphate buffer (pH7.0), 0.1M NaCl
Temperature: 11°C

- 1) Yamana, K., Iwase, R., Furutani, S., Tsuchida, H., Zako, H., Yamaoka, T., and Murakami, A. (1999) *Nucleic Acids Res.*, 27, 2387-2392.
- 2) Mahara, A., Iwase, R., Sakamoto, T., Yamana, K., Yamaoka, T., and Murakami, A. (2002) *Angew. Chem., Int. Ed.*, 19, 3648-3650.
- 3) Amitani, Y., Iwase, R., Mahara, A., Yamana, K., Yamaoka, T., and Murakami, A., *日本化学会第81回春季年会講演予稿集 II*, 2002, 931.

Pb-31

**ピレンを含む長寿命蛍光剤を用いた
生体高分子間相互作用検出法の開発**

京工織大繊維¹・国立循環器病センター²

坂本 隆¹, ○藤原 伸行¹, 小堀 哲生¹, 山岡 哲二², 村上 章¹

【緒言】近年のプロテオーム解析により、多くの疾患に関わるタンパク質・ペプチドが同定されてきている。疾患の機構の解明にはプロテオーム解析により同定されたタンパク質・ペプチドの相互作用を詳細に解析することが求められる。本研究では、リアルタイムに生体分子間相互作用を検出できる蛍光偏光解消法に着目し、この手法における問題点の解決を目的とした。蛍光偏光解消法では、用いる蛍光ラベル剤の蛍光寿命により検出可能な分子量域が制限される。従来の短寿命蛍光剤では低分子量 (<100kDa) の分子間相互作用しか検出できず、高分子量 (>100kDa) の生体高分子への応用には長寿命蛍光剤が必要となることが報告されている¹⁾。本研究では、長寿命蛍光剤として Pyrene に着目した。Pyrene 誘導体は比較的長い発光寿命 (τ :130nsec) を有するものの、共存する分子と非特異的に疎水性相互作用するため、蛍光ラベル剤としては不向きであると考えられる。そこで、Pyrene- β -cyclodextrin conjugate (Py- β -CD) に着目した²⁾。Py- β -CD 中の Pyrene は同一分子内の β -CD に包接されるため、共存する分子との非特異的な疎水性相互作用をしにくいと考えられる。このことから、Py- β -CD が新規長寿命蛍光ラベル剤として有用であると考えた。今回は、Py- β -CD の合成、Py- β -CD の蛍光特性の評価およびモデルタンパクへのラベルを試みた結果について報告する。

【実験】 Py- β -CD は、1-Pyrenebutyric anhydride を β -CD に反応させて合成し、逆相カラムクロマトグラフィーによる精製後、NMR および質量分析により同定した。また、Py- β -CD の蛍光スペクトル・定常光異方性・蛍光寿命測定の結果から、PBS 中での蛍光特性を評価した。Py- β -CD に HSA を加えたときの定常光異方性の変化から、Py- β -CD の非特異的な疎水性相互作用の有無について調べた。無水コハク酸を Py- β -CD に反応させてコハク酸リンカーを結合した後、粗生成物を NHS エステル活性化し、ヒト血清アルブミン (HSA) にラベルした。ゲルろ過による精製後、Pyrene と HSA の定量を、それぞれ、UV スペクトル法と BCA 法により行い、HSA に対する Pyrene の導入効率を評価した。

【結果と考察】 Py- β -CD の収率は 40% であった。蛍光寿命測定の結果、Py- β -CD の蛍光寿命は 130nsec であった。このことから、Py- β -CD は PBS 中でも長寿命を保ち、本研究において有用な長寿命蛍光ラベル剤であることが示唆された。また、定常光異方性測定の結果 (Table.1)、1-Pyrenebutyric acid に HSA を加えた場合には定常光異方性 (r) は大きく増加したが、Py- β -CD に HSA を加えた場合には r 値は変化しなかった。これは、HSA の添加により、1-Pyrenebutyric acid の運動性は減少したが、Py- β -CD の運動性には変化がなかった、つまり、1-Pyrenebutyric acid は HSA と非特異的に結合し、Py- β -CD は HSA と結合しなかった事を示している。この結果から Py- β -CD 中の Pyrene が β -CD に包接されることにより HSA との非特異的な結合が抑えられたものと考えられる。Py- β -CD 誘導体を HSA にラベルした結果、HSA 1 つに対して Pyrene を 6.8 個ラベルできたことが明らかとなり、Py- β -CD の蛍光ラベル剤としての有用性が示された。

発表では、Py- β -CD でラベルした HSA を用いた抗原抗体反応の検出についても報告する。

Table 1. Anisotropy of pyrene derivatives in the presence and absence of human serum albumin (HSA)

Sample	r
1-Pyrenebutyric acid	-0.001
1-Pyrenebutyric acid+HSA	0.012
Py- β -CD	-0.001
Py- β -CD+HSA	-0.001

[Pyrene derivative]=[HSA]=0.75 μ M
in 20mM PBS (pH7.3)

- 1) E. Terpetschnig, H. Szmecinski, and J. R. Lakowicz, *Anal. Biochem.*, 227, 140 (1995)
- 2) A. Ueno, I. Suzuki, and T. Osa, *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 6391 (1989)

14) ポリプレックス被転写効率を亢進する 遺伝子キャリアーの分子設計

(京工織大繊維、国立循環器病セ研) ○橋本朋子、小林由美子、近藤千晶

(京工織大繊維) 小堀哲生、村上 章

(京都府立医科大) 松田 修

(国立循環器病セ研) 山岡哲二

E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

TEL: 06-6833-5004(ext2637), FAX: 06-6835-5476

1. 諸言

カチオンポリマーを用いた遺伝子導入システムにおいて、ポリプレックスの細胞内挙動、あるいは、キャリアー分子の化学的や物理的要因と導入効率との相関性について多くの知見が報告されている。しかしながら、遺伝子導入の最終ステップである核内での被転写翻訳効率についての報告は、他のステップに比べて未だに少ない。

我々は、この被転写翻訳効率の向上が、総括的な効率である遺伝子発現の向上に直結すると考えて検討を進め、これまでに、ポリプレックスの絡み合いを緩和することで発現効率が向上することを報告してきた。例えば、核への移行性が高いにも拘らず発現効率が低いレセプター介在型の遺伝子キャリアーに、疎水性基を付与すると発現効率が向上する。この結果は、キャリアーが分子内ミセルを形成することによって、核内での被転写翻訳効率が向上するためであることが示唆された。本研究では、カチオン性オリゴペプチド末端に疎水性基を付与した両親媒性のキャリアーを設計し、その分子内ミセル形成の効果について検討した。さらに、カチオン性オリゴペプチド部位を様々なタンパク質の活性化に寄与する細胞内酵素である furin によって分解されてフラグメント化する配列とすることで生理活性的要素により被転写翻訳効率が向上する新規遺伝子導入システムの構築を図った。これらの要因が、細胞内でのポリプレックスの不安定化と被転写翻訳効率の向上との相関性に及ぼす影響について検討した。

2. 実験

Fmoc 固相合成法にて furin の切断部位を有するオリゴペプチド(Fur ペプチド)として Fur-1: $H_2N-(RKKR)_4C-CONH_2$, Fur-3: $H_2N-(RKRRKR)_4C-CONH_2$ を、また、それぞれと同じアミノ酸組成でかつ認識配列を持たない Fur-2 と Fur-4 を、および Fur-5(Leu0): $H_2N-KRR(RKRRKR)_2C-CONH_2$ 、オリゴアルギニン (以下 Arg_n) を合成した。続いて N 末端側に疎水性基としてステアリン酸あるいはオリゴロイシン (以下 Leu_n) をコンジュゲートした。常法にて脱保護後、合成確認は ¹H-NMR 測定、元素分析、HPLC、および MalDI-ToF-Mass により行った。得られた両親媒性のキャリアーの水溶液中での臨界ミセル濃度 (CMC) をピレンプローブ法にて測定し、その構造を AFM にて観察した。無細胞系での転写翻訳効率はウサギ網状血球を利用して求め、また、pCMV-Luc を COS-1 細胞へクロロキン処理法にて導入し、48 時間後にルシフェラーゼ発光を測定して一過性の発現効率とした。

13) 新規アンチセンス核酸のデザインと遺伝子制御効果

○村上 章¹・樋口麻衣子¹・中澤智子¹・小堀哲生¹・山吉麻子²
加藤聖子³・和氣徳夫³・山岡哲二⁴

京都工繊大繊維¹・九州大学先端物質化学研究所²・九州大学生体防御医学研究所³
国立循環器病センター研究所⁴

Tel: 075-724-7814 Fax:075-724-7814 E-mail: akiram@kit.ac.jp

【緒言】 近年、RNA の機能の多様性が明らかになってきている。rRNA、mRNA、tRNA 等のような遺伝子発現の主役を担っている RNA に加え、snRNA、hnRNA、miRNA 等に代表される新たに見い出された RNA 群が遺伝子発現に大きく関与していることが報告されている。これらは siRNA (small interference RNA) と名付けられた small RNA が、配列特異的に RNA の分解を引き起こす RNAi (RNA 干渉) という分子機構とも密接に関係しており、それら RNA の機能解析は今後の生命科学の中心課題になると思われる。機能解析と並行して、それら RNA の制御も重要な課題となる。従来制御の対象となってきた RNA は主に mRNA であり、制御分子はアンチセンス核酸であり、リボザイムであった。現在は少しその影が薄れた感のあるこれらの手法であるが、RNA 選択的制御の手法は対象 RNA の切断によるのみではなく、一過的な制御やスプライシングのコントロールなど非破壊的な制御法も重要であることから、アンチセンス法はその重要性が今後も維持されるものと考えられる。一方、疾患関連遺伝子の発見や分子病態解明が進み、正常遺伝子の 1 塩基の変異(点突然変異)が重篤な疾患の原因となることがわかってきた。これら変異遺伝子の発現を特異的に制御できれば、副作用のない疾患の治療につながる。従来のアンチセンス核酸や siRNA では 1 塩基の変異を検出する能力が不十分であり、変異遺伝子だけでなく正常遺伝子をも制御してしまうことを防ぎ得ない。

本発表では高い配列選択性を持つアンチセンス核酸の開発を目的として行った種々のアンチセンス核酸デザイン法について報告する。

【実験】 (1) 新規アンチセンス核酸 (Fig.1) の合成: タイプ A 及びタイプ B については論文に従って合成した^{1) 2)}。タイプ C: 3',5'位をシリルエーテル基、N⁶位をベンゾイル基で保護したアデノシンの糖環 2'-位にメチレンリンカー及びアミドメチレンリンカーを介して 4,5',8-trimethylpsoralen を導入した後、2'位水酸基を、(a) NaH、(b) *N,N'*-カルボニルジイミダゾールでそれぞれ活性化し、4'-aminoethyl-4,5',8-trimethylpsoralen を導入した。これら 2 タイプの修飾アデノシンを固相合成法によりオリゴヌクレオチドに導入し、2'-Ps-oligo を得た (2'-Ps-met および 2'-Ps-amd)。(2) アンチセンス核酸の配列決定: 3通りの手法により配列決定を試みた。(a) RNA 高次構造予測プログラム (RNA-Structure Ver.3) ならびに独自に開発したループ領域検索プログラムから、結合可能部位を選択した。(b) 逆転写酵素法: 対象 RNA 溶液に RNA-Structure に基づいて選択したオリゴヌクレオチドを添加し、それらの逆転写酵素反応阻害効率の高い部位を予測した。(c) 蛍光法: 対象 RNA との結合により蛍光特性を変化させる蛍光核酸プローブを用い、RNA-Structure Ver.3 に基づいて選択したオリゴヌクレオチドの結合可能性を評価した。(3) 相補的な oligo-RNA との二重鎖安定性並びに構造は、UV 融解曲線、CD、蛍光分光法により解析した。さらに、2'-Ps-met および 2'-Ps-amd と match-RNA もしくは配列中に 1 塩基 mismatch を含む oligo-RNA (mismatch-RNA) との UVA (365nm) 照射による光架橋効率と配列選択性を、RPLC と変性 PAGE により評価した。(4) デザインしたアンチセンス核酸の遺伝子制御能は、無細胞タンパク質合成系並びに子宮頸がん細胞系を用いて評価した。

4) HAp 複合化吸収性ハイドロゲルによる軟組織再生

(京工繊大繊維、国立循環器病セ研) ○中村友亮、北川達哉
(京工繊大繊維) 小堀哲生、村上 章
(国立循環器病セ研) 山岡哲二

E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

TEL: 06-6833-5004(ext2637), FAX: 06-6835-5476

1、緒言

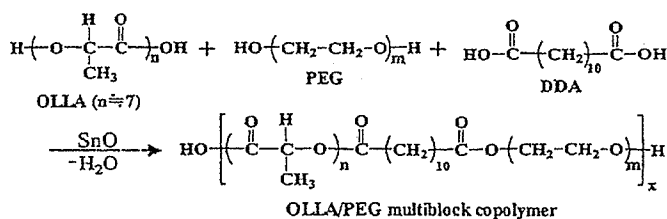
人工皮膚用材料として広く臨床応用されているコラーゲンやその複合体は、優れた組織親和性を有する反面、生体由来であるために抗原性等の問題が指摘されている。我々は、コラーゲンのような生体由来材料に代わり、安全性に優れた合成高分子材料による軟組織再生を検討してきた。現在までに、優れた骨再生スキャホールドであるポリ乳酸と、親水性ポリエーテルとのマルチブロック共重合化後、ハイドロキシアパタイト(HAp)と複合化することで、柔軟性を有する HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの作製に成功し、ラット皮下埋入実験より、優れた軟組織適合性を確認した。

従来の組織再生では、*in vitro* でターゲット組織の細胞を播種し、培養後に埋入し、*in vivo* 組織再生を誘導する手法が一般的であるが、細胞の入手法、*in vitro* での培養条件等に未だ課題がある。本研究では、*in vitro* のステップを省き、*in vivo* のみでの組織再生を目的とし、*in vivo* 軟組織再生の最重要課題であると考えられる、スキャホールド内への組織浸潤性の向上を検討してきた。本発表では、作製した HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの特性評価、特に、ポリエーテル組成と HAp 析出量が組織浸潤性、生体適合性に与える詳細な効果について報告する。

2、実験

・マルチブロック共重合体の合成と物性評価

Oligo L-lactic acid(OLLA)、polyethylene glycol(PEG)、および 1,10-decanedicarboxylic acid(DDA)に、溶媒として diphenyl ether、触媒として tin(II)oxide を加えて、180℃、30mmHg 下で直接脱水重縮合法により、様々な組成比の OLLA/PEG マルチブロック共重合体を合成した。凍結乾燥法により、スポンジ形状のハイドロゲルとし、物性評価として、含水率測定、*in vitro* 加水分解実験、および引張試験を行った。



Scheme 1. Multiblock copolymerization of OLLA, PEG, and DDA.

・HAp 複合化吸収性ハイドロゲルの作製と物性評価

交互浸漬法¹⁾により、様々な複合化量の HAp 複合化吸収性ハイドロゲルを作製し、SEM 測定、X 線測定によりハイドロゲル内の白色結晶が HAp であることを確認した。引張試験により、HAp 複合化することによるハイドロゲルの含水性・柔軟性への影響を評価した。

208

Specific adhesion of CD34+ cells on PLLA porous scaffolds

Tetsuji Yamaoka, Tomokazu Higami, Sho Uchida, Akira Murakami,
Goki Matsumura, Toshiharu Shin'oka
National Cardiovascular Research Institute, 5-7-1 Fujituro-dai, Suita, Osaka 565-0865, JAPAN

Hematopoietic stem cells (HSCs) have been attracting great attention in the field of regenerative medicine. In general, they have been isolated from the bone marrow cells (BMCs) by use of the magnetic cell sorting system (MACS) or the fluorescence activated cell sorter (FACS) before being transplanted. In the present study, bioresorbable porous scaffolds having HSCs specific surface modified with anti CD34 antibodies were developed. Poly (L-lactic acid-co-ε-caprolactone) scaffolds were briefly hydrolyzed in order to introduce carboxylic groups on their surface, and anti-human CD34 mouse IgG was immobilized by the carbodiimide method. The amount of immobilized antibody was about 30ng/scaffold. When a mixed suspension of KG-1a (CD34⁺) cells and HL60 (CD34⁻) cells was continuously applied into the modified porous scaffold, a selective adhesion of the KG-1a cells was observed under the FACS system.

The destabilization of polyplexes facilitates intranuclear transcription efficiency

Tomoko Hashimoto^{1,2}, Akio Kobori², Akira Murakami² and Tetsuji Yamaoka¹

¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8585, Japan and ²Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan

ABSTRACT

We have been focusing on the last step of transfection, that is, the intranuclear recognition of polyplexes by transcription factors. In this work, we studied about the relationship between the intracellular destabilization of polyplexes and the transcription efficiency. Polypeptides containing specific sequences which are digested by intracellular proprotein convertase(PC), furin(Fur-polypeptide) were synthesized as novel carriers. When Fur-polypeptide/plasmid DNA polyplexes were incubated with furin in the cell-free transcription/translation system, the sequence specific expression was observed as time. Additionally, Fur-polypeptides/plasmid DNA polyplexes led to site-specific effective transgene expression even in COS-1 cells. These results indicate that shortened carriers lose their abilities to form polyplexes in response to furin activity in the cells, and it seems to enhance the destabilization of polyplexes, the recognition of transgene in polyplexes by transcription factors, and the expression efficiency.

INTRODUCTION

In non-viral carrier mediated gene therapy, various intracellular mechanisms of polymeric carrier/gene polyplexes have been gradually clarified. The conventional evaluation of these polyplexes mediated gene delivery systems shows the total efficiency including all steps, such as cellular uptakes, endosomal escapes, nuclear transfers, and intranuclear expressions of transgene.

We have been focusing on the last step following the intracellular barriers described above, transcription of transgene. Since the transcription efficiency seems to be affected by condensation of the polyplex, optimum molecular design of polymeric gene carriers for high transcription efficiency should be clarified. Generally, linear polycations such as poly(L-lysine) (PLL) are known as DNA condensers. In order to relax the condensation between polymeric carrier and transgene, we have designed

various polymeric gene carriers that are cationic polymers conjugated with hydrophilic or hydrophobic segments. Some PLL derivatives showed that quaternary ammonium groups and non-ionic hydrophilic groups led to high transfection efficiency¹. On the other hand, cationic copolymers with hydrophobic segment formed micelle-like structure in aqueous solution and improved the expression efficiency because of an easy disassembly of polyplexes and recognition of the DNA in polyplexes.

These results indicated that both of the reciprocal factors, hydrophilic and hydrophobic, commonly destabilize electrostatic polyplexes and facilitate transgene expressions. Following these factors, a biological factor was proposed in the present study. Polypeptide containing sequences recognized and cleaved by intracellular proprotein convertase(PC), furin(Fur-polypeptide) was selected as a novel destabilization carrier. This intracellular enzymatic digestion-induced destabilization of polyplexes led to site-specific transgene expression². In the present study, we evaluated whether these enhanced expression efficiencies were brought by high transcription efficiencies or not.

RESULTS AND DISCUSSION

Since furin digests the carboxyl side of Arg-Xaa-Xaa-Arg³, H₂N-(Arg-Lys-Arg-Lys-Lys-Arg)₄-Cys-CONH₂ and H₂N-(Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys)₄-Cys-CONH₂ were synthesized as a digestible and control carrier, and they were abbreviated as Fur-3 and Fur-4, respectively. These polypeptides are highly cationic enough to form polyplexes with plasmid DNA. Digestion assay with furin were conducted by a modified method of previously reported one² using Fur-polypeptide/pT7-Luc polyplexes(C/A=5) at a fixed concentration of human recombinant furin convertase(Affinity BioReagents, Inc., USA). The destabilization of polyplexes was observed on the ethidium bromide stained agarose gel(0.8%) electrophoresis. We selected *in vitro* transcription/translation assay as the cell-free evaluation system of the transcription efficiency. The polyplex was evaluated using T_NT Coupled Reticulocyte

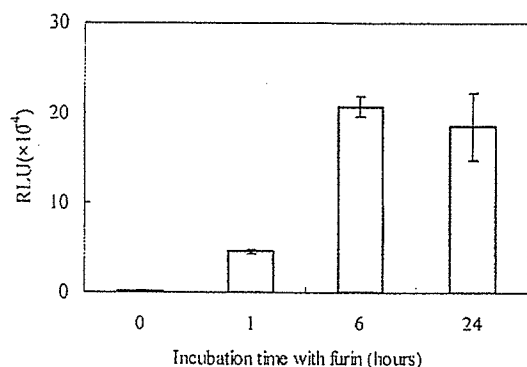


Figure 1. Transcription efficiency determined by luciferase activity *in vitro* transcription/translation system. Fur-3/pT7-Luc polyplexes (C/A=5) were digested with 5units of furin for a given period of time and used.

Lysate Systems(Promega, USA). Polyplexes composed of Fur-polypeptide were destabilized chronologically. In case of Fur-3, the DNA release from destabilized polyplexes was observed clearly, and transcription efficiency of digested polyplexes in the cell-free system were increased time-dependently (Figure 1.). Especially polyplexes reacted with furin for 6hours resulted in a about 100-fold enhancement compared with non-reacted polyplexes. It was reported that low molecular weight carriers easily release DNA under intracellular environment⁴. These results indicate that furin digestion resulted in the loss of the polyplex forming ability of the carriers, the destabilization of polyplexes, and higher transcription efficiency. These enhancements indicate that the enzymatic-destabilization actually occurs in the intracellular compartments when Fur-polypeptide is used as a gene carrier.

To assess the intracellular transcription efficiencies, the osmotic shock procedure and the microinjection were selected as transfection protocols. PLL and its derivatives having quaternary ammonium groups and non-ionic hydrophilic groups were used as carriers. To quantify the transcription efficiency of transgene in single cell, Cy3-labeled pCMV-Luc and pEGFP-N1 were transfected at optimum ratio into COS-1 cells by the osmotic shock method. The fluorescence intensity of Cy3(585nm) and EGFP(520nm) were measured on the FACS system with a 488nm excitation laser 40h after the onset of transfection to assess the cellular uptake and transient expression. The transcription efficiency is defined as following equation (1).

Transcription efficiency in single cell =

$$\frac{\text{Fluorescence intensity of expressed EGFP}}{\text{Fluorescence intensity of uptaked Cy3}} \quad (1)$$

Although PLL and all derivatives showed similar degree of nuclear transfer of plasmid DNA(data not shown), only PLL derivative having quaternary ammonium groups and hydroxy groups showed high transcription. These results indicate that polyplexes formed with these chemical structures also play an important role to destabilize the polyplexes during the intracellular trafficking.

In conclusion, the polyplex destabilization was induced by the enzymatic fragmentation and the chemically modified characterization, and they facilitate their transcription efficiencies.

REFERENCES

1. Kimura, T., Yamaoka, T., Iwase, R., and Murakami, A. (2002) *Macromol. Biosci.* 2, 437-446
2. Hashimoto, T., Murakami, A. and Yamaoka, T., (2004) *Nucleic Acids Res Suppl.*, 48, 235-236.
3. Hosaka, M., Nagahama, M., Kim, W. S., Watanabe, T., Hatsuzawa, K., Ikemizu, J., Murakami, K., and Nakayama, K. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 12127-12130
4. Schaffer, D. V., Fidelman, N. A., Dan, N., and Lauffenburger, D. A. (2000) *Biotechnol. Bioeng.* 67, 598-606

Luminescence anisotropy-based detection of nucleic acids and proteins using long-lifetime Ru(II) complex as a luminescent label

Takashi Sakamoto¹, Atsushi Mahara², Kobori Akio¹, Tetsuji Yamaoka² and Akira Murakami¹

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan and ²Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

ABSTRACT

Luminescence anisotropy-based methods are powerful tool for the detection of biomolecules in homogeneous physiological media without Bound/Free separation. However, analyses based on the method are always disturbed by the autofluorescence from biological specimen. This disturbance limits the sensitivity of the method. To improve the detection limit of the method, a long-lifetime luminophore was adopted as the label. Because of the lifetime of the autofluorescence is below 10ns, it is expected that the use of the long-lifetime luminophore enables us to avoid the disturbance by adopting time-resolved luminescence anisotropy measurement. To verify this concept, oligodeoxyribonucleotides and *Staphylococcus aureus* protein A were labeled with Ru(II) complex ($\tau \sim 500\text{ns}$) and used for the detection of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA (16S rRNA) and immunoglobulin G (IgG), respectively. Results indicated that the methods were useful for the detection of rRNA and IgG without disturbance of the autofluorescence.

INTRODUCTION

Recent advancements of the methods for the detection of biomolecules largely contribute to understand the functions of DNAs, RNAs and proteins. Especially, solid-phase methods such as DNA chip¹ and oligonucleotide microarray² enabled us to understand gene functions. These methods will play an important part of genome-based diagnostics. However, as the chip-based technology requires a lot of time-consuming procedures, the technology is not applicable for the real-time analysis of the biomolecules. For the real-time detection of biomolecule, further developments of the solution-phase methods are still required for the detection of biomolecules.

In this study, as a method to detect biomolecules in homogeneous physiological media, we adopted the luminescence anisotropy-based method. During the past 50 years, this method has contributed significantly to biological studies. This method can analyse not only the rotational motion of the luminescent-labeled biomolecule but also the change in rotational motion caused by interactions between biomolecules in homogeneous

physiological media without Bound/Free separation. However, the analysis based on this method was frequently disturbed by the autofluorescence from biological specimen.

To apply this method for highly sensitive and real-time detection of biomolecules, we adopted the time-resolved luminescence anisotropy (TR-LA) analysis using long-lifetime Ru(II) complex as a luminescent label. The disturbance caused by the autofluorescence could be avoided by the TR-LA analysis using the appropriate time window. In this report, interactions between oligonucleotide (ODN) and *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA (16S rRNA), and between *Staphylococcus aureus* protein A (SpA) and immunoglobulin G (IgG) were examined by this method.

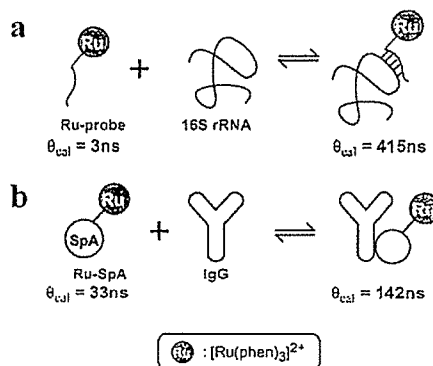


Fig. 1. Schematic illustrations of the change in rotational correlation time (θ) of Ru-probe (a) and Ru-SpA (b).

θ_{cal} was calculated according to the following equation³:

$$\theta_{\text{cal}} = (\bar{v} + h)\eta M_w / RT$$

\bar{v} : specific volume, h : hydration volume, η : viscosity, M_w : molecular weight, R : ideal gas constant, T : absolute temperature.

RESULTS AND DISCUSSION

Ru(II) complex labeling of ODN and SpA

Ru(II) complex was successfully conjugated to the 5' end of ODN (5'-GCCGTACTCC-3'; 10mer) according to the following procedure. The sequence of the ODN was complementary to the single stranded region of 16S rRNA. The 5' end of the ODN on the CPG support was activated