

by 1,1-carbonyldiimidazole and the CPG was suspended in 0.1M $[\text{Ru}(\text{phen})_3(\text{phen}-(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2)](\text{PF}_6)_2$ in dry DMSO (60°C, 30h). After the cleavage and deprotection, the Ru(II) complex-labeled ODN (Ru-probe) was purified by reversed-phase HPLC. It was found that approximately 80% of the ODN was labeled with Ru(II) complex. SpA was labeled according to reported procedure⁴. Briefly, SpA was treated with *N*-hydroxysuccinimide activated $[\text{Ru}(\text{phen})_2(\text{phen}-(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H})](\text{PF}_6)_2$ in 50mM Na-carbonate buffer (pH9.8) containing 50%(v/v) DMF (20°, 18h). Unreacted Ru(II) complex and DMF were then removed by gel-filtration (Sephadex-G25). Dye to protein ratio of the Ru(II) complex-labeled SpA (Ru-SpA) was 0.97. The Ru-SpA was used without further purification.

Detection of 16S rRNA and IgG by TR-LA analysis

Basic principles of the luminescence anisotropy-based detection of 16S rRNA and IgG were shown in Fig.1. In our previous study, we demonstrated that the target site of Ru-probe was accessible site for ODN binding². The TR-LA analysis of Ru-probe was performed in the absence and presence of 16S rRNA (Fig.2). Results indicated that the addition of 16S rRNA to the Ru-probe caused significant change in luminescence anisotropy 0.1 μ sec after the pulse excitation (Fig.2, dashed line). The results suggested that the autofluorescence ($\tau < 10$ sec) from biological specimen could be avoided by the use of appropriate time window for the analysis. Rotational correlation time (θ) of Ru-probe bound to 16S rRNA was observed to be 1.2 μ sec, which was 3-fold greater than the calculated value (θ_{cal}) as depicted in Fig.1a, suggesting that the assumption in the calculation of θ_{cal} ($\bar{v} \pm h = 1.9$)³ should be reconsidered.

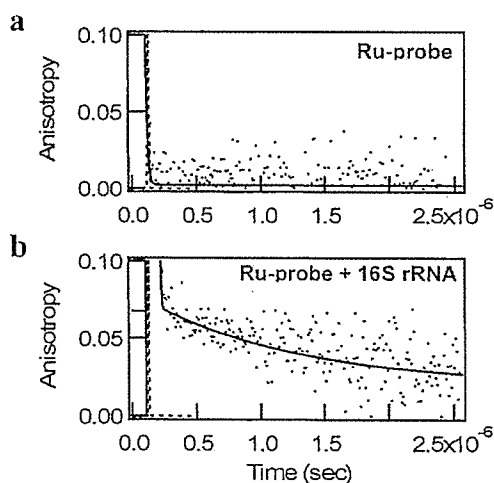


Fig.2. Luminescence anisotropy decay curves of Ru-probe in the absence (a) or presence (b) of 16S rRNA.

Dashed line represents the intensity decay of the excitation pulse. $[\text{Ru-probe}] = [\text{16S rRNA}] = 0.75 \mu\text{M}$ in 10mM Tris-HCl (pH7.5) containing 100mM NaCl and 1mM MgCl_2 . Measurements were carried out at 11°C

Table 1 Detection of IgG by TR-LA and SS-LA analyses using Ru-SpA in DMEM containing 10% FBS

	Luminescence anisotropy	
	TR-LA (average anisotropy) ^a	SS-LA
Ru-SpA	0.025	0.097
Ru-SpA + 0.5 μ M IgG	0.066	0.084
Ru-SpA + 5.0 μ M IgG	0.116	0.093

^aAverage anisotropy was calculated using the anisotropy decay curve 50-100nsec after the pulse excitation. $[\text{Ru-SpA}] = 0.3 \mu\text{M}$ in 20mM PBS. Measurements were carried out at 20°C.

To evaluate the availability of the TR-LA-based detection of IgG using Ru-SpA, TR-LA analysis was compared with the steady-state luminescence anisotropy (SS-LA) analysis (Table 1). In the case of SS-LA analysis, the addition of IgG to Ru-SpA did not show the significant change in luminescence anisotropy, suggesting that the autofluorescence from FBS greatly disturbed SS-LA analysis. On the other hand, the significant change in luminescence anisotropy was detected in the case of TR-LA analysis. These results suggested that the autofluorescence from FBS was effectively avoided by the TR-LA analysis.

CONCLUSION

In this report, we tried to evaluate the availability of the TR-LA-based method for the detection of various biomolecules in the homogeneous physiological media. Results suggest that the autofluorescence due to concomitant materials in the serum containing media was effectively avoided. This methodology might contribute to the development of highly sensitive and real-time detection system for biomolecules in homogeneous physiological media.

REFERENCES

- Schena, M., Shalon, D., Davis R.W., Brown, P.O. (1995) *Science*, 270, 467-470.
- Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschin, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A. (1996) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 93, 4913-4918.
- Lakowicz, J.R. (1999) *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Sakamoto, T., Mahara, A., Yamagata, K., Iwase, R., Yamaoka, T., Murakami, A. (2004) *Anal. Biochem.*, 329, 142-144.
- Sakamoto, T., Mahara, A., Iwase, R., Yamaoka, T., Murakami, A. (2005) *Anal. Biochem.*, 340, 369-372.

Synthesis and properties of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralen-conjugated adenosine

Maiko Higuchi¹, Asako Yamayoshi², Akio Kobori¹, Tetsuji Yamaoka³ and Akira Murakami¹

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 602-0841, Japan, ²Institute of Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, 6-10-1, Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan and ³Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

ABSTRACT

In order to selectively regulate mRNA having a point mutation, the photo-reactive antisense oligonucleotides were developed. Two types of photo-reactive oligonucleotides containing adenosine whose 2'-OH was modified with 4,5',8-trimethylpsoralen (psoralen) were synthesized (2'-Ps-oligo). One contains psoralen *via* a methylene linkage (2'-Ps-met), and the other *via* an amidomethylene linkage (2'-Ps-amd). 2'-Ps-oligos were then subjected to the photo-cross-linking reaction. 2'-Ps-met cross-linked to the complementary RNA and scarcely did to the RNA having a single mismatch base. Contrarily, 2'-Ps-amd did not cross-link to both RNA strands. These results suggest the structure of the linkage might affect the efficiency of the photo-cross-linking.

INTRODUCTION

Through the identification of human genome sequence and the development of molecular biology, it has found that various serious diseases were caused by the consequence of a single point mutation in the coding region. For example, *ras* oncogene having a single point mutation in the coding region is responsible for the transformation [1,2]. The mutation affects the cellular proliferation and induces tumorigenic properties. It is desired to inhibit selectively the expression of disease-causing mutation without affecting normal genes. Traditional drugs have certain limitations for such diseases because of the lack of the sequence specificity. The antisense strategy which inhibits gene expression in a sequence specific manner might be suitable for the purpose.

We designed new photo-reactive antisense oligonucleotides to suppress the expression of mRNA having a single point mutation and 4,5',8-trimethylpsoralen (psoralen) was adopted as the photo-reactive molecule.

In our previous study, it was found that 5'-O-psoralen-conjugated oligonucleotide (5'-Ps-oligo) [3] which was complementary to HPV18 mRNA inhibited the cellular proliferation of cervical carcinoma cells (C4II) upon UVA-irradiation [4]. However, there is some possibility that the

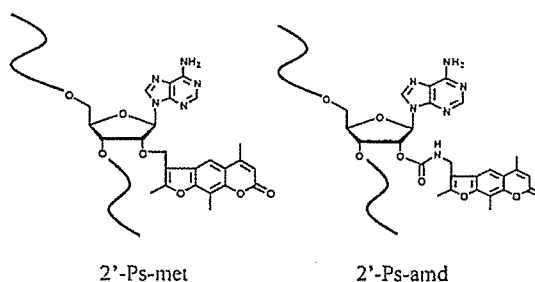
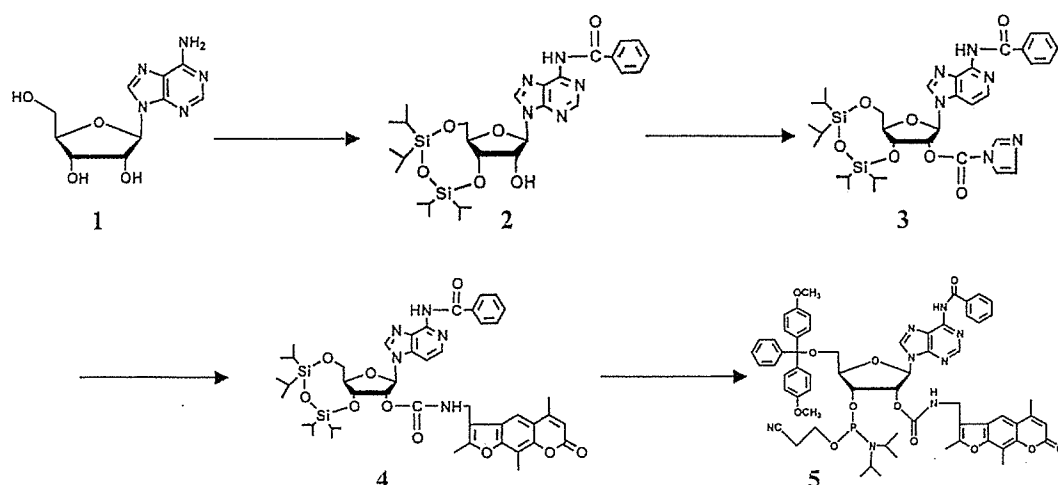


Fig.1. Structures of 2'-Ps-oligos (2'-Ps-met and 2'-Ps-amd)

psoralen of 5'-Ps-oligo could photo-cross-link to the undesired sites of mRNA because of the flexibility of the linkage. In this study, photo-reactive oligonucleotides whose 2'-OH was modified with psoralen were designed to overcome the problem.

RESULTS AND DISCUSSION

We designed the photo-reactive antisense molecule so as to cross-link to pyrimidine base at the site of the point mutation in the target RNA, and so as not to randomly cross-link to the pyrimidine bases. The antisense molecules possess a psoralen derivative at 2'-position *via* either a methylene linkage (2'-Ps-met) or an amidomethylene linkage (2'-Ps-amd). The conformational calculation of the hybrid between 5'-Ps-oligo or 2'-Ps-oligo and its complementary RNA was carried out using AMBER* force field in MacroModel ver.8.0. It was demonstrated that both psoralens of 2'-Ps-met and 2'-Ps-amd intercalated only between the designated base pairs. Contrarily, the psoralen of 5'-Ps-oligo intercalated between the designated base pairs and also between the neighboring base pairs. This might cause the undesired cross-linking. The calculated distances between the double bond of the pyrimidine base 5-6 and the double bond of psoralen 3-4 were 5.7 Å in the 2'-Ps-met and 4.0 Å in the 2'-Ps-amd.



Scheme 1. Synthetic scheme of 2'-Ps-ampd-adenosine derivative

Two types of 2'-*O*-psoralen-conjugated adenosine phosphoramidites were synthesized. The introduction of psoralen derivatives to the 2'-position was achieved in two ways. (I) 4'-Chloromethyl-4,5,8-trimethylpsoralen was selectively introduced to 2'-position of adenosine whose 2'-OH and 3'-OH were activated by sodium hydride. (II) 4'-Aminomethyl-4,5,8-trimethylpsoralen (AMT) was introduced to 2'-position of *N*⁶-benzoyl-3',5'-*O*-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)adenosine **2** adopting the carbonyl diimidazole (CDI) activation protocol (Scheme 1) [5]. The reaction of **2** with CDI in THF gave 2'-*O*-(imidazol-1-ylcarbonyl)-3',5'-*O*-(tetraisopropylidisiloxane-1,3-diyl)adenosine **3** in nearly quantitative yield. Subsequently, **3** was treated with AMT in THF to give **4** and **4** was isolated by column chromatography (87%). These 2'-*O*-psoralen-conjugated adenosine derivatives (Aps) were introduced to oligonucleotide by the solid phase synthesis protocol. The sequence of the Ps-oligo was d(CCTCGACAApsACCGCAT), which was complementary to codon12 of K-ras mRNA surrounding region.

2'-Ps-oligos were then subjected to the photo-cross-linking reaction with their target RNAs. The reactions were analyzed by RPLC and denaturing PAGE. 5'-Ps-oligo cross-linked to both its complementary RNA and RNA having a single mismatch base. It means that 5'-Ps-oligo could cross-link to the undesired site of RNA. On the other hand, 2'-Ps-met cross-linked to its complementary RNA upon UVA-irradiated, but scarcely cross-linked to the RNA having a single mismatch base. These results suggest that 2'-Ps-met could selectively cross-link to the site of a single base mutation of RNA.

CONCLUSION

We reported the synthesis of photo-reactive antisense oligonucleotides containing 2'-*O*-psoralen-conjugated adenosine. Photo-cross-linking reaction studies indicated 2'-Ps-met has higher selectivity than 5'-Ps-oligo, and 2'-Ps-met becomes a powerful antisense molecule to inhibit the expression of mRNA.

REFERENCES

1. Barbacid, M. (1987) *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827.
2. Bos, L. (1989) *Cancer Res.*, **49**, 4682-4689.
3. Murakami, A., Yamayoshi, A., Nishida, J., Iwase, R., Yamaoka, T. and Wake, N. (2001) *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 25-34.
4. Lee, B., Murakami, A., Blake, K., Lin, S., Miller, P. (1988) *Biochemistry*, **27**, 3197-3203.
5. Korshun, V., Stetsenko, D., Gait, M. (2002) *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1092-1104.

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

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8585, Japan, ²Department of Biosciences, Teikyo University of Science and Technology, 2525 Yatsusawa, Uenohara, Yamanashi, 609-0193, Japan and ³Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka, 565-8565, Japan

ABSTRACT

An oligonucleotide containing a photocleavable protecting group at a guanine base was synthesized to induce the duplex formation by photo-irradiation. α -Methyl-2-nitropiperonyl (MeNP) group was used for the photocleavable protecting group at O⁶ position of deoxyguanosine. The oligonucleotide containing MeNP group (MeNP-ODN: 5'-dTTCG^{MeNP}TCTGT-3') was synthesized by phosphoramidite method. The MeNP group was found to be removable by UV irradiation at wavelength of 365 nm for 5 min in 98% yield. UV-melting temperature (T_m value) analysis indicated that the duplex of MeNP-ODN with the complementary RNA was significantly unstable compared with the unmodified DNA/RNA duplex (Δ T_m = -25 °C). After UV irradiation at 365 nm, the T_m value of the mixture increased to the 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.

INTRODUCTION

Phototriggered duplex formation of oligonucleotides with the target DNA and RNA is expected as a new means for the temporal and spatial control of gene expression by photo-irradiation. Recently, systems for the phototriggered duplex formation of oligonucleotides have been reported by the use of photoinduced conformational change of azobenzene group¹⁾ or photocleavage of 1-*o*-nitrophenyl-1,3-propanediol linker²⁾ on the modified oligonucleotides. The control of base-pair formation of oligonucleotides using photocleavable protecting groups on the thymine bases has been reported to induce the duplex formation by photo-irradiation.^{3,4)} We have developed the utility of 6-nitroveratryloxycarbonyl (NVOC) group⁵⁾ as a photocleavable protecting group of the N³ position of thymidine on antisense oligonucleotides.³⁾ This protecting group has proved to have a property that it could be removed by photo-irradiation at wavelength of 365 nm to

induce the T-A base pairing of the oligonucleotide with the complementary RNA. Unfortunately, the photocleavage of the NVOC group required 5 h. Furthermore, two NVOC groups were needed in 18-mer-antisense DNA for the sufficient destabilizing effect of the duplex formation with complementary RNA. It is therefore required to introduce faster photocleavable protecting group at more effective position on antisense DNA as compared with the NVOC-modified oligonucleotides. We have chosen α -methyl-2-nitropiperonyl (MeNP) group as a rapidly photocleavable protecting group to protect the O⁶ position of deoxyguanosine for the induction of G-C base pairing by photo-irradiation (Figure 1). Recently another group has reported that rapidly photocleavable 2-(2-nitrophenyl)propyl group was attached to the O⁴-position of thymidine on oligonucleotides for the photoinduced duplex formation with complementary DNA.⁴⁾ In this report, we present the synthesis of MeNP-modified oligonucleotides (MeNP-ODN) (1) and the ability of photo-induced duplex formation of MeNP-ODN with the complementary RNA.

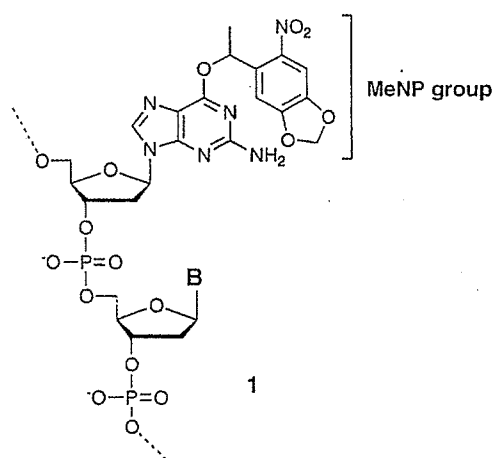


Figure 1. Structure of MeNP-modified oligonucleotide

RESULTS AND DISCUSSION

First, we prepared a deoxyguanosine phosphoramidite 5 bearing MeNP group at the O⁶ position (Figure 2). 3',5'-bis-O-(t-butylidimethylsilyl)-N²-phenoxyacetyl-2'-deoxyguanosine was first converted into 3',5'-bis-O-(t-butylidimethylsilyl)-N²-phenoxyacetyl-O⁶-mesitylene-sulfonyl-2'-deoxyguanosine in 80% yield. The intermediate was converted into the 6-quinuclidinium salt, which was allowed to react with 1-(4,5-methylenedioxy-2-nitrophenyl)ethanol in the presence of DBU to give the O⁶-MeNP-modified derivative (2) in 86% yield. The treatment of 2 with TBAF gave the 3',5'-diol derivative (3) in 83% yield. The 5'-dimethoxytritylation of 3 gave the 5'-O-tritylated product 4 in 41% yield. Compound 4 was converted into 5 by 3'-phosphitylation in 81% yield.

Next, MeNP-ODN was prepared by phosphoramidite method using 5 and other nucleoside phosphoramidites bearing easily-removable protecting groups under mild basic condition at exocyclic amino functions of guanine and cytosine bases (G^{iPrPac}, C^{Ac}, T: iPrPac = *p*-(isopropyl)phenoxyacetyl, Ac = acetyl). CPG support with hydroquinone-O,O'-diacetic acid linker was also used. Cleavage from CPG and deprotection of the MeNP-ODN with 0.05M of potassium carbonate in methanol⁶⁾ for 2h gave MeNP-ODN (5'-dTTCGT^{MeNP}TCTGT-3'; G^{MeNP} = deoxyguanosine having a MeNP group at O⁶ position).

The MeNP group of MeNP-ODN was found to be removable by UV irradiation at wavelength of 365 nm (transilluminator, 2.5 mW/cm², 37 °C) in 5 min to produce the unmodified oligonucleotide in 98 % (Scheme 1).

To examine the destabilizing effect of the MeNP group for the duplex formation, we measured UV melting temperature (T_m value) of the mixture of MeNP-ODN and

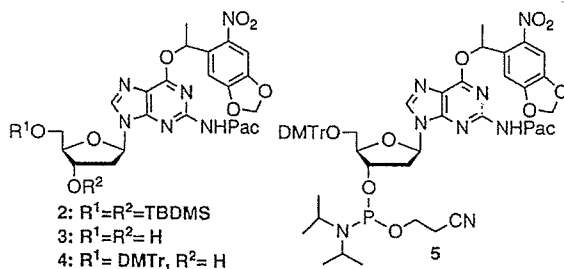
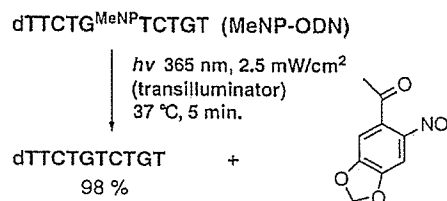


Figure 2. Structures of MeNP-modified deoxyguanosine derivatives

Scheme 1.



complementary RNA. The T_m value of this duplex (T_m = 16 °C) was significantly reduced compared with that of unmodified ODN-RNA duplex (T_m = 41 °C)(Table 1). In mixtures with complementary RNA, the MeNP-ODN also exhibited the T_m value 5 °C lower than the mismatch ODN (5'-dTTCATCTGT-3') containing an adenine mismatch base (T_m = 21 °C) (Table 1). These results suggest that the MeNP group on the oligonucleotide remarkably inhibits the duplex formation. After UV irradiation to the mixture of the MeNP-ODN with the complementary RNA, the T_m value was the same as that of unmodified duplex (Table 1). This result indicates that the RNA binding ability of MeNP-ODN was induced by UV irradiation. Thus, the photo-induced RNA binding ability of oligonucleotide was achieved by the introduction of photocleavable protecting group at the O⁶ position of guanine base.

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

	T _m (°C)	Δ T _m (°C)
unmodified ODN	41	-
mismatch ODN	21	-20
MeNP-ODN	16	-25
MeNP-ODN (UV irradiation)	41	0

Measurement: 10mM phosphate buffer (pH7.0), 1M NaCl. Concentration of total oligonucleotides: 4μM. Condition of UV irradiation: transilluminator (hv/ 365nm, 2.5mW/cm², room temperature, 5 min.). Sequence of mismatch ODN: 5'-dTTCATCTGT-3'.

CONCLUSION

In conclusion, MeNP group can be attached to the O⁶ position of deoxyguanosine and incorporated into oligonucleotide in a site-specific manner by the use of MeNP-modified deoxyguanosine phosphoramidite unit 5. The MeNP group on oligonucleotide has high photocleavage efficiency at UV wavelength of 365 nm and allows the production of unmodified oligonucleotide. The MeNP-modified oligonucleotide has the ability of photo-induced duplex formation with the target RNA.

REFERENCES

- Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X., Komiyama, M. (1999) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **38**, 2393-2395.
- Ordoukhanian, P., Taylor, J.-S. (1995) *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 9570-9571.
- Iwase, R., Kitani, A., Yamaoka, T., Murakami, A. (2003) *Nucleic Acids Res. Supp.*, **3**, 61-62.
- Kröck, L., Heckel, A. (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 471-473.
- Alvarez, K., Vasseur, J.-J., Beltran, T., Imbach, J.-L. (1999) *J. Org. Chem.*, **64**, 6319-6328.
- Kuijpers, W.H.A., Kuyl-Yeheskiely, E., van Boom, J.H., Boeckel, C.A.A. (1993) *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3493-3500.

2X13

ポリカチオンミセルによる遺伝子導入効率向上の機構解析

(¹国循セ研、²京工織大繊維) ○山岡哲二¹、北川達哉²、橋本朋子²、
小林由美子²、村上 章²、馬原 淳¹

【緒言】 非ウイルスベクターにより細胞内に到達された DNA 分子が転写されて、遺伝子が発現するまでの詳細なメカニズムはいまだ明らかでない。細胞表面レセプター介在システムやプロトンスポンジ効果、あるいは、核移行性シグナル (NLS) を利用した試みが報告されているにもかかわらず、未だ十分な発現効率の向上が達成できないのは、最終段階である複合体の転写・翻訳効率の低さが原因と考えられる。複合体からの DNA 分子の遊離や複合体中の DNA の直接転写は、導入遺伝子の発現効率を左右する最も重要な段階の一つであることは疑う余地もないが、その検討はほとんど進んでいない。本研究では、ポリプレックスの解離などの特性を制御すべく、様々な分子構造を有するカチオンポリマー系非ウイルスベクター、特に分子集合化によるミセル状ポリカチオンを合成し、その被転写翻訳効率と遺伝子発現効率について検討した。

【実験】 キャリアーの合成 分子内ミセル形成型遺伝子キャリアーとして、側鎖に数%のステアリル基を有する直鎖状のポリカチオン (poly(Gal-co-DMAPAA-co-S)) を選び、親水性モノマーの 6-O-vinyladipoyl-D-galactose (Gal)、カチオン性モノマーの N-[3-(dimethylamino)propyl] acrylamide (DMAPAA)、および、疎水性モノマーの stearylacrylate (S) を様々な比で共重合し、定法により精製した。また、分子間ミセル形成型モノマーとしては、様々な配列を有するオリゴアミノ酸とステアリン酸との縮合による両親媒性化合物を合成した。ミセル形成の確認 ミセル形成確認のため、ピレンを用いて以下の方法で臨界ミセル濃度 (cmc) を測定した。各ベクター水溶液の希釈系列 1.5 ~ 0.0005mg/ml に所定量のピレンプローブを加え、3時間 65°C でインキュベートし、室温で放冷した後、励起スペクトルを測定した (蛍光波長 393nm、サンプリング間隔 0.2nm)。また、各ベクター水溶液 1.5mg/ml を、マイカ上に 2μl 滴下し、窒素雰囲気下で乾燥させた後、AFM タッピングモードにて撮像した。In vitro 遺伝子導入 pCMV-Luc プラスミド DNA を COS-1 細胞にクロロキン処理法により導入し、定法により発現量を定量した。ヘパリン添加によるポリイオン交換反応 種々の C/A 比のキャリアー/pT7-Luc ポリプレックス溶液に、カチオン基数に対して所定倍量の硫酸基数となるようにポリビニル硫酸カリウムを添加し、プラスミド DNA の解離の様子をアガロースゲル電気泳動法および in vitro 転写翻訳系にて分析した。細胞内でのポリプレックスの解離 RITC ラベル化ベクターと FITC ラベル DNA を用いて両者の FRET の有無を利用することで、複合体の細胞内挙動の追跡を検討した。

Novel mechanism of enhanced gene transfer with micelle type gene carriers

Tetsuji YAMAOKA¹, Tatsuya KITAGAWA², Tomoko HASHIMOTO², Yumiko KOBAYASHI², Akira MURAKAMI², Atsushi MAHARA¹ (¹Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Department of polymer science and engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo, Kyoto 606-8585, Japan) Tel: 06-6833-5012 ext 2637, Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

We have been focusing on the last step of gene delivery using nonviral carriers, that is, the intranuclear recognition of the polyplexes by transcription factors. In the present study, cationic micelles of linear polycations having hydrophobic groups at the side chain and oligo cationic peptide bearing hydrophobic group at the N terminus were evaluated. The former forms intramolecular micelles and the latter forms intermolecular micelles. Both of the micelle-type carriers form stable but uncompacted polyplexes with plasmid DNA, and the polyplexes are easily disassemble by addition of another polyanion such as heparin and potassium poly(vinyl sulfate). In addition, the disassembly of the polyplexes was observed even in the nucleus based on fluorescent resonance energy transfer (FRET) using FITC-labelled plasmid DNA and Cy3-labelled polycations. Polyplexes composed of micelle-type carrier and plasmid DNA disassembles much easier than the case of linear type carriers possibly because of the suppressed entanglement between them, resulting in the high transcription and high expression efficiency.

疎水化キャリアー分子のナノ自己組織化現象の解明

図1に、poly(Gal-co-DMAPAA-co-S)の、ビレンプローブを用いたCMC測定の結果、および、AFM観察による分子内ミセル形成の様子を示した。疎水基含有率に拘わらず全てのキャリアーが、ミセル形成能を有する両親媒性分子であることが確認され、CMC以上の濃度では、分子内疎水場を形成するナノ自己組織化キャリアーであり、外殻にカチオン基が集積した構造であることが明らかとなった。さらに、図2には、キャリアー分子に導入した疎水基の割合がナノミセル化構造に与える影響について観察した結果を示した。特に、ステアシル基が3%以上では、DNAとの複合体形成後も、その構造を保持しており、「ブドウ」状の複合体を形成していることがわかる。さらに、図2最下段に示したアガロースゲルの写真は、形成したポリプレックスが解離し易いかをアニオン分子間交換反応により検討した結果である。Potassium polyvinyl sulfate solution (PVSK)をDNAに対し1~4等量加えたところ、疎水基導入率の上昇とともにミセル構造が明らかとなり、さらに、DNA分子の放出(ポリプレックスの解離)が容易になることが明らかとなった。

pCMV-Luv遺伝子導入の結果、ナノ構造化により、その遺伝子導入効率は飛躍的に向上した。また、直鎖状のキャリアーの多くで認められる、C/A比上昇に伴う発現効率の急激な低下が顕著に抑制され、広い範囲に於いて高い発現効率を示した。

さらに、ミセル型キャリアーとDNAとのポリプレックスが、実際に、細胞内でも解離しやすい事を示すために、新たな追跡システムを構築した。すなわち、FITCで蛍光ラベルしたプラスミドDNA分子とRITCで蛍光ラベルしたキャリアー分子のポリプレックス間で起こるFRET (Fluorescence resonance energy transfer)現象を利用した。上記と同様にして細胞内にポリプレックスを導入し、FITC分子を励起して蛍光スペクトルを測定した結果を図3に示した。疎水基を導入していない第一世代キャリアー分子の場合(図3左)、細胞の蛍光写真は黄色く観察され、そのスペクトルからも、RITC由来の蛍光がメジャーであることが判る。すなわち、細胞内でもポリプレックスは解離できず、このために、プラスミドDNAを核にないに送達できるにもかかわらず、遺伝子の発現を誘導できなかったことが明らかである。それに対して、ナノ自己組織化キャリアーの場合には、細胞は緑色蛍光を発生し、そのスペクトルはFRET現象の消失を示しており、細胞内でポリプレックスが解離し、十分に離れた位置に存在していることが示された(図3右)。

分子内・分子間ミセルの何れの場合にも、ポリプレックスの易動性の向上と共にその被転写効率が向上すること、さらに、この効率向上が直接的に遺伝子発現効率の向上につながる事が明らかとなり、この事は非ウィルスキャリアー新たな分子設計指針となる。

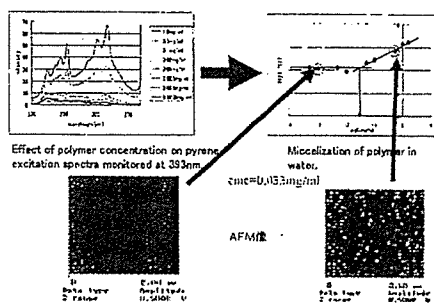


Figure 1 CMC measurement and AFM images of poly(Gal-co-DMAPAA-co-S) micelle.

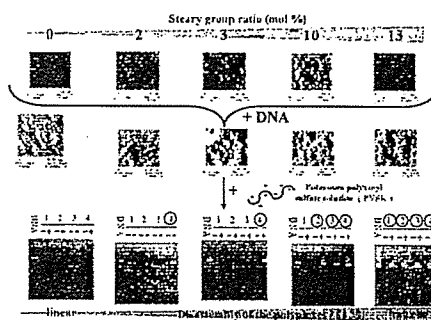


Figure 2 Polyplexes composed of poly(Gal-co-DMAPAA-co-S) micelle-type carrier and pCMV-Luc. Agarose gels represent the interexchange reaction of polyplexes with PVSK

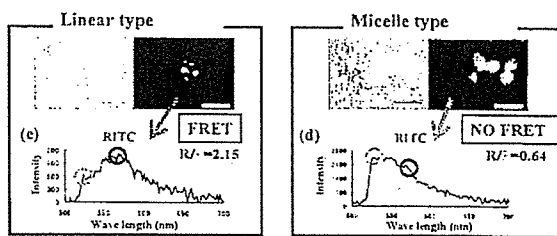


Figure 3 Polyplex disassembly in the nuclei assessed by FRET.

3X08

幹細胞特異的表面の構築と組織再生

○馬原 淳¹、樋上 智一²、村上 章²、山岡 哲二¹

(1 国立循環器病センター研究所 生体工学部、2 京工繊大・織)

【緒言】様々な細胞に分化が可能な自己幹細胞を用いて組織を再構築する再生医療分野では、目的の幹細胞を効率よく回収し、スキャホールドへ細胞を播種する必要がある。現在、目的の幹細胞のみを単離するためには、表面レセプターの有無に基づいた FACS 法や磁気ビーズ法が検討されている^{1, 2}が、操作が難しく回収できる細胞数に限界があることから臨床への展開は難しい。

そこで本研究では、血管再生用スキャホールドとして用いられている多孔質構造の poly(L-lactide-co-caprolactone) (p(LA/CA)) をスキャホールドとして採用し、目的の幹細胞のみが連続的に接着することで組織を再生できるシステムの構築を目指した。造血幹細胞の表面マーカーである CD34 に対する特異抗体を固定化した p(LA/CL) 表面の構築を行い、骨髓細胞液を通液することで CD34 陽性細胞のみを連続的に単離・播種する事が可能であるばかりでなく、迅速な組織再生材料の構築にも有効である。

【実験】パーティクルリーチング法および凍結乾燥法により p(LA/CA) 多孔質体を作成し、走査型電子顕微鏡 (SEM) および水銀圧入法により多孔質構造の評価および表面積の算出を行った。Anti-human CD34 mouse IgG 抗体 (CD34 抗体) の固定化を行うために、まず p(LA/CA) 多孔質体を 1N の NaOH で 30 分間加水分解することで、その表面にカルボキシル基を導入した。次に、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) によりカルボキシル基を活性化後、CD34 抗体と反応した。固定化された抗体量は、ペルオキシダーゼ標識 anti-mouse IgG 抗体 (HRP-IgG 抗体) を用いて定量した。その後、CD34 陽性モデル細胞である KG-1a 細胞 2×10^6 個/50ml を流速 0.05ml/min で抗体固定化 p(LA/CA) 多孔

Design of Stem cell-specific Surface for the Regenerative Medicine

Atsushi MAHARA¹, Tomokazu HIGAMI², Akira MURAKAMI², Tetsuji YAMAOKA¹ (¹Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishiro-dai, Suita, Osaka 565-8565, Japan, ²Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585, Japan)

Tel: 06-6833-5012 ext 2637, Fax: 06-6835-5476, E-mail: yamtet@ri.ncvc.go.jp

Key Word: stem cell / CD34 / regenerative medicine / separation

Abstract: Hematopoietic stem cells are the ideal cell source of the regenerative medicine for restoring the function of damaged vascular tissues, but the target stem cells are in general only 1-2% of the total cell population in the bone marrow. When the regenerative medicine is apply to the clinical stage, it is important to condense the stem cells on scaffold without complicated procedure. To separate and condense the stem cell directly on the scaffold, antigen-antibody interaction is adopted. Pours poly(L-lactide-co-caprolactone) scaffolds were prepared, and anti-human CD34 mouse IgG was immobilized on the surface by methods of alkali hydrolysis and carbodiimide activation. The antibody density was about $7.6 \mu\text{g}/\text{m}^2$. The amount of KG-1a cells (CD34⁺) adhering on the antibody-modified scaffold evaluated by WST-1 assay was about four times larger than that of the non-modified scaffolds. When cell suspension containing KG-1a cells and HL-60 cells (CD34⁻) was pass through the scaffold, and the eluent was analyzed by flow cytometric analysis, the fluorescence signal for the KG-1a cells was largely reduced due to the CD34 specific cell adhesion on the scaffold. These results suggest that the antibody-modified p(LA/CA) scaffold via extremely safe manner is useful and expected for isolating CD34-positive cells from the bone marrow.

質体へ播種し、スキャホールド表面に接着している細胞数を WST-1 assay により定量した。また、KG-1a 細胞と CD34 陰性モデル細胞の HL60 との混合懸濁液からの KG-1a 細胞単離実験も行った。

【結果と考察】作成した p(LA/CA) 多孔質体の SEM 像を図 1 に示した。数十 μm の均一な連通孔が確認され、また、水銀圧入法により、その比表面積は $0.88\text{m}^2/\text{g}$ であった。これらの結果より、多孔質でかつ連通孔を有するスポンジ状の p(LA/CA) 多孔質体は細胞接着のスキャホールドとして有効であると判断した。

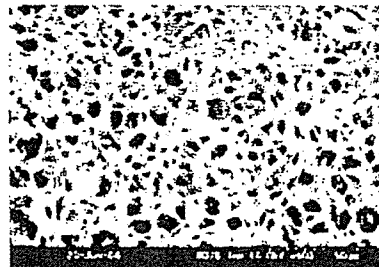


Figure 1. SEM image of p(LA/CA) scaffold.

スキャホールド に対する CD34 抗体の固定化とその定量

HRP-IgG 抗体を用いて、作成したスキャホールド表面に結合している CD34 抗体量を定量した結果、スキャホールドに

対して結合している抗体量は、 $30\text{ng}/\text{scaffold}$ であった。さらに水銀圧入法により求めた表面積から、固定化抗体密度は $7.6\mu\text{g}/\text{m}^2$ であることが算出された。

CD34 抗体を固定化したスキャホールドによる KG-1a 細胞の選択的分離

CD34 抗体を固定化したスキャホールドに対して KG-1a 細胞を播種した結果、original あるいは control のスキャホールドと比べて約 4 倍多い KG-1a 細胞の接着が確認された。この結果より、抗体固定化スキャホールド表面に結合した細胞は CD34 抗体を介して特異的に細胞が接着しているものと考えている。次に、このスキャホールドを用いて、KG-1a と、CD34 陰性細胞である HL60 が等量存在する細胞混合液からの CD34 陽性細胞の選択的分離が可能であるか検討した。作成した細胞混合液とスキャホールド通液後の溶出液をフローサイトメーターで解析した結果、KG-1a 細胞に由来する蛍光シグナルが大きく減少し、HL60 に由来するシグナルの割合が増加した。すなわち、抗 CD34 抗体を固定化したスキャホールドは、細胞混合液から CD34 陽性細胞のみを選択的に接着できるため、骨髓液中に 2% 程度しか存在しない造血幹細胞を効率よく濃縮できるものと期待される。

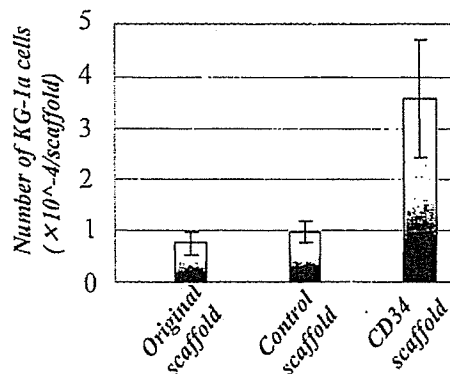


Figure 2. Number of KG-1a cells adhered on the original scaffold, control scaffold (hydrolyzed by NaOH, activated by EDC, and capped with 2-aminoethanol), and CD34 scaffold bearing $7.6\mu\text{g}/\text{m}^2$ CD34 antibody. 2×10^6 KG-1a cells were seeded and adherent cells were counted by WST-1 assay.

Reference

1. Visser et al. Isolation of murine pluripotent hematopoietic stem cells. *Journal of Experimental Medicine* 591: 576-1590, 1984.
2. Miltenyi et al. High gradient magnetic cell separation with MACS. *Cytometry* 11:231-238, 1990.

C-707

In vitro 血管組織再構築を目指した
スキャホールド内細胞への遺伝子導入○北川達哉¹、小堀哲生¹、村上 章¹、山岡哲二²
(¹京工繊大繊維、²国立循環器病セ研)

1. [緒言] 組織の再生を促進するため、スキャホールドから細胞増殖因子を放出する検討がなされているが、タンパク因子の安定性や徐放期間などの問題があり十分な効果は得られていない。そこで、安定性の高いプラスミドDNAの徐放化による再生促進を目指し、スキャホールド内で増殖する細胞へ効果的に遺伝子導入可能なキャリアーの開発、ならびに、スキャホールドへの保持方法を検討した。これら一連の細胞播種、遺伝子導入、および三次元培養には、我々がこれまでに報告してきた灌流型バイオリアクターを利用した。

2. [実験] 凍結乾燥法により、ポリ-L-乳酸 (PLLA; Mw=130,000) 性中空多孔質スキャホールドを作製した。スキャホールドとの疎水性相互作用が可能な遺伝子導入キャリアーとして、疎水性基 (stearylacrylate (SA)) を付与した N-[3-(dimethylamino) propyl] acrylamide (DMAPAA) と、2-methacryloyloxy ethylphosphoryl choline (MPC) の共重合体 (DMAPAA/MPC/SA=46/53/1) を作製した。スキャホールドへの複合体保持方法として、方法(1): あらかじめ形成した DNA/キャリアー複合体溶液をスキャホールドに含浸後、凍結乾燥し保持する方法、または、方法(2): スキャホールド上で複合体を形成させ、保持する方法 (キャリアー溶液、DNA 溶液を別々にスキャホールドへ含浸、乾燥させ、キャリアー/DNA/キャリアーの三層構造を作製) を検討した。これら二種の方法で作製した複合体保持スキャホールドを用い、DNA の放出挙動、放出された複合体の表面電荷 (ξ -potential)、および遺伝子導入能を評価した。

Fluorescence ラベルした DNA (F-pCMV-Luc) を用い、方法(1)で作製したスキャホールドを PBS 溶液中に浸け、一定時間ごとに溶液の蛍光強度 ($\lambda_{em}=595nm$) を測定し、DNA の徐放性を評価した。遺伝子導入能の評価では、方法(1)、(2)のスキャホールドを灌流型バイオリアクターに接続し、ヒト平滑筋細胞 (AOSMC) 懸濁液の 12 時間送液 (1.1ml/cm²-min) によるスキャホールドへの細胞播種後、10%FBS を含む DMEM 培地に交換し、灌流培養 60 時間後のスキャホールド内細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。比較のため、スキャホールドに複合体を保持しない方法(3)として、上記の培地交換後に複合体溶液を送液した時の遺伝子導入能を評価した。ポジティブコントロールに linear-PEI (Mw=25,000) を用いた。

3. [結果・考察] p(DMAPAA-co-MPC) や PEI では、2 日間で完全に DNA がスキャホールドから放出したが、疎水性基を付与した p(DMAPAA-co-MPC-co-SA) を用いると 7 日以上、DNA の徐放が可能であった。キャリアーへの疎水性基の付与がスキャホールドとの疎水性相互作用を向上させ、DNA の徐放化に有用であることが示された。しかしながら、方法(1)のスキャホールドから放出された複合体はマイナスの表面電荷を有しており、全く遺伝子導入能がなかった。それに比べ、方法(2)のスキャホールドから放出された複合体はプラスの表面電荷を有し、最適条件 (キャリアー(C/A=3)/DNA/キャリアー(C/A=3)) での遺伝子導入効率は、方法(3)に比べ 7 倍高く、ポジティブコントロールの PEI (C/A=10) と同程度まで上昇した (図 1)。また PEI は、方法(2)で保持させても、すぐにスキャホールドから放出し、培地交換時に系中から除かれるため、方法(3)に比べ、導入効率が低くなったと考えられる。以上の結果より、疎水性基を付与したキャリアー/DNA 複合体を、方法(2)でスキャホールドに保持すると、遺伝子導入能を有した複合体が徐放され、接着細胞の周囲での DNA 濃度が常に高く保たれるため、効果的な遺伝子導入が可能であったと考えられる。

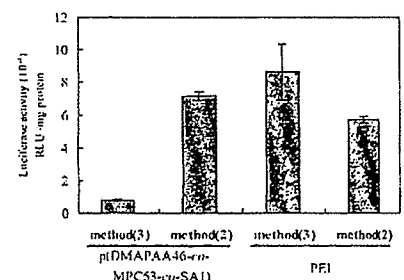


Figure 1. Transient expression of luciferase introduced to SMC cells using p(DMAPAA-co-MPC-co-SA) and PEI. method(2); carriers and pDNA were separately coated on the scaffold, method(3); complex solutions were added to the cell-seeded scaffold.

Gene transfer to smooth muscle cells on 3-D porous scaffolds

Tatsuya KITAGAWA¹, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA²¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology²Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute

P-168

ポリメリック遺伝子キャリアーの分子特性と
ポリプレックス被転写効率

○小林由美子¹、橋本朋子¹、小堀哲生¹、村上 章¹、山岡哲二²
¹京都工繊大繊維、²国立循環器病セ研

1. 緒言 ポリメリックキャリアー分子構造や側鎖のpKaなどが、ポリプレックスの取り込みやエンドソームからのリリースなどの各挙動に影響を与えることが報告されている。すなわち、キャリアー分子の諸特性に焦点を絞った分子設計が各ステップの効率向上につながることを示唆される。我々は、ポリプレックス形成に直接は関与しない疎水性基、または親水性基をポリメリックキャリアーに付与し、ポリプレックスの高い被転写効率を引き出すことで発現効率の向上に成功している。本研究では、キャリアーのカチオン性セグメントと疎水性セグメントの量比を変えた両親媒性のキャリアーを合成し、得られたキャリアーの特性評価、また遺伝子発現効率の評価を行った。また被転写効率を向上させる分子設計の諸条件についても検討した。

2. 実験 Fmoc 固相合成法により、オリゴアルギニン(以下 Rn)を合成した。続いてペプチドのN末端側にステアリン酸を導入し、その後脱保護・脱樹脂反応を行った。得られた両親媒性のオリゴアルギニン(以下 RnS)の組成は ¹H-NMR 測定、また元素分析により確認した。RnS の物性評価として、ピレン法による臨界ミセル濃度(CMC)の測定、AFM 測定を行った。Rn や RnS、また高分子量のポリアルギニンを用い、プラスミド DNA とのポリプレックス形成、および、そのポリプレックスからのプラスミド DNA のリリース挙動を、アガロースゲル電気泳動により評価した。各ポリプレックスの遺伝子導入効率は、クロロキン処理法により COS-1 および HepG2 細胞に pCMV-Luc プラスミドを導入することで評価した。

3. 結果・考察 AFM 観察の結果より、両親媒性の RnS は水溶液中で疎水性基をコアとしたミセル構造をとることが明らかとなった。また CMC は R4S では 0.023g/L となり、アルギニンの残基数が増すに従ってその値は徐々に減少し、R20S では 0.009g/L であった。図1および図2には、それぞれ Rn、および RnS を用いた COS-1 細胞への遺伝子導入実験結果を示した。

ステアリン酸を含まない Rn に対し、両親媒性の RnS を用いた場合、顕著な発現効率の向上が見られ、その発現効率は、直鎖状ポリエチレンイミンに匹敵する値となった。いずれの RnS キャリアーも、CMC 以上の濃度で発現効率の極大を示し、両親媒性分子がミセル構造をとることが必須であることが示唆された。キャリアーの分子特性という意味では、このミセル構造化は2つの特性を変化させていることになる。第一は、みかけの分子量の増大であり、第二は分子トポロジーの変化、すなわち、球状であることの重要性である。そこで、形成されたミセルの会合数を光散乱法により定量し、これと類似の分子量を有する直鎖状ポリアルギニンと比較検討することにより、図2に示された発現効率の向上メカニズムについて考察した。

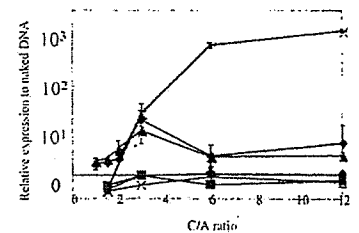


Figure 1. Transfection efficiency of R4 (x), R8 (■), R12 (●), R16 (◆), R20 (▲), and l-PEI (△). The COS-1 cell line was transfected with carrier/DNA complex. Reporter gene expression is given as CPS (count per second) per milligram of protein.

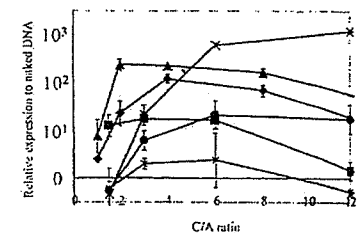


Figure 2. Transfection efficiency of R4s (x), R8s (■), R12s (●), R16s (◆), R20s (▲), and l-PEI (△). The COS-1 cell line was transfected with carrier/DNA complex. Reporter gene expression is given as CPS (count per second) per milligram of protein.

A key factor of self-organizing polymeric carriers affecting on the transcription efficiency of the transgene

Yumiko KOBAYASHI¹, Tomoko HASHIMOTO¹, Akio KOBORI¹, Akira MURAKAMI¹, and Tetsuji YAMAOKA²

¹Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology and

²Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute

JSAO 2005 オリジナル賞候補者発表

JSAO 2005 オリジナル賞候補者発表1

O1 完全生体吸収性ゲル化材料による細胞注入システムの開発

国立循環器病センター研究所生体工学部¹⁾, 京都工業繊維大学
繊維学部高分子学科²⁾, Boise State University³⁾

山岡 哲二¹⁾, 中野 順子²⁾, 藤原 知子³⁾, 藤原 俊哉¹⁾, 木村 良晴²⁾

【目的】アルツハイマーや心筋梗塞の治療法として注目されている細胞移植術において、細胞懸濁液を直接組織などに注入した場合には、足場と空間確保の問題から細胞の十分な機能を果たすことはできない。そこで、細胞注入を支援する材料として、温度変化に応答して水溶液から含水ゲルへ変化する生体吸収性材料の開発を進めている。従来から開発されているインジェクタブルスキャホールドには、光反応性基や、化学反応性基、あるいは、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)などの温度応答性ポリマーが利用されているが、その安全性は必ずしも確保されていない。我々は、ポリ乳酸とポリエチレングリコールという、生体内での利用実績に優れた2つの高分子材料のみを利用することで、全く新たなメカニズムに基づいた温度応答ゲル化性インジェクタブルスキャホールドを開発した。

【実験と結果】様々なブロック長を有するポリ-L-乳酸あるいはポリ-D-乳酸とポリエチレングリコールとのトリブロック共重合体を合成し、そのミセル分散液を調製した(それぞれ、PLLA-PEG-PLLA分散液およびPDLA-PEG-PDLA分散液)。得られた分散液を種々の混合液を、所定温度で所定時間処理した時のゲル化挙動を熱測定、nmr、および、IRにより追跡するとともに、同種細胞移植の媒体としての機能性をin vitro および in vivo にて評価した。

【結論】PLLA-PEG-PLLA分散液とPDLA-PEG-PDLA分散液との等量混合分散液を25度から、37℃に昇温することにより、透明なゲルが形成された。X線散乱測定により、温度上昇とともにPLLAとPDLAの間にステレオコンプレックス結晶が成長することが確認され、このステレオコンプレックス結晶の生成とともにこのゲル形成現象が進行することが確認された。得られたゲルの含水率は90%以上であり、その物質透過性に優れること、さらに、細胞毒性を誘発する一切の化学物質を利用していないことから、細胞生存率を下げることなく、対象部位に細胞を注入できるインテリジェントゲル化材料であることが明らかとなった。



SY1-7 幹細胞分離基材による組織再生材料の構築

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部¹⁾, 東京女子医科大学日本心臓血管研究所心臓血管外科学講座²⁾

馬原 淳¹⁾, 植上 智一¹⁾, 松村 剛毅²⁾, 新岡 俊治²⁾, 山岡 哲二¹⁾

【目的】自己幹細胞を用いて組織再生材料を構築する場合、目的とする幹細胞を単離し、多孔質スキャホールド上に効率よく播種する必要がある。現在、目的の幹細胞のみを単離するためには、表面レセプターの有無に基づいたFACS法や磁気ビーズ法が検討されているが、操作が煩雑で採取から移植までに長時間かかることが臨床への展開の障害となっている。本研究では、幹細胞の表面マーカーに対する特異抗体を基材表面へ固定化し、特定の幹細胞のみを連続的に単離するシステムの開発を目指した。この手法により、骨髄から目的の細胞へ分化が可能な幹細胞を接着させた再生組織を迅速に構築できる。本発表では、造血幹細胞の表面マーカーであるCD34に対する特異抗体を固定化したpolyethylene tubeおよびpoly(L-lactide-co-caprolactone) p(LA/CL) 表面の修飾法ならびに、これらの基材を用いたCD34陽性細胞の選択的な分離について検討した結果を報告する。

【実験と結果】p(LA/CA) 多孔質体を1NのNaOHで30分間加水分解することでカルボキシル基を導入し、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) によりカルボキシル基を活性化後anti-human CD34 mouse IgG 抗体 (CD34抗体) を固定化した。ペルオキシダーゼ標識抗体により固定化抗体密度は $7.6 \mu\text{g}/\text{m}^2$ であることを算出した。次に、CD34陽性細胞であるKG-1aと、CD34陰性細胞であるHL60が等量存在する細胞混合液をスキャホールドに通液後、溶出液をフローサイトメーターで解析した。その結果、KG-1a細胞に由来する蛍光シグナルが大きく減少し、HL60に由来するシグナルの割合が増加した。

【結論】細胞混合液中に存在するCD34陽性細胞は抗CD34抗体を固定化したスキャホールドへ選択的に接着した。この原理を骨髄液へ適応することで数%程度しか存在しない目的の幹細胞を選択的に単離できると考えられる。





ES-7 灌流システム下での多孔質スキャホールドへの特異的細胞播種

国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部¹⁾、鈴鹿医療科学大学²⁾馬原 淳¹⁾、北川 達哉¹⁾、筏 義人²⁾、山岡 哲二¹⁾

【目的】In vitroでの血管組織の三次元再構築化が多く検討されているが、幹細胞や体細胞の単離の問題に加えて、多孔質スキャホールド内全体への均一な細胞播種が容易ではなく、さらにスキャホールド深部でのネクロシスが問題となっている。本研究では、新規バイオリアクターを利用した灌流条件下での、細胞の播種/培養システムの構築を検討し、スキャホールドの表面特性や灌流速度をはじめとする培養条件が組織再生に与える影響を検討した。

【実験と結果】ポリ-L-乳酸(PLLA)、あるいは、ポリ(L-乳酸-co-ε-カプロラクトン)共重合体 p(LA/CL)からなる、細孔径の異なる多孔質スキャホールドを作製した。得られたスキャホールドを新たに設計した灌流型バイオリアクターにセットし、骨髄細胞、平滑筋細胞、あるいは、血管内皮細胞などを種々の条件下で灌流することによる特異的細胞播種効率および細胞増殖効率について検討した。また、灌流システム下でのシェアストレスが細胞の播種、増殖効率を低下させることが予想されるため、上記スキャホールド表面の細胞親和性を修飾することで、さらなる効率向上を図った。

【結論】静置または灌流状態で平滑筋細胞をスキャホールドに播種した時の細胞分布を3次元的に解析したところ、 $1.1\text{mL}/\text{cm}^2\cdot\text{min}$ という最適条件下においてスキャホールド全体に細胞を播種することが可能となり、また、従来の静置播種法に比較して遙かに優れた細胞播種効率を得られた。その後の、細胞増殖速度に対しては、さらに高い灌流速度が最適である事が明らかになったが、反面、シェアストレスによる細胞の流出も継続的に認められた。この細胞流出は、スキャホールド表面修飾による細胞親和性の向上により大きく改善され、3次元的に均一な細胞増殖が達成された。同様の、システムを利用して、中空スキャホールド内壁への内皮細胞特異的播種システム、および、骨髄細胞からの造血幹細胞特異的播種システムについても併せて報告する。

Program Number: 195 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Molecular design of non - viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency

T.Hashimoto^{1,3}; O.Mazda²; A.Murakami¹; T.Yamaoka³

1. *Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;*
2. *Department of Microbiology, Kyoto Prefectural University of Medicine, Kyoto, Kyoto, Japan;* 3.
Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

Viral gene carriers, which have mostly been used in clinical trials because of their excellent transfection efficiency, possess some drawbacks such as limited DNA size, toxicity and immunogenicity. Non-viral gene transfection systems, in contrast, are biologically safe, cost-effective and easy to manufacture compared with viral systems and show useful potentials. However, its application is also limited, because not only the optimum molecular design of effective non-viral gene carriers such as molecular weight, charge density and shape, but also intracellular trafficking of polyplexes has not been clarified yet. We have been focusing on the last step of the gene transfer, that is, the recognition of polyplexes by transcription factors in the nuclei. We have previously reported that the uncompact state of the polyplexes enhances the transcription efficiency.

In this work, we proposed an intracellular signal-responsive non-viral gene delivery system based on the enzymatic activity of the intracellular proprotein convertase (PC), furin. Cationic polypeptides containing furin recognizing sequences, Arg-Xaa-Arg/Lys-Arg, were cleaved by furin and fragmented. The fragmentation resulted in the intracellular destabilization of polyplexes and showed high reporter gene expression. These results indicated that this PC-induced gene delivery system is an effective strategy to enhance transcription efficiency.

Citation: T.Hashimoto, O.Mazda, A.Murakami, T.Yamaoka. Molecular design of non - viral gene carriers aiming at facilitated transcription efficiency. Program No. 195. *2005 Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer

Program Number: 962 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 8:00 PM - 10:00 PM

Soft tissue regeneration using novel biodegradable hydrogel/HAp composite materials

Y.Nakamura^{1,2}; A.Mahara²; A.Murakami¹; T.Yamaoka²

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;

2. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan

Recently, tissue regeneration using living cells and the artificial extracellular matrix called scaffolds has been attracting great attention as alternative strategies to the artificial organs or organ transplantation. In this treatment, collagen or its derivatives has been tested clinically as scaffolds for the regeneration of soft tissue such as skin tissue. However the antigenecity and biological contaminants of these bio-derived materials has been pointed out. The other promising biodegradable scaffold materials, poly-L-lactic acid (PLLA) derivatives, do not have enough flexibility and tissue compatibility.

In the present study, we have developed novel synthetic scaffold materials with high flexibility, rapid biodegradability, and excellent tissue compatibility. Multiblock copolymers composed of biodegradable hydrophobic segment, PLLA, and hydrophilic segment, polyethylene glycol (PEG), were newly synthesized. The copolymers with high PEG cotents were found to form bioinert soft hydrogels. Composite material of the hydrogel and hydroxyapatite (HAp) has been prepared by the alternate soaking process, because HAp was previously reported to have high tissue compatibility. Their *in vivo* evaluation indicated that the composite material induces tissue/cell ingrowth and was rapidly replaced with surrounding tissue. These results show the synthesized composite hydrogel are promissing scaffold for soft tissue regeneration.

Citation: Y.Nakamura, A.Mahara, A.Murakami, T.Yamaoka. Soft tissue regeneration using novel biodegradable hydrogel/HAp composite materials. Program No. 962. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer

Program Number: 482

Day / Time: Saturday, Dec. 17, 4:00 PM - 6:00 PM

Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration

T.Yamaoka²; S.Uchida^{1,2}; T.Higami¹; A.Murakami¹

1. *Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Kyoto, Japan;*
2. *Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan*

Tissue regeneration using biodegradable scaffolds such as poly(L-lactic acid) (PLLA) has been attracting great attention as a new alternating strategy to the artificial organs and organ transplantation. Although PLLA is an expectant biodegradable safe material, this is not necessarily an ideal substance for the scaffold from the viewpoint of the cell-compatibility and selectivity. Moreover, it is quite difficult to modify the surface characterization of PLLA because of the lack of side functional groups. In the present study, we developed some novel immobilization methods of bioactive molecules onto PLLA porous scaffolds.

Oligo peptide including Arg-Gly-Asp sequence (RGD oligo peptide) was selected to improve the non-specific cell adhesion properties of PLLAs. We newly synthesized Oligo(lactic acid)-(RGD)s block oligomers (OLA-RGD) and a small amount of the synthesized OLA-RGD was added to PLLA solution before fabricating the PLLA scaffold. The amphiphilic peptides migrated to the surface of the scaffolds and were stably immobilized due to the hydrophobic interaction and their cell adhesion property was greatly enhanced. In addition, immobilization of cell specific immunoglobulin onto the scaffolds and their improved selectivity of cell adhesion will be presented.

Citation: T.Yamaoka, S.Uchida, T.Higami, A.Murakami. Immobilization of bioactive molecules onto PLLA porous matrices for tissue regeneration. Program No. 482. *2005 Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer

Program Number: 1120

Day / Time: Monday, Dec. 19, 4:00 PM - 6:00 PM

In vitro vascular regeneration using biodegradable scaffold in the perfusion bioreactorT.Kitagawa^{1,2}; A.Murakami¹; T.Yamaoka²

1. Department of Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto, Japan; 2. Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishirodai, Suita, Osaka, Japan

In *in vitro* tissue regeneration using various bioreactors, cells should be seeded beforehand onto the scaffolds under the static culture condition, but it is quite difficult to seed them evenly throughout the entire scaffolds. Moreover, the cellular necrosis due to the severe anoxia and the lack of nutrients at the central part of the three-dimensional (3-D) scaffolds is the other big problem.

In the present study, we have designed a novel perfusion-type bioreactor and examined the effect of perfusion conditions on the smooth muscle cell (SMC) seeding and growth in tubular poly-L-lactic acid (PLLA) porous scaffolds. The cell suspension was flown from the luminal side to the lateral side of the scaffold for SMCs seeding. It is found that cell seeding at the perfusion rate of $1.1\text{ml}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$ was the most effective, and the seeded cells were distributed evenly overall the scaffolds. In the following cultivation, the perfusion rate affected not only on the growth rate but also on the collagen producing ability of SMCs. In addition, a gene transfection system to the cells under the perfusion condition with novel hydrophobized polycations-type gene carriers which enable the controlled release of plasmid DNA from PLLA scaffolds has been established.

Citation: T.Kitagawa, A.Murakami, T.Yamaoka. *In vitro* vascular regeneration using biodegradable scaffold in the perfusion bioreactor. Program No. 1120. 2005 Abstract Viewer. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer

Program Number: 219 Day / Time: Friday, Dec. 16, 4:00 PM - 6:00 PM

Long - lifetime Ru (II) complex - labeled probes for the evaluation of the dynamic feature of biomolecule and its interaction

T.Sakamoto¹; A.Mahara²; T.Munaka¹; A.Kobori¹; T.Yamaoka²; A.Murakami¹

1. *Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan*; 2. *Department of Biomedical Engineering, Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan*

To evaluate the dynamic feature of biomolecules and their interactions with other biomolecules, more sophisticated methodology that can analyze the feature in homogeneous physiological media is required. To fulfill this requirement, we adopted the time-resolved luminescence anisotropy (TR-LA)-based method using a long-lifetime Ru(II) complex as the luminescent molecule. In this report, we present two novel approaches: (1) for the evaluation of the structural dynamics of biomolecules and (2) for the development of the highly-sensitive detection system of the biomolecules in the presence of auto-fluorescence.

(1) 5'-Ru(II) complex-labeled oligoDNAs (Ru-probes) which were complementary to *Escherichia coli* 16S rRNA were synthesized and used to evaluate the rotational motion of the RNA strand by the TR-LA analysis. It was found that the rotational motion was significantly dependent on the site Ru-probe bound and the results suggest that the Ru-probe was applicable to evaluate the structural dynamics of folded RNAs. (2) *Staphylococcus aureus* protein A was labeled with Ru(II) complex (Ru-SpA) and used for detection of immunoglobulin G (IgG). It was found that the TR-LA analysis 50nsec after the pulse excitation enabled us to avoid the auto-fluorescence from the serum. These results suggested that the method was applicable to detect IgG with high-sensitivity in cell culture medium or serum.

Citation: T.Sakamoto, A.Mahara, T.Munaka, A.Kobori, T.Yamaoka, A.Murakami. Long - lifetime Ru (II) complex - labeled probes for the evaluation of the dynamic feature of biomolecule and its interaction. Program No. 219. 2005 *Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer

Program Number: 205 Day / Time: Sunday, Dec. 18, 4:00 PM - 6:00 PM

Development of novel photo - sensitive antisense oligonucleotides

M.Higuchi¹; A.Yamayoshi²; A.Kobori¹; T.Yamaoka³; A.Murakami¹

1. *Polymer Science and Engineering, Kyoto Institute of Technology, Kyoto, Japan*; 2. *Institute of Materials Chemistry and Engineering, Kyushu University, Fukuoka, Japan*; 3. *Advanced Medical Engineering Center, National Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Osaka, Japan*

Through the development of molecular biology, it was found that various serious diseases result from a consequence of single base point mutations in coding regions of genes. It is desired to inhibit selectively the expression of the disease-causing mutant gene without affecting its normal genes which are essential for cell survival. We developed novel antisense oligonucleotides to inhibit the expression of mRNA which has a point mutation. 4,5',8-Trimethylpsoralen (Ps), photo-crosslinking reagent, was conjugated with oligonucleotides at 2'-position (2'-Ps-oligo). Two kinds of 2'-psoralen-conjugated nucleosides were synthesized. Type I nucleoside has Ps via methylene linkage and type II nucleoside has Ps via amidomethylene linkage. 2'-Ps-oligo (type I) effectively crosslinked with the complementary oligoribonucleotide (oligo-RNA) at the designated base by UVA (365nm)-irradiation, whereas it scarcely crosslinked with the oligo-RNA having a mismatch base. These results suggest that 2'-Ps-oligo could discriminate a point mutation of RNA. It was also found that the effectiveness of the photo-crosslinking reaction was dependent on the length and structure of the linkage.

Citation: M.Higuchi, A.Yamayoshi, A.Kobori, T.Yamaoka, A.Murakami. Development of novel photo - sensitive antisense oligonucleotides. Program No. 205. *2005 Abstract Viewer*. Honolulu, Hawaii: International Chemical Congress of Pacific Basin Societies

Application Design and Programming Copyright ScholarOne, Inc. All Rights Reserved. Patent Pending.

Abstract Viewer