

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究

ナノ無機・有機複合塩を用いた遺伝子送達システムの開発

平成19年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 木村 剛

平成20年（2008）年 4月

目次

I. 総括研究報告

ナノ無機・有機塩を用いた遺伝子送達システムの開発 ----- 1

木村 剛

II. 分担研究報告

1. ナノ無機粒子の創製に関する研究 ----- 1 1

古菌 勉

2. ナノ無機・有機複合化研究・細胞・動物実験に関する研究 ----- 1 9

木村 剛

III. 研究成果の観光に関する一覧表 ----- 2 9

IV. 研究成果の刊行物・印刷 ----- 3 3

ナノ無機・有機塩を用いた遺伝子送達システムの開発

主任研究者 木村剛 東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 助教

研究要旨

非ウイルス型遺伝子ベクターとして求められる要素である低毒性・高遺伝子導入効率を兼ね備えた遺伝子ベクターを創出するため、超高压技術を用いたナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの創製について要素技術に関する詳細な検討を行った。ナノ無機粒子をハイブリッド化した水素結合性高分子/DNA 複合体の *in vivo* 遺伝子導入効率が改善された。

分担研究者

- (1) 木村 剛・東京医科歯科大学学生体材料工学研究所 助教
- (2) 古菌 勉・国立循環器病センター研究所 先進医工学センター 室長

A. 研究目的

ナノメディシン研究領域における遺伝子送達システム(Gene Delivery System : GDS)の開発の必要性は高く、重要課題の一つである。GDS 開発においては、低い細胞傷害性、高い遺伝子導入効率を兼ね備える遺伝子ベクターが望まれている。これまで、種々の無機塩、カチオン性脂質・ポリマーが用いられてきたが、未だ達成されていない。現在の主流のカチオン性物質においては、比較的高い遺伝子発現効率を示すものの、カチオン性に由来する細胞障害性が問題となっている。そこで本研究では、細胞障害性の低減を主眼に静電的相互作用を介さない遺伝子ベクターの創出のための要素技術開発を行っている。

これまで、6,000 気圧以上の超高压下では水素結合が強調されることに着目し、ポリビニルアルコール (PVA) と DNA の混合系を超高压処理(10,000 気圧)することにより、PVA/DNA 複合体が得られ

ることを明らかにした。得られた複合体は、水素結合を介した相互作用で形成されているため、細胞障害性の軽減が示された。更なる発現効率の向上を目指し、エンドソームからの脱出を促進するために無機塩の複合化法を考案した。エンドソームは、ライソソームとの融合により pH が低下するため、pH に応答して溶解する無機塩を用いることで、浸透圧ショックが起これ、エンドソームが破壊されると考えられる。本研究では、DNA と種々の水素結合性高分子と無機塩から構成される「DNA/高分子/無機塩複合体」を超高压法により創出し、低毒性、高遺伝子導入効率な新規ナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの開発を目的とする。

昨年度までは、(1) pH 応答性ナノ無機粒子の調製、(2) 水素結合性高分子/DNA 複合体の調製、(3) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入を検討した。また、(4) 高压凝縮 DNA の調製について検討した。

本年度は、(1) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の調製、(2) HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と細胞接着性、(3) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/

DNA 複合体を用いた in vivo 遺伝子導入、さらに、
(4) 高圧凝縮 DNA を用いた in vivo 遺伝子導入
を検討した。

(1) の「pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性
高分子/DNA 複合体の調製」については、最適な
複合体調製条件の探索を目的とした。本研究では、
ナノ無機粒子を水素結合性高分子/DNA 複合体に
含有させ、エンドサイトーシス経路の pH 低下時に
pH 応答的にナノ無機粒子を溶解させることで、エン
ドソーム小胞を崩壊させ、細胞内に導入するス
トラテジーをとっている。これまで、pH 応答性ナ
ノ無機粒子の分散安定性の向上を高分子溶液の添
加による達成しており、本年度は、超高压印加処
理を行うことでナノスケールの複合体の調製とそ
のサイズ制御を目的とした。

(2) の「HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と
細胞接着性」については、HAp は細胞親和性が高
く、ハイドロゲル中に含有させることで HAp に細
胞が接着可能であると考えられる。遺伝子を含む
ハイドロゲルに HAp を含有させることで、接着し
た細胞への効率良い遺伝子導入がすることが可能
であると考えられる。このことから、HAp 含有 PVA
ハイドロゲルの調製と細胞接着性に関する検討を
行った。

(3) の「pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性
高分子/DNA 複合体を用いた in vivo 遺伝子導入」
については、pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性
高分子/DNA 複合体を用いた培養細胞への遺伝子
送達においては、遺伝子導入の向上が示されてい
ることから、マウスへの遺伝子導入について検討
した。マウスへの遺伝子導入は、肝臓特異的に遺
伝子導入可能なハイドロダイナミックス法を用い
た。これにより、効率的に複合体の性能・機能を
評価できると考えられる。

(4) の「高圧凝縮 DNA を用いた in vivo 遺
伝子導入」については、昨年度までにプラスミド DNA
単独への超高压印加によりプラスミド DNA が凝
縮されることを明らかにした。これは、従来の正
電荷物質を用いた静電的相互作用とは異なる新し
い凝縮法と言える。また、その凝縮は可逆的に引

き起こされることから、細胞内での被転写・翻効
率の向上と凝縮からの巻き戻りに由来する遺伝子
発現の遅延が期待出来る。

B. 研究方法

(1) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子 /DNA 複合体の調製

改良型マイクロエマルジョン法にてナノ HAp
粒子の調製を行った。また、炭酸リン酸カルシウ
ムナノ無機粒子は、湿式法にて、酸性溶液として
リン酸 2 水素アンモニウムおよび炭酸ナトリウム
を用い、それぞれの溶液を所定の混合比で総濃
度 100mM の水溶液を作製し、硝酸カルシウム水
溶液（終濃度：42mM）と混合し、室温あるいは
80℃にて反応させた。得られたナノ無機粒子と
PVA と DNA を混合し、超高压印加処理（10000
気圧、40℃、15 分間）を施し、ナノ無機粒子/PVA
/DNA 複合体を調製し、粒子径および分散性を
DLS 測定により計測した。

(2) HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と細胞接着 性

7.5、10%のPVA (PD:1700) 水溶液を調製し、
終濃度1%となるようにHAp (50, 400nm) を混合・
攪拌した。その後、超高压印加処理（10,000気圧、
10分間、40℃）を施し、HAp/PVAハイドロゲルを
得た。得られたHAp/PVAハイドロゲルのSEM観察
を行った。L929細胞、MC3T3細胞、ラット骨髄細
胞 (rBMC) 細胞を蛍光色素に依り標識し、所定数
播種した後、蛍光顕微鏡観察を行った。

(3) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子 /DNA 複合体を用いた in vivo 遺伝子導入

水素結合性高分子/DNA 複合体を用いたマウ
スへの in vivo 遺伝子導入については、水素結合性
高分子として PVA (重合度 1700) を用い、遺伝子
としてはルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラ
スミド DNA (pLuc) を用いた。PVA 水溶液を調
製し、終濃度 0.001%となるように DNA 溶液（終

濃度:25ng/ μ l)と混合した。超高压印加処理(10000気圧、15分間、40°C)を施した。PVA/DNA複合体溶液200 μ lを生理的食塩水1.4~1.8mlと混合し、マウス(20~30g)の尾静脈より5~6秒間で投与した(ハイドロダイナミックス)。24時間後の肝臓でのルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ活性測定キットにて測定した。

ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体を用いたマウスへのin vivo遺伝子導入については、ナノ無機粒子としては、ハイドロキシアパタイト(HAp)と炭酸アパタイト(cHAp)を用い、水素結合性高分子としてPVA(重合度1700)を用い、遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドDNA(pLuc)を用いた。PVA水溶液(終濃度:0.001%)とナノ無機粒子(終濃度:0.001%)を混合し、超音波処理を5分間行った。その後、DNA溶液(終濃度:25ng/ μ l)と混合した。超高压印加処理(10000気圧、15分間、40°C)を施した。ナノ無機粒子/PVA/DNA複合体溶液200 μ lを生理的食塩水1.4~1.8mlと混合し、マウス(20~30g)の尾静脈より5~6秒間で投与した(ハイドロダイナミックス)。12, 24, 48, 72時間後の肝臓でのルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ活性測定キットにて測定した。

(4) 高压凝縮DNAを用いたin vivo遺伝子導入

高压凝縮DNAを用いたマウスへのin vivo遺伝子導入については、遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドDNA(pLuc)を用いた。25ng/ μ lのDNA溶液を調製し、超高压印加処理(10000気圧、15分間、40°C)を施した。DNA溶液200 μ lを生理的食塩水1.4~1.8mlと混合し、マウス(20~30g)の尾静脈より5~6秒間で投与した(ハイドロダイナミックス)。12, 24, 48, 72時間後の肝臓でのルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ活性測定キットにて測定した。

C. 研究結果

(1) pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製

リン酸溶液とカルシウム溶液とDNA溶液の混合により形成されるリン酸カルシウム/DNA共沈殿法は、簡便かつ安価で行えるため、細胞培養へのin vitro遺伝子導入の一般的な手法となっている。しかしながら、再現性が低く、また、カチオン性高分子、カチオン性脂質などの他の遺伝子導入材料と比べて導入効率は依然として低いため、in vivo遺伝子導入に用いられていない。この原因の一つとして、生成されるリン酸カルシウムの結晶性を制御できないため、さまざまな形態、サイズ、物性の共沈殿物(粒子)が得られることが挙げられる。これらの物性は遺伝子導入効率を大きく左右し、サイズの微小な粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少すると報告されている。このことから、本研究では、物性の制御されたナノスケールの無機粒子の応用を検討した。また、本研究では、得られたナノ無機粒子を水素結合性高分子/DNA複合体に含有させて用いる。ナノ無機粒子を含有する水素結合性高分子/DNA複合体は、エンドサイトーシス経路を介して細胞内に取り込まれると考えられ、エンドサイトーシス過程のpH5.5への低下時にナノ無機粒子が溶解されれば、浸透圧ショックによりエンドソームが崩壊され、効率良く細胞質内に遺伝子が移行されることが考えられる。従って、ナノ無機粒子が求められる機能としては、pHに応答した溶解性を有することである。以上のことから、昨年度までは、pH応答性かつ均一形状のナノ無機粒子の創製について検討した。改良型マイクロエマルジョン法にて得られるリン酸カルシウムの結晶制御を仮焼行程の有無によりナノHAp粒子のpH応答性のコントロールを行った。その結果、仮焼行程を施さないナノHAp粒子にて、エンドサイトーシス過程のpH低下時のpH=5.5付近で有意な溶解が示された。また、更なるpH応答性の向上を目的として、リン酸カルシウムのみでなく炭酸カルシウムの調製を検討した。ナノ無機粒子調製時

に、炭酸とリン酸の含有量を変化させることで得られるナノ無機粒子の pH 応答性の制御を試みた。炭酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。得られた種々のナノ無機粒子の酸溶解性試験の結果、リン酸カルシウム粒子においては、pH5.5 付近では溶解されず、pH5 以下にて溶解され、炭酸リン酸カルシウム粒子においては、pH6 付近にて溶解され始め、pH5.5 では約 70%が溶解された。

これらのナノ無機粒子をもちいて、ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体を超高圧印加により調製した。ここでは、PVA 濃度を 0.001~0.1%、ナノ無機粒子濃度を 0.001%、DNA 濃度を 25ng/ μ l で行った。得られた複合体のサイズを DLS 測定により計測した。PVA/DNA 複合体の複合体の平均粒子径は約 200nm であった。ナノ HAp/PVA/DNA 複合体およびナノ炭酸・リン酸カルシウム粒子/PVA/DNA 複合体は、ともに 500nm の粒子径であった。PVA/DNA 複合体にナノ無機粒子が含有されたため、粒子径が増加したと考えられる。また、高 PVA 濃度では、800nm 以上の粒子径を示し、濃度増加による粒子径の増加が認められた。PVA 濃度 0.1% では、マイクロオーダーの粒子径の増加が示された。これらの結果から、至適 PVA 濃度範囲としては 0.001~0.1%と考えられる。

(2) HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と細胞接着性

次に、HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と細胞接着性に関する検討を行った。超高圧印加法により、PVA/HAp ハイドロゲルを作製された。PVA ハイドロゲル、HAp/PVA ハイドロゲルの走査型電子顕微鏡観察した結果、PVA ハイドロゲルにおいては、スムーズな表面が観察され、一方の、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、HAp 粒子が表面にて観察された。HAp の表面被覆率は 10%PVA に比べて 7.5%PVA で高かった。また、50nm の HAp に比べ 400nm の HAp の場合に表面被覆傾向が示された。

細胞接着性について、L929 細胞、MC3T3 細胞、

rBM 細胞を用いて検討した。細胞は蛍光色素で染色した後、蛍光顕微鏡下で観察した。L929 細胞においては、PVA 濃度に依らず、PVA ハイドロゲルでは細胞の接着が示されなかった。一方、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、有意な細胞の接着・伸展が観察された。7.5%と 10%の PVA 濃度の比較では、7.5%の PVA 濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。MC3T3 細胞では、いずれの PVA 濃度においても、PVA ハイドロゲル上にて若干の接着細胞が観察されたが、細胞の伸展は示されなかった。一方、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、有意な細胞の接着・伸展が観察された。7.5%と 10%の PVA 濃度の比較では、7.5%の PVA 濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。rBM 細胞においても、PVA ハイドロゲルでの細胞接着が観察されたが、細胞の伸展は示されなかった。PVA 濃度 7.5%においては細胞が多数観察されたが、これは表面の凹凸によるものと考えられる。一方、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、有意な細胞の接着・伸展が観察された。7.5%と 10%の PVA 濃度の比較では、7.5%の PVA 濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。以上より、HAp を含有することで PVA ハイドロゲル上での細胞の接着が促進された。HAp の表面被覆率の高い 7.5%PVA での若干の高接着性が示された。

(3) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を用いた in vivo 遺伝子導入

ハイドロダイナミックス法は、肝臓特異的に遺伝子発現を示すことが知られており、遺伝子ベクターの遺伝子導入能を検討するのに適した方法である。ハイドロダイナミックス法にて in vivo 遺伝子導入を行ったマウスの肝臓でのルシフェラーゼ活性 (24時間後) を測定した。未処理 DNA 単独の場合、約 3×10^6 /mg protein のルシフェラーゼ活性を示した。一方の PVA/DNA 複合体では、未処理 DNA 単独に比して約 1/4 にルシフェラーゼ活性が減少した。

ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合

体を用いたマウスへのin vivo遺伝子導入については、炭酸アパタイト/水素結合性高分子/DNA複合体、ハイドロキシアパタイト/水素結合性高分子/DNA複合体を用いたハイドロダイナミックス法によるin vivo遺伝子導入後のマウスの肝臓でのルシフェラーゼ活性を測定した。炭酸アパタイト/PVA/DNA複合体、ハイドロキシアパタイト/PVA/DNA複合体ともに未処理DNA単独に比して約10倍のルシフェラーゼ活性の増加が示された。これは、上述のPVA/DNA複合体では示されなかった結果であり、ナノ無機粒子の含有効果と言える。一方、PVA濃度の高い場合は若干のルシフェラーゼ活性の減少が示された。

次に、遺伝子発現の経時変化について、未処理DNA単独とハイドロキシアパタイト/PVA/DNA複合体を用いて検討した。未処理のDNA単独の場合、投与後12時間後に遺伝子発現が最大となり、その後経時的に減少した。一方、ハイドロキシアパタイト/PVA/DNA複合体では、24時間後に最大の遺伝子発現を示し、その後は急激に減少した。

(4) 高圧凝縮DNAを用いたin vivo遺伝子導入

10000気圧、15分間、40℃の超高压印加処理にて得られた高圧凝縮DNAを用いたマウスへのin vivo遺伝子導入におけるルシフェラーゼ活性の経時変化を検討した。コントロールとしては、未処理DNA単独を用いた。未処理のDNA単独の場合、投与後12時間後に遺伝子発現が最大となり、その後経時的に減少した。一方、高圧圧縮DNAでは、12時間後では、未処理DNA単独に比して低いルシフェラーゼ活性であったが、24時間後には同程度の活性に増加し、さらに、48時間後には約10倍以上のルシフェラーゼを示した。

高圧凝縮DNAの基礎的物性について、AFM観察、一本鎖DNA特異的切断酵素試験を行った(図5,6)。AFM観察では、超高压未処理のプラスミドDNAは環状およびスーパーコイル状のプラスミドDNAが観察された。一方の高圧凝縮DNAでは、スーパーコイル型プラスミドDNAとスーパーコイル型プラスミドDNAがさらに巻かれた凝縮構造をとるプラ

スミドDNAが観察された。スーパーコイル型プラスミドDNAにおいても部分的に球形が観察されていることから、高圧印加によりヘリシティが増加し、徐々に部分的に巻かれていったと考えられる。一本鎖DNA特異的切断酵素試験においては、超高压未処理のプラスミドDNAではS1ヌクレアーゼの添加量の増加に伴い、若干の切断が示された。一方の高圧凝縮DNAでは、S1ヌクレアーゼの添加量の増加に伴い、顕著な切断が認められ、100単位添加において切断されたDNAがスメアーなバンドが示され、さらに、100単位添加においては、オリジナルのバンドはほぼ消失し、スメアーなバンドだけとなった。

D. 考察

pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製については、超高压印加によりナノ無機粒子の種類に依らず、同程度のナノスケールのナノ無機粒子/PVA/DNA複合体が得られた。これは、高分子溶液と混合することでナノ無機粒子の分散安定性が向上したためと考えられる。また、PVA濃度により得られるナノ無機粒子/PVA/DNA複合体のサイズコントロールが可能であった。これは、従来の遺伝子導入キャリアーであるカチオン性ポリマー・リポソーム等では非常に困難であり、本超高压印加法の特徴と言える。すなわち、カチオン性ポリマー・リポソーム等は、静電的相互作用をDNAとの複合化の駆動力としており、得られる複合体のサイズは、量論的に制御される。一方の超高压印加法においては、水素結合がDNAの複合化の駆動力となり、状態による制御となる。

HAp含有PVAハイドロゲルの調製と細胞接着性については、HAp含有PVAハイドロゲルにおいては、HApの表面被覆率は10%PVAに比べて7.5%PVAで高く、また、50nmのHApに比べ400nmのHApの場合に表面被覆傾向が示された。これについては、低い濃度においてHAp粒子とPVAの相互作用が減少したと考えられ、また、粒子サイ

ズが大きい場合に無機粒子間の相互作用が強かったためと考えられる。細胞接着性については、HApを含有することでPVA水ゲル上での細胞の接着が促進され、7.5%のPVA濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。すなわち、HApの表面被覆率の高い7.5%PVAでの若干の高接着性が示された。これについては、HApが十分な細胞接着点として作用することを示している。

PVA/DNA複合体を用いた水動的ダイナミクス法によるマウスへの*in vivo*遺伝子導入については、PVA/DNA複合体においては、これまでに培養細胞を用いた遺伝子導入にて効率良い細胞内導入が示されているものの、遺伝子発現は低いことが明らかとなっており、また、細胞内での遺伝子の被転写・翻訳モデルである無細胞系転写・翻訳においても、PVA/DNA複合体の低い転写・翻訳が示されている。これらの結果は、細胞内に導入されたPVA/DNA複合体の低い被転写・翻訳効率を示しており、図1に示された*in vivo*遺伝子導入におけるPVA/DNA複合体の低い遺伝子発現の原因の一つと考えられる。

ナノ無機粒子/PVA/DNA複合体を用いた水動的ダイナミクス法によるマウスへの*in vivo*遺伝子導入については、ナノ無機粒子/PVA/DNA複合体においては、昨年度の培養細胞への遺伝子導入にてPVA/DNA複合体に比して高い遺伝子発現を示しており、今回の*in vivo*遺伝子導入でも高い遺伝子発現を示し、ナノ無機粒子の含有効果と言える。一方、培養細胞系においては、水動的ダイナミクス法に比して炭酸アパタイトの細胞内導入促進が示されていたが、今回の*in vivo*遺伝子導入ではその違いが示されなかった。これについては、今回の水動的ダイナミクス法による遺伝子導入が細胞内への遺伝子送達をある程度強制的に行える手法であるため、培養細胞での遺伝子導入過程のエンドサイトーシスを経由していないためと考えられる。すなわち、水動的ダイナミクス法においてはナノ無機粒子の含有がエンドサイトーシスからの遊離促進効果以外の何らかのメカニズムに作用しているものと考えられる。

これについては今後詳細な検討を必要とする。また、高濃度PVAのナノ無機粒子/PVA/DNA複合体では遺伝子発現の減少が示された。これについては、PVA濃度の低いナノ無機粒子/PVA/DNA複合体では粒子径が約600nmであり、PVA濃度が高いナノ無機粒子/PVA/DNA複合体では約1000nmであり、これらの粒子径の違いが影響したものと考えられる。

高圧凝縮DNAを用いた水動的ダイナミクス法によるマウスへの*in vivo*遺伝子導入については、高圧凝縮DNAにおいては、経時的な遺伝子発現の増加が示された。未処理DNA単独の場合は、遺伝子発現の経時的減少が示されており、細胞内での分解による減少と考えられる。一方の高圧凝縮DNAは、凝縮による核酸分解酵素の耐性が示されていることから遺伝子発現の安定化あるいは、凝縮からの巻き戻りが考えられる。現在においては、初期のルシフェラーゼ活性が未処理DNA単独に比して低いことから、後者のDNAの巻き戻りによる遺伝子発現増加と考えている。

E. 結論

本年度は、(1) pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製、(2) HAp含有PVA水ゲルの調製と細胞接着性、(3) pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体を用いた*in vivo*遺伝子導入、さらに、(4) 高圧凝縮DNAを用いた*in vivo*遺伝子導入を検討した。

pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製については、超高压印加によりナノ無機粒子/PVA/DNA複合体が得られ、また、PVA濃度依存的に複合体のサイズ制御が可能であった。これらのことから、本研究の目的である複合体の作製手法がほぼ確立できたと考えられる。

HAp含有PVA水ゲルの調製と細胞接着性については、HApを含有するPVA水ゲルも調製でき、HAp含有PVA水ゲル上では、細胞がHApを足場として接着することが明らか

となった。これは、DNA を含有する HAp/PVA ハイドロゲルを作製することで、HAp/PVA ハイドロゲルに接着する細胞のみへの効率的遺伝子導入の可能性を示唆している。

pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を用いた in vivo 遺伝子導入については、PVA/DNA 複合体では、未処理のプラスミド DNA 単独に比して遺伝子発現の低下が示され、pH 応答性ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体において遺伝子発現の増加が示されたことから、本研究のストラテジーの一つであるナノ無機粒子の含有効果が示されたと考えられる。

高压凝縮 DNA を用いた in vivo 遺伝子導入については、超高压処理により誘起される DNA 構造変化（凝縮）が遺伝子発現の機能向上（遺伝子発現の持続）を示した。これは、全くの新しい知見であり、核酸構造科学の視点から意義深い知見と考えられる。また、遺伝子発現の持続は、現在の遺伝子治療臨床研究における Naked plasmid DNA 法への応用においても有効でと考えられ、また、高压印加のみの他の物質を利用しない点は、効率的な実用的開発が期待できる。さらに、現在の遺伝子キャリアーの主流である正電荷物質では、静電的相互作用による強度の凝縮が遺伝子発現を抑制していることから、これらの遺伝子キャリアー開発においても応用可能でと考えられる。具体的には、高压凝縮 DNA の利用では、同程度の凝縮度を得るにあたり正電荷物質の添加量を低減させることが出来ると考えられ、これは、正電荷物質に由来する細胞傷害性を低減でき、巻き戻りの効果（遺伝子発現の遅延）を付与できることから効率的に遺伝子導入することが可能と考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1). Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiya Moritan, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono,

Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery, *Journal of Artificial Organs*, 10, 104-108, 2007

2). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Physical and biological properties of collagen-phospholipid polymer hybrid gels, *Biomaterials*, 28, 3153-3162, 2007

3). Tsuyoshi Kimura, Seiichi Funamoto, Akio Kishida. Gene transfection on the tissue engineered bone decellularized by ultra high hydrostatic pressurization, *Controlled Release Society Newsletter*, 24(2), 10-11, 2007

4). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Characteristics of compacted plasmid DNA by high pressurization, *Nucleic Acids Symposium Series*, No51, 343-344, 2007

5). Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida, Pressure-induced Molecular Assembly of Hydrogen-bonded Polymers, *Journal of Polymer Science Part B, Polymer Physics*, 46, 743-750, 2008

6). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Controlling Coupling Reaction of EDC and NHS for Preparation of Collagen Gels Using Ethanol/Water Co-Solvents, *Macromolecular Bioscience*, 8, 32-37, 2008

7). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Kwangwoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato,

Akio Kishida, Preparation and characterization of the condensed plasmid DNA by high hydrostatic pressurization, in preparation

2. 学会発表

- 8). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧凝縮DNAの基礎的検討と遺伝子デリバリーへの応用、遺伝子・デリバリー研究会 第7回シンポジウム要旨集、32、2007
- 9). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧印加によるPEG/多糖水性二相形成の促進、Polymer Preprints, Japan, Vol.56, No.1, 1926 2007
- 10). 三浦義之、木村剛、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫 超高压誘起PVAハイドロゲルの調製と物性に関する検討、Polymer Preprints, Japan Vol.56, No.1, 1861, 2007
- 11). 木村剛、堀内可奈、栗田公夫、三浦義之、吉澤秀和、岸田晶夫、高圧凝縮 DNA の調製と機能解析、Polymer Preprints, Japan Vol.56, No.1, 1952, 2007
- 12). Tsuyoshi Kimura, Kwangoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Assembling of hydrogen-bonding-polymers using high pressure technology, Proceedings of The International Symposium Organized by Institute of Chemical Research (ICR) Kyoto University, 107-108, 2007
- 13). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、pH応答性ナノ無機粒子を含有する水素結合性ポリマー/DNA複合体の細胞内送達、Drug Delivery System, 22-23, 363, 2007
- 14). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸悟、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起ナノ高分子集合体のDDSへの応用、Fiber Preprints, Japan, 62, No2,(symposia), 14, 62(2), 14, 2007
- 15). Tsuyoshi Kimura, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Cellular delivery of DNA-polymer complex encapsulating inorganic nanoparticles prepared by ultra high pressurization, Tissue Engineering, 13, 1746-47, 2007
- 16). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、小野努、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧技術を用いたプラスミドDNAの凝縮操作、Polymer Preprints, Japan, 56(2), 5323-24, 2007
- 17). 三浦義之、木村剛、栗田公夫、小野努、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高静水圧誘起PVAゲルの特性解析、Polymer Preprints, Japan, 56(2), 3832, 2007
- 18). 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、細胞への遺伝子送達における高圧技術応用、第5回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集、102, 2007
- 19). 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、遺伝子送達における高圧技術の応用、第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、418, 2007
- 20). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, DNA condensation using hydrostatic pressurization for gene delivery, 1st Asiam Biomaterials Congress Abstract, 302, 2007
- 21). 木村剛、岸田晶夫、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、圧縮DNAの遺伝子送達への

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特願 2007-263704、岸田晶夫、木村剛、南
広祐、藤里俊哉、「機能性 DNA の製造方法、
形質転換体、及び疾患治療剤」、2007年10
月9日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ナノ無機粒子の創製に関する研究

分担研究者 古菌勉 国立循環器病センター研究所先進医工学センター 室長

研究要旨

ナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの創製のための無機材料としてナノ無機粒子を選択し、pH 応答性ナノ無機粒子を用いたナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体の調製に関して検討した。ナノスケールの粒子径を有する複合体が得られ、また、調製条件によりそれらの粒子径の制御が可能であった。

A. 研究目的

リン酸カルシウムを主成分とする骨、歯など硬組織に対する代替移植材料として、従来からリン酸カルシウム（ハイドロキシアパタイト（ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$: HAp）、 β -三リン酸カルシウム（ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: β -TCP）など様々な無機材料が検討されており、その生体適合性は高い。また、無機材料は遺伝子導入材料としても利用されており、リン酸カルシウムが主流となっている。DNA 溶液と水酸化カルシウム溶液を混合し、その後、リン酸緩衝液と混合することによりリン酸カルシウム/DNA 共沈殿物が形成される。その共沈殿物がエンドサイトーシスを介して細胞に取り込まれ、遺伝子が導入される（リン酸カルシウム法）。リン酸カルシウム法は、特殊な機器、試薬を使用しないため研究室レベルの培養細胞への *in vitro* 遺伝子導入法として一般的な方法の一つとなっている。しかしながら、遺伝子導入の再現性が低く、また、高分子、脂質などの他の遺伝子導入材料と比べてその効率は依然として低い。この原因の一つとして、リン酸カルシウム/DNA 共沈殿物の不均一性が考えられる。共沈殿物の生成時においては、産生されるリン酸カルシウム結晶の生成制御

がなされず、さまざまな形態、サイズのリン酸カルシウム/DNA 複合体が得られる（リン酸カルシウムは、その結合状態により様々な種類があり、その物性は異なる）。それら複合体は安定化ために凝集し、不均一な凝集体が形成される。不均一凝集体の生成が再現性の低下の一因となり、また、細胞内への取り込み、あるいは、細胞内で遺伝子発現の低再現性、低効率の原因となると考えられている。これまで、リン酸カルシウム/DNA 複合体・凝集体のサイズ、溶解性などの物性が遺伝子導入効率を大きく左右することが報告されており、導入効率は、微小なサイズの場合に高く、凝集化に伴い減少する。そこで本研究では、安定かつ均一形状を有するナノサイズの無機粒子の創製を目的の一つとした。

また、本研究では、従来のリン酸カルシウム法のようにナノ無機粒子と DNA とを複合化させるのではなく、水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させる、すなわち、ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体として用いる。この理由を以下に述べる。現在、細胞内への遺伝子送達における最大の障壁として、遺伝子送達過程うちエンドソームでの DNA 分解過程が挙げられている。こ

れまで、この過程における DNA 分解の抑制法として、クロロキン、膜透過性ペプチド、膜融合性ペプチドなどが研究されているが、それぞれ、合成化合物、ウイルスの一部であるため、その利用制限は大きいと考えられる。そこで本研究では、生体成分から構成される無機粒子を用いることとした。無機粒子の利用にあたり、エンドサイトーシス経路ではライソゾームとの融合による pH の低下 (pH=5.5 以下) が知られていることから、pH5 付近で溶解される無機粒子を創製することを目的とした。作業仮説としては、ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体がエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれた後、ライソゾームとの融合による pH 低下に反応して無機粒子が溶解し、その浸透圧ショックにより、エンドソームが破壊され、遺伝子導入が促進される。このような無機・有機ハイブリッド型の遺伝子デリバリーは少なく、これまで、片岡らにより開発された高分子ミセルの内核でリン酸カルシウム結晶を形成させる方法のみである。プラスミド DNA のみではなく、短鎖のオリゴ DNA および siRNA の内包が可能であり、いずれも粒径数百ナノメートルのミセルが形成される。この有機・無機ハイブリッドナノミセルの細胞質内へのデリバリーおよび核移行が示され、siDNA の導入による顕著な遺伝子ノックダウンが培養細胞系において確認されている。これは先に述べたように、エンドソームの pH が 5.5 であり、リン酸カルシウムの溶解によって核酸分子の効率的なエンドソームエスケープがなされたと考えられている。

昨年度までは、分担研究者の古菌らが発案した改良型マイクロエマルジョン法により HAp の形状および結晶性 (溶解性) 制御を行った。球状、ロッド状の HAp 粒子が得られ、結晶化を促進する焼結行程の有無によりナノ HAp 粒子の酸溶解性の制御に成功した。また、さらなる pH 応答性の向上を目的として、炭酸塩およびリン酸塩から構成されるナノ無機粒子の調製について検討した。得られた炭酸リン酸カルシウムナノ無機粒子の pH 応答性について酸溶解試験を行った結果、pH6

付近にて溶解され始め、pH5.5 では約 70% が溶解され、炭酸を含有することでリン酸カルシウム粒子の酸溶解性を制御することができることが示唆された。

本年度は、上述のヒドロキシアパタイトおよび炭酸リン酸カルシウムナノ無機粒子と PVA と DNA の複合体形成について検討を行った。

また、HAp は細胞親和性が高く、ヒドロゲル中に含有させることで HAp に細胞が接着可能であると考えられる。遺伝子を含むヒドロゲルに HAp を含有させることで、接着した細胞への効率良い遺伝子導入がすることが可能であると考えられる。このことから、HAp 含有 PVA ヒドロゲルの調製と細胞接着性に関する検討を行った。

B. 研究方法

(1) pH 応答性ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体の調製

改良型マイクロエマルジョン法にてナノ HAp 粒子の調製を行った。また、炭酸リン酸カルシウムナノ無機粒子は、湿式法にて、酸性溶液としてリン酸 2 水素アンモニウムおよび炭酸ナトリウムを用い、それぞれの溶液を所定の混合比で総濃度 100mM の水溶液を作製し、硝酸カルシウム水溶液 (終濃度: 42mM) と混合し、室温あるいは 80°C にて反応させた。得られたナノ無機粒子と PVA と DNA を混合し、超高压印加処理 (10000 気圧、40°C、15 分間) を施し、ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体を調製し、粒子径および分散性を DLS 測定により計測した。

(2) HAp 含有 PVA ヒドロゲルの調製と細胞接着性

HAp 含有 PVA ヒドロゲルの調製と細胞接着性に関する検討としては、7.5、10% の PVA (PD:1700) 水溶液を調製し、終濃度 1% となるように HAp (50, 400nm) を混合・攪拌した。その後、超高压印加処理 (10,000 気圧、10 分間、40°C) を施し、HAp/PVA ヒドロゲルを得た。得られた HAp/PVA ヒドロゲルの SEM 観察を行った。L929

細胞、MC3T3 細胞、ラット骨髄細胞 (rBMC) 細胞を蛍光色素に依り標識し、所定数播種した後、蛍光顕微鏡観察を行った。

C. 研究結果

(1) pH 応答性ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体の調製

リン酸溶液とカルシウム溶液と DNA 溶液の混合により形成されるリン酸カルシウム/DNA 共沈殿法は、簡便かつ安価で行えるため、細胞培養への *in vitro* 遺伝子導入の一般的な手法となっている。しかしながら、再現性が低く、また、カチオン性高分子、カチオン性脂質などの他の遺伝子導入材料と比べて導入効率は依然として低いため、*in vivo* 遺伝子導入に用いられていない。この原因の一つとして、生成されるリン酸カルシウムの結晶性を制御できないため、さまざまな形態、サイズ、物性の共沈殿物 (粒子) が得られることが挙げられる。これらの物性は遺伝子導入効率を大きく左右し、サイズの微小な粒子の場合に導入効率は高く、粒子の凝集化に伴い導入効率は減少すると報告されている。このことから、本研究では、物性の制御されたナノスケールの無機粒子の応用を検討した。また、本研究では、得られたナノ無機粒子を水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させて用いる。ナノ無機粒子を含有する水素結合性高分子/DNA 複合体は、エンドサイトーシス経路を介して細胞内に取り込まれると考えられ、エンドサイトーシス過程の pH5.5 への低下時にナノ無機粒子が溶解されれば、浸透圧ショックによりエンドソームが崩壊され、効率良く細胞質内に遺伝子が移行されると考えられる。従って、ナノ無機粒子が求められる機能としては、pH に応答した溶解性を有することである。以上のことから、昨年度までは、pH 応答性かつ均一形状のナノ無機粒子の創製について検討した。改良型マイクロエマルジョン法にて得られるリン酸カルシウムの結晶制御を仮焼行程の有無によりナノ HAp 粒子の pH 応答性のコントロールを行った。その結果、仮焼

行程を施さないナノ HAp 粒子にて、エンドサイトーシス過程の pH 低下時の pH=5.5 付近で有意な溶解が示された。また、更なる pH 応答性の向上を目的として、リン酸カルシウムのみでなく炭酸カルシウムの調製を検討した。ナノ無機粒子調製時に、炭酸とリン酸の含有量を変化させることで得られるナノ無機粒子の pH 応答性の制御を試みた。炭酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。得られた種々のナノ無機粒子の酸溶解性試験の結果、リン酸カルシウム粒子においては、pH5.5 付近では溶解されず、pH5 以下にて溶解され、炭酸リン酸カルシウム粒子においては、pH6 付近にて溶解され始め、pH5.5 では約 70%が溶解された。

これらのナノ無機粒子をもちいて、ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体を超高压印加により調製した。ここでは、PVA 濃度を 0.001~0.1%、ナノ無機粒子濃度を 0.001%、DNA 濃度を 25ng/ μ l で行った。得られた複合体のサイズを DLS 測定により計測した (図 1)。PVA/DNA 複合体の複合体の平均粒子径は約 200nm であった。ナノ HAp/PVA/DNA 複合体およびナノ炭酸・リン酸カルシウム粒子/PVA/DNA 複合体は、ともに 500nm の粒子径であった。PVA/DNA 複合体にナノ無機粒子が含有されたため、粒子径が増加したと考えられる。また、高 PVA 濃度では、800nm 以上の粒子径を示し、濃度増加による粒子径の増加が認められた。PVA 濃度 0.1%では、マイクロオーダーの粒子径の増加が示された。これらの結果から、至適 PVA 濃度範囲としては 0.001~0.1%と考えられる。

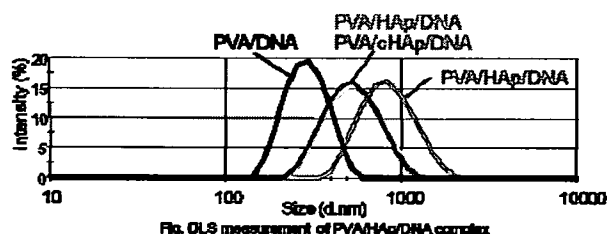


図 1. DLS 測定

(2) HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と細胞接着性

HAp 含有 PVA ハイドロゲルの調製と細胞接着性に関する検討を行った。超高压印加法により、PVA/HAp ハイドロゲルを作製された。図 2 には、PVA ハイドロゲル、HAp/PVA ハイドロゲルの走査型電子顕微鏡観察結果を示す。PVA ハイドロゲルにおいては、スムーズな表面が観察された。一方の、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、HAp 粒子が表面にて観察された。HAp の表面被覆率は 10%PVA に比べて 7.5%PVA で高かった。また、50nm の HAp に比べ 400nm の HAp の場合に表面被覆傾向が示された。

細胞接着性について、L929 細胞、MC3T3 細胞、rBM 細胞を用いて検討した。細胞は蛍光色素で染色した後、蛍光顕微鏡下で観察した。図 3,4,5 には、それぞれ L929 細胞、MC3T3 細胞、rBM 細胞の結果を示す。L929 細胞においては、PVA 濃度に依らず、PVA ハイドロゲルでは細胞の接着が示されなかった。一方、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、有意な細胞の接着・伸展が観察された。7.5%と 10%の PVA 濃度の比較では、7.5%の PVA 濃度

において効果的な細胞の接着・伸展が示された。MC3T3 細胞では、いずれの PVA 濃度においても、PVA ハイドロゲル上にて若干の接着細胞が観察されたが、細胞の伸展は示されなかった。一方、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、有意な細胞の接着・伸展が観察された。7.5%と 10%の PVA 濃度の比較では、7.5%の PVA 濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。rBM 細胞においても、PVA ハイドロゲルでの細胞接着が観察されたが、細胞の伸展は示されなかった。PVA 濃度 7.5%においては細胞が多数観察されたが、これは表面の凹凸によるものと考えられる。一方、HAp 含有 PVA ハイドロゲルにおいては、有意な細胞の接着・伸展が観察された。7.5%と 10%の PVA 濃度の比較では、7.5%の PVA 濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。以上より、HAp を含有することで PVA ハイドロゲル上での細胞の接着が促進された。HAp の表面被覆率の高い 7.5%PVA での若干の高接着性が示された。

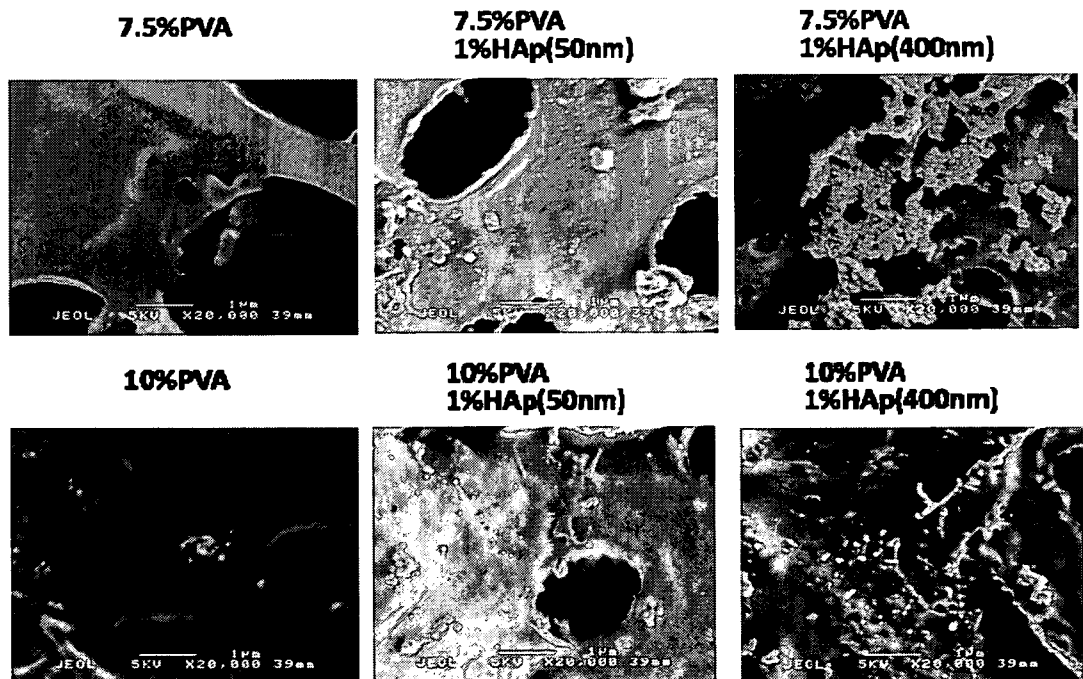


図 2. HAp 含有 PVA ハイドロゲルの SEM 写真

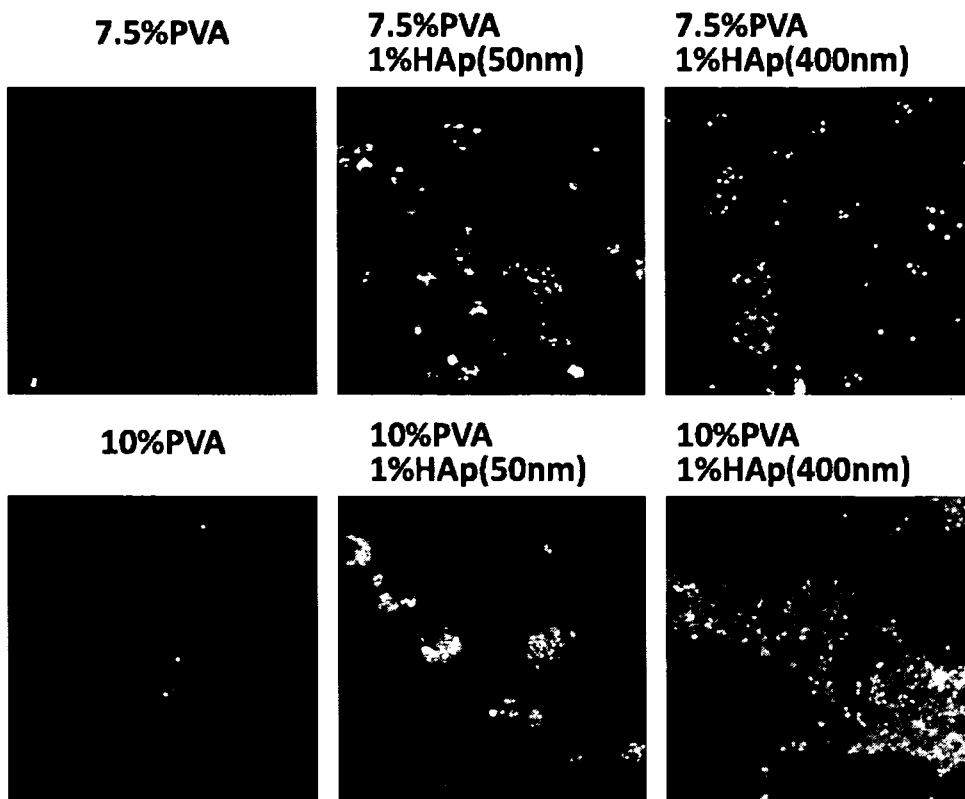


図 3. L929 細胞の HAp/PVA ゲルへの接着

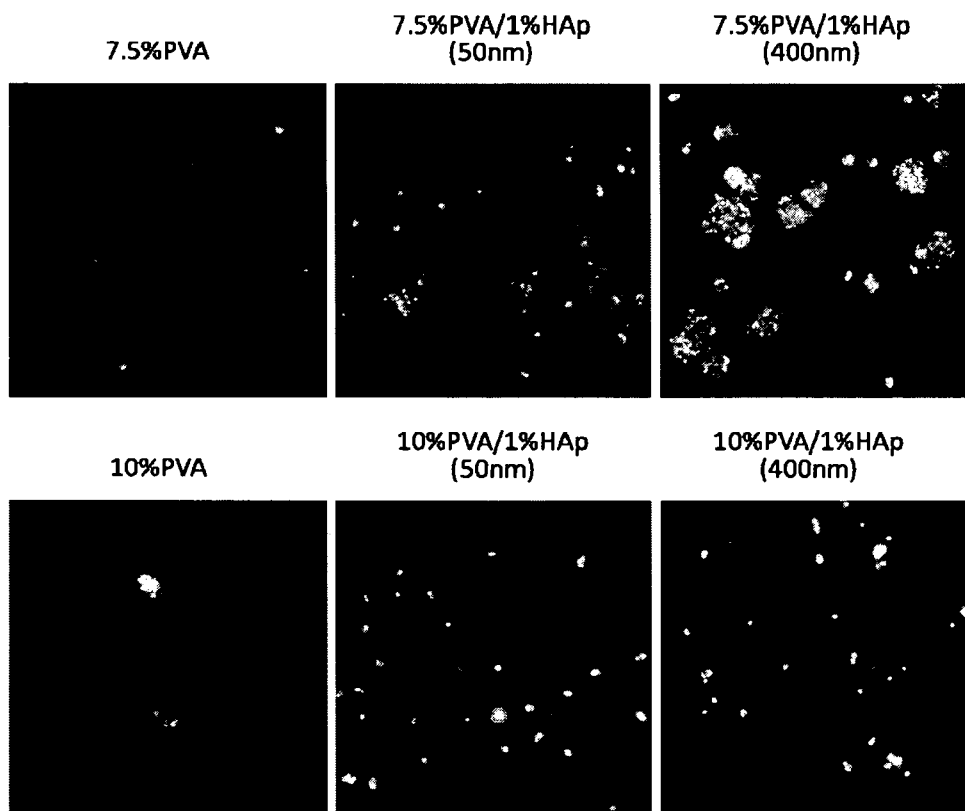


図 4. MC3T3 細胞の HAp/PVA ゲルへの接着

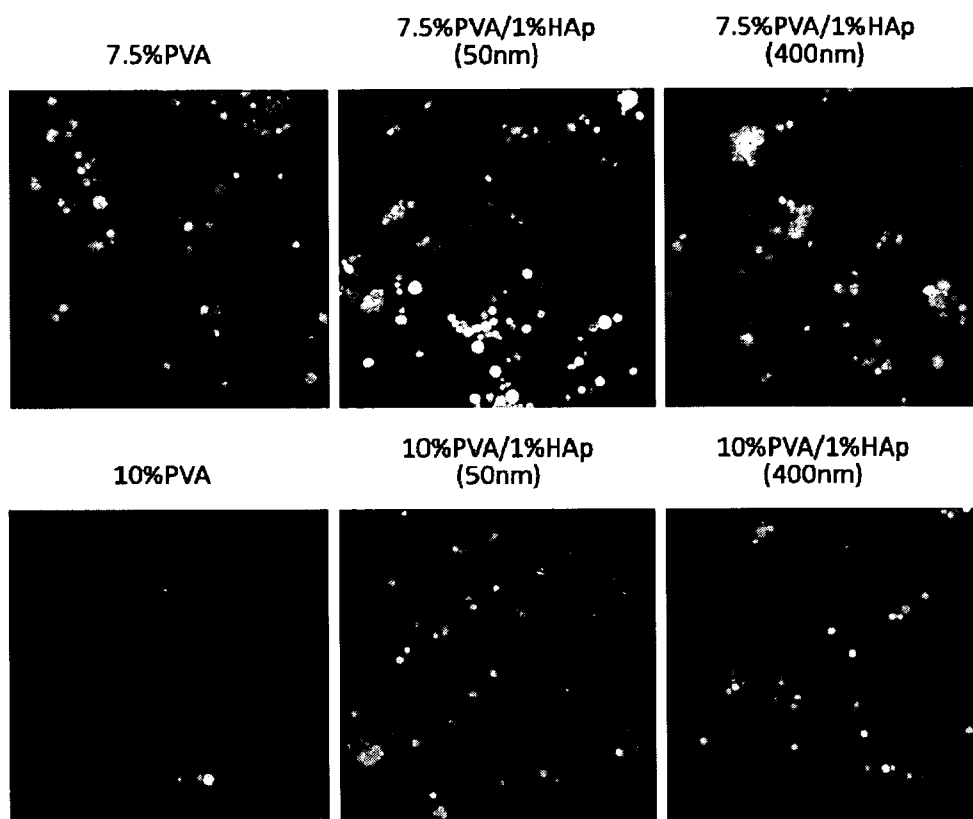


図5. rBM細胞のHAp/PVAゲルへの接着

D. 考察

超高压印加によりナノ無機粒子の種類に依らず、同程度のナノスケールのナノ無機粒子/PVA/DNA複合体が得られた。これは、高分子溶液と混合することでナノ無機粒子の分散安定性が向上したためと考えられる。また、PVA濃度により得られるナノ無機粒子/PVA/DNA複合体のサイズコントロールが可能であった。これは、従来の遺伝子導入キャリアーであるカチオン性ポリマー・リポソーム等では非常に困難であり、本超高压印加法の特徴と言える。すなわち、カチオン性ポリマー・リポソーム等は、静電的相互作用をDNAとの複合化の駆動力としており、得られる複合体のサイズは、量論的に制御される。一方の超高压印加法においては、水素結合がDNAの複合化の駆動力となり、状態による制御となる。

HAp含有PVA水素ゲルにおいては、HApの表面被覆率は10%PVAに比べて7.5%PVAで高く、また、50nmのHApに比べ400nmのHApの場合に表面被覆傾向が示された。これについては、低

い濃度においてHAp粒子とPVAの相互作用が減少したと考えられ、また、粒子サイズが大きい場合に無機粒子間の相互作用が強かったためと考えられる。細胞接着性については、HApを含有することでPVA水素ゲル上での細胞の接着が促進され、7.5%のPVA濃度において効果的な細胞の接着・伸展が示された。すなわち、HApの表面被覆率の高い7.5%PVAでの若干の高接着性が示された。これについては、HApが十分な細胞接着点として作用することを示している。

E. 結論

遺伝子導入における最大の障壁とされるエンドソームでのDNAの分解抑制を目的として、ナノ無機粒子によるエンドソーム破壊機構を提案し、pH応答型のナノ無機粒子を含有するPVA/DNA複合体の調製について検討を行った。超高压印加によりナノ無機粒子/PVA/DNA複合体が得られ、また、PVA濃度依存的に複合体サイズ制御が可能

であった。これらのことから、本研究の目的である複合体の作製手法がほぼ確立できたと考えられる。

また、HAp を含有する PVA ハイドロゲルも調製でき、細胞が HAp を足場として接着することが明らかとなった。これは、DNA を含有する HAp/PVA ハイドロゲルを作製することで、HAp/PVA ハイドロゲルに接着する細胞のみへの効率的遺伝子導入の可能性を示唆している。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1). Tsuyoshi Kimura, Sayaka Iwai, Toshiya Moritan, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Preparation of PVA/DNA hydrogels via hydrogen bonds by ultra high pressure treatment and controlled release of DNA from hydrogels for gene delivery, *Journal of Artificial Organs*, 10, 104-108, 2007
- 2). Shingo Mutsuo, Kazuya Yamamoto, Tsutomu Furuzono, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Ono, Akio Kishida, Pressure-induced Molecular Assembly of Hydrogen-bonded Polymers, *Journal of Polymer Science Part B, Polymer Physics*, 46, 743-750, 2008
- 3). Tsuyoshi Kimura, Kana Horiuchi, Kimio Kurita, Kwangwoo Nam, Tsutomu Ono, Hidekazu Yoshizawa, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Preparation and characterization of the condensed plasmid DNA by high hydrostatic pressurization, in preparation

2. 学会発表

- 4). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、高圧凝縮DNAの基礎的検討と遺伝子デリバリーへの応用、遺伝子・デリバリー研

究会 第7回シンポジウム要旨集、32、2007

- 5). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、pH 応答性ナノ無機粒子を含有する水素結合性ポリマー/DNA 複合体の細胞内送達、*Drug Delivery System*, 22-23, 363, 2007
- 6). Tsuyoshi Kimura, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Cellular delivery of DNA-polymer complex encapsulating inorganic nanoparticles prepared by ultra high pressurization, *Tissue Engineering*, 13, 1746-47, 2007
- 7). 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、細胞への遺伝子送達における高圧技術応用、第5回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集、102, 2007
- 8). 木村剛、南広祐、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、遺伝子送達における高圧技術の応用、第29回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、418, 2007
- 9). 木村剛、岸田晶夫、小野努、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、圧縮 DNA の遺伝子送達への応用、第2回バイオ・ナノテクフォーラム講演要旨集、A-06, 2008

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

ナノ無機・有機複合化研究・細胞・動物実験に関する研究

分担研究者 木村剛 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教

研究要旨

ナノ無機・有機複合型遺伝子ベクターの創製のため、超高圧印加処理にて得られたナノ無機粒子／水素結合性高分子／遺伝子複合体を用いたin vivo遺伝子導入を検討した。また、高圧凝縮DNAを用いたin vivo遺伝子導入を検討した。ナノ無機粒子／水素結合性高分子／DNA複合体では、未処理DNA単独に比して約10倍のルシフェラーゼ活性を示された。また、高圧凝縮DNAにおいては、遺伝子発現時間の遅延が認められた。

A. 研究目的

ナノメディシン研究領域における遺伝子送達システム(Gene Delivery System: GDS)の開発の必要性は高く、重要課題の一つである。GDS開発においては、低い細胞傷害性、高い遺伝子導入効率を兼ね備える遺伝子ベクターが望まれている。

遺伝子ベクターは、ウイルス感染によるウイルスベクターとウイルスを用いない非ウイルスベクターに大別される。米国RAC承認プロトコールの70%以上がウイルスベクター法を採用しており、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ポックスウイルスなどが用いられている。ウイルスによる遺伝子導入効率は高く有効であるが、導入遺伝子のサイズ制限や作製法の煩雑性などが問題として挙げられる。また、1999年12月に米国で実施された遺伝子治療研究において、過剰量のアデノウイルスの投与による免疫反応が原因とされる事故が起こった。そこで、近年、安全かつ高効率な非ウイルス遺伝子ベクターの開発が切望されている。

非ウイルスベクターは、安全性が高く、合成・操作が容易であり、比較的長期保存できる点で有用であるが、ウイルスに比べ遺伝子導入効率が低いことから、遺伝子治療への実用化の障壁となっ

ている。また、導入効率の低いベクターでは頻回投与が余儀なくされ、患者への身体的、経済的負担が大きい。従って、遺伝子導入効率の向上が非ウイルス遺伝子ベクター開発における最大の課題である。

DNAは負に帯電しているため、非ウイルス遺伝子ベクターとしては、従来から正電荷物質が選択されている。無機、有機のほとんどの正電荷物質は、DNAと静電的相互作用を介して複合体を形成する。中でも、比較的高い遺伝子導入効率を示す正電荷物質は、カチオン性リポソームやカチオン性ポリマーである。これらのうちいくつかは、すでに臨床研究段階のものもあり、その開発は進んでいる。しかしながら、本質的にカチオン性に由来する細胞障害性が問題となっている。すなわち、DNAを細胞内に送達するための正電荷物質が細胞表面との相互作用により細胞本来の機能が発現しにくくなっている。

そこで本研究では、細胞障害性の低減を主眼に静電的相互作用を介さない遺伝子ベクターの創出のための要素技術開発を行った。静電的相互作用を介さない相互作用としては、水素結合に着目した。DNA自身も水素結合を介して二重鎖形成していることから天然の水素結合性高分子と言える。

水素結合を介したDNAとの複合化技術として、高圧技術を採用した。高圧技術は、無機・有機科学、医療、食品分野等で幅広く利用されており、例えば、人工ダイヤモンドの合成や食品の加工、滅菌に用いられている。また、圧力は、タンパク質の変性に関する熱力学パラメータの一つとして学術的研究がなされている。クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などを介して様々な構造と機能を有するタンパク質は、圧力印加によりそれらの相互作用が変化し、全体として変性する。タンパク質変性の研究から得られた知見として、高圧下における相互作用は、疎水性相互作用が弱まり、水素結合が強調される。そこで我々は、この水素結合性の強調に着目し、水素結合性高分子への圧力印加による新規構造体の創出について検討を行った。これまで、水素結合性高分子としてポリビニルアルコール (PVA) を選択し、超高圧印加処理 (10,000気圧) を施した場合、水素結合を介したナノ粒子、微粒子、ゲルなどの様々な構造体を得られた。さらに、DNAの混合系においても、超高圧印加処理によりPVA/DNA複合体が得られることが明らかとなった。得られた複合体は、水素結合を介した相互作用で形成されており、細胞上清への添加により、細胞内送達を示された。この時、細胞障害性はほとんど示されなかった。

昨年度までは、1) 水素結合性高分子/DNA複合体の調製とin vitro遺伝子導入、2) ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製とin vitro遺伝子導入、3) DNA構造への高圧印加の影響について検討してきた。

1) 水素結合性高分子/DNA複合体の調製とin vitro遺伝子導入については、超高圧印加法のさらなる広範な応用を目的として、種々の水素結合性高分子とDNAの複合化について検討した。用いた水素結合性高分子として、これまでのPVAに加え、すでに臨床応用されている合成高分子のポリエチレングリコール (PEG)、多糖のデキストラン (Dextran)、プルラン (Pulluran)、タンパク質のアルブミン、イムノグロブリンG (IgG) などを検討し、それぞれのDNA複合化に成功した。

また、水素結合性高分子/DNA複合体のサイズ制御を目的とし、水性二相系を用いた複合体形成法の基礎的検討を行った。水性二相系にて形成されるマイクロエマルジョンに着目し、超高圧によるエマルジョン内の水素結合性高分子間の水素結合形成による複合化の制御である。

2) ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製とin vitro遺伝子導入については、ナノ無機粒子の水素結合性高分子/DNA複合体への含有による細胞への遺伝子導入の高効率化について検討した。水素結合性高分子/DNA複合体は、エンドサイトーシス経路にて細胞に取り込まれるが、エンドソームからの遊離機構が備わっておらず、細胞に取り込まれた後の細胞質移行が難しいと考えられる。このことから本研究では、エンドソームからの遊離を促進させるために、ナノ無機粒子との更なる複合化を提案した。細胞への遺伝子導入経路の一つであるエンドサイトーシス経路では、エンドソームのライソゾームとの融合時にpHが5.5になる。このため、ナノ無機粒子を複合体に含有させることで、エンドサイトーシスにより取り込まれた複合体は、カルシウムイオンなどを溶解し、エンドソーム内にて浸透圧ショックが引き起こり、エンドソームが破壊されると考えられる。ナノ無機粒子としてリン酸カルシウムのナノHAp粒子を調製し、DNAの細胞質移行促進効果について検討した。また、ナノHAp粒子に加え、pH応答性を向上させた炭酸カルシウム、炭酸リン酸カルシウムから成るpH応答性ナノ無機粒子を調製し、これらのナノ無機粒子を含有するナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の調製について詳細に検討し、その複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入について検討した。その結果、ナノ無機粒子を含有するPVA/DNA複合体にて効果的な遺伝子導入が示された。

3) DNA構造への高圧印加の影響については、核酸への高圧印加による核酸の構造・機能変化について検討した。核酸の高圧構造変化はこれまでも検討されているがその数は少ない。2量体のDNA (poly(dG-C)₂) への6000気圧の圧力印加