

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17年度～19年度 総合研究報告書

主任研究者 木村 剛

平成20年（2008）年 4月

## 目次

I. 総合研究報告	-----	1
ナノ無機・有機塩を用いた遺伝子送達システムの開発		
木村 剛		
(資料1) ナノ無機粒子の創製に関する研究		
(資料2) ナノ無機・有機複合化研究・細胞・動物実験に関する研究		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	4 5
III. 研究成果の刊行物・印刷	-----	5 1

## 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した。本研究では、(1) pH 応答性ナノ無機粒子の創製、(2) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の創製と遺伝子導入、(3) 高压凝縮 DNA の創製と遺伝子導入について詳細に検討した。

(1) の「pH 応答性ナノ無機粒子の創製」については、以下の背景よりナノ無機粒子を選択した。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 (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub> : HAp)、β-三リン酸カルシ

ウム ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ :  $\beta$ -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ナノ無機粒子の創製を目的の一つとした。

(2) の「pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の創製と遺伝子導入」については、本研究では、上述の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。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。この過程における DNA 分解の抑制法として、これまでにクロロキン、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 ( $\text{pH}=5.5$  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 (pH 応答性の付与)。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。

また、水素結合性高分子/DNA 複合体については、以下の遺伝子導入に関する研究の背景より発案した。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。しかしながら、得られた複合体は、水素結合を介しているため、エ

ンドサイトーシス経路にて細胞に取り込まれたのちの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。そこで本研究では、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発案した。HApは、pH5付近で溶解することが知られており、また、エンドソームはライソゾームとの融合時にpHが5.5になる。このことから、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出し、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。

(3)の「高圧凝縮DNAの創製と遺伝子導入」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、そこから新たに得られた知見をもとに遺伝子導入への応用に発展させた。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( $\text{poly(dG-C)}_2$ )への6000気圧の圧力印加では、A型からZ型にらせん構造が変化する。また、RNA( $\text{poly(rG-C)}_6$ )においても、B型からZ型に構造変化する。さらに、核酸の機能変化については、リボザイム(RNA)への圧力印加により、リボザイムが構造変化し、その結果、RNA切断活性が低下することが報告されている。以上のように、核酸の構造と機能には密接な関係があり、本研究では、DNAの圧力印加による構造変化と機能の関係について詳細に検討した。その結果、構造の変化に誘起されるDNAの凝縮が示されたことから遺伝子導入への応用を検討した。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の創製

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。本法は、焼結処理をすることで結晶が成長する。そこで、仮焼行程の有無、温度、時間を調節することで、サイズ、形態、結晶化度の制御を試みた。走査型顕微鏡 (SEM) を用いて得られたナノ HAp 粒子のサイズ、形状を観察した。また、ナノ HAp 粒子の pH 応答性について、塩酸を用いた滴定を行った。滴定は、カルシウムテストワコーにより溶解されたカルシウムの定量を行った。

また、炭酸リン酸カルシウムナノ無機粒子は、従来から用いられている焼結行程を有さない湿式法によりナノ無機粒子の調製を行った。湿式法は、酸性溶液とカルシウム溶液の二液を混合し、攪拌することで無機粒子を調製する方法である。酸性溶液としては、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た。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を走査型顕微鏡 (SEM) にて観察し、IR にて成分同定を行った。また、ナノ無機粒子の pH 応答性について、塩酸を用いた滴定を行った。滴定は、カルシウムテストワコーにより溶解されたカルシウムの定量を行った。

調製したナノ無機粒子は、長期放置により分散性が低下し、凝集・沈殿するため、水素結合性高分子と DNA との複合体の形成における安定性の低下につながると考えられた。そこで、水素結合性高分子、DNA との混合法について検討した。具体的には、ナノ無機粒子、水素結合性高分子、DNA の混合時において、水素結合性高分子溶液、DNA (サケ白子 DNA) 溶液の濃度、添加順序、また、超音波処理の有無、時間、さらに、加温処理等について種々の条件にて検討した。ここでは、水素結合性高分子として PVA を用いた。種々の方法で混合した溶液を光学顕微鏡、SEM にて観察した。

## (2) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の創製と遺伝子導入

pH 応答性ナノ無機粒子と水素結合性高分子と DNA の混合溶液を作製し、超高压印加処理 (10,000 気圧、37°C、10 分間) を施し、pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を調製し、サイズ、分散性、安定性について検討した。また、DLS 測定、AFM 観察にて物性を検討した。

得られた pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体を種々の細胞の上清に添加し、遺伝子送達実験を行った。遺伝子送達実験は、細胞内導入の確認のため、蛍光標識した DNA を用いて複合体を形成させ、細胞上清に添加した後、蛍光顕微鏡を用いて観察した。遺伝子発現効率をタンパク質の発現にて評価した。さらに、細胞内での転写・翻訳について、*in vitro* 転写・翻訳システムを用いて詳細に検討した。さらに、得られる複合体は、水素結合を介しているため、加温処理により複合体から DNA が遊離すると考えられ、加温処理による遺伝子導入効率の向上についても検討した。複合体からの DNA の解離は、細胞内送達された後に、核内での転写・翻訳効率、すなわち、被転写・翻訳効率が促進されると考えられ、結果として、遺伝子導入効率の向上につながると考えられる。具体的には、前処理として 42°C、1 時間の加温処理を施した後、無細胞系 (*in vitro* 転写・翻訳システム) における転写・翻訳を評価した。また、細胞系では、細胞上清に複合体を添加し、42°C、1 時間の加温処理を施した後、発現タンパク質にて評価した。

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/ $\mu$ 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  $\mu$ 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。

### (3) 高圧凝縮 DNA の創製と遺伝子導入

DNA構造への圧力印加の影響を検討するため、DNA単独溶液(ラダーDNA、プラスミドDNA)に種々の圧力強度、時間、温度にて高圧処理を施した。CD測定、UV測定、DLS測定により構造変化を検討した。また、DNA塩基対にインターカレートすることで蛍光強度が上昇するエチジウムブロマイドを用いて、高圧前後の蛍光強度変化を測定することで塩基対形成への影響を検討した。さらに、DNA機能への高圧印加の影響を検討するために、ウサギ網状赤血球由来の無細胞系転写・翻訳システムを用いて、DNA機能の一つである転写・翻訳について高圧処理前後のルシフェラーゼ活性を検討した。また、AFM観察および一本鎖DNA特異的切断酵素試験を行った。超高圧印加処理(10,000気圧、15分間、40℃)したプラスミドDNAをマイカ上に滴下し、所定時間静置した後に、エアフラッシュし、AFM観察を行った。一本鎖DNA特異的切断酵素試験は、超高圧印加処理したプラスミドDNAに一本鎖DNA特異的切断酵素であるS1ヌクラアーゼを種々の単位で添加し、所定時間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行った。

In vivo遺伝子導入においては、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/ $\mu$ lのDNA溶液を調製し、超高圧印加処理(10000気圧、15分間、40℃)を施した。DNA溶液200 $\mu$ 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の創製

改良型マイクロエマルジョン法では、球状、ロッド状のナノ HAp 粒子が得られる。本法では800℃での焼結行程があり、これにより HAp が高結晶化される。走査型電子顕微鏡観察では、球状、ロッド状の焼結したナノ HAp 粒子が観察された。球状では、約 100nm のナノ HAp 粒子が、ロッド状では、軸長約 200~400nm、直径 100nm の円筒のナノ HAp 粒子が得られた。未焼結の場合は、焼結した場合とほぼ同様であり、球状では、約 50nm のナノ HAp 粒子が、ロッド状では、軸長約 200~400nm、直径 100nm の円筒のナノ HAp 粒子が得られた。これらの粒子は、IR 測定にて HAp であることを確認している。

次に、ナノ HAp 粒子に pH 応答性を付与するため、結晶化度の異なる低結晶化ナノ HAp 粒子、中結晶化ナノ HAp 粒子、高結晶化ナノ HAp 粒子を調整した。それぞれの酸溶解性については、pH=3,5,7 の溶液を用いて検討した。高結晶化ナノ HAp 粒子では、pH を低下させた場合でも溶解しにくく、pH=3 にすることで溶解した。中結晶化ナノ HAp 粒子においては、pH=5 では完全には溶解しないがほとんどが溶解し、pH=3 にて完全に溶解した。低結晶化ナノ HAp 粒子は、pH=5 で完全に溶解した。これらの結果から、酸溶解性は結晶化度に依存し、結晶化度が低い程、溶解しやすい傾向があることが分かった。これらのナノ HAp 粒子を用いることで、本研究の目的であるナノ HAp 粒子の溶解によるエンドソーム破壊制御はある程度なされることが考えられる。

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。炭酸リン酸カルシウム粒子は、炭酸ナトリウム溶液とリン酸 2 水素アンモニウム水溶液と硝酸カルシウム溶液の混合により調製した。さらに、リン酸カルシウム粒子は、リン酸 2 水素アンモニウム水溶液と硝酸カルシウム

溶液の混合により調製した。得られたナノ無機粒子の酸溶解性試験を行った。炭酸カルシウム系では、pH7 付近にて溶解され始め、pH5.5 では完全に溶解されていた。一方、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 以下の pH にて溶解された。また、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。この結果は、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を示唆している。炭酸含有量を調整することで、更なる pH 応答性の向上も考えられる。この炭酸リン酸カルシウム粒子を用いることで、本研究の目的であるナノ無機粒子の溶解によるエンドソーム破壊制御がある程度なされると考えられる。

得られた pH 応答性ナノ無機粒子は、最終的に水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させる。このためには、分散性が高い方が望ましく、pH 応答性ナノ無機粒子の分散性について、一般的な手法である超音波処理による高分散ナノ無機粒子溶液の調製を試みた。超音波処理後の早期の段階では、高い分散を示していたが、放置時間の延長に伴い凝集、沈殿された。そこで、粘性溶液での超音波処理を行った。ここでは、粘性溶液として水素結合性高分子溶液を選択した。水素結合性高分子として、ポリビニルアルコール (PVA) およびポリエチレングリコール (PEG) を用いて検討した。PVA 水溶液あるいは PEG 溶液にリン酸カルシウム粒子あるいはリン酸・炭酸カルシウム粒子を添加し、混合した後、超音波処理を施した。この時、超音波処理時間を変化させ、分散性を検討した。PVA 溶液は、低濃度であると低粘性であり、高濃度であると高粘性である。一方、PEG 溶液は、PVA 溶液に比べ粘性は低かった。PVA 溶液の場合、高濃度になるに従って分散安定性は向上したが、さらに高濃度になると分散性は低下した。至適 PVA 濃度範囲としては 0.001~0.1%であった。この範囲では、比較的安定かつ高分散であり、超音波処理時間の延長に伴う分散性の向上が認められ、長期放置した場合でも分散性は維持された。PVA の

粘性に加え、PVA のリン酸カルシウム (HAp) との親和性が高く、PVA の側鎖官能基であるヒドロキシル基とカルシウムが相互作用していると考えられる。また、PVA と PEG の混合系においては、凝集・白濁したナノ無機粒子溶液が透明になった。分散性が著しく向上した結果であると考えられる。PVA と PEG の混合溶液では、水性二相分離が形成されることが知られていることから、この水性二相系がナノ無機粒子の分散性に影響したと考えられる。

## (2) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の創製と遺伝子導入

上記で得られた pH 応答性ナノ無機粒子をもちいて、pH 応答性ナノ無機粒子/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/ $\mu$ 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。また、得られた複合体を走査型電子顕微鏡にて観察した結果、超高圧誘起 PVA 粒子では、滑らか表面を有した約 200~500nm の粒子が観察された。一方、超高圧誘起 PVA/ナノ無機粒子では、その表面の凹凸が観察され、さらにナノ無機粒子と考えられる微小な粒子が見られる。これらの結果より、pH 応答性ナノ無機粒子を内包した PVA/DNA 複合体が超高圧印加処理により得られることが明らかとなった。得られた pH 応答性ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体の DNA 酵素耐性を検討するため、10% 血清存在下において、20 時間放置した。その後、in vitro 転写・



翻訳系にて評価した。DNA単独の場合は、転写・翻訳はなされず発現強度の著しい減少が認められた。一方、pH応答性ナノ無機粒子/PVA/DNA複合体の場合、10%血清の暴露前では、DNA単独に比して発現強度の低下、すなわち、複合体形成による転写・翻訳抑制がなされたと考えられるが、その発現強度の低下レベルは、PVA/DNA複合体の場合とほぼ同程度であったことから、ナノ無機粒子含有による発現抑制ではなく、PVAとの複合化によるものと考えられる。さらに、血清暴露による発現強度の低下はほとんどなく、これらのことから、細胞内での十分な発現が期待できる。

ナノHAp/PVA/DNA複合体、ナノHAp/PEG/DNA複合体の細胞による取り込みについて検討した。上記と同様に蛍光標識したDNAを用いた。DNA単独では、蛍光を示す細胞は観察されず、取り込まれなかったと考えられる。ナノHAp/PVA/DNA複合体およびナノHAp/PEG/DNA複合体においては、蛍光を発する細胞が多く見られ、細胞による取り込みがなされた。また、核で蛍光を発する細胞も確認された。細胞内送達メカニズムを検討するため、経時的観察を行った。ナノHAp粒子を含有した複合体の場合、細胞上清添加5時間後においても、蛍光を発する細胞が確認できており、ナノHAp粒子を含有することで複合体自身の質量が増加し、沈降係数が向上したため、早期の細胞内取り込みがなされたと考えられる。また、作業仮説であるナノHAp溶解に伴うエンドサイトーシスの破壊によるものと考えられる。そこで、エンドサイトーシス経路での細胞内送達であるかを確認するため、エンドサイトーシスマーカーであるFITC-Dextranを用いて検討した。その結果、DNAを標識した蛍光色とFITC-Dextranの蛍光色の位置がほぼ一致していた。このことから、エンドサイトーシスを介した細胞内送達であることが確認できた。しかしながら、ナノHApの溶解によるエンドサイトーシス破壊は装置の検出限界を超えていたため観察できなかった。以上のことから、ナノHAp/水素結合性高分子/DNA複合体の細胞内送達能が確認でき、in vitro遺伝子導入を

検討した。緑色蛍光タンパク質遺伝子を組み込んだプラスミドDNAを用い、10%血清存在下にて細胞上清に複合体を添加し、所定時間培養後、緑色発光を有する細胞の頻度により発現能を評価した。DNA単独、PVA/DNA複合体、ナノHAp/DNA複合体、では、緑色発光を示した細胞は観察されなかった。DNA単独では、細胞内に遺伝子が送達されなかったためと考えられる。また、PVA/DNA複合体については、細胞内に遺伝子送達されるものの、DNA分解酵素による分解あるいは転写・翻訳抑制によると考えられる。また、HAp/DNA複合体での細胞内取り込みが確認されていることから、DNA分解酵素による分解のために遺伝子発現がなされなかったと考えられる。一方、ナノHAp/DNA複合の場合は、有意な遺伝子発現が認められた。PVA/DNA複合体にナノHAp粒子を混合した場合、また、超高压印加処理を行っていないナノHAp粒子、PVA、DNAの混合液では遺伝子発現が示されなかったことから、ナノHAp/PVA/DNA複合体を形成することが重要であり、本研究の作業仮説がある程度立証できたと考えられる。しかしながら、市販の遺伝子導入剤である、リポフェクタミン2000と比較する依然としてその発現効率は低かった。

導入遺伝子の発現を向上させる方法として、加温処理を提案した。PVA/DNA複合体は水素結合を介して相互作用しているため、熱による相互作用の緩和が容易であり、複合体からDNAが遊離され、転写因子による認識が促進されると考えられる。このような複合体からのDNAの遊離については、現在の遺伝子ベクター開発における中心的課題である。遺伝子ベクターの多くは正電荷物質であり、静電的相互作用によりDNAと複合体を形成されている。その結果、相互作用が強固であり、容易にDNAの解離はなされず、結果として遺伝子導入効率は低い。一方、我々の複合体は水素結合を介していることから、加温によるDNA解離が可能であると考えられ、本複合体の特徴である。まず、加温温度の設定と、PVA/DNA複合体の水素結合緩和温度を検討するため、PVA/DNA複合体の融

解温度 (T<sub>m</sub>) 測定を行った。超高压未処理のDNA単独およびPVAとDNAの混合液では、融解温度の変化は認められず、互いに約57°CのT<sub>m</sub>値を示した。一方、DNAを超高压処理した場合では、融解温度の上昇が示され、約62°CのT<sub>m</sub>値を示した。これは超高压処理によってDNAの塩基対間での水素結合に変化が生じ、結合エネルギーが強くなったためと考えられる。また、DNA/PVA複合体では、40-50°C付近のブロードな変化と約54°Cのシャープな変化が観察され、後者が54°C付近はDNA二重らせんの解離であり、前者の40-50°Cにかけての融解温度は未知であり、複合体からのDNA解離であると考えられる。そこで、加温温度を42°Cに設定した。42°Cは、細胞内でヒートショックプロテインが産生されるかどうかの温度である。PVA/DNA複合体への加温処理により解離されるDNAは転写・翻訳されるかどうかを検討するために、PVA/DNA複合体を42°Cで加温処理し、その後、無細胞系による蛋白質合成反応によって検討した。加温処理したPVA/DNA複合体でのタンパク質生成が顕著に向上した。この結果は、加温処理により、複合体からDNAが解離し、転写因子により認識されやすくなったと考えられる。次に、実際の細胞系での加温効果を検討するため、細胞への遺伝子導入実験を行った。この時、一般的にガン細胞（ほとんどの樹立系細胞）は熱耐性が小さく、少しの加温により細胞は破壊されることが考えられる。そこで、樹立系のガン細胞ではなく、初代の培養系細胞として、骨髄由来細胞を用いた。骨髄細胞は、幹細胞として最近注目されている細胞である。骨髄由来細胞の上清にナノHAp/PVA/DNA複合体を添加し、42°Cの加温処理を施した。その結果、有意な遺伝子導入効率の向上が示された。この結果は、本研究の特徴を利用した新しい方法である。

さらに、pH応答性を付与したpH応答性ナノ無機粒子を用いて、pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の培養細胞への遺伝子送達について検討した。細胞として、SV40抗原を有するサル腎由来のCOS7細胞を用いた。細胞内送達

を確認するため、ローダミンにて蛍光標識したDNAを用い、超高压印加処理により複合体を得た。得られたpH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体溶液を10%の血清を含む細胞上清に添加し、種々の期間培養し、蛍光顕微鏡にて複合体の細胞内送達を観察した。DNAのみの場合では、細胞内蛍光は観察されなかったが、pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体では蛍光を発光する細胞が観察され、pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体のCOS7細胞への取り込みが示された。それぞれの細胞内への取り込みを画像から定量したところ、リン酸カルシウム粒子に比して、炭酸・リン酸カルシウム粒子での取り込みの増加が示された。また、高濃度PVAに比べ低濃度PVAにて取り込みの増加が見られ、細胞内導入における粒子サイズの影響が明らかとなった。

しかしながら、細胞内でのDNAの分布を詳細に観察したところ、細胞核での蛍光発光は観察されず、細胞核へのDNAの移行は示されず、また、十分な遺伝子発現も示されなかった。エンドサイトーシスを介して複合体は細胞内に取り込まれた後に、複合体として存在していたため、十分な核内移行および被転写・翻訳がなされなかったと考えられる。

ハイドロダイナミクス法は、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 $3 \times 10^6$ /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。

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。

### (3) 高圧凝縮DNAの創製と遺伝子導入

従来より、圧力印加によるタンパク質の構造変化(変性)に関する検討がなされている。タンパク質は、クーロン力、疎水性相互作用、ファン・デル・ワールス力などの相互作用が複雑に介して様々な構造と機能を有しており、圧力印加によるそれらの相互作用変化により構造が変化し、機能が失活されると考えられている。一方、DNAやRNAなどの核酸への圧力印加に関する報告としては、圧力印加によるコンホメーション変化が報告されている。6,000気圧の圧力印加により、B-DNAはZ-DNAへコンホメーション変化し、6,080気圧でA-DNAはZ-DNAへコンホメーション変化する。一方、RNAは、6,000気圧でもA-RNAからZ-RNAへのコンホメーション変化が起こらない。しかし、5M NaCl存在下では6,000気圧の圧力印加にてA-RNAがZ-RNAにコンホメーション変化することが報告されている。また、RNA機能への圧力の影響として、リボザイムが検討されている。リボザイムとはRNA鎖の切断などの触媒活性をもつRNA、すなわちRNA触媒のことである。リボザイムは遺伝病などの遺伝子発現がかかわる疾患の治療薬として現在期待され研究が進められている。その一つにヘアピン型リボザイムがあり、その触媒活性への圧力印加の影響に関する研究がさ

れている。リボザイムに高圧処理した場合、圧力の増加に伴い自己切断反応率が減少する。さらに、実験から計算された反応の活性化量は、一般的なタンパク質酵素の活性量と同じであり、触媒作用中のRNA分子の圧縮を表すという報告がされている。また、環状DNAであるプラスミドDNAが1600気圧の圧力印加にてスーパーコイルを形成する報告がある。また、プラスミドDNA pUC18は400MPaで、pBR322は200MPaで融解条件において高い安定性を得ることが報告されている。高圧処理により水素結合が安定し、水素結合を安定する圧力の大きさは、プラスミドDNAのサイズ、GC含有量に影響されるのではないかと示唆されている。一方、800MPaで印加処理した場合のpBR322では、無処理のpBR322よりも吸光度が増大し、超高圧下では水素結合が弱まる可能性も示唆される。これらの構造変化は、DNAの機能(複製、被転写・翻訳など)に影響されると考えられるが検討されていない。そこで本研究では、プラスミドDNAの機能の一つである発現機能を中心に、高圧処理されたプラスミドDNAの構造と機能について検討した。

プラスミドDNAとしては、T7プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだpT7-Lucを用いた。pT7-LucをDNase,RNase Free Waterで20  $\mu$ g/mlに調製して用いた。超高圧印加装置(Dr. C HEF;(株)神戸製鋼所)を用いて高圧印加処理を行った。高圧印加処理条件のうち、印加圧力、時間を変化させた。10,000気圧、10分間の超高圧処理を施したpT7-LucのCD測定を行った。超高圧印加処理したDNAのピークがわずかに高波長側にシフトし、CDスペクトルに若干の違いが見られた。タンパク質に比べDNAは剛直であり、CD測定では長鎖DNAの構造変化は検出されにくく、今回のCDスペクトルの若干の変化は、超高圧印加処理によるプラスミドDNAの構造変化を強く示唆すると考えられる。プラスミドDNAは環状でコンホメーションの歪みが大きいいため、圧力の影響を受けやすいと考えられる。

次に、融解温度( $T_m$ )測定を行った。測定波長は、

260nmである。DNAの $T_m$ は、DNA塩基対の50%が解離する温度を指す。従って、 $T_m$ は用いるDNAの塩基数により変化し、低塩基数ほど低い $T_m$ 値を示し、高塩基数ほど高い $T_m$ 値を示す。今回用いた装置は温度を100°Cまでしか上げることができなため、pT7-Lucの融解温度を測定することができなかった。そこで、動的光散乱(DLS)測定にて検討することとした。超高压印加処理によりプラスミドDNAのサイズが小さくなることがわかった。また、500~700nmあたりのサイズはオープンサークルであり、100nmあたりのサイズはスーパーコイルであると考えられる。超高压印加処理すると500~700nm付近のピークが消失し、100nm付近のピークが大きくなり、20~30nm付近に新たなピークが得られ、全体的にスペクトルが左にシフトした。これは、DNAが凝縮したと考えられる。超高压印加処理により得られた100nm付近の新たなピークは、未処理時のオープンサークルプラスミドDNAとほぼ同じであり、これまでに高压印加処理によりスーパーコイル分率が高くなる報告があることから、スーパーコイル化がなされた事が考えられるが明らかではない。印加圧力強度の影響について検討するため、5,000気圧、8,000気圧、10,000気圧の異なる圧力強度にて5分間の超高压処理をpT7-Lucに施し、DLS測定を行った。5,000気圧、5分間の圧力印加では未処理との変化が見られなかった。一方、8,000気圧、10,000気圧と圧力の増加により、プラスミドDNAのサイズ減少が示された。さらに、高压印加処理時間の影響を調べるため、10,000気圧にて、1,5,20分間の超高压印加を施し、DLS測定を行った。印加処理時間を延長に伴うプラスミドDNAのサイズの減少が示された。印加処理時間5分と20分では、DNAサイズに十分な差異は認められず、20分の処理にて最小サイズのDNA凝縮がなされたと考えられる。以上の結果から、DNAの超高压凝縮が強く示唆され、より詳細な解析を行うため、DNAのインターカレーターの一つであるエチジウムブロマイドを用いた蛍光強度測定を行った。DNA塩基対数と等量のエチジウムブロマイドを添加し、3,000気圧、5,000気圧、8,000気圧、1

0,000気圧にて5分間の超高压処理を施した後、蛍光強度測定を行った。3,000気圧、5分間の圧力印加の蛍光強度は、未処理との変化が認められなかった。5,000気圧、8,000気圧、10,000気圧と印加圧力強度の上昇に伴う蛍光強度の減少が示された。これはDNAの構造変化によりエチジウムブロマイドが外れたことによると考えられる。一方、DNA結合試薬は他のコンホメーションに比べてB型構造で最大親和性を示すと報告されており、超高压処理によりA型、Z型にコンホメーション変化が起こったとも考えられる。現在のところ、エチジウムブロマイドが外れたのか、あるいは、親和性が弱まっただけなのかは明らかでない。さらに、AFM観察、一本鎖DNA特異的切断酵素試験を行った。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。一方の超高压凝縮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、超高压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。一方の超高压凝縮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。

超高压凝縮DNAのin vivo遺伝子導入を検討した。10000気圧、15分間、40°Cの超高压印加処理にて得られた超高压凝縮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調査した。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、超高压凝縮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。

#### D. 考察

pH 応答性ナノ無機粒子の創製については、本研究においては、ナノ無機粒子をエンドサイトーシス経路のエンドソームの破壊を行うための助剤として位置づけており、エンドソームの pH に応答する pH 応答性ナノ無機粒子の創製を目的とした。改良マイクロエマルジョン法によりナノ HAp 粒子を作製した。ここで作製過程の焼結行程の有無による溶解性の制御が可能であった。また、リン酸・炭酸カルシウム粒子を用いることで、目的とする pH=5.5 にて溶解する pH 応答性ナノ無機粒子が得られた。リン酸に比べ、炭酸の高い pH での溶解性が高かったため、ナノ無機粒子の溶解制御が可能であったと考えられる。また、炭酸のみではナノ無機粒子は得られず、炭酸とリン酸の混合比がナノ無機粒子の形成に強く影響することが明らかとなった。得られた pH 応答性ナノ無機粒子は、最終的に水素結合性高分子/DNA 複合体に含有させる。このためには、分散性が高い方が望ましく、pH 応答性ナノ無機粒子の分散性について検討した。従来から超音波処理することで分散性の向上することが知られているが、高分子溶液と混合し超音波処理することで pH 応答性ナノ無機粒子の分散安定性の向上が示された。

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。

得られたナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体は、水素結合性高分子/DNA 複合体に比して若干の遺伝子導入効率の向上が示された。しかしながら、市販の遺伝子導入剤に比して導入効率は未だに低く、更なる改良を要した。高分子とDNAの複合化を緩和する、加温処理による水素結合の緩和について検討した。その結果、遺伝子導入効率の改善が示され、本法の有用性が示された。この加温処理による遺伝子導入効率向上法は、水素結合を介在する複合体でのみ可能であることから、新規性が高い。

次に、PVA/DNA 複合体、ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体を用いたハイドロダイナミックス法によるマウスへの *in vivo* 遺伝子導入を行った。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、*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 複合体においては、PVA/DNA 複合体に比して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、ハイドロキシアパタイト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、*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、ハイドロダイナミッ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

ドサイドーシスを経由していないためと考えられる。すなわち、ハイドロダイナミッ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。

プラスミド DNA 単独への超高压処理により、高压凝縮プラスミド DNA が得られることが明らかとなった。高压凝縮プラスミド DNA の *in vivo* 遺伝子導入においては、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。一方の高压凝縮 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

本研究では、(1) pH 応答性ナノ無機粒子の創製、(2) pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の創製と遺伝子導入、(3) 高压凝縮 DNA の創製と遺伝子導入について検討した。

(1) の「pH 応答性ナノ無機粒子の創製」については、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発案し、pH 応答型ナノ無機粒子の創製を検討した。エンドソームの pH にて十分に溶解可能な pH 応答型ナノ無機粒子が得られた。

(2) の「pH 応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA 複合体の創製と遺伝子導入」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。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 vitro/in vivo* 遺伝子導入においては、ナノ無機粒子含有効果が示され、本研究戦略であるナノ無機粒子効果（エンドソームでのナノ無機粒子の溶解によるエンドソームからの複合体の細胞内導入促進）を強く示している。このことから、本研究の目的はおおむね達成されたと言える。

(3) の「高压凝縮 DNA の創製と遺伝子導入」については、超高压処理により DNA 構造変化（凝縮）が誘起されることが明らかとなった。この高压凝縮 DNA を用いた遺伝子導入においては、遺伝子発現機能（遺伝子発現の持続）の向上を示した。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あると考えられ、さらに、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。加えて、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が報告されており、これらの遺伝子キャリアー開発においても高压凝縮 DNA の応用が可能であると考えられる。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). 木村剛、古菌勉、岸田晶夫、遺伝子導入におけるセラミック材料～リン酸カルシウムを中心～、先端生物医学研究・医療のための遺伝子導入テクノロジー 「ウイルスを用いない遺伝子導入法」の材料、技術、方法論の新たな展開」原島秀吉、田端泰彦編、遺伝子医学MOOK 5号, p75-78, 2006
- 2). Tsuyoshi Kimura, Kwangwoo Nam, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Masahiro Okada, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Akio Kishida, Gene Transfection Using Inorganic Particle/PVA/DNA Complexes Prepared by Ultra High Pressure Technology, Molecular Therapy, 13, suppl. 1, pS75, 2006
- 3). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida. Influence of cross-linking on physicochemical and biological properties of collagen-phospholipid hybrid gel, Trans. Mater. Res. Soc. Jpn., 31, No.2, 735-738, 2006
- 4). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, Preparation and characterization of cross-linked collagen-phospholipid polymer hybrid gel, Biomaterials, 28, 1-8, 2007
- 5). 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
- 6). Kwangwoo Nam, Tsuyoshi Kimura, Akio Kishida, collagen-phospholipid polymer hybrid gels, Biomaterials, 28, 3153-3162, 2007
- 7). 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
- 8). 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
- 9). 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
- 10). 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
- 11). 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
- 12). Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Kozo Miyazaki, Toshiya

### 2. 学会発表

- Fujisato and Tsutomu Furuzono, Preparation Of DNA-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier, Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, p471,2005
- 13). 木村剛、南広祐、岩井彩夏、森反俊幸、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压処理により形成したPVA/DNA ハイドロゲルからのDNA徐放解析、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.1, p214, 2005
  - 14). Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Toshiya Fujisato, Tsutomu Furuzono and Akio Kishida, Gene delivery using hydrogen bonding polymer-DNA complex prepared by ultra high pressure, 32nd Annual meeting & exposition of the controlled release society transactions, p614, 2005
  - 15). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた水素結合性高分子/DNA 複合体によるトランスフェクションスケジューリングの可能性、第15回バイオ・高分子シンポジウム講演要旨集、p25-26、2005
  - 16). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた新規無機粒子/水素結合性高分子構造体の調製と生医学応用、第49回日本学術会議材料研究連合講演会講演論文集、p341、2005
  - 17). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压法によるナノ無機粒子/高分子コンポジットの調製と遺伝子キャリアーへの応用、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5199-5200, 2005
  - 18). 木村剛、南広祐、大矢裕一、大内辰郎、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、ナノ無機粒子を内包した超高压誘起PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.54, No.2, p5201-5202, 2005
  - 19). 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压静水圧処理による分子集合体の開発、第46回超高压討論会、第46回超高压討論会講演要旨集、p141、2005
  - 20). 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製、第14回ポリマー材料フォーラム講演予稿集、p171、2005
  - 21). 木村剛、南広祐、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压技術を用いた多成分系ポリマー構造体の調製と生医学材料としての応用、第27回バイオマテリアル学会大会予稿集、p227、2005
  - 22). 三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起多成分系高分子複合体による遺伝子送達、第5回日本再生医療学会総会抄録、p221、2006
  - 23). 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機/高分子コンポジットを用いた細胞への遺伝子導入、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム要旨集、pO-1、2006



- 24). 仁部洋一、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、エンドソーム遊離促進を目指したナノHAp/PVA /DNA 複合体による細胞への遺伝子導入、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2056, 2006
- 25). 三浦義之、栗田公夫、木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、PEG/多糖水性二相系への超高压処理による新規構造体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p956, 2006
- 26). 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、遺伝子導入能を有する超高压誘起ナノ無機粒子/高分子/DNA 複合体の調製、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.1, p2055, 2006
- 27). 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、DNA/RNA 構造制御を目指した超高压印加処理とその応用、Polymer Preprints, Japan Vol.55, No.2, p5288-9, 2006
- 28). Miura, Y, Kurita, K, Nam, K, Mutso, S, Yoshizawa, H, Fujisato, T, Kimura, T, Kishida, A, Preparation of Hydrogen Bonding Polymer Structures Using Ultra High Pressure Technology as Drug Carrier, Abstract for AIChE, 2006
- 29). 木村剛、小粥康充、岡田正弘、古菌勉、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起 PVA/DNA 遺伝子ベクターへの無機塩付加による遺伝子導入促進、第 28 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、p286, 2006
- 30). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、吉澤秀和、藤里俊哉、小林尚俊、岸田晶夫、高压印加による PVA ハイドロゲルの作製と物性評価、第 1 8 回高分子ゲル研究討論会講演要旨集、p39-40, 2007
- 31). 木村剛、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、岡田正弘、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、超高压誘起無機/高分子ハイブリッドベクターによる遺伝子導入おける細胞内動態の検討、Drug Delivery System, 21, p292, 2006
- 32). 木村剛、堀内可奈、栗田公夫、南広祐、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高压凝縮 DNA の構造・機能解析と遺伝子導入への応用、再生医療、6、Suppl、p301、2007
- 33). 木村剛、吉澤秀和、古菌勉、藤里俊哉、岸田晶夫、高压凝縮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
- 34). 木村剛、三浦義之、栗田公夫、六雄伸吾、吉澤秀和、藤里俊哉、岸田晶夫、高压印加による PEG/多糖水性二相形成の促進、Polymer Preprints, Japan, Vol.56, No.1, 1926 2007
- 35). 三浦義之、木村剛、栗田公夫、六雄伸吾、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
- 36). 木村剛、堀内可奈、栗田公夫、三浦義之、吉澤秀和、岸田晶夫、高压凝縮 DNA の調製と機能解析、Polymer Preprints, Japan Vol.56, No.1, 1952, 2007
- 37). 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

- 38). 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
- 39). 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 D D S への応用、Fiber Preprints, Japan, 62, No2,(symposia), 14, 62(2), 14, 2007
- 40). 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
- 41). 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、高压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
- 42). 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、高静水压誘起 P V A ゲルの特性解析、Polymer Preprints, Japan, 56(2), 3832, 2007
- 43). 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压技術応用、第 5 回生活支援工学系学会連合大会講演予稿集、102, 2007
- 44). 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压技術の応用、第 29 回日本バイオマテリアル学会大会予稿集、418, 2007

- 45). 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
- 46). 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

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）、 $\beta$ -三リン酸カルシウム（ $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  :  $\beta$ -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ナノ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。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。この過程における DNA 分解

の抑制法として、これまでにクロロキン、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 (pH 応答性の付与)。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。

以上より、本研究では、(1) pH 応答性ナノ無機粒子の調製と、(2) 超高压印加処理によるナノ無機粒子/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た。

また、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。

## B. 研究方法

### (1) pH 応答性ナノ無機粒子の調製

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。本法は、焼結処理をすることで結晶が成長する。そこで、仮焼行程の有無、温度、時間を調節することで、サイズ、形態、結晶化度の制御を試みた。走査型顕微鏡 (SEM) を用いて得られたナノ HAp 粒子のサイズ、形状を観察した。また、ナノ HAp 粒子の pH 応答性について、塩酸を用いた滴定を行った。滴定は、カルシウムテストワコーにより溶解されたカルシウムの定量を行った。

また、炭酸リン酸カルシウムナノ無機粒子は、従来から用いられている焼結行程を有さない湿式法によりナノ無機粒子の調製を行った。湿式法は、酸性溶液とカルシウム溶液の二液を混合し、攪拌することで無機粒子を調製する方法である。酸性溶液としては、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た。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を走査型顕微鏡 (SEM) にて観察し、IR にて成分同定を行った。また、ナノ無機粒子の pH 応答性について、塩酸を用いた滴定を行った。滴定は、カルシウムテストワコーにより溶解されたカルシウムの定量を行った。

調製したナノ無機粒子は、長期放置により分散性が低下し、凝集・沈殿するため、水素結合性高分子と DNA との複合体の形成における安定性の低下につながると考えられた。そこで、水素結合性高分子、DNA との混合法について検討した。具体的には、ナノ無機粒子、水素結合性高分子、DNA の混合時において、水素結合性高分子溶液、DNA (サケ白子 DNA) 溶液の濃度、添加順序、また、超音波処理の有無、時間、さらに、加温処理等について種々の条件にて検討した。ここでは、水素