

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) 超高压印加処理による 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

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。

(3) 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 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。

C. 研究結果

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。

(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では、球状、ロッド状のナノ HAp 粒子が得られる。本法では 800°C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と考えられる。

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) 超高压印加処理による 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

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/μl 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。

(3) 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。

D. 考察

本研究では、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。

また、pH 応答性ナノ無機粒子/PVA/DNA 複合体の超高压印加による調製においては、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 ハイドロ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。また、pH 応答型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). 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). 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
- 4). 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

- 5). 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
- 6). Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Akira Okuno, Yuichi Ohya, Tatsuro Ouchi, Shingo Mutsuo, Hidekazu Yoshizawa, Kozo Miyazaki, Toshiya 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
- 7). 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
- 8). 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
- 9). 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
- 10). 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
- 11). 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
- 12). 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
- 13). 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
- 14). 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
- 15). 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

- 16). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、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
- 17). 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
- 18). 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
- 19). 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
- 20). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、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
- 21). 木村剛、小粥康充、岡田正弘、古菌勉、六雄伸悟、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
- 22). 木村剛、南広祐、六雄伸悟、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における細胞内動態の検討、Drug Delivery System, 21, p292, 2006
- 23). 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
- 24). 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
- 25). 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
- 26). 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
- 27). 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
- 28). 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
- 29). 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・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が得られた。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、細胞内送達が示された。この時、細胞障害性はほとんど示されなかった。

超高圧印加法のさらなる広範な応用を目指し、(1) 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、すでに臨床利用されているポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン (DEX)、プルラン (PUL)、タンパク質のアルブミン、イムノグロブリンG (IgG) などを検討した。

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提案した。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。このことから、本研究では、

(2) 超高圧印加法を用いた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複合体を用いた(3) 培養細胞への遺伝子導入、および(4) *in vivo*遺伝子導入を検討した。

さらに、(5) 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気圧の圧力印加では、A型からZ型にらせん構造が変化する。また、RNA (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。

B. 研究方法

(1) 水素結合性高分子/DNA複合体の調製

水素結合性高分子として、分子量、鹼化度の異なるPVA、また、分子量の異なるPEG、DEX、PULを用いた。さらに、タンパク質として、アルブミン、IgG、DNase Iを用い、それぞれ種々の濃度の水溶液を作製した。DNAとしては、サケ白子由来DNA、分子量マーカーであるラダーDNA、プラスミドDNAを用いた。上記の水素結合性高分子水溶

液とDNA水溶液を混合し、超高压印加処理（10000気圧、37℃、10分間）を施した。処理溶液のアガロースゲル電気泳動により複合体形成を検討した。また、融点測定、尿素添加系での超高压処理により、水素結合を介した相互作用であるかどうかを検討した。さらに、走査型電子顕微鏡（SEM）、原子間力顕微鏡（AFM）により形状観察し、動的光散乱（DLS）測定にてサイズ測定を行った。得られた複合体を用いて、種々の細胞への遺伝子送達実験を行った。遺伝子送達実験においては、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量測定にて評価した。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。

（2）超高压処理法を用いた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

pH応答性ナノ無機粒子を超音波処理にて分散し、そこに水素結合性高分子溶液を添加した後、再度超音波処理を行い、DNAを添加し、超高压印加処理（10,000気圧、37℃、10分間）を施した。処理溶液の走査型電子顕微鏡観察により複合体の形成を確認した。また、DLS測定、AFM観察にて物性を検討した。

（3）培養細胞へのpH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の遺伝子導入

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℃、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℃、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。

（4）pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の*in vivo* 遺伝子導入

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℃）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。

（5）DNA構造への高圧印加の影響と高圧凝縮DNAの*in vivo* 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。超高压印加処理（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、超高压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/ μ lのDNA溶液を調製し、超高压印加処理（10000気圧、15分間、40℃）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

一般的に非ウイルス型遺伝子ベクターとしては正電荷物質が選択される。これらは、負に帯電するDNAと複合体を形成し、DNA分解酵素耐性を示す。このことから、非ウイルス型遺伝子導入ベクターとして用いられる。代表的な正電荷物質としては、カチオン性リポソーム・脂質とカチオン性高分子である。カチオン性リポソーム・脂質は、リン脂質二重膜を形成し、DNAを内包するタイプと、DNA周辺に微小リポソームが相互作用するタイプがあり、DNA分解酵素耐性を示す。両者とも非ウイルス遺伝子ベクターの中でも培養細胞系で高い遺伝子導入効率を示し、一部では臨床研究段階にあるものもあるが、遺伝子導入効率はウイル

スベクターに劣り、大量の遺伝子を必要とする。また、遺伝子発現は一過性であるため、頻回を余儀なくされ、患者への負担は大きい。また、in vivo系においては、腎臓などに集積することが知られており、頻回投与は困難であると考えられる。さらに、高分子量のDNAでの利用は困難であり、分子量制限がある。一方のカチオン性高分子は、用いるDNAの分子量制限がなく、簡便な合成、操作性と比較的高い遺伝子導入効率を示すことから、従来から培養細胞系にて用いられている。しかしながら、得られる複合体の物性と遺伝子導入効率との相関が明らかにされておらず、また、カチオン性由来の本質的な細胞障害性が懸念されている。

これらのことから、本研究では、非電荷高分子を用いることとした。非電荷高分子を用いた遺伝子送達に関する研究は少ない。これまでに行われている方法としては、核酸分子のインターカレータ分子を用いて複合化させる方法や、核酸分子のリン酸基と水素結合を介して行われるが、遺伝子治療については現実的ではない。我々は非電荷高分子とDNAとの複合化技術として、超高压技術を採用した。これまで高圧技術は、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、学術的研究としては、圧力印加によるタンパク質変性が一般的であり、ここから得られた知見として、水素結合の強調性がある。DNA自身も水素結合を介して二重鎖形成がなされていることから、他の水素結合性高分子とも水素結合を介して複合体が得られる可能性があるため超高压技術を採用した。

（1）水素結合性高分子/DNA複合体の調製

生体材料として用いられている水素結合性高分子である合成高分子であるPVAを用いて、超高压印加処理による水素結合性構造体について検討した。低濃度および高濃度のPVA溶液に超高压印加処理した結果、低濃度では、透明、あるいは白濁溶液が得られ、その溶液を走査型顕微鏡観察した

ところ、ナノ・マクロ粒子が見られた。一方、高濃度の場合は、ハイドロゲルが得られた。次に、DNAとの混合系にて超高压印加処理を施した。超高压処理条件を変えて行い、アガロースゲル電気泳動により複合体の確認を行った。複合体が形成された場合は分子量の増加に伴う高分子側へのシフトが観察される。2,000気圧ではコントロールのバンドパターンとの差異は見られず、複合体は形成されていないと入る。一方、10,000気圧の場合は、超高压印加処理のレーンで高分子量側でのスメアーバンドが見られ、複合体の調製が確認された。相互作用様式を検討するため、水素結合阻害剤である尿素を混合した系での複合化を試みた。その場合、コントロールのレーンとの差異は見られず、複合体が得られなかった。また、融点測定では新たなピークが現れたから、水素結合を介した複合体であることが分かった。さらに、原子間力顕微鏡観察では、ネイティブなDNA鎖の幅に対して、幅広いDNA鎖が観察されたことから、DNA鎖の主溝（メジャーグループ）周りに、PVAが絡まっていることが示唆された。

他の水素結合性高分子として合成高分子であるポリエチレングリコール（PEG）とDNAとの複合化を検討したところ、PVAと同様に複合化が示された。PEGは、既存の医療利用されている高分子であり、複合体のin vivoでの利用に期待できる。

多糖類であるプルラン（PUL）との複合化にも成功した。同様に、既存の医療利用されている多糖であるデキストラン（DEX）との複合体も得られた。DEXとの複合体の場合、複合体形成は、用いるDEXの分子量、濃度に依存し、中程度の分子量のDEXを低濃度で用いた場合に複合体が得られた。今回、アガロースゲル電気泳動解析において、スメアーバンドの出現にて複合体形成としていることから、低分子量のDEXでは、DNAと複合体を形成した場合でも十分なスメアーバンドとして出現されなかったと思われる。一方、高分子量のDEXの場合は、DEX自体が多分岐しているため、1つのDNAに多数の分子が相互作用できなかつたため、スメアーバンドとして複合体が検出されな

かつたと考えられる。また、高濃度領域においては、DNAとの相互作用以上に、DEX自身の分子集合体の方が形成し易くなったのではないかと考えている。以上の結果から、複合体形成には、用いる分子量、分岐数等の影響を考慮する必要があることが分かった。

PEG-DEX混合系について検討した。PEG、DEXの単成分溶液では、互いに透明な溶液であり、超高压印加処理による変化は目視では観察されず、いずれも透明溶液のままであった。一方、PEGとDEXを混合により溶液は青白色に変化し、高分子量のDEXを用いた場合にこの現象は顕著に観察された。一般に、高分子量のPEGとDEXとの混合液では、水性二相が形成されることが知られているが、今回用いたPEG、DEXは低分子量であるためマクロな二相は形成されず、エマルションが形成され、その散乱により青白色を呈したと考えている。得られたPEG/DEX混合液に超高压印加処理を施した結果、高分子量のDEX（75,000、150,000）を用いた場合に水性二相が形成され、下相（DEX相）が青白色を呈した。さらに高分子量のDEX（ $M_w=500,000$ ）を用いると、超高压を印加しない場合でも分子量6,000と8,000のPEGとで水性二相が形成されたことから、この現象は超高压によるDEX単独あるいはPEGとの多成分構造体の形成に伴う見かけの分子量の増加による水性二相形成と考えられる。DLS測定を行った結果、いずれの場合も粒子径の増加が観察され、超高压印加により新規多成分構造体が形成されたと考えられる。

このPEG/DEX複合体にさらにDNAを形成させる検討を行った。ここでは、DNAとしてプラスミドDNAを用いた。DNAを混合した場合でも、高分子量のPEG-DEX系では、下層での散乱が生じた。この下層溶液をアガロースゲル電気泳動した結果、スメアーバンドは観察されず、複合体の形成は確認できなかつた。これは、PEG-DEX集合体の形成にDNAが寄与されなかつたと考えられ、PEG-DEXとDNAの相互作用を亢進させるため、加温処理を試みた。それぞれの運動性を向上されることで、互いの分子との絡まりが促進されると考え

た。しかし、この場合においてもDNAとの複合化は確認できなかった。この原因としては、用いたDNAの分子量が影響していると考えられる。すなわち、PEG-DNA混合液では、DEX-DNA混合液では、直鎖状のラダーDNAを用い、PEGDEX-DNA混合液では、環状のプラスミドDNAを用いていたことで、それぞれの複合体形成能が異なっていたと考えられる。実際の応用としては、プラスミドDNAも考えているため、今後の課題とする。

次に、タンパク質とDNAとの複合化について、タンパク質として、アルブミン、IgGを用いた。アルブミンでは顕著なDNA複合化は示されなかったが、IgGではDNAとの複合体が得られた。また、DNA分解酵素の一つであるDNase Iを用いて、非酵素反応条件にてDNAとの複合化を試みたところ、DNAは分解されず、複合体が形成された。

以上をまとめると、超高圧印加処理による複合体形成には、用いる水素結合性高分子の分子量、多分岐度、および、用いるDNA分子の分子量、形状が影響することが明らかとなった。すなわち、用いるDNA分子の種類により、水素結合性高分子を使い分ける必要があり、DNAとしては、オリゴDNA、プラスミドDNAなど多種に渡ることから、これらについては、今後の検討課題とする。

水素結合性高分子/DNA複合体が得られたことから、培養細胞への遺伝子送達について検討した。細胞として、マクロファージ様の貪食能の高いRAW264細胞、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、蛍光標識したDNAを用い、超高圧印加処理により複合体を得た。得られた水素結合性高分子/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、PVA/DNA複合体では蛍光を発光する細胞が観察され、PVA/DNA複合体のRAW264細胞への取り込みが示された。同様に、PEG/DNA複合体、DEX/DNA複合体でも、細胞への取り込みが示された。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の移行は示されなかった。

また、遺伝子発現については、ほとんど発現効率の上昇は示されなかった。これは、先の細胞内移行性試験にて核内への移行が示されなかった結果と一致する。おそらく、複合体はエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ、エンドサイトーシス経路の取り込み機構のうち、エンドソームにてDNAが分解されたと考えられる。検証するため、DNA分解酵素耐性試験を種々の酵素量にて行った。DNA分解酵素が少ない場合、水素結合性高分子/DNA複合体の有意な分解耐性が示された。しかし、多い場合に顕著な分解耐性は示されず、インタクトなDNAはなかった。この結果は、酵素暴露時間の増加に伴い顕著となり、暴露時間の延長に伴いDNAは分解されやすくなることを示唆している。したがって、エンドソームからの早期の遊離あるいはエンドソームの失活を要すると考えられる。

(2) 超高圧処理法を用いた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

エンドソームを早期に破壊させるため、pH応答性ナノ無機粒子を含有した水素結合性高分子/DNA複合体、すなわち、pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の創製を行った。これまでの研究では、エンドソーム阻害剤としてクロロキシンや、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。クロロキシンは、塩基性物質であり添加することで、エンドソームとライソソームの融合後のpH低下を抑制し、DNA分解酵素の活性が抑制される。一方、膜透過性ペプチド、膜融合性ペプチドは、エンドソーム膜を貫通あるいは融合することで、DNAの細胞質移行を促進する。これらは、細胞への添加時に助剤として用いられているものであるが、最近では、遺伝子ベクター自身がエンドサイトーシス破壊機能を有するものもある。たとえば、ポリエチレンイミンやアミドアミンデンドリマーである。これらは、2級アミンを有した弱塩基性物質であり、低いpHにて

アミンのプロトン化が起こる。したがって、エンドソーム内へ集積してきたプロトンをポリカチオンが消費し、pHの低下を抑制することになり、続いて、エンドソーム内へ塩化物イオンの流入を伴ったプロトンの集積が続くことにより、浸透圧が増大する。その結果、エンドソーム内外の浸透圧のバランスがくずれ、遂にはエンドソームが崩壊し、内包物を細胞質内へ放出すると考えられている。これをプロトンスポンジ効果という。しかしながら、これらは、細胞障害性を有する合成化合物、正電荷物質、あるいはウイルスの一部分であるため、その利用制限は大きいと考えられる。そのため本研究では、生体成分であり、pH低下により溶解性を示すHApを採用した。このようなエンドサイトーシス破壊を目的とした無機物質の利用研究としては、これまでに、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がある。DNAを内包する高分子ミセルにリン酸カルシウム溶液を添加し、放置することでリン酸カルシウム結晶を生成させる。この方法では、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による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。しかしながら、この手法では、無機塩の溶解制御には至っておらず、また、操作も煩雑であり滅菌性など問題点を残している。そこで、本研究では、高分子/DNA複合体を形成された後にリン酸カルシウム結晶を生成するのではなく、すでに結晶化されたリン酸カルシウムを用いることと、遺伝子発現の制御を行うために、結晶化度、酸溶解性、組成の制御によりpH応答性を制御したpH応答性ナノ無機粒子を用いた。

pH応答性ナノ無機粒子との複合化では、上記の

ように、pH応答性ナノ無機粒子を分散させるために超音波処理を施し、PVA溶液を添加し、再度超音波処理により分散させたのち、DNA溶液と混合させた。その混合液と超高压印加処理（10,000気圧、37℃、10分間）した。得られた複合体を走査型電子顕微鏡にて観察した結果、超高压誘起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、超高压誘起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複合体が超高压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。

（3）培養細胞へのpH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の遺伝子導入

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、緑色蛍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_m) 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_m 値を示した。一方、DNAを超高压処理した場合は、融解温度の上昇が示され、約62°Cの T_m 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と考えられる。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、骨髓由来細胞を用いた。骨髓細胞は、幹細胞として最近注目されている細胞である。骨髓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。

細胞内導入後の核内移行性、被転写・翻訳効率の向上については、現在、水素結合性複合体の特徴を活かした加温法による複合体からのDNA放出を考案し、ある程度の効果が示されている。更なる効果向上のため、加温法条件設定や複合体からのDNA放出など詳細に検討する必要がある。PVA/DNAハイドロゲルを用いたゲルからのDNAの放出を詳細に検討した。超高压印加処理によりPVA/DNAゲルを調製し、PBSに浸漬した後、放出されるDNAを定量した。従来のPVAゲルの調製法である凍結融解法をコントロールとして用いた。凍結融解法に比べ、超高压印加処理法にて得られたPVA/DNAゲルの場合に、DNAの放出は抑制された。水素結合を介して相互作用しているものと考えられる。水素結合を超高压印加処理条件により制御可能と考え、種々の条件の超高压印加処理にてPVA/DNAゲルを調製し、放出試験を行った。超高压印加処理条件としては、温度（10、37°C）、圧力（8,000,10,000気圧）、時間（5,10,20分間）を変えて行った。37°Cでは、5分間の超高压印加処理に比べ、10分間の超高压印加処理の場合に放出量の増加が認められたが、20分間の超高压印加処理では、更なる増加は示されなかった。処理温度を低下させた場合、10分間の処理では差異は認められなかったが、20分間の処理では有意な放出量の増加が認められた。一方、超高压印加処理の圧力を8000気圧にした場合、放出量の低下が示された。以上の結果から、PVA分子同士の相互作用とPVAとDNAの相互作用について超高压印加処理条件を変えることでコントロールできることが明らかとなった。

（４）pH応答性ナノ無機粒子/水素結合性高分子/DNA複合体の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。

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。

(5) DNA構造への高圧印加の影響と高圧凝縮DNAの *in vivo* 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フォ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-D

NA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 μ 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℃までしか上げることができないため、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。超高圧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。超高圧印加処理すると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。超高圧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、これまでに高圧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分間の高圧処理を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、高圧印加処理時間の影響を調べるため、10,000気圧にて、1,5,20分間の超高圧印加を施し、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の高圧凝縮が強く示唆され、より詳細な解析を行うため、DNAのインターカーテ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、10,000気圧にて5分間の超高圧処理を施した後、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、高圧処理により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、超高圧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、超高圧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がスミ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、スミアーなバンドだけとなった。

高圧凝縮DNAのin vivo遺伝子導入を検討した。10000気圧、15分間、40℃の超高圧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、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。

D. 考察

超高圧印加処理にて水素結合性高分子とDNAとの複合体が得られた。水素結合を介した複合体であり、新規な複合体であると考えられる。本手法は、プロセス工学を用いており、これまでの化学的手法によるものとは本質的に異なり、全くの新しい手法でありと言える。得られた水素結合性高分子/DNA複合体は、核酸分解酵素耐性、細胞内取り込みを示したことから、遺伝子ベクターとしても有用であった。しかし、細胞内に遺伝子が送達されるものの、導入遺伝子の発現活性は低かった。このことから、pH応答性ナノ無機粒子との複合化を検討した。ナノHAp粒子/水素結合性高分子/DNA複合体が得られ、遺伝子導入効率の若干の向上が示された。このように、ナノHAp粒子のエンドソーム破壊剤として応用が、本研究の新規点のである。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。

得られた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、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ト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単独への超高圧処理により、高圧凝縮プラスミドDNAが得られることが明らか

となった。高圧凝縮プラスミド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

本研究では、超高压印加処理によりPVA/DNA複合体、ナノ無機粒子/PVA/DNA複合体、高圧凝縮DNAが作製されることが明らかとなった。これらを用いた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。また、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、さらに、高圧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圧凝縮DNAの応用が可能であると考えられる。具体的には、高圧凝縮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に～、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