

Figure 3. Change in the diffusion coefficient of ethanol in collagen gel according to ethanol mole concentrations.

v/v); furthermore, the D value of pure ethanol ($1.2 \times 10^{-10} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1}$) is approximately 1400 times lower than that of pure water. This directly affects the cross-linking ability. The solvent adsorption ability in pure ethanol and at $N_A \approx 0.74$ (ethanol/water = 9/1, v/v) is about 50% of that of pure water and 80% at $N_A \approx 0.55$ after 24 h of solvent adsorption. This implies that ethanol could not completely reach the interior of the collagen gel throughout the crosslinking procedure.

Using EDC and NHS, we obtained crosslinked collagen gels under various ethanol concentrations (Figure 4). When EDC and NHS are used for the crosslinking process, the lowest value of the free amine group content was approximately 45% (60% when crosslinked in MES buffer). This can be achieved when the crosslinking was executed for 24 h at $N_A \approx 0.07\text{--}0.17$ (ethanol/water = 2/8–4/6, v/v) with 51 mmol of EDC. This range is assumed to be the most proficient range for the coupling reaction, where the suppression of hydrolysis and fast solvent absorption has occurred. The addition of ethanol is thought to have prevented the hydrolysis of EDC. On the other hand, when

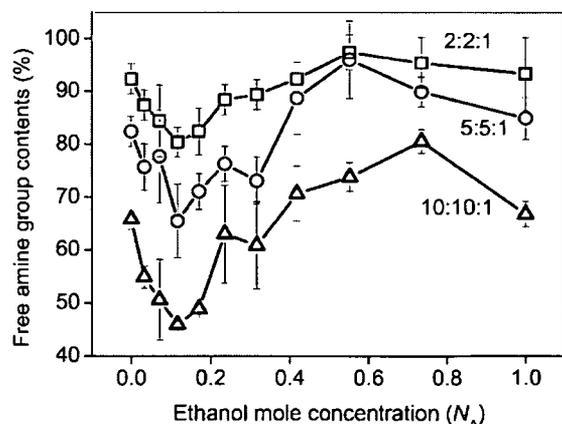


Figure 4. Change in the free amine group contents of collagen gel according to ethanol mole concentrations.

$N_A \approx 0.24$ (ethanol/water = 5/5, v/v), the free amine group content increases again, and from $N_A \approx 0.42$ and above, the free amine group content increases to higher than that of pure water. This is because of the decrease in the number of carboxyl groups reacting with EDC.^[25,26] The reactivity of the carboxyl groups decreases as the ethanol concentration increases because EDC reacts with the carboxylate anions. The increase in the number of neutral carboxyl groups would lead to relatively low *O*-isoacylurea formation.^[6] Furthermore, when $N_A \geq 0.42$, the crosslinking is assumed to be mainly concentrated on the surface of the collagen gel. The decrease in D causes heterogeneous coupling reactions in the collagen gel. That is, the partly crosslinked network of the collagen gel could be mainly located on the surface of the gel. This can be confirmed when the collagen gels prepared at $N_A \geq 0.42$ are placed in pure water. The sudden change in the environment causes the gel to adsorb a large amount of water, which makes the uncrosslinked collagen microfibrils dissolve and expand to the maximum extent by an increase in the free energy. The expansion of the collagen microfibrils is obstructed by the crosslinked part, which is mainly located on the surface. For the collagen gel prepared at $N_A \approx 0.42$, D is approximately the same as that of the gel prepared at $N_A \approx 0.32$, but it is thought that the protonation of the carboxyl groups prevents the formation of *O*-isoacylurea. The reactivity between the carboxyl groups and D alters the formation of the collagen gel. When the morphology of the razor-cut surface was observed, the monolithic morphology of the collagen gel was found to form a layered structure as the hydrophobicity increased, which eventually collapses. The collapse of the inner part of the collagen gel is due to the dissolution of the uncrosslinked collagen microfibrils. This implies that the crosslinking of the collagen gel would start from the surface and then occur inside the collagen gel. Furthermore, it is possible to crosslink only the surface of the collagen gel to obtain a phase-separated collagen gel when the ethanol concentration is controlled.

An extended reaction time under high-hydrophobic conditions ($N_A \geq 0.42$) did not cause any significant difference in the free amine group content. The crosslinking rate is much higher after 24 h, as compared to 4 h; however, no significant change is observed after 48 h. When crosslinking was performed in MES buffer, we observed a decrease in the free amine group content;^[7] however, in the case of ethanol, the formation of the *O*-isoacylurea does not occur due to the slow adsorption and protonation of the carboxyl groups.

Is it possible to obtain a collagen gel with a smaller number of free amine groups? To answer this question, we have re-crosslinked the collagen gel by repeating the same procedure (Figure 5). The activation by EDC can be triggered when EDC is introduced into the reaction solvent.^[4] We

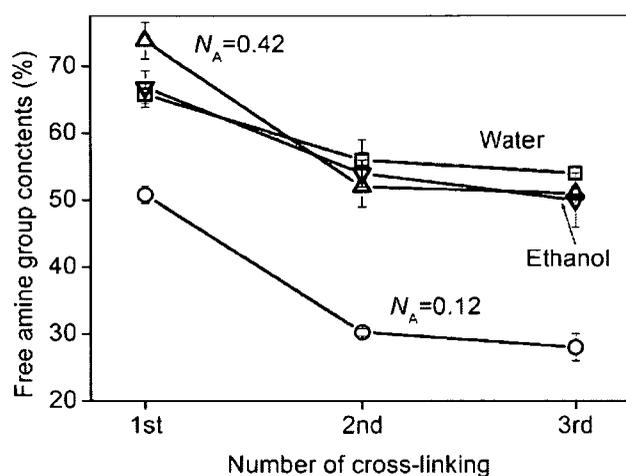


Figure 5. Change in the free amine group content of collagen gel by the re-crosslinking procedure in different solvents.

have proved in our previous report that the carboxyl groups can be activated at any point of time during the course of the reaction.^[6,7] Thus, by re-crosslinking the collagen gel, we attempted to evaluate the highest coupling rate possible using this process. The re-crosslinking was possible and the least value of the free amine group content was 30% ($N_A \approx 0.12$). This value is still high as compared with the glutaraldehyde-crosslinked collagen gel ($\approx 12\%$ using the same collagen gel) and the BDDGE-crosslinked collagen ($\approx 25\%$ using the same collagen gel). This is thought to be the lowest limit of the EDC/NHS crosslinker. Unlike glutaraldehyde and BDDGE, which can interconnect the microfibrils of the collagen, EDC/NHS can only induce intra- and interhelical crosslinks. It is difficult to assume that the microfibrils are crosslinked via the EDC/NHS crosslinker due to distal problem. Hence, it is not possible to achieve a free amine group content that is lower than $\approx 30\%$. The crosslinking may still occur when a different crosslinker or a polymer is added to this collagen gel.

Conclusion

We have proposed a new method for controlling the coupling reaction rate using EDC and NHS for collagen crosslinking. The collagen triple-helix was stable in ethanol/water mixed solvent, but the properties of the collagen gel prepared in the above solvent could be altered by the ethanol mole concentration. The highest reaction rate was achieved at $N_A \approx 0.07$ – 0.17 with 51 mmol of EDC in 24 h. This is the optimum concentration range that balances the reactivity of EDC and the formation of carboxyl groups. We also discovered that the coupling

reaction begins from the surface of the collagen gel. The coupling reaction was limited to the surface of the collagen when $N_A > 0.55$; this was because of the slow penetration of EDC and NHS caused by the high-ethanol environment and the decrease in the number of carboxylate anions. It is thought that the same procedure could be repeated not only in collagen but also in collagen-based materials such as body tissue and proteins.

Received: July 17, 2007; Accepted: September 21, 2007; DOI: 10.1002/mabi.200700206

Keywords: collagen gel; crosslinking; EDC; ethanol

- [1] C. B. Weinberg, E. A. Bell, *Science* **1986**, *231*, 397.
- [2] E. Khol, *Biomaterials* **1997**, *18*, 95.
- [3] C. A. G. N. Montalbetti, V. Falque, *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827.
- [4] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *Biomaterials* **1996**, *17*, 765.
- [5] K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Biomaterials* **2007**, *28*, 1.
- [6] N. Nakajima, Y. Ikada, *Bioconjugate Chem.* **1995**, *6*, 123.
- [7] K. Nam, T. Kimura, A. Kishida, *Biomaterials* **2007**, *28*, 3153.
- [8] J. S. Pieper, T. Hafmans, J. H. Veerkamp, T. H. van Kuppevelt, *Biomaterials* **2000**, *21*, 581.
- [9] H. M. Powell, S. T. Boyce, *Biomaterials* **2006**, *34*, 5821.
- [10] L. Buttafoco, P. Engbers-Buijtenhuijs, A. A. Poot, P. J. Dijkstra, I. Vermes, J. Feijen, *Biomaterials* **2006**, *27*, 2380.
- [11] S. N. Park, J.-C. Park, H. O. Kim, M. J. Song, H. Suh, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1205.
- [12] L. H. H. Olde Damink, P. J. Dijkstra, M. J. A. van Luyn, P. B. van Wachem, P. Nieuwenhuis, J. Feijen, *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29*, 139.
- [13] R. Zeeman, P. J. Dijkstra, P. B. van Wachem, M. J. A. van Luyn, M. Hendriks, P. T. Cahalan, J. Feijen, *Biomaterials* **1999**, *20*, 921.
- [14] C. S. Brazel, N. A. Peppas, *Polymer* **1999**, *40*, 3383.
- [15] K. Nam, J. Watanabe, K. Ishihara, *Int. J. Pharm.* **2004**, *275*, 259.
- [16] W. A. Bubnis, C. M. Ofner, III, *Anal. Biochem.* **1992**, *207*, 129.
- [17] F. Everaerts, M. Torrianni, M. van Luyn, P. van Wachem, J. Feijen, M. Hendriks, *Biomaterials* **2004**, *25*, 5523.
- [18] Y. Feng, G. Melacini, J. P. Taulane, M. Goodman, *Biopolymers* **1996**, *39*, 859.
- [19] Y. Imanishi, N. Kawazoe, K. Ichizawa, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Phys.* **2003**, *41*, 3632.
- [20] J. Schnell, *Arch. Biochem. Biophys.* **1968**, *127*, 496.
- [21] E. Bianchi, A. Rampone, A. Ciferri, *J. Biol. Chem.* **1970**, *245*, 3341.
- [22] A. E. Russel, D. R. Cooper, *Biochemistry* **1969**, *8*, 3980.
- [23] R. Usha, R. Maheshwari, A. Dhathathreyan, T. Ramasami, *Colloids Surf., B* **2006**, *48*, 101.
- [24] R. Usha, S. Sundar Raman, V. Subramanian, T. Ramasami, *Chem. Phys. Lett.* **2006**, *430*, 101.
- [25] K. Sarmini, E. Kennndler, *J. Chromatogr. A* **1998**, *811*, 201.
- [26] A. Doğan, E. Klç, *Anal. Biochem.* **2007**, *365*, 7.

Preparation and characterization of the condensed plasmid DNA by high hydrostatic pressurization

Tsuyoshi Kimura¹, Kana Horiuchi², Kimio Kurita², Kwangwoo Nam¹, Tsutomu Ono³, Hidekazu Yoshizawa³, Tsutomu Furuzono⁴, Toshiya Fujisato⁵, Akio Kishida¹

¹Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²Department of Materials and Applied Chemistry, College of Science and Technology, Nihon University, 1-8-14, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8308, Japan, ³Gradual School of Environmental Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan, ⁴Department of Biomedical Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1, Fujishiro-dai, Suita, Osaka 656-8565, Japan, ⁵Division of Biomedical Engineering, Osaka Institute of Technology, 5-16-1 Omiya, Asahi-ku, Osaka, Japan

It was found that the condensation of super-coiled plasmid DNA was induced by high hydrostatic pressurization. The spherical structure of the condensed plasmid DNA was observed for atomic force microscopic observation. The degree of condensation was increased with increasing the pressurizing strength and time. The pressure-condensed plasmid DNA was effectively recognized by transcriptional factors.

For non-viral gene delivery system using plasmid DNA, plasmid DNA has been directly injected into local regions *in vivo*¹ or condensed by cationic compounds, such as cationic polymers, peptides, and lipids, which can interacted with DNA electrostatically, and then delivered into cells *in vitro* and *in vivo*.² Although the former method is simple and safe, the level of transgene expression is relatively low and restricted to the injection site due to its low stability. The latter methods show the relative high transfection efficiency *in vitro* due to the high stability of condensates, whereas the cytotoxicity of cationic materials is one of essential problems *in vitro* and *in vivo*. Therefore, for safer, more stable and efficient delivery system of plasmid DNA, it is necessary to condense plasmid DNA with a less cationic compound or without one.

It is well known that pressure, which is one of intensive variables in thermodynamic as well as temperature and concentration, strongly affects on protein structure formed via various weak interactions, such as electrostatic, hydrophobic and hydrogen bonding interactions,³ and that the hydrogen bond is strengthen than the other interaction under high pressure condition.⁴ From this fact, we previously reported that the nanoparticles and hydrogels of polyvinyl alcohol (PVA) were formed via hydrogen bonds by high hydrostatic pressurization.⁵ Also, PVA nanoparticles and hydrogels interacting with DNA via hydrogen bonds could be delivered into cells⁶ and release DNA⁷, respectively. In relation to the effect of pressure on nucleic acid, which is one of hydrogen bonded bio-polymers, it was reported that the stability of a DNA duplex was increased with increasing pressure.⁸ Also, super-coiling of a relaxed plasmid DNA was induced by the elevated pressure because of pressure-increasing of the winding and twisting of DNA helix.⁹ In the present study, we hypothesized that the super-coiled plasmid DNA could be condensed by high hydrostatic pressurization, and investigated the change in the tertiary structure of plasmid DNA having the super-coiled and relaxed forms through various physicochemical methods. Also, the recognition of the pressurized plasmid DNA by transcription factor was examined in order to be applicable for gene delivery.

Plasmid DNA encoding luciferase gene under T7 promoter (pT7-luc, Promega Co., Ltd.) was used. The aqueous

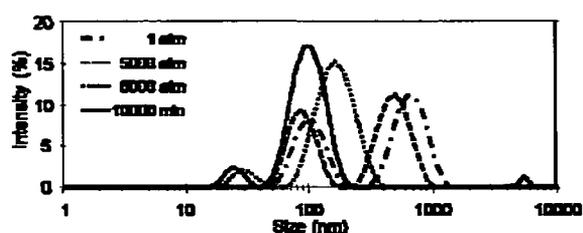


Figure 1. DLS measurement of the pressurized pT7-luc at various atmospheres and 40 °C for 5 min.

Table 1. Hydrodynamic size of the pressurized pT7-luc at various atmospheres and 40 °C for 5 min.

| Pressure (atm) | Hydrodynamic size (nm) | |
|----------------|------------------------|----------|
| | Peak 1 | Peak 2 |
| 1 | 94 ± 2 | 624 ± 60 |
| 5000 | 93 ± 6 | 529 ± 25 |
| 8000 | 33 ± 8 | 168 ± 21 |
| 10000 | 25 ± 2 | 108 ± 9 |

solution of pT7-luc was prepared at the concentration of 20 ng/μl and hydrostatically pressurized at different atmosphere ranging from 2,000 to 10,000 atm, and at 40 °C for various times from 1 to 20 min using high pressurizing machine (Dr.chef, Kobe Steel Co., Ltd.). After pressure removal, the obtained solutions were analyzed by dynamic light scattering (DLS) measurement (Nano-Zs, Malvern Instruments Ltd.). Their size distributions by intensity were overlaid in Figure 1. Table 1 shows the hydrodynamic size of the pressurized pT7-luc at different atmosphere for 5 min. For the non-pressurized pT7-luc, the super-coiled and relaxed forms of pT7-luc were detected at approximately 94±2 and 624±60 nm, respectively. The hydrodynamic size of them was decreased with increasing pressure, and then measured at approximately 25±2 and 108±9 nm, respectively, for the pressurization at 10,000 atm. This change in the latter size from 624 to 108 nm was regarded as super-coiling of the relaxed pT7-luc by the hydrostatic pressurization.⁹ When the relaxed pT7-luc, which was enzymatically prepared using topoisomerase I, was treated by the pressurization at 10,000 atm for 10 min, the super-coiled pT7-luc was measured at approximately 138±19 nm by DLS measurement (data not shown). Thus, the decrease in the size of the super-coiled pT7-luc from 94 to 25 nm suggests that the super-coiled pT7-luc was condensed by high hydrostatic pressurization. At constant pressure at 10,000 atm, a long period of pressure treatment effectively induced the condensation of super-coiled pT7-luc and super-coiling of a relaxed pT7-luc (data not shown). From these results, it

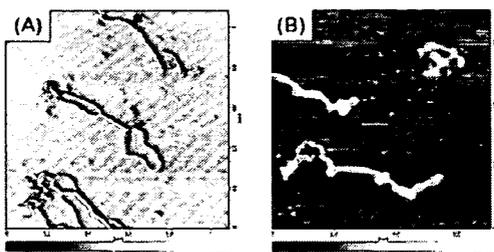


Figure 2. AFM images of pT7-luc (A) without the pressurization and (B) with the pressurization at 10,000 atm for 5min.

Table 2. Fluorescent intensity and DLS measurements of the pT7-luc intercalated with EtBr pressurized at various atmospheres for 5min.

| Pressure (atm) | Fluorescent intensity ^{a)} | Hydrodynamic size (nm) ^{b)} | |
|----------------|-------------------------------------|--------------------------------------|-----------|
| | | Peak 1 | Peak 2 |
| 1 | 15.3 ± 0.3 | 133 ± 16 | 924 ± 147 |
| 3000 | 15.3 ± 0.8 | 118 ± 16 | 515 ± 65 |
| 5000 | 13.5 ± 1.9 | 100 ± 23 | 566 ± 205 |
| 8000 | 12.7 ± 0.5 | 119 ± 7 | 318 ± 125 |
| 10000 | 13.0 ± 2.4 | 82 ± 58 | 290 ± 126 |

^{a)} Ex: 511nm, Em: 603nm, ^{b)} DLS measurement

suggests that the tertiary structure of plasmid DNA, condensation and super-coiling, could be controlled using pressurizing process and be remained after pressure removal.

Atomic force microscope image of the pT7-luc without the pressurization on mica in air is shown in Figure 2 (A).¹⁰ The fibrous super-coil form of pT7-luc that was highly twisting was mainly observed. The super-coil form being partially opened was also exhibited. On the other hand, for the pressurized pT7-luc at 10,000 atm for 5 min, the super-coil form having partially globule was observed (Figure 2 (B)). Further, the entirely spherical structure of the pressurized pT7-luc was also observed. It is assumed that the pressure-induced twisting and winding of plasmid DNA caused the condensation of super-coiled plasmid DNA.

Ethidium bromide (EtBr), which can intercalate into DNA double helix, resulting in a significant increase in the EtBr fluorescence intensity, is commonly used to monitor the DNA condensation induced by a complex formation with cationic polymers, in which the EtBr fluorescent intensity reduced due to being excluded.¹¹ The plasmid DNA intercalated with EtBr at an equimolar ratio per base pair was pressurized at various atmospheres and subjected by fluorescent intensity measurement (FP-6500, JASCO Co., Ltd., Ex: 511nm, Em: 603nm) after pressure removal (Table 2). Although the EtBr fluorescent intensity was decreased with increasing pressure, even for the pressurization at 10,000 atm, the EtBr fluorescent intensity reduced to only about 85 % of that of the non-pressurized pT7-luc. The hydrodynamic size of the pressurized pT7-luc with EtBr was ineffectively decreased compared to that of the pressurized pT7-luc without one. These results suggest that the EtBr intercalating into plasmid DNA inhibited the pressure-induced condensation and super-coiling of plasmid DNA. Also, it is considered that

Figure 3 shows the activity of luciferase expressed from the pT7-luc treated with the pressurization at various atmospheres for 5min in cell-free translation and translation

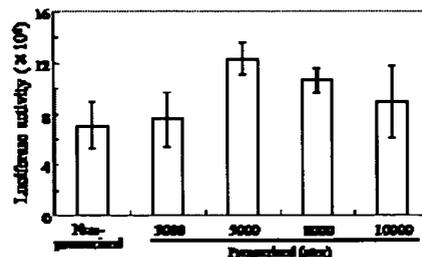


Figure 3. Transcription and translation activity of the pressurized pT7-luc at various atmospheres for 5min in cell-free system.

system (TNT Coupled Reticulocyte Lysate System, Promega Co., Ltd.).¹² The luciferase activity of the pressurized pT7-luc at 5,000 atm was increased about 1.8 times compared to the non-pressurized one. Although more increasing of pressure decreased the luciferase activity, indicating that the pressurized plasmid DNA was applicable for gene delivery.

Acknowledgement

This work was supported by a grant from the Ministry of Health, Labour, and Welfare (MHLW).

References

1. M. Nishikawa, Y. Takakura, M. Hashida, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2005**, *57*, 675.
2. ,
3. S. Kunugi, *Prog. Poly. Sci.*, **1993**, *18*, 805
4. E. Doi, A. Shimizu, N. Kitabatake, in: *High Pressure Bioscience and Food Science*, ed. by R. Hayashi, Sanei Press, **1993**, Chap. , p. 171;
5. K. Yamamoto, T. Furuzono, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, Y. Kitamura, A. Kishida, in *Meeting Report of the Poval Committee*, **2002**, *121*, 25
6. T. Kimura, A. Okuno, K. Miyazaki, T. Furuzono, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, Y. Kitamura, T. Fujisato, A. Kishida, *Mater. Sci. and Eng. C*, **2004**, *24*, 797.
7. T. Kimura, S. Iwai, T. Moritan, K. Nam, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, M. Okada, T. Furuzono, T. Fujisato, A. Kishida, *J Artificial Organs*, **2007**, *10*, 104.
8. a) J. Q. Wu, R. B. Macgregor, Jr, *Biochemistry*, **1993**, *32*, 12531. b) R. B. Macgregor, Jr., *Biopolymers*, **1998**, *48*, 253
9. a) G. Q. Tang, N. Tanaka, S. Kunugi, *Biochim. Biophys. Acta*, **1998**, *1443*, 364. b) G. Q. Tang, S. Kunugi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **2001**, *74*, 1909.
10. The 10 µl of pT7-luc solutions at the concentration of 20 µg/ml with or without the pressurization at 10,000 atm for 5 min was injected onto mica for 5 min, thoroughly rinsed with deionized water, twice, and then blown dry with compressed air. AFM studies were performed using the SPA-300 scanning probe microscope (Seiko Instruments Inc.) operated in tapping mode.
11. S. Danielsen, G. Maurstad, B. T. Stokke, *Biopolymers*, **2005**, *77*, 86
12. Two µl of the pT7-luc solutions (20 ng/µl) with the high pressurization from 2,000 to 10,000 atm for 5 min was mixed with eight µl of rabbit reticulocyte lysate and incubated at 30 °C for 1 h. The five µl aliquots were added to a luciferase reaction buffer (Luciferase Assay System, Promega Co., Ltd.), and the light emission was measured on a luminometer (AB-2200, ATTO Co., Ltd.)

Transaction: 644

Citation: Society For Biomaterials 30th Annual Meeting Transactions, page 471

Preparation Of Dna-polymer Composite Using Ultra-high Pressure And Application Of The Composite As Gene Carrier

A. Kishida¹, T. Kimura¹, A. Okuno², Y. Ohya², T. Ouchi², S. Mutsuo³, H. Yoshizawa³, K. Miyazaki⁴, T. Fujisato⁴, T. Furuzono⁴

¹ Tokyo Medical and Dental University, Chiyoda-ku, Japan, ² Kansai University, Suita, Japan, ³ Okayama University, Okayama, Japan, ⁴ National Cardiovascular Center, Suita, Japan

Introduction

Most of non-viral gene carrier uses either of electrostatic interaction or hydrophobic interaction for associating with DNA. Here we introduce a new process for obtaining DNA-Polymer molecular composite via hydrogen bond. In the ultra-high pressure condition(over 6,000 atm), it is well-known that hydrogen bond is strengthens. Using this characteristic, the ultra-high pressure have been used in order to elucidate the flexibility-structure-function of proteins¹. We have reported the molecular composite, such as hydrogels and nano-aggregate were easily obtained by the ultra-high pressure treatment². In this study, the preparation of the molecular composite of DNA and synthetic polymer by using the ultra-high pressure treatment and the application of the composite as gene carrier was studied. The model polymer used was poly(vinyl alcohol) (PVA).

Materials and Method

Electrophoresis molecular marker(100 bp Ladder DNA, and 1 kbp ladder DNA; TaKaRa) was used as model DNA. Aqueous solutions of PVA(1 to 2×10^{-5} w/v%) were prepared by using supplied PVA (Kuraray Co. Ltd. Mw=22,000, 74,800, 176,000, 787,600). The PVA and DNA mixed solution was sealed in the plastic bag, and pressurized with the ultra-high pressure apparatus(Dr. Chef; Kobe Steel, Co Ltd.) under a prescribed condition (pressure and time). After the treatment, the formation of composite was confirmed by gel electrophoresis. The DNA(pEGFG)-PVA composite was added into culture medium to transfect pEGFP gene into RAW264 cells.

Results and Discussion

From the result of gel electrophoresis of DNA-PVA mixture solutions with various mixing conditions. It was clear that DNA-PVA composite formation was observed only when the mixture was treated under ultra-high pressure(10,000atm). When urea was added to the mixture solution, the formation of DNA-PVA composite was obstructed even at ultra-high pressure condition. To evaluate uptake of PVA/DNA composites by mammalian cells, fluorescence Rhodamine labeled DNA (Rh-DNA) complexed with PVA were mixed with various species of cells. The PVA/Rh-DNA composites internalized into cells were observed under fluorescence microscope (Fig.2). It was clear almost of all cells were coloured red. It meant that Raw264 cells uptake PVA-Rh-DNA composite with high efficiency. These results indicate the possibility of new type of non-viral vector.

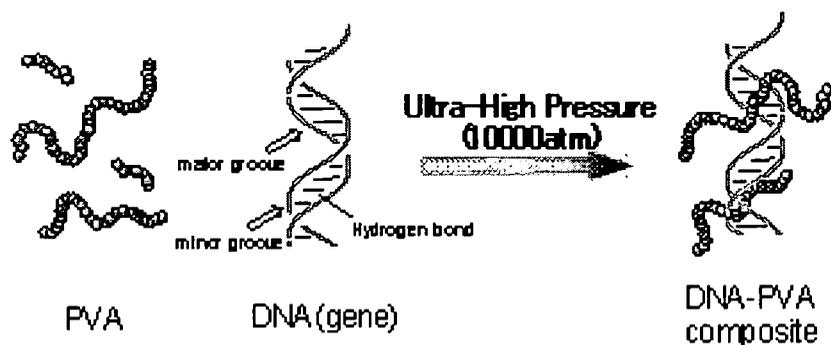


Fig. 1 Schematic illustration of DNA-PVA composite

Figure 1. Schematic illustration of DNA-PVA composite.

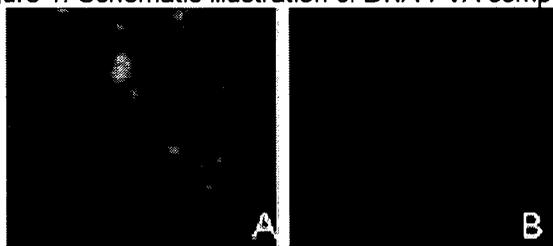


Fig 2 . Uptake of PVA/Rhodamine labeled pEGFP (Rh-pEGFP) composites by Raw 264 cells. (A)PVA117H (0.5%) (B) Rh-pEGFP.

Figure 2. Uptake of PVA/Rhodamine labeled pEGFP (Rh-pEGFP) composite by Raw 264 cells. (A) PVA117H (0.5%), (B) Rh-pEGFP.

Conclusion

Using ultra-high pressure (over 10000atm), DNA-PVA composite was obtained. This composite is one candidate for preparing non-viral gene carrier.

References

1. P.W.Bridgman, J.Biol. Chem., 19, 511 (1914)
2. A.Okuno, et al. Polym. Prep. Japan., 52(5), 1036 (2003)

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

(東医歯大生研)木村剛, 南広祐, (鈴鹿医科)岩井彩夏, 森反俊幸, (関西大)大矢裕一, 大内辰郎, (岡山)六雄伸吾, 吉澤秀和, (国循セ研)古菌勉, 藤里 俊哉, (東医歯大生研)岸田晶夫

【緒言】 我々は、超高压（6000 気圧以上）条件下において、水素結合が強調されることに着目し、超高压印加法を用いた分子集合体の創製に関して研究している。これまで、水素結合性高分子であるポリビニルアルコール（PVA）を用いて、PVA 水溶液への超高压印加により、PVA 濃度に依存して粒子あるいはハイドロゲルが得られることを報告した。また、DNA との混合溶液においては PVA/DNA 複合体が作製され、細胞による取り込みが確認されたことから、遺伝子デリバリーへの応用を示した。本研究では、PVA と DNA からなる新規ハイドロゲルの調製と DNA の放出について検討を行った。

【実験】 分子量および鹸化度の異なる PVA はクラレ（株）より提供して頂いた。DNA としては、プラスミド DNA、サケ白子由来 DNA を用いた。種々の濃度の PVA 溶液および DNA 溶液を調整し、超高压処理装置（(株)神戸製鋼所）を用いて様々な圧力下で所定時間印加した。得られた PVA/DNA ハイドロゲルの物性解析を力学強度測定、DSC 測定により行った。PBS 溶液に浸漬し、所定時間ごとの DNA 濃度の測定により、DNA の徐放解析を行った。さらに、放出された DNA をアガロース電気泳動により解析した。

【結果と考察】 PVA/DNA ハイドロゲルの成形性は、用いる PVA の濃度に依存し、低濃度では脆弱なゲルであったが、高濃度の場合に弾性のある強固なゲルが得られた (Fig)。PVA/DNA ハイドロゲルを PBS 溶液に浸漬し、上清の PBS 溶液を DNA 測定した結果、十分な DNA の含有が確認できた。また、種々の PVA 濃度の PVA/DNA ハイドロゲルを用いて DNA 放出を検討した結果、高濃度の PVA の場合に緩やかな DNA の放出が示されたことから、長期の徐放の可能性が示唆された。以上より、新規 PVA/DNA ハイドロゲルの形成および DNA 徐放が示され、長期徐放型の遺伝子導入への可能性が示唆された。

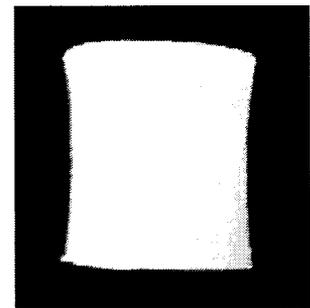


Fig. PVA/DNA hydrogel.

DNA release from PVA/DNA hydrogels prepared by ultra high pressure technology

Tsuyoshi Kimura¹⁾, Kwangwoo Nam¹⁾, Sayaka Iwai²⁾, Toshiyuki Moritan²⁾, Yuichi Ohya³⁾, Tatsuro Ouchi³⁾, Shingo Mutsuo⁴⁾, Hidekazu Yoshizawa⁴⁾, Tsutomu Furuzono⁵⁾, Toshiya Fujisato⁵⁾ and Akio Kishida¹⁾

1) Tokyo Medical and Dental University, Institute of Biomaterials and Bioengineering, 2) Suzuka University of Medical Science, 3) Kansai University, 4) Okayama University 5) National Cardiovascular Center Research Institute

TEL&FAX: +81-3-5280-8029

Key words: Hydrogel, Polyvinyl alcohol, Gene delivery, DNA

We have studied the hydrogen bonding structures formed by ultra high pressure (UHP) technology because of hydrogen bonding interaction emphasized under UHP condition. Previously, we reported the formation of PVA hydrogels and PVA/DNA particles uptaken by cells. In this study, we studied that the formation of PVA/DNA hydrogels using UHP technology and DNA release from that. Various PVA/DNA hydrogels were formed at different PVA concentration by UHP treatment (Fig). With lower PVA conc., fast release of DNA were observed, but slow DNA release were achieved using higher PVA conc.. These results indicated the application for PVA/DNA hydrogels for gene delivery.

Gene delivery using hydrogen bonding polymer-DNA complexes prepared by ultra high pressure

Kimura, T.¹, Okuno, A.², Ohya, Y.², Ouchi, T.², Mutsuo, S.³, Yoshizawa, H.³,
Furuzono, T.⁴, Fujisato, T.⁴, Kishida, A.¹

¹ Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

² Kansai University, Osaka, Japan

³ Okayama University, Okayama, Japan

⁴ National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan

Abstract

DNA complexes formulated from biocompatible polymers have been extensively investigated as non-viral DNA delivery systems due to their safety. In this study, a new class of DNA delivery system, which biocompatible hydrogen bonding polymers (HBP) interacting with DNA by hydrogen bond interaction were used, was developed using the ultra-high pressure technology. The properties and characteristics of HBP/DNA complexes were investigated by AFM, SEM, gel electrophoretic retardation and nuclease resistance. By agarose gel electrophoresis and AFM, the formation of the HBP/DNA complexes was confirmed. Additionally, using the complexes of HBP and plasmid DNA labelled by fluorescence molecules, the fluorescent cells were observed with a fluorescence microscope, indicating the utility of the HBP/DNA complexes prepared by the ultra-high pressure treatment as non-viral DNA carriers.

Introduction

In recent year, significant efforts have been devoted to develop non-viral DNA delivery system. Many researchers have focused on formulating therapeutic agents in biocompatible complexes such as capsules, particles, micellar system, and conjugates [1]. Although cationic compounds was also used as the DNA packing agents such as polyamines, cationic polymers and peptides due to higher transfection efficacy, it was reported that such cationic substances has the essential problem of the cytotoxicity[2,3]. Therefore, in this study, we have investigated the preparation of a new class of complexes formed using hydrogen bonding polymers with therapeutic agents for DNA delivery by ultra-high pressure technology because the inter-, intramolecular weak hydrogen bonding interaction was empathized with high pressure process [4].

Materials and methods

Polyvinyl alcohol (PVA) having various molecular weights were utilized as the model hydrogen bonding polymers (Table). Plasmid DNAs encoding enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene and luciferase genen under CMV promoter were used because of the nature hydrogen boding compounds with high

molecular weights. The mixture solutions of PVA and plasmid DNA were treated under 10000 atmospheric pressures at 40°C for 10min (ultra high pressure (UHP) treatment). The properties of the complexes were investigated by agarose gel electrophoresis and SEM, AFM observation. The cellular uptake into cultured cells of various cell lines was carried out using the plasmid DNA labelled by fluorescent rhodamine molecules. The cells were observed with a fluorescent microscope.

Results and discussion

The mixtures of PVA having various molecular weights and DNA at various mixing ratios treated with the UHP processing were electrophoresed on 1% agarose gel. Using high molecular weight of PVA, the retard bands were observed, indicating the formation of the PVA/DNA complexes. However, there were not the new bands with PVA having low molecular weight. It suggests the importance of the widely spread of the polymer segment and the entanglement of PVA and DNA.

When the complexes of PVA and fluorescent plasmid DNA were mixed with cells, the red fluorescent cells were observed, indicating the PVA/DNA complexes were transferred into cells. These results indicate the utility of the PVA/DNA complexes prepared by the UHP treatment for DNA delivery.

Table . Various polyvinyl alcohols used.

| PVA | D.P.*1 | D.S.*2 | M.W. |
|--------|--------|--------|--------|
| PVA205 | 500 | 88 | 22000 |
| PVA105 | 500 | 98.5 | 22000 |
| PVA117 | 1700 | 99.3 | 74800 |
| PVA140 | 4000 | 99.8 | 176000 |

*1 : D. P. :Degree of polymerization

*2 : D. S. :Degree of saponification

- [1] Vijayanthan, V. et al. Biochemistry, 41, 14085, (2003)
- [2] Kimura, T. et al. Macromol. Biosci. 2, 437-446, (2002)
- [3] Arigita, C. et al. Pharm. Res., 16, 1534-1541, (1999)
- [4] Hayashi, R. et al. Pressure-Processed Food, (1990)

(12) 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

(東医歯大 生材研) ○木村 剛・南 広祐
(関西大 工) 大矢 裕一・大内 辰郎
(岡山大 環境理工) 六雄 伸悟・吉澤 秀和
(国立循環器病センター) 古菌 勉・藤里 俊哉
(東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

E-mail: kimurat_fm@tmd.ac.jp
TEL & FAX: 03-5280-8029

1. 緒言

非ウイルス遺伝子ベクターによる細胞への遺伝子導入における重要課題として、トランスフェクション効率とその時間制御が挙げられる。これまで、正電荷物質を用いた静電的相互作用による DNA との複合体を用いての効率改善が試みられている。しかしながら、正電荷に由来する細胞傷害性と複合体の物性制御が困難さから、時間制御に関する研究はほとんどなされていない。我々は、6000 気圧以上の超高压状態における物質の水素結合の強調性に着目し、水素結合性構造体の形成に関して検討している。天然由来の水素結合性高分子である DNA においても、水素結合を介した DNA 複合体が形成され、静電相互作用や疎水性相互作用を介した従来の非ウイルスベクターとは異なる新しい遺伝子ベクターとなり得る可能性を有すると考えている。本研究では、種々の水素結合性高分子を用いて、超高压印加により誘起される DNA 水素結合性高分子/DNA 複合体を調製し、それらの物性解析と細胞への遺伝子導入により、トランスフェクションスケジューリングの可能性について検討した。

2. 実験

水素結合性高分子として、種々の分子量を有する PVA、ポリエチレングリコール (PEG) およびデキストラン (DEX) を用いた。DNA は、サケ白子 DNA、マーカー DNA (1 kbp ラダー)、プラスミド DNA (pEGFP) を用いた。種々の濃度に調整した水素結合性高分子溶液と DNA 溶液を混合し、超高压処理装置 (Dr.CHEF ; (株)神戸製鋼所) を用いて

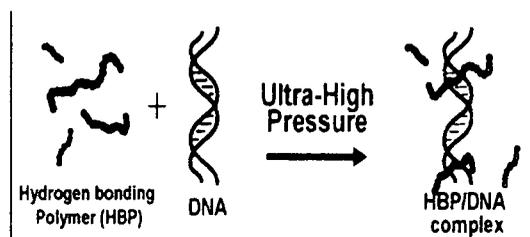


Fig 1 . Hydrogen bonding polymer/DNA complex via hydrogen bond by ultra-high

40°C、10000 気圧の条件で所定時間印加した (超高压処理)。得られた超高压処理溶液を目視、顕微鏡下で観察した。水素結合性高分子/DNA 複合体の形成をゲル電気泳動、熱融解測定にて確認した。また、複合体物性を、AFM 観察、DLS 測定、CD スペクトル測定、核酸分解酵素耐性試験等により複合体物性を検討した。さらに、培養細胞への遺伝子導入試験を行い、遺伝子発現の時間依存性を検討した。

3. 結果・考察

種々の水素結合性高分子を異なる濃度で DNA 溶液と混合し、超高压処理を施した。PVA を用いた場合、濃度の上昇に伴い透明溶液、白濁溶液、ゲル化と変化が認められ、SEM 観察により、透明溶液では約 200nm のナノ粒子が、白濁溶液では約 1 μ m の微粒子が観察された。一方、PEG および DEX の場合は、若干の粘性の上昇が認められたものの透明溶液のままであった。DNA との複合体形成をアガロースゲル電気泳動により確認した結果、いずれの水素結合性高分子においても、超高压処理した場合でのみスミアーなバンドが見られ、複合体が形成されていることが明らかとなった (Fig1)。また、PVA での 1 μ m の微粒子、ゲル内においても DNA の存在が確認できた。さらに、水素結合阻害剤である尿素存在下では複合体が形成されなかったことから、水素結合を介した複合体であることが示された。熱融解測定では、DNA および PVA と DNA の混合液の超高压未処理の場合、融解温度の変化は認められなかった (約 5.7 $^{\circ}$ C) が、DNA の超高压処理した場合は融解温度が上昇した (約 6.2 $^{\circ}$ C)。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 $^{\circ}$ C 付近のブロードな変化と約 5.4 $^{\circ}$ C のシャープな変化が観察され、後者が 5.4 $^{\circ}$ C 付近は DNA 二重らせんの解離であり、前者の 40~50 $^{\circ}$ C にかけての融解温度は未知であり、複合体の解離であると考えている。AFM 観察においては、DNA 鎖幅に比べ、複合体の鎖幅の若干の増加が認められ、DNA への水素結合性高分子の巻き付きが示唆された。核酸分解酵素耐性試験では、十分な分解耐性が示され、また、無細胞系転写・翻訳試験では、核酸分解酵素存在下で長期間インキュベートした後も十分な転写・翻訳活性が示された。これらより、長期間の遺伝子導入の可能性が示唆された。

さらに、種々の水素結合性高分子/DNA 複合体による培養細胞への遺伝子導入についても報告する。

4. 謝辞

本研究は、厚生労働省科学研究費、文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

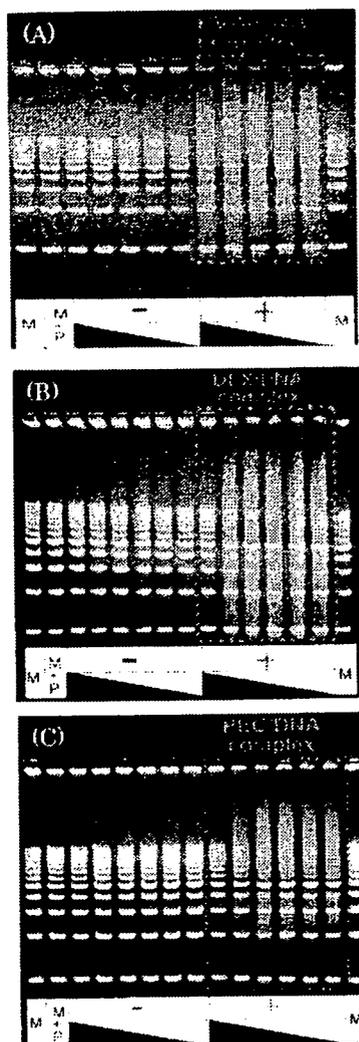


Fig 1. Agarose gel electrophoresis of DNA mixtures with (A) PVA, (B) DEX and (C) PEG treated with ultra-high pressure.

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

東医歯大 ○木村 剛 東医歯大 南 広祐 関西大 大矢 裕一
 関西大 大内 辰郎 岡山大 六雄 伸吾 岡山大 吉澤 秀和
 国循セ研 岡田 正弘 国循セ研 古菌 勉 国循セ研 藤里 俊哉
 東医歯大 岸田 晶夫

【緒言】

高压技術は、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。また学術的研究のひとつとしては、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圧力が検討されている。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の変化により変性し、高压下においては、疎水性相互作用が弱まり、水素結合が強調されることが報告されている[1, 2]。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している。これまで、水酸基を有する合成高分子であるポリビニルアルコール（PVA）への圧力印加により、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ることを報告した。また、これらの構造体のドラッグデリバリーシステムへの利用を目的とし、天然由来の水素結合高分子であるDNAとPVAとの混合系へ超高压を印加した結果、PVA/DNA複合体を得られ、細胞への遺伝子導入が達成された[3]。

本研究では、構造体へのさらなる機能付与を目的とし、無機粒子と水素結合性高分子の混合系への超高压印加により、新規な無機粒子／水素結合性高分子複合体の創製に関して検討した。無機粒子としては、ハイドロキシアパタイト（HAP）を選択した。HAPは、リン酸カルシウムの結晶体であり、骨の成分であることから生体適合性が高く、従来よりバイオマテリアルとして用いられている。これまでに我々は、新しいHAPのナノ粒子化法を開発し、種々の高分子との複合材を創出してきた。複合材は、細胞への高い親和性を示し、また、高分子の物性を損なわないことを報告してきた[4]。

【実験】

水素結合性高分子としては、PVA、デキストラン（DEX）、ポリエチレングリコール（PEG）を用いた（表1）。用いたHAPは、マイクロエマルジョン法により調整し、形態の制御された種々のスケール（50～400nm）のナノHAP粒子を得た。また、異なる結晶化度のナノHAP粒子も調整した。まず、ナノ粒子を含有したPVA粒子を作製するため、低濃度PVA水溶液（0.

01～1%）とナノHAP粒子（0.01～10mg/ml）を種々の割合で混合し、超高压処理装置（Dr. CHEF；（株）神戸製鋼所）にて40℃、10000気圧で所定時間加圧した（超高压処理）。得られた混合液を目視および顕微鏡下で観察し、SEM観察、AFM観察、FT-IR測定により物性解析を行った。次に、HAP含有ハイドロゲルを作製のため、高濃度PVA水溶液（5%以上）とナノHAP粒子（0.01～10mg/ml）を種々の割合で混合し、超高压処理を施した。さらに、天然由来の水素結合性高分子として種々のDNA（プラスミドDNA、サケ白子DNA、1kb ラダーDNAマーカー）を選択し、DNA水溶液を上記のPVA、ナノHAP混合液と混合し、超高压処理を施し、三成分系の粒子、ハイドロゲルを作製した。DNAとの複合体形成については、ゲル電気泳動によるパターン変化の観察、DNA染色法等の検討により評価した。上記複合材の細胞親和性、細胞への遺伝子導入を検討するため、マウス由来の繊維芽細胞（L929）、マクロファージ（RAW264）、ラット骨髄細胞を用いた。ラット骨髄細胞は、ラット大腿骨より採集し、培養シャーレ播種後、接着した細胞を使用した。

Table 1. Various hydrogen bonding polymers used.

| PVA | D.P.*1 | D.S.*2 | M.W. |
|---------|--------|--------|--------|
| PVA105 | 500 | 98.5 | 22000 |
| PVA117H | 1700 | 99.3 | 74800 |
| PVA140 | 4000 | 99.8 | 176000 |
| PEG | 400 | — | 8000 |
| Dextran | — | — | 15000 |

*1: D. P. → Degree of polymerization

*2: D. S. → Degree of saponification

【結果と考察】

種々の分子量のPVA水溶液とナノHAP粒子を混合し、超高压処理を施した。高分子量のPVA（PVA117H、PVA140）を低濃度（1%以下）で用いた場合、PVA溶液と同様にナノ粒子、微粒子が濃度依存的に得られた。一方、低分子量のPVA105では、ナノ粒子、微粒子は得られなかった。これらより、用いるPVAの分子量をコントロールすることで複合体形成

を制御できること明らかとなった。また、DNAを混合した場合においても、ナノ粒子、微粒子（PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体）が得られ、種々の細胞への遺伝子導入を行った。マウスマクロファージ様細胞であるRAW264細胞の場合、DNA単独では全く遺伝子発現が認められなかったが、PVA/DNA複合体およびPVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体で遺伝子発現が認められた。一方、ラット骨髄細胞においては、PVA/DNA複合体では遺伝子発現が認められず、PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体で有意な遺伝子発現が示された。これらの結果は、RAW264細胞は貪食能が高いため、両方で遺伝子発現が示されたが、一方のラット骨髄細胞は、比較的低い貪食能であるためPVA/DNA複合体では発現が認められず、PVA/ナノHA p 粒子/DNA複合体では、HA pの高い細胞親和性とエンドサイトーシス経路でのpH低下によるHA pの溶解に伴うエンドソーム破壊のために有意な遺伝子発現が認められたと考察している。

高濃度PVA溶液（5%以上）への超高压処理においては白色のハイドロゲルが得られ、PVA溶液の濃度上昇に伴うハイドロゲルの力学的強度の向上が示された。また、DNAの混合系においても白色のハイドロゲルが得られ、青色のDNA染色剤で得られたハイドロゲルを染色した結果、青色に染色されたハイドロゲルが得られた。PVAハイドロゲルの場合にはほとんど染色されなかったことから、DNAを含有したハイドロゲルが得られたと考えられる。これらの結果は、超高压技術を用いることで、無機・有機ハイブリッド材料を容易に作製できることを示している。得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を検討した。5、48時間培養後のラット骨髄細胞の接着結果を図1に示す。5時間後では、ナノHA p 粒子を含有しないPVAハイドロゲル（図1（A））に比べ、ナノHA p 粒子/PVAハイドロゲル（図1（B））での接着細胞数の有意な増加が認められた。また、後者においては、48時間培養後で十分な細胞の伸展が認められた（図1（C））。これら結果より、ナノHA p 粒子の複合化による機能性の付与と生医学領域

【謝辞】

本研究は、文部科学省科学研究費、厚生労働省科学研究費の補助を受けて行われた。

【参考論文】

- 1) E. Doi, A. Shimizu and N. Kitabatake, in: R. Hayashi (Ed.), High Pressure Bioscience and Food Science, Sanei Press, 171(1993)
- 2) E. Doi, A. Shimizu and N. Kitabatake, Food Hydrocol. 5, 409(1991)
- 3) T. Kimura, A. Okuno, K. Miyazaki, T. Furuzono, Y. Ohya, T. Ouchi, S. Mutsuo, H. Yoshizawa, Y. Kitamura,

T. Fujisato and A. Kishida, Mater. Sci. Eng. C, 24, 797(2004)

4) T. Furuzono, S. Yasuda, T. Kimura, J. Tanaka and A. Kishida, J. Artifi. Org., 7, 137(2004)

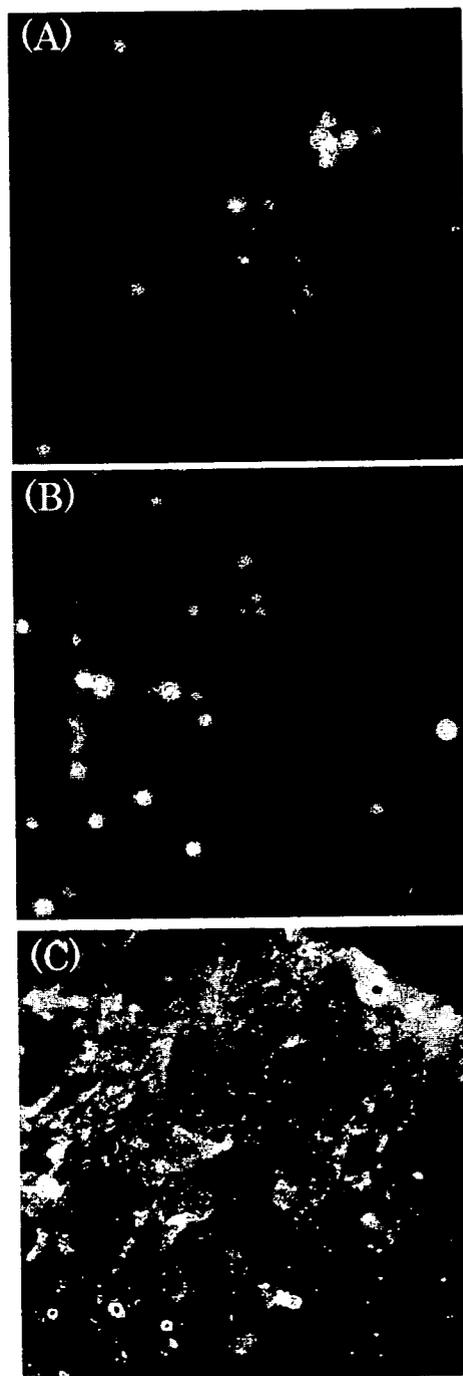


Fig1. Fluorescent images of the adhesion of rBMC cells stained by calcein-AM on nano-HAp/PVA composite hydrogel after (A)5h and (B) 48h incubation.

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

(東医歯大 生材研) ○木村 剛、南 広祐
(関西大 工) 大矢 裕一、大内 辰郎
(岡山大 環境理工) 六雄 伸吾、吉澤 秀和
(国循セ研) 岡田 正弘、古菌 勉、藤里 俊哉
(東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

[緒言]

我々は、超高压下（6000 気圧以上）における物質の水素結合の強調性に注目し、超高压法による水素結合を介した分子集合体の形成に関して検討している。これまで、種々の水素結合性高分子への超高压印加により、ナノ粒子、微粒子、そしてハイドロゲルが形成されることを明らかにした。本研究では、水素結合性分子集合体への新たな機能性の付与を目的として、ナノスケールのハイドロキシアパタイト (HAp) 焼結体と水素結合性高分子とのコンポジットの調整について検討した。ナノ HAp との複合化による細胞親和性、力学特性等の向上が期待できる。また、天然の水素結合性高分子である DNA を用い、ナノ HAp と水素結合性高分子からなる三成分系コンポジットの調整、さらに、それらのコンポジットの細胞親和性および細胞への遺伝子送達を検討したので合わせて報告する。

[実験]

水素結合性高分子のモデルとしてポリビニルアルコール (PVA) を選択し、種々の分子量、鹼化度の PVA を用いた (表 1)。これらはクラレ (株) より提供していただいた。ナノ HAp は、マイクロエマルジョン法により調整し、形態の制御された種々のスケール (50~400nm) のナノ HAp 粒子を得た。また、異なる結晶化度のナノ

Table 1. Various polyvinyl alcohol used.

| PVA | D.P.*1 | D.S.*2 | M.W. |
|---------|--------|--------|--------|
| PVA105 | 500 | 98.5 | 22000 |
| PVA117H | 1700 | 99.3 | 74800 |
| PVA140 | 4000 | 99.8 | 176000 |

*1 : D. P. → Degree of polymerization

*2 : D. S. → Degree of saponification

Preparation of inorganic nanoparticles/polymer composite for gene carrier

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, Yuichi OHYA¹⁾, Tatsuro OUCHI¹⁾, Shingo MUTSUO²⁾, Hidekazu YOSHIZAWA²⁾, Tsutomu FURUZONO³⁾, Toshiya FUJISATO³⁾, Akio KISHIDA

(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ¹⁾Kansai University, ²⁾Okayama University, ³⁾National Cardiovascular Center Research Institute)

Tel&Fax: 03-5280-8029, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key word: ultra high pressure /inorganic nano-particles / hydroxyl apatite / hydrogen bond / composite / gene carrier

Abstract: In order to form inorganic particles/polymers composites, nano-scaled hydroxyl apatite (HAp) and polyvinyl alcohol (PVA) having various molecular weights were mixed at different concentration and treated by ultra high pressure processing. In the case of higher PVA concentration, hydro gels containing nano-HAp particles were obtained. The good cell adhesion on the hydro gel was showed. At lower PVA concentration, the particles of the nano-HAp particles/PVA composites or nano-HAp/PVA/DNA composites were formed, which also showed effective DNA delivery.

HAp 粒子も調整した。PVA 水溶液とナノ HAp 粒子を様々な割合で混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF ; (株)神戸製鋼所) にて 40°C、10000 気圧で所定時間加圧した (超高压処理)。得られた混合液を目視および顕微鏡下で観察し、SEM 観察、FT-IR 測定により物性解析を行った。また、天然由来の水素結合性高分子として DNA (プラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカー) を選択し、種々の濃度で DNA 水溶液、PVA 水溶液およびナノ HAp を混合し、超高压処理を施した。DNA との構造体形成については、ゲル電気泳動によるパターン変化の観察等の検討を行って評価した。さらに、マウス由来の繊維芽細胞 (L929)、マクロファージ (RAW264)、ラット骨髄細胞 (rBMC) を用いて、HAp/PVA コンポジットおよび HAp/PVA/DNA コンポジットへの細胞接着性と遺伝子導入について検討した。

[結果と考察]

種々の分子量の PVA 水溶液とナノ HAp を様々な割合で混合し、超高压処理した。高分子量の PVA (PVA117H、PVA140) を高濃度 (5%以上) で用いた場合、ハイドロゲルが得られ、低濃度 (1%以下) では、ナノ粒子、微粒子が得られた。一方、低分子量の PVA105 においては、ハイドロゲル、粒子は作製されなかった。これらより、用いる PVA の分子量および濃度をコントロールすることで構造体形成を制御できることがわかった。上記で得られたハイドロゲル上に数種の培養細胞を播種し、細胞親和性を調査した。5 時間培養後の rBMC の接着結果を図 1 に示す。ナノ HAp を含有しない PVA ハイドロゲル (図 1(A)) に比べ、ナノ HAp/PVA ハイドロゲル (図 1(B)) において有意な接着細胞数の増加が認められた。また、後者においては細胞の伸展も認められ、これらより、ナノ HAp による機能性の付与が示された。

次に、PVA/HAp 水溶液に、DNA を混合し超高压処理を施した。上記と同様に、高分子量 PVA の場合に、高濃度でハイドロゲルが、低濃度で粒子が得られた。DNA の含有は、ハイドロゲルでは染色法を、粒子では熱融解後の溶液のアガロースゲル電気泳動により確認した。ハイドロゲルでは、DNA の十分な染色が示され、また、アガロースゲル電気泳動においても DNA のバンドが確認できた。これらより、ナノ HAp/PVA/DNA から成る三成分系コンポジットの形成が示された。発表では、培養細胞を用いた遺伝子導入について詳細に報告する。

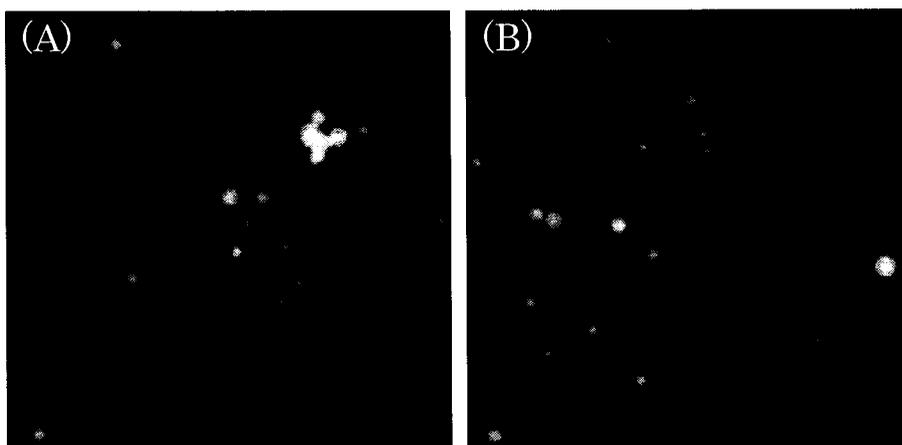


Fig1. Fluorescent images of the adhesion of rBMC cells stained by calcein-AM on (A) PVA hydro gel and (B) nano-HAp/PVA composite hydro gel.

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

(東医歯大 生材研) ○木村 剛、南 広祐
(関西大 工) 大矢 裕一、大内 辰郎
(岡山大 環境理工) 六雄 伸吾、吉澤 秀和
(国循セ研) 岡田 正弘、古菌 勉、藤里 俊哉
(東医歯大 生材研) 岸田 晶夫

【緒言】

培養細胞への遺伝子送達法の一つであるリン酸カルシウム法は、安価かつ簡便であるため従来から用いられている。しかしながら、高い凝集性およびその制御の困難さによる低い再現性が問題として挙げられている。これまで、片岡等は、ポリエチレングリコールとポリアスパラギン酸からなるブロック共重合体を用いて、DNA とリン酸カルシウム微結晶を内包する単分散な高分子ナノミセルを開発し、オリゴDNA、siRNA の細胞内送達に成功している。本研究では、リン酸カルシウムの物性制御による遺伝子導入効率の向上を目的とし、結晶化度、サイズが精密に制御されたハイドロキシアパタイト (HAp) 単結晶粒子を用いて、超高压印加法による HAp 粒子を内包した PVA/DNA 複合体の調整について検討した。また、培養細胞への遺伝子導入についても検討したので報告する。

【実験】

分子量および酸化度の異なる PVA を用いた。これらはクラレ (株) より提供していただいた。マイクロエマルジョン法により、形態、結晶化度、サイズが制御された HAp 粒子を調整した。DNA としてプラスミド DNA、サケ白子 DNA、1kb ラダー DNA マーカーを用いた。種々の濃度に調整した PVA 溶液に HAp 粒子を混合し、超音波処理を施すことで HAp 粒子を分散させた。さらに、所定濃度の DNA 水溶液を混合し、超高压処理装置 (Dr. CHEF ; (株) 神戸製鋼所) を用いて 37°C、10000 気圧、10 分間の超高压処理

Gene transfection into mammalian cells using PVA/DNA complexes encapsulating inorganic nanoparticles

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, Yuichi OHYA¹⁾, Tatsuro OUCHI¹⁾, Shingo MUTSUO²⁾, Hidekazu YOSHIZAWA²⁾, Tsutomu FURUZONO³⁾, Toshiya FUJISATO³⁾, Akio KISHIDA
(Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ¹⁾Kansai University, ²⁾Okayama University, ³⁾National Cardiovascular Center Research Institute)
Tel&Fax: 03-5280-8029, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key word: ultra high pressure /inorganic nano-particles / hydroxyl apatite / hydrogen bond / nano-composite / gene delivery

Abstract: Polyvinyl alcohol (PVA)/DNA complexes encapsulating nano-scaled hydroxyl apatite (HAp) particles were formed by ultra high pressure processing. The good dispersiveness of them was showed comparison with the nano-HAp particles/DNA complexes. Using fluorescent labeled DNA molecules, the cellular uptake of the PVA/DNA complexes encapsulating nano-HAP was investigated. The intracellular distribution of them was observed by fluorescent microscope. The high transfection efficiency was achieved using PVA/DNA complexes encapsulating nano-HAP, suggesting the effective DNA release from endocytosis.

を施した (図 1)。得られた混合溶液を目視、顕微鏡、SEM により観察した。複合体形成をゲル電気泳動にて確認した。マウス由来の繊維芽細胞 (L929)、マウスマクロファージ様細胞 (RAW264)、ラット骨髄細胞 (rBMC) を用いて、複合体の細胞による取り込みおよび遺伝子発現を検討した。

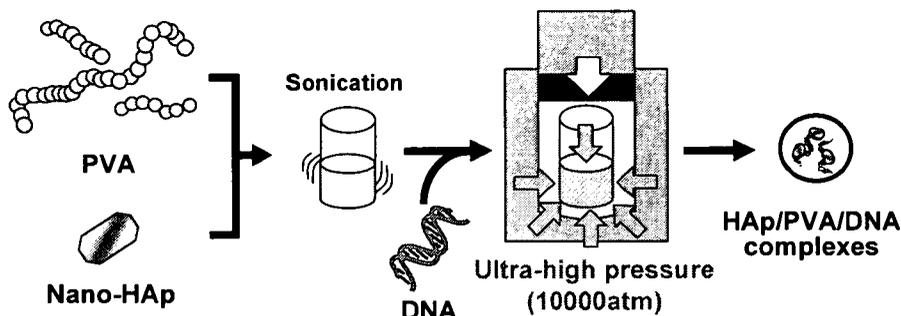


Fig1. Preparation of PVA/DNA complexes encapsulating HAp particles

[結果と考察]

ナノ HAp 粒子単独あるいは DNA の混合系では、若干のナノ HAp の凝集が観察された。一方、PVA 水溶液へのナノ HAp の混合、超音波処理により、ナノ HAp の安定した分散が達成され、さらに DNA の混合においても凝集、沈殿は認められなかった。これより、PVA による凝集抑制効果が示された。ナノ HAp、PVA、DNA 混合溶液を超高圧処理した結果、1w/v%PVA 溶液では約 $1\mu\text{m}$ の微粒子が、0.1w/v%では、約 200nm のナノ粒子が作製された。蛍光色素でラベルした DNA (FITC-DNA) を用いて、細胞による DNA の取り込みを調査した。コントロールであるリン酸カルシウム法では、リン酸カルシウムの凝集、沈殿が観察された。一方、複合体では、凝集は認められず、細胞表面への吸着と取り込みが示された。また、蛍光タンパク質遺伝子をコードしたプラスミド DNA を用いて、遺伝子発現効率を検討した。その結果を図 2 に示す。DNA のみの場合は発現は認められず (図 1(A))、また、ナノ HAp/PVA/DNA の混合液においても遺伝子発現は示されなかった (図 1(B))。一方、超高圧処理により作製したナノ HAp/PVA/DNA 複合体においては有意な遺伝子発現が示され (図 1(C))、遺伝子導入効率の良い Lipofectamine2000 と同程度であった。

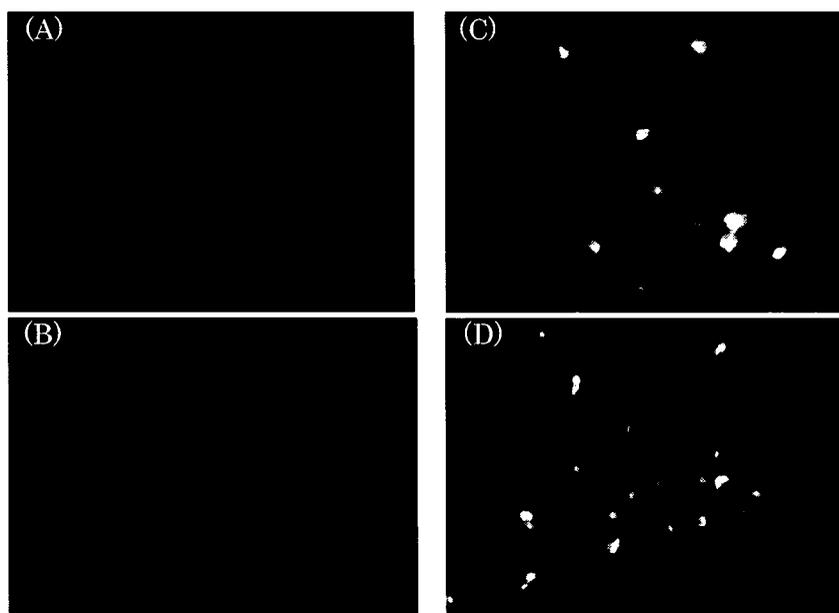


Fig2. Gene expression in cells transfected by (A) DNA, (B) nano-HAp/PVA/DNA mixture, (C) nano-HAp/PVA/DNA complex and (D) Lipofectamine2000.

超高静水圧処理による分子集合体の開発

○ 木村剛, 南広祐 (東医歯大生材研), 六雄伸悟, 吉澤秀和 (岡山大環境理工),
藤里俊哉 (国循七研), 岸田晶夫 (東医歯大生材研)

Development of molecular assembly by ultra high pressure technology

Tsuyoshi KIMURA, Kwangwoo NAM, (Tokyo Med. Dent. Univ.) Shingo MUTSUO, Hidekazu YOSHIZAWA (Okayama Univ.)

Toshiya FUJISATO (National Cardio. Center Res. Inst.), Akio KISHIDA (Tokyo Med. Dent. Univ.)

1. はじめに

近年、ファンデルワールスカ、クーロン力、水素結合など比較的弱い分子間相互作用によって形成される分子集合体に関する研究が活発に行われている。そのほとんどは、精密な分子設計に基づき合成された分子が、熱、塩濃度、pHなどの条件の最適化された環境において集合化がなされる。我々は、新たな分子集合体化法として、高圧条件下において物質の相互作用のうち水素結合が強調されること^{1,2)}に着目し、水素結合性高分子への超高静水圧処理による分子集合体の形成について検討している。本研究では、汎用的な水素結合性高分子のモデルとしてポリビニルアルコールを用いて、さまざまな条件下での高分子集合体形成に関して検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

水素結合性高分子のモデルとして、分子量の異なるポリビニルアルコール (PVA)、ポリエチレングリコール (DEX)、デキストラン (DEX) を用いた。0.1、1.0、10%水溶液調整し、単独あるいは混合したのちに、圧力印加装置 (Dr. chef、(株)神戸製鋼所) を用いて、種々の圧力下にて静水圧処理を行った。目視観察、SEM観察、DLS測定にて分子集合体の解析を行った。

3. 結果と考察

まず、圧力の影響を調べるため、10% PVA溶液にさまざまな圧力で静水圧処理を行った。印加圧力の上昇に伴い粘調な溶液と変化し、6000気圧以上で脆弱なハイドロゲルが得られ、10000気圧においては成形性の良い白色のハイドロゲルが得られた。これらを100℃にて加温した結果、透明溶液になったことから、水素結合を介した分子集合体であることが示された。次に、種々の濃度のPVA水溶液に超高静水圧処理 (10000気圧) を行った。濃度により異なる溶液変化が見られ、1.0%では白濁溶液が得られたが、0.1%では透明溶液のままであった。これらをSEM観察した結

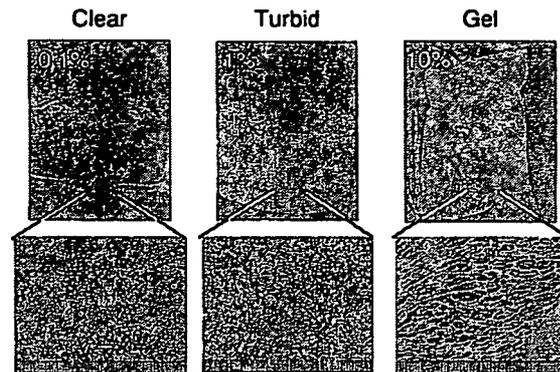


Fig1. Ultra-high pressure treatment of PVA solutions at various concentrations

果、それぞれ約200nmの粒子と、その凝集体が形成されていた (図1)。また、印加圧力を調整することで粒子径の制御が可能であった。

一方、PEG、DEXにおいては、単独溶液では超高静水圧処理による溶液の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/DEX混合液への超高静水圧処理では、水性二相が形成された。一般に、高分子量にPEG、DEXの場合での水性二相形成が知られているが、今回我々の用いた分子量では、混合のみでは水性二相は形成されなかった。このことから、この現象は超高圧によるDEX、あるいはPEG/DEXの集合体形成に伴う見かけの分子量の増加により水性二相が形成されたと考えられる。以上より、超高静水圧処理法は、新たな分子集合化法といえる。

本研究は、厚生労働科学研究費、ヒューマンサイエンス総合研究事業および日本学術振興会研究補助金に依った。

参考文献

- [1] E. Doi, A. Shimizu, N. Kitabatake, in: R. Hayashi (Ed.), *High Pressure Bioscience and Food Science*, Sanei Press, 1993, p. 171.
- [2] E. Doi, A. Shimizu, N. Kitabatake, *Food Hydrocoll.* 5 (1991) 409.

超高压印加法による多成分系ポリマー構造体の調製

東医歯大生材研 ○木村剛・南広祐、 日大理工 三浦義之・栗田公夫、
岡大環理工 六雄伸吾・吉澤秀和、 国循セ研 岡田正弘・古園勉・藤里俊哉、
東医歯大生材研 岸田晶夫

1. 緒言

我々は、超高压技術を用いた新規ポリマー構造体の創製について研究を行っている。これまで、超高压（10000気圧）印加により、ポリビニルアルコール（PVA）が水素結合によってナノ・マイクロ粒子、ハイドロゲルが形成されること、また、DNA との混合系にて PVA/DNA ヘテロ構造体が形成されることを報告した。本研究では、種々の水素結合性高分子を用いて、超高压印加法による新規な多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。

2. 実験

種々の分子量のポリエチレングリコール（PEG）、デキストラン（DEX）を用いた（表1）。また、小麦、馬鈴薯、サツマイモ、トウモロコシに由来するデンプンを用いた。各々の10%(w/v)水溶液を調製し、1:1の割合で混合した後、超高压（10000気圧、10分間、25°C）により処理した。超高压処理液を、目視による観察、動的光散乱（DLS）測定、粘度測定、示差走査熱量（DSC）測定にて構造体の物性解析を行った。

Table 1. Various polymers used

| No | Polymers | Mw |
|----|----------|------------------|
| 1 | PEG | 6,000 |
| 2 | PEG | 8,000 |
| 3 | Dextran | 32,000 ~45,000 |
| 4 | Dextarn | 60,000 ~90,000 |
| 5 | Dextarn | 100,000 ~200,000 |

3. 結果と考察

超高压印加処理による PEG、DEX の単成分溶液の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、エマルジョンが形成され、その散乱により青白色を呈したと考えている。

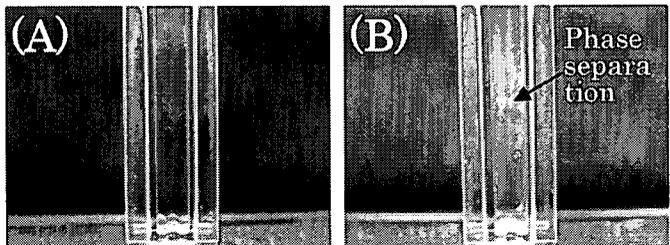


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG (No.1) and dextran (No5) (A) without or (B) with ultra high pressure treatment.

さらに PEG/DEX 混合液への超高压印加処理では、高分子量の DEX (No4, 5) を用いた場合に水性二相を形成し、下相（DEX 相）が青白色を呈した（図1）。より高い分子量の DEX (Mw=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 とで水性二相を形成することから、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、超高压印加による新規多成分構造体が形成したと考えられる。この他に、PEG/DEX 構造体の詳細な解析、デンプンへの超高压印加による構造体形成の検討について報告する。

本研究は、厚生労働科学研究費、ヒューマンサイエンス総合研究事業および日本学術振興会研究補助金に依った。

“Preparation of novel multicomponent polymer structures by ultra high pressure technology.”

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Masahiro OKADA⁴, Tsutomu FURUZONO⁴, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA¹

(¹Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan, ²Nihon Univ., ³Okayama Univ. ⁴National Cardiovascular Center Research Institute)

¹TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

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

○木村剛¹⁾, 南広祐¹⁾, 三浦義之²⁾, 栗田公夫²⁾, 六雄伸吾³⁾,
吉澤秀和³⁾, 岡田正弘⁴⁾, 古菌勉⁴⁾, 藤里俊哉⁵⁾, 岸田晶夫¹⁾

1)東医歯大 生材研, 2)日本大 理工, 3)岡山大 環理工,
4)国循セ研 生体工, 5)国循セ研 再生医療

1. 緒言

我々は、超高压技術を用いた新規高分子構造体の創製に関して検討している。これまで、ポリビニルアルコール (PVA) 水溶液への超高压 (10000 気圧) 印加により、水素結合によってナノ・マイクロ粒子、ハイドロゲルが得られること、また、DNA との混合系にて PVA/DNA ヘテロ構造体が形成されることを報告した。本研究では、超高压印加による新規な多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。生医学応用を目指し、素材として医療用途に用いられている高分子および生物由来高分子を用いた。

2. 実験

種々の分子量のポリエチレングリコール (PEG)、デキストラン (DEX) を用いた (表 1)。また、小麦、馬鈴薯、サツマイモ、トウモロコシに由来するデンプンを用いた。各々の 10%(w/v)水溶液を調製し、1:1 の割合で混合した後、超高压印加処理 (10000 気圧、10 分間、25℃) を施した。超高压処理液を、目視による観察、動的光散乱 (DLS) 測定、粘度測定、示差走査熱量 (DSC) 測定にて構造体の物性解析を行った。

Table 1. Various polymers used

| No | Polymers | Mw |
|----|----------|------------------|
| 1 | PEG | 6,000 |
| 2 | PEG | 8,000 |
| 3 | Dextran | 32,000 ~45,000 |
| 4 | Dextarn | 60,000 ~90,000 |
| 5 | Dextarn | 100,000 ~200,000 |

3. 結果と考察

PEG、DEX の単成分溶液では、超高压印加による溶液の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 を混合すると溶液は青白色に変化し、この現象は高分子量の DEX を用いた場合に顕著であった。高分子量の PEG と DEX を混合液すると水性二相が形成することが知られている。今回用いた PEG、DEX は低分子量のため、マクロな二相は形成されず、エマルションが形成されたため、その散乱で青白色を呈したと考えている。

さらに PEG/DEX 混合液への超高压印加では、高分子量の DEX を用いた場合に水性二相を形成し、下相 (DEX 相) が青白色を呈した。より高い分子量の DEX (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 とで水性二相を形成することから、この現象は超高压による DEX の構造体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、超高压印加による新規多成分構造体が形成したと考えられる。この他に、PEG/DEX 構造体の詳細な解析、デンプンへの超高压印加による構造体形成、およびこれらの生医学応用に関する検討について報告する。

本研究は、厚生労働科学研究費、ヒューマンサイエンス総合研究事業および日本学術振興会研究補助金に依った。

“Preparation of novel multicomponent polymer structures using ultra high pressure technology for biomedical application.” Tsuyoshi Kimura¹⁾, Kwangwoo Nam¹⁾, Yoshiyuki Miura²⁾, Kimio Kurita²⁾, Shingo Mutsuo³⁾, Hidekazu Yoshizawa³⁾, Masahiro Okada⁴⁾, Tsutomu Furuzono⁴⁾, Toshiya Fujisato⁵⁾, Akio Kishida¹⁾

1) Tokyo Medical and Dental Univ., 2) Nihon Univ., 3) Okayama Univ. 4), 5) National Cardiovascular Center Research Institute

P-162 超高压誘起多成分系高分子複合体による遺伝子送達の検討

三浦義之¹, 栗田公夫¹, 木村 剛², 南 広祐², 六雄伸吾³, 吉澤秀和³, 岡田正弘⁴, 古籔 勉⁴, 藤里俊哉⁵, 岸田晶夫²

¹日本大学 理工学部 物質応用化学科, ²東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, ³岡山大学 環境理工学部, ⁴国立循環器病センター 研究所 生体工学部, ⁵国立循環器病センター 研究所 再生医療部

[緒言]我々は、超高压技術による分子集合体形成に関する研究を行っている。これまで、水素結合性高分子であるポリビニルアルコール(PVA)とDNAの混合液への超高压印加(10,000気圧)により、水素結合を介するPVA/DNA複合体の形成と細胞への遺伝子導入を報告した。本研究では、種々の水素結合性高分子を用い、超高压印加による新規高分子構造体の創製と遺伝子導入の可能性について検討した。[実験]種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG)、デキストラン(DEX)を用いた。異なる濃度の混合液を超高压装置 ((株)神戸製鋼所)にて超高压処理(10,000気圧、10分間、25℃)を施した。処理液の目視観察、粘度測定、DLS測定等にて物性解析を行った。プラスミドDNAとの複合体を調整し、培養細胞への遺伝子導入を検討した。[結果と考察]PEG、DEXの単成分溶液への超高压処理では、目視変化は観察されなかった。PEGとDEXの混合溶液では青白色の散乱を示し、超高压処理後に二相に分離し、下相において青白色散乱した。超高压印加後の溶液のDLS測定において粒子径の増加が示された。超高压処理によりDEX単独あるいはPEG/DEXの多成分構造体が形成され、見かけの分子量増加により水性二相が形成されたと考えられる。DNAとの複合体形成と培養細胞への遺伝子導入について合わせて報告する。厚生労働省科学研究費ならびに文部科学研究費の補助を受けて行われた。