

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

○木村剛¹・南広祐¹・六雄伸悟²・吉澤秀和²・岡田正弘³・古蘭勉³・藤里俊哉³・岸田晶夫¹

¹東医歯大生材研・²岡山大環境理工・³国循セ研先医工セ

kimurat.fm@tmd.ac.jp

<緒言>

遺伝子導入法の一つとして、DNA とリン酸カルシウムの共沈殿によるリン酸カルシウム法があり、簡便かつ低コストで行えることから *in vitro* にて幅広く利用されている。DNA-リン酸カルシウム共沈殿の生成は pH に依存し、微小な pH 変化、生成時間により得られる共沈殿のサイズが大きく異なるため、遺伝子導入効率の再現性が低い。この問題に対して、赤池らはマグネシウムの添加により結晶成長制御と遺伝子発現効率の向上に成功している[1]。一方近年、無機、有機のそれぞれの特性を併せ持つ無機／有機コンポジットの研究が活発に行われている。遺伝子ベクターにおいては、片岡らが、高分子ミセルの内核においてリン酸カルシウム結晶を生成させ、細胞への遺伝子導入に成功している[2]。ここでは、エンドサイトーシス経路の pH 低下にてリン酸カルシウム結晶が溶解され、浸透圧ショックによるエンドソームの崩壊、核酸分子の細胞質移行が示唆されている。本研究では、無機／高分子コンポジットの調製法として超高压印加法を導入し、無機物質としてはナノスケールのハイドロキシアパタイト (ナノ HAp) を用いて、無機／高分子コンポジットによる細胞への遺伝子導入について検討した。超高压印加法では、物質間の水素結合が強調性され、水素結合性高分子と DNA の複合化され、また、複合体にナノ HAp を付加することで上記の機構にてエンドサイトーシスからの遊離が促進されると考えられる。

<実験>

ポリビニルアルコール (PVA) を用いた。HAp は、マイクロエマルジョン法により調整し、種々のスケール (50~400nm) のナノ HAp を得た。遺伝子としては、蛍光タンパク質遺伝子、あるいはルシフェラーゼ遺伝子を有するプラスミド DNA、サケ白子 DNA を用いた。PVA、PEG、DEX を種々の濃度に調製し、0.01~10mg/ml の HAp 溶液、DNA 溶液と様々な割合で混合し、10000 気圧、10 分間加圧した (超高压処理)。得られた無機／高分子コンポジットの物性を、SEM 観察、電気泳動法、DLS 測定、DSC 測定、CD 測定などの種々の方法にて検討した。細胞として、L929、RAW264、MC3T3、ラット骨髄細胞を用いた。これらの細胞への遺伝子導入を血清存在下で行い、蛍光強度測定、ルシフェラーゼ活性測定により評価した。また、細胞内動態について蛍光ラベル化 DNA を用いて蛍光顕微鏡観察を行った。

<結果・考察>

ナノ HAp を PVA と混合し、超音波処理することで分散性の高いナノ HAp-PVA 溶液が得られ、DNA を添加後、超高压処理によりナノ HAp/PVA/DNA 複合体が得られた。得られる複合体は、用いる PVA 濃度に依存し、低濃度ではナノ・マイクロ粒子が、高濃度でハイドロゲルが得られた。DNA/PVA/HAp 複合体の SEM 観察により、表面および内部への HAp 含有が確認された。超高压技術を用いることで、無機／高分子コンポジットを容易に作製できることを示している。蛍光ラベル化 DNA を用いて粒子状の複合体の細胞への取り込みと細胞内動態を検討した。添加後 1 時間では、ナノ HAp を含有しない PVA/DNA 複合体、リン酸カルシウム/DNA 複合体に比べ、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体の有意な細胞内導入が示された。24 時間後においてもその導入遺伝子は確認された。また、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体の場合に、遺伝子発現の有意な向上が示された。しかし、市販の遺伝子導入剤である Lipofectamine2000 に比して低く、更なる改善が必要である。一方、高濃度のハイドロゲルでは、核酸染色法により DNA の含有が確認された。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結果、PVA ゲル上では細胞接着は観察されず、HAp 含有 PVA ゲルにおいて有意な細胞接着が認められた。このハイドロゲルによる遺伝子導入についても報告する。

エンドソーム遊離促進を目指した
ナノHAp/PVA/DNA複合体による遺伝子導入

東医歯大生材研 ○仁部洋一・木村剛・南広祐 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、超高压処理により調製したポリビニルアルコール (PVA) と DNA の複合体を用いた細胞への遺伝子導入を検討している。PVA/DNA 複合体の細胞内送達は達成されたが、十分な遺伝子発現は認められなかった。そこで、エンドソームの遊離促進を目指し、低 pH で溶解されるハイドロキシアパタイトのナノ粒子を含有するナノ HAp/PVA/DNA 複合体を考案し、遺伝子導入効率の向上が示された。本研究では、更なるエンドソーム遊離促進と遺伝子導入効率の向上を目指し、物性の異なる HAp を用いた HAp/PVA/DNA 複合体による遺伝子送達について検討した。

【実験】形状および酸溶解性の異なる HAp を用いた。HAp 濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高压処理装置 (Dr.CHEF ; (株)神戸製鋼所) を用いて 37°C、10000atm の超高压処理を施し、ナノ HAp/PVA/DNA 複合体を得た。得られた複合体の物性を光学・電子顕微鏡観察、DSC 測定にて解析した。COS 7 細胞への遺伝子送達について、蛍光ラベル化したプラスミド DNA を用いて検討した。

【結果と考察】超音波処理を 20 分した後、高濃度 DNA 溶液に混合した場合に高分散性複合体が得られることが明らかとなった。得られた DNA/PVA/HAp 複合体の SEM 観察では、表面および内部への HAp 含有が確認された。蛍光ラベル化 DNA を用いた細胞内送達では、添加後 1 時間において HAp を含有しない PVA/DNA 複合体、リン酸カルシウム/DNA 複合体に比べ、HAp/PVA/DNA 複合体の場合に有意な細胞内導入が達成された。24 時間後においても導入遺伝子は確認された (図)。これらの結果より、HAp による早期の細胞内送達を示された。

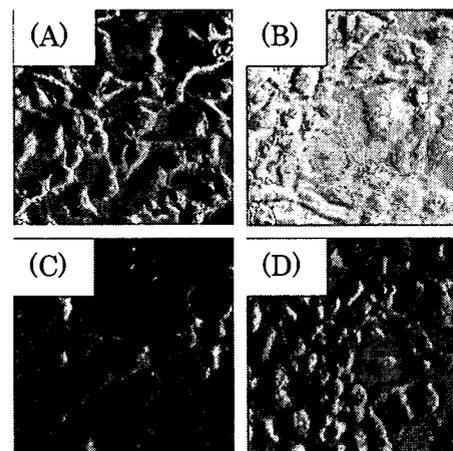


Fig. Gene delivery into COS7 cells using (A) DNA, (B) nano-PVA/DNA (C) nano-HAp/PVA/DNA complex and (D) calcium phosphate/DNA complex.

Gene delivery using nano-HAP/PVA/DNA complexes promoting endosomal escape

Yoichi NIBE¹, Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIKAWA², Masahiro Okada³, Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISATO³, Akio KISHIDA¹ (Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. ²Okayama University, ³National Cardiovascular Center Research Institute)

Phone&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: We have researched gene transfection using hydrogen bonding polymer/DNA complex prepared by ultra high pressure technology. In this study, for effective gene transfection, we investigated the preparation of nano-hydroxyl apatite (HAp)/PVA/DNA complex including nano-scaled HAp particles promoting endosomal escape. Gene transfection was carried out using fluorescent labeled plasmid DNA molecules. After 1hour incubation, the effective cellular uptake of HAp/PVA/DNA complexes comparison with PVA/DNA complex and DNA was observed by fluorescent microscope, and then high transfection efficiency was achieved using HAp/PVA/DNA complexes. These results indicate the effective DNA release from endocytosis.

PEG/多糖の水性二相系への超高压処理による新規構造体の調製

日大理工 ○三浦義之・栗田公夫 東医歯大生材研 木村剛・南広祐、
岡山大環境理工 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

<緒言>

我々は超高压技術を用いた新規構造体の創製について研究を行っている。超高压条件下では、水素結合が強調されることに着目し、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)への超高压印加により、ナノ・マイクロ粒子、ハイドロゲルが形成されることを報告した。本研究では、種々の分子量のPEG/多糖水性二相系の高分子混合液への超高压処理による、新しい多成分系ポリマー構造体の調製について検討した。

<実験>

種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG、Mw:6000、8000)、デキストラン(DEX、Mw:60,000~90,000、50,000)、プルランを用いた。各々10%(w/v)水溶液を調製し、1:1の割合で混合した後、25°Cで10,000気圧、10分間超高压印加処理した。処理液を、目視による観察、動的光散乱(DLS)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。

<結果・考察>

各単成分溶液への超高压処理では、目視による変化が確認できなかった。一方、PEG/DEX混合溶液では、溶液を調製した段階で溶液が青白色を呈した。これは、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を混合することにより水性二相分離が形成されることが知られている。今回用いたPEG、DEXは低分子量であることから二相は形成されず、エマルジョンな状態となったことで散乱が生じ、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処理では、高分子量のDEXを用いた場合に水性二相を形成し、下相では青白色を呈した(図1)。より高分子量のDEX(Mw=500,000)を用いると、超高压を印加しない場合でも水性二相を形成するが、処理後では変化は確認できなかった。従って、この現象は超高压によるPEGとDEXから成る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。生じた二相分離の下相部の溶液のDLS測定(25°C)では、いずれの場合も粒子径の増加が観察された。また、50°CにおけるDLS測定では粒子径の減少が示されたから、PEG/DEXのエマルジョンへの超高压印加処理により、水素結合を介した新規多成分構造体が形成されたと考えられる。また、PEG/プルラン混合系においても、同様の結果が得られた。PEG/DEX構造体の詳細な解析、および超高压処理によるその他のPEG/多糖構造体についても報告する。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。

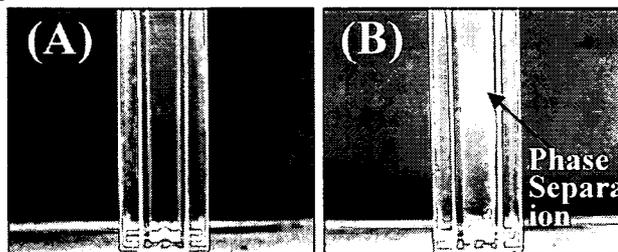


Fig1. Photographs of the mixtures of PEG(6,000) and DEX(60,000~90,000).
(A) without or (B) with ultra high pressure treatment.

Preparation of novel structures by ultra high pressure treatment for aqueous PEG/polysaccharides two-phase system

Yoshiyuki MIURA¹, Kimio KURITA¹, Tsuyoshi KIMURA², Kwangwoo NAM², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Masahiro OKADA⁴, Tsutomu FURUZONO⁴, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA²⁽¹⁾
Nihon Univ., 1-8-14 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan,²Tokyo Medical and Dental Univ.,
³Okayama Univ.,⁴National Cardiovascular Center Reserch Institute)

² TEL&FAX: +81-3-5280-8029, E-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure treatment / aqueous two-phase system

Abstract: In this study, the preparation of novel structures by ultra high pressure (UHP) treatment for aqueous PEG/polysaccharides two-phase system was investigated. For polyethylene glycol (PEG) or dextran (DEX) solutions, the clear solutions were maintained after UHP treatment. On the other hand, when PEG (Mw: 6,000 or 8,000) were mixed with DEX (Mw:60,000-90,000) or pullulan, the solution with light scattering was obtained. After UHP treatment, aqueous two-phase separation having light scattering in lower phase was obtained for all cases, suggesting that apparent molecular weight was increased by the formation of PEG/ polysaccharides complex. DLS measurement of them before/after UHP treatment was carried out. The particle size was increased by UHP treatment, then decreased by heat treatment at 50 degrees, indicating the formation of novel hydrogen bonding structures.

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

東医歯大生材研 ○木村剛・南広祐
 国循セ研 岡田正弘・古園勉・藤里俊哉

岡山大環境理工 六雄伸吾・吉澤秀和
 東医歯大生材研 岸田晶夫

<緒言>

我々は超高压状態における物質の水素結合の強調性に着目し、種々の水素結合性高分子を用いた超高压誘起水素結合性高分子集合体による細胞への遺伝子導入について検討している。これまで、ポリビニルアルコール (PVA) /DNA 複合体、および、ハイドロキシアパタイト (HAp) を含有する HAp/PVA/DNA 複合体による細胞への遺伝子導入を報告してきた。また、高濃度 PVA への超高压印加によりハイドロゲルが形成されることから、PVA/DNA ゲルからの DNA の徐放についても取り組んでいる。本研究では、PVA/DNA ゲルに HAp を含有させることで細胞接着性を付与し、接着する細胞への効率的な遺伝子導入について検討した。

<実験>

重合度 1700、鹼化度 99.3%の PVA を用いた。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 HAp を得た。また、異なる結晶化度の HAp も調整した。遺伝子としては、蛍光タンパク質遺伝子を有する pEGFP プラスミド DNA、サケ白子 DNA を用いた。5、7.5、10w/v% の PVA 水溶液を調製し、0.01~10mg/ml の HAp 溶液、DNA 溶液と種々の割合で混合し、10000 気圧、10 分間加圧した (超高压処理)。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)、マウス骨髄細胞を用いた。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。

<結果・考察>

PVA/HAp/DNA 混合液への超高压処理により白色のハイドロゲルが得られた。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。SEM 観察では、ハイドロゲル表面に HAp が観察され、また、DNA 染色法により DNA の含有が確認された。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。PVA ゲル上では細胞接着は観察されず、HAp 含有 PVA ゲルにおいて有意な細胞接着が認められた。遺伝子導入についても報告する。

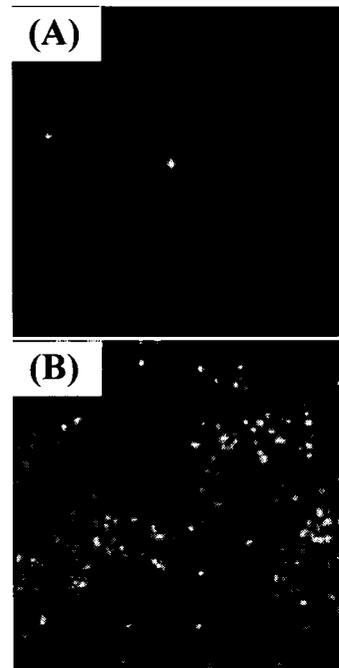


Fig. Adhesion of L929 cells on (A) PVA/DNA and (B) PVA/HAp/DNA hydrogels.

Preparation of nano-inorganic particle/polymer/DNA composites by ultra high pressure technology for gene transfection

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo NAM¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIKAWA², Masahiro OKADA³, Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISAO³, Akio KISHIDA¹ (¹Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, ²Okayama Univ., ³National Cardiovascular Center Reserch Institute)

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

Key Word: ultra high pressure treatment / hydrogel / transfection / hydroxy apatite

Abstract: We have performed the development of nano-inorganic particle/polymer/DNA composites by ultra high pressure technology for gene transfection. Nano scaled hydroxy apatite (HAp) was used as nano-inorganic particle. Polyvinyl alcohol (PVA, 5, 7.5, 10w/v%) aqueous solution mixed with HAp(0.01-10mg/ml) and DNA, then treated by ultra high pressure at 10,000 atm for 10min. HAp/PVA/DNA hydrogel was obtained. By SEM observation, HAp particles on the surface of the hydrogel were observed. By DNA staining, the including of DNA in the hydrogel was confirmed. In order to investigate the cell affinity of the hydrogel, various cell lines were added on the hydrogels. In the case of PVA/DNA hydrogel, almost all of cells were not adhered. On the other hand, the effective cell adhesion was observed on HAp/PVA/DNA hydrogel.

DNA/RNA 構造制御を目指した超高压印加処理とその応用

東医歯大生材研 ○木村 剛、南 広祐、岡大環境理工 六雄 伸吾、吉澤 秀和
国循セ研 古菌 勉、藤里 俊哉、東医歯大生材研 岸田 晶夫

【緒言】

無機・有機科学、医療、食品分野などの幅広い分野で高压技術が利用されている。例えば、人工ダイヤモンド合成や食品加工・滅菌などで実用されている。また、学術的研究の一つとして、压力の熱力学パラメータとしての点から压力印加によるタンパク質の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、压力印加による相互作用の変化により変性されると考えられている。高压下では、一般的に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。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压力印加による水素結合を介す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) への压力印加により、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が得られることを報告した。本研究では、天然の水素結合性高分子である DNA および RNA を用い、DNA および RNA の高次構造に及ぼす压力印加の影響とそれらの機能解析について詳細に検討した。DNA と PVA の混合系への超高压印加によるヘテロ構造体の形成とそれらの細胞への遺伝子導入についてはすでに報告している。

【実験】

DNA としては、プラスミド DNA、1kb ラダー DNA を用いた。それぞれ、TE 溶液に溶解し、種々の濃度に調製した。高压処理装置 (Dr.CHEF ; (株)神戸製鋼所) を用いて、温度を 10、25、37°C、压力を 3,000、6,000、8,000、10,000 気圧、時間を 1、5、10 分の異なる条件にて高压処理を行った。処理液を、UV 測定、T_m 測定、CD 測定、アガロースゲル電気泳動、AFM 観察にて構造解析を行った。また、高压処理による DNA の機能解析として、ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳、

Ultra high pressure technology for controlling the structure of DNA/RNA

Tsuyoshi KIMURA¹, Kwangwoo Nam¹, Shingo MUTSUO², Hidekazu YOSHIZAWA², Tsutomu FURUZONO³, Toshiya FUJISATO³ and Akio KISHIDA¹. (¹ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan, ² Okayama University, ³ National Cardiovascular Center Institute Research)

Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Key Word: ultra high pressure / DNA / RNA / structure

Abstract: High pressure technology has been utilized for various fields, such as inorganic, organic science, bio and food science. Pressure is one of thermodynamic parameters, and interactions, such as van der Waals, Coulomb, hydrophobic interaction and hydrogen bond, are varied under pressure condition. Previously, we reported that structuring of polyvinyl alcohol, which is one of the hydrogen bonding polymers, was induced by ultra high pressure treatment. In this study, we investigated the changing of structure of DNA and RNA by ultra high pressure to controlling the functions of them by ultra high pressure for biomedical application. It is important to control the structure of DNA and RNA for the function expression.

核酸分解酵素を用いた分解性試験により検討した。

【結果と考察】

図1には、1kb ラダーDNA の T_m 測定の結果を示す。超高压未処理の DNA では、約 57°C 付近に、DNA の二重鎖の解離による吸光度の上昇が示された。一方、10,000 気圧、10 分間の超高压処理を施した場合、63°C 付近で T_m が観察され、圧力印加による T_m 上昇が示された。また、CD 測定では、1kb ラダーDNA に超高压印加処理した場合にスペクトルの形状が変化し、280nm、250nm 付近のピークトップのシフトが見られた (図 2)。これらの結果は、超高压印加による DNA の構造変化を示しており、 T_m 測定の結果から新たな水素結合の形成を示唆している。また、核酸分解酵素による分解試験では、超高压印加処理した DNA での分解耐性の向上が示され、超高压印加による機能付与と考えられる。

次に、プラスミド DNA に超高压処理を施した。プラスミド DNA の場合、ラダーDNA に比して顕著な CD スペクトル変化は見られなかった。しかし、10%FBS 存在下にてプラスミド DNA をインキュベートし、その後、無細胞系転写・翻訳システムにて発現するルシフェラーゼ活性を測定した結果、超高压印加処理を施したプラスミド DNA の場合に、ルシフェラーゼ活性の低下は抑制された (図 3)。これは、構造変化に伴う核酸分解酵素耐性の向上と考えられる。これらの結果について、ラダーDNA の場合は低分子量の DNA の構造変化が検出され、高分子量のプラスミド DNA では十分に検出されなかったと考えている。発表では、上記の結果について詳細に報告する。

【謝辞】

本研究は、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。

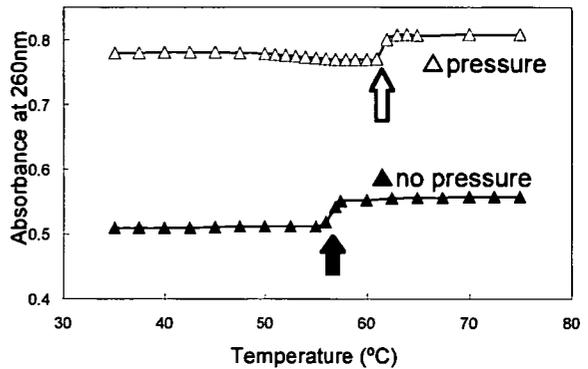


Fig1. T_m measurement of DNA with pressurization at 10,000 atm for 10 min.

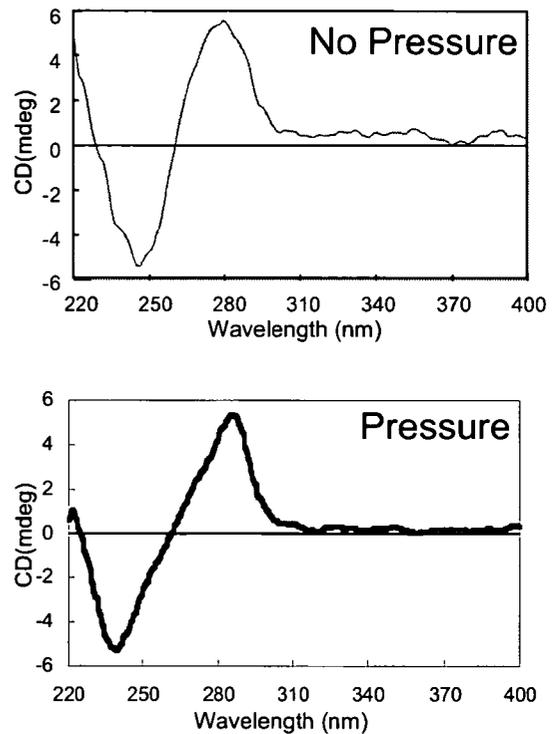


Fig2. CD measurement of DNA with pressurization at 10,000 atm for 10 min.

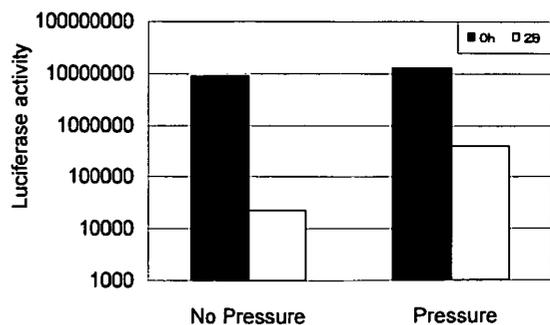


Fig3. Luciferase activity of DNA with pressurization incubated in culture medium with 10% FBS for 0, 20 hours in in vitro transcription/translation system.

PREPARATION OF HYDROGEN BONDING POLYMER STRUCTURES USING ULTRA HIGH PRESSURE TECHNOLOGY AS DRUG CARRIER

Yoshiyuki Miura¹, Tsuyoshi Kimura¹, Kwangwoo Nam¹, Shingo Mutsuo², Hidekazu Yoshizawa², Toshiya Fujisato³, Akio Kishida¹

¹*Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan*

²*Department of Material and Energy Science, Gradual School of Environmental Science, Okayama University, Okayama, Japan*

³*Department of Regeneration Medicine and Tissue Engineering, National Cardiovascular Center Research Institute, Osaka, Japan*

Introduction

Polymeric assembly is a powerful tool for producing functional materials that combine properties and many respond to external conditions (1, 2). Self-assembly of amphiphilic polymers to create nanomicelle (3) or nano-gels (4) has been eagerly studied. They are formed by complex combination of weak interactions, such as hydrophobic interaction, electrostatic interaction and hydrogen bond. To fabricate self-assemble molecules or to break them by controlling these intermolecular forces, alternating concentration and/or temperature is mainly adopted. Here we have focused on pressure, which is one of the fundamental physical parameters as well as concentration and temperature, could also be used for controlling the intermolecular forces to maintain the self-assembled molecules. Pressure processing technology ranging from 1 to 100,000 atmosphere (atm) has been utilized in several fields, such as earth science, material science, food processing, chemistry and biology. In chemistry and biology, the behavior of molecules, such as proteins, artificial peptides and synthetic polymers, has been studied under high pressure condition. It was reported that pressure affected the aggregation properties of elastin, elastin-like peptide (5), poly(N-isopropylamide) (PNIPAM) (6) and poly(N-vinylisobutyamide) (PNVIBA) (7), which exhibit lower critical solution temperatures (LCSTs) derived from their hydrogen bonding and hydrophobic properties.

The strength of pressure at over 6,000 atm is thought as ultra high pressure (UHP). Under UHP condition, the fact that the hydrogen bond between inter/intra molecules is emphasized than electrostatic and hydrophobic interactions is known well (8, 9). Previously, we found that nano-, micro-particles and hydrogels of poly(vinyl alcohol)(PVA) mediated by hydrogen bonding interaction were formed by pressurization (10). Moreover, for drug delivery system, we also reported the formation of hetero-assembling of PVA and DNA using UHP technology and gene delivery into mammalian cells in vitro (11).

In this study, we have demonstrated the preparation of novel assembly via hydrogen bond by UHP treatment using various hydrogen bonding polymers, such as poly(ethylene glycol) (PEG), poly(vinyl pyrrolidone) and dextran. It is well known that aqueous two-phase separation of PEG and dextran having high molecular weights is formed because of their molecular repulsion between them. We hypothesized that the inter/intra molecular hydrogen bonding interaction of PEG and dextran could be induced by UHP processing, in which the hydrogen bonding interaction is strengthened (Figure 1). The assembly of hydrogen bondable polymers was investigated by pressurization under various conditions. The assembly of those and DNA, in which the hydrogen bonding interactions between bases are formed, was also examined by UHP treatment as one of biomedical applications.

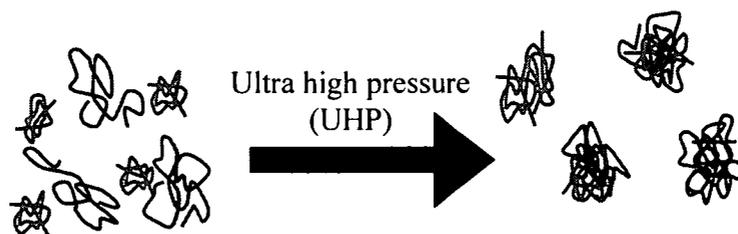


Figure 1. Illustration of polymeric assembly induced by ultra high pressure.

Experimental Part

Poly(ethylene glycol)(PEG), dextran and poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) having various molecular weights were used (Table 1). Their chemical structures are shown in Figure 2. They were dissolved in water at concentration of 10 w/v%, respectively and then autoclaved at 121 °C for 10 minutes. The PEG solution was mixed with dextran solution and PVP solution at the ratio of 1 to 1, respectively. Their mix solutions were treated under ultra high pressure condition at 10000atm, 25 °C for 10 min using high pressure machine (Dr.Chef; Kobe steel. Co. Ltd.). The obtained solution was observed by visual observation and the size of the obtained solution was measured using by dynamic light scattering (DLS) measurement. Also, the changing of their sizes during heat treatment was examined by DLS measurement in order to confirm whether the driven force of their assemblies is the hydrogen bonding interaction.

Polymers	Mw
PEG6	6,000
PEG8	8,000
Dextran60	60,000-90,000
Dextran500	500,000
PVP40	40,000
PVP360	360,000

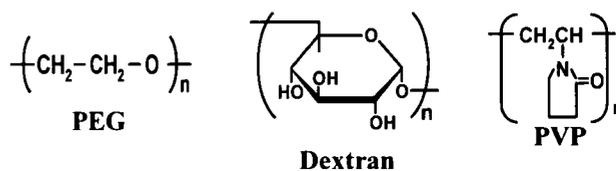


Figure 2 Chemical structures of polymers used

Results

When 10 w/v% solutions of PEG6, PEG8 and PEG35 were pressurized at 10,000 atm, 25 °C for 10 min, respectively, the solutions were still translucent. Also, in the case of dextran60, dextran100, dextran500, PVP40 and PVP360, there was no change in visual observation of them as they were treated by UHP processing (Figure 3). When the DLS measurement of PEG6 solution and dextran60 solution with/without UHP treatment was carried out at 25 °C, the average diameters of PEG and dextran were approximately 4 and 8 nm, respectively, irrespective of UHP treatment. Also, no change in sizes of PEG6 and dextran60 was detected by DLS measurement at 50 °C (Table 2). These results indicate that the assemblies of themselves were not induced by UHP treatment. On the other hand, the two-phase separation of mixture solution of PEG6 (5 w/v%) and dextran60 (5 w/v%) was obtained by UHP treatment although the alteration of solution was not observed with mixing of them (Figure 4). The light scattering was observed in lower phase, suggesting that apparent molecular weight was increased by the formation of the assembly of PEG6 and dextran60. In order to confirm the formation of the assembly by UHP treatment, DLS measurement of the mixture solution was performed before and after UHP treatment. The average diameter of their molecules in the mixture solution was increased by UHP

treatment, indicating that the assembling of PEG6 and dextran60 by pressurization (Table 2). The diameter of the assembly was decreased by heat treatment. It suggests that the driving force of the assembly formed by UHP treatment is hydrogen bonding interaction. Similarly, the phase separation of mixture solution of PEG6 (5 w/v%) and PVP40 (5 w/v%) was formed by UHP treatment (Figure 4).

In order to investigate the assembling of PEG and dextran by UHP treatment in detail, PEG and dextran having higher molecular weights were used. The two-phase separation of PEG8 and dextran60 having light scattering in lower phase was induced by UHP treatment, while that of PEG8 and dextran500 was already obtained before UHP treatment. Also, the phase separation was already formed by mixing of PEG6 and dextran500 before UHP treatment. From these results, it was clear that the assembly tended to be formed using dextran having optimal molecular weight. It seems that the assembly could be inhibited due to the intense molecular repulsion between PEG and dextran having higher molecular weight.

When the mixture solution of DNA and PEG6 was pressurized at 10,000 atm for 10 min, the assembling of them was confirmed by agarose gel electrophoretic analysis. The assembly of DNA and dextran60 was also formed by UHP treatment. From these results, they would be utilized as a novel drug carrier.

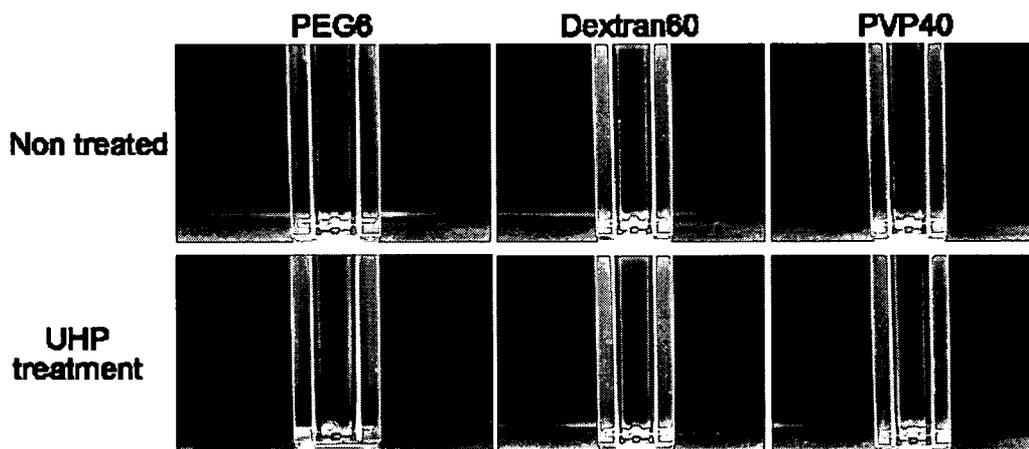


Figure 3. Photographs of polymer solutions of 10 w/v% before and after UHP treatment.

Table 2. DLS measurement of polymer solutions before and after UHP treatment.

Mixtures	Size/nm		
	Non UHP	UHP	UHP
	25°C (nm)	25°C (nm)	50°C (nm)
PEG6	3.6±0.01	3.5±0.04	4.4±0.05
Dextran60	8.1±0.1	7.9±0.04	8.0±0.02
PEG6/Dextran60	112.0±16.0	140.7±7.0	109.5±3.5

* Analysis by cumulant method

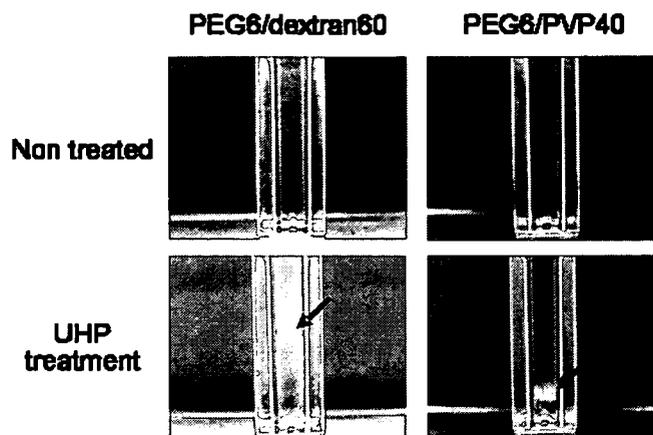


Figure 4. Photographs of mixture solutions of PEG6 and other polymers used before and after UHP treatment.

Discussion

This report described the successful formation of a novel polymeric assembly using UHP technology. DLS measurement confirm the successful assembling of PEG and dextran mediated by hydrogen bonding interaction. Also, PEG and dextran were also assembled with DNA, which has hydrophobic and hydrophilic moieties, by UHP treatment. It is expected that this methodology could be applied to build a structure by the manipulating molecular interactions to develop novel assembly.

This work was supported by grants from the ministry of Health, Labour and Welfare, and the ministry of Education, culture, Sports, Science and Technology.

References

1. Ikkala, O, Brinke, GT, "Functional materials based on self-assembly of polymeric supramolecules." *Science*, **295**, 2407-2409, 2002.
2. Whitesides, GM, Grzybowski, B, "Self-assembly at all scales." *Science*, **295**, 2418-2421.
3. Yokoyama, M, Miyauchi, M, Yamada, N, Okano, T, Sakurai, Y, Kataoka, K, Inoue, S, "Characterization and anticancer activity of the micelle-forming polymeric anticancer drug adriamycin-conjugated poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer" *Cancer Res.* **50**, 1693-700, 1990.
4. Morimoto, N, Endo, T, Ohtomi, M, Iwasaki, Y, Akiyoshi, K, "Hybrid nanogels with physical and chemical cross-linking structures as nanocarriers." *Macromolecular Bioscience*, **5**, 710-716, 2005.
5. Tamura, T, Yamaoka T, Kunugi S, Panitch, A, Tirrell, DA, "Effects of temperature and pressure on the aggregation properties of an engineered elastin model polypeptide in aqueous solution." *Biomacromolecules.*, **1**, 552-555, 2000.
6. Schild, HG, "Poly(N-isopropylacrylamide)-experiment, theory and application" *Prog. Polym. Sci.*, **17**, 163-249, 1992.
7. Akashi, M, Nakano, S, Kishida, A, "Synthesis of poly(N-vinylisobutyramide) from poly(N-vinylacetamide) and its thermosensitive property." *J Polym. Sci. Part A: Polym. Chem. Ed.*, **34**, 301-303, 1996.

8. Sawamura, S, Kitamura, K, Taniguchi, Y, "Effect of pressure on the solubilities of benzene and alkylbenzene in water." *J Phys. Chem.*, **93**, 4931-4935, 1989.
9. Doi, E, Shimizu, A, Kitabatake, N, "Gel-sol transition of ovalbumin by high pressure." in: R, Hayashi (Ed.), *High Pressure Bioscience and Food Science*, Sanei Press, 171-177, 1993.
10. Yamamoto, K, Furuzono, T, Mutsuo, S, Yoshizawa, H, Kitamura, Y, Kishida, A, " Formation of the supramolecular assembly of poly(vinyl alcohol) by ultrahigh pressure." *Meeting report of the poval committee*, **121**, 25-26, 2002
11. Kimura, T, Okuno, A, Miyazaki, K, Furuzono, T, Ohya, Y, Ouchi, T, Mutsuo, S, Yoshizawa, H, Kitamura, Y, Fujisato, T, Kishida, A, "Novel PVA-DNA nanoparticles prepared by ultra high pressure technology for gene delivery." *Mater. Sci. Eng. C*, **24**, 797-801, 2004

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

○木村剛¹⁾・小粥康充²⁾・岡田正弘³⁾・古菌勉³⁾・
六雄伸悟⁴⁾・吉澤秀和⁴⁾・藤里俊哉⁵⁾・岸田晶夫¹⁾

1) 東京医科歯科大学 生体材料工学研究所、2) 科学技術振興機構 研究成果活用プラザ大阪 古菌プロジェクト、3) 国立循環器病センター研究所 生体工学部、4) 岡山大学、環境理工学部、5) 国立循環器病センター研究所 再生医療部

1. 緒言

エンドサイトーシス経路を介する非ウイルス遺伝子デリバリーでは、エンドソームから細胞質への移行が重要となる。これまで、エンドソームの酸性化をトリガーとし、エンドソーム膜を破壊する遺伝子ベクターの分子設計が行われてきた。膜破壊性のカチオン性両親媒ペプチド、ヒスチジン含有ペプチド、あるいは、プロトンスポンジ効果を誘導するカチオン性ポリマーなどである。遺伝子導入促進は達成されているが、そのカチオン性に由来する細胞傷害性が問題として残る。一方、リン酸カルシウムなどの無機塩と DNA との共沈殿物がエンドソームの酸性下で溶解され、エンドソームからの遺伝子の遊離が報告されているが、その再現性、安定性は低い。我々は、細胞障害性の低減を目的に、非電荷ポリマーであるポリビニルアルコール (PVA) を用い、超高压印加法にて誘起される PVA/DNA 複合体の遺伝子ベクターとしての応用を検討している。細胞内導入は達成されるが、有意な遺伝子発現は認められなかった。本研究では、PVA/DNA 複合体への無機塩の付加による遺伝子導入促進について検討した。

2. 実験

無機塩として、ハイドロキシアパタイト (HAp) を用いた。改良型マイクロエマルジョン法により、形状および酸溶解性の異なる HAp を調製した。HAp 濃度、分散処理条件の最適化を行い、超高压処理装置 ((株)神戸製鋼所) を用いて 37°C、10,000 atm の超高压処理を施し、HAp 含有 PVA/DNA 複合体を得た。得られた複合体の物性を光学・電子顕微鏡観察、DSC 測定にて解析した。蛍光ラベル化プラスミド DNA を用いて、COS7 細胞への遺伝子導入・発現を検討した。

3. 結果と考察

所定濃度の PVA 水溶液に HAp を添加し、超音波処理により高分散溶液を得た。DNA 溶液を混合し、超高压印加処理を施した。SEM 観察では、PVA/DNA 複合体に比べ、HAp を混合した複合体の表面での凹凸が観察され、PVA/DNA 複合体への HAp の含有が明らかとなった。また、得られた HAp 含有 PVA/DNA 複合体溶液の pH 滴定により、HAp の酸溶解性が確認された。蛍光ラベル化 DNA を用いて細胞内導入について検討した結果、HAp 含有 PVA/DNA 複合体の有意な細胞内導入が示された。HAp 含有による有意な遺伝子発現が示されたが、市販の遺伝子導入剤に比して低く、更なる改善が必要である。本研究は、厚生労働省科学研究補助金の助成を受けて行われた。

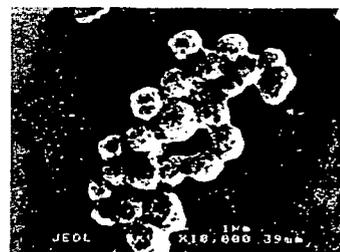


Fig. SEM image of PVA/DNA complexes containing HAp.

Enhancement of gene transfection using PVA/DNA complex containing inorganic salts formed by ultra high pressure treatment

Tsuyoshi KIMURA¹⁾, Yasumichi KOGAI²⁾, Masahiro OKADA³⁾, Tsutomu FURUZONO³⁾, Shingo MUTSUO⁴⁾, Hidekazu YOSHIKAWA⁴⁾, Toshiya FUJISATO⁵⁾ and Akio KISHIDA¹⁾

1) Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku Tokyo 101-0062, Japan

2) Innovation Plaza Osaka, Japan Science and Technology Agency, Osaka, Japan.

3) Department of Bioengineering, National Cardiovascular Center Research Institute

4) Department of Material and Energy Science, Okayama University

5) Department of Regenerative Medicine and Tissue Engineering,

National Cardiovascular Center Research Institute

Tel: +81-3-5280-8028, Fax: +81-3-5280-8028, E-mail: Kishida.fm@tmd.ac.jp

P5 高圧印加による PVA ハイドロゲルの作製と物性評価

(東医歯大生材研) ○木村剛, (日大院理工) 三浦義之, (日大院理工) 栗田公夫,
(岡山大環境理工) 吉澤秀和, (国立循環器セ) 藤里俊哉,
(物材機構) 小林尚俊, (東医歯大生材研) 岸田晶夫

【緒言】

高圧技術は、無機・有機科学、医療、食品分野などの幅広い分野で利用されている。特に、食品分野においては、タンパク質の熱変性とは異なる変性が圧力により誘起され、原料を反映した風味、色合であり、滅菌も可能であることから高圧食品として注目されている¹⁾。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、圧力印加によりそれら相互作用が変化し、変性が誘起されると考えられている。一般的には、高圧下では、疎水性相互作用が弱まり、水素結合性が強調されることが報告されている²⁾。そこで、我々はこの点に着目し、水酸基を有する水素結合性高分子への圧力印加による水素結合を介する新規構造体の創出について検討した。対象として、ポリビニルアルコール (PVA)、ポリエチレングリコール (PEG)、アガロース、デキストランを用いて、それらの水溶液を種々の条件下での静水圧処理を施した結果、PVA にてハイドロゲルが得られた。本研究では、PVA ハイドロゲルの作製および物性について詳細に報告する。

【実験】

PVA(重合度: 1700, 鹸化度: 99.8%)の水溶液およびジメチルスルホキシド(DMSO) / 水 (DMSO : 水 = 80 : 20) 混合溶液を様々な濃度で調製した。高圧処理装置 (Dr.CHEF ; (株)神戸製鋼所) を用いて、種々の温度 (25~40℃)・圧力 (1000~10000気圧)・時間 (0~30分) にて高圧処理を行った。また、一般的な PVA ハイドロゲルの作製方法である凍結融解法によっても PVA ハイドロゲルを作製した。得られた PVA ハイドロゲルのマクロ・ミクロ観察、透過度、膨潤度、力学強度測定にて物性解析を行った。

【結果と考察】

まず、5% PVA 溶液への圧力処理を施圧時間 10 分間にて様々な圧力強度で検討した。印加圧力の上昇に伴い白濁溶液、粘調な溶液と変化し、6000気圧以上にて脆弱なハイドロゲルとなり、10000気圧において成形性の良い白色のハイドロゲルが得られた。次に、一定の圧力強度にて異なる時間で圧力処理を施した。施圧時間の増加に伴うハイドロゲル形成が示された。さらに、用いる PVA 水溶液の濃度を変化させた場合、より高濃度の PVA 溶液の場合にハイドロゲルが得られた (図1)。これらのゲルは、加熱により溶解したことから水素結合性の物理ゲルで

Ultra high pressure technology for controlling the structure of DNA/RNA

Tsuyoshi KIMURA¹, Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Hidekazu YOSHIKAWA³, Toshiya FUJISATO⁴, Hisatoshi KOBAYASHI⁵ and Akio KISHIDA¹. (¹ Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo, 101-0062, Japan, ² Nihon University, ³ Okayama University, ⁴ National Cardiovascular Center Institute Research, ⁵ National Institute of Materials Science) Tel: 03-5280-8029, Fax: 03-5280-8028, e-mail: kimurat.fm@tmd.ac.jp

Abstract: PVA hydrogel was obtained by high hydrostatic pressurization at more than 6000 atm for 10min. The formation of the PVA hydrogels was dependent on pressuring time and strength and the higher strength and longer time of pressurization induced the gelation of PVA. Also, PVA with higher concentration tended to form the hydro gel. It was clear that the obtained hydrogels was mediated by hydrogen bonding interaction. This simple technology

あることが示唆された。そこで、水素結合阻害剤である尿素を系中に添加し、高圧処理を施した結果、尿素濃度の上昇に伴いゲル化の阻害がみられ、3Mの濃度にてハイドロゲルは形成されなかった。以上より、PVA ハイドロゲルの形成ドライビングフォースは水素結合であることが明らかとなった。従来から PVA ヒドロゲルの調製方法として凍結融解が知られている。しかしながら、凍結融解法では、高圧ゲルと同等の力学強度を得るために約10日間を要する。このことから本手法の有用性が示された。また、PVA ハイドロゲルを走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察した。凍結融解法、超高圧印加法にて調製した PVA ハイドロゲルを凍結乾燥した後に SEM 観察を行った。その結果、凍結融解ゲルでは繊維状構造がみられ、一方の高圧ゲルはメッシュ構造を有していた。これは、ハイドロゲルの形成過程が凍結融解法と超高圧法で異なることを示唆している。高圧ゲルの形成過程を検討するため、5~20%PVA を1000気圧、5分間にて高圧処理を施し、それぞれの膨潤度を測定した。濃度上昇に伴い、直線的に膨潤度は減少し、濃度上昇による架橋率の増加が示された。また、10%PVA 溶液への7000~10000気圧、5分間の施圧により得られた PVA ハイドロゲルでは、圧力強度の増加に伴う膨潤度の減少が示された。さらに、ハイドロゲルが形成されない10%PVA 溶液への5000気圧、5分以下の施圧条件では、施圧時間の減少に伴う粒子サイズの減少がDLS測定により示された。以上の結果から、圧力印加によりPVA が集合化し、圧力強度、時間、用いるPVA 濃度の上昇に伴い、集合体サイズが増加し、ハイドゲルが形成されたと考えられる。

上記に示した PVA ハイドロゲルは、白色のゲルであった。従来より、DMSO と水の混合溶媒とする PVA 溶液を冷却することにより合成される PVA ゲルは、透明性が高く、機械的強度にも優れていることが知られている。凍結融解は、 -20°C にて2時間インキュベートし、室温にて30分間放置し、これを1サイクルとして計10サイクルを繰り返した。得られたゲルは、透明性を有していた。一方、高圧印加によっても透明な PVA ハイドロゲルは得られた。発表では、種々の条件による PVA ゲル形成について検討し、また、力学強度、透過性等の物性についても詳細に検討したので報告する。

【謝辞】

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

【参考論文】

- 1) 生物と食品の高圧科学、林 力丸編、さんえい出版、1993年
- 2) E.Doï, A. Shimizu, N. Kitabatake, Food Hydrocoll. 5, 409-425, 1991

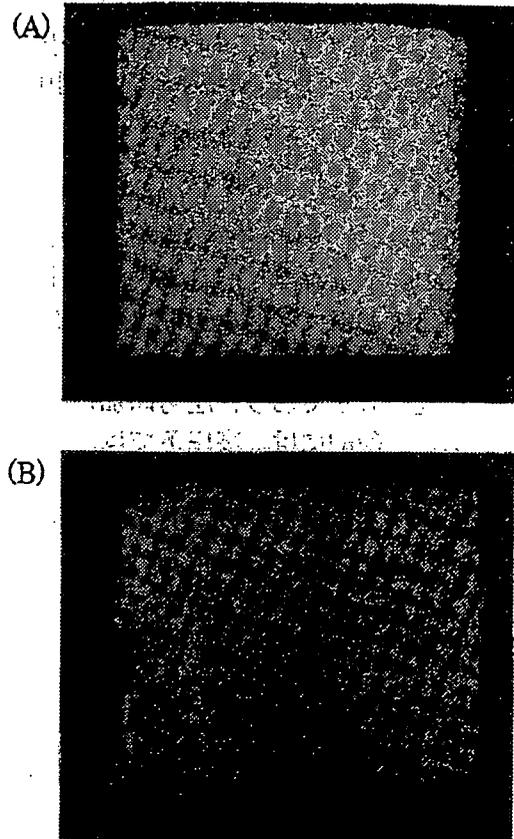


Fig1. (A)圧力処理により得られたPVAヒドロゲル。10 w/v% PVA 水溶液を調整し、10,000気圧で5分間処理した。(B)凍結融解法により得られたPVAヒドロゲル。

1-C-10

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

木村 剛¹、南 広祐¹、六雄 伸悟²、吉澤 秀和²、岡田 正弘³、古園 勉³、藤里 俊哉⁴、岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所、²岡山大学 環境理工学部、³国立循環器病センター研究所先進医工学センター生体工学部、⁴国立循環器病センター研究所先進医工学センター再生医療部

我々は、超高压により誘起される水素結合型の高分子／DNA複合体を用いた遺伝子送達について検討している。これまで、ホリビニルアルコール(PVA)とDNAの複合体の細胞内送達は達成されたが、十分な遺伝子発現は認められなかった。そこで、エンドソームの遊離促進を目指し、低pHで溶解される無機物質とハイブリッド化した無機／高分子／DNA複合体を考案し、遺伝子導入効率の向上が示された。本研究では、更なる導入効率の向上を目指し、細胞内動態について検討した。無機物質としてハイドロキシアパタイト(HAp)を用い、種々の高分子とDNAとのハイブリット化を超高压処理により行い、HAp／高分子／DNA複合体を得た。蛍光ラベル化DNAを用いた細胞内導入観察では、エンドサイトーシスを介した導入が示された。経時観察では、無機ハイブリッド化複合体の場合に早期の細胞内導入が観察され、遺伝子導入効率における導入速度の影響が示唆された。

P-386 高圧凝縮DNAの構造・機能解析と遺伝子導入への応用

木村 剛¹, 堀内 可奈², 栗田 公夫³, 南 広祐¹,
六雄 伸悟³, 吉澤 秀和³, 藤里 俊哉⁴, 岸田 晶夫¹

¹東京医科歯科大学生体材料工学研究所, ²日本大学理工学部,
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再生医療部

【緒言】 遺伝子あるいはタンパク質導入による細胞の高次機能化技術は、再生医療分野における重要課題の一つである。非ウイルス遺伝子導入の主流は、正電荷物質との複合化によりDNAを凝縮させて細胞に導入する手法であるが、正電荷に由来する細胞障害性が問題となる。本研究では、新たなDNA凝縮法として高静水圧凝縮法を考案し、DNA構造に及ぼす圧力印加の影響と機能解析について詳細に検討した。

【実験】 遺伝子として1kbラダーDNA、プラスミドDNAを用いた。高静水圧印加装置を用いて、温度10、40℃、圧力3,000、6,000、8,000、10,000気圧、時間1、5、10、20分間と異なる条件にて高静水圧処理を行った。処理液をT_m測定、CD測定、アガロースゲル電気泳動、DLS測定にて解析した。また、高圧処理によるDNAの機能解析として、ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳、核酸分解酵素を用いた分解性試験により検討した。さらに、培養細胞への遺伝子導入を試みた。

【結果と考察】 高静水圧印加後のDNAのDLS測定より、DNAの凝縮が確認できた。また、T_m測定、CD測定にて構造変化が示された。高圧凝縮DNAでは、分解酵素耐性と転写・翻訳活性の向上が示され、遺伝子送達への応用の可能性が示唆された。本研究は、厚生労働省科学研究費および文部科学省科学研究費の補助を受けて行われた。

10) 超高压技術を用いた無機/高分子コンポジット材料の調製と in vitro 評価

(東京医科歯科大学学生体材料工学研究所) ○木村 剛・南 広祐
(岡山大学環境理工学部) 六雄 伸吾・吉澤 秀和
(国立循環器病センター研究所) 岡田 正弘・古菌 勉・藤里 俊哉
(東京医科歯科大学学生体材料工学研究所) 岸田 晶夫

[緒言]

6000 気圧以上の超高压条件下では、物質間の水素結合が強調されることが知られている。そこで我々は、超高压処理による水素結合を介した分子集合体の形成について検討している。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・マイクロ粒子、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、水素結合性高分子集合体への新たな機能性の付与を目的として、ナノスケールのアパタイト粒子と水素結合性高分子とのコンポジットの調製について検討した。ナノアパタイト粒子との複合化により細胞親和性、力学特性等の向上が期待できる。また、水素結合性高分子と DNA のヘテロ集合体の形成と細胞への遺伝子送達を報告しており、ハイドロキシアパタイトが pH=5.0 付近にて溶解することから、今回、酸溶解性をコントロールしたナノアパタイト粒子との三成分系コンポジットを用いて、エンドソーム遊離促進による遺伝子発現改善について検討した。

[実験]

無機粒子としては、球状、ロッド状と形態を制御した、種々のスケール (50, 200, 400nm) を有するアパタイト粒子をマイクロエマルジョン法により調製した。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: 重合度 1700、鹸化度 99.3%、クラレ (株) より提供) を用いた。PVA 溶液 (0.001~10%) とアパタイト粒子 (0.0001~1%) と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)。また、DNA 水溶液、PVA 水溶液およびアパタイト粒子を混合し、超高压処理を施した。得られた集合体を目視および顕微鏡下で観察し DLS 測定、FT-IR 測定、力学測定などにより物性解析を行った。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 コンポジットのおよび 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]

種々の濃度の PVA 溶液を超高压処理した場合、低濃度 (1%以下) では、ナノ・マイクロ粒子が得られ、高濃度 (5%以上) でハイドロゲルが得られる。まず、低濃度 PVA 溶液とアパタイト粒子とを様々な割合で混合し、超高压処理を施した。PVA 過剰条件では、DLS 測定より 200nm~1 μm のナノ・マイクロ粒子が濃度依存的に得られることが分かった。SEM 観察では、PVA 単独の粒子に比べ、PVA とアパタイト粒子の混合系では表面の凹凸が観察され、アパタイト粒子を内包する粒子が得られることが分かった (図 1)。アパタイト粒子過剰の条件ではアパタイトの凝集体が得られ、コンポジット化は困難であった。また、

DNA との三成分系への超高压処理においてもナノ・マイクロ粒子が得られた。種々の細胞への遺伝子導入を行った結果、PVA/DNA コンポジットに比べ、PVA/アパタイト粒子/DNA コンポジットでの遺伝子発現の改善が示された。PVA/アパタイト粒子/DNA コンポジットの pH5.5 付近でのアパタイト粒子の溶解性が確認され、また、細胞内でのアパタイト粒子の溶解性を細胞内カルシウム濃度測定により検討したところ、経時的な濃度上昇が示された。これらの結果より、エンドサイトーシス経路での pH 低下によりアパタイト粒子が溶解され、それに伴うエンドソーム破壊により有意な遺伝子発現が認められたと考察している。

一方、高濃度 PVA では、アパタイト粒子を含有するハイドロゲルが得られた。SEM 観察した結果、表面および内部でのアパタイト粒子の存在が確認できた。アパタイト粒子の表面被覆率は、用いる PVA 濃度に依存し、10%PVA に比べて 7.5%PVA で高かった (図2)。また、50nm のアパタイト粒子に比べアパタイト粒子の HAp の場合に表面被覆傾向が示された。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、細胞親和性を検討した。アパタイト粒子を含有しない PVA ハイドロゲルに比べ、アパタイト粒子/PVA ハイドロゲルにおいて接着細胞数の増加が示された。また、2日間の培養では、後者においては細胞の伸展も認められ、アパタイト粒子とのコンポジット化による機能性の付与が示された。

[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。

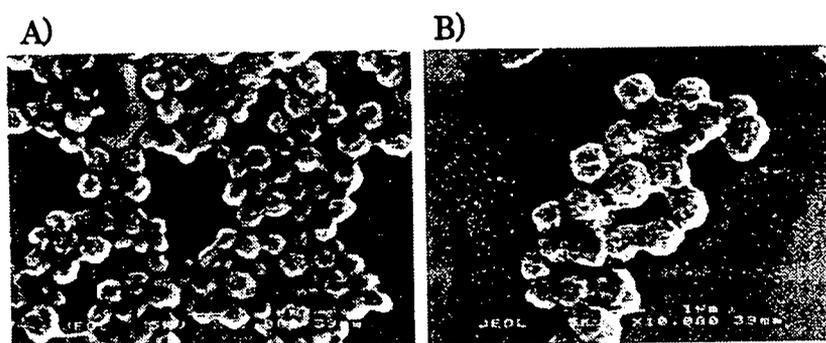


Fig1. SEM photos of (A) PVA particles, (B) Apatite/PVA composite particles.

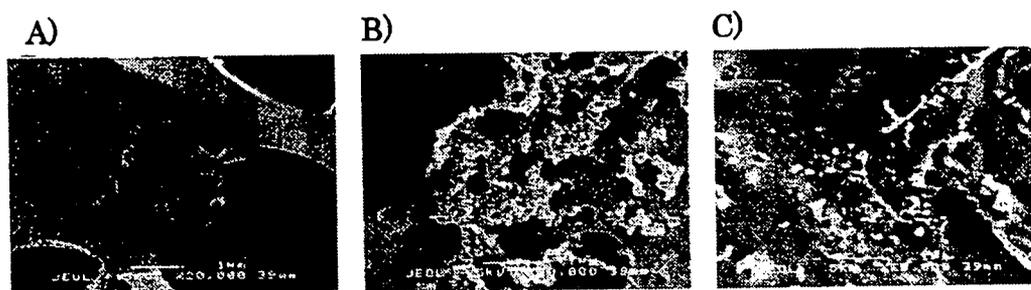


Fig2. SEM photos of (A) PVA hydro gel, (B) Apatite/PVA composite hydro gel(7.5%PVA) and (C) Apatite/PVA composite hydro gel(10%PVA).

高圧凝縮DNAの基礎的検討と遺伝子デリバリーへの応用

○木村剛¹、吉澤秀和²、古菌勉³、藤里俊哉⁴、岸田晶夫¹

¹東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、²岡山大学・環境理工学部、³国立循環器病センター研究所・生体工学部、⁴国立循環器病センター研究所・再生医療部

【緒言】

DNA、RNAなどの核酸は、遺伝子情報を担う塩基配列(一次構造)とそれらの遺伝情報の保持・発現のための二次構造が重要である。核酸の高次構造は、温度、圧力、pH、塩濃度などの外部環境に影響されることが知られている。これまで、核酸への圧力の影響として、低分子量DNAの構造変化や、RNA(リボザイム)活性の低下が知られている。本研究では、遺伝子導入における遺伝子発現を調節することを目的として、圧力印加によるDNA構造変化およびその機能について検討した。

【方法】

DNAとしては、1kb ラダーDNA とプラスミドDNA (pT7-Luc) を用いた。超高圧印加装置(Dr.chef(神戸製鋼所))を用いて、温度 40℃、圧力 3,000、5,000、8,000、10,000 気圧、印加時間 1、5、20 分間と異なる条件にて高圧処理を行った。常圧に戻した後、DNA 溶液を T_m 測定、CD 測定、DLS 測定、蛍光強度測定にて解析した。また、高圧処理によるDNAの機能解析として、ウサギ網状赤血球を用いた無細胞系転写・翻訳により検討した。

【結果・考察】

超高圧印加によるラダーDNAの構造変化は、CD測定、T_m測定では示されなかった。一方、プラスミドDNAでは、CD測定の結果から構造変化が示唆され、また、DLS測定よりプラスミドDNAのサイズ減少が示された。プラスミドDNAサイズへの圧力の影響として超高圧処理時間の影響を詳細に検討した結果、圧力の増加と圧力印加時間の延長に伴い、DNAサイズが減少することが示された。次に、DNAインターカレーターであるエチジウムブロマイド(EtBr)を用いて、プラスミドDNA構造への圧力影響について検討した。圧力増加に伴う蛍光強度の減少が示された。これは、DNAにインターカレートしていたEtBrが外れたことによる蛍光強度の減少と考えられ、高圧印加によるDNAの構造変化を示す。また、インターカレートしたプラスミドDNAにおいてもサイズの減少が示された。以上より、プラスミドDNAは高圧印加により凝縮すると考えられる。部分的あるいは全体的に凝縮され、オープンサークルからスーパーコイルへの転移、さらにはよりきつく巻かれたスーパーコイルになると考えられる。これを判断するために、原子間力顕微鏡(AFM)による視覚的な観察を検討している。また、凝縮したDNAの機能について調べるため無細胞系転写・翻訳を行った結果、圧力による転写・翻訳活性の向上が示された。一方、処理時間による活性への影響は示されなかった。活性の促進は、高圧処理により転写因子に認識されやすい構造に変化したことによると考えられる。本研究は、厚生労働科学研究費の補助を受けて行われた。

高圧印加による PEG/多糖水性二相形成の促進

東医歯大生材研 ○木村剛 日大理工 三浦義之・栗田公夫
 岡山大環境理工 六雄伸悟・吉澤秀和 国循セ研 藤里俊哉
 東医歯大生材研 岸田晶夫

<緒言>

2種類の水溶性高分子混合溶液における相分離形成（水性二相）が知られている。水性二相形成は、用いる高分子の分子量、濃度に依存し、また、塩濃度、温度、pHなどの外部環境の影響を強く受ける。本研究では、温度と同様の示強パラメータである圧力に着目し、圧力印加による水性二相形成に関して検討した。ここでは、代表的な水性二相系である PEG-Dextran 混合溶液にて検討した。

<実験>

ポリエチレングリコール (PEG ; Mw : 6000, 8000)、デキストラン (Dex ; Mw : 32,000~45,000、60,000~90,000、100,000~200,000、500,000) を用いた。各 10%(w/v)水溶液を調製し、1:1 の割合で混合した後、25°C で 10,000 気圧、10 分間超高压印加処理した。処理液を、目視による観察、動的光散乱(DLS)測定、示差走査熱量(DSC)測定、NMR 測定、旋光度測定にて構造体の物性解析を行った。

<結果・考察>

PEG 水溶液、Dex 水溶液への超高压印加処理では、目視による変化は確認されず、透明溶液であった。DLS 測定においてもサイズの変化は示されなかった。一方、PEG/Dex 混合溶液においては、PEG の分子量に依らず、低分子量の Dex32,000~45,000 では透明溶液であり、Dex60,000~90,000 および 100,000~200,000 では青白色を呈した。エマルジョンが形成されたことによる散乱と考えられる。また、Dex500,000 は PEG との混合により白濁溶液となり、その後の放置により二相分離した。PEG/Dex 混合液への超高压印加処理では、Dex60,000~90,000 および 100,000~200,000 にて二相分離が形成され、下相にて青白色を呈した。Dex500,000 では、白濁溶液状態および二相形成状態への超高压印加処理のいずれの場合も二相分離を形成し、上下相とも透明溶液であった。従って、この現象は超高压による PEG と DEX から成る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。生じた二相分離の下相部の溶液の DLS 測定 (25°C) では、いずれの場合も粒子径の増加が示された。また、加熱処理による粒子径の減少が DLS 測定にて示され、PEG/DEX のエマルジョンへの超高压印加処理により、水素結合を介した新規 PEG/Dex 複合体が形成されたと考えられる。これらを詳細に検討するため、上下相溶液の NMR 測定を行った。上相では PEG に帰属するピークが、下相では PEG と Dex に帰属するピークが検出され、上相には PEG のみが、下相には PEG と Dex が存在することを示された。また、水素結合阻害剤である尿素添加系においては、超高压処理に誘起される二相分離が形成されなかったことから、水素結合を介した PEG/Dex 複合体の形成が強く示唆された。以上の結果より、高圧印加による PEG/多糖水性二相形成の促進が示された。本研究は、厚生労働科学研究費および文部科学研究費の補助を受けて行われた。

Enhancement of aqueous two phase separation of PEG-polycarbonate by high pressurization

Tsuyoshi KIMURA¹, Yoshiyuki MIURA², Kimio KURITA², Shingo MUTSUO³, Hidekazu YOSHIZAWA³, Toshiya FUJISAO⁴, Akio KISHIDA¹ (¹Tokyo Medical and Dental Univ., 2-3-10 Kanda-surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, ²Nihon Univ., ³Okayama Univ., ⁴National Cardiovascular Center Reserch Institute)

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

Key Word: high pressurization / aqueous phase separation / PEG / Dextran / DLS

Abstract: In this study, the aqueous phase system of PEG and dextran was studied under high pressure condition. The mixed solutions of PEG and dextran having various molecular weights were treated with ultra high pressurization (10,000 atm, 25 degree, 10min). Various analyses, such as DLS, NMR and DSC measurements, were carried out. We found that the assembling of poly(ethyleneglycol) (PEG) and dextran was induced by ultra high pressurization. The assembly of PEG and dextran induced the formation of aqueous two-phase system. There was the assembly of PEG and dextran and PEG molecules in the lower and upper phase, respectively.