

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業
(医療機器開発 (ナノテクノロジー等) 総合推進研究事業)

腹腔内視鏡に搭載可能な組織吸引MEMSデバイスを用いた
低侵襲かつ安全な新規核酸送達法の難治性腎臓・心臓疾患治療への応用

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 清水 一憲

平成25 (2013) 年 5月

目次

I. 総括研究報告

腹腔内視鏡に搭載可能な組織吸引MEMSデバイスを用いた 低侵襲かつ安全な新規核酸送達法の難治性腎臓・心臓疾患治療への応用 清水一憲	1
---	---

II. 分担研究報告

1. 吸引圧法の腎臓疾患治療への応用に関する研究 川上茂	8
2. 吸引圧法の心臓疾患治療への応用に関する研究 木下秀之	13

III. 研究成果の刊行に関する一覧表	17
---------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷	18
-----------------	----

厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業
 (医療機器開発 (ナノテクノロジー等) 総合推進研究事業)
 総括研究報告書

腹腔内視鏡に搭載可能な組織吸引MEMSデバイスを用いた
 低侵襲かつ安全な新規核酸送達法の難治性腎臓・心臓疾患治療への応用

研究代表者 清水 一憲 京都大学大学院薬学研究科 特定助教

本研究の目的は、吸引圧を利用した naked 核酸導入法 (吸引圧法) を腎・心疾患治療へと応用することである。本年度は、吸引圧法の最適化を行うことを目標にした。まず吸引圧制御システムを構築した。システムを用いることで最小到達圧力、圧力供給時間、圧力維持時間、圧力解放時間を制御して、任意の圧力波形を発生させることが出来た。吸引圧波形の違いによる導入核酸発現量への影響を特に腎臓で詳細に調べた。その結果、腎臓においては -30 kPa より小さい圧力で吸引する、また心臓においては -75 kPa より小さい圧力で吸引するという最適値を見出した。来年度はこれらの最適条件を用いた疾患治療法への応用を研究分担者と共に進める。

川上茂・京都大学大学院薬学研究科

講師

木下秀之・京都大学大学院医学研究科

特定助教

A. 研究目的

近年、日本は急速な高齢化社会を迎えており、医療技術に対するニーズと期待は今後もますます大きくなることが予想される。国民からも画期的な医薬品・医療機器の開発が求められている。遺伝子・核酸医薬品は生体での多様な薬理効果が期待されている一方で、細胞内への導入が極めて困難とされることが多いため医薬品として実用化が進んでいない。

遺伝子・核酸医薬治療の実現には、高効率な *in vivo* 核酸導入法が必要である。現在、世界中で ウイルスベクターやリポソーム・高分子などの非ウイルスベクターなどの DDS キャリアを用いた *in vivo* 核酸導入法の開発が進んでいる。しかし広範囲な研究施設での使用や臨床応用を進めるにあたり、DDS キャリア

自身の安全性、免疫原性、調製の必要性などが障壁となることが多い。このため DDS キャリアを用いない *in vivo* 核酸導入法が必要である。これまでに、注射による直接注入法やエレクトロポレーション法などの DDS キャリアを用いない *in vivo* 核酸導入が開発されているが、前者は針を生体組織に直接刺すため組織障害、後者は高電圧パルスにより生体組織表面が損傷を受けることが多い。

我々は非常にシンプルで安全な DDS キャリアを用いない *in vivo* ネイキッド核酸導入法 (吸引圧法) の開発に成功した。吸引圧法とは、腹腔内視鏡に搭載可能な組織吸引 MEMS デバイスを用いて低侵襲かつ安全に吸引部位特異的な核酸導入を可能とすることができる技術である。ネイキッド核酸とシンプルな医療機器を用いた簡便な方法であるため、医薬品添加物の毒性等の問題を考慮することなく、速やかな臨床応用への展開が期待される。これまでに吸引圧法により健常マウス腎臓、心臓、肝臓、脾臓へのプラスミド DNA 送達による吸引部位特異的な遺伝子導入に成功してきた。

本研究は研究期間を2年間とし、“核酸医薬品”と“MEMSデバイス”を利用した“革新的なDDS手法”を腎臓と心臓の難治性疾患治療へ応用することを目標とする。吸引圧法は低侵襲性や安全性に優れていることから、スムーズな臨床展開が可能であると予想され保健医療に大きく貢献すると考えられる。本年度（1年目）は、疾患治療のための吸引圧法の最適化を進める。まず吸引圧を制御するためのシステムを構築する。システムを用いることで広範囲な施設で再現性良く吸引圧法を実施できるようになることが期待される。次に、構築したシステムを用いて腎臓や心臓への吸引圧法の最適化を行う。すなわち腎臓や心臓を吸引するための最適な圧力の大きさや吸引圧の波形を調べる。得られた結果を分担者と共有し、吸引圧法による疾患治療へと展開する。

B. 研究方法

B-1. 吸引圧制御システムの構築

図1aに示す構成の吸引圧制御システムを構築した。LabVIEW (National Instruments) で電子式真空レギュレーター ITV (SMC Corp.) を制御し、それにより真空ポンプで発生させた陰圧を制御した。吸引デバイスに印加される陰圧の大きさは圧力センサ（株式会社センシズ）を用いて実測した。圧力センサによる陰圧の測定値はLabVIEWで収集した。

B-2. 吸引デバイスの製作

吸引デバイスはポリジメチルシロキサン (PDMS) 製である。作製方法は以下のとおりである。まず三次元光造形装置を用いて鋳型を作製した。その鋳型にパリレンを厚み10 μm でコーティングした。PDMSの主剤に硬化剤を10:1の割合で加え、鋳型に流し込んだ。減圧下で脱泡後、75度で4時間加熱し硬化させた。硬化したPDMSを鋳型から剥離し、吸引圧印加用の穴をあけた。

B-3. 吸引圧法による核酸導入

麻酔下のマウスを開腹し、目的の臓器を必要最低限だけ露出させた。尾静脈から100 μg のプラスミドDNAを含む200 μl の生理食塩水を投与した。目的の臓器表面に生体組織吸引デバイスを軽く接触させた後に、吸引圧制御システムを用いて、デバイスに吸引圧を印加し、目的臓器を吸引変形させた。プラスミドDNAとしてCMVプロモーター制御下にルシフェラーゼ遺伝子をもつプラスミドDNAを用いた。臓器を吸引した6時間後にマウスを安楽死させて臓器を取り出し、臓器中のルシフェラーゼ活性を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験を行うのにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会の承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守する。DNAを取り扱う実験を行うにあたり、同様に承認を受け、環境問題および実験者の安全に十分に配慮して実験を行った。

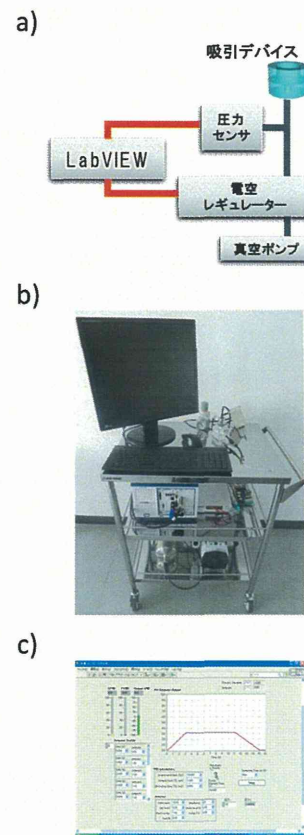


図1 吸引圧制御システム

C. 研究結果

C-1. 吸引圧制御システムの構築

構築した吸引圧制御システムの概観を図1bに示す。図1cにはシステムを駆動させるために開発したLabVIEWプログラムの操作画面を示す。初期値を開始時間0秒と圧力0 kPaとして、そこからの経過時間(秒)とその時の圧力の大きさ(kPa)を設定することで、電空レギュレーターから圧力を制御することが出来る。図2はLabVIEWから電空レギュレーターへの出力信号(白)と圧力センサからLabVIEWへの入力信号(黒)を表示したグラフである。出力信号として1秒間で7.5 Vにまで達し、7.5 Vで3秒間維持し、1秒間で0 Vに戻るといった信号を出力したところ、わずかな遅れはあるものの出力信号とほぼ同じ入力信号を得た。

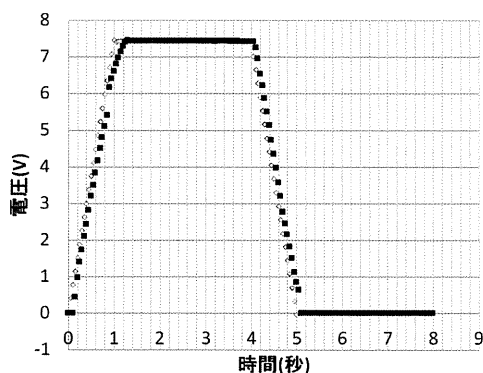


図2 出力信号と入力信号

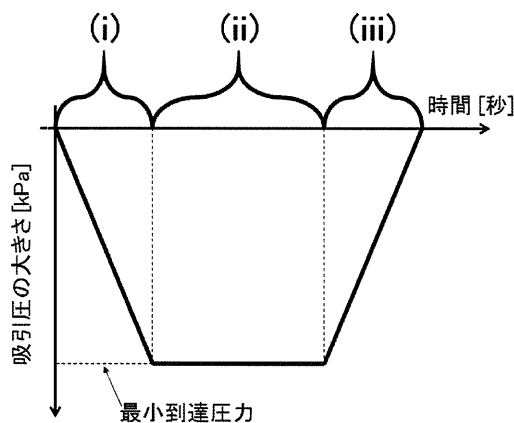


図3 圧力波形の定義

C-2. 吸引圧制御システムの動作確認

次に吸引圧制御システムの動作確認を行った。LabVIEWプログラムで任意の圧力波形を設定し、システムがその圧力波形の吸引圧を発生させられるかどうか調べた。圧力波形は4つのパラメータで設定した(図3)。すなわち最小到達圧力、[i] 最小到達圧力に達するまでの時間である圧力供給時間、[ii] 維持する時間である圧力保持時間、[iii] 元に戻るための時間である圧力解放時間の4つである。

まず初めに最小到達圧力を変えて実験を行った。最小到達圧力を-1、-3、-5、-15、-30 kPaに設定し、圧力供給時間を1秒、圧力保持時間を2秒、圧力解放時間を1秒という条件でシステムを駆動させてその時の吸引圧の変化を測定した。結果を図4に示す。開発したシステムを用いて、それぞれ設定した通りの大きさの最小到達圧力を発生させることが出来た。次に圧力供給時間を変えて実験を行った。0.5、1、3秒後に最小到達圧力(-5 kPa)に到達、3秒間維持、1秒後に元に戻るといった条件でシステムを駆動させてその時の吸引圧の変化を測定した。図5に示すように、設定した圧力供給速度に従って最小到達圧力に達することが確認された。

図4に示すように、最小到達圧力を-1 kPaに設定した場合は、0秒から1秒の間に圧力が徐々に減少せず、1秒後に瞬時に-1 kPaに達した。また2秒間維持した後は、瞬時に0 kPaに戻った。この現象は最小到達圧力を-3、-5、-15、-30 kPaに設定した場合においても0から-1 kPaで観察された。すなわち本システムでは-1 kPa以下の圧力波形を制御することが出来なかった。これは使用した電空レギュレーターの設定圧力範囲が-1 kPaから-100 kPaであるためと考えられる。しかし最小到達圧力が小さくなるほど、0から-1 kPaでの圧力波形変化の影響が相対的に小さくなると考えられたため、システムの改良を行わず、これ以降の実験を進めた。

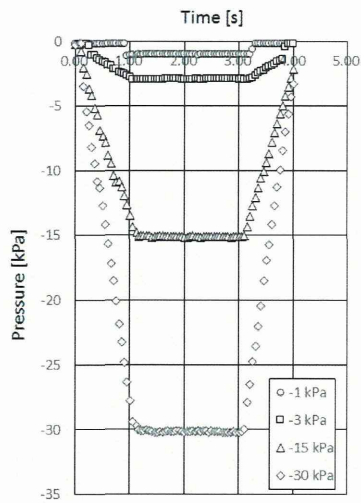


図4 最小到達圧力の制御

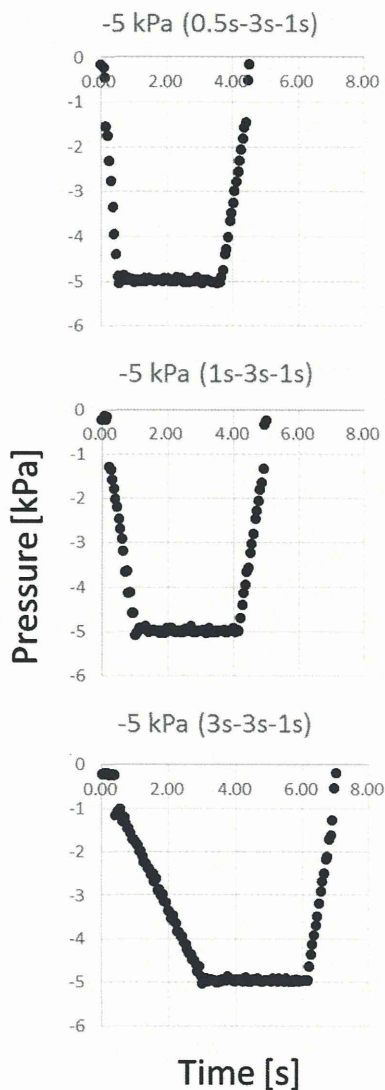


図5 圧力供給時間の制御

C-3. 吸引圧制御システムによる吸引圧法

開発した吸引圧制御システムを用いて吸引圧法を行い、システムの有効性を検証した。肝臓を対象に吸引圧法の実験を行った。使用した吸引デバイスの大きさは内径3 mm、外径5 mm、高さ3 mmである（図6）。

まず最小到達圧力を-1、-3、-5、-15、-30 kPaと変えて吸引圧法を行い、導入遺伝子発現量への影響を調べた。使用した波形は、圧力供給時間1秒、圧力維持時間3秒、圧力解放時間1秒とした。その結果、-5 kPa以下の吸引圧で、ルシフェラーゼ活性がほぼ同等になった（図7）。この結果から肝臓への吸引圧法には最小到達圧力を-5 kPaよりも小さい圧力に設定する必要があることが示唆された。

次に圧力の波形を変えて吸引圧法を行い、導入遺伝子発現量への影響を調べた（図8）。最小到達圧力を-5 kPaに設定し圧力供給時間を0.5、1、3秒と変化させた時の影響を調べたところ、圧力供給時間を0.5秒と設定した時に最も発現量が大きくなることがわかった。また圧力維持時間を0、1、2、3秒と変えて実験を行ったところ、圧力維持時間が長いほど圧力供給時間を変化させたことによる発現量の変化が緩和され、全体的に高い発現量が得られる可能性が示された。

このように吸引圧制御システムを用いることで、必要な吸引圧と吸引圧波形を見出すことが出来た。このことから構築したシステムの有効性が示された。

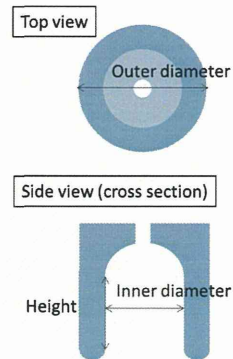


図6 吸引デバイスの形状

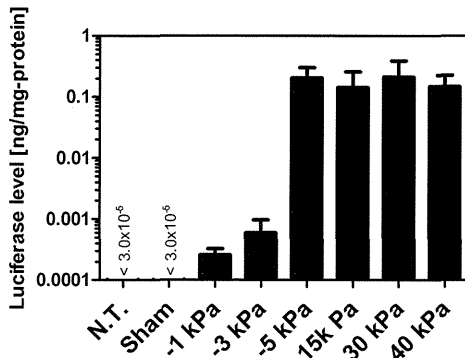


図7 最小到達圧力の発現量への影響 (肝臓)

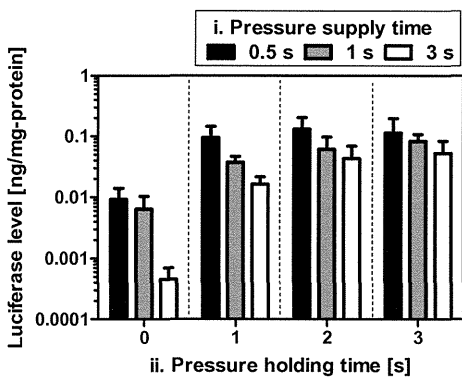


図8 圧力供給時間と圧力維持時間の発現量への影響 (肝臓)

C-4. 腎臓への吸引圧法の最適化

次に開発したシステムを用いて、腎臓への吸引圧法の吸引圧条件の最適化を行った。使用した吸引デバイスの大きさは内径3 mm、外径5 mm、高さ3 mmである。

まず最小到達圧力を-5、-15、-30、-45、-60 kPaと変えて吸引圧法を行った。使用した波形は、圧力供給時間1秒、圧力保持時間3秒、圧力時間1秒とした。吸引圧法を実施してから6時間後に、吸引した腎臓におけるルシフェラーゼの発現量を測定したところ、-30 kPa以下の吸引圧でルシフェラーゼ活性がほぼ一定になることがわかった(図9)。この結果から腎臓への吸引圧法には最小到達圧力を-30 kPaよりも小さい圧力に設定する必要があることが示唆された。

次に圧力の波形を変えて吸引圧法を行

い、ルシフェラーゼ活性の変化を調べた(図10)。最小到達圧力を-45 kPaに設定し圧力供給時間を0.5、1、5秒(図10a)、圧力維持時間を0、1、3、5秒(図10b)、圧力解放時間を0.5、1、5秒(図10c)と変化させた。その結果、吸引圧の波形はルシフェラーゼ発現量に大きな影響を与えないことが明らかになった。

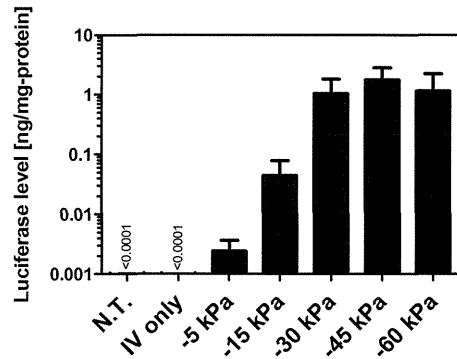


図9 最小到達圧力の発現量への影響 (腎臓)

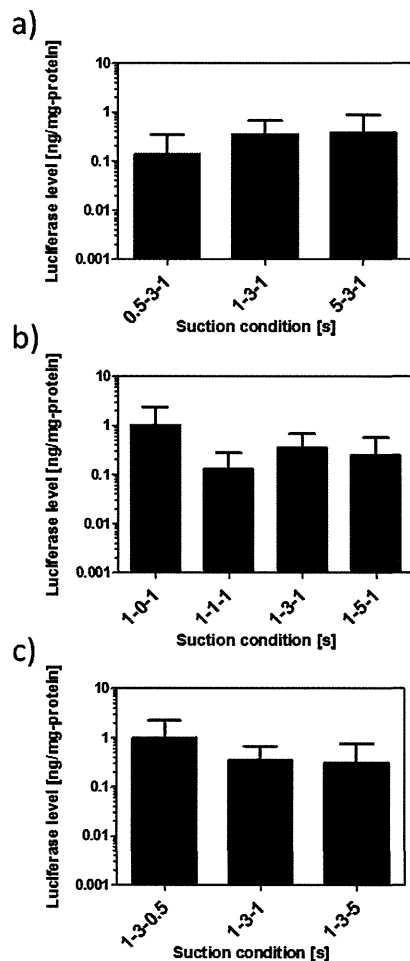


図10 圧力波形の発現量への影響 (腎臓)

C-5. 心臓への吸引圧法の最適化

これまでの吸引圧法の研究成果から、吸引圧法では臓器や組織を変形させることが重要であることが示唆されている。そこで組織の変形に注目し、マウス心臓への吸引圧法の最適化を進めた。マウス心臓の吸引圧法では吸引デバイスを第4肋骨と第5肋骨の間から挿入している。このためデバイスの外径が大きすぎるとは心臓に吸引圧法を適用できない。そこで外径を3 mm、内径を1.5 mm (A) と2 mm (B) のデバイスをそれぞれ製作し、どちらのデバイスが効率よくマウス心臓を吸引変形することが出来るか調べた (表1)。最少到達圧力を-30から-90 kPaまで変化させたところ、Bのデバイスでマウス心臓を効率よく変形させられることがわかった。また最小到達圧力が-75 kPaで十分に心臓を変形させることが出来た。

表 1 用いた吸引デバイスのサイズ

	Inner Diameter	Outer Diameter	Height
A	1.5 mm	3 mm	3 mm
B	2 mm	3 mm	3 mm

D. 考察

本研究ではまず吸引圧法の最適化を行うために吸引圧制御システムを開発した。このシステムでは、吸引圧の大きさや吸引圧の波形を自在に設定、制御することが可能であった。システムはフットスイッチを使って作動するため、作業者は両手を自由に使うことが可能であった。これまでの吸引圧法では、手動で吸引圧を発生させていたため、最小到達圧力の正確な制御や吸引圧波形の制御が出来なかった。これに対して本研究では、吸引圧制御システムを構築することで、最小到達圧力や波形の制御が可能になり、これにより吸引圧法の最適条件の検討が初めて可能になった。このようなシステムを用いることで、将来的には再現性が高い高精度で安全な吸引圧法を、広範な研究施設や医療機関で実施することが可能になると考えられる。本研究では、開発したシステムを用い

て肝臓、腎臓、心臓への吸引圧法の最適化を進めた。肝臓では-5 kPa、腎臓では-30 kPa、心臓では-75 kPaで吸引するのが良いということがわかった。また肝臓と腎臓では吸引圧の波形の違いへの感受性が異なることが明らかになった (図8と10)。この違いの原因は明らかではないが、臓器の形や硬さといったマクロな違いや組織内部構造といったミクロな違いがその要因ではないかと考えている。今後、この要因が明らかになることで吸引圧法のメカニズム解明が進み、吸引圧法の臨床応用への展開が進むことが期待される。

E. 結論

本研究では吸引圧法による腎臓と心臓の疾患治療法の開発を目指して研究を進めた。本年度は腎臓、心臓の吸引圧法の最適化を進めた。腎臓においては-30 kPaより小さい圧力で吸引する、また心臓においては-75 kPaより小さい圧力で吸引するという最適値を見出した。来年度はこれらの最適条件を用いた疾患治療法への応用を研究分担者と共に進める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nakao, K., Hashida, M., Konishi, S. *In vivo* site-specific transfection of naked plasmid DNA and siRNAs in mice by using a tissue suction device. PLoS ONE, 7(7): e41319 (2012)

学会発表

Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Katano, S., Guangyuan, Z., Maekawa, D., Hashida, M., Konishi, S. Development of *in vivo* Gene Delivery Methods in Mice Using Tissue Suction Devices for Abdominal Endoscopic Gene Therapy. 23th 2012 IEEE International Symposium on

Micro-Nano Mehatronics and Human Science (MHS2012), Nagoya, Japan, 5-7 Nov (2012), 5 Nov (2012), Oral, pp5-8

林昂司、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：組織吸引デバイスを用いた低犯襲・部位特異的なnaked核酸導入法の開発、日本薬剤学会 第27年会、神戸国際会議場、日本、2012年5月24日（木）

清水一憲、川上茂、林昂司、橋田充、小西聡：生体組織吸引デバイスを用いた遺伝子・核酸デリバリー、第28回日本DDS学会学術集会、札幌コンベンションセンター、日本、2012年7月5日（木）

川上茂、林昂司、清水一憲、小西聡、橋田充：組織吸引デバイスを用いた標的部位特異的なpDNA及びsiRNA導入法の開発と評価、第2回レギュラトリーサイエンス学会学術大会、学術総合センター（東京）、日本、2012年9月3日（月）

林昂司、川上茂、谷口陽太、清水一憲、小西聡、橋田充：圧力刺激を利用したnaked siRNA導入法の開発と評価、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2012、仙台市民会館、日本、2012年9月24日（月）

谷口陽太、林昂司、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：圧力制御した組織吸引によるマウス腎臓におけるnaked核酸導入法の開発、第62回日本薬学会近畿支部総会・大会、武庫川女子大学、日本、2012年10月20日（金）

依頼講演など

清水一憲、川上茂、橋田充、小西聡：生体組織吸引デバイスを利用した新規in vivoネイキッド核酸導入、BIOtech2012 アカデミックフォーラム、東京ビッグサイト、日本、2012年4月25日（水）

清水一憲、川上茂、林昂司、橋田充、小西聡：生体組織吸引変形デバイスを用いた遺伝子・核酸デリバリー、遺伝子・デリバリー研究会 夏季セミナー、かんぽの宿 北九州、日本、2012年7

月30日（月）

Kazunori Shimizu : MEMS Devices for Delivery of Nucleic Acid-Based Drugs、2012 IEEE Nanotechnology Material and Devices Conference (IEEE-NMDC 2012)、Hyatt Regency Waikiki Beach Resort and Spa, Waikiki Beach, Hawaii, USA、2012/10/18（木）

清水一憲 : MEMSを用いたDrug deliveryとDrug discovery、創薬科学セミナー、名古屋大学、日本、2012/11/6（火）

清水一憲 : 臓器への物理刺激を利用した遺伝子導入法、第25回日本トレーニング化学会大会、立命館大学、日本、2012/12/2（日）、口頭

清水一憲 : 押圧/吸引圧を利用したin vivo核酸導入法へのMEMS応用、第4回ナノバイオ創薬研究シンポジウム、京都大学薬学部 記念講堂、京都、日本、2013年3月9日（土）、口頭

著書
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
（予定を含む。）

特許取得

METHOD FOR OPERATING A DEVICE FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED, AND METHOD FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED

Inventor : Kazunori Shimizu, Satoshi Konishi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida

PCT/JP2011/062102、WO

2012/056756、米国出願番号：13/881, 304

実用新案登録
なし

その他
なし

厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業
 (医療機器開発 (ナノテクノロジー等) 総合推進研究事業)
 分担研究報告書

吸引圧法の腎臓疾患治療への応用に関する研究

研究分担者 川上 茂 京都大学大学院薬学研究科 講師

本研究では吸引圧法を難治性腎疾患モデル動物の治療に応用することを目標としている。本年度は健常マウス腎臓への吸引圧法の最適化の一部を行い、吸引回数は一回で十分であることを見出した。また吸引圧法の腎機能への影響を調べ、明らかな障害性はないことが示唆される結果を得た。病態モデルマウスを作製し、その腎臓に対して核酸導入の検討を行った。

A. 研究目的

糖尿病性腎症や急性腎不全など腎臓には遺伝子治療が期待される疾患が多くあるが、静脈投与で選択的に遺伝子・核酸医薬品を導入する方法がない。我々は、静脈投与により部位特異的にネイキッド核酸を導入することが出来るin vivo核酸導入法である吸引圧法を開発した。これまでの研究により、吸引圧法がマウス腎臓に対して適用可能であることを明らかにしてきた。

本研究では2年間の研究期間で、吸引圧法を難治性腎疾患の治療に応用することを目標としている。本年度は健常マウス腎臓への吸引圧法の最適化の一部を行う。また吸引圧法の腎機能への影響を明らかにする。さらに病態モデルマウスを作製し、その腎臓に対して核酸導入を行う。

B. 研究方法

B-1. 腎臓への吸引圧法

腎臓への吸引圧法は、本年度見出した最適条件で行った。詳細は研究総括報告書に記載されている。

B-2. HE染色、マッソントリクローム染色

麻酔下において、脱血により安楽死

させたのち、腎臓を摘出しパラホルムアルデヒドにて組織を固定し、PBSで洗浄後、エタノールにより脱水した。エタノールをキシレンに置換したのち、キシレンをパラフィンに置換してパラフィン中に包埋し、マイクロームにより5 μ mのパラフィン切片を作成した。HE染色においては、脱パラフィン後、ヘマトキシリン液、エオシン液により染色した。マッソントリクローム染色においては、脱パラフィン後、第1媒染液(10%トリクロール酢酸、10%重クロム酸カリウムの等量混合物)で媒染し、2倍カラッチヘマトキシリン液で染色した。さらに、第2媒染液(2.5%リンタングステン液、2.5%リンモリブデン液の等量混合物)で媒染後、0.75%オレンジG液により染色し、洗浄後、ポンソー・SX、酸フクシン、アゾフロキシン混合物で染色した。洗浄後、アニリン青で染色した。いずれの染色法においても、染色後洗浄し、アルコールで脱水、キシレンで置換して封入した。

B-3. 血中尿素窒素測定

吸引圧法を適用後、1日後、3日後の時点においてはマウス尾静脈より採血し、5日後の時点においては下大静脈より採血したのち、血液を室温で30分インキュベートし、3000 rpm、15分、室温で遠心してその上清より血清を得た。

-20℃で1日以上保管したのち、尿素窒素B-テストワコー(和光純薬工業株式会社)により、血清中の尿素窒素を測定した。

B-4. 腎疾患モデルマウスの作製

本研究では慢性腎不全モデルマウスとして、片側尿管結紮(UUO)モデルマウスを作成した。その手順は以下のようである。まず、麻酔下において正中線を切開して開腹し、左腎臓および輸尿管を露出させた。次に、輸尿管を2か所で結紮し、結紮した2か所間の部分を切断した。最後に、腹部を縫合し、閉復した。

B-5. 腎疾患モデルマウスへの押圧法

UUOモデルマウス作製後、プラスミド溶液を尾静脈より投与し、圧力コントロールデバイス (Mukai. et al. *Human gene therapy* 2009) により、左腎臓を 0.5 N/m^2 にて押圧した。押圧法を適用後、縫合し、閉復した。

(倫理面への配慮)

動物実験を行うのにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会の承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守する。DNAを取り扱う実験を行うにあたり、同様に承認を受け、環境問題および実験者の安全に十分に配慮して実験を行った。

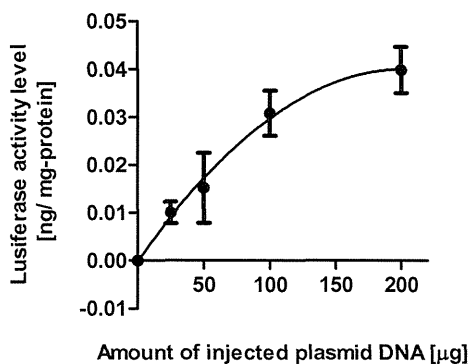


図1 プラスミド DNA 濃度と導入核酸の発現量

C. 研究結果

C-1. プラスミド濃度の影響

まず初めにプラスミドDNA量の影響を調べた。プラスミドDNA濃度が25、50、100、200 μgの条件で吸引圧法を行った際のルシフェラーゼ発現量を調べたところ、100 μgまでは直線的に濃度依存的に発現量が高くなり、200 μgではその上昇が緩やかになる傾向が観察された(図1)。これ以降の実験では100 μgの条件を用いた。

C-2. 吸引回数の影響

次に吸引回数が核酸発現量に影響するかどうかを調べた。本実験では静脈内にプラスミドDNA溶液を投与後、腎臓の同じ場所を、回数を変えて吸引した。図2に示すように、吸引回数を1、10、100回と変化させたが、吸引回数依存的な発現量の変化は観察されなかった。また吸引回数が1回の条件で、最も高いルシフェラーゼ発現量が得られたことから、腎臓への吸引圧法は1回の吸引で十分であることが明らかになった。

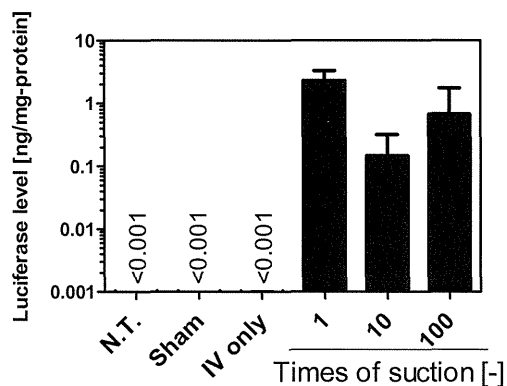


図2 吸引回数と発現量の関係

C-3. 腎機能への影響

腎臓への吸引圧法の腎機能への影響を調べた。先に見出した腎臓吸引最適条件(-45 kPaで1回)で腎臓を吸引し、その一日後、三日後、五日後に血中尿素窒素濃度(BUN)を調べた。ポジティブコントロールとして用いた急性腎

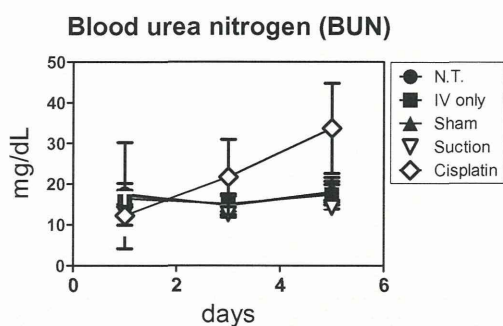


図3 吸引圧法の腎機能への影響（血中尿素窒素濃度測定）

不全モデルマウスではBUNの上昇が確認されたが、吸引圧法を行ったマウスではBUNの上昇は観察されなかった（図3）。また吸引7日目において、腎臓の組織切片を作製し、HE染色を行った（図4）。吸引ありの組織切片と吸引なしの組織切片を比較したが、明らかな違いは確認されなかった。これらの結果から、腎臓吸引最適条件での腎臓吸引圧法は、腎機能に顕著な障害性を与えないことが示唆された。

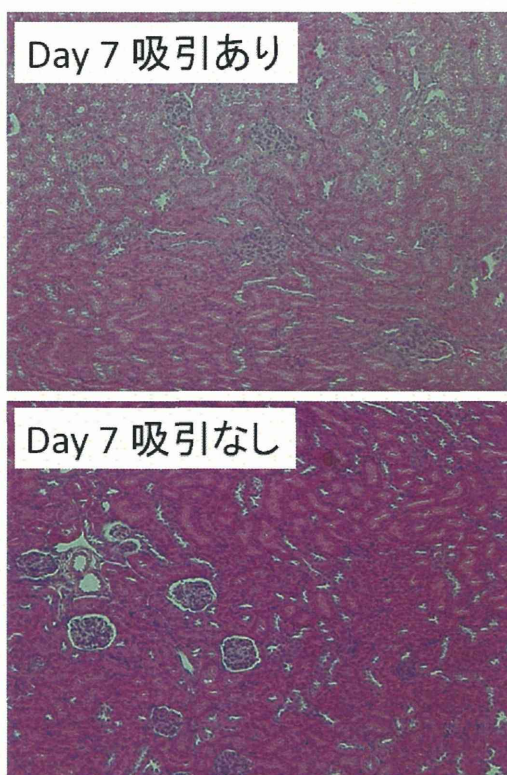


図4 吸引したマウス腎臓のHE染色

C-4. UUOマウスの作製

本研究では、吸引圧法による腎臓の難治性疾患モデルマウスの治療を目指している。そこでまず腎疾患モデルマウスとしてUUOモデルマウスの作製を行った。作製方法の詳細は、B-4に記した。図5にUUOモデルマウス作製7日後の腎臓組織切片をマッソントリクローム染色した結果を示す。間質の線維化や糸球体や尿細管の一部脱落が確認されたことから、病態モデルマウスの作製に成功したと考えられる。

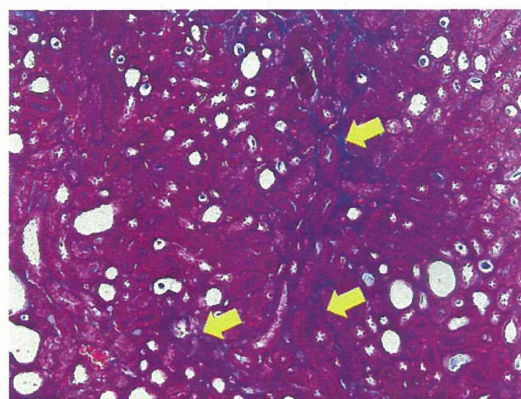


図5 UUOモデルマウスの腎臓切片。矢印部分に線維化が認められた

C-5. UUOマウスへの核酸導入

次にUUOマウスの病態腎臓に対して核酸導入が可能かどうかを調べた。本実験では、吸引圧法の基となる技術である押圧法を用いた。使用した核酸は肝細胞増殖因子（HGF）を発現するプラスミドDNAである。プラスミドDNA量を100、300、500 µgと変化させて押圧法を行い、3日後のHGFの発現量を測定した。その結果を図6に示す。健常マウスとUUOマウスにおける発現量を比較したが、両者に明らかな発現量の違いは観察されなかった。また両者において500 µgを投与した条件で最も高い発現量が得られた。

D. 考察

腎臓吸引圧法の最適化を目的に、核酸発現量に対する吸引回数の影響を調べ

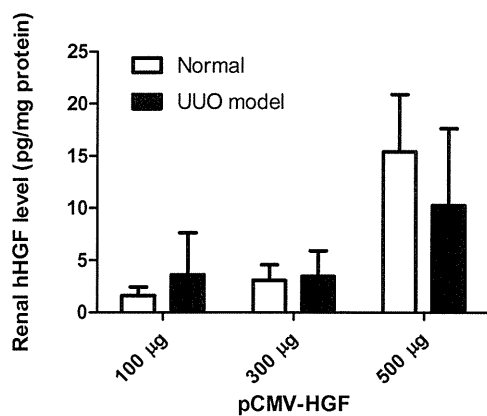


図 6 UUO モデルマウスに対する核酸導入

た(図2)。これまでの研究では一つの臓器内の異なる部位を何か所も吸引し、吸引回数が増えるほど、ひとつの臓器あたりの発現量が増えることが明らかになっていった。それに対して今回の実験では、ひとつの臓器内の同じ場所を何度も吸引したことによる影響を調べ、吸引回数は一回で十分であることが明らかになった(図2)。肝臓に対しても同様の実験を行い、同じ部位の吸引は一回で十分であるという、腎臓に対する結果と同様の結果を得た。これらの結果は、吸引圧法により核酸導入されやすい細胞とされにくい細胞が存在することを示唆する結果であると考えている。すなわち、それぞれの細胞が吸引圧法により核酸導入されるための何らかの閾値を持ち、一回の吸引でその閾値を超えた細胞には核酸が導入される。逆に、閾値を超えなかった細胞には、同じ条件で何度も吸引しても、閾値を超えて核酸が導入されることはないということである。現在のところその閾値を決めているものが何であるのかは不明である。細胞の種類、細胞の状態、細胞の臓器内での絶対位置、細胞の吸引デバイスとの相対位置など様々な原因が考えられる。今後この点をさらに調べることで吸引圧法のメカニズム解明につながり、治療応用に対して重要な知見を与えられると考えられる。

吸引圧法の腎機能への影響を調べ、明らかな障害がないということが示唆された。しかしながら本実験では吸引圧法を行ってから比較的短期間の一週

間以内の障害性評価を行っていることから、今後、治療応用を目指すためにはさらに長期的な障害性の有無を評価する必要があると考えている。

腎疾患モデルマウスに対して押圧法を行い、病態腎臓に対して核酸を導入することに成功した(図6)。これまでの研究から押圧法は吸引圧法と同じメカニズムであることが示唆されている。また押圧法と吸引圧法の核酸導入効率も同等であることが明らかになっている。これらの結果から吸引圧法を用いた場合も、今回の押圧法の結果と同様の結果が得られることが期待され、吸引圧法の腎疾患モデルマウス治療への応用が期待される。

E. 結論

本年度は吸引圧法による腎疾患モデルマウス治療のための基礎検討を進めた。腎臓への吸引圧法の吸引条件の最適化を行い、 -45 kPaで一回という条件を得た。また吸引圧法の腎機能への影響を調べ、腎機能に対して重大な影響がないことを明らかにした。今後は作製した腎疾患モデルマウスに対して吸引圧法の応用を進めていく予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nakao, K., Hashida, M., Konishi, S. *In vivo site-specific transfection of naked plasmid DNA and siRNAs in mice by using a tissue suction device.* PLoS ONE, 7(7): e41319 (2012)

学会発表

Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Katano, S., Guangyuan, Z., Maekawa, D., Hashida, M., Konishi, S. Development of *in vivo* Gene Delivery Methods in Mice Using Tissue Suction Devices for Abdominal Endoscopic Gene Therapy. 23th 2012 IEEE International Symposium on

Micro-Nano Mehatronics and Human Science (MHS2012), Nagoya, Japan, 5-7 Nov (2012), 5 Nov (2012), Oral, pp5-8

林昂司、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：組織吸引デバイスを用いた低犯襲・部位特異的なnaked核酸導入法の開発、日本薬剤学会 第27年会、神戸国際会議場、日本、2012年5月24日(木)

清水一憲、川上茂、林昂司、橋田充、小西聡：生体組織吸引デバイスを用いた遺伝子・核酸デリバリー、第28回日本DDS学会学術集会、札幌コンベンションセンター、日本、2012年7月5日(木)、口頭

川上茂、林昂司、清水一憲、小西 聡、橋田 充：組織吸引デバイスを用いた標的部位特異的なpDNA及びsiRNA導入法の開発と評価、第2回レギュラトリーサイエンス学会学術大会、学術総合センター(東京)、日本、2012年9月3日(月)、ポスター

林昂司、川上茂、谷口陽太、清水一憲、小西聡、橋田充：圧力刺激を利用したnaked siRNA導入法の開発と評価、アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2012、仙台市民会館、日本、2012年9月24日(月)

谷口陽太、林昂司、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：圧力制御した組織吸引によるマウス腎臓におけるnaked核酸導入法の開発、第62回 日本薬学会近畿支部総会・大会、武庫川女子大学、日本、2012年10月20日(金)、ポスター

依頼講演など

清水一憲、川上茂、橋田充、小西聡：生体組織吸引デバイスを利用した新規in vivoネイキッド核酸導入、BIOtech2012 アカデミックフォーラム、東京ビッグサイト、日本、2012年4月25日(水)、口頭

川上 茂：外部刺激を利用したin vivo核

酸デリバリー法の開発と評価、日本薬剤学会第27年会、神戸国際会議場、兵庫県、2012年5月25日、口頭

清水一憲、川上茂、林昂司、橋田充、小西聡：生体組織吸引変形デバイスを用いた遺伝子・核酸デリバリー、遺伝子・デリバリー研究会 夏季セミナー、かんぼの宿 北九州、日本、2012年7月30日(月)、口頭

著書

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

METHOD FOR OPERATING A DEVICE FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED, AND METHOD FOR DELIVERING A SUBSTANCE TO BE INTRODUCED

Inventor : Kazunori Shimizu, Satoshi Konishi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida

PCT/JP2011/062102、WO

2012/056756、米国出願番号：13/881, 304

実用新案登録

なし

その他

なし

厚生労働科学研究費補助金医療機器開発推進研究事業
(医療機器開発 (ナノテクノロジー等) 総合推進研究事業)
分担研究報告書

吸引圧法の心臓疾患治療への応用に関する研究

研究代表者 木下 秀之 京都大学大学院医学研究科 特定助教

本研究では、吸引圧法を難治性心疾患の治療に応用することを目指している。本年度（初年度）は心疾患治療のための吸引圧法最適化を進めた。吸引圧法が健常マウスの心機能に与える影響を調べ、吸引圧法はマウス心機能に明らかな障害を与えないことが示唆される結果を得た。また吸引圧法による心臓へのオリゴ核酸導入の検討を行った。さらに心筋梗塞モデルマウスの作製を行った。

A. 研究目的

心疾患は日本人の3大死因のひとつであり、新たな治療法の開発が求められている。新たな治療法のひとつに遺伝子・核酸医薬品を用いた治療法が挙げられる。遺伝子・核酸医薬品は生体で多様な薬理効果が期待されているが、細胞内への導入が極めて困難であることから医薬品としての実用化が進んでいない。我々は、*in vivo*核酸導入法である吸引圧法を開発し研究を進め、その過程で吸引圧法がマウス心臓に対して適用可能であることを明らかにした。

そこで本研究では、2年間の研究期間の間に、吸引圧法を難治性心疾患の治療に応用することを目指している。本年度（初年度）は、心疾患治療のための吸引圧法最適化を進める。具体的には、吸引圧法が健常マウスの心機能に与える影響を明らかにするとともに、吸引圧法による心臓へのオリゴ核酸導入の検討を行い、さらに心筋梗塞モデルマウスの作製を行う。

B. 研究方法

B-1. 心臓への吸引圧法

心臓への吸引圧法は次のように実施した。まず麻酔下のマウスの呼吸を入

工呼吸器で管理し、左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸した。次にマウス尾静脈から核酸水溶液を200 μ l投与した。その直後に、心臓吸引デバイスを開胸した部分から挿入し、左心室周辺に軽く接触させた後に吸引圧制御システム（詳細は研究総括報告書に記載）を用いて左心室部分を-75 kPaの吸引圧で吸引した。

B-2. tail-cuff法

マウスの収縮期血圧を、tail-cuff法（無加温型非観血式血圧計, Model MK-2000ST, 室町機械株式会社、京都）により非観血的に測定した。

B-3. 心臓超音波法

マウス左室機能の評価を、12-MHzプローブを用い、無麻酔覚醒下に心臓超音波検査（Toshiba power vision 8000）を施行し、左室拡張末期径、収縮末期径、壁厚、左室内径短縮率、駆出率を測定し行った。

B-4. 心臓へのsiRNA導入

使用したsiRNA-Lucとscramble siRNAの配列は次の通りである。
5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAd TdT-3' (sense, siRNA-Luc)。

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGd
TdT-3' (antisense, siRNA-Luc)
5'-CUUACGCUGUCAUGAUCGAd
TdT-3' (sense, scramble siRNA)
5'-UCGAUCAUGACAGCGUAAGd
TdT-3' (antisense, scramble siRNA)

B-5. 心筋梗塞モデルマウスの作製

挿管・人工呼吸管理下に、左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸し、前下行枝を7-0縫合糸を用い結紮し行った。

(倫理面への配慮)

動物実験を行うのにあたり、京都大学で策定された動物実験倫理規定に従ってプロトコルを作成し、倫理委員会の承認を受けるとともに、実験遂行時にはプロトコルを遵守する。DNAを取り扱う実験を行うにあたり、同様に承認を受け、環境問題および実験者の安全に十分に配慮して実験を行った。

C. 研究結果

C-1. 吸引による心機能への影響

心臓組織吸引デバイスを用いて健常マウスの心臓を吸引し、それによる心機能への影響を調べた。吸引条件は研究総括報告書に記載されている心臓への最適吸引条件である。具体的には、内径1.5 mm、外径3 mm、高さ3 mmのPDMS製デバイスを用いて、-75 kPaの圧力で吸引した。

結果を表1に示す。Tail cuff法により、収縮期血圧と心拍数を測定したが、いずれもコントロール群、Sham群、吸引群で有意な差は見られなかった。超音波検査法により、砂質拡張末期径、左室収縮末期径、内径短縮率、駆出率、壁厚、心拍数を測定したが、こちらの測定法でもTail cuff法と同様に、いずれの群間においても有意な差は見られなかった。また体重、心重量、肺重量、心体重比、肺体重比の測定においても、いずれの群間に有意な差は見られなかった。

表1 心機能への影響

		コントロール群	sham手術群	吸引群
tail-cuff法	収縮期血圧 (mmHg)	108.0 ± 4.0	104.0 ± 4.2	106.7 ± 2.3
	心拍数 (/min)	704.5 ± 22.5	712.0 ± 2.1	688.0 ± 35.3
心臓超音波検査	左室拡張末期径 (mm)	2.05 ± 0.05	2.10 ± 0.06	1.97 ± 0.09
	左室収縮末期径 (mm)	0.80 ± 0.10	0.93 ± 0.13	0.83 ± 0.09
	内径短縮率 (%)	62.0 ± 5.0	54.0 ± 5.51	59.0 ± 2.52
	駆出率 (%)	94.0 ± 2.00	89.67 ± 3.84	92.67 ± 1.33
	壁厚 (mm)	0.85 ± 0.00	0.78 ± 0.03	0.85 ± 0.03
	心拍数 (/min)	634.0 ± 13.0	679.0 ± 18.4	684.0 ± 11.9
	体重 (g)	18.9 ± 1.7	20.1 ± 0.9	18.8 ± 0.1
	心重量(mg)	100.0 ± 2.8	93.5 ± 1.9	99.1 ± 1.6
	肺重量 (mg)	12.8 ± 1.3	12.7 ± 1.6	12.7 ± 4.6
	心体重比	5.34 ± 0.63	4.66 ± 0.11	5.27 ± 0.07
	肺体重比	6.79 ± 0.54	6.32 ± 0.25	6.75 ± 0.22

C-2. 吸引圧法によるオリゴ核酸導入の検討

心臓への吸引法により、健常マウスの心臓の細胞にプラスミドDNAを導入できることは明らかになっていた。そこで次にオリゴ核酸を導入可能かどうか、プラスミドDNAとsiRNAを共投与する実験で検討した。その結果、pCMV-Luc単独投与、pCMV-LucとsiRNA-Lucの共投与、pCMV-LucとsiRNA-Lucの共投与の条件で有意な差異は観察されなかった (図1)。

C-3. 心筋梗塞モデルマウスの作製

本研究では、吸引圧法を用いた難治性心疾患モデルマウスの治療を目指している。そこでまず、心筋梗塞モデルマウスの作製を行った (方法の詳細は、

研究方法 B-5)。梗塞作製後、3日目の心臓の断面は図2のようになった。梗塞を作製した部位には、血流が確認されなかったことから心筋梗塞モデルマウスの作製に成功したと考えられる。

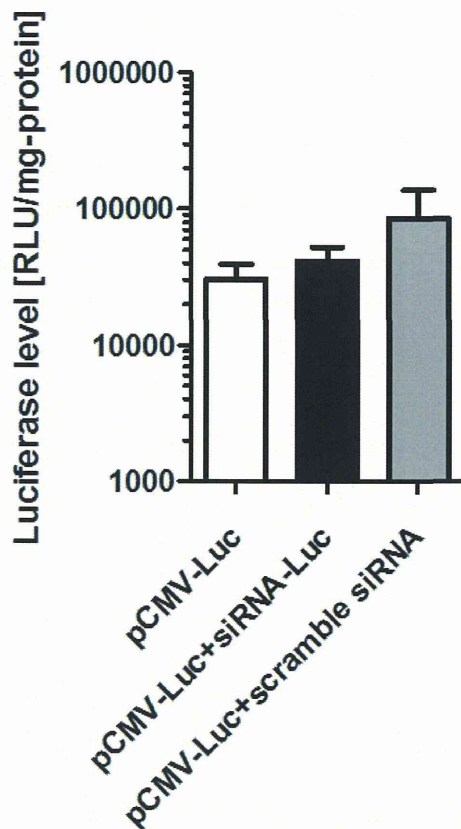


図1 マウス心臓への siRNA 導入の検討

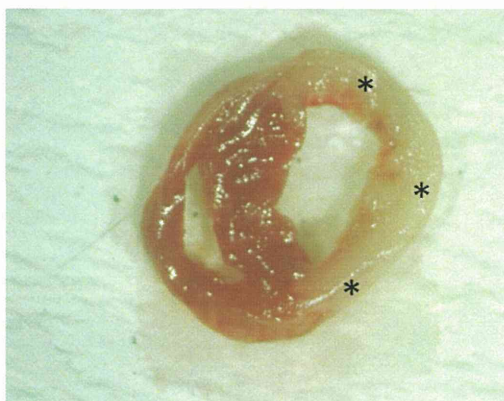


図2 心筋梗塞モデルマウスの心臓の断面写真

D. 考察

吸引圧法による心機能への影響を Tail cuff 法や超音波検査法で調べたが、吸引処置による心機能低下は観察されなかった(表1)。このことから -75 kPa で一回吸引するという心臓への吸引圧法は、心臓に対して重大な損傷を与えない安全な方法であることが示唆された。本実験では心臓吸引してから10日前後での心機能への影響を調べたが、今後さらに長期的な影響も明らかにしていく必要があると考えられる。

心臓へのオリゴ核酸導入の検討を行ったが、siRNA の導入による遺伝子発現抑制効果は得られなかった(図1)。本実験ではマウス一匹あたり $100\mu\text{g}$ のプラスミド DNA と $20\mu\text{g}$ の siRNA を使用したが、今後 siRNA の使用量を増やすことで遺伝子抑制効果が得られる可能性がある。また本実験では6時間後に心臓におけるルシフェラーゼ活性を測定したが、今後は測定する時間を検討する必要があると考えられる。また本実験では、共投与実験によりオリゴ核酸の導入可否を検討したが、内因性の遺伝子をターゲットにした siRNA や miRNA を用いてオリゴ核酸導入を示すことも今後の課題である。

E. 結論

本年度は、吸引圧法を心臓疾患治療へと応用するための基礎検討を進めた。まず心臓組織の吸引が健常マウスの心機能に対して明らかな障害を与えないということが示唆される結果を得た。また吸引圧法による心臓への siRNA の導入を試みたが、本年度の検討においては、siRNA による遺伝子発現抑制効果は得られなかった。今後条件検討を行うことで、抑制効果が得られることが期待される。さらに心臓疾患の病態モデルとして、心筋梗塞モデルマウスの作製に成功した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nakao, K., Hashida, M., Konishi, S. *In vivo* site-specific transfection of naked plasmid DNA and siRNAs in mice by using a tissue suction device. PLoS ONE, 7(7): e41319 (2012)

学会発表

なし

依頼講演など

なし

著書

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

特許取得

なし

実用新案登録

なし

その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Shimizu, K., Kawakami, S., Hayashi, K., Kinoshita, H., Kuwahara, K., Nakao, K., Hashida, M., Konishi, S.	<i>In vivo</i> site-specific transfection of naked plasmid DNA and siRNAs in mice by using a tissue suction device.	PLoS ONE	7(7)	e41319	2012

In vivo Site-Specific Transfection of Naked Plasmid DNA and siRNAs in Mice by Using a Tissue Suction Device

Kazunori Shimizu^{1,2*}, Shigeru Kawakami³, Kouji Hayashi³, Hideyuki Kinoshita⁴, Koichiro Kuwahara⁴, Kazuwa Nakao⁴, Mitsuru Hashida^{1,3,5}, Satoshi Konishi^{1,2,6*}

1 Institute for Innovative NanoBio Drug Discovery and Development, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan, **2** Ritsumeikan-Global Innovation Research Organization, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga, Japan, **3** Department of Drug Delivery Research, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan, **4** Department of Medicine and Clinical Science, School of Medicine, Kyoto University Graduate, Kyoto, Japan, **5** Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan, **6** Department of Micro System Technology, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga, Japan

Abstract

We have developed an *in vivo* transfection method for naked plasmid DNA (pDNA) and siRNA in mice by using a tissue suction device. The target tissue was suctioned by a device made of polydimethylsiloxane (PDMS) following the intravenous injection of naked pDNA or siRNA. Transfection of pDNA encoding luciferase was achieved by the suction of the kidney, liver, spleen, and heart, but not the duodenum, skeletal muscle, or stomach. Luciferase expression was specifically observed at the suctioned region of the tissue, and the highest luciferase expression was detected at the surface of the tissue (0.12 ± 0.03 ng/mg protein in mice liver). Luciferase expression levels in the whole liver increased linearly with an increase in the number of times the liver was suctioned. Transfection of siRNA targeting glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene significantly suppressed the expression of GAPDH mRNA in the liver. Histological analysis shows that severe damage was not observed in the suctioned livers. Since the suction device can be mounted onto the head of the endoscope, this method is a minimally invasive. These results indicate that the *in vivo* transfection method developed in this study will be a viable approach for biological research and therapies using nucleic acids.

Citation: Shimizu K, Kawakami S, Hayashi K, Kinoshita H, Kuwahara K, et al. (2012) *In vivo* Site-Specific Transfection of Naked Plasmid DNA and siRNAs in Mice by Using a Tissue Suction Device. PLoS ONE 7(7): e41319. doi:10.1371/journal.pone.0041319

Editor: Edward E. Schmidt, Montana State University, United States of America

Received: January 16, 2012; **Accepted:** June 20, 2012; **Published:** July 23, 2012

Copyright: © 2012 Shimizu et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by the Adaptable and Seamless Technology Transfer Program through Target-driven R&D (A-STEP) from Japan Science and Technology Agency (AS221Z01400F), Ritsumeikan Global Innovation Research Organisation project in Ritsumeikan University, and Showa Hokokai Foundation. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: kshimizu@pharm.kyoto-u.ac.jp (KS); konishi@se.ritsumei.ac.jp (S. Konishi)

Introduction

In the post-genomic era, increased importance has been placed on the development of *in vivo* transfection techniques that can be used for biological research or gene therapy. Many *in vivo* transfection methods have been developed using recombinant viral vectors or non-viral carriers such as cationic liposomes and polymers [1–4]. However, transfection methods for naked nucleic acids, including plasmid DNA (pDNA) or siRNA, have many advantages, including convenient preparation, ease of handling, and lack of toxicity associated with the transfection agents. Therefore, this is largely considered to be the simplest and safest method [5].

Liu *et al.* reported that non-invasive gene delivery to the liver was performed by a mechanical massage around the abdomen after intravenous injection of naked pDNA in mice [6,7]. Inspired by their study, our group found that direct pressure to the kidneys, spleen, and liver induces the transfection of naked nucleic acids, which we termed as tissue pressure-mediated transfection [8–10]. This method has been used with naked pDNA, siRNA, and microRNA [8–11], and the miR-200 family of microRNAs introduced by renal pressure-mediated transfection ameliorated renal tubulointerstitial fibrosis in mice [11]. Further, we previously reported that the secretion of pro-inflammatory cytokines was not observed under the experimental conditions for transfection and

the degree of direct pressure applied to the target tissue is one of the key factors for controlling the expression levels of the transfected pDNA [9].

In tissue pressure-mediated transfection, 2 objects were used to apply direct pressure effectively to the target tissue; the first is used to directly press the target tissue, and the other is used to support the pressed tissue. Examples include the index finger and the thumb [8,11], a syringe-modified pressure controlling device and a spatula [9,10], and a pneumatic balloon actuator and a renal case [12]. We have used these objects to perform tissue pressure-mediated transfection in small animals such as mice and rats. However, considering future clinical use, we sought to develop an easier method using a simpler device that required minimally invasive treatment. Previously, we developed a micro-pneumatic suction device for medical diagnosis and operation [13]. The simple suction device was used to fix medical Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) such as temperature sensors or micropumps on the surface of pulsating target tissues. The tissue suction device, made of polydimethylsiloxane (PDMS), suctioned a tissue surface by applying negative pressure. Although the suctioned part of the tissue was deformed temporarily, *in vivo* experiments revealed that the damage was negligible [13]. Furthermore, it has been demonstrated that the suction device