

厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究事業)

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～25年度 総合研究報告書

研究代表者 清水 一憲

平成26(2014)年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 23

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 24

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）
総合研究報告書

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 大阪大学大学院基礎工学研究科 助教

我々はこれまでに、in vivo ネイキッド核酸導入法である吸引圧法の開発を行ってきた。本研究では、吸引圧法を腎・心臓疾患治療へと応用することを目的とした。まず吸引圧制御システムを構築し、吸引圧法の最適化を行った。これにより、肝臓、腎臓、心臓において、安全に効率よく吸引圧法を行うことが可能になった。さらに腎臓疾患モデル、心臓疾患モデル動物に対して、吸引圧法が適用可能であることを明らかにした。

川上茂
長崎大学大学院医歯薬総合研究科・教授

木下秀之
京都大学大学院医学研究科・医員

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核酸導入法が開発が進んでいる。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、保健医療に大きく貢献すると考えられる。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。

本研究では、“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した。本総合研究報告書では、研究成果を次の3つに分け報告する。

- ・吸引圧制御システムの開発とそれを用いた吸引圧法の特長解明（C-1）
- ・腎臓疾患治療への応用を目指した吸引圧法の研究（C-2）

・心疾患治療への応用を目指した吸引圧法の研究 (C-3)

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。

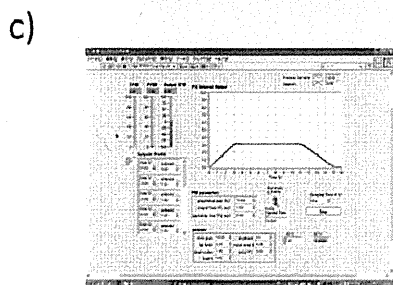
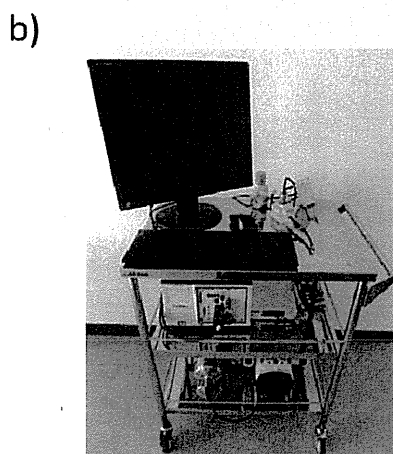
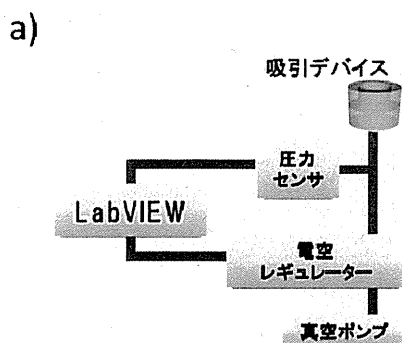


図1 吸引圧制御システム

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。吸引デバイスの模式図を図2に示す。

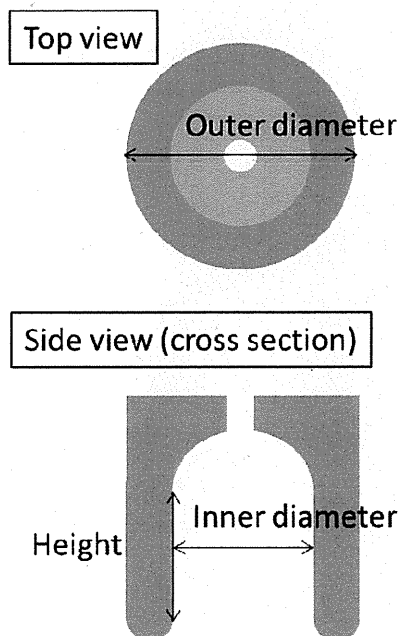


図2 吸引圧制御システム

B-3. 肝臓への吸引圧法

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。

B-4. 肝障害性の評価

血清中のアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) 量、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 量を測定した。吸引圧法を行い、0、6、24、48 時間後に血清をサンプリングした。測定には、トランスアミナーゼCII-テストワコー (和光純薬) を用いた。

B-5. 肝臓への吸引圧法により核酸導入される細胞種の評価

肝臓に対して、ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを用いて吸引圧法を行った。6時間後に、コラゲナーゼ灌流法により肝組織から細胞を分離した。回収した細胞懸濁液を遠心し、肝実質細胞と非実質細胞に分け、それぞれの細胞のルシフェラーゼ量を測定した。

B-6. 腎臓への吸引圧法

マウス (ICR、雌、5週齢)、およびラット (Wister/ST、雌、7週齢) に麻酔を行い、開腹し、腎臓を必要最小限露出させた。尾静脈からCMVプロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを、マウスに対しては100 µg含む生理食塩水を200 µl、ラットに対しては1 mg含む生理食塩水を2 mL投与し (あるいはマウス、ラットに対して4 mg/kg投与し)、その直後に、腎臓の標的とする部位に軽くデバイスを接触させ、吸引圧制御システムを作動させた。ただちに閉腹し、6時間経過後、マウス及びラットを安楽死させて腎臓を取り出し、標的部位中のルシフェラーゼの発現量をルミノメーターで測定した。

B-7. 腎臓の組織学的な評価

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、マイクロトームにより5µmのパラフィン切片を作製した。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-8. 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°C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-9. 腎臓へのオリゴ核酸導入

マウス (ICR、雌、5週齢) に麻酔を行い、開腹し、腎臓を必要最小限露出させた。外因性遺伝子のノックダウンには、尾静脈からルシフェラーゼ遺伝子を発現するプラスミドDNAを100 µgと、ルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNAを50 µg含む生理食塩水200 µLを投与した。内因性遺伝子のノックダウンにはGAPDHに対するsiRNAを50 µg含む生理食塩水200 µLを投与した。投与後ただちに閉腹し、6時間後、および24時間後に遺伝子の発現量をルミノメーター及びリアルタイムRT-PCRにより測定した。ルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNA及びスクランブルsiRNAの配列は次の通りである。siRNA: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (セ ン ス 鎖) 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3'

(アンチセンス鎖)、スクランブルsiRNA:
5'-CUUACGCUGUCAUGAUCGAdTdT-3'
(センス鎖) and 5'-UCGAUCAUGACAGCGUAAGdTdT-3'
(アンチセンス鎖)。

GAPDHに対するsiRNA及びスクランブルsiRNAの配列は次の通りである。

siRNA: 5'-CAAGAGAGGCCCUAUCCC
AdTdT-3' (センス鎖)、
5'-UGGGAUAGGGCCUCUCUUGdTdT-
3' (アンチセンス鎖)、スクランブル

siRNA:
5'-CGCAACUACCGAUGCGAACdTdT-
3' (センス鎖)、
5'-GUUCGCAUCGGUAGUUGCGdTdT-
3' (アンチセンス鎖)。

GAPDHの発現量を定量したリアルタイムRT-PCRでは次の配列のプライマーを用いた。GAPDH 5'-TCTCCTGCGACTTCAACA-3' (forward)、5'-GCTGTAGCCGTATTCATTGT-3' (reverse)、β-actin: 5'-GTTCTACAAATGTGGCTGAGGACTT-3' (forward)、5'-TTGGGAGGGTGAGGGACTT-3' (reverse)

B-10. 腎疾患モデル動物の作製

慢性腎不全モデルマウスとして、片側尿管結紮(UUO)モデルマウスを作製した。その手順は以下のようなものである。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か所の間の部分を切断した。最後に、腹部を縫合し、閉復した。同様の方法で、慢性腎不全モデルラットである、作製には、Wister/ST、雌、7週齢のラットを用いた。

B-11. 腎臓への押圧法

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/m²にて押圧した。押圧法を適用後、縫合し、閉復した。

B-12. hBMP7発現プラスミドDNAの構築

図3のように、pF1KB6604ベクター(かずさDNA研究所)からhBMP7のcDNAフラグメントをpcDNA3ベクター(Invitrogen社)のマルチクローニングサイト(Hind III/Xba Iサイト)に挿入することにより作製した。作製したpDNAは大腸菌DH5αへの形質転換後に増殖させ、pDNA精製キットJETSTAR2.0 Plasmid Giga Prep Kits 12 (GENOMED社)により抽出並びに精製を行った。

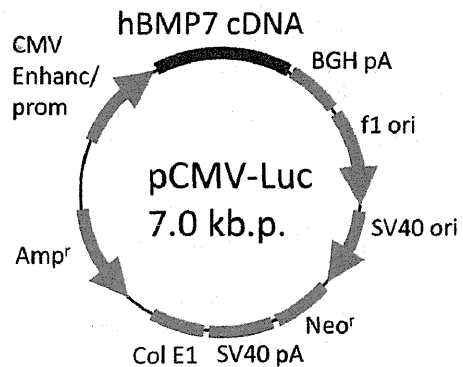


図3 構築したhBMP7発現プラスミドDNA

B-13. hBMP7のタンパク質発現量の測定

In vitroの実験においては、リポフェクタミンを遺伝子導入試薬として用いて、遺伝子導入24時間後の細胞中、および培養上清中のhBMP7濃度をELISAにより定量した。細胞は液体窒素並びに37°Cの温浴に交互に4回侵漬し凍結、融解し、タンパクを抽出した。

In vivoの実験においてはまず吸引圧法および押圧法を右腎臓に適用し遺伝子を導入した。6時間経過後、組織ライセート中、および血清中のhBMP7濃度をELISAにより定量した。まず、臓器を脱血後に摘出し、コンプリート、ミニ、EASYPack(ロシュ社)を含むPBS中でホモジナイザーを用いて破碎し、4°C、13000 rpm、10分遠心後の上清を組織ライセートとして得た。また、深麻酔下で下大静脈より採取した血液を4°Cで一晩静置し、室温で3000 rpm、15分間の遠心後の上清を血清として得た。hBMP7濃度はQuantikine ELISA (R&D

system社) により定量した。

B-14. hBMP7のmRNA発現量の測定

吸引圧法および押圧法を右腎臓に適用し遺伝子を導入し、6時間経過後、右腎臓の遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCRにより定量した。具体的にはまず右腎臓を摘出し、全RNAをGen Elute™ Mammalian Total RNA Miniprep Kit (Sigma aldrich社) により抽出した。Primescript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写反応を行い、各mRNA量はSYBR Premix Ex Taq (タカラバイオ株式会社) を利用してLight Cycler system (Roche Diagnostics社) による

リアルタイムRT-PCRにより、hBMP-7の発現量を定量した。

用いたプライマーは次の通りである。

hBMP7: 5'-
CCGGAACGCTTCGACAATG -3'
(forward) 5'-
CAGAGGGTACGGCTGTCGAG -3'
(reverse)

B-15. 心臓への吸引圧法

麻酔を施したマウスの呼吸を人工呼吸器で管理し、左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸した。200 µlのプラスミドDNA溶液を尾静脈から投与し、直後に、吸引デバイスを標的部位に接触させ、圧力制御システムを作動させた。用いたデバイスの基本形状は、内径1.5 mm、外径3 mm、高さ3 mmである。

B-16. 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-17. 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-18. 心臓へのオリゴ核酸導入

使用したsiRNA-Lucとscramble siRNAの配列は次の通りである。

5'-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-3' (sense, siRNA-Luc)

5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGdTdT-3' (antisense, siRNA-Luc)

5'-CUUACGCUGUCAUGAUCGAdTdT-3' (sense, scramble siRNA)

5'-UCGAUCAUGACAGCGUAAGdTdT-3' (antisense, scramble siRNA)

B-19. 心疾患モデル動物の作製

麻酔下で、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縫合糸を用いて結紮した。結紮ののち、ただちに閉胸した。

B-20. 心疾患モデル動物への吸引圧法

心筋梗塞モデル作製の3日後に、麻酔下で、挿管・人工呼吸管理下にて開胸し、B-5と同様の手順で虚血部位に対して吸引圧法を適用した。なお、虚血部位は目視により確認した。吸引波形は1-3-1、圧力は-75 kPa、デバイスの形状は1.5-3-3である。

(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した。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. 吸引圧制御システムの開発とそれを用いた吸引圧法の特性解明

我々はこれまで、吸引圧を制御することなく吸引圧法を行ってきた。今後、広範囲な施設で再現性良く安全に吸引圧法を実施するためには、吸引圧を制御して吸引圧法を行う必要があると考えられる。そこで、吸引圧法のための吸引圧

制御システムを開発した。さらに、そのシステムを用いて、吸引圧法の特長説明を行った。

C-1-1. 吸引圧制御システムの動作評価

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4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に戻るという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。

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るかどうか調べた。圧力波形は4つのパラメーターで設定した(図5)。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、-40 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6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。図7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6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。

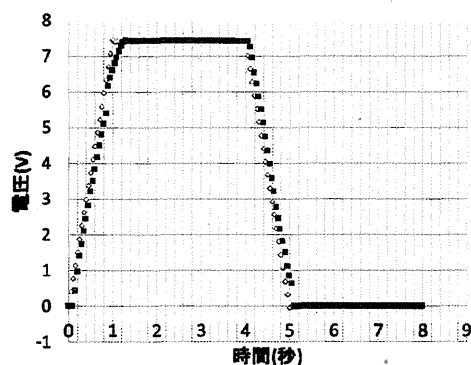


図4 出力信号と入力信号

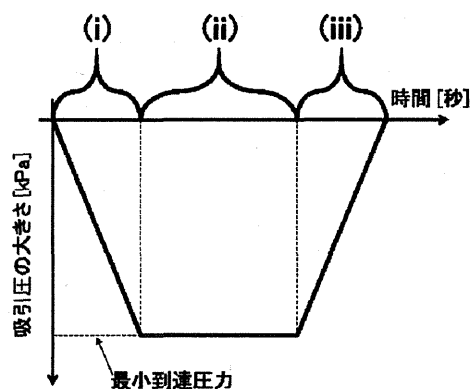


図5 圧力波形の定義

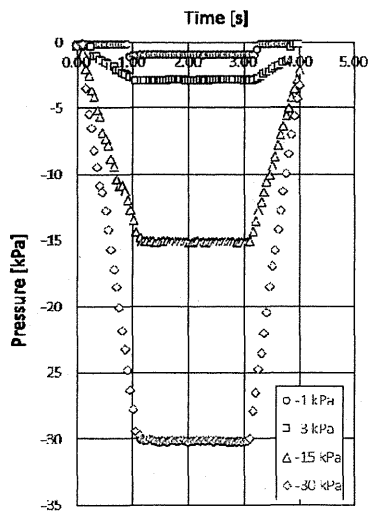


図 6 最少到達圧力の制御

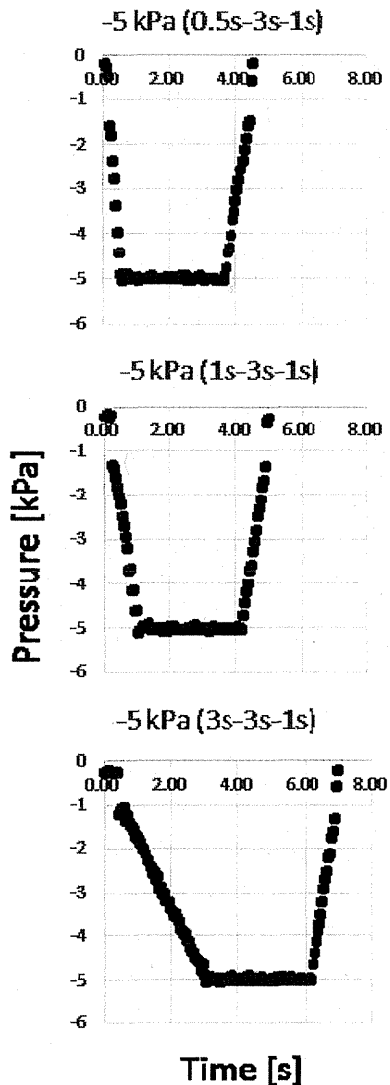


図 7 圧力供給時間の制御

C-1-2. 導入遺伝子発現量に対する最小到達圧力の影響 (肝臓)

開発した吸引圧制御システムを用いて肝臓への吸引圧法を行い、システムの有効性を検証すると共に、吸引圧法の基本特性の解明を試みた。

まず最小到達圧力を-1、-3、-5、-15、-30、-40 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8)。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。

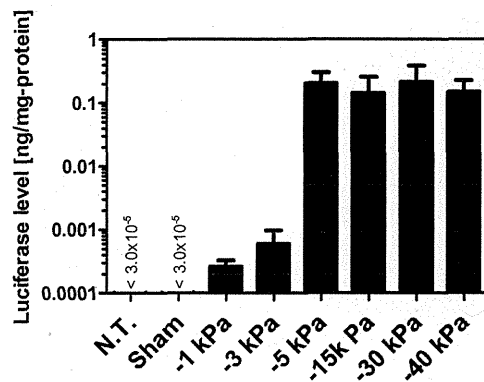


図 8 最小到達圧力の発現量への影響 (肝臓)

C-1-3. 導入遺伝子発現量に対する吸引圧波形の影響 (肝臓)

次に圧力の波形を変えて肝臓への吸引圧法を行い、導入遺伝子発現量への影響を調べた(図9)。最小到達圧力を-5 kPaに設定し圧力供給時間を0.5、1、3秒と変化し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。

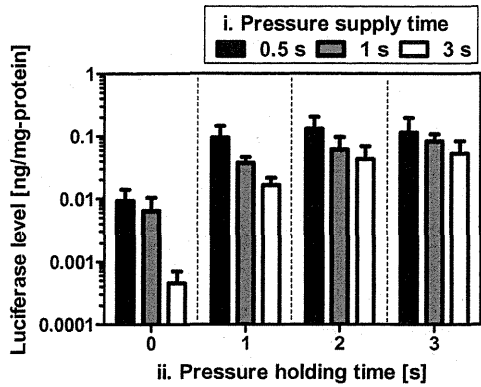


図9 圧力供給時間と圧力維持時間の発現量への影響 (肝臓)

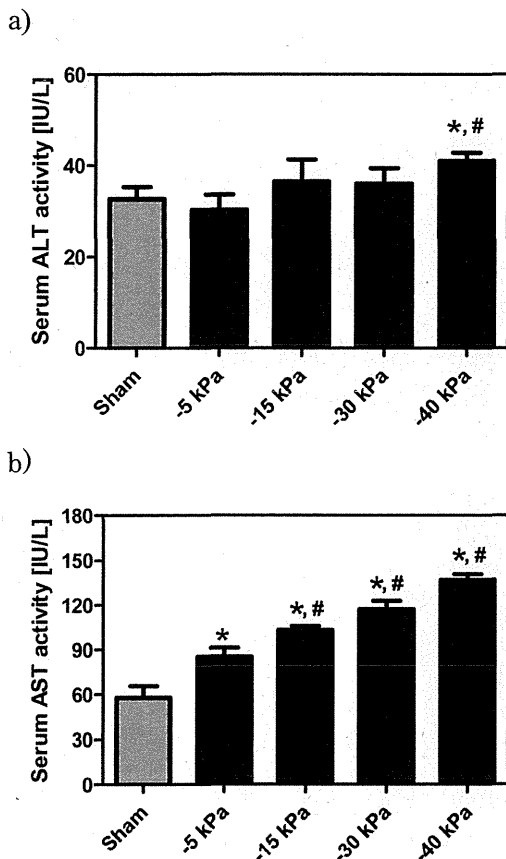


図10 最少到達圧力の大きさが肝障害性に与える影響

肝臓への吸引圧法を行った後、6時間経過後のALT値(a)とAST値(b)

C-1-4. 肝障害性に対する最小到達圧力の違いの影響 (肝臓)

次に最少到達圧力の違いが、肝障害性に影響するかどうかを調べた。最少到達圧力を-5、-15、-30、-40 kPa、波形

を1-3-3に設定し、肝臓への吸引圧法を行った。

その結果、吸引圧法を実施して6時間後において、ALT値は、-5、-15、-30 kPaはShamと同等であったが、-40 kPaは有意に高い値となった(図10a)。AST値は、最少到達圧力が小さくなるほど、高い値となり、-5 kPaにおいても、Shamよりも有意に高い値となった(図10b)。しかし図11に示すように、ALT値、AST値ともにその上昇は一過性のものであり、24時間後以降では何も処置を行っていないコントロールマウスと同等のレベルとなった。

このように吸引圧制御システムを用いることで、肝臓に対して安全に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。

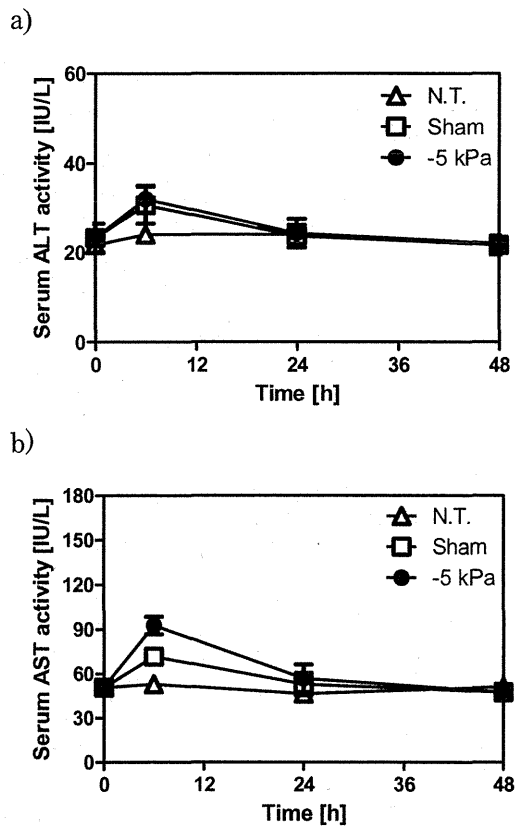


図11 肝臓への吸引圧法による肝障害性の経時変化

肝臓への吸引圧法を行った後、0、6、24、48時間経過後のALT値(a)とAST値(b)

C-1-5. 吸引圧法における組織変形の重要性

図8に示すように、肝臓への吸引圧法において最少到達圧力が、導入したプラスミドDNAの発現量に大きく影響した。しかし、なぜ最少到達圧力の違いにより発現量が変化するのが明らかになっていなかった。我々は、最少到達圧力が違うことで、組織の変形量が異なり、変形量が異なることで発現量が異なると考え、最少到達圧力を変化させた時の組織変形量を調べた。図12に示すように、-3 kPaと-5 kPaの間に組織変形量の違いがあることがわかった(図12)。すなわち、発現量と組織変形量に相関があることが示唆される結果を得た。

そこで、それらの関係をより詳細に検討した。図13aに示すように、穴の数が違うが穴面積の和が同じ吸引デバイスを4種作製し、同じ最少到達圧力で吸引圧法を行った際の、発現量と組織変形量の関係を調べた。組織変形量は、-5 kPaの圧力を負荷した際に、デバイスの穴の中に吸引された肝組織量を測定することで求めた。

その結果、発現量がデバイス(i)において最も高く、デバイス(ii)で2番目に高いという結果が得られた(図13b)。一方、組織変形量もデバイス(i)において最も大きく、デバイス(ii)で2番目に高いという結果が得られた(図13c)。これらの結果から、吸引圧法における導入核酸発現量は、組織変形量に大きく依存することが分かった。

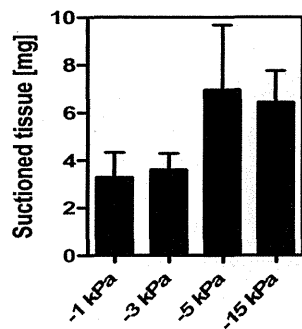


図12 最少到達圧力と組織変形量の関係

肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力-5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

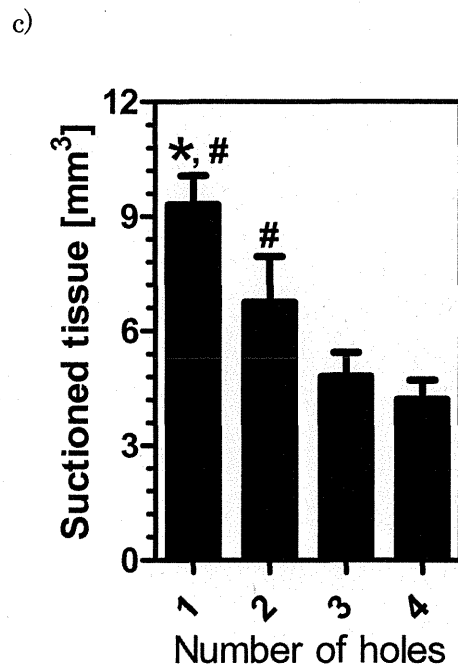
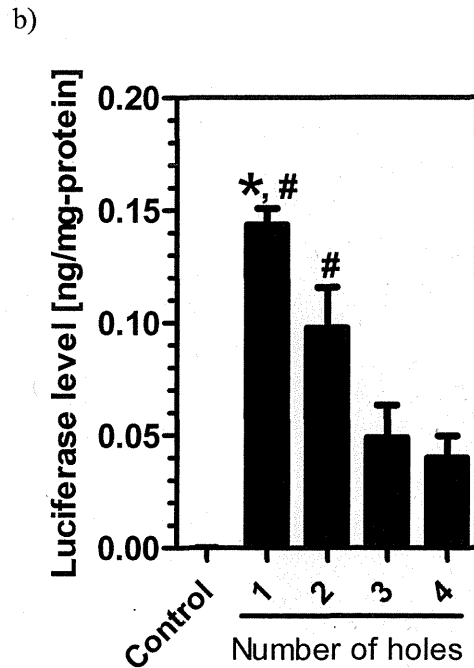
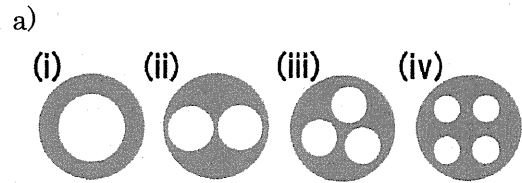


図13 吸引圧法における導入核酸発現量と組織変形量の関係

用いた吸引デバイスの穴形状の断面 (a)、それぞれのデバイスを用いた際の発現量の違い (b)、それぞれのデバイスを用いた際の組織変形量の違い (c)。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力-5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

C-1-6. 吸引デバイスの改良:吸引口の複数化

続いて、吸引デバイスの改良を行った。我々は以前、吸引口を1つもつ吸引デバイスを用いて、吸引回数と臓器あたりの導入核酸発現量が比例することを示した。本研究では、吸引口を複数もつデバイスを新たに開発し、臓器あたりの導入核酸量を増加させることを目指した。肝臓を対象臓器として実験を行った。

図14aに示すように、これまで用いてきたデバイス (device #1) を基本構造とし、それを2、3、4個配置したものを作製した (device #2-4)。それぞれのデバイスを用いて肝臓への吸引圧法を行った結果を図14bに示す。その結果、想定した通り、吸引口の数が多い、device #4において最も高い発現量が得られた。またdevice #4による発現量はdevice #1の4倍以上 (約8.9倍) であった。

また、肝臓への吸引圧法で、肝臓のどの細胞種に核酸が導入されるのかを調べた。どの細胞種に核酸導入されるのかを明らかにすることは、疾患治療戦略を考える上で、非常に重要である。

その結果、肝実質細胞において、細胞一個当たりの発現量が有意に高いことが分かった (非実質細胞の約13.7倍) (図15)。このことから、肝臓への吸引圧法では、主に、肝実質細胞に核酸が導入されていることがわかった。

さらに、吸引口の複数化が肝障害性に与える影響をALT値、AST値を調べることで明らかにした。その結果、吸引口が多くなるに従い、ALT値とAST値が大きくなる傾向が観察された (図16)。一方、最も高い値が観察されたdevice #4においても48時間以内にそれぞれの値がコントロールマウス (無処置) と同等になることが分かった (図17)。

このことから、device #4による肝臓への吸引圧法は、発現量を向上させるが、肝臓に対して、深刻な障害を与えないことが分かった。

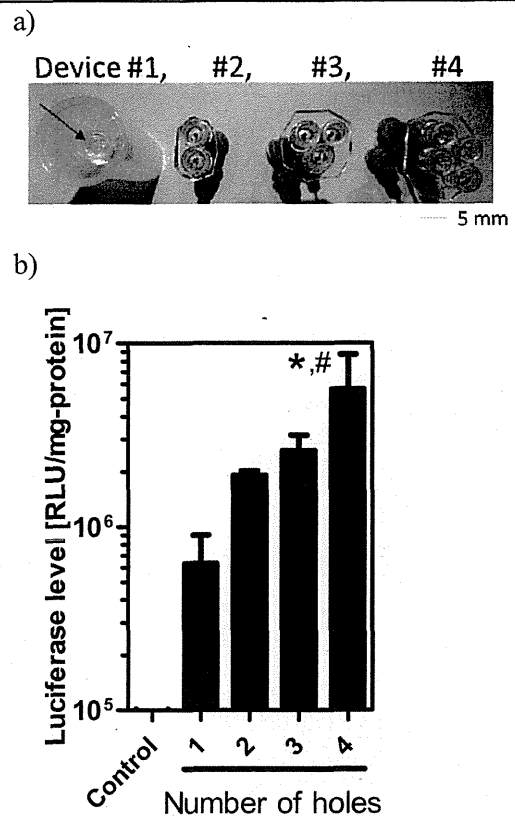


図14 複数の吸引口をもつデバイスの開発とそれを用いた吸引圧法
開発した吸引デバイス (a)、それぞれのデバイスを用いた際の発現量の違い (b)。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力・5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

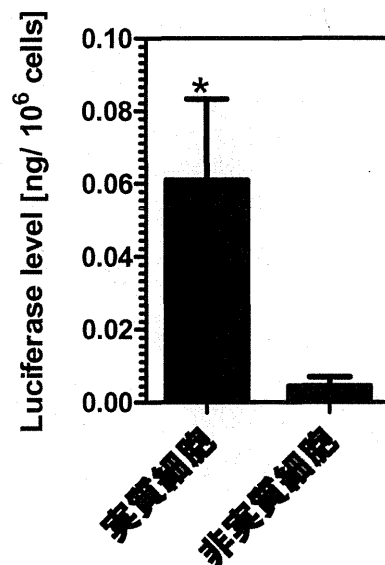
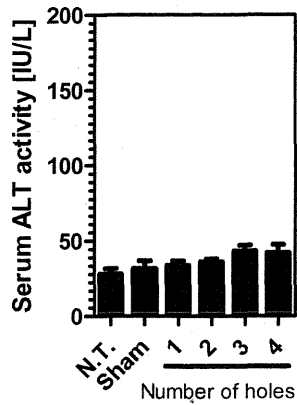


図15 核酸導入される細胞種の検討

a)



b)

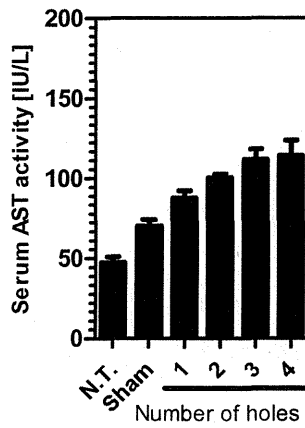
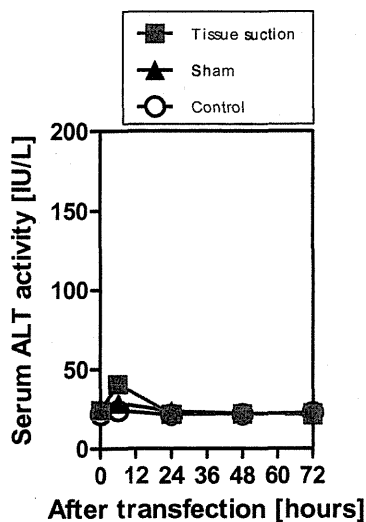


図 16 複数の吸引口をもつデバイスを用いた吸引圧法による肝障害性

開発した吸引デバイス#1 から#4 を用いて、肝臓への吸引圧法を行い、6 時間後の血清中の ALT 値 (a)、AST 値 (b) を調べた。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力 5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

a)



b)

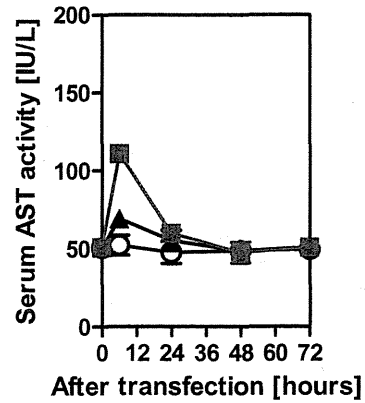


図 17 複数の吸引口をもつデバイスを用いた吸引圧法による肝障害性の経時変化

開発した吸引デバイス#4 を用いて、肝臓への吸引圧法を行い、0、6、24、48、72 時間後の血清中の ALT 値 (a)、AST 値 (b) を調べた。肝臓への吸引圧法は、最少到達圧力 5 kPa、波形 0.5-1-1 で行った。

C-1-7. 吸引デバイスの改良: 吸引デバイスの硬さの影響

最後に吸引デバイスの硬さの違いが、肝障害性に与える影響を明らかにした。同じ形状で硬さの異なる吸引デバイスを製作し、それを用いて肝臓への吸引圧法を行った。PDMSの混合比を変えることで、硬さの異なるデバイスを製作した。用いた混合比は、主剤:硬化剤=20:1と10:1である。それぞれのヤング率は、20:1 (約500 kPa : soft)、10:1 (約2500 kPa : hard) である。

まず、それぞれのデバイスを用いて、肝臓への吸引圧法を行った。導入核酸発現量は、soft、hardにおいて同等であり、デバイスの硬さの影響は見られなかった。一方、ALTとAST値を測定した結果、ALT値は-40 kPaで、AST値は-15、-30、-40 kPaにおいて、softで有意に低いという結果が得られた(図18)。また-40 kPaでは、hardにおいて、肝臓の吸引した部位が断裂し、出血することが明らかになった。ルシフェラーゼ発現量は、softとhardの間で違いは見られなかった。これらの結果より、吸引デバイスの硬さは、組織障害性に影響することが分かった。

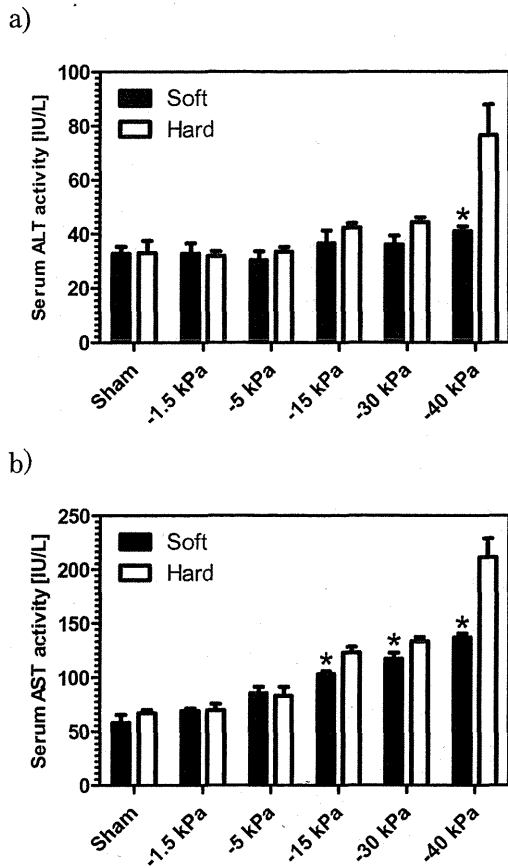


図 18 吸引デバイスの硬さと肝障害性の関係
硬さの異なる吸引デバイスで吸引圧法を行った後、6時間経過後の ALT 値 (a) と AST 値 (b)

C-2. 腎疾患治療への応用を目指した吸引圧法の研究

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治療薬や核酸医薬品を導入する方法がない。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た。まず腎臓への吸引圧法の最適化を行った。次に腎疾患治療用タンパク質発現プラスミドDNAを構築し、吸引圧法を用いた腎臓への核酸導入を検討した。さらに腎疾患モデルマウスへの吸引圧法の適用を行った。

C-2-1. 導入遺伝子発現量に対する最小到達圧力の影響 (腎臓)

上述した吸引圧制御システムを用いて、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19)。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。

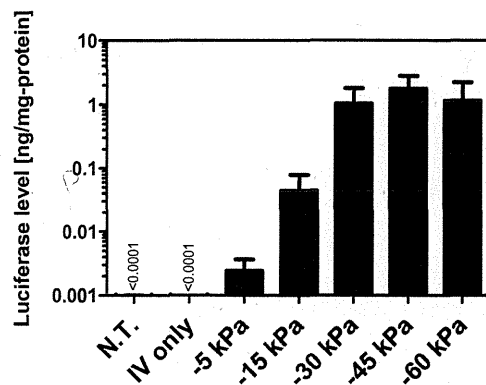


図 19 最小到達圧力の発現量への影響 (腎臓)

C-2-2. 導入遺伝子発現量に対する吸引圧波形の影響 (腎臓)

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20)。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20a)、圧力維持時間を0、1、3、5秒(図20b)、圧力解放時間を0.5、1、5秒(図20c)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。

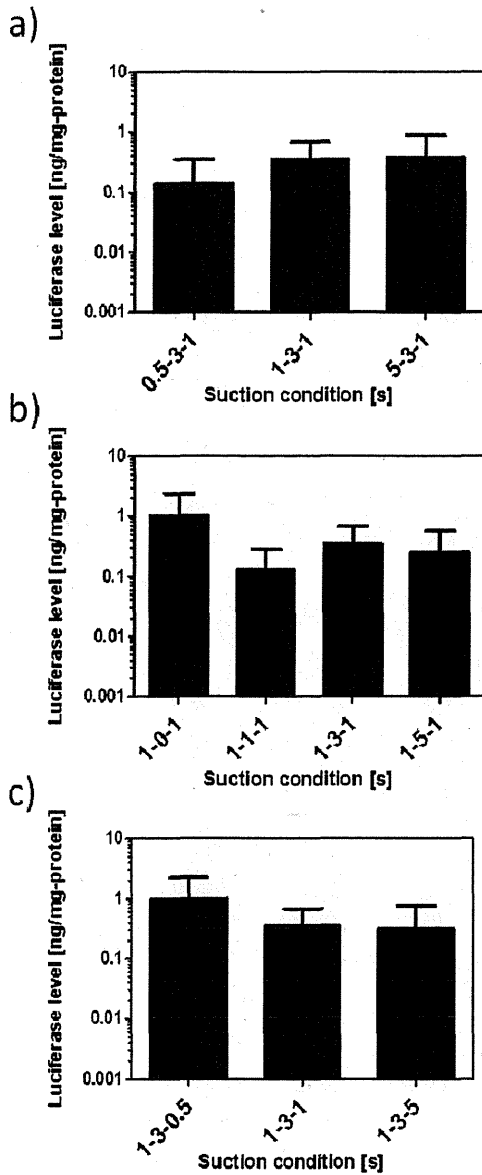


図 20 圧力波形の発現量への影響(腎臓)

C-2-3. 導入遺伝子発現量に対するプラスミドDNA量の影響 (腎臓)

次に、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21)。

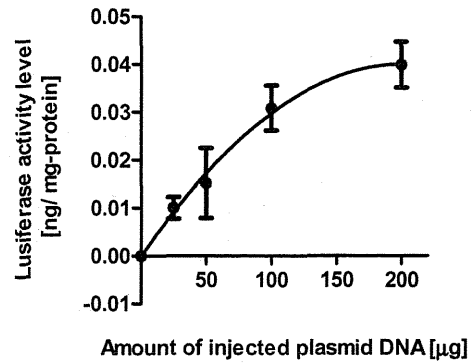


図 21 プラスミドDNA濃度と導入核酸の発現量

C-2-4. 導入遺伝子発現量に対する吸引回数の影響 (腎臓)

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22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。

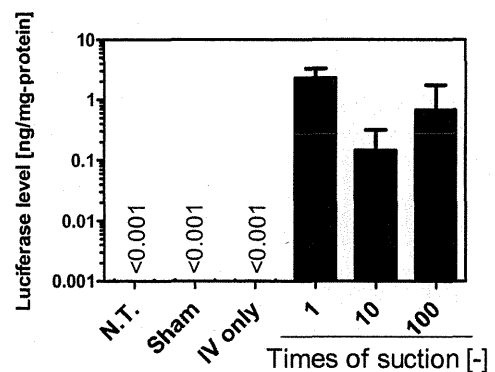


図 22 吸引回数と発現量の関係

C-2-5. 吸引圧法による腎障害性の検証

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1日後、3日後、5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23)。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24)。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、腎臓機能に顕著な障害性を与えないことが示唆された。

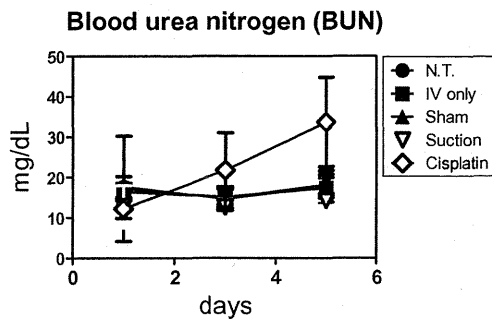


図 23 吸引圧法の腎臓機能への影響(血中尿素窒素濃度測定)



図 24 吸引したマウス腎臓の HE 染色

C-2-6. 吸引圧法による腎臓へのオリゴ核酸導入の検討

核酸医薬品であるsiRNAを用いて、腎臓において、外因性、内因性の遺伝子発現を抑制することを試みた。まず初めに、健常マウスを用いて、ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAとルシフェラーゼ遺伝子に対するsiRNAを共投与し、ルシフェラーゼ発現が抑制されるかどうか調べた。その結果、共投与群とプラスミドDNAのみ投与群で同等のルシフェラーゼ発現量が得られた。次に、内在性の遺伝子であるGAPDHに対するsiRNAを吸引圧法で健常マウスの腎臓に導入し、GAPDHの遺伝子の発現量を抑制できるかどうか調べた。コントロールとして、無処置群、スクランブルsiRNA群(GAPDHのsiRNAの配列をランダムに並べ替えたsiRNAを投与)を用いた。その結果、GAPDHの発現量に変化が見られなかった。

以上のように、腎臓に対するsiRNAを用いた吸引圧法によって、外因性、内因性の遺伝子の発現を抑制することができなかった。

C-2-7. 腎臓への吸引圧法による治療用タンパク質発現プラスミドDNAの導入

上述したように、腎臓への吸引圧法において、核酸医薬品であるsiRNAで有効な結果が得られなかった。このため本研究において速やかに吸引圧法による腎疾患治療へと研究を展開するために、遺伝子治療薬を用いて研究を進めた。

腎疾患の治療用タンパク質として、骨形成因子であるBMP7を選択した。BMP7は線維化の進行の主要な因子であるTGF- β を抑制し、線維化の抑制だけでなく障害された腎組織の修復が報告されているタンパク質であり、慢性腎臓病に対する新規治療薬となり得る。しかし、その広範な副作用が問題となり実用化には至っていない。本研究により、吸引圧法を用いて腎臓特異的にBMP7を作用させることができれば、BMP7を用いた腎疾患治療が可能になると期待される。我々はまず、hBMP7を発現するプラスミドDNAを構築した(手順は研究方法に記載)。構築したプラスミドDNAが

hBMP7を発現するかどうか、培養細胞 (B16BL6) に導入し調べた。細胞、培養上清に含まれるhBMP7量を測定したところ、培養上清に多くのhBMP7が分泌されていることが分かった。これらの結果から、構築したプラスミドDNAはhBMP7を発現すること、さらにhBMP7は培養上清中に分泌されることが確認された。

次に、構築したプラスミドDNAを吸引圧法で健常マウス腎臓に導入し、腎組織中、血清中のhBMP7のタンパク質量を調べた。ポジティブコントロールとして、ハイドロダイナミクス法により、肝臓にhBMP7発現プラスミドDNAを導入したマウスを用いた。その結果、ポジティブコントロール群では、血清中に高い濃度でhBMP7が存在していることが確認されたが、腎臓への押圧法や吸引圧法で核酸導入した群では、血清中にhBMP7が検出されなかった (図25)。

このことから、押圧法や吸引圧法では、hBMP7発現プラスミドDNAが腎臓細胞に導入されない、あるいは導入されても発現しない可能性があると考え、押圧、吸引圧法を行った腎臓あたりのhBMP7遺伝子発現量を調べる実験を行った。その結果、ポジティブコントロールとして用いたハイドロダイナミクス法でプラスミドDNAを導入した肝臓では、無処置マウスの肝臓に比べて、194倍のhBMP7が発現していることが分かった。また腎臓への押圧法、吸引圧法を行った群では、それぞれ69倍、26倍のhBMP7遺伝子の発現が観察された (図26a,b)。これらの結果から、hBMP7発現プラスミドDNAは、押圧法、吸引圧法を用いて健常マウスの腎臓に導入することが可能であることがわかった。

図 26 腎臓への吸引圧法を行ったマウス腎臓における hBMP7 遺伝子発現量の変化

ハイドロダイナミクス法 (a)、押圧法と吸引圧法 (b)

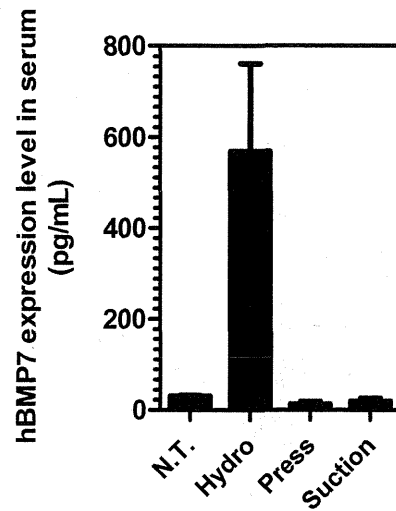
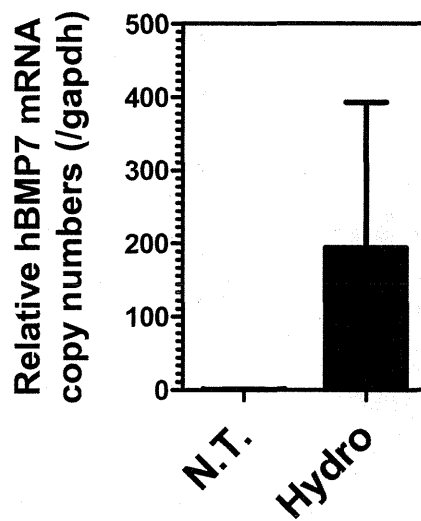
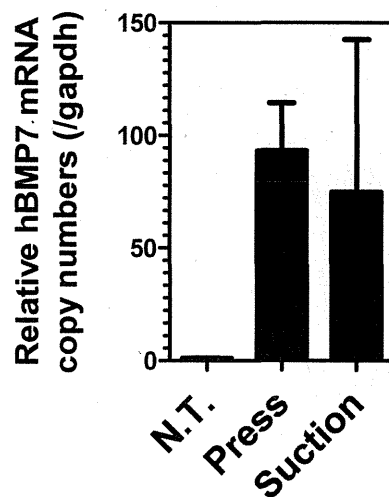


図 25 腎臓への吸引圧法を行ったマウス血清中の hBMP7 量測定

a)



b)



C-2-8. 腎疾患モデルマウス・ラットの作製

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。図27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。

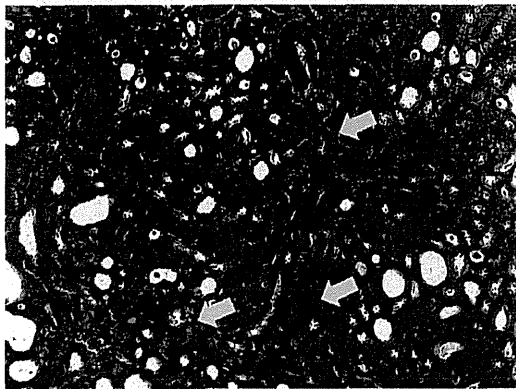


図27 UUOモデルマウスの腎臓切片
矢印部分に線維化が認められた

C-2-9. 病態腎臓への吸引圧法の適用

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。まず、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28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。

次に、UUOモデルラットの作製を行い、病態腎臓に対して、吸引圧法でプラスミドDNAの導入を行った。

左腎の輸尿管を結紮して3週間後のUUOモデルラット腎臓に対して、吸引圧法を行った。核酸としてルシフェラ

ーゼ発現プラスミドDNAを用いた。その結果、左右の腎臓に健常ラットの腎臓と同等のレベルのルシフェラーゼ発現量が認められた(図29)。このことから、ラット病態腎臓に対して、吸引圧法が有効であることが分かった。

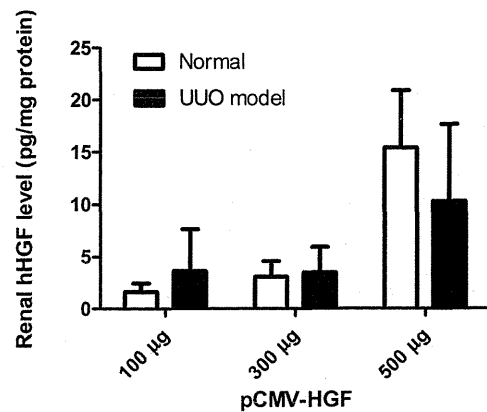


図28 UUOモデルマウスに対する核酸導入

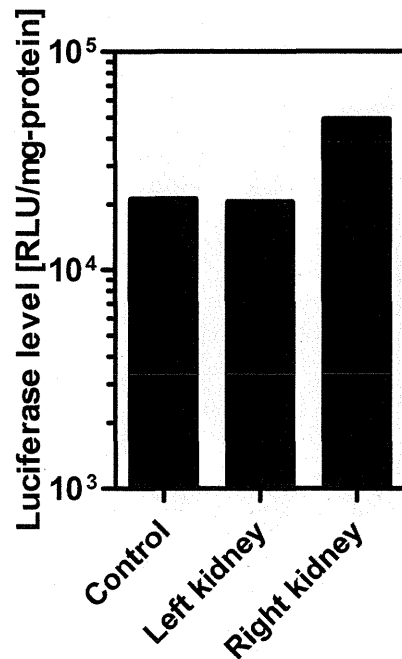


図29 UUOモデルラット腎臓に対する吸引圧法

C-3. 心疾患治療への応用を目指した吸引圧法の研究

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治療薬や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、これまでの研究から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。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標とした。まず、心臓への吸引圧法の最適化を進めた。次に心疾患モデルマウスを作製し、病態心臓への吸引圧法の適用を行った。

C-3-1. 導入遺伝子発現量に対する最小到達圧力の影響 (心臓)

まず、心臓への吸引圧法において、発現量に対する最小到達圧力の影響を調べた。その結果、最小到達圧力が小さいほど、大きな発現量が得られ、 -75 kPa以上では、その値がほぼ一定となることが分かった (図30)。

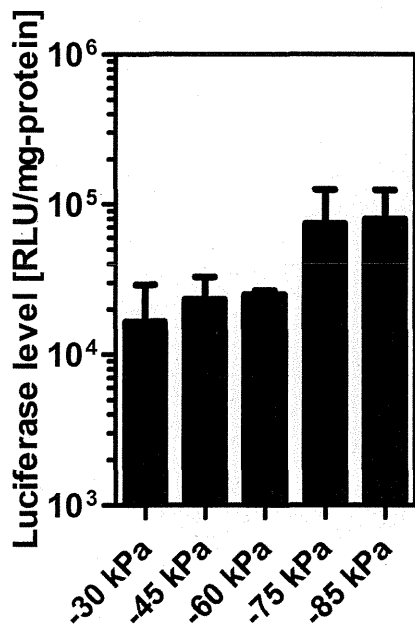


図 30 心臓の吸引圧法における最小到達圧力の影響

C-3-2. 導入遺伝子発現量に対する吸引圧波形の影響 (心臓)

初年度に開発した吸引圧制御システムを用いて、心臓への吸引圧法における吸引波形の影響を調べた。ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNAを用いて、2種類の波形の影響を調べた (1-3-1、1-1-1)。最少到達圧力は -75 kPaとした。その結果、検討した2条件では、発現量が変わらなかった (図31)。

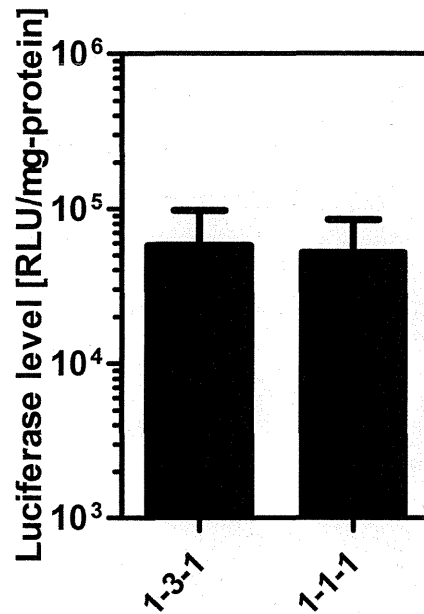


図 31 心筋梗塞モデルマウス心臓に対する吸引圧法

C-3-3. 心臓への吸引圧法における臓器特異性の検証

次に心臓への吸引圧法を行ったの臓器特異性を調べた。心臓への吸引圧法を行い、その6時間後に、心臓、肺、脾臓、腎臓、肝臓におけるルシフェラーゼ発現量を調べた。

結果を図32に示す。心臓においてのみ高いルシフェラーゼ発現量が得られた。これまでに吸引圧法の適用が可能であることが明らかになっている、脾臓、腎臓、肝臓においてはルシフェラーゼ発現がほぼ見られなかった。しかしながら、肺でわずかなルシフェラーゼ発現が検出された。

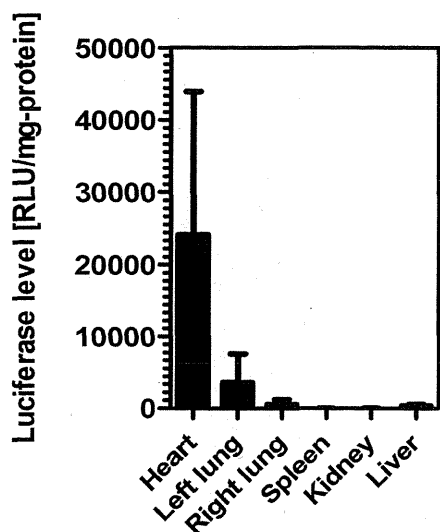


図 32 心臓の吸引圧法における臓器特異性の検討

C-3-4. 吸引圧法による心臓への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33)。

C-3-5. 吸引圧法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。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。

健常マウスの心臓に吸引圧法を適用し、10日後の心機能を調べた。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、左室拡張末期径、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。

さらに我々は、長期的な心機能への影響を調べた(表2)。吸引圧法を行い、3か月後での心機能を調べた。Tail cuff法により、収縮期血圧、心拍数を測定した。また超音波法を用いて、左室拡張末期径、左室収縮末期径、内径短縮率、壁厚、心拍数を測定した。その結果、いずれの測定項目においても、いずれの群間に有意な差は観察されなかった。このことより、心臓の吸引圧法は短期的にも長期的にも心機能に影響を与えないことが分かった。

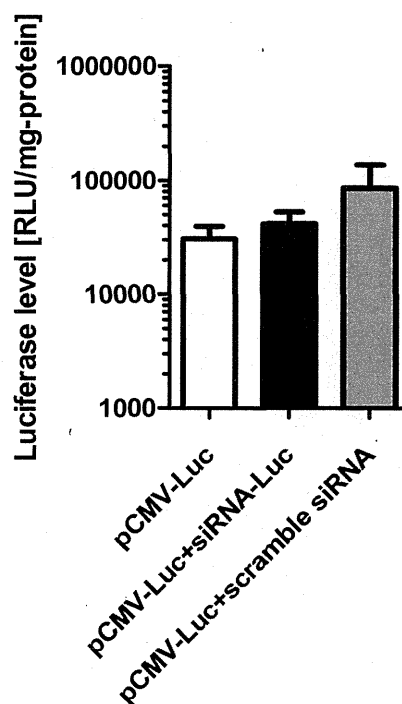


図 33 マウス心臓へのsiRNA導入の検討

C-3-6. 心疾患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。そこで心筋梗塞モデルマウスの作製を行った。梗塞作製後、3日目の心臓の断面は図34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。