

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25年度 総括・分担研究報告書

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-----1
清水一憲

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-----10
川上茂

2．吸引圧法の心臓疾患治療への応用に関する研究-----16
木下秀之

III．研究成果の刊行に関する一覧表 -----18

IV．研究成果の刊行物・別刷 -----19

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 大阪大学大学院基礎工学研究科 助教

本研究の目的は、吸引圧法を腎・心疾患治療への応用へと展開することである。本年度は、初年度に開発した吸引圧制御システムを用いて、吸引圧法の基本的特性を明らかにした。肝臓に対して、様々な条件で吸引圧法を行い、特に肝障害性について詳細に検討した。さらに吸引デバイスの形状を変えて吸引圧法を行い、吸引圧法では組織変形量が重要であることを明らかにした。また心臓への吸引圧法の最適化を進めた。圧力波形や最少到達圧力の違いによる、核酸導入量の違いを調べた。さらに心疾患モデルマウスの心臓に対して、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

本年度（2年目）は、吸引圧法の最適化をさらに進めるとともに、分担者と協力し、疾患モデル動物の治療へと研究展開することを目的とした。

まず、吸引圧法の基本的特性を明らかにするために、肝臓を対象とした吸引圧法を行った。特に、吸引圧法の肝障害性への影響を詳細に検討した。また心臓に対する吸引圧法の最適化を進め、波形や最少到達圧力の影響を調べた。さらに疾患モデルマウスの心臓に対して吸引圧法を行った。

B. 研究方法

B-1. 吸引デバイスの製作

吸引デバイスは三次元プリンターを用いて作製した型を鋳型として、ポリジ

メチルシロキサン（PDMS）を成型することで作製した。三次元プリンターで作製した型は、PDMSを硬化させるため、その表面に厚さ10 μmのパリレンを蒸着した後に使用した。

B-2. 肝臓への吸引圧法

マウス（ICR、雌、4週齢）に麻酔を行い、開腹し、肝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100 μg含む生理食塩水を200 μl投与し、その直後に、肝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、マウスを安楽死させて肝臓を取り出し、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。

肝臓に対して用いた吸引デバイスの基本形状は、内径3 mm、外径5 mm、高さ3 mmである。

B-3. 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-4. 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-5. 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 μ l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-6. 心筋梗塞モデルの作製と吸引圧法

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。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。

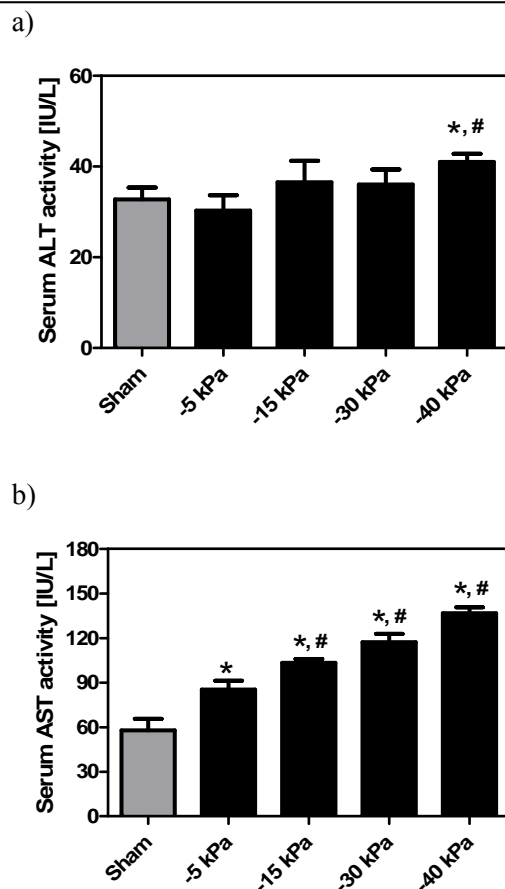


図 1 最少到達圧力の大きさが肝障害性に与える影響

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. 研究結果

C-1. 肝障害性に対する最少到達圧力の影響

初年度に吸引圧制御システムを開発し、肝臓への吸引圧法を実施することで、最少到達圧力が導入プラスミドDNAの発現量に影響することを見出した。そこで本年度は、まず、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1a)。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1b)。しかし図2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。

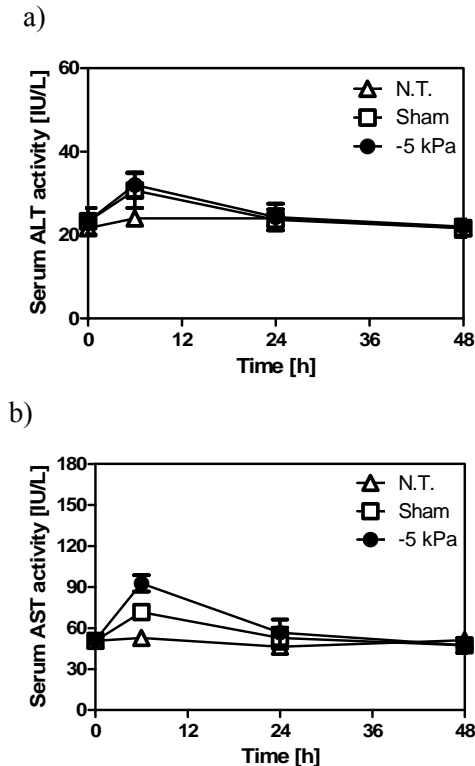


図 2 肝臓への吸引圧法による肝障害性の経時変化

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-2. 肝障害性に対する吸引デバイスの硬さの影響

次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であり、20:1をsoft、10:1をhardとした。吸引圧制御システムを用いて、肝臓への吸引圧法を、それぞれのデバイスで行い、6時間後にALTとAST値を測定した。その結果、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3)。

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。

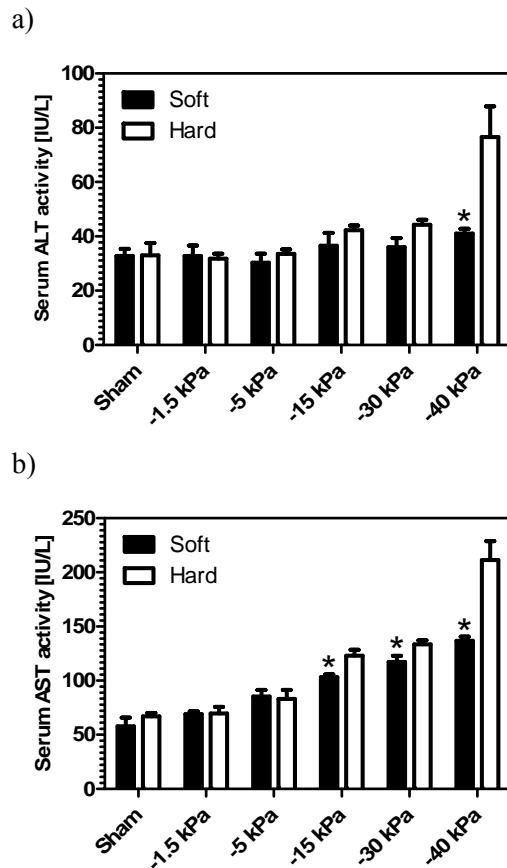


図 3 吸引デバイスの硬さと肝障害性の関係

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-3. 吸引圧法における導入核酸の発現量と組織変形量の関係

前年度の研究から、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することが明らかになっていた。しかしながら、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ことなると考えた。まず、最少到達圧力を変化させた時の組織変

形量を調べたところ、-3 kPaと-5 kPaの間に違いがあることが明らかになった（図4）。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5a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5b）。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5c）。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。

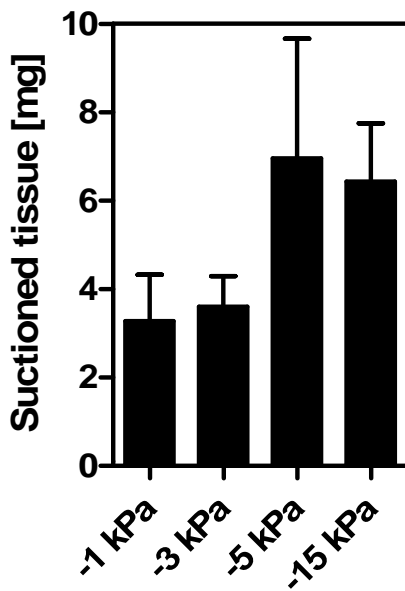


図 4 最少到達圧力と組織変形量の関係

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。

C-4. 複数の吸引口を持つ吸引デバイスの開発とその効果

続いて、吸引圧法による疾患モデル動物

治療に向けた検討を行った。まずは肝臓を対象とした。初めに、肝臓あたりの核酸導入量を増加させるために、吸引デバイスの改良を行った。

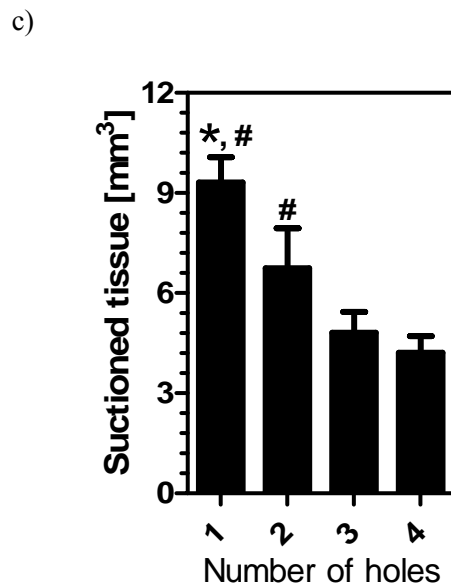
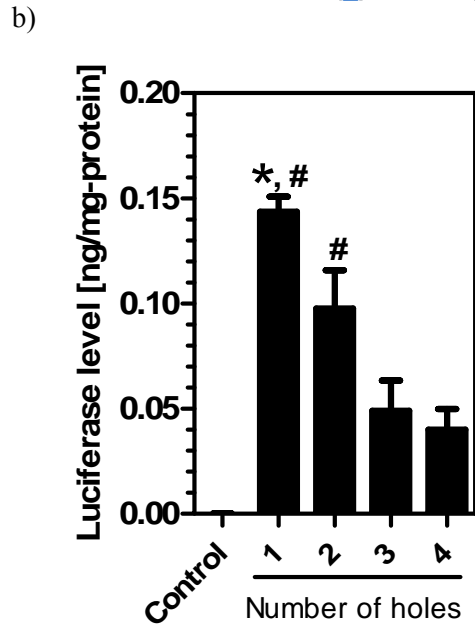
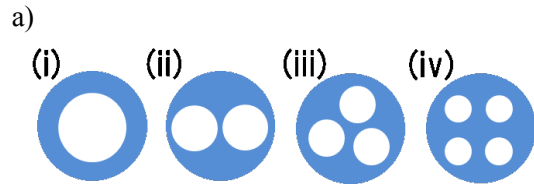


図 5 吸引圧法における導入核酸発現量と組織変形量の関係

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。

図6a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6bに示す。その結果、想定した通り、吸引口の数が最も多い、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ALT値、AST値を調べたところ、吸引口が多くなるに従い、それらの値が大きくなる傾向が観察された（図7）。しかしながら、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8）。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。

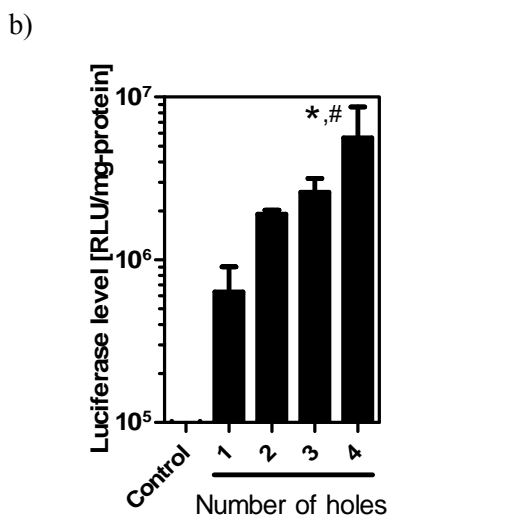
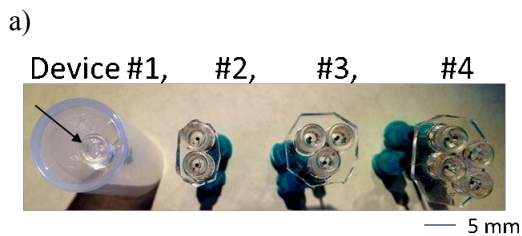


図 6 複数の吸引口をもつデバイスの開発とそれを用いた吸引圧法

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。

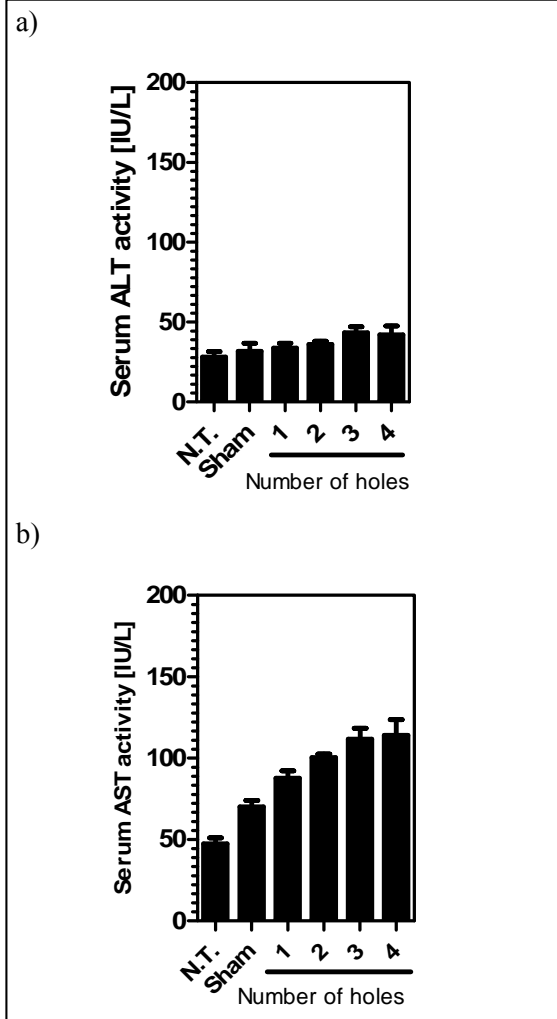


図 7 複数の吸引口をもつデバイスを用いた吸引圧法による肝障害性

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。

C-5. 肝臓への吸引圧法により核酸導入される細胞種の検討

どの細胞種に対して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。そこで、肝臓を対象に吸引圧法を行い、どの細胞種に核酸が導入されるのかを調べた。

その結果、細胞一個当たりの発現量が実質細胞において有意に高いことが分かった（約13.7倍）（図9）。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示唆された。

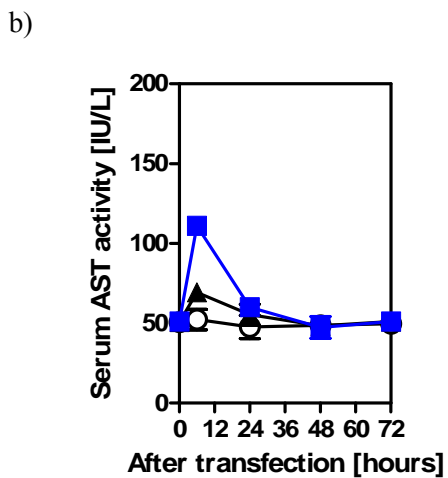
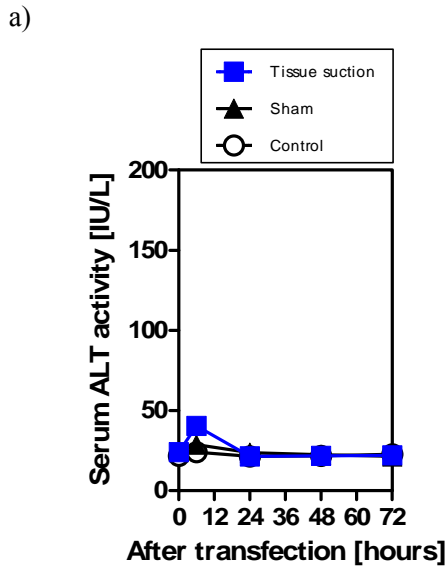


図 8 複数の吸引口をもつデバイスを用いた吸引圧法による肝障害性の経時変化

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-6. 心臓への吸引圧法の最適化：吸引波形の影響

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、発現量が変化らなかった (図10)。

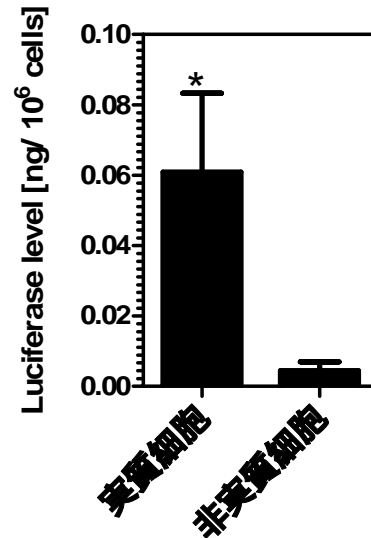


図 9 核酸導入される細胞種の検討

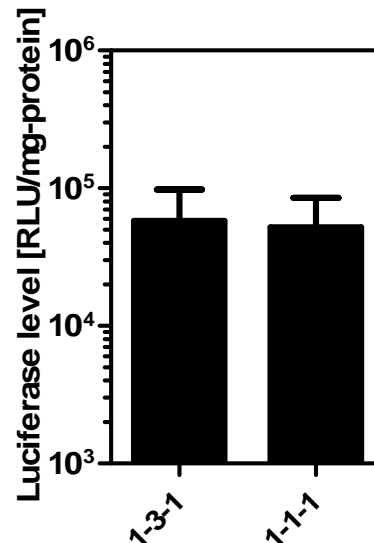


図 10 心臓への吸引圧法における圧力波形の発現量への影響

C-7. 心臓への吸引圧法の最適化：最少到達圧力の影響

次に心臓への吸引圧法において、発現量に対する最少到達圧力の影響を調べた。その結果、最少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11)。

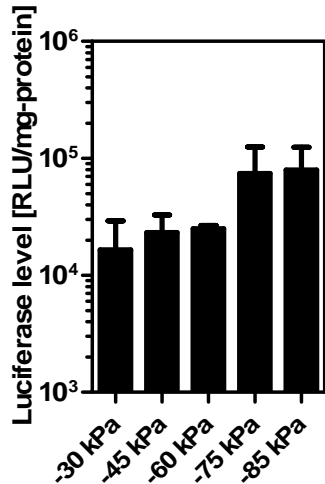


図 11 心臓の吸引圧法における最少到達圧力の影響

C-8. 心臓への吸引圧法の最適化：臓器特異性の検討

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12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。

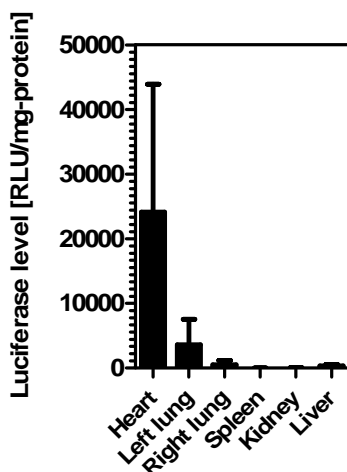


図 12 心臓の吸引圧法における臓器特異性の検討

吸引圧法の波形は、0.5-1-1で行った。

C-9. 心筋梗塞モデルマウスの心臓への吸引圧法

最後に、心筋梗塞モデルマウスの心臓に対して、吸引圧法を行い、梗塞部位周辺への核酸導入が可能であるかどうかを調べた。ルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを投与後、心筋梗塞モデルマウスの心臓の虚血部位を吸引デバイスで吸引した。その結果、ルシフェラーゼ発現量は、健常マウスを用いた場合と同等であった。このことから、吸引圧法は虚血部位を持つ心臓へも適用可能であることが明らかになった。

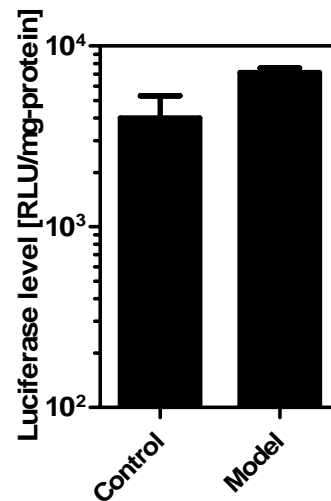


図 13 心筋梗塞モデルマウス心臓に対する吸引圧法

D. 考察

本研究では、初年度に完成させ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、吸引圧法の基礎的な特性を明らかにした。初年度に、最少到達圧力が-5 kPaで十分な導入核酸発現量が得られることが明らかになっていたことから、本年度は同条件での肝障害性に対する検討も進め、-5 kPaでの肝組織吸引は深刻な肝障害性を与えないことをALT値、AST値の測定から明らかにした。また複数の吸引口を持つデバイスを製作し、同様に肝障害性を調べたが、いずれも-5 kPaの最小到達圧力において、深刻な肝障害性を与えなかった。このことから、

肝臓への吸引圧法は基本的に安全な手法であると考えられる。

最少到達圧力が導入核酸発現量の違いを生む大きな原因であることは明らかになったが、これが何に起因するのか、明らかになっていなかった。我々は、最少到達圧力が異なると、組織変形量が違うことに注目し実験を進めた。吸引口の面積は同じであるが、吸引口の数異なるデバイスを作製して、それらを用いて同じ最少到達圧力で吸引圧法を行った。その結果、発現量の変化と組織変形量の変化に相関があることが明らかになった。このように我々は、吸引圧法において、組織変形が重要な因子であることを初めて示した。

またデバイスの硬さや形状を変化させることで、対象臓器に対して最適な吸引デバイスを開発可能なことを明らかにした。本研究では、2種の硬さの違うデバイスを用いたが、さらに硬さの違うデバイスを用いることで、それぞれの臓器に対して最適な硬さのデバイスを開発することができると思われる。

さらに本研究では、心臓への吸引圧法の最適化ならびに心疾患モデルマウスの治療への展開を進めた。心筋梗塞モデルの心臓への吸引圧法では、梗塞部位を中心に吸引したが、健常マウスの心臓への吸引圧法と同レベルの核酸導入量が得られ、疾患治療応用への可能性が見いだされた。

心臓への吸引圧法の際の臓器特異性を調べたところ、肺でわずかにルシフェラーゼ発現が確認された。左肺での発現量が右肺よりも大きいことから、心臓への吸引圧法を行う際に、意図せず、左肺を変形させてしまっていることが、非特異的な発現の原因であると考えられる。今後、心疾患の治療を考えた際は、心臓特異的に核酸導入するために手技の改良が必要である可能性がある。一方で、これまでに肺に吸引圧法が適用可能であることは報告されておらず、本研究により、吸引圧法の新たな適用可能臓器が見いだされた。

E. 結論

本年度は、マウス肝臓を対象に吸引圧法を行い、吸引圧法の特性を明らかに

した。また吸引圧法の安全性を肝臓を対象に調べ、最適条件での吸引圧法は肝臓に深刻な障害を与えないことを明らかにした。また吸引圧法では組織変形が重要因子であることを明らかにした。心臓への吸引圧法の最適化も進め、発現量を最大とする最少到達圧力を見出した(-75 kPa)。さらに心筋梗塞モデルマウスの心臓に対しても吸引圧法が適用可能であることを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Zhang, G., Kawakami, S., Taniguchi, Y., Hayashi, K., Hashida, M., Konishi, S. *Liver suction-mediated transfection in mice using a pressure-controlled computer system.* Biological Pharmaceutical Bulletin, 37(4): 569-575 (2014)
Highlighted paper selected by Editor-in-Chief

学会発表

谷口陽太、川上茂、林昂司、清水一憲、小西聡、山下富義、橋田充：腎臓への吸引圧核酸導入法における吸引圧条件の最適化、遺伝子/デリバリー研究会 第13回シンポジウム、帝京大学、日本、2013年5月11日（土）

張光元、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：Hepatic suction-based site-specific transfection in mice : improving naked plasmid DNA transfer to the liver by optimization of suction conditions and device softness、日本薬学会 第28年会、愛知県産業労働センター、日本、2013年5月25日（土）

清水一憲、川上茂、張光元、谷口陽太、林昂司、木下秀之、桑原宏一郎、中尾一和、橋田充、小西聡：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法における吸引圧波形の検討、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、日本、2013年9月20日（金）

清水一憲、張光元、谷口陽太、小西聡、川上茂、橋田充：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法による疾患治療、化学工学会第79回年会、岐阜大学、日本、2014年3月18日（火）

依頼講演など

Kazunori Shimizu : Tissue Pressure-Mediated Delivery of Nucleic Acid-Based Drugs Using MEMS Devices、The 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC'13)、Osaka International Convention Center、Japan、2013年7月5日（金）、口頭

清水一憲：In vivo遺伝子・核酸デリバリーのためのMEMSデバイスの開発、医療情報解析学セミナー、長崎大学、日本、2013年8月19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

欧州出願：11835898.5

（出願日2013年5月21日）

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）
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 長崎大学大学院医歯薬総合研究科 教授

本研究の目的は、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である。本年度は、まず腎疾患モデルラットへの吸引圧法の適用を検討した。次に、腎臓への吸引圧法による核酸医薬品であるオリゴ核酸の導入を行ったが、有効な結果を得られなかった。速やかに腎疾患治療へと研究を展開するため、遺伝子治療薬を用いる方針とし、hBMP7タンパク質を発現するプラスミドDNAの構築及び、吸引圧法による腎臓への導入を行った。

A. 研究目的

本年度（2年目）は、腎疾患モデルラット腎臓への吸引圧法の適用を試みた。また吸引圧法による健常マウス腎臓へのオリゴ核酸導入を検討した。さらに治療用タンパク質を発現するプラスミドDNAを構築し、それをを用いて健常マウス腎臓に対して、吸引圧法を適用した。

B. 研究方法

B-1. 腎疾患モデルラットの作製

ラット（Wister/ST、雌、7週齢）深麻酔下において正中線を切開、開腹し、左輸尿管を露出させた。縫合糸を用いて2か所結紮し、結紮した箇所を切断することで片側尿管結紮（UUO）モデルを作製した。

B-2. 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-3. 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'-TCTCTGCGACTTCAACA -3' (forward)、5'-GCTGTAGCCGTATTCATTGT -3' (reverse)、β-actin: 5'-GTTCTACAAATGTGGCTGAGGACT T-3' (forward)、5'-TTGGGAGGGTGAGGGACTT-3' (reverse)

B-4. hBMP7発現プラスミドDNAの構築

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。

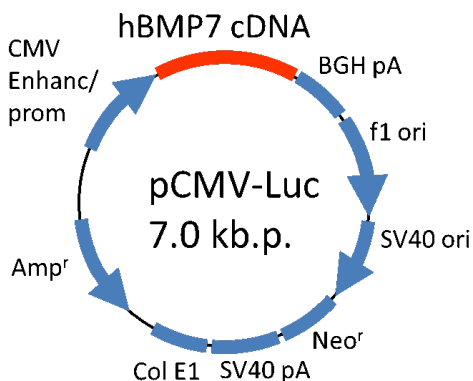


図1 構築したhBMP7発現プラスミドDNA

B-5. hBMP7タンパク質量測定 (in vitro, in vivo)

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、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-6. リアルタイムRT-PCRによるhBMP7遺伝子の発現量測定

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'-CCGGGAACGCTTCGACAATG -3' (forward)、5'-CAGAGGGTACGGCTGTTCGAG -3' (reverse)

B-7. 腎臓への押圧法

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。尾静脈からCMVプロモーター制御下でhBMP7を発現するプラスミドDNAを100 µg含む生理食塩水を200 µl投与し、その直後に、過去に研究室で報告している圧力制御デバイスを用いて腎臓にデバイスを接触させ、0.5 N/cm²の圧力で押圧した。ただちに閉腹し、6時間経過後、マウスを安楽死させて腎臓を摘出し、標的部位のhBMP7の発現量をELISA並びにリアルタイムRT-PCRにより定量した。

（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. UUOモデルラットの作製と吸引圧法

我々は初年度にUUOモデルマウスを作製し、病態腎臓に対して、押圧法によりプラスミドDNAを導入できることを示した。本年度は、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。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。

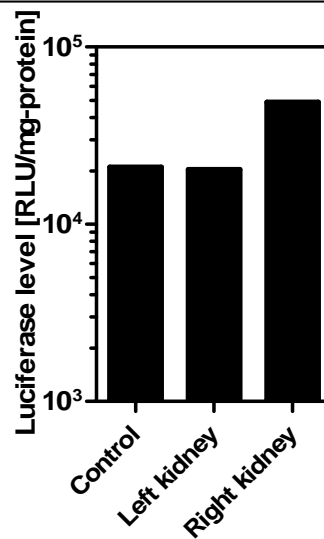


図2 UUOモデルラット腎臓に対する吸引圧法

C-2. マウス腎臓へのオリゴ核酸導入の検討

次に健常マウスを用いて、オリゴ核酸の導入を検討した。まず初めに、外因性遺伝子の発現抑制を行った。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-3. hBMP7発現プラスミドDNAの構築

上述したように、腎臓への吸引圧法により核酸医薬品（siRNA）による遺伝子発現抑制効果を得られなかった。この

ことから、速やかに腎臓に対する疾患治療へと研究を展開するために、遺伝子治療薬であるプラスミドDNAを用いることを選択し、検討を進めた。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。

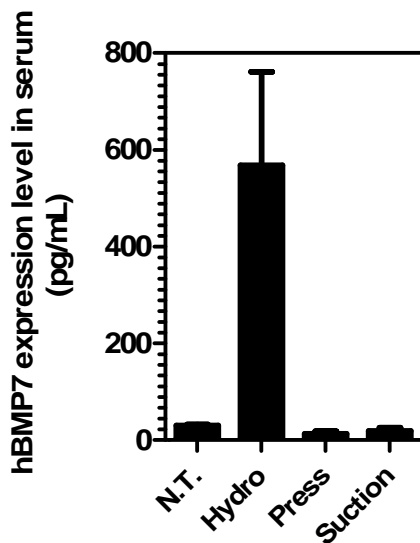


図3 腎臓への吸引圧法を行ったマウス血清中のhBMP7量測定

C-4. hBMP7発現プラスミドDNAを用いた腎臓への吸引圧法

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。このことから、押圧法や吸引圧法では、

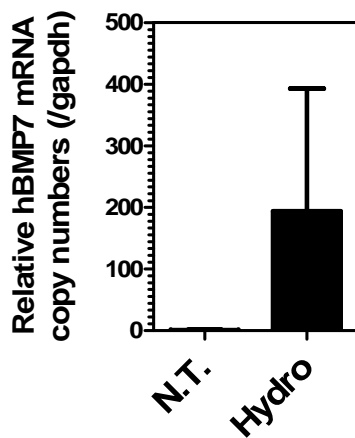
hBMP7発現プラスミドDNAが腎臓細胞に導入されない、あるいは導入されても発現しない可能性があると考え、押圧、吸引圧法を行った腎臓あたりのhBMP7遺伝子発現量を調べる実験を行った。その結果、ポジティブコントロールとして用いたハイドロダイナミクス法でプラスミドDNAを導入した肝臓では、無処置マウスの肝臓に比べて、194倍のhBMP7が発現していることが分かった。また腎臓への押圧法、吸引圧法を行った群では、それぞれ69倍、26倍のhBMP7遺伝子の発現が観察された。これらの結果から、hBMP7発現プラスミドDNAは、押圧法、吸引圧法を用いて健常マウスの腎臓に導入することが可能であることがわかっ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

D. 考察

初年度に、UUOモデルマウスを作製し、UUOモデルマウスの腎臓に対して吸引圧法を適用出来る可能性を示した。そこで本研究では、UUOモデルラットを作製し、病態腎臓に対して、吸引圧法が適用可能であることを示した。これにより、吸引圧法による難治性腎疾患治療実現の可能性が示唆された。本研究では、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しようと試みたが、有効な結果が得られなかった。その理由は不明であり、今後の検討課題である。このため核酸医薬品による腎疾患治療は困難であると思われた。そこで、遺伝子治療薬を用いた腎疾患治療を行うという研究方針に切り替え、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。本研究では、実際にhBMP7発現プラスミドDNAを構築し、健常マウスの腎臓に

において、hBMP7の遺伝子発現が増大していることを明らかにした。一方、ELISA法を用いたタンパク質量測定では、発現の向上は検出されなかったが、これは、発現したhBMP7タンパク質の絶対量が少ないため、血清中に分泌されてしまうと濃度が薄まり、ELISAの検出感度を下回ったと考えられる。今後は、吸引箇所を増やし、腎臓あたりの発現量を向上させることで、タンパク質レベルでの発現向上が確認できると思われる。今後、腎疾患モデルマウスの腎臓に対して、構築したhBMP7発現プラスミドDNAを導入することで、難治性腎疾患モデルの治療の実現が期待される。

a)



b)

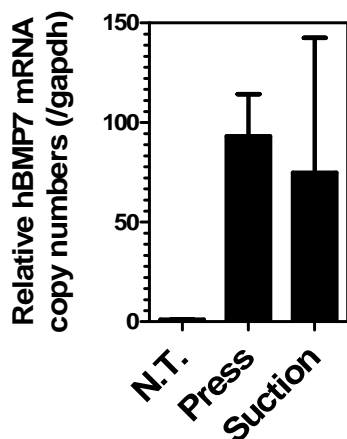


図4 腎臓への吸引圧法を行ったマウス腎臓におけるhBMP7遺伝子発現量の変化

ハイドロダイナミクス法(a)、押圧法と吸引圧法(b)

E. 結論

本年度は、腎疾患モデル動物の病態腎臓に対して吸引圧法が適用可能であることを示した。また治療用タンパク質遺伝子をマウス腎臓で高発現させることに成功した。このことから吸引圧法による腎疾患モデル動物の治療応用の可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

Shimizu, K., Zhang, G., Kawakami, S., Taniguchi, Y., Hayashi, K., Hashida, M., Konishi, S. *Liver suction-mediated transfection in mice using a pressure-controlled computer system.* Biological Pharmaceutical Bulletin, 37(4): 569-575 (2014)
Highlighted paper selected by Editor-in-Chief

学会発表

谷口陽太、川上茂、林昂司、清水一憲、小西聡、山下富義、橋田充：腎臓への吸引圧核酸導入法における吸引圧条件の最適化、遺伝子/デリバリー研究会 第13回シンポジウム、帝京大学、日本、2013年5月11日(土)

張光元、清水一憲、川上茂、小西聡、橋田充：Hepatic suction-based site-specific transfection in mice : improving naked plasmid DNA transfer to the liver by optimization of suction conditions and device softness、日本薬剤学会 第28年会、愛知県産業労働センター、日本、2013年5月25日(土)

清水一憲、川上茂、張光元、谷口陽太、林昂司、木下秀之、桑原宏一郎、中尾一和、橋田充、小西聡：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法における吸引圧波形の検討、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、日本、2013年9月20日(金)

清水一憲、張光元、谷口陽太、小西聡、

川上茂、橋田充：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法による疾患治療、化学工学会第79回年会、岐阜大学、日本、2014年3月18日（火）

依頼講演など
なし

著書
なし

A. 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

欧州出願：11835898.5
（出願日2013年5月21日）

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）
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

研究分担者 木下 秀之 京都大学医学部附属病院 医員

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ている。本年度（最終年度）は心疾患治療のため、心筋梗塞モデルマウスへの吸引圧法を行った。また吸引圧法が健常マウスの心機能に与える影響を長期的な観点で調べた。その結果、心筋梗塞モデルマウスの心臓に吸引圧法が適用可能であった。また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明らかとなった。

A. 研究目的

本年度は、吸引圧法による心疾患治療の実現に向けて、次の2点を実施することを目的とした。一つ目は、心筋梗塞モデルマウスの心臓に対して、吸引圧法が適用可能であるかどうかを明らかにすることである。二つ目は、心臓への吸引圧法が長期的な観点で心機能に与える影響の有無を健常マウスを用いて明らかにすることである。

B. 研究方法

B-1. 心臓への吸引圧法

麻酔下のマウスの呼吸を人工呼吸器で管理し、開胸した。マウス尾静脈からルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを100 µg含む生理食塩水200 µlを投与した。直後に、吸引デバイスを目的部位に軽く接触させ、吸引圧制御システムを作動させた。

B-2. Tail-cuff法

Tail-cuff法を用いて、マウスの収縮期血圧を測定した。用いた装置は、無加温型非観血式血圧計（室町機械株式会社）である。

B-3. 心臓超音波法

マウス左室機能評価を心臓超音波検査

により行った。測定した項目は、左室拡張末期径、左室収縮末期径、内径短縮率、壁厚、心拍数である。

B-4. 心筋梗塞モデルマウスの作製

まず挿管し、人工呼吸器を装着した。左第4番肋骨と第5番肋骨の間から開胸し、前下行枝を結紮した。結紮には7-0縫合糸を用いた。

（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. 心筋梗塞モデルマウスへの吸引圧法

心筋梗塞モデルマウスを作製し、研究代表者らとともに、心臓に対して吸引圧法を行った（結果は総括研究報告書に記した）。

C-2. 吸引による心機能への影響

初年度に、心臓を吸引して約10日前後での心機能への影響を調べた。Tail cuff法、超音波検査法を行ったが、無処置群、シャムオペ群、吸引群のいずれの群間でも有意差は見られなかった。そこで、本年度は、長期的な心機能への影響を調べた。吸引圧法を行い、3か月後での心機能を、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、心臓の吸引圧法は心機能に影響を与えないことが分かった。

表1 心機能への影響（3か月後）

		コントロール群	sham手術群	吸引群
tail-cuff法	収縮期血圧 (mmHg)	99.7 ± 3.1	101.5 ± 2.9	101.5 ± 2.0
	心拍数 (/min)	623.7 ± 24.1	600.5 ± 24.1	627.0 ± 20.8
心臓超音波検査	左室拡張末期径 (mm)	2.98 ± 0.14	3.06 ± 0.13	2.95 ± 0.11
	左室収縮末期径 (mm)	1.54 ± 0.14	1.49 ± 0.17	1.37 ± 0.11
	内径短縮率 (%)	48.5 ± 2.2	51.9 ± 3.9	53.9 ± 2.3
	壁厚 (mm)	0.90 ± 0.01	0.88 ± 0.01	0.89 ± 0.02
	心拍数 (/min)	744.4 ± 10.1	711.3 ± 23.0	707.2 ± 32.5

D. 考察

本研究では、心筋梗塞モデルマウスを作製し、その心臓に対して吸引圧法を行い、ルシフェラーゼ発現プラスミドDNAを、梗塞部位あるいはその周辺に導入することに成功した。心筋梗塞モデルマウスに対して、吸引圧法を適用したのは初めてであり、本手法による心筋梗塞モデル治療の可能性を示すことができた。

また本研究では、マウス心臓への吸引圧法が心機能に与える影響を、心臓を吸引してから3か月後のマウスを用い

て調べた。初年度に、心臓を吸引してから約10日後の健常マウスの心機能を調べ、吸引が心機能に影響を与えないことを明らかにしていた。本年度の結果から、3か月後のマウスにおいても心機能に影響がみられなかったことから、マウス心臓を吸引することは、心機能に大きな影響を与えないということが示唆された。

E. 結論

本研究により、心筋梗塞モデルマウスの治療に吸引圧法が有効である可能性が示された。また、心臓への吸引圧法は安全な手法であることが示唆された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

清水一憲、川上茂、張光元、谷口陽太、林昂司、木下秀之、桑原宏一郎、中尾一和、橋田充、小西聡：吸引圧を利用したin vivo核酸導入法における吸引圧波形の検討、第65回日本生物工学会大会、広島国際会議場、日本、2013年9月20日（金）

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., Zhang, G., Kawakami, S., Taniguchi, Y., Hayashi, K., Hashida, M., Konishi, S.	<i>Liver suction-mediated transfection in mice using a pressure-controlled computer system.</i>	Biological Pharmaceutical Bulletin	37(4)	569-575	2014