

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700566
 研究課題名(和文) ジスルフィド交換反応を用いた新規刺激応答性表面の調製と遺伝子導入への応用
 研究課題名(英文) Preparation of stimuli-responsive surfaces that release cationic polymer triggered by thiol-disulfide exchange for gene introduction
 研究代表者
 秋元 文(AKIMOTO AYA)
 東京大学・大学院工学系研究科・助教
 研究者番号：10585805

研究成果の概要(和文)：

経済的かつ細胞毒性の低い遺伝子導入技術、リバーストランスフェクション法に用いるための新規機能性表面を開発した。具体的には、細胞に対して毒性を与えない濃度のシステインを含む水溶液に浸漬する事で、カチオン性高分子を培地中に徐放させる機能性細胞培養表面の調製を行った。調製した表面には 293T 細胞が良好に接着し、細胞毒性を示さないことから、今後さらなる検討を行う事で、遺伝子導入への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：

In this study, we aimed to improve the efficiency of reverse transfection, one of the economic and low cytotoxic gene introduction methods, by preparing novel stimuli-responsive polycation releasing surface. Polycation release was examined by using cysteine as stimuli. As a result, polycation was released from the surface by applying cysteine containing aqueous solution which was nontoxic to cells. Moreover, 293T cells were well adhered to the surface and surface showed any cytotoxic activities. This functional surface would be potentially useful as experimental platform for gene introduction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞への遺伝子導入技術は、バイオ分野の基礎研究、医療への応用の両観点から非常に重要な基盤技術である。この中でも、リバーストランスフェクションという機能性表面を用いた技術は、経済的かつ細胞毒性が低い手法として有用である。

(2) しかし、現状のリバーストランスフェクションは、一般的に遺伝子導入率が低く、遺伝子導入法として一般化しているとは言

ない。多くの既報において、リバーストランスフェクションの効率上昇のためには、機能性表面からのカチオン性高分子/DNA 複合体のコントロールリリースが鍵になる事が示唆されている。具体的には、遺伝子導入時の DNA リリースが速すぎると DNA の分解・凝集が引き起こされるために、適切な DNA 速度が存在するという議論などが存在し、遺伝子導入時には適切な DNA 量は細胞種によって異なる点からも、複合体リリースの時間的制御は重要であると考えられる。

(3) これまでに報告されている複合体リリースの時間的制御の試みに関する報告は、僅かに一報のみである。また、この既報は電気刺激を用いて複合体リリースを行うためにシステムが煩雑であることから、簡便なシステムの構築が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、生体分子であるシステインにตอบสนองしてカチオン性高分子が表面からコントロールリリースされるシステムを新たに設計する事で、高効率かつ簡便な使用が期待できる新規リバーストランスフェクション用表面の調製を行った。

3. 研究の方法

(1) 新規システイン応答性表面の調製

ガラス基板にジスルフィド結合を介してカチオン性高分子を修飾した。表面修飾は、X線光電子分光(XPS)による元素分析や表面ゼータ電位測定により確認した。

(2) リバーストランスフェクションへの応用に関する検討

調製した表面を、種々の濃度のシステイン含有水溶液に浸漬させ、ジスルフィド交換反応によるカチオン性高分子のリリースを行った。表面物性変化は表面ゼータ電位測定により評価した。また、表面の細胞接着性やシステインの細胞毒性も併せて評価を行った。

4. 研究成果

(1) シランカップリング反応によりチオール基を導入したカバーガラス表面と、*N*-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)

propionate (SPDP)によってピリジルジスルフィド基を導入したポリエチレンイミン(PEI)を反応させ、PEIを表面修飾した。SPDPの仕込み濃度条件を変化させることでPEIへのピリジルジスルフィド基の導入量を種々変化させ、ジスルフィド結合の結合点の数が異なる3種類の表面を調製した(SN-PEI_x)(サンプル名のxはSPDPの仕込み濃度(μM)を示す)(図1)。調製したPEI-ガラス表面は、XPSおよび表面ゼータ電位の測定結果より、ジスルフィド結合を介してPEIが修飾されていることを確認した(表1, 2)。

表1 XPS測定による元素分析

サンプル	元素組成 (%)			
	C	N	S	Si
未処理	9.4	ND	ND	27.8
シラン処理後	21.8	2.2	0.95	24.4
SN-PEI ₅₀	27.8	4.0	1.19	23.1

表2 表面ゼータ電位

サンプル	ゼータ電位 (mV)
未処理	-42.2 ± 4.6
シラン処理後	-19.2 ± 6.0
SN-PEI ₂₅	-2.3 ± 1.8
SN-PEI ₅₀	10.7 ± 2.6
SN-PEI ₂₅₀	12.9 ± 0.9

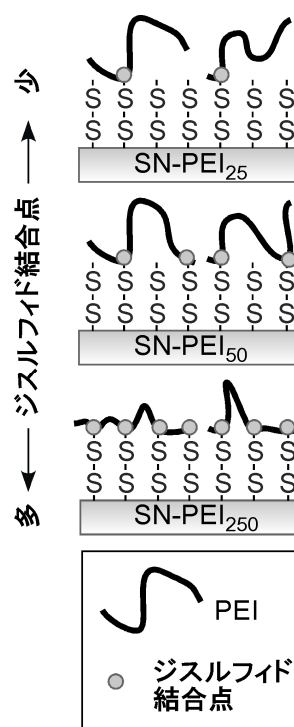


図1 調製した表面の概念図

(2) SN-PEI_xを0, 0.4, 1, 5 mmol/LのCys含有リン酸緩衝液(pH 7.4, 200 mmol/L)にそれぞれ25°Cで24時間浸漬した後、表面ゼータ電位を測定すると、暴露していたCys濃度に応答して値が変化することがわかった。SN-PEI₅₀とSN-PEI₂₅の場合、0-0.4 mmol/LのCys暴露ではPEIがほとんどリリースされないため、シランカップリング反応処理のみの表面(-19.2 mV)と比較して約20 mV以上高い値を示したが、1-5 mmol/LとCys濃度が高くなるにしたがってPEIがリリースされてゼータ電位の値は0-0.4 mmol/LのCys暴露の場合よりも2-7 mV程度低くなる傾向が示された(図2)。一方、ジスルフィド結合の結合点が多いと考えられるSN-PEI₂₅₀ではCys濃度が1 mmol/L以上でも表面ゼータ電位の値はほとんど変化がなく、PEIのリリースは起こらなかった

と考えられる。すなわち、PEI リリースは、PEI に導入するピリジジルスルフィド基の量

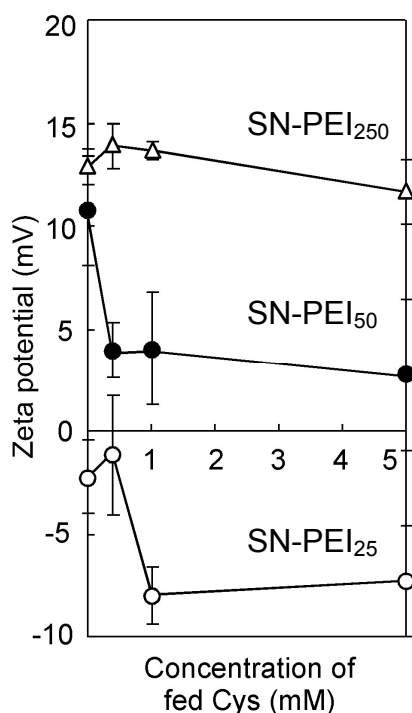


図2 暴露 Cys 濃度に対する表面ゼータ電位変化

を変えることによっても制御することができたと言える(図2)。

さらに PEI-ガラス表面上に DNA を吸着させ、その上で 293T 細胞を培養したところ、DNA-PEI-ガラス表面はポリスチレン製細胞培養皿と同様に 293T 細胞を接着させることが明らかになった(図3)。

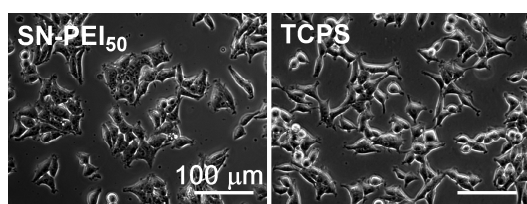


図3 37 °C で 24 h 培養後の表面への 293T 細胞の接着

293T 細胞を用いて Cys の細胞毒性評価を行った結果、0-5 mmol/L までの濃度では細胞生存率が 83-117%であることも確認した(図4)。以上より、細胞に毒性を与えない量の Cys を培地に添加することで、PEI をコントロールリリースする細胞培養表面を調製できたと考えられる。

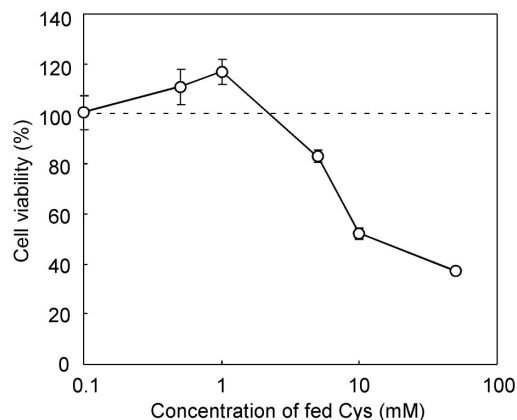


図4 濃度に依存した Cys の 293T 細胞に対する毒性

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Aya Mizutani Akimoto*, Tohru Takarada, Mizuo Maeda, "Preparation of cell-culturing glass surfaces that release branched polyethyleneimine triggered by thiol-disulfide exchange", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 103, 360-365 (2013). 査読あり
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.10.031>

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋元 文 (AKIMOTO AYA)
東京大学・大学院工学系研究科・助教
研究者番号：10585805