

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650281

研究課題名(和文)核内事象を制御する四元遺伝子複合体の創製による細胞分化誘導

研究課題名(英文)Cell Differentiation by DNA Quaternary Complex to Nucleus Event

研究代表者

朝山 章一郎(Asayama, Shoichiro)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：90315755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重らせん溝へのアルキル鎖の巻き付きによる新しい核酸修飾法を昇華させ、「DNAモノイオンコンプレックス」の新概念を提唱した。モノイオンコンプレックスをマウスの脛骨筋へ局所投与すると、臨床応用されているnaked DNA及び一般的なin vivo 遺伝子導入試薬であるjet PEIと比較し、有意に高い遺伝子発現効率を示した。

本研究成果である分裂能の低いマウス脛骨筋への遺伝子導入の成功は、核膜が保存されている細胞へ外来遺伝子が導入可能なことを示している。従って、核内事象制御のためのツールの獲得に成功し、非分裂細胞の分化誘導の実現に近づいたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The new concept of DNA "mono-ion complex" had been established from the DNA modification method by the interaction of the alkyl group with the DNA groove. The resulting mono-ion complex has exhibited significant higher transfection activity for tibialis muscle than clinical naked DNA and commercial in vivo transfection reagent jet PEI.

The achievement of transfection to mouse tibialis muscle cells with less mitosis suggests the possibility of exogenous gene transfection preserving their nucleus membrane. Therefore, the resulting tool to control nucleus event has been established for realizing the differentiation of cell with no mitosis.

研究分野：複合領域

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：遺伝子複合体 細胞分化誘導 アルキルイミダゾール末端修飾PEG DNA一分子修飾

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで、標的の細胞に到達するまでは遺伝子を安定に保持させ、到達後には不必要な標的指向性の糖鎖分子をエンドソーム内で切り離し、細胞内移行後に遺伝子の放出を促進させるという、遺伝子の保持と放出の相反する機能の両立を達成した遺伝子デリバリーシステムを構築してきた。しかし、核膜が維持されているため遺伝子導入の難しい非分裂細胞への遺伝子導入に関しては、未解明のことが残されている。

2. 研究の目的

本研究では、近年、生化学の分野で核内コードと呼ばれる「核内タンパク質の翻訳後修飾が遺伝子発現に向けて重要な役割を果たす」という核内事象に関する新概念が台頭してきたことを鑑み、冒頭に記したデリバリーシステムに、核内事象を制御するキャリアと、新しい核酸修飾法 (DNA 二重らせん溝へのアルキル鎖の巻き付き) で核内移行性分子修飾した遺伝子を、組み込んだ四元遺伝子複合体を創製する。得られた四元遺伝子複合体を用い、非分裂細胞への遺伝子導入を行い、細胞の分化・脱分化制御を試み、再生医療分野で意義深い生命科学基盤技術の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)DNA 二重らせん溝へのアルキル鎖の巻き付きによる DNA の修飾

アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG の合成および DNA とのモノイオンコンプレックスの形成評価

アミノプロピル PEG (Mw:2000) と活性エステル基を導入した 1-イミダゾール酢酸を縮合反応させイミダゾール末端修飾 PEG (Im-PEG) を合成した。続いて、各種ハロゲン化アルキルを用いてイミダゾールの四級化反応を行い、アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG (R-Im-PEG) を合成した (図 1)。本研究では、炭素数の異なるメチル (Me)、エチル (Et)、ブチル (Bu) 及びオクチル (Oc) イミダゾリウム末端修飾 PEG を合成した (Me-Im-PEG, Et-Im-PEG, Bu-Im-PEG, Oc-Im-PEG)。

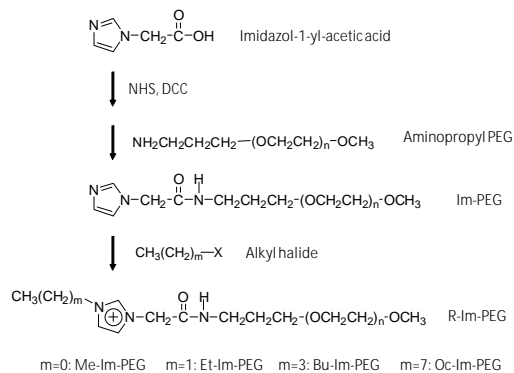


図 1 アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG の合成

合成した各種 R-Im-PEG の DNA 修飾能をアガロースゲル電気泳動、動的散乱 (DLS) による粒径測定、CD スペクトルにより評価した。

1-アミド-アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG の合成および DNA とのモノイオンコンプレックスの形成評価

アミノプロピル PEG (Mw:2000) と活性エステル基を導入した 1-イミダゾール酢酸を縮合反応させ、イミダゾール末端修飾 PEG (Im-PEG) を合成後、6-ブロモヘキサナムドを用いてイミダゾールの四級化反応を行い、1-アミド-ペンチルイミダゾリウム末端修飾 PEG (Ape-Im-PEG) を合成した (図 2)。

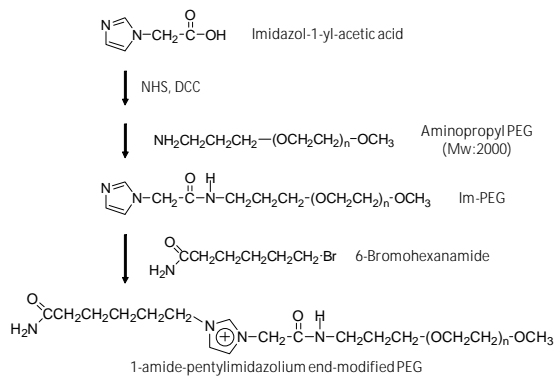


図 2 1-アミド-アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG の合成

合成した Ape-Im-PEG の MIC 形成能はアガロースゲル電気泳動、動的散乱 (DLS) による粒径・ゼータ電位測定、及び、CD スペクトル測定により評価した。また、モノイオンコンプレックスの安定性評価はデキストラン硫酸を用いた複合体置換実験より行った。

(2)非分裂細胞への遺伝子導入: In vivo 遺伝子導入

Bu-Im-PEG/pGL3 モノイオンコンプレックスを用いた in vivo 遺伝子導入

5 週齢マウスの皮内に局所投与し、導入部位の遺伝子発現をルシフェラーゼアッセイにより評価した。

Ape-Im-PEG/pGL3 モノイオンコンプレックスを用いた in vivo 遺伝子導入

マウス脛骨筋へ局所投与し、導入部位の遺伝子発現をルシフェラーゼアッセイにより評価した。

4. 研究成果

(1)DNA 二重らせん溝へのアルキル鎖の巻き付きによる DNA の修飾

アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG の合成および DNA とのモノイオンコンプレックスの形成評価

アガロースゲル電気泳動実験の結果を図 3 に示す。各種 R-Im-PEG は DNA をわずかにリタデーションさせた。これらの結果は

R-Im-PEG がモノカチオンであるにも関わらず、DNA とイオン複体を形成可能なことを示唆している。この時、Bu-Im-PEG は高い電荷比(+/-=32, 64)において、DNA バンドの消失が観察された。従って、アルキルイミダゾリウムのアルキル鎖が DNA 修飾能に影響を与えたと考えられる。

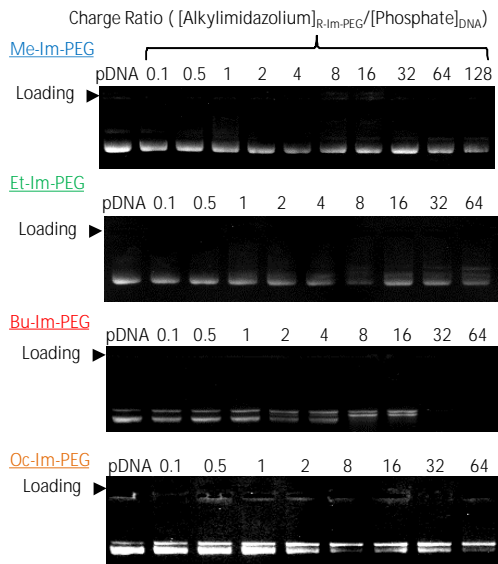


図3 アガロースゲル電気泳動による R-Im-PEG とプラスミド DNA との複合体形成能評価

そこで、Bu-Im-PEG/pDNA 修飾体の粒径を DLS により測定すると、50nm 以下の粒径を示した。さらに、Bu-Im-PEG/DNA 修飾体の CD スペクトル測定において、DNA の脱水和に伴う B 型から A 型へのコンフォメーション変化が観察された。以上の結果より、ブチル鎖がイミダゾリウムと DNA リン酸アニオン間の静電相互作用を増強し、安定なイオン複体を形成させることが示された。

従って、R-Im-PEG は分子末端のみに DNA との相互作用点を有することから DNA 間の架橋を抑制した新規 DNA 一分子非共有結合修飾法に成功したと考えられる。

1-アミド-アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG の合成および DNA とのモノイオン複体の形成評価

アガロースゲル電気泳動によるモノイオン複体形成能評価の結果を図4に示す。in vivo で高効率な遺伝子発現効率を示したブチルイミダゾリウム末端修飾 PEG (Bu-Im-PEG) と比較し、Ape-Im-PEG は低い電荷比(+/-=16)においても DNA バンドを完全に消失させ、モノイオン複体を形成することが明らかになった。この結果より、アルキル鎖末端への一級アミド導入による、モノイオン複体形成能の向上が示唆された。

そこで、DLS による粒径測定を行うと、

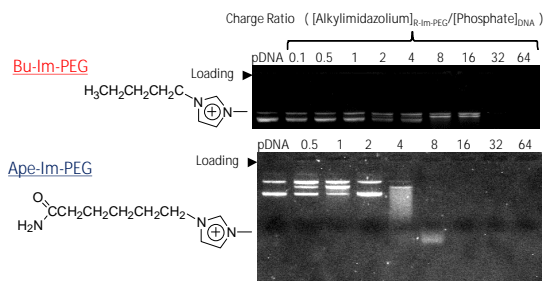


図4 アガロースゲル電気泳動による Ape-Im-PEG とプラスミド DNA との複合体形成能評価

Ape-Im-PEG /pDNA モノイオン複体は、各電荷比において約 50nm 前後の粒径を示した。約 30nm の粒径を有する Bu-Im-PEG/pDNA モノイオン複体と比較して、粒径が増大した理由は、pDNA に結合している PEG 数の増加による影響だと考えられる。

また、Ape-Im-PEG 存在下で pDNA の CD スペクトルを測定すると、pDNA の CD スペクトルは電荷比依存的に変化し、pDNA のコンフォメーション変化が示唆された。この pDNA の CD スペクトル変化は、Bu-Im-PEG の結合に伴う pDNA の脱水和挙動と異っていた。従って、アルキル鎖末端へのアミド導入により、pDNA への結合様式が変化したと考えられる。

図5には Ape-Im-PEG/pDNA モノイオン複体のデキストラン硫酸置換に対する安定性評価の結果を示す。Ape-Im-PEG/pDNA モノイオン複体は電荷比 (+/-)1 において、過剰のデキストラン硫酸存在下 (2mM) でも pDNA バンドが変化したままであり、低い電荷比においても pDNA を安定に保持できることが示唆された。また、電荷比 (+/-)8 の条件でも、デキストラン硫酸存在下 (8mM) において、Naked pDNA バンドは観察されず、Ape-Im-PEG/pDNA モノイオン複体はポリアニオンの置換に対し、高い安定性を有していることが明らかになった。

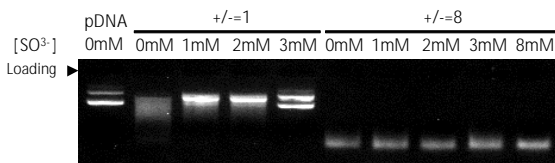


図5 デキストラン硫酸置換実験による Ape-Im-PEG/pDNA モノイオン複体の安定性評価

(2)非分裂細胞への遺伝子導入：In vivo 遺伝子導入

Bu-Im-PEG/pGL3 モノイオン複体を用いた in vivo 遺伝子導入

In vivo 遺伝子導入の結果を図6に示す。Bu-Im-PEG/pGL3 モノイオン複体をマウスの皮内へ局所投与すると、naked DNA を有意に上回る遺伝子発現が観察された。こ

れら結果は Bu-Im-PEG が pDNA を分解から保護すると共に、微小な粒径が標的組織への浸透性を高めたことを示唆している。これらの結果より、モノイオンコンプレックスの開発に成功し、得られた pDNA モノイオンコンプレックスは、臨床応用可能な *in vivo* 遺伝子デリバリーシステムの構築に向けて有用な手法であることが明らかとなった。

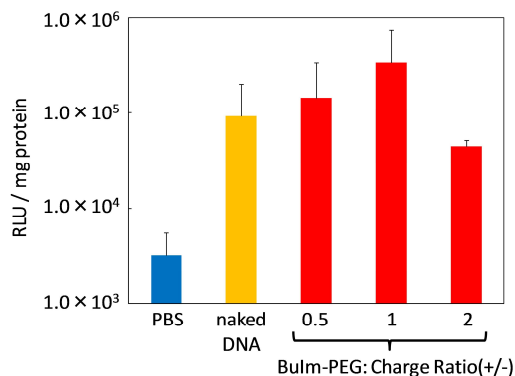


図6 Bu-Im-PEG/pDNA モノイオンコンプレックスによる *in vivo* 遺伝子導入評価

APE-Im-PEG/pGL3 モノイオンコンプレックスを用いた *in vivo* 遺伝子導入

In vivo 遺伝子導入の結果を図7に示す。APE-Im-PEG/pGL3 MIC をマウスの脛骨筋へ投与すると、臨床応用されている naked DNA 及び一般的な *in vivo* トランスフェクション試薬である jet PEI と比較し、有意に高い遺伝子発現効率を示した。これらの結果は、APE-Im-PEG/pGL3 の微小粒径による目的組織への拡散性の向上効果を示唆している。以上より、モノイオンコンプレックスの形成能と安定性の向上が *in vivo* 局所遺伝子発現効率を高めることが明らかになった。

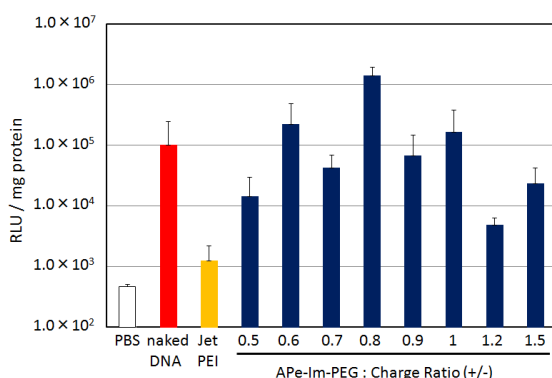


図7 APE-Im-PEG/pDNA モノイオンコンプレックスによる *in vivo* 遺伝子導入評価

(3) 総括・展望

研究開始当初の背景で述べた「核膜が維持されているため遺伝子導入の難しい非分裂細胞への遺伝子導入に関しては、未解明のことが残されている。」に対して、本研究成果

である分裂能の低いマウス脛骨筋への遺伝子導入の成功は、核膜が保存されている細胞へ外来遺伝子を導入可能なことを示している。従って、核内事象制御のためのツールの獲得に成功し、非分裂細胞の分化誘導の実現に近づいたと考えられる。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計8件)

S. Asayama, T. Hakamatani, H. Kawakami, Tuning of the Methylimidazolium/Imidazole Balance in Polycations for Gene Carrier, *Polymers for Advanced Technologies*, in press. (査読有)

DOI: 10.1002/pat.3309

R. Kubota, S. Imamura, T. Shimizu, S. Asayama, H. Kawakami, Synthesis of Water-Soluble Dinuclear Mn-Porphyrin with Multiple Antioxidative Activities, *ACS Medicinal Chemistry Letters*, in press. (査読有)

DOI: 10.1021/ml400493f

S. Asayama, A. Nohara, Y. Negishi, H. Kawakami, Alkylimidazolium End-Modified Poly(ethylene glycol) to Form the Mono-Ion Complex with Plasmid DNA for *In Vivo* Gene Delivery, *Biomacromolecules*, 15, 997-1001 (2014). (査読有)

DOI: 10.1021/bm401902j

S. Asayama, K. Matsuda, Y. Negishi, H. Kawakami, Intracellular Co-Delivery of Zinc Ions and Plasmid DNA for Enhancing Gene Transfection Activity, *Metallomics*, 6, 82-87 (2014) (*Selected for Inside Front Cover*). (査読有)

DOI: 10.1039/c3mt00226h

S. Asayama, K. Seno, H. Kawakami, Synthesis of Carboxymethyl Poly(1-vinylimidazole) as a Polyampholyte for Biocompatibility, *Chemistry Letters*, 42, 358-360 (2013). (査読有)

DOI: 10.1246/cl.2013.358

K. Hazama, S. Asayama, H. Kawakami, Up-Regulation of Gene Expression by Transfection to Hepatocyte Spheroids, *Molecular Pharmaceutics*, 9, 3602-3605 (2012). (査読有)

DOI: 10.1021/mp300519x

N. Hayakawa, S. Asayama, Y. Noda, T. Shimizu, H. Kawakami, Pharmaceutical Effect of Manganese Porphyrins on Manganese Superoxide Dismutase Deficient Mice, *Molecular Pharmaceutics*, 9, 2956-2959 (2012). (査読有)

DOI: 10.1021/mp300147v

S. Asayama, T. Kumagai, H. Kawakami, Synthesis and Characterization of

Methylated Poly(L-histidine) to Control the Stability of its siRNA Polyion Complexes for RNAi, *Bioconjugate Chemistry, Bioconjugate Chemistry*, 23, 1437-1442 (2012). (査読有)
DOI: 10.1021/bc300044r

〔学会発表〕(計 17 件)

朝山章一郎, 松田宏紹, 根岸洋一, 川上浩良, 亜鉛イオンとプラスミド DNA の共送達による遺伝子発現上方制御, 日本薬学会第 134 年会 (2014 年 3 月 27-30 日: 熊本大学)

野原 敦, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG を用いた DNA 一分子非共有結合修飾型 *in vivo* 遺伝子デリバリー, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月 25-26 日: タワーホール船堀)

朝山章一郎, 松田宏紹, 根岸洋一, 川上浩良, 亜鉛イオン配位イミダゾール基含有キャリアによる遺伝子発現上方制御, 第 35 回日本バイオマテリアル学会大会 (2013 年 11 月 25-26 日: タワーホール船堀)

Yutaro Asaba, Shoichiro Asayama, Kazuhiko Nakabayashi, Hiroyoshi Kawakami, Cell Differentiation Control by the Novel Biodegradable Nanoparticles to Control Histone Modification, JSAO2013/IFA02013 (第 51 回日本人工臓器学会大会・第 5 回国際人工臓器学術大会 合同大会), PEJ-1 (2013 年 9 月 27-29 日: Pacifico Yokohama)

浅羽祐太郎, 朝山章一郎, 中林一彦, 川上浩良, エピジェネティクス修飾を標的とした新規生分解性ナノ粒子による細胞分化治療, 第 62 回高分子討論会 (2013 年 9 月 11-13 日: 金沢大学)

野原 敦, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, アルキルイミダゾリウム末端修飾 PEG による DNA 一分子修飾型 *in vivo* デリバリーシステムの開発, 第 62 回高分子討論会 (2013 年 9 月 11-13 日: 金沢大学)

野原 敦, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, アルキルイミダゾール末端修飾 PEG による新規 DNA 一分子修飾法の開発と *in vivo* 遺伝子デリバリーへの展開, 第 42 回医用高分子シンポジウム (2013 年 7 月 29-30 日: 産業技術総合研究所臨海副都心センター)

Shoichiro ASAYAMA, Takao KUMAGAI, Hiroyoshi KAWAKAMI, Methylated Poly(L-histidine) to Control the Stability of its siRNA Polyion Complexes for RNAi, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2013 年 7 月 21-24 日:

Hawaii Convention Center)

野原 敦, 朝山章一郎, 根岸洋一, 川上浩良, アルキルイミダゾール末端修飾 PEG を用いた新規 DNA 一分子修飾による *in vivo* 遺伝子デリバリー, 第 29 回日本 DDS 学術集会 (2013 年 7 月 4-5 日: 京都テルサ)

浅羽祐太郎, 朝山章一郎, 川上浩良, ヒストンを標的とした新規生分解性ナノ粒子による細胞分化治療, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2013 年 5 月 30-31 日: 奈良県新公会堂)

朝山章一郎, 松田宏紹, 根岸洋一, 川上浩良, 亜鉛イオン配位/カルボキシメチル化イミダゾール基導入キャリアによる遺伝子発現上方制御/生体適合化, 第 62 回高分子学会年次大会 (2013 年 5 月 29-31 日: 京都国際会館)

朝山章一郎, ドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築: 新規生体適合性高分子の DNA 一分子修飾による *in vivo* 遺伝子導入 (依頼講演), BIO tech 2013: 第 12 回国際バイテクノロジー展/技術会議 (2013 年 5 月 8-10 日: 東京ビッグサイト)

野原 敦, 朝山章一郎, 川上浩良, 核酸新規修飾法としてのアルキル化 PEG/DNA 複合体形成能評価, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012 (2012 年 11 月 26-27 日: 仙台国際センター)

朝山章一郎, 熊谷喬生, 川上浩良, メチル化ポリヒスチジンによる siRNA 保持安定性制御に基づく RNA 干渉, 第 61 回高分子討論会 (2012 年 9 月 19-21 日: 名古屋工業大学)

松田宏紹, 朝山章一郎, 川上浩良, 亜鉛イオンによる遺伝子発現促進システムの構築, 第 28 回日本 DDS 学術集会 (2012 年 7 月 4-5 日: 札幌コンベンションセンター)

松田宏紹, 朝山章一郎, 川上浩良, 生理活性亜鉛イオン配位ポリプレックスによる遺伝子発現向上メカニズム解析, 第 41 回医用高分子シンポジウム (2012 年 6 月 25-26 日: 東京大学先端科学技術研究センター)

Shoichiro Asayama, Satoshi Nishinohara, Hiroyoshi Kawakami, Zinc-Chelated Poly(1-vinylimidazole) and a Carbohydrate Ligand Polycation Form DNA Ternary Complexes for Gene Delivery, 9th World Biomaterials Congress (2012 年 6 月 1-5 日: 中国 (成都))

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: 界面活性剤様化合物

発明者: 朝山章一郎、野原敦、川上浩良、根岸洋一

権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2014/56873
出願年月日：2014年3月14日
国内外の別：国外

名称：界面活性剤様化合物
発明者：朝山章一郎、野原敦、川上浩良、
根岸洋一
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-56436
出願年月日：2013年3月19日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝山 章一郎 (ASAYAMA, Shoichiro)
首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授
研究者番号：90315755