

1F09-1 膜透過ペプチド提示バイオナノカプセルを用いる高効率薬剤導入法の開発

○米澤 太作¹, 宍戸 卓矢¹, 上田 政和², 妹尾 昌治³, 多田 宏子³, 谷澤 克行⁴, 黒田 俊一⁴, 田中 勉⁵, 福田 秀樹⁵, 近藤 昭彦⁶
(¹神戸大院・自科, ²慶応大・医, ³岡山大院・自科, ⁴阪大・産研, ⁵神戸大 自科・研究環, ⁶神戸大院・工)

【目的】ドラッグデリバリーにおいて薬剤をデリバリーした後、その薬剤を効率よく細胞内に導入することが重要な課題となっている。我々はB型肝炎ウイルス表面抗原よりなるバイオナノカプセル (BNC) を開発し、BNCを用いた肝細胞への薬剤の導入に成功している。しかし、このBNCは肝細胞にしか薬剤を導入することができない。そこでBNCを肝細胞以外の細胞へも使えるキャリアとして発展させるため、本研究では膜透過ペプチド (CPP) をBNCの表面に提示することで様々な細胞への高効率導入を試みた。

【方法及び結果】BNCの肝細胞認識部位を削除し、そこへCPPであるTAT、R8、Antennapediaを融合したプラスミドを作製し、酵母を用いてBNCを発現・精製した。これらのBNCをAlexaにより標識した後、それぞれのBNCを培養細胞に添加し、その後蛍光顕微鏡及びFACSを用いて導入効率を評価した。その結果、CPPをBNCに提示することで肝細胞以外の細胞にもBNCを導入することに成功した。今後薬剤モデルとしてGFPや蛍光小分子をBNCに実際に封入し導入効率を評価していく。

Development of Bio-nanocapsule displaying cell-penetrating peptides for efficient drug delivery

○Daisaku YONEZAWA¹, Takuya SHISHIDO¹, Masakazu UEDA², Masaharu SENO³, Hiroko TADA³, Katuyuki TANIZAWA⁴, Syunichi KURODA⁴, Tsutomu TANAKA⁵, Hideki HUKUDA⁵, Akihiko KONDO⁶
(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., ²Sch. Med., Keio Univ., ³Grad. Sch. Sci. Tech., Okayama Univ., ⁴Ins. sci. Ind. Res., Osaka Univ., ⁵Org. Adv.Sci.Tech., Kobe Univ., ⁶Grad. Sch. Eng., Kobe Univ.)

Key words drug delivery system, cell penetrating peptides, Bio-nanocapsule

1F09-3 構造性多糖分子配向膜の表面ナノ構造と細胞培養特性

○横田 慎吾¹, 江崎 慶¹, 江草 静香¹, 北岡 卓也¹, 割石 博之¹, 杉山 淳司²
(¹九大院・生資環, ²京大・生存研)

【緒言】代表的な構造性多糖類であるセルロースは、その分子集合化特性と機能多様性から、糖鎖系バイオインターフェースの細胞応答性において鍵となる糖鎖分子の配列・集密化を制御するための構造化分子素子として期待されているが、その分子集合構造を膜状で人為制御することはこれまで困難であった。そこで本研究では、多糖分子の還元末端のみをS誘導体化することで、分子鎖ベクトルを揃えた多糖配向膜を金基板上に構造構築し、その細胞培養特性について検討した。【実験および結果】還元末端にチオセミカルバジドを導入したセルロースより調製した自己組織化膜 (SAM) 上で、ラット肝細胞 (IAR-20) を培養したところ、組織培養用ポリスチレンと同程度の良好な細胞接着・増殖が観察された。スピンコート法で調製したセルロース薄膜ではほとんど細胞が接着しなかったことから、膜表面の分子配向状態が細胞接着挙動に強く影響することが示唆された。また、メチルセルロースSAMでは良好に細胞接着したのに対し、ヒドロキシエチルセルロースSAMではほとんど細胞接着が見られなかったことから、膜構成多糖の側鎖構造により細胞接着性を制御できる可能性が示された。これらの結果より、セルロース系多糖分子配向膜のナノレベルの表面モルフォロジーが、動物細胞の培養特性に深く関与することが示された。

Cell culture behavior on cellulosic nano-layers designed by vectorial chain immobilization via self-assembly

○Shingo YOKOTA¹, Kei ESAKI¹, Shizuka EGUSA¹, Takuya KITAOKA¹, Hiroyuki WARIISHI¹, Junji SUGIYAMA²
(¹Grad. Sch. Biores. Bioenviron. Sci., Kyushu Univ., ²RISH, Kyoto Univ.)

Key words cellulosic biopolymers, self-assembled monolayer, surface morphology, cell culture

1F09-2 抗体提示バイオナノカプセルを用いたピンポイントプロテインデリバリーシステムの開発

○倉田 直弥¹, 宍戸 卓矢¹, 上田 政和², 妹尾 昌治³, 多田 宏子³, 谷澤 克行⁴, 黒田 俊一⁴, 田中 勉⁵, 福田 秀樹⁵, 近藤 昭彦⁶
(¹神戸大院・自科, ²慶応大・医, ³岡山大院・自科, ⁴阪大・産研, ⁵神戸大院・自・研究環, ⁶神戸大院・工)

【目的】近年、蛋白質や遺伝子を医薬品として腫瘍部位特異的に投与する先端医療が注目されている。そのための新規キャリアーとして、我々はB型肝炎ウイルス表面抗原から成る生体適合性の高い粒子 (バイオナノカプセル: BNC) を開発し、肝細胞特異的に遺伝子を導入することに成功している。そこで本研究では粒子表面に存在する肝細胞に特異的な領域を削除し、そこへ抗体と強い親和性のあるZZドメインを挿入した。このことにより、BNCに望みの抗体を提示させ、肝細胞以外の細胞へ様々な物質を特異的にデリバリーすることが可能となる。本発表ではデリバリーのモデル蛋白質としてEGFPを用いた抗体提示BNCの開発を行った。

【方法・結果】BNCの表層にZZドメインを提示し、更に内部にEGFPが内包されるプラスミドを構築し、昆虫細胞High Fiveに形質転換した。その培養上清を酵素免疫測定法およびウェスタンブロッティングにより評価したところ、目的とする粒子を発現させることに成功した。今後この粒子に抗体を提示し、肝細胞以外の細胞へ特異的にBNCを導入できるかどうか検討を行っていく予定である。

Development of the pinpoint protein delivery system using bio-nanocapsule displaying antibodies

○Naoya KURATA¹, Takuya SHISHIDO¹, Masakazu UEDA², Masaharu SENO³, Hiroko TADA³, Katuyuki TANIZAWA⁴, Shun-ichi KURODA⁴, Tsutomu TANAKA⁵, Hideki FUKUDA⁵, Akihiko KONDO⁶
(¹Grad. Sch. Sci. Tech., Kobe Univ., ²Sch. Med., Keio Univ., ³Grad. Sch. Sci. Tech., Okayama Univ., ⁴Ins. Sci. Ind. Res., Osaka Univ., ⁵Org. Adv. Sci. Tech., Kobe Univ.)

Key words bio-nanocapsule, pinpoint drug delivery system, insect cell

1F10-1 カチオンリポソーム包埋型磁性ナノ粒子を用いたレトロウイルスベクターの磁気濃縮

○高橋 哲也¹, 河邊 佳典², 井藤 彰², 上平 正道²
(¹九大院・シス生命, ²九大院・工・化工)

レトロウイルスベクターは、分裂する細胞の染色体に安定に組み込まれることにより長期に遺伝子の発現が可能なのが最大の利点であり、遺伝子導入実験及び遺伝子治療に広く用いられている。一方、in vivoでの遺伝子導入効率は十分ではないことから、タイターを高めるために濃縮が必要である。現在、濃縮には主に遠心分離法が行われているが、ウイルス粒子は比重が低いために、濃縮に長時間を要する。そこで本研究は、ウイルス粒子が負電荷を持つことを利用して、カチオンリポソーム包埋型磁性ナノ粒子 (Magnetite cationic liposome, MCL) を使い、磁気濃縮することができるかを調べた。レトロウイルスベクターは、LacZを発現するパッケージング細胞に、VSV-G遺伝子を導入することで生産した。回収したウイルスを含む培養上清に、MCLを加えて30分間静置後、磁石をセットして磁気分離を行った。磁気分離後の上清あるいは磁石に寄ったMCLを、Neuro2a細胞の培地に加え、48時間後にX-gal染色を行って染色された細胞数を計測した。結果として、100 pg/cellsのMCLを用いて濃縮することでウイルスの感染細胞数は 2.5×10^7 cells/mlとなり、MCLを添加しない場合と比較して4.6倍高かった。さらに、1000 pg/cellsの場合、ウイルスベクターの濃縮率は8.0倍、回収率は約80%だった。これらの結果から、MCLはレトロウイルスベクターの濃縮に有用であると考えられる。

Magnetic concentration of retroviral vectors using magnetite cationic liposomes

○Tetsuya TAKAHASHI¹, Yoshinori KAWABE², Akira ITO², Masamichi KAMIHIRA²
(¹Grad. Sch. Sys. Life Sci., Kyushu Univ., ²Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words retrovirus vector, magnetite nanoparticle, liposome, gene delivery