

3P-2087 医療機器被覆を目指した細胞特異性接着ペプチドの探索

○蟹江 慧¹, 加藤 竜司¹, 成田 裕司², 趙 英梓¹, 桑原 史明², 佐竹 真³, 本多 進³, 兼子 博章³, 大河内 美奈¹, 本多 裕之¹
(¹名大院・工・生物機能,²名大院・医,³帝人)

【背景・目的】現在、先進国では心疾患や脳卒中などの循環器系疾患が死因の大半を占めている。致死性の高いこれらの疾患の治療に用いられる人工血管やカテーテル、ステントなどの医療機器において、長期留置における再狭窄が大きな問題となっている。

血管内留置型医療機器において最狭窄の原因は、平滑筋細胞の過形成による血管肥大化、血小板の付着による血栓形成などの複雑な要因が知られている。これらの問題を解決するためには迅速な内皮化を促し、血管肥大化の抑制・血栓形成の予防することが必要である。そこで我々は、平滑筋細胞には接着性を有さず、内皮細胞には接着性を持つような、細胞特異的ペプチドを生体分子(コラーゲンIV)から探索し、医療機器への迅速な血管の内皮化促進効果を検証した。

【実験方法・結果】本研究では、細胞スクリーニング技術として有効な、ペプチドアレイ細胞アッセイ法を用いた。ペプチドアレイは、セルコースメンブレんに多種類のペプチドを任意に合成することが可能であり、多検体の細胞-ペプチド相互作用を検証するのに適している。ペプチドアレイを用いた探索の結果、RGD配列以上に内皮細胞に対して特異的な接着を示す3残基のペプチドを20種類以上取得する事に成功した。この中のペプチドを更に評価し、血管内医療機器被覆の有効が示唆された。

Screening of cell-specific adhesion peptides for medical device coating

○Kei Kanie¹, Ryuji Kato¹, Yuji Narita², Yingzi Zhao¹, Fumiaki Kuwabara², Makoto Satake³, Susumu Honda³, Hiroaki Kaneko³, Mina Okochi¹, Hiroyuki Honda¹
(¹Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.,²Sch. Med. Nagoya Univ.,³Teijin Ltd.)

Key words peptide array, cell-specific adhesion, endothelialization

3P-2089 マイクロデバイスによる臓器圧刺激を利用した *in vivo* 遺伝子デリバリー技術

○清水 一憲^{1,2}, 森 勇樹³, 林 昂司⁴, 守法 篤³, 川上 茂⁴, 橋田 充^{1,4}, 小西 聡^{1,2,3,4}
(¹京大院・薬・革新的ナノバイオ,²立命館大・R-GIRO,³立命館大・理工・マイクロ機械,⁴京大院・薬・動態)

【背景・目的】*in vivo* 遺伝子デリバリー技術は、遺伝子治療や基礎医学研究への応用のために重要である。我々は、簡便なnaked核酸導入法である組織圧核酸導入法(押圧法)の開発を進めてきた。押圧法では核酸水溶液を静置後、組織を圧するだけでその部分に核酸が導入される。これまで押圧法をマウス腎臓に適用する場合、開腹後、腎臓を直接押圧していたため、長期的に繰り返し押圧法を行うのは困難であった。本研究では、マウス腎臓を長期的に繰り返し押圧することが可能なマイクロデバイスの開発を目指した。

【実験方法及び結果】MEMS技術(Micro Electro Mechanical Systems)を用いてマウス腎臓圧用マイクロデバイスを作製し、押圧法を行った。すなわち、3次元光造形技術で作製した腎臓位置固定用ケース内にマウス腎臓と圧力で大きく膨張するシリコーンゴム製マイクロバルーンを収納した。ルシフェラーゼを発現するプラスミドDNA水溶液を尾静脈に注射後、マイクロバルーンを膨張させることでケース内の腎臓を押し、プラスミドDNAの導入を試みた。6時間後、押圧した腎臓においてルシフェラーゼの発現が確認された。また発現量は押圧圧力に相関することが明らかになった。本デバイスを用いることで、開腹なしに、長期的に繰り返しマウス腎臓に対し押圧法を行うことが可能になると期待される。

Tissue-press mediated *in vivo* gene delivery using a microdevice

○Kazunori SHIMIZU^{1,2}, Yuuki MORI³, Kouji HAYASHI⁴, Atsushi SHUNORI⁵, Shigeru KAWAKAMI⁶, Mitsuru HASHIDA^{1,4}, Satoshi KONISHI^{1,2,3,4}
(¹Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.,²R-GIRO, Ritsumeikan Univ.,³Dept. Micro System Tech., Ritsumeikan Univ.,⁴Grad. Sch. Pharm. Sci., Kyoto Univ.)

Key words transfection, drug delivery system, MEMS

3P-2088 生体内ピンポイント遺伝子送達に適したバイオナノカプセルーリポプレックス複合体の高効率化

○太江田 綾子, 山田 光男, 良元 伸男, 飯嶋 益巳, 黒田 俊一
(名大院・生命農)

2003年、我々はB型肝炎ウイルスのヒト肝臓特異的な感染機構を有するナノカプセルである同表面抗原タンパク質L粒子を酵母で生産させ、生体内ピンポイント遺伝子・薬剤送達用非ウイルスベクター“バイオナノカプセル(BNC, Bio-nanocapsule)”を開発した(山田ら, Nat Biotech)。さらに2008年には、BNCがリポソームと複合体(BNC-Lp複合体)を形成することを発見し、薬剤や遺伝子を包含するリポソームの生体内ピンポイント送達を可能にした(鄭ら, J Controlled Release)。本研究では、カチオン性リポソームと遺伝子の複合体(リポプレックス)が高い遺伝子導入活性を有しながらも、標的化能が低いことに着目し、BNC-Lp複合体の最適化を行った。具体的には、BNCとリポプレックスを融合させる際に、BNC表層に存在する膜透過ドメインの活性を最大限に高める条件を検討した。また、複合体形成に寄与しないリポプレックス及びBNCを除去する条件を検討した。その結果、同複合体の単位DNAあたりの遺伝子導入効率、従来型BNC-Lp複合体よりリポプレックス単体と比較して100倍以上も向上していた。さらに、B型肝炎ウイルス由来のヒト肝臓特異的認識能によるヒト由来肝臓細胞特異的遺伝子導入能は約30倍(対ヒト由来非肝臓細胞)であった。以上のように、BNC-Lp複合体は、リポソームにウイルス由来の機能を付与するもので、既存リポソーム法の可能性を著しく広げる新しい手法と考えられた。

Highly efficient bio-nanocapsule-lipoplex conjugate for *in vivo* pinpoint gene delivery system

○Ayako OEDA, YAMADA Mitsuo, YOSHIMOTO Nobuo, IJIMA Masumi, KURODA Shunichi
(Grad. Sch. Biol. Agr. Sci., Nagoya Univ.)

Key words gene delivery system, liposome, bio-nanocapsule, virus

3P-2090 軟骨細胞および間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化度のMIA定量による非侵襲的推定

尾上 香織¹, 橋橋 秀紀¹, 〇佐藤 康史¹, 脇谷 滋之², 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能,²阪市大・医・整形外科)

【目的】間葉系幹細胞(MSC)から軟骨細胞への分化度、並びに脱分化した軟骨細胞の再分化度の、培養上清中のMIA濃度定量による非侵襲的推定の可能性を検討した。

【方法】ヒト骨髄MSCとヒト膝関節軟骨細胞を、軟骨分化用培地を用いて約3週間ベレット培養を行い、培地交換の際に得られる培養上清中のメラノマ阻害活性(MIA)タンパク質濃度を測定すると共に、細胞数、正常軟骨細胞と比したアグリカン遺伝子発現率を測定した。

【結果と考察】MSCから軟骨細胞への分化培養及び、脱分化した軟骨細胞の再分化培養において、アグリカン遺伝子発現率が約100%以下の範囲で、アグリカン遺伝子発現率とMIA比生産速度との間に良好な正の相関関係が得られた。また、100%以上のアグリカン遺伝子発現率範囲ではMIA比生産速度がほぼ一定になる傾向がみられた。従って、培養上清中のMIA定量により、軟骨細胞への分化度を非侵襲的に推定できる可能性が示された。

Noninvasive estimation of chondrogenic differentiation level of mesenchymal stem cells and chondrocytes by the analysis of MIA production

Kaori Onoue¹, Hideki Kusubashi¹, Yasushi Sato¹, Shigeyuki Wakitani², Mutsumi Takagi¹
(¹Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.,²Orth. Surg., Grad. Sch. Med., Osaka City Univ.)

Key words differentiation, noninvasive, mesenchymal stem cell, chondrocyte