

## 研究論文

DEAE-デキストラン共重合体を非ウイルス性遺伝子導入  
キャリアーとして用いた、培養細胞への外来遺伝子導入

江下優樹<sup>\*1</sup>、東原絢子<sup>\*1</sup>、大西政康<sup>\*2</sup>、水野正明<sup>\*3</sup>、吉田純<sup>\*4</sup>、住吉秀明<sup>\*5</sup>、吉岡秀克<sup>\*5</sup>、  
高崎智彦<sup>\*6</sup>、石川雄一<sup>\*7</sup>、久保田直治<sup>\*8</sup>、大西靖彦<sup>\*2</sup>

Transfection of Foreign Genes into Cultured Cells Using Novel DEAE-Dextran  
Copolymer as a Non-Viral Gene Carrier

Yuki ESHITA<sup>\*1</sup>, Junko HIGASHIHARA<sup>\*1</sup>, Masayasu ONISHI<sup>\*2</sup>, Masaaki MIZUNO<sup>\*3</sup>, Jun  
YOSHIDA<sup>\*4</sup>, Hideaki SUMIYOSHI<sup>\*5</sup>, Hidekatsu YOSHIOKA<sup>\*5</sup>, Toshihiko TAKASAKI<sup>\*6</sup>,  
Yuichi ISHIKAWA<sup>\*7</sup>, Naoji KUBOTA<sup>\*8</sup> and Yasuhiko ONISHI<sup>\*2</sup>

Transfection efficiency of 2-diethyl aminoethyl-dextran-methyl methacrylate graft copolymer (DDMC) was evaluated with pGL3 DNA and COS-7 cells. Relative light unit (RLU) of luciferase proteins was measured using 96 hole-microtiter trays. Results were as follows: 1) When DNA (0.05  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) and DDMC (4.0  $\mu\text{g}/\text{well}$ ) were transfected into the cells, RLU was about double higher than DNA and DEAE-dextran. However, it was of equal or lower value when the less quantity of DDMC was used. 2) The first peak of RLU on DDMC and DEAE-dextran appeared at 72 hours and 48 hours after the transfection, respectively. The delay luciferase expression may be explained by the fact that the complex of DNA and DDMC in cells is hard to be decomposed. The complex will be formed by Michaelis-Menten type equation such as  $\text{complex amount} = K1 (\text{DNA concentration}) / (\text{DNA concentration} + K1 (\text{DDMC concentration}))$ .

Key words: Transfection efficiency, foreign gene, cultured cell, DEAE-dextran-MMA graft copolymer, non-viral gene carrier

## 1. 緒言

遺伝子工学で遺伝子デリバリーシステムはもっとも重要である<sup>1)</sup>。その構成要素で、ある遺伝子を他の生物へ移植する際にその遺伝子を運ぶ、いわば運び屋が必要でありこれをベクターと称している。ベクターには、元々細胞に入り込む性質を

持つウイルスの「殻」や、脂質のボール（リポソーム）等が使われる。ウイルスベクターは、ウイルスの殻とウイルス遺伝子の一部を使うので、病原性や免疫原性の危険性が指摘されている。リポソームベクターは、主に人工的に作った、細胞膜に良く似た構造の脂質二重膜でできたミクロの球体に、遺伝子を入れたものであるが、熱的に安定でなくオートクレーブによる滅菌が不可能である。一方、市販のカチオン性脂質ミセルのトランスフェクション試薬が効率の良い結果を示している。しかし、これらもオートクレーブ等による滅菌が不可能であることから、今後の非ウイルス性遺伝

平成 年 月 日受理

\*<sup>1</sup> 大分大学医学部感染予防医学講座

\*<sup>2</sup> 株式会社リュージュサイエンス

\*<sup>3</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科遺伝子治療学

\*<sup>4</sup> 名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科学

\*<sup>5</sup> 大分大学医学部マトリックス医学講座

\*<sup>6</sup> 国立感染症研究所ウイルス第1部

\*<sup>7</sup> 大分大学工学部応用化学科機能物質化学講座

\*<sup>8</sup> 大分大学医学部化学講座

子導入キャリアーの主流になることは困難であろう。そこで人工物である事から熱的に安定して使用される陽イオン性高分子体が期待されている<sup>2)</sup>。今回、非ウイルス性ベクターとしてもっとも歴史があり、形質変換率が低く細胞毒などの問題を有するが、滅菌可能などいまだ有望な DEAE-デキストランをクローズアップし<sup>3-4)</sup>、DEAE-デキストランに MMA をグラフト重合させた共重合体 (DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体: DDMC) は親水-疎水領域を有し、その形質変換効率は高く非ウイルス性ベクターとして大変に有望であることが解った<sup>5-7)</sup>。このように DEAE デキストランを改質した DDMC と DNA との複合体は種々の細胞を使用した形質変換効率の点で DEAE-デキストランに比較して 50 倍以上優れていると報告されているが<sup>8)</sup>、そのメカニズムの詳細はいまだ明らかでない。細胞への DNA の取り込みを定量的な手段や可視化イメージの手法を持って検討すれば、そのメカニズムは明らかになり、遺伝子デリバリーシステムの分子設計が確立される。

## 2. 材料および方法

### 2.1 試薬

ルシフェラーゼをコードした DNA はプロメガ社製 pGL3-Control Vector であり、DEAE-デキストランは Sigma-Aldrich Chemicals 社製の D-9885 (分子量推定 Mw50 万、塩酸塩) であり、DDMC はグラフト率 130% で濃度 10、20、28.6mg/mL ものを使用した。ルシフェラーゼ試薬は Bright-Glo Luciferase Kit (Promega 社製造) を使用し、細胞融解剤は Glo Lysis Buffer (Promega 社製造) を使用した。

### 2.2 DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体

DEAE-デキストラン-MMA グラフト共重合体 (2-diethyl aminoethyl-dextran-methyl methacrylate graft copolymer: DDMC) は、DEAE-デキストランに 4 価のセリウム塩を使用してメタクリル酸メチルエステル (MMA) をグラフト重合したもので<sup>1)</sup>、DEAE-デキストランを幹ポリマーに

PMMA を枝ポリマーとする共重合体である。DEAE-デキストラン部を親水ドメイン、枝ポリマー-PMMA 部を疎水ドメインとする親水-疎水マイクロ相分離構造を形成する。

#### 2.2.1 共重合体のグラフト率 (graft rate) の定義

グラフト率は  $\text{グラフト率} = \frac{\text{PMMA (枝ポリマーの重量)}}{\text{DEAE-デキストラン (幹ポリマーの重量)}}$  と定義する。今回使用の DDMC は完全にグラフト反応が進んでおり、 $\text{グラフト率} = \frac{\text{PMMA (枝ポリマーの重量 2.6g)}}{\text{DEAE-デキストラン (幹ポリマーの重量 2g)}} = 130\%$  であった。

#### 2.2.2 電荷比の定義

P/N を電荷比という。DDMC (N: 1.4%) と DNA (P: 5.3%) の錯体形成反応がイオン結合による化合物 (Poly-ion complex: PIC) なのでその組成比率を重量比と共に電荷比で表す。

$$P/N = (y \times 0.0533 \times 14) / (x \times 0.014 \times 31)$$

DNA/DDMC =  $y/x$  (重量比)、P: 5.3%、N: 1.4%、P 原子量: 14、N 原子量: 31 とする、 $y$  は使用する DNA の量、 $x$  は使用する DDMC の量である。

### 2.3 細胞の形質変換

#### 2.3.1 供試細胞

アフリカミドリザル腎由来の COS-7 細胞 (CV-1 サル細胞の複製開始点欠損 SV40 によるトランスフォーマント、SV40 large T 抗原を発現)

#### 2.3.2 細胞数のカウント

MEM 培地 (10% FBS 含) で培養した COS-7 細胞 (アフリカ緑ザル腎由来) のフラスコ 75cm<sup>2</sup> からガラスピペットで培地を除き、1×PBS (-) 液を 6mL フラスコに加え、細胞表面を洗い、1×PBS (-) 液を除いた。この操作を 2 回繰り返した。次に 2×1% トリプシン/EDTA 液を 3mL 加え、細胞剥がれた際に、12mL の MEM 培地 (10% FBS 含) を加え、ピペティングした。生きた細胞のみをカウントするため、1×PBS (-) 液 750  $\mu$ L、0.5% トリパンブルー 200  $\mu$ L、トリプシン処理した COS-7 細胞 50  $\mu$ L を混ぜ、ヘモサイトメーターによりカウントした。96 穴プレートで、細胞数が  $2 \times 10^4$  /well になるようにまいた。空いた well には細胞の乾燥防止する

ために MEM 培地 100  $\mu$ L /well 加えた。COS-7 細胞を MEM 培地 (10%FBS 含) で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 下で 1 日培養した。

### 2.3.3 トランスフェクション液の作製

滅菌チューブ中にルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA (pGL3 Control Vector) 0.05  $\mu$ g を 1×PBS(-)液 2.6  $\mu$ L で希釈し、DEAE-デキストランおよび DEAE-デキストラン共重合体をそれぞれ 0.14  $\mu$ L 加え、よく混ぜた。

### 2.3.4 トランスフェクション法

被形質変換細胞の COS-7 細胞が存在する培養シャーレから培養液を除いた。次に 96 穴中培養 COS-7 細胞を 1×PBS(-)液 100  $\mu$ L で 2 回洗浄した。1well あたり、2.79  $\mu$ L のトランスフェクション液を COS-7 細胞に加え、よく行き渡るように培養プレートを緩やかに揺らした。この培養プレートを 37°C で 5 分おきにシャーレを揺らしながら 30 分間インキュベートした。30 分経過後、インキュベートした培養プレートに MEM 培地 (10%FBS 含) を 28.8  $\mu$ L /well 加え、37°C で 2 時間 30 分インキュベートし、その後 MEM 培地を取り除き、新たに MEM 培地 (10%FBS 含) を 100  $\mu$ L 加え、37°C で 24~96 時間インキュベートした。

### 2.3.5 発光測定

24 時間 (または 48、72、96 時間後) にインキュベーターから COS-7 細胞培養プレート (トランスフェクション液含) を取り出し、培地を取り除いて、1×PBS(-)液 50  $\mu$ L /well でリンスした。Glo Lysis Buffer を 25  $\mu$ L /well 加え、プレートを揺らし、5 分後 Bright-Glo Luciferase 試薬を 25  $\mu$ L /well 加えて 2 分経過後に SPECTRA FLUOR PULUS (Wako 社製造) で発光測定し RLU 値を得た。測定条件はゲイン 150、インテグレーションタイム Maximum に設定した。

### 2.3.6 RLU 値

RLU 値については RLU 値 = (サンプルの RLU 値 2 回の平均) で求めた。

### 2.3.7 抗菌剤

細胞を培養する際に用いる MEM 培地 (10%FBS 含) には抗生物質、抗真菌剤は含まれていない。トランスフェクション液をくわえたあと、2 時間

30 分のインキュベーションが終わった時点で入れる培地 (10%FBS 含) の中に抗生物質-抗真菌剤 (ペニシリン/ストレプトマイシン/アンフォテリシン B) を加えた。

### 2.4 DNase 分解試験

先ず、鮭精子由来の DNA 液 (10mg/mL) 1mL と 0.005% のトルイジン青液 (pH7) 1mL とを反応させ、DEAE デキストラン液 (10mg/mL) 1mL やそれと当電荷の共重合体 (28.6mg/mL) 1mL をそれぞれ反応させ PIC 複合体として沈殿させる。それを 5 番のろ紙を用いて自然濾過したものをろ紙ごと試験管に移し、4mL の蒸留水を加え、RQ1 RNase-Free DNase を 0.01mL (0.01mg) と 10 倍の緩衝液を 0.1mL 加えて、30°C の環境で DNA を分解させ、それによりその上澄み液に遊離するトルイジン青の吸光度を 633nm で測定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 COS-7 細胞へトランスフェクション

96 穴マイクロプレートを用いて、pGL3 DNA とキャリアーの複合体を COS-7 細胞へトランスフェクションする方法を検討した。その結果を Fig. 1 に示した。DDMC (グラフト率 130%) と DEAE-dextran (グラフト率 0%) とのトランスフェクション効率を比較すると、DDMC の濃度 10.0mg/mL での RLU 値は DEAE-dextran より低かったが、DDMC の濃度を高くすると、濃度依存的にその効率は高くなり、濃度 20.0mg/mL では同程度、28.6mg/mL では 2 倍程高くなった。濃度依存的にその効率は高くなることは DDMC の細胞毒性は低く、かつ形成される DNA との複合体が増加することよりトランスフェクション効率があがることを意味してすこぶる合理的である。

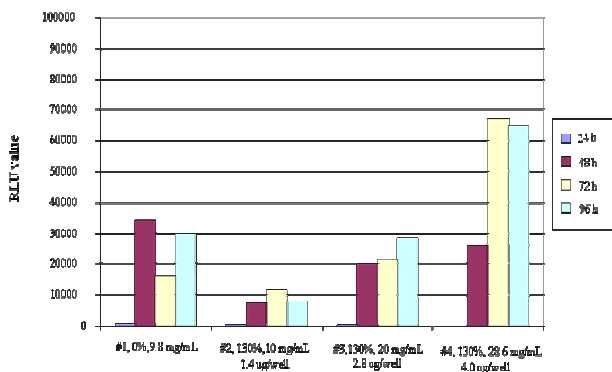


Fig.1 Transfection of COS-7 cells by sample 1 of DEAE-dextran and DEAE-dextran-MMA graft copolymer. The grafting rate is 130% for sample 2 at 10 mg/mL, sample 3 at 20 mg/mL, and sample 4 at 28.6 mg/mL.

### 3.2 電荷比 P/N 比

トランスフェクション効率を論ずる時に濃度と同様に各サンプルの電荷比 P/N 比の値が重要であり、P/N の値を等しくして DEAE-dextran と DDMC の RLU 値を比較することも必要である。関連の P/N 比を調べてみると、DEAE-dextran の N% は 3.3% であった。また DNA の P% は約 5.33% であった。そこで以下の Table 1 の P/N 値が得られた。

Table 1 Charge ratios (P/N) of DEAE-dextran-MMA graft copolymer (DDMC) and DEAE-dextran to DNA

	P/N
DEAE-dextran (grafting rate 0%)	0.026
DEAE-dextran-MMA graft copolymer (DDMC, grafting rate 130%)	
28.6 mg/mL	0.021
20.0 mg/mL	0.030
10.0 mg/mL	0.060

Table 1 で見ると輸送 DNA の量に依存すると考え、各サンプルの P/N 値で DEAE-dextran (グラフト率 0%) と DDMC (グラフト率 130%) との RLU 値の比較ができそうであり、28.6mg/mL のサンプルが P/N 値 0.021 を示しており、DEAE-dextran の P/N 値 0.026 と電荷比は同程度であると考えられるので、DEAE-dextran (グラフト率 0%) とのトランスフェクション効率比較で、DDMC の濃度 28.6mg/mL では 2 倍程高くなった理由は共重合体の親水-疎水ミクロ相分離構造によるミセルのマ

クロ形成によるものと考えられる。

DDMC と DEAE-dextran とのルシフェラーゼタンパク質の発現時間を比較すると、トランスフェクション 24 時間後の COS-7 細胞では、DEAE-dextran (グラフト率 0%) と異なり DDMC (グラフト率 130%) ではほとんど発現していなかった。

また、本論文の手順に従ったトランスフェクション試験では、共重合体ばかりでなく DEAE-dextran (グラフト率 0%) のトランスフェクション効率が市販の PolyFect (キアゲン社製)<sup>9)</sup> より高い RLU 値であったことが COS-7 細胞を用いた予備試験で得られていることから、トランスフェクションの条件によってその効率は比較的大きく変動することが示唆される。

### 3.3 発現時間

DDMC と DEAE-dextran との発現時間を比較すると、DEAE-dextran (グラフト率 0%) と異なり、DDMC (グラフト率 130%) が COS-7 細胞では 24 時間で、ほとんど発現していなかった。これは DDMC と DNA との錯体が比較的安定であり、細胞核に輸送された後でも DNA が解離して発現するまでの経過時間が長いと考えられる。

DEAE-dextran と DDMC との発現時間が異なる事を前に述べたが、DDMC との発現時間の最適値を考慮するとその RLU 値の比較は 72 時間が良いと考えられる。Fig. 1 より DDMC の RLU 値の最大は 72 時間であった。この理由により各サンプルを時間で統一する場合は RLU 値の比較は 72 時間が良いと考えられる。そうでない場合はそれぞれの最大値で比較することになる。

DEAE-dextran (グラフト率 0%) と DDMC とのトランスフェクション率の比較を行うと、HEK293 細胞を用いたトランスフェクションの実験では DDMC (グラフト率 130%) の方に顕著な効果があった<sup>5-9)</sup>。しかし、本実験ではその差は濃度 28.6mg/mL、20.0mg/mL に限られ、濃度:10.0 mg/mL サンプルの発現は DEAE-dextran より低かった。これは、この実験系では DEAE-dextran の細胞毒や DDMC の濃度に対する細胞毒が問題にされず、絶対的な輸送 DNA の量に依存した結果と考えている。

また、前述の発現時間の最適値を考慮すると DEAE-dextran と DDMC はトランスフェクションの機構が異なるのかもしれない。これは DEAE-dextran (グラフト率 0%) と異なり、DDMC (グラフト率 130%) が COS-7 細胞では 24 時間で、ほとんど発現していない事で示されている。トランスフェクションの効率に DNA 凝縮が直接関与している可能性も高い<sup>10)</sup>。

### 3.4 錯体形成

次に、DDMC を使用した目的の一つとして、DNA との安定な錯体形成があげられる。すなわち DEAE-dextran では DNA との錯体形成が不安定であり、細胞内に輸送された後、細胞内のデキストラナスクラーゼ (dextranucrase) で分解されてしまう可能性が高い。そのために、DNase 保護作用が低下して、トランスフェクション効率が低下してしまい、さらにその細胞毒性によって DEAE-dextran の濃度を高める事ができない事が新規に合成した DDMC 使用の理由の一つとしてあげられる。このように DDMC は DNA との複合体を安定にするために、DEAE-dextran にビニル単量体をグラフト重合したものである。その安定化の効果は発現の遅延として今回の実験で証明されたと考えられる。

### 3.5 DNase 保護作用

その安定化の効果は DNase 保護作用の差によっても理解できる。Fig. 2 より DEAE-dextran/DNA は初期から DNA の分解が促進して遊離するトリジン青は多くその吸光度変化は大きく<sup>11)</sup>、一方 DEAE-dextran 共重合体/DNA では DNA の分解がほとんどすすまず、その吸光度変化は大変に小さく、両者には十分に差がある。

これで DNase 分解に対する保護作用は DEAE-dextran に比較して DEAE-dextran 共重合体では格段に大きく、これが transfection 効率を大きくしていると考えられる。

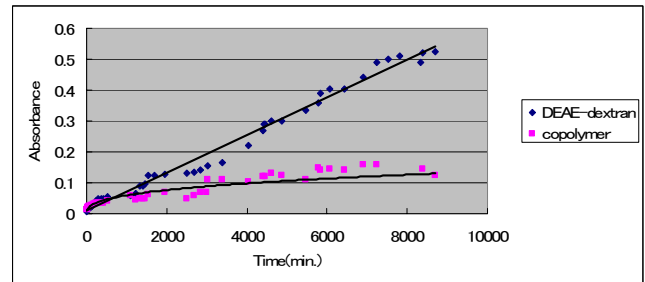


Fig.2 DNase degradation times for foreign DNA complex with DEAE-dextran-MMA graft copolymer and DEAE-dextran, respectively. DNase I degrades both double-stranded and single-stranded DNA endonucleolytically, producing 3'-OH oligonucleotides. Toluidine Blue (TB) is isolated in water from DNA after the degradation, as the DNA is stained with TB. This shows the absorbance of TB isolated from DNA in each sample in the water with a spectrophotometer.

### 3.6 錯体形成反応のメカニズム

DDMC と DEAE-dextran によるタンパク質発現の差異は、それらの異なった錯体形成反応により、特にそれらの濃度が低い場合に起因することが考えられる。

DNA と DDMC との錯体形成反応は、グラフト MMA 部の疎水性により、クーロン力と共に疎水結合力が大きく影響して、ミカエリス・メンテン (Michaelis Menten) 型の錯体形成反応は、

$$\text{形成錯体量} = K1 (\text{DNA 濃度}) (\text{DDMC 濃度}) \quad (1)$$

が考えられ、形成錯体量は RLU 値と比例する。

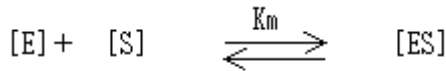
DEAE-dextran と DNA との錯体形成反応は、クーロン力にほぼ依存するので、DEAE-dextran 濃度の一次式に比例して、

$$\text{形成錯体量} = K2 (\text{DEAE-dextran 濃度}) \quad (2)$$

と考えられる。

トランスフェクション液をさらに 10.9 倍に薄めて DNA の量を一定 0.075  $\mu\text{g}$  とし、DDMC の量を 0-15  $\mu\text{g}$  と変化させて、どの組み合わせの時が高いトランスフェクション効率が得られるかに関して、Fig. 3 のような興味ある結果が得られた。DEAE-dextran の場合は DNA との y/x (重量比) = 1/50 が最適と言う報告、即ち最適 DNA 量の比率が 50 前後という報告もある<sup>12)</sup>。Fig. 1 の結果と異なり、この低い濃度では DEAE-dextran RLU 値が、結果として DDMC より高い値を示している。RLU 値は錯

体の形成能に直接影響すると考えられる。錯体の形成能はミカエリス・メンテン型と考えられ、そうであれば



$$[E][S]/[ES]=K_m \quad (3)$$

となる。普通は酵素と基質の関係になるが、ここでは DEAE-dextran や DDMC を [E] として、DNA を [S] とする。

最初の DEAE-dextran や DDMC の濃度を [E0] とすると、

$$[E]=[E0]-[ES] \quad (4)$$

となる。これを代入すると、複合体の濃度は

$$[ES]= [E0][S]/(K_m+[S]) \quad (5)$$

となる。ここで DDMC の場合はクーロン力が小さく (E と S の親和力が小さく、[S] が小さいことが直接影響する)、 $K_m$  は大きくなり複合体は不安定になり、 $K_m$  に比較して [S] は無視される。この式は  $K_m \gg [S]$  として、複合体濃度は

$$[ES]= [E0][S]/K_m \quad (6)$$

となる。これは DDMC の例で、濃度条件に強く影響しそうである。つまり共重合体の濃度が低いと錯体の形成に大きな影響があると考えられよう。

逆の場合として、DEAE-dextran を考えると、クーロン力が大きく (E と S の親和力が大きく、[S] が小さいことが直接影響しない)、 $K_m$  は小さく複合体は安定になり、反対に [S] に比較して  $K_m$  は無視される。この式は  $K_m \ll [S]$  として、複合体濃度は近似的に

$$[ES]=[E0] \quad (7)$$

となる。これは DEAE-dextran の濃度に複合体形成は比例することを示している。つまり濃度が低くても錯体の形成は極端に言えばあまり影響しないと考えられる。

逆に Menten 型の DNA と DDMC の錯体形成反応は濃度に大きく作用される筈である。それぞれの最大 RLU 値で求めた  $K1=1.055 \times 10^{-7} (\mu\text{g}/\text{well})$ 、 $K2=1.626 \times 10^{-5} (\mu\text{g}/\text{well})$  を用い、RLU 値を実験値の最大値を 100% として正規化されているその関係をあらわしたのが Fig. 3 である。これは DNA 0.075

$\mu\text{g}$  の 48 時間 (h) の条件では DEAE-デキストランや共重合体とも良く成り立つ事をしめす。横軸の濃度は DNA が  $0.075 \mu\text{g}$ 、DEAE-デキストラン共重合体が  $0.75 \mu\text{g}$  使用した場合は、MEM (w/o FBS) で全量を  $30 \mu\text{L}$  としたとき DNA の濃度は  $0.075 \mu\text{g}/30 \mu\text{L}$  つまり、 $0.0025 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  となる。DDMC の濃度は、 $0.75 \mu\text{g}/30 \mu\text{L}$  つまり、 $0.025 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  である。また通常このグラフの縦軸は複合体の量であるが RLU 値と比例するので、ここでは図の傾向が同じなら、反応機構は類推しても良いと考えている。

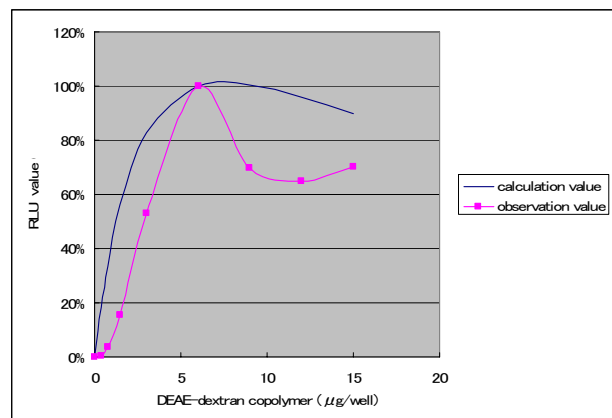
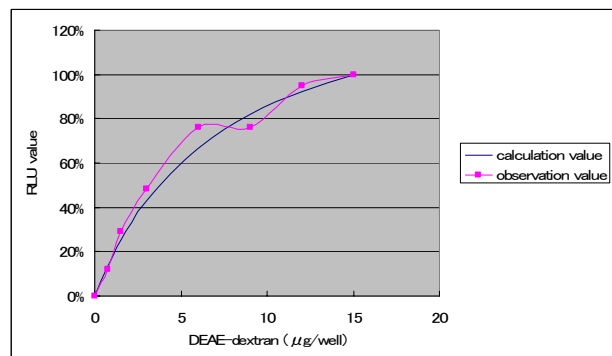


Fig. 3 Transfection of COS-7 cells with samples of DEAE-dextran and DEAE-dextran-MMA graft copolymer having a grafting rate of 130% and including  $0.075 \mu\text{g}$  of DNA. Maximum luciferase expression within each experiment was set at 100%.

(4) 式を考慮すると、トランスフェクションの手順の中で、2 時間 30 分のインキュベーションタイムの間に DNA と DDMC が複合体を形成するもの、あるいは形成していないものがあると考えられる。もし、形成するものがあるとするれば、その時期に 10%FBS を含む D-MEM 培養液を使用しているので、錯体の形成の影響が考えられる。錯体形成反応に

は pH が強く影響すること、および FBS は DDMC の分解を促進する可能性があることから、次の問題として PBS 緩衝液の使用を検討する必要があるかも知れない。また、もし、複合体を形成していない未反応のものがあるとするれば、それが、細胞にとってどれくらいのダメージを与えることになるかを知ることは重要である<sup>13)</sup>。DDMC では、2 時間 30 分のインキュベーションタイムを設定している。この 2 時間 30 分はどのような意味となるのか更に検討する必要があるだろう。

### 3.7 細胞へのトランスフェクション

細胞へのトランスフェクション効率は DNA の構造に強く依存すると言われている。DNA は溶液中でコイル状に膨潤した状態から凝縮（グロビュール）まで連続的に共同的な変化を伴うが、DNA の活性は ON から OFF に変化する。トランスフェクションの過程からいえば凝縮が OFF になっている必要がある。即ち、DNA がコンパクトに閉じた状態、DNA 収縮の状態が細胞膜での透過や細胞内での DNA の分解に有利に働くとされている<sup>10)</sup>。その段階では、1) 核酸複合体をいかに細胞内へ効率よく取り込ませるか。2) 細胞質内・輸送小胞体での分解をいかにおさえるか。3) 輸送小胞体からいかに効率よく細胞質へ脱出させるか。4) 細胞質から核内にいかに効率よく移行させるか。5) 核内でいかに転写できる核酸分子の状態にするかがポイントとなる。

一方、細胞へのトランスフェクションは、先ず DNA と DDMC の錯体形成による細胞のエンドサイトシス（捕食）によると考えられる。その意味で、この錯体形成条件は重要である。

また、細胞のエンドサイトシスには細胞膜を透過する為に DDMC の疎水ドメインである PMMA 部分が重要である。DNA と DDMC の錯体形成反応は pH や電荷比に強く影響される。しかし、この反応は DNA の燐酸エステルマイナスイオン電荷と DDMC のプラス電荷が静電的に結合したものであり、ポリイオンコンプレックスと言われるものである。それ故、DNA は凝縮して細胞内で分解から保護され、さらに核にいたる核膜の透過を容易にすると考え

られる<sup>7)</sup>。細胞内での分解からの保護は細胞内での DNase や更に Dextranucrase の作用からの保護を意味しており、DDMC は DEAE-dextran よりも優れていると考えられる。DDMC の高分子ミセルと DNA が錯体形成して、エンドサイトシスを行い、細胞核に至る模式図を Fig. 4 に示した。

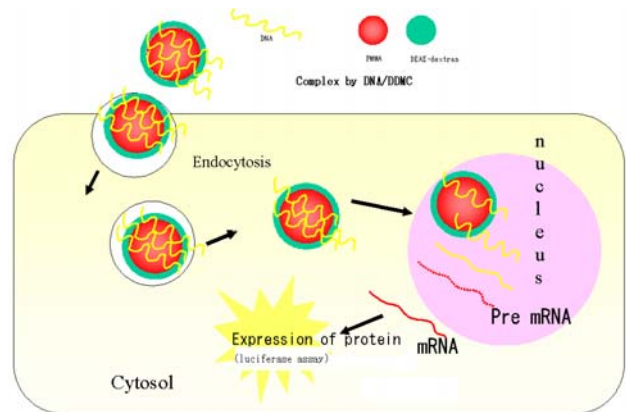


Fig.4 Schematic drawing of putative delivery pathways for foreign DNA complex with DEAE-dextran-MMA graft copolymer.

## 4. 結論

遺伝子導入キャリアーとして用いた DDMC は、オートクレーブ滅菌が可能で、しかも DEAE-dextran 単体よりもトランスフェクション効率がよく、細胞毒性が低いと考えられることから、哺乳動物由来細胞のみならず節足動物由来細胞への応用が今後期待される。

## 謝辞

本研究をまとめるに際して、感染予防医学講座の高岡宏行教授から貴重な助言を得た。また、本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤 C : 1858031 ; 基盤 B(海外学術) : 20401050)、および厚生労働科学研究費補助金 (H20-新興一般-015) によって得られた。

## 参考文献

- 1) 橋田 充, “ドラッグデリバリーシステム—創薬と治療への新たな挑戦,” (化学同人, 京都, 1995), p. 145
- 2) 佐藤智典, “遺伝子デリバリーに利用される糖

- 鎖高分子,” 高分子, 51, 837-840(2002)
- 3) 大西靖彦, 菊地康男, “陽イオン性高分子体と核酸との複合体の研究(I)-DNA とジエチルアミノエチル化-デキストランの反応,” 高分子論文集 60, 359-364(2003)
- 4) 大西靖彦, 菊地康男, “RNA とジエチルアミノエチル化(DEAE)デキストランの複合体形成反応,” 高分子論文集 61, 139-143(2004)
- 5) Y. Onishi, Y. Eshita, A. Murashita, M. Mizuno, J. Yoshida, “Synthesis and Characterization of 2-Diethylaminoethyl (DEAE)-dextran-MMA Graft Copolymer for Non-viral Gene Delivery Vector,” J.Appl.Polym.Sci.98,9-14(2005)
- 6) Y. Onishi, Y. Eshita, A. Murashita, M. Mizuno, J. Yoshida, “2-Diethylaminoethyl(DEAE)-dextran-MMA Graft Copolymer for Non-viral Gene Delivery,” Bull.Res.Cent.Enviroin.Sci.Tech.,Nippon Bunri Univ.5,8-13(2006)
- 7) Y. Onishi, Y. Eshita, A. Murashita, M. Mizuno, J. Yoshida, “Characteristics of 2-Diethylaminoethyl(DEAE)-dextran-MMA Graft Copolymer as a Non-viral Gene Carrier,” Nanomedicine:Nanotech.Biol.Med.3,184-191(2007)
- 8) Y. Onishi, Y. Eshita, A. Murashita, M. Mizuno, J. Yoshida, “A Novel Vector of 2-Diethylaminoethyl(DEAE)-dextran-MMA Graft Copolymer for Non-Viral Gene Deliver,” J.Gene Med.10,472(2008)
- 9) N. Karak, S. Maliti, “Dendritic Polymers: A Class of Novel Materials,” J.Polym.Mater.14,107-122 (1997)
- 10) 吉川祐子, 湊元幹太, 吉川研一, “DNA の高次構造スイッチングと遺伝子発現,” 生物物理, 42, 179-184(2002)
- 11) J. B. Schreier, “Modification of Deoxyribonuclease Test Medium for Rapid identification of *Serratia marcescens*,” Am. J.Clin.Pathol.51,711-716(1969)
- 12) Y. W. Yang, J. C. Yang, “Studies of DEAE-dextran-mediated Gene Transfer,” Biotechnol. Biotechnol.Appl.Biochem.25(Pt1),47-51(1997)
- 13) M. Ogris, P. Steinlein, M. Kursa, K. Mechtler, R. Kircheis, E. Wagner, “The Size of DNA/Transferrin-PEI Complexes is an Important Factor for Gene Expression in Cultured Cells,” Gene Ther.5,1425-1433(1998)