

MERIT 長期海外派遣報告書

マテリアル工学専攻博士 2 年 武田香織

1. MERIT エラントリーを通しての長期海外派遣の実現

2015 年 9 月より 2 ヶ月間、ドイツの Friedrich Schiller University Jena 医学部の Dr. Mosig の研究グループで、研究を行わせていただいた。Dr. Mosig は、2015 年 3 月に私が MERIT エラントリーにて講演のため Jena を訪れた際、初めて出会った研究者であった。講演時、私が発表する以外に複数の現地学生の発表を聞く機会をいただいた。その内一人が偶然 Dr. Mosig の研究室の学生であり、発表内容は当時私が特に興味を抱いていた、流れのある環境下での細胞挙動の評価についてであった。折角の機会と考え、急遽その学生に依頼して指導教員である Dr. Mosig に連絡を取っていただき、実験設備の見学をさせていただいた。今回の長期海外派遣は、MERIT エラントリーから 2 ヶ月後に再度 Dr. Mosig と連絡を取り、共同研究を立ち上げる形で実現した。

2. 長期海外派遣中の主な研究成果

私はこれまで、遺伝子治療用の遺伝子キャリアの開発に取り組んできた。治療用遺伝子を標的細胞で発現させることで疾患を治療する遺伝子治療には、近年大きな期待が寄せられている。全身投与型の遺伝子治療の実現に向けては、血中投与されたプラスミド

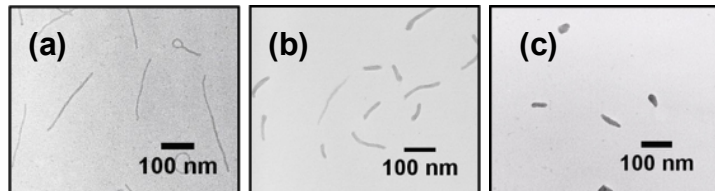


Figure 1. TEM images of PEG-PLys polyplex micelles with PEG-PLys. (a) Long rods (b) Short rods (c) Globules.

DNA (pDNA) を、標的細胞の核まで送達する遺伝子キャリアの開発が不可欠となっている。しかしながら、遺伝子キャリアは血中に存在する DNA 分解酵素による分解や、マクロファージの貪食によって速やかに血中から消失してしまう。従って、血中滞留性の改善が大きな課題となっている。

私は遺伝子キャリアとして、poly(ethylene glycol) (PEG) と poly(L-lysine) (PLys) からなるブロック共重合体 PEG-PLys が、pDNA と静電相互作用により形成する高分子ミセル (polyplex micelles, PMs) を開発してきた。特にその形態制御の観点より研究を進めており、これまでに PMs の形態を主に Long rods, Short rods, Globules の三つに制御する方法論を確立した (Figure 1)。次なるステップとして、これら PMs の体内動態の形態依存性の有無を明らかにしたいと考えてきた。

一方、Dr. Mosig の研究室では、生体内相当のせん断応力下で細胞を培養し、その挙動を評価する手法の開発を行ってきた。これまでに、生体内相当のせん断応力下で培養した細胞を用いることで、従来の静的環境での培養細胞よりも忠実に *in vivo* の細胞挙動を再現できることを報告している。

今回の長期海外派遣では、日本より持参した PEG-PLys により各種形態の PMs を調製し、流れ環境下にて、マクロファージと HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) による PMs の細胞取り込み評価を行った。まず、ヒト血液より採取した単核細胞とヒト臍帯静脈より採取した HUVEC を混合したものを Biochip 中で 5 日間培養し、単核細胞をマクロファージへと分化させた。次に、3 dyne/cm² のせん断応力を与える流れ下で蛍光標識した PMs を与えた。その後、フローサイトメトリーによる蛍光強度測定より、PMs の細胞取り込み量を評価し

た。その結果、興味深いことにマクロファージによる Long rods の取り込みは、Short rods や Globules と比較して大幅に高くなることが明らかとなった (Figure 2a)。一方、HUVEC における取り込みでは、有意な差は確認されなかった。また、炎症性サイトカインである IL-6 および TNF- α の定量を行ったところ、Long rod は他の 2 種と比較して多くのサイトカインを分泌しており、マクロファージによる高い細胞取り込みを支持する結果となった (Figure 2b)。以上より、マクロファージは流れ環境下において、Long rod の形態を有する PMs を多く取り込むものと考えられる。すなわち、*in vivo* 環境でマクロファージによる取り込みを回避するためには、Short rod あるいは Globule のように、長軸長の短い PMs 形態が好ましいであろうことが示唆された。一方、一般に細胞取り込み評価の際に用いられる細胞培養プレートを用いて静的条件下での対照実験を行ったところ、上述のような細胞取り込みの形態依存性は確認されなかった。このことより、静的条件下での細胞取り込みは、生体内相当の流れのもとでの細胞取り込みと異なっていると推察され、PMs の遺伝子キャリアとしての評価においては流れ環境の有無が重要な因子となることが示唆された。

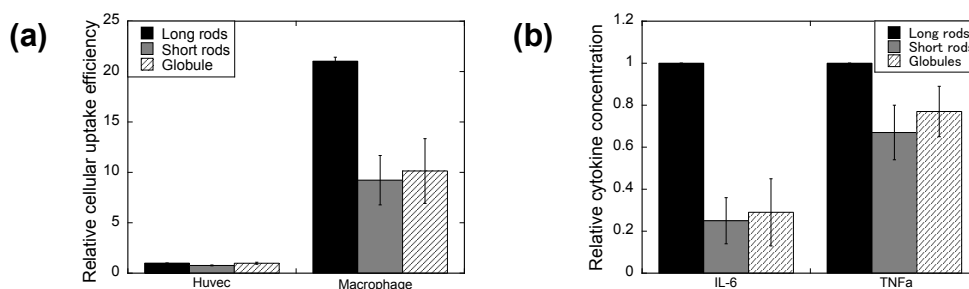


Figure 2. Evaluated cellular activity with PMs under flowing condition with 3 dyne/cm² of shear stress. (a) Cellular uptake efficiency of PMs for Huvec and Macrophage (b) Cytokine release (IL-6 and TNF- α) from co-cultured cells of Huvec and Macrophage.

3. 今後の展開

今回の滞在期間中には、本報告書に記載した以外にも興味深い実験結果をいくつか得ることができた。今後、滞在中お世話になった Marko Gröger 氏のご協力を得て追加実験を行なう。同時に日本でも私が補足実験を進め、共著にて原著論文の執筆を目指す。

4. 謝辞

本長期海外派遣中、実験の計画、手順の説明、結果の考察に至るまで、常に親切に助言をくださった Marko Gröger 氏に心より感謝いたします。また、快く受け入れて頂き多くの建設的アドバイスをいただいた Dr. Mosig をはじめ、受け入れ先研究室の全メンバーに心より感謝いたします。今回このような機会を提供してくださった MERIT プログラムに感謝しつつ、今後一層研究活動に力を入れるとともに、残り1年半の MERIT プログラムを通じていっそうの成長を目指して参ります。



Figure 3. With the lab members.