

マクロファージに対する非凝縮 DNA 送達およびトランスフェクションシステムとしてのアルギン酸カルシウム微粒子

著者：Mansoor Amiji, PhD and Shardool Jain
(Pharmaceutical Engineering, 2012, vol 32, No5, 1-8)

翻訳：栗原 亮介 (Ryohsuke KURIHARA)

はじめに

炎症は、病原体、負傷、および自己免疫反応を含む様々な刺激に応答する体が身に付けた防御機構である^{1,2}。炎症におけるマクロファージの主な機能は、抗原提示、ファゴサイトーシスおよび様々なサイトカインや成長因子の産生物を通じた免疫反応の制御が挙げられる^{1,3}。病原体暴露によって引き起こされる炎症の場合、ファゴサイトーシスの過程は、マクロファージおよび他の免疫細胞の表面で発現している特異的な受容体を介して行われる。また、オプソニン化と呼ばれる過程によって、病原体に抗体や補体断片が付着することで、マクロファージの貪食能が大いに増強する¹。古典的マクロファージ活性化状態は、細胞内病原体の死滅やがん抵抗性によって特徴付けられ、インターフェロン- γ (IFN- γ) 単体あるいはリポ多糖類 (LPS) のような病原体産出物もしくは腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) のようなサイトカインと結合することで誘導される。選択的活性化状態は、IL-4 や IL-13 のようなサイトカインによって誘導され、主に抗炎症性反応や創傷治癒をもたらす。古典経路によるマクロファージの活性化は、高い抗原提示能、高い IL-12、IL-23、一酸化窒素 (NO) および活性酸素種の産生によって特徴付けられる。一方、選択的活性化状態は、IL-10 や IL-1ra サイトカイン、マンノースやスカベンジャー受容体およびアルギナーゼ産生の増加や、誘導型一酸化窒素合成酵素の減少によって特徴付けられる⁴⁻⁶。

したがって、マクロファージの活性化は、悪性腫瘍の増殖や広がり、敗血症、関節リウマチにおける慢性炎症、リソソーム蓄積症、アテローム性動脈硬化症、HIV/AIDS や結核を含む主な感染症などの病状の進行に重大な影響を与えることは明白である。それ故、マクロファージ特異的な過程を対象とした治療的送達戦略の開発は、様々な疾患を治療する可能性を持っている。

アルギン酸塩は、 β -D-マンヌロン酸 (M) と α -L-グルロン酸 (G) 残基を (1 \rightarrow 4) 結合したランダムなブロック共重合体であり、海産褐藻類 (*Phaeophyceae*) の構成成分として自然界に存在し、乾燥物の 40%に含まれる。土壌細菌の莢膜多糖類の構成成分としても存在する⁷。アルギン酸塩は、アメリカ食品医薬品局 (US FDA) により”概ね安全であるとみなされる”すなわち GRAS 材料と考えられており、また、食品、医薬品、化粧品産業を含む様々な産業に応用されている⁸。アルギン酸塩の利用の多くは、カルシウムイオン (Ca^{2+}) のような二価や三価の陽イオン存在下で架橋ヒドロゲルを形成する重合体の能力に依存す

る。

Ca^{2+} イオンが架橋されたアルギン酸塩粒子を形成するために、拡散（外部ゲル化）法を用いて非常に制御された状態で電解質が導入される必要がある。この過程において、 Ca^{2+} イオンは外側の大きな容器からアルギン酸塩溶液へ拡散する。この技術は急速なゲル化速度を示し、また、アルギン酸塩の各液滴がバイオ活性剤を封入した単一のゲルビーズを形成する固相化目的に適している。アルギン酸ナトリウムの分子量や濃度、攪拌条件、添加する Ca^{2+} イオンの割合などの構成パラメータは、ナノメートル領域の粒子を形成するために、さらに最適化することができる¹⁰。

Ca^{2+} -アルギン酸塩ヒドロゲル粒子は、生体適合性や、プラスミド DNA を酵素や pH に起因する分解から保護する能力のため、非ウイルス性遺伝子送達システムにも利用されている。Douglas らは、コントロールと比較して、アルギン酸塩を含んだキトサンをベースにしたナノ粒子が、封入されたプラスミド DNA のトランスフェクション効率を4倍向上させることを報告した¹¹。細胞生存評価、ゲル遅延評価およびトランスフェクション実験より、アルギン酸塩-キトサン/DNA をベースとしたシステムは、より低い細胞毒性や、キトサンをベースとしたナノ粒子のみでは達成されなかった DNase I による分解から DNA を保護し、293T 細胞においてトランスフェクション効率を改善することが示された。さらに、投与 48 時間後において、このグループは、アルギン酸塩-キトサンナノ粒子のトランスフェクション効率が Lipofectamine™ と同程度であることを示した。同様に、Jiang らは、アニオン性生分解性高分子であるアルギン酸塩でコーティングした poly (ethyleneimine) (PEI) /プラスミド DNA 複合体のトランスフェクション効率の改善およびより低い細胞毒性を目指した¹²。そのグループは、アルギン酸塩を含むことで C3 細胞へのトランスフェクション効率が、非コーティング PEI/DNA 複合体と比較して 10-30 倍高くなることを報告した。さらに、アルギン酸塩/PEI/DNA 複合体は、PEI/DNA 複合体単独と比較して、赤血球集合を低減し、C3 細胞に対してより低い細胞毒性を示した。

これまで、タイプ B ゼラチンのような物理的にプラスミド DNA を封入する非凝縮高分子システムは、カチオン性の脂質や高分子と比較して、さらに効率的かつ持続的に導入遺伝子を発現させることが示されてきた^{13,14}。タイプ B ゼラチンベースのナノ粒子は、様々なレポーターおよび治療用プラスミド DNA を用いた全身および経口遺伝子治療に利用されてきた。我々は、非分裂細胞において、非凝縮システムがプラスミド DNA のスーパーコイル構造を維持し、より効率的な核移行を可能にすると仮定してきた。もっとも重要なことは、これら構築物が、カチオン性の脂質や高分子のトランスフェクション試薬と比べ細胞に対して毒性がとて低くことである。遺伝子治療のための非凝縮高分子の応用を進めるために、本研究において、我々は、GFP (すなわち EGFP-N1) を発現するレポータープラスミド DNA を用いた Ca^{2+} アルギン酸塩微粒子を開発し、J774A.1 接着マクロファージ細胞株を用いて送達効率および導入遺伝子の発現を評価した。

材料及び方法

材料

高粘度グレードアルギン酸ナトリウムは Protanal (Norsay) より購入し、塩化カルシウム二水和物は Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) より購入し、脱イオン化蒸留水に溶解させた。高感度緑色蛍光タンパク質 (すなわち EGFP-N1, 4.7 kb) を発現するプラスミド DNA は Clontech より購入し、増幅した後、Elim Biopharmaceuticals (Hayward, Californiam, USA) によって精製した。ローダミン B 標識デキストラン (分子量 70 kDa)、スーパーコイル DNA ラダー (2-16 kb) は Invitrogen (Carlsbad, California, USA) より購入した。アルギン酸リアーゼ酵素は Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, USA) より購入した。Pluronic® F-108 は BASF chemicals (Mount Olive, New Jersey, USA) より購入した。

DNA 封入アルギン酸微粒子の調製

1% (w/v) 中間粘度アルギン酸ナトリウム (Protanal® LF 20/200) 溶液のストック溶液を調製した。同様に、0.5 M 塩化カルシウム二水和物 (分子量 147.02) (Fisher) のストック溶液を調製した。3 ml のアルギン酸ナトリウム溶液を 30G1/2-インチ針が取り付けられた 5 ml シリンジに充填した。そのアルギン酸塩溶液を塩化カルシウム溶液 (27 ml) に 4 枚羽根ラボスターラーを用いて 2,400 rpm で攪拌しながら液滴した。さらに、カルシウムと架橋する前に、Pluronic® F-108 (アルギン酸塩の 0.1% w/w) をアルギン酸ナトリウム溶液に加え、これらの材料を安定化させた。Pluronic® F-108 (PEO) は酸化プロピレン (PO) の 56 残基と酸化エチレン (EO) の 122 残基で構成される共重合体である。生成された粒子の懸濁液を 1,000 rpm で 35 分間遠心分離した。沈殿物を脱イオン水で 2 回洗浄した。沈殿物に 5 ml の脱イオン水を加え懸濁液にして、抗凍結剤として 0.1% (w/w) マンニトール (Acros Organics) を加えた。次に試料を -80°C で凍結乾燥し、その後、粒子ケーキとするために凍結乾燥した。

微粒子材料の特性評価

粒径、表面電荷、および形態学的分析:

ブランクおよび DNA を組込んだ粒子の粒径および表面電荷 (ゼータ電位) は、Massachusetts Institute of Technology (MIT)、Boston, Massachusetts, USA において、Coulter Counter Coulter Particle Size Analyzer を用いて測定した。凍結乾燥材料を凍結乾燥した後に得られた試料は、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて表面形態およびサイズを分析した。試料をアルミニウム試料マウントに取り付け、表面電荷を最小限にするため金-パラジウム合金でスパッタコートした。SEM は、3 kV の加速電圧で Hitachi Instruments' S-4800 environmental scanning electron microscope (San Jose, California,

USA) を用いて行った。

プラスミド DNA の封入および安定性の決定：

カルシウムと架橋する前に、水溶液に溶解させた 20 μg の EGFP-N1 プラスミド DNA をアルギン酸塩溶液に加えた。プラスミド DNA 封入効率は、微小球の高分子マトリックスを酵素アルギン酸リアーゼ (1 mg/ml) と共にリン酸緩衝生理食塩水中 (PBS、pH 7.4) で 24 時間分解した後、PicoGreen[®] dsDNA fluorescence assay (Invitrogen) を用いて測定した。13,000 rpm で 30 分間遠心分離した後、上清を回収し放出された DNA を PicoGreen[®] fluorescence reagent を用いて Bio-Tek Synergy[®] HT マイクロプレートリーダー (Winooski, Vermont, USA) で定量した。各処理条件での封入プラスミド DNA の安定性は、アガロースゲル電気泳動法を用いて評価した。1 mg/ml アルギン酸リアーゼおよびエタノール沈殿を用いたナノ粒子凍結乾燥試料からの DNA 抽出後、試料を 1.2% pre-casted ethidium bromide-stained agarose gels (Invitrogen) に流した。コントロールレーンには 2-16 kb DNA ラダーおよび naked プラスミド DNA 試料を置いた。アガロース電気泳動の後、臭化エチジウム標識 DNA バンドを Kodak FX imager (Carestream, Rochester, New York, USA) を用いて可視化した。

マクロファージ特異的な取り込みおよび細胞毒性評価

細胞培養条件：

J774A.1 接着マウスマクロファージ細胞株は American Type Culture Collection (ATCC Manassas, Virginia, USA) より入手し、T75 培養フラスコで、10%ウシ胎児血清 (FBS Gemini Bio-Products, West Sacramento, California, USA) と組み合わせ penicillin / streptomycin 抗生物質で改変した Dulbecco's modified Eagle 培地 (DMEM Cellgro[®], Mediatech Inc., Manassas, Virginia, USA) を使用して 37°C、5%CO₂ で培養した。細胞は適切な密度になるまで分裂させた。細胞計数は、20 μL の細胞懸濁液を血球計算板スライドに加え、細胞生存率評価はトリパンブルー色素排除試験法を用いて行った。

マクロファージ特異的な粒子の取り込みおよび細胞内局在性：

カルシウム-アルギン酸塩微小球の取り込みおよび細胞内局在性を評価するため、ローダミン-B デキストランを、上記で述べたプラスミド DNA と同様の工程を用いて 1% (w/w) 濃度となるように封入した。粒子を 20,000 個の J774A.1 マクロファージと共に、10%FBS を加えた DMEM 存在下の 6 穴マイクロプレート中のカバーガラス上でインキュベートした。細胞を 1-6 時間の時間依存的に微小球処理した。しかし、ここでは 6 時間の時点のみを示す。蛍光顕微鏡を用いて取り込みと細胞内局在を定性的分析するため、粒子で処理した後、細胞をカバーガラスに置き、6 ウェルマイクロプレートに置かれたカバーガラスを取り除いて滅菌 PBS で洗浄し、きれいなスライドへ反転させた。明視野および蛍光画像は、20x お

よび 40x の原寸において BX51-TRF Olympus 倒立顕微鏡 (Center Valley, Pennsylvania, USA) を用いて取得した。

MTT 試薬を用いた細胞毒性分析:

ブランクおよびプラスミド DNA 封入アルギン酸塩粒子を、10%FBS を補充した DMEM 存在下の 96 穴マイクロプレート中の 10,000 J774A.1 マクロファージと共にインキュベートした。材料の細胞毒性を評価するため、生細胞によって水溶性ホルマザン誘導体に変換される (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide、黄色テトラゾール) 試薬 (MTT Promega, Madison, Wisconsin, USA) を用いた。未処理の細胞をネガティブコントロールとして用い、(1 mg/ml) の濃度において細胞毒性があるカチオン性高分子として知られる poly (ethyleneimine) (PEI; 分子量 10 kDa) をポジティブコントロールとして用いた。封入プラスミド DNA (20 µg) を伴う場合と伴わない場合の微粒子試料の既知量を、200 µL の培養培地で懸濁し、6 時間細胞と共にインキュベートした。滅菌 PBS での洗浄工程の後、ウェルを MTT 試薬で処理し、ホルマザン生成物を可溶化するためにストップミックスを添加し、生細胞における発色性のホルマザン生成物の 570 nm における吸光度を BioTek Synergy HT マイクロプレートリーダーで測定した。パーセント細胞生存率は、未処理の細胞の吸光度値に対する吸光度値より算出した。試料は n = 8 の反復で試験した。

EGFP-N1 プラスミド DNA トランスフェクション実験

レポーター GFP を発現するプラスミド DNA (すなわち EGFP-N1) を封入したアルギン酸カルシウム微小球を、10%FBS を加えた DMEM 存在下の 6-well マイクロプレート中の J774A.1 マクロファージに、200,000 個の細胞あたり等しく 20 µg の DNA 投与量となるように加えた。naked プラスミド DNA とカチオン性脂質トランスフェクション試薬 Lipofectin® (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) との DNA 複合体はコントロールとして用いた。6 時間培養後、余分な粒子を除くためウェルを滅菌 PBS で洗浄し、FBS を加えた DMEM を 2 mL 加えた。定期的に、投与後 24 時間から 96 時間まで、導入遺伝子発現の定量分析を GFP 特異的な酵素結合免疫吸着法 (ELISA) で行った。トランスフェクションした細胞を回収、破碎した細胞抽出物は、BCA Assay (Thermo Scientific-Pierce, Rockford, Illinois, USA) を用いて得られた全細胞内タンパク質濃度に対する GFP 濃度の決定に用いた。96 ウェルマイクロプレートを、1 : 2400 の濃度で希釈した 100 µL の抗 GFP マウスモノクローナル抗体 (Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA) でコートし、25°C で 2 時間インキュベートした。そして抗体コートマイクロプレートを PBS-T 洗浄緩衝液 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) で 5 回洗浄し、200 µL のブロッキング緩衝液 (Thermo Scientific-Pierce, Rockford, Illinois, USA) を用いて室温で 2 時間ブロッキングした。マイクロプレートを再び 5 回洗浄し、細胞溶解液を 100 µL 加え 4°C

で一晩インキュベートした。洗浄緩衝液で広範囲をすすいだ後、100 μ L アルカリホスファターゼ結合ポリクローナル二次抗体 (Novus Biologicals、Littleton、Colorado、USA) を加え室温で1時間インキュベートした。最後に、ウェルに100 μ L の基質を加えマイクロプレートリーダーを用いて409 nmにおける色原体を測定した。校正曲線はGFP (BioVision、Mountain View) を用いて作成し、マクロファージにおける導入GFPのレベルは、全細胞内タンパク質 mg あたりの ng 量として算出した。

EGFP-N1 プラスミド DNA 封入アルギン酸塩粒子と共に J774A.1 マクロファージを培養した後の経時的な GFP 発現の定性的分析を蛍光顕微鏡で分析した。naked プラスミド DNA および Lipofectin® との DNA 複合体はコントロールとして用いた。10%FBS を加えた DMEM が存在する、各ウェルにカバーガラスが入った 6 ウェルマイクロプレートにおいて 200,000 個の細胞あたり等しく 20 μ g の DNA 投与量となるように6時間処置した後、細胞を 37°C でインキュベートした。24 時間から 96 時間の処置後に所定の時間間隔で、カバーガラスを除き、滅菌 PBS で洗浄し、スライドガラスの上に置いた。細胞中の GFP 発現はオリンパス倒立顕微鏡を用いた蛍光顕微鏡法によって可視化した。

統計的データ解析

結果の統計的有意性は、信頼区間 95% ($p < 0.05$) の一元配置分散分析法および Tukey の多重比較検定を用いて決定した。

結果

アルギン酸カルシウム微粒子の調製および特性評価

アルギン酸塩は GRAS 物質であるため様々な用途に使用されてきた。本研究では、マクロファージ特異的な遺伝子送達およびトランスフェクションのための、 Ca^{2+} イオン架橋アルギン酸塩微粒子を調製した。図 1 は、 Ca^{2+} イオン架橋アルギン酸マトリックスを特徴づけるのに使用される "egg box" モデルであるアルギン酸塩の G と M の繰り返し単位の化学構造を示す。表 A は、0.1% (w/w) F-108 Pluronic® で修飾したブランクおよび DNA 封入の最適化されたアルギン酸カルシウム微粒子の粒径および表面電荷を示す。最適化された DNA 封入材料は ~ 800 nm で、表面電荷は平均 -13.5 mV であるが、一方、ブランクの材料は ~ 1 μ m で表面電荷は -8.6 mV であった。さらに、図 2 の SEM の結果より、最適化された DNA 封入料が約 1 μ m の平均粒径を持つ滑らかで球状の形状であることが確認された。

図 3 は、アガロースゲル電気泳動を用いた各処理条件における封入プラスミド DNA の安定性を示す。レーン 1 は 2-16 kb スーパーコイル状二本鎖 DNA ラダー、レーン 2 は開環および環状を示す沈殿した naked EGFP-N1 プラスミド DNA、レーン 3 は 1 mg/ml のアルギン酸リアーゼで 24 時間 37°C で処理したアルギン酸カルシウム微粒子の上清から抽出したプラスミド EGFP-N1 DNA を示す。レーン 4 はアルギン酸リアーゼで処理した粒子を遠

心分離したあと得られた沈殿物を示す。一目瞭然だが、このレーンでプラスミド DNA バンドが観察されなかったことは、24 時間のアルギン酸リアーゼ処理が高分子を完全に分解するのに十分であることを示唆しており、その結果、封入プラスミド DNA の全量が放出され、上清で回収された。概して、これらの結果はプラスミド DNA を効率的に微粒子マトリックス中に保護できることを示している。

さらに、picogreen 分析を用いたプラスミド DNA 封入評価より、プラスミド封入効率はおおよそ 65%であることが明らかになった。

マクロファージにおける微粒子の取り込みおよび細胞毒性

図 4 は、コントロール（未処理細胞）とローダミン標識微粒子の 20x および 40x 倍率における蛍光画像を示す。実験は時間依存的に行ったが、かなりの量のシグナルが観察された 6 時間の時点の蛍光画像のみをここに示す。粒子を DMEM 完全培地中で懸濁し、細胞と共に 6 時間インキュベートし、次に細胞を蛍光顕微鏡で観察した。これらの画像は、アルギン酸塩をベースとする微粒子が投与 6 時間後に J774A.1 マクロファージによって効率的に取り込まれたことを裏付けた。このデータを元に、それに続く細胞毒性および GFP トランスフェクション分析に対して、粒子を細胞と 6 時間共にインキュベートすることを決定した。

コントロールおよび EGFP-DNA プラスミド封入アルギン酸塩粒子を用いて潜在的な細胞毒性があるかを評価するため、材料を J77A.1 マクロファージと共に培養した。生存細胞において、酵素はフェナジメトサルフェート存在下で黄色の MTT 試薬を 570 nm に極大吸収を持つ紫色ホルマザン産物に変換する。細胞生存率の結果は、図 5 に示すように、ブランクおよび DNA 封入材料の両方においても重大な細胞毒性を誘発しないことを裏付けた。どちらの場合も細胞生存率はおおよそ 100%を維持した。一方、1 mg/ml 濃度の PEI で処理した細胞は、重大な細胞毒性をもたらし、6 時間インキュベート後の細胞生存率はおおよそ 35%まで大きく減少した。

定量的および定性的なトランスフェクション分析

GFP 特異的 ELISA（図 6）を、コントロールおよび DNA 封入アルギン酸カルシウム微粒子で処理した J774A.1 マクロファージにおける導入遺伝子発現の定量に使用した。結果は、投与後 24 時間から 96 時間の範囲における経時的な、総タンパク質あたりの細胞内 GFP 濃度を示す。平均すると、投与 24 時間後に最も高い GFP 発現（すなわち 0.65 ng/ml）が観察された。一方、同時間における Lipofectin®および naked プラスミドはそれぞれ 0.41 ng/mg ($p < 0.001$) と 0.05 ng/mg ($p < 0.0001$) の平均導入遺伝子発現であった。その後の時点では、Lipofectin®および naked プラスミド DNA を含むポジティブコントロールと比較して、アルギン酸カルシウム微小球で処理したグループでは GFP レベルは依然としてとても高いままであった。

図 7 は、コントロールおよびアルギン酸塩微粒子材料における EGFP-N1 プラスミド

DNA をトランスフェクションした J774A.1 マクロファージの蛍光顕微鏡画像を用いた定性的な GFP 発現の分析を示す。Lipofectin® とアルギン酸塩材料の両方で見られた GFP 発現は、粒子投与後 24 時間まで現れていた。さらに、naked プラスミド処理したグループではかなり低い蛍光強度も観察された。同じような傾向が 48 時間においても観察され、Lipofectin® および材料を処理したグループは再び顕著な蛍光強度を示した。しかしながら、粒子投与後 96 時間になると、アルギン酸塩粒子処理グループからのシグナル強度は Lipofectin® と比較してはるかに高かった。naked プラスミド DNA のシグナル強度は 24 時間以降、著しく低下した。これらの結果は、DNA 封入アルギン酸カルシウム粒子がトランスフェクション後最大 4 日までより高い導入遺伝子発現を得ることができることを示唆した。

“これらの結果は、多くの急性および慢性消耗性疾患を治療する可能性を持つマクロファージを標的とする抗炎症遺伝子送達システムの開発のための有望な証拠をもたらす。”

ディスカッション

古典的な方法では効率的にタンパク質および核酸を送達する能力を欠いているため、特に薬物の治療レベルを長期間維持する必要がある慢性疾患の場合、遺伝子治療は炎症性疾患の治療に対するエキサイティングな可能性となっている^{15,16}。しかしながら、効率的な遺伝子送達のためには、搭載物を細胞内（エンドソームまたは細胞のファゴリソソームコンパートメント）および細胞外（血清タンパク質/酵素）の障壁から保護する必要がある。したがって、研究者はプラスミド DNA のトランスフェクション効率を改善するためウイルスおよび非ウイルスベクターの両方を使用している¹⁷。しかしながら、ウイルスカウンターパートの主な欠点は発癌性および免疫原性である。同様に、負に荷電した DNA と静電複合体を形成する Lipofectin® や PEI のようなカチオン性凝縮非ウイルス遺伝子送達ベクターは、細胞に対して高い細胞毒性があり、また、核移行のための DNA 放出を妨げる可能性がある^{18,19}。したがって、このシステムを利用する背後にある動機は、物理的なプラスミド DNA 封入に基づく優れた安全性/毒性プロファイルとアニオン性アルギン酸マトリックスの非凝縮性の性質にある。

高粘度グレードのアルギン酸ナトリウムを用いることで、直径がおよそ 1 μm の粒子を再現可能な方法で、材料を最適化することができた。プラスミド DNA の封入効率をおよそ 65% となるように最適化し、プラスミド DNA の安定性を各条件で確認した（図 4）。ローダミンデキストランを封入したアルギン酸塩粒子の細胞への取り込みは、J774A.1 接着細胞で蛍光顕微鏡を用いて評価した。細胞毒性分析より、ブランクおよび DNA 封入粒子は、その後の DNA 送達やトランスフェクションで使用した投与量において、あからさまな毒性を引き起こさないことが示された（図 5）。

DNA 送達やトランスフェクションは EGFP-N1 プラスミドを用いて行った。ELISA による定量的 GFP 発現や蛍光顕微鏡による定性的分析は、アルギン酸塩微粒子が J774A.1 マクロファージに対する遺伝子送達ベクターとして最も効率的であることを示した(図 6, 7)。ファゴ/リソソーム脱出の促進におけるアルギン酸カルシウムマトリックスの正確なメカニズムは十分に検討されていないが、You らの報告によると、架橋アルギン酸塩に使用された Ca^{2+} イオンが細胞内リン酸塩およびクエン酸イオンによって隔離され、浸透圧の上昇につながり、ファゴ/リソソームの膨張や破裂を促進するという可能性が示唆されている²⁰。

結論

マクロファージは体の急性および慢性炎症反応において重要な役割を果たしている。本研究では、マクロファージに対するトランスフェクションのための非凝縮 DNA 送達システムとしてカルシウムイオン架橋アルギン酸塩微粒子を評価した。GFP 発現レポータープラスミド DNA を用いて、マクロファージによる取り込みの増強を示し、システムは PEI などのポジティブコントロールと比較して細胞に対して比較的非毒性であることが見出された。GFP 発現の定量および定性分析は、Lipofectin[®]複合体 DNA を含む他のすべてのコントロールに比べ、アルギン酸カルシウム微粒子で最も高かった。これらの結果は、多くの急性および慢性の衰弱性疾患を治療する可能性を有するマクロファージを標的とする抗炎症性遺伝子送達システムの開発のための有望な証拠を提供する。

本文以上

〈図表の説明〉

図1 (a) 2つの繰り返しモノマー単位—マンヌロン酸 (M) およびグルロン酸 (G) を示したアルギン酸塩の化学構造と (b) カルシウムイオンのような二価陽イオンを持つイオン性ゲル化は”egg box”構造を形成する。

図2 走査型電子顕微鏡の画像は、球状で均一なサイズのプラスミド DNA 封入アルギン酸カルシウム微小球を示す。微小球のうちの一つの高倍率画像は、滑らかな表面形態を示している。

図3 アガロースゲル電気泳動によるプラスミド DNA の安定性評価。レーン1は2~16 kb の DNA ラダー、レーン2は環状とスーパーコイル DNA に対応する二つのバンドを示した沈殿後の naked EGFP-N1 プラスミド DNA、レーン3は1 mg/ml アルギン酸リアーゼで24時間インキュベートした後の微小球材料から抽出した EGFP-N1 プラスミド DNA、レーン4は1 mg/ml アルギン酸リアーゼで処理した材料を遠心分離した後に得られた沈殿物である。

図4 J774A-1 マクロファージにおける細胞取り込みおよびローダミン標識アルギン酸カルシウム微粒子の細胞内局在。上部パネル画像は20x および40x の倍率における未処理細胞であるのに対し、下部パネル画像は20x および40x の倍率におけるローダミン標識微小球で処理した細胞である。

図5 J774A-1 マクロファージにおけるアルギン酸カルシウム微小球の MTT (ホルマザン) 分析による細胞毒性分析。マクロファージにおけるプラスミド DNA 封入材料の細胞毒性を未処理細胞と比較した。poly (ethyleneimine) (PEI、分子量 10 kDa) をポジティブコントロールとした。未処理細胞の細胞生存率を100%とし、他の処理グループで得られた値をコントロールに対して標準化し、生存率パーセントとして示した。報告された値は平均値 ±SD (n=8) である。結果の統計的有意性は、信頼区間 95% (p < 0.05) の一元配置分散分析法および Tukey の多重比較検定を用いて決定した。

図6 コントロールおよび DNA 封入アルギン酸カルシウム微粒子材料でトランスフェクションした24時間、48時間、および96時間後の J774A-1 マクロファージ細胞における緑色蛍光タンパク質 (GFP) 特異的 ELISA を用いた EGFP-N1 プラスミド DNA トランスフェクションの定量的評価。プラスミド DNA の投与量は、200,000 個の細胞あたり 20 µg で一定にした。GFP の量は、BCA 分析を用いて測定した総細胞タンパク質 1mg あたりの濃度 (ng) で示した。値は、平均値 ±SD (n=3) で報告する。結果の統計的有意性は、信頼

区間 95% ($p < 0.05$) の一元配置分散分析法および Tukey の多重比較検定を用いて決定した。

図7 コントロールおよび DNA 封入アルギン酸カルシウム微粒子材料でトランスフェクションした 24 時間、48 時間、および 96 時間後の J774A-1 マクロファージ細胞における EGFP-N1 プラスミド DNA トランスフェクションの定性的評価。処理した細胞の微分干渉コントラスト (DIC) 画像 (A)、未処理細胞の蛍光画像 (B)、ブランクの微小球で処理した細胞 (C)、naked EGFP-N1 プラスミド DNA (D)、Lipofectin® と複合体化した EGFP-N1 プラスミド DNA (E)、アルギン酸カルシウム微小球に封入した EGFP-N1 プラスミド DNA。プラスミド DNA の投与量は、200,000 個の細胞あたり 20 μg で一定にした。すべての画像は、40 \times 原寸で取得した。

表A ブランクおよびプラスミド DNA 封入カルシウムイオン架橋 poly (ethylene glycol) (PEO) 修飾アルギン酸塩微粒子の粒径および表面電荷分析。