

ラット骨格筋遺伝子直接導入法における多価陽イオン,多価陰イオンの影響に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 土井, 建朗 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9233

ラット骨格筋遺伝子直接導入法における多価陽イオン、 多価陰イオンの影響に関する研究

金沢大学医学部医学科神経内科学講座 (主任: 高守正治教授)

土 井 建 朗

遺伝子直接導入において、いかなる機序で生体中の筋細胞が DNA 分子を取り込むかを知る目的で、プラスミド DNA 溶液に多価陰イオン、多価陽イオンの巨大荷電分子および骨格筋細胞基底膜機能を修飾する蛋白分解酵素を加えラット骨格筋内に直接注入し、その遺伝子導入効率を比較した。レポーター遺伝子として大腸菌 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、あるいはホタルルシフェラーゼ遺伝子を使用した。対照実験において、骨格筋で、各レポーター遺伝子の発現が認められ、著者の構築したプラスミドおよび遺伝子導入技術は機能していることを確かめた。プラスミド DNA に混和した種々の物質のうち、グリコサミノグリカン群において、高濃度のヘパリンに有意な CAT 活性の減少を認めた。ヘパリンとプラスミド DNA はともに多価陰イオンの巨大分子であり、高濃度のヘパリンが DNA の細胞内取り込みにおいて競合している可能性が考えられた。また蛋白分解酵素のトリプシンや DNA 分解酵素の混入のないプロテナーゼ K, DNA 分子に静電的に結合すると考えられるポリ-L-リジンにより遺伝子導入は強く阻害された。

Key words direct gene transfer, naked DNA, heparin, glycosaminoglycan

1990年, Wolff らはプラスミド DNA を単独でマウス骨格筋に注入すると、そのプラスミド DNA 上の遺伝子はその骨格筋で発現することを報告した¹⁾。この現象は、遺伝子直接導入法と名付けられ、主としてワクチンとしての利用を目的とする研究が進められた²⁻⁹⁾。また、この技術を応用して、遺伝性筋疾患の遺伝子治療の可能性が検討されてきた⁷⁻¹⁰⁾。その後、精製された DNA そのものが、どのように生体の骨格筋細胞に取り込まれ、どのように核まで運搬されるのか、という機序解明の努力が続けられているが、残念ながら未だ不明のままである¹⁰⁻¹⁹⁾。遺伝子直接導入法は裸の DNA が取り込まれることで注目されたが、本当に裸のまま DNA は取り込まれるのか、蛋白や脂質などを DNA 分子に付随させたりすると遺伝子導入効率に変化が出てくるのであろうか、また、骨格筋の DNA 取り込み機構は DNA 分子を取り込むために骨格筋に本来備わっているものであろうか、などの疑問がある。これらに対し、本研究では、精製された DNA が陰性荷電をもつ巨大分子である点に注目して、同様に陰性荷電の巨大分子であるグリコサミノグリカンが遺伝子直接導入において遺伝子導入効率に影響を与えるのか否かを中心に、DNA 溶液に骨格筋細胞基底膜機能を修飾する可能性のある物質を加え、その影響について検討した。

対象および方法

I. プラスミド構築およびプラスミド DNA の大量調整

pRc/RSV プラスミド (Invitrogen, San Diego, USA) のラウス肉腫ウイルス長末端反復配列 (Rous sarcoma virus long

terminal repeat, RSV-LTR) 由来のプロモーター下流に大腸菌 β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase, β -gal) 遺伝子、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) 遺伝子、あるいはホタルルシフェラーゼ (luciferase, luc) 遺伝子を挿入し、レポーター遺伝子として使用した (図 1)。pRSV- β -gal は pSV- β -gal (Promega, Madison, USA) の β -gal 遺伝子を含む HindIII-BamHI 断片を pRc/RSV の HindIII-NotI 領域に挿入し作成した。pRSV-CAT は pRc/RSV の HindIII-NotI 領域に pSV0-CAT (愛知県心身障害者コロニー発達障害研究所, 滝沢剛則博士より供与) 由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を含む HindIII-HpaI 断片を挿入し作成した。また、pRSV-luc は PGV-B (東洋インキ, 東京) の BglII-HindIII 領域に pRc/RSV の RSV プロモーターを含む BglII-HindIII 断片を挿入し作成した²⁰⁾。

骨格筋への遺伝子導入に使用する DNA は、Sambrook らの方法に従いアルカリ-SDS 法にて抽出後、ポリエチレングリコール (polyethyleneglycol, Sigma, St. Louis, USA) にて精製したものを使用した²¹⁾。

II. プラスミド DNA の骨格筋内注入

生後 2 週齢のウイスター系ラット (平均体重 23g) の大腿部に皮膚切開を加え、大腿四頭筋を露出した。DNA 溶液の注入は、脳定位装置 (図 2) に固定した 28ゲージ注射針 (ミサワ, 東京) を用いて、露出された大腿四頭筋を直接穿刺して行なった。注入時間は 30 秒間とし、注入後、皮膚を縫合した。注入 3 日後、

平成 8 年 7 月 16 日受付, 平成 8 年 9 月 26 日受理

Abbreviations: β -gal, β -galactosidase; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; luc, luciferase; PBS, phosphate-buffered saline; RLU, relative light unit; RSV-LTR, Rous sarcoma virus long terminal repeat; X-gal, 4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

ラットを断頭屠殺し、大腿四頭筋を切除し、これをレポーター遺伝子の発現量の測定に使用した。注入液は、種々の濃度に調製したヘパリン (heparin, Sigma), ヘパリン硫酸 (heparan sulfate, Sigma), スラミン (suramin sodium, フナコシ, 東京), デルマタン硫酸 (dermatan sulfate, Sigma), ヒアルロン酸 (hyaluronate, Sigma), ポリ-L-リジン (poly-L-lysine, Sigma), ヒストン (histone, Sigma), リポフェクチン試薬 (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA), トリプシン (trypsin, Sigma), プロテナーゼ K (proteinase K, 和光純薬, 大阪), コラゲナーゼ (collagenase, Sigma), ヘパリナーゼ (heparinase, Sigma) の各溶液に, プラスミド DNA 20 μ g を加え, 100 μ l の浮遊液 (NaCl 0.9%) とした。

III. β -gal 組織化学染色

DNA (pRSV- β -gal) 溶液注入 3 日後, その大腿四頭筋を切除し, ドライアイスにて十分冷却したアセトン液内で急速凍結を行なった。その凍結筋から, クライオスタットにて 20 μ m の連続切片を作成し, β -gal 組織化学染色を行なった。0.25% グルタルアルデヒドを含む 100mM リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline, PBS) (pH 7.4) で 4 $^{\circ}$ C 10 分間固定後, 氷上で 10 分間ずつ PBS で 3 度洗い, 室温にて自然乾燥した。染色は Sanesら²³⁾の方法に従い行なった。各切片を, 0.5mg/ml 4-クロロ-5-ブromo-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (4-chloro-5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside, X-gal, Sigma), 2mM MgCl₂, 0.02% Nonidet P40 (Sigma), 5mM フェリシアン化カリウム [potassium ferricyanide, K₃Fe (CN)₆], 5mM フェロシアン化カリウム [potassium ferrocyanide, K₄Fe (CN)₆] を PBS に溶解した反応液で, 37 $^{\circ}$ C 17 時間放置後, 滅菌蒸留水で洗いエオジンで対比染色し観察した。

IV. CAT 活性測定

大腿四頭筋の筋切片に溶媒 [25mM Tris-HCl (pH 7.6), 2mM MgCl₂] 200 μ l を加え超音波ホモジナイザーで細胞を破壊, 続いて液体窒素および 37 $^{\circ}$ C 恒温槽による凍結融解を 3 回反復し, 15,860g, 30 分遠心して筋上清を分離した。CAT 活性は Rosenthal²⁴⁾の方法に準じて測定した。得られた筋上清 20 μ l に 80 μ l の基質液, 0.5 μ Ci/ml ¹⁴C-クロラムフェニコール (D-threo-[dichloroacetyl 1-¹⁴C] chloramphenicol, アマシャムジャパン, 東京), 250mM Tris-HCl (pH 7.6) および 1mM アセチル CoA

(acethyl-coenzyme A, Sigma) を加え 37 $^{\circ}$ C 60 分保温した。続いて酢酸エチル (半井, 京都) 500 μ l を加え反応を停止させた。15,860g, 5 分遠心し酢酸エチル層 (上層) を回収し, 遠心エバポレーター VC-96 (太陽, 東京) で蒸発乾固した。20 μ l の酢酸エチルを加え, シリカゲル薄層プレート (MERCK, Art. 5735, Darmstadt, Germany) にスポット後 95:5 比のクロロホルム・メタノール混合液を溶媒としてクロマトチャンパー内で展開した。プレートを取出し風乾し, イメージプレート BAS-III (富士写真フィルム, 神奈川) にて 24 時間露光した後, ラジオイメージアナライザー BA100 (富士写真フィルム) によりクロラムフェニコールのアセチル化率を測定した。

V. ルシフェラーゼ活性測定

凍結筋切片を氷上で径 1mm 程度に細切し, 40 μ l ピッカジン緩衝液 (東洋インキ), 10 μ g/ml ロイペプチン (leupeptin, Sigma) および 1mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, Sigma) 200 μ l を溶解液として, 氷上で 10 分間静置した。軽く均等混合した後, 15,860g, 20 分遠心して筋上清を分離した。ルシフェラーゼ活性はルミノメーター (ルーマット LB9501, ベルトールドジャパン, 東京) を用いて測定した。ピッカジン発光基質液 (東洋インキ) 100 μ l に 20 μ l の筋上清を混和し, 相対的発光量 (relative light unit, RLU) を 30 秒間測定した。

VI. 統計学的検討

本稿に示す CAT 活性およびルシフェラーゼ活性値は, いずれも異なる筋肉に別々にプラスミド DNA を注入した平均値である。同一バッチのプラスミドを注入後, CAT 活性もしくはルシフェラーゼ活性を測定し, 異なる条件下での発現量を比較した。

得られた成績は, 一元配置分散分析法を用い, コントロール群および各群間の組み合わせについて, Dunnett 法および Tukey 法で解析した。危険率 5% 以下を有意と判定した。

成 績

I. β -gal 組織化学染色像 (図 3)

著者の作成したラット骨格筋への遺伝子直接導入系が機能しているか知る目的で, プラスミド注入 3 日目の骨格筋の X-gal 染色の結果を図 3 に示した。陰性対照では β -gal 陽性細胞は認

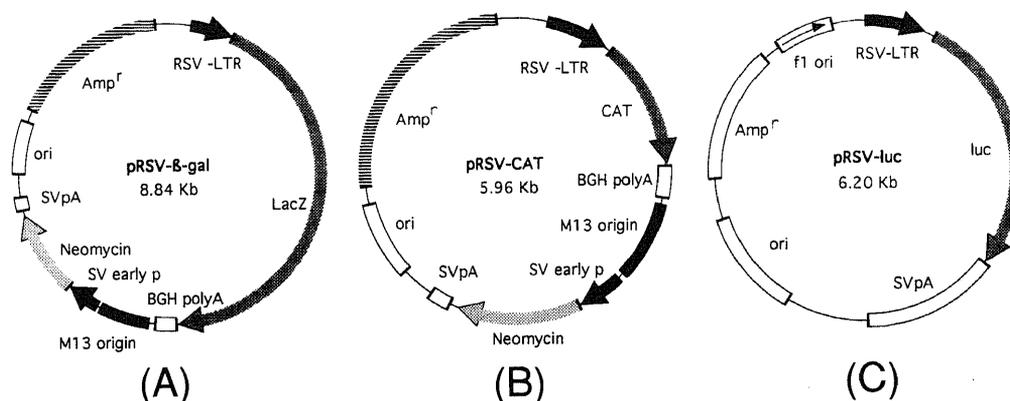


Fig.1. Schematic presentation of the reporter plasmids. (A) pRSV- β -gal, (B) pRSV-CAT, (C) pRSV-luc. ori, origin of replication; Amp^r, β -lactamase gene; LacZ, *Escherichia coli* β -galactosidase gene; BGA polyA, bovine growth hormone poly additional signal; M13 origin, M13 bacteriophage origin; SV early p, simian virus 40 early promoter; neomycin, neomycin resistance gene; SVpA, simian virus 40 poly additional signal; f1 ori, f1 bacteriophage origin.

められなかったが、プラスミドを注入した骨格筋では青く染色された β -gal 陽性細胞が穿刺領域を越えて広く散在性に認められた。

II. 種々のグルコサミノグリカンの遺伝子発現量への影響

1. ヘパリンの阻害作用 (図4)

DNA と同様に巨大分子であり陰性荷電を持ちうるグリコサミノグリカンに注目し、ヘパリンおよびその対照として陰性荷電の乏しいヒアルロン酸を選択し、その阻害効果の濃度依存性を検討した。各々 $10\mu\text{g}$ から 100pg までの6つの濃度群に分け、DNA 溶液に加えて筋注した。ヒアルロン酸には遺伝子導入効率に阻害効果は認められなかったが、 $10\mu\text{g}$ のヘパリン群

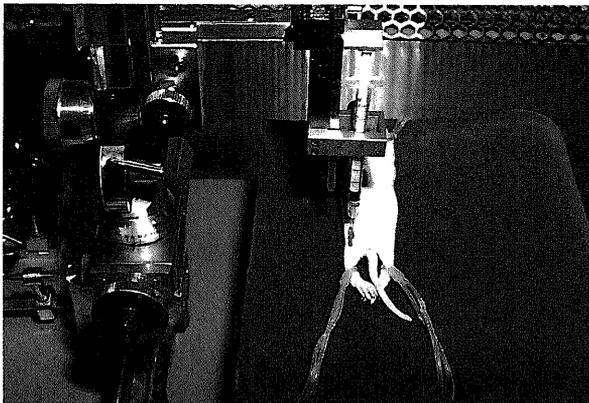
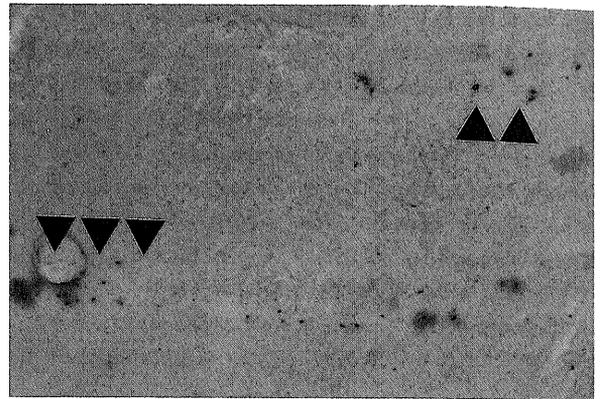
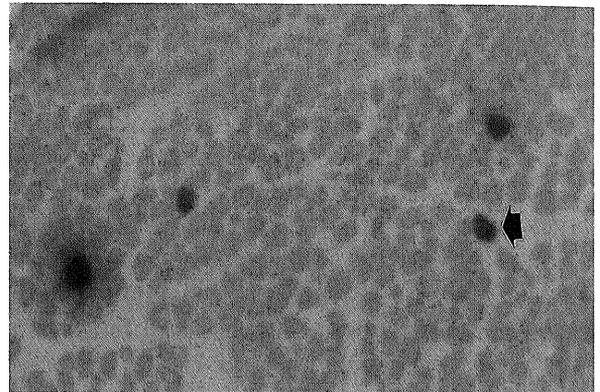


Fig. 2. The injection technique. The right quadriceps muscle was exposed and injected within 30 sec with $20\mu\text{g}$ of plasmid DNA in the presence of various materials in a buffer using a 28-gauge needle fixed to a stereotaxic apparatus. The same amount of plasmid DNA in the buffer was injected into the contralateral uninjured quadriceps muscle.



A



B

Fig. 3. Cytochemical staining of muscle fibers expressing the *Escherichia coli* β -galactosidase. Cross sections of muscle injected with pRSV- β -gal at $\times 10$ (A) and $\times 50$ (B) optical magnification, respectively. Triple arrowhead, site of injection; double arrowhead, β -galactosidase-positive muscle fibers distant from injection site; filled arrow, β -galactosidase-positive muscle fiber. X-gal stain.

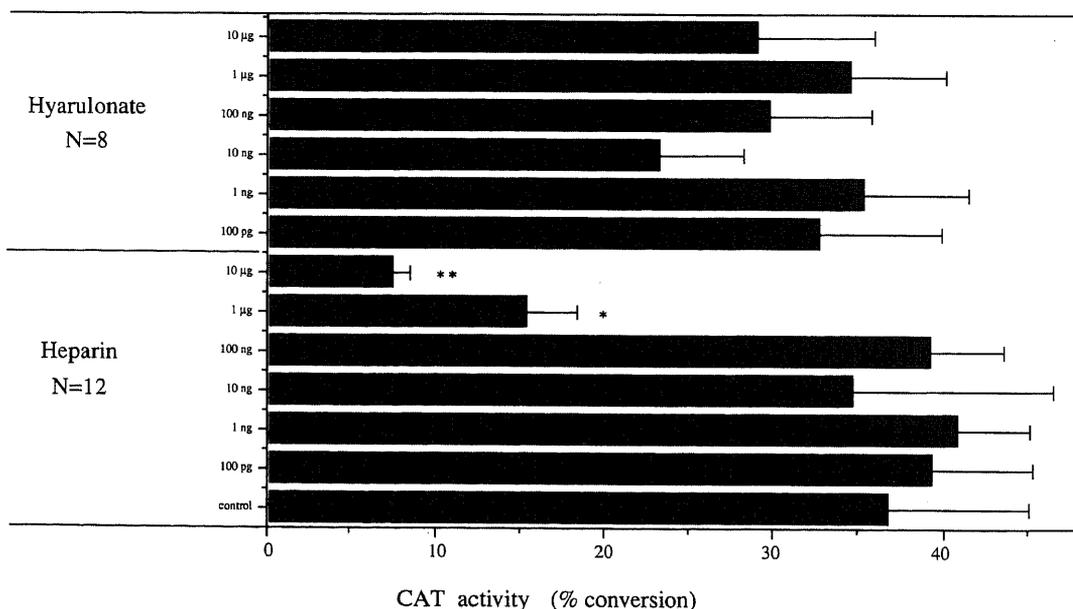


Fig. 4. Effects of heparin and hyarulonate concentration conjoined with RSV-CAT plasmid DNA on the efficiency of transfection of the DNA. "N" indicates the number of muscle specimens analyzed. T bars represent their SEM. * and ** denote values significantly different from the control at $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively.

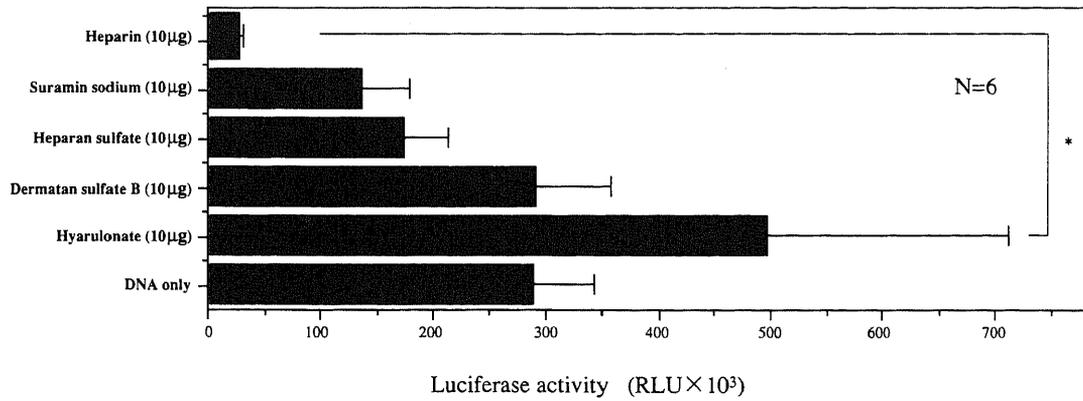


Fig. 5. Effects of glycosaminoglycans coinjected with RSV-luc plasmid DNA on the efficiency of transfection of the DNA. "N" indicates the number of muscle specimens analyzed. T bars represent their SEM. * denotes values significantly different from the hyarulonate at $p < 0.05$.

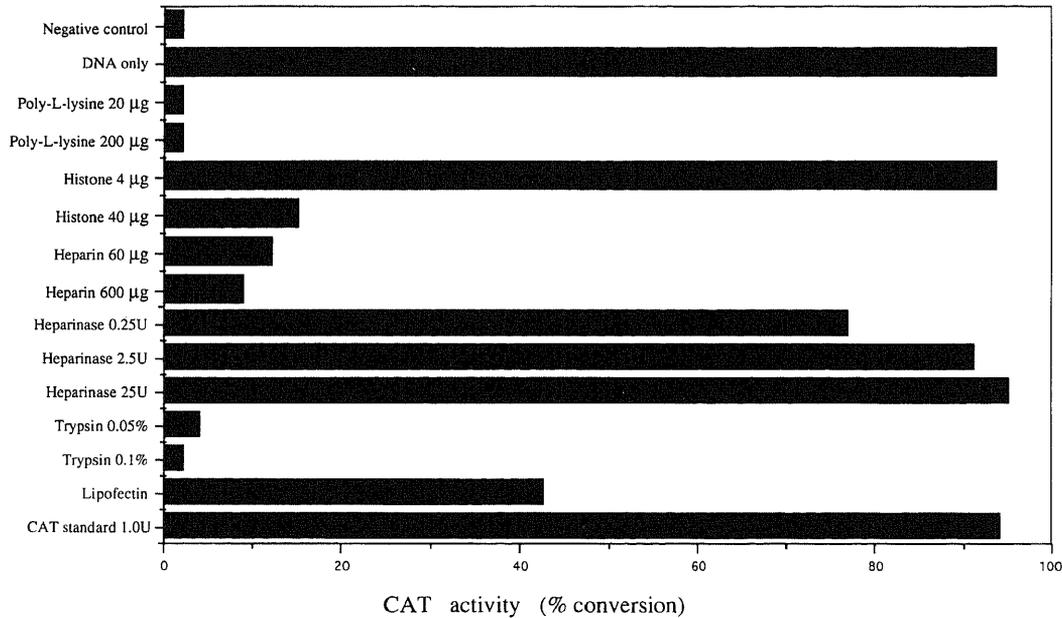


Fig. 6. Effects of various substances coinjected with RSV-CAT plasmid DNA on the efficiency of transfection of the DNA. Co-injection of polycations such as poly-L-lysine and histone with the DNA inhibited the direct gene transfer. Cationic liposome such as lipofectin also moderately inhibited the direct gene transfer.

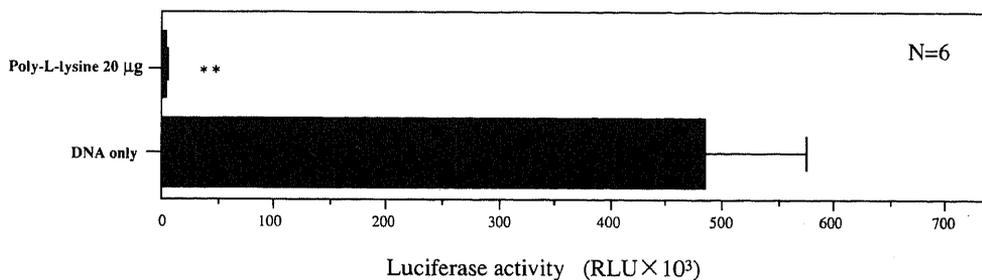


Fig. 7. Effects of poly-L-lysine coinjected with RSV-luc plasmid DNA on the efficiency of transfection of the DNA. "N" indicates the number of muscle specimens analyzed. T bars represent their SEM. ** denotes values significantly different from the DNA only at $p < 0.01$.

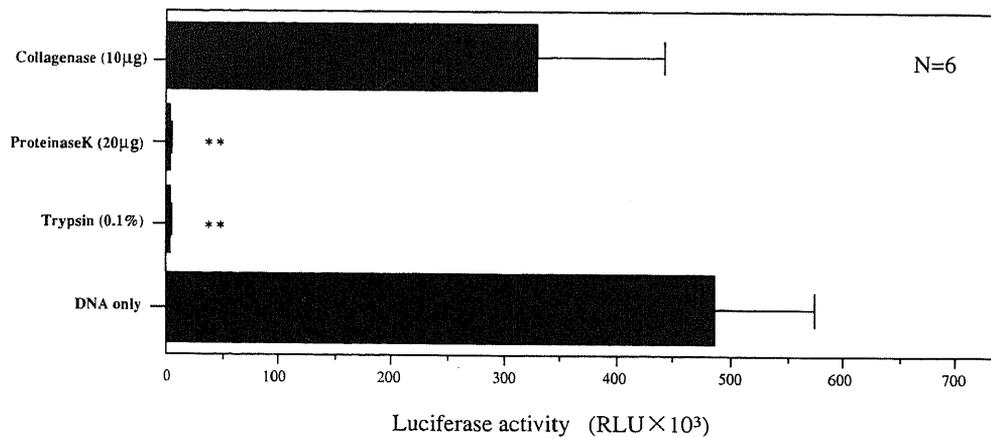


Fig. 8. Effects of proteases coinjected with RSV-luc plasmid DNA on the efficiency of transfection of the DNA. "N" indicates the number of muscle specimens analyzed. T bars represent their SEM. ** denotes values significantly different from the DNA only at $p < 0.01$.

Table 1. Factors inhibiting the direct gene transfer

Isotonic glycerol ^{a)}
Hydroxychloroquine ^{b)}
Heparin ^{c)}
Poly-L-lysine ^{c)}
Trypsin ^{c)}
Proteinase K ^{c)}
Cationic lipids ^{c)}

- a) Wolff et al.¹⁷⁾
 b) Manthorpe et al.²¹⁾
 c) The present study.

において、コントロール群と比較して遺伝子導入効率に対する有意の阻害が認められた。

2. ヘパリン以外のグルコサミノグリカンの影響 (図5)

さらにヘパリン以外のグルコサミノグリカンであるヘパラン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸や低分子のヘパリン類似化合物であるスラミンについて pRSV-luc を利用して遺伝子発現量の比較を試みたが、明らかな遺伝子導入効率の阻害は認められなかった。

Ⅲ. 多価陽イオンの影響 (図6)

DNA と静電的に結合することが予想される多価陽イオンのポリ-L-リジンを DNA 溶液に加えて筋注した場合において、遺伝子導入阻害が認められた (図7)。陽性荷電を持った遺伝子導入試薬であるリポフェクチン試薬にも中等度の阻害傾向が認められた。

Ⅳ. 蛋白分解酵素の影響 (図8)

蛋白分解酵素のトリプシンおよび DNA 分解酵素の混入のないプロテナーゼKにおいても遺伝子導入効率に対する著明な阻害が認められた。これに対し、コラゲナーゼに明らかな遺伝子導入効率の阻害作用は認められなかった。

考 察

著者は、骨格筋への遺伝子直接導入において、高濃度のヘパリンおよびポリ-L-リジン、蛋白分解酵素をプラスミド DNA とともにマウス骨格筋に注入すると、有意に遺伝子導入効率の低

下が認められることを見出した。低濃度のヘパリンおよび他のグリコサミノグリカンには明らかな遺伝子導入効率の低下は認められなかった。表1は遺伝子直接導入法による遺伝子導入実験において、遺伝子導入阻害作用が報告されている溶質および物質の一覧表である。このうちヒドロキシクロキンは、DNA 間入剤 (intercalating drug) として DNA と結合し、DNA 合成を阻害することが知られているが²⁰、著者が見出したポリ-L-リジンの持つ阻害作用はその陽性荷電により DNA と結合することで生ずると考えられた。一方、ヘパリンが阻害因子となるのは、ヘパリンの有する陰性荷電が DNA の細胞内取り込みをはじめとする遺伝子直接導入過程で、DNA と競合する可能性を考慮している。

骨格筋による純粋な DNA の取り込み発現機構は不明であるが、2通りの可能性が指摘されている。第一に直接穿孔により筋細胞膜、場合によっては核膜が破壊され DNA の侵入路が形成されるという説である¹⁹。第二に肝臓、脾臓、皮膚、肺、脳などの他組織に比し、骨格筋で純粋な DNA の取込みおよびその発現が優れているのは、骨格筋の構造的特徴に由来するとする説である。すなわち、多核細胞、筋小胞体および細胞外液を含み筋細胞深く侵入している横細管系の存在が、DNA の取り込みに重要な役割を果たすと考えられている¹¹⁶。著者が X-gal 染色で、その陽性細胞の分布を観察した結果からは、直接穿孔による筋膜破壊機序では説明が困難と考えられた。

骨格筋に特徴的な輸送系に着目して、遺伝子直接導入法の発見者である Wolff ら¹⁶ は陽イオン-金複合体、ポリ-L-リジン-テキサス-レッド複合体、リポフェクチン-DNA 複合体が、マウス骨格筋の外膜を通過できないことを示し、陽性荷電脂質複合体による生体でのプラスミド DNA の遺伝子直接導入は不可能と報告している。また陰性荷電を有する純粋な DNA は外膜を越えて小窩や横細管系に侵入可能であることを示している。しかし同じく陰性荷電を有するポリ-グルタマイト-金複合体は極く少量しか外膜を越えることができないことも示されており、これより純粋な DNA は他の多価陰イオンにはない固有の性質を有すると考えられている。彼らはポトサイトーシスと呼ばれる 1000~2000Da 以下の分子の取り込み機構²⁰を想定して、プラスミド DNA の取り込みを説明しようと試みている。プラ

スミド DNA が環状構造をとれば、最小径で 2nm×4nm となり、ポトサイトーシスの経路を通して DNA が侵入することは充分可能とされるが、果たして DNA に特異的な取り込み機構が存在するかは依然不明のままである。

一方、著者の実験で阻害活性が認められたヘパリンについては、Ryser ら²⁶⁾が培養細胞系において、低効率ながら特異的な受容体を介したエンドサイトーシスで細胞内に取り込まれることを示している。ヘパリンの生体での取り込みは証明されていないが、仮にこの取り込み機構が骨格筋に存在するとすれば、ヘパリンとプラスミド DNA はともに多価陰イオンの巨大分子であり、高濃度のヘパリンが DNA の細胞内取り込みにおいて競合している可能性が考えられる。この場合、阻害様式にはいくつかの可能性が考えられるが、第一に外膜レベルでの競合、第二に DNA と同じくヘパリン分子も外膜を通過できるのであれば、小窩レベルでの競合の可能性にも考慮が必要と思われる。さらに Busch ら²⁷⁾は HeLa 細胞や平滑筋細胞において、細胞外のヘパリンがヘパリン結合蛋白を介して細胞内に取り込まれ、核へ運ばれて Fos-Jun 二量体と結合し一部の遺伝子群の発現を制御すると報告している。この様な系が骨格筋細胞にも存在するとすれば、DNA とヘパリンの競合は細胞内レベル、場合によっては核内レベルまで及ぶ可能性もある。ヘパリンと DNA の間に見られる競合関係が他の多価陰イオンのヘパラン硫酸、デルマトン硫酸、ヒアルロン酸、スラミンにも存在する可能性も示唆されるが、著者の実験で有意差が見られなかったことは、仮に DNA とヘパリンの競合機構があるとすれば、その競合はある程度の特異性を保持していることを示していると思われる。これについては、Moczar ら²⁸⁾がラットの横紋筋肉腫細胞にヘパリンが結合する性質があることから、横紋筋肉腫細胞膜からヘパリン、ヘパラン硫酸、デルマトン硫酸に結合する 19KDa を主体とする蛋白を検出している。著者が見出した結果のうち、トリプシンおよびプロテナーゼ K が著明な遺伝子導入阻害作用を持つのも、骨格筋細胞においても同様のヘパリンなどの多価陰イオンを結合する蛋白が、筋膜又は細胞外に存在し、DNA の細胞内取り込みに重要な役割を果たしていることを示唆しているのかもしれない。

結 論

1. 遺伝子直接導入法により、骨格筋の DNA 取り込み機構に対する阻害因子の研究を行なった。多価陰イオン、多価陽イオン両者に外来遺伝子導入阻害作用を認めた。ヘパリンとプラスミド DNA はともに多価陰イオンの巨大分子であり、高濃度のヘパリンが DNA の細胞内取り込み系や輸送系において競合している可能性が考えられた。

2. ポリ-L-リジンおよび高濃度ヒストンをはじめ陽性荷電を有する脂質においても導入が阻害されることより、DNA の骨格筋への導入には、その陰性荷電が重要と考えられた。

3. 蛋白分解酵素のトリプシンおよび DNA 分解酵素の混入のないプロテナーゼ K に強い導入阻害が認められたことより、遺伝子導入の阻害は蛋白分解酵素に混入する DNA 分解酵素による DNA の分解がその主因とは考えられず、筋の DNA 取り込みに筋膜、または細胞外の蛋白質が重要な役割を果たしていることが予想された。

4. 以上骨格筋肉内への DNA 取り込みの機序は明らかとなっていないものの、骨格筋細胞の表面にも巨大な多価陰イオ

ンの分子を結合させる機構が存在する仮説を提示した。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師金沢大学神経内科高守正治教授に深甚の謝意を表します。また貴重な御助言、多大な御協力を戴いた応用生化学研究所小島久典博士に感謝いたします。なお、本研究の一部は、厚生省「精神・神経疾患研究委託費」筋ジストロフィーおよび類縁疾患の病態と治療法に関する研究(高木班)平成6年度班会議(1994, 東京)および第36回日本神経学会総会(1995, 名古屋)で発表された。

文 献

- 1) Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jan A, Felgner PL. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science 247: 1465-1468, 1990
- 2) Tnag D, Devit M, Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature 356: 152-154, 1992
- 3) Davis HL, Michel M-L, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. Hum Mol Genet 2: 1847-1851, 1993
- 4) Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Hawe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science 259: 1745-1749, 1993
- 5) Yankauckas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dworki VJ, Gromkowski SH. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. DNA Cell Biol 12: 771-776, 1993
- 6) Katsumi A, Emi N, Abe A, Hasegawa Y, Ito M, Saito H. Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. Hum Gene Ther 5: 1335-1339, 1994
- 7) Stratford-Perricaudet LD, Makeh I, Perricaudet M, Briand P. Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. J Clin Invest 90: 626-630, 1992
- 8) Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J, Whalen RG. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. Hum Gene Ther 4: 733-740, 1993
- 9) Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM, Powell JS. Gene expression following direct injection of DNA into liver. Hum Gene Ther 5: 1477-1483, 1994
- 10) Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinge A, Wolff JA, Davies KE. Human dystrophin expression in mdx mice after intramuscular injection of DNA constructs. Nature 352: 815-818, 1991
- 11) Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao S, Jani A, Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. Biotechniques 11: 474-485, 1991

- 12) Jiao S, Williams P, Berg RK, Hodgeman BA, Liu L, Repetto G, Wolff JA. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers *in vivo*. Hum Gene Ther 3: 21-33, 1992
- 13) Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: Factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. Hum Gene Ther 4: 151-159, 1993
- 14) Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. Hum Mol Genet 1: 363-369, 1992
- 15) Manthorpe M, Cornefert-Jensen F, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, Dwarki V. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: Studies on firefly luciferase gene expression in mice. Hum Gene Ther 4: 419-431, 1993
- 16) Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, Repetto G, Berg RK, Ludtke JJ, Williams P, Slautterback DB. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubes and caveolae of mammalian skeletal muscle. J Cell Sci 103: 1249-1259, 1992
- 17) Acsadi G, Jiao S, Jani A, Duke D, Williams P, Chong W, Wolff JA. Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*. New Biol 3: 71-81, 1991
- 18) Sikes ML, O'malley Jr BW, Finegold MJ, Ledley FD. *In vivo* gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection. Hum Gene Ther 5: 837-844, 1994
- 19) Vitadello M, Schiaffino MV, Picard A, Scarpa M, Schiaffino S. Gene transfer in regenerating muscle. Hum Gene Ther 5: 11-18, 1994
- 20) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, 1.53-1.73, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- 21) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed, 1.33-1.41, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- 22) Sanes JR, Rubenstein JLR, Nicolas J-F. Use of a recombinant retrovirus to study post-implantation cell lineage in mouse embryos. EMBO J 5: 3133-3142, 1986
- 23) Rosenthal N. Identification of regulatory elements of cloned genes with functional assays. Methods Enzymol 152: 704-720, 1987
- 24) Neidle S, Pearl LH, Skelly JV. DNA structure and perturbation by drug binding. Biochem J 243: 1-13, 1987
- 25) Anderson RGW, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW. Potocytosis: Sequestration and transport of small molecules by caveolae. Science 255: 410-411, 1992
- 26) Ryser HJ-P, Morad N, Shen W-C. Heparin interaction with cultured cells. Cell Biol Int 7: 923-930, 1983
- 27) Busch SJ, Martin GA, Barnhart RL, Mano M, Cardin AD, Jackson RL. Trans-repressor activity of nuclear glycosaminoglycans on Fos and Jun/AP-1 oncoprotein-mediated transcription. J Cell Biol 116: 31-42, 1992
- 28) Moczar E, Raulais D, Poupon MF, Moczar M. Heparin-binding sites of rat rhabdomyosarcoma cells with low and high metastatic capacity. Invasion Metastasis 11: 158-165, 1991

Effects of Polycations and Polyanions on the Efficiency of Direct Gene Transfer into Rat Skeletal Muscle
Tatsuro Doi, Department of Neurology, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 580—586 (1996)

Key words direct gene transfer, naked DNA, heparin, glycosaminoglycan

Abstract

To explore how naked DNA is taken up and expressed by muscle cells *in vivo*, the reporter genes driven by the RSV-LTR promoter were co-injected with various kinds of polyanions, polycations, or proteases. Heparin, poly-L-lysine and proteases significantly decreased the reporter gene expression. However, other glycosaminoglycans or collagenase had no significant influence on the expression. These results suggested that direct gene transfer was inhibited by heparin and poly-L-lysine in some steps because of their polyanionic or polycationic characters. It was also suggested that trypsin, or DNase-free proteinaseK had a role in interfering with the uptake system of DNA.