

厚生科学研究費補助金

21世紀型医療開拓推進研究事業

新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 橋田 充

平成14(2002)年 4月

目 次

Ⅰ．総括研究報告	
新しい肝がん発症予防法および治療法の開発に関する研究	
橋田 充	1
Ⅱ．分担研究報告	
1．抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤開発とその評価に関する研究	
岡野光夫	5
2．マイクロエマルション担体制剤を用いた肝癌の化学療法と遺伝子治療に関する研究	
米谷芳枝	7
(資料) Fig	
Ⅲ．研究成果の刊行に関する一覧表	12
Ⅳ．研究成果の刊行物・別刷	17

研究要旨 現在、肝細胞癌に対し確実な腫瘍縮小効果あるいは延命効果を有する抗癌剤は少なく、十分な治療効果を保証する標準的な化学療法は確立されていない。肝癌治療が困難な理由として、わが国では、多くの肝癌がウイルス性肝炎、肝硬変を経て多段階的に発症することや、大腸や直腸癌からの転移性癌が多いことが挙げられる。これまでの検討から、ナノ技術を用いて種々の微粒子製剤を開発し、薬物の肝ターゲティング特に肝癌化学療法へ応用において、肝癌の予防と治療には癌の進行度や組織学的特性等を考慮に入れた適切な化学療法あるいは遺伝子治療が有用であることを確認し、その実現に特に組織・細胞特異的デリバリーを可能とする精密な肝ターゲティング技術の確立が必須であることを明らかにしてきた。例えば、肝癌では抗癌剤のナノ粒子製剤の方が薬物単独に比べて効果・毒性が共に高くなる場合もあり薬物の特性に応じた担体（高分子ミセルやリボソーム）の最適化設計・選択が必要であること、さらに、腫瘍縮小効果に優れる抗癌剤併用投与を可能とする抗癌剤ナノ粒子製剤の開発が臨床的に重要性が高いこと等が確かめられ、その基盤構築が臨床的・社会的に極めて重要性の高い課題であることに確信を得た。本研究ではこうした認識のもと、肝癌の病態に応じた最適化された化学療法を実現するために、幅広い特性を有する抗癌剤肝ターゲティング・ナノ粒子製剤を開発し、その動態制御と治療効果をモデル動物を用いて評価して、肝細胞癌に対する化学療法・抗癌剤併用療法の確立を試みた。また、インターフェロン遺伝子治療を目指して、ナノ粒子を利用した細胞特異的デリバリー技術の開発にも取り組んだ。本年度は、研究基盤の確立を目指して、種々のナノ粒子担体（橋田は高分子とリボソーム、岡野は高分子ミセル、米谷はリボソームと脂質エマルション）の調製技術を確認し、その肝ターゲティング特性を評価して、治療応用への可能性を検証した。

岡野 光夫・東京女子医科大学・施設長、教授
米谷 芳枝・星薬科大学・助教授

A. 研究目的

(1) 薬物封入肝能動的ターゲティング・ナノ粒子製剤：抗癌剤は副作用が高く、至適投与量まで投与できない場合が多い。従って、抗癌剤を癌細胞にターゲティングし正常細胞への暴露を防ぐことのできるナノ粒子担体の開発は、临床上極めて有用性が高い。特に、能動的・細胞特異的ターゲティングを可能とするガラクトース、マンノース等の糖残基で修飾したナノ粒子製剤の開発は、機能性ナノテクノロジーとしての視点からも生命科学技術的に重要性が高

く、併せて臨床的にも治療効果の大幅な改善が期待される。(2) 疎水性の高い抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤：抗癌剤のナノ粒子製剤は、ターゲティング機能の付加が可能な製剤として注目されているが、現在1種類しか開発されていない。従って、薬物特性にあったナノ粒子担体の選択、すなわち抗癌作用機構や副作用スペクトルの異なる種々の薬物のナノ粒子製剤開発が必要である。本研究では、カンプトテシン、ビンクリスチン、イリノテカン、アクラシノマイシンやその誘導体を封入したブロックコポリマーから成る高分子ミセルを開発するが、本高分子ミセル製剤は固形癌局所の血管透過性亢進に基づき、肝癌局所に対

する抗癌剤の選択性送達を可能とする。また、トポイソメラーゼ阻害剤、チューブリンの重合阻害など作用機構の異なる抗癌剤を肝癌局所にターゲティングすることにより、従来にはない飛躍的な抗癌活性を有する肝癌化学療法の構築を目指す。(3) 早期肝癌治療用薬物のナノ粒子製剤:肝癌予防と早期肝細胞癌に対する新規治療法の開発を目指し、基本技術を応用して、レチノイン酸やその誘導體、インターフェロンあるいはその遺伝子を封入したナノ粒子製剤を開発することにより、肝癌治療法の拡大を目指す。(4) 肝癌併用化学療法:抗癌剤は併用療法が望ましい。薬物封入肝ターゲティング・ナノ粒子の併用投与による抗腫瘍効果や薬物の体内動態の測定を行い、抗癌剤の選択、薬物投与開始時期、投与量と間隔、投与順序と投与部位を決定することによって、有効性が高く安全性の高い新規肝癌治療法の開発が期待できる。

B. 研究方法

(1) 高分子ミセルナノ粒子の設計:高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリ(β -ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマーをもととし、さらにベンジルエステルを部分的に加水分解した。(2) ビンクリスチン(VCR)含有マイクロエマルジョン(M-VCR)の調製:オレイン酸、ビタミン E、コレステロール、PEG-DSPE を混合後適量のエタノールに溶解し、ロータリーエバポレータにより溶媒を留去した。残存する半固形液に VCR 含有生理食塩水を加えることによりマイクロエマルジョンを形成させ、NaOH により pH を 7.4 に調整した。100 nm のメンブランフィルターによる粒径の調整を行い、VCR 封入率、安定性等を評価した。また、M-VCR の亜急性毒性、抗腫瘍効果とファーマコキネティクスは M5076 担癌マウスを用いて評価した。(3) トリブシン修飾

長期滞留性エマルジョン(T-PEG-M)の調製:DC-コレステロール、PEG-DSPE、オレイン酸ヒドロキシサクシイミドエステルをエタノールに溶解後溶媒を留去し、トリブシン水溶液を加え T-PEG-M を作成する。これに Midkine プロモータで制御された自殺遺伝子プラスミド DNA を加えたマイクロエマルジョンも調製した。HepG2 細胞および膵臓細胞への遺伝子導入を行うとともに担癌マウスにおける遺伝子導入も検討した。また、ガンシクロビルと T-PEG-M による遺伝子治療後の腫瘍のサイズも測定した。(4) インターフェロン(IFN)遺伝子導入による転移性癌細胞増殖の抑制:マウス結腸癌細胞株 CT-26 細胞をマウスの門脈内あるいは尾静脈内に投与することによりそれぞれ転移性肝癌、肺癌モデルマウスを作成した。ホタルルシフェラーゼあるいはマウス IFN- β 、IFN- γ をコードしたプラスミド DNA (それぞれ Mu β 、Mu γ) を常法により作成したものを用いた。肝臓および肺への選択的遺伝子導入を実現する方法としてそれぞれハイドロダイナミクス法による投与、正電荷リポソーム複合体の利用を行った。すなわち、肝臓を対象にした場合には、発現実験大容量(マウス 1 匹当たり 1.6 ml)のプラスミド DNA 生理食塩水溶液を速やかに投与した。また、肺への導入に関しては、プラスミド DNA と DOTMA/cholesterol から成る正電荷リポソームとを電荷比+2.24 で混合し複合体を調製した。得られた複合体を 5%デキストロースに溶解し、マウス尾静脈内に投与した。投与 6 時間後に臓器を摘出し、ルシフェラーゼ活性を測定することにより各条件下での遺伝子発現効率、細胞選択性等を評価した。IFN 遺伝子導入による転移性癌増殖に対する抑制効果は、臓器表面の癌結節数を計数することにより評価した。

動物実験に関しては、各大学の動物実験委員会から使用許可を得た。抗癌剤は有害物質使用許可を得、遺伝子を取り扱う実験に関しては、

組換え DNA 実験計画に関する承認を得た。

C. 研究結果

(1) 高分子ミセルの調製：ポリエチレングリコール-ポリ(β -ベンジル L-アスパルテート) ブロックコポリマーおよび加水分解率が 25 %、50 %、65 % のものはすべて直径 70 nm 程度の高分子ミセルを形成した。(2) M-VCR の調製と評価：M-VCR は 100 nm 程度の球状粒子として調製された。VCR はマイクロエマルジョン化により安定されることが示された。また、遮光下 7 °C で 1 年間は安定であることが明らかとなった。M-VCR は遊離 VCR (F-VCR) よりも有意に亜急性毒性が低下し、抗腫瘍効果は増大した。M-VCR は F-VCR よりも血中に長時間滞留した。(3) T-PEG-M の調製と評価：T-PEG-M の粒子サイズは 113.0 ± 1.3 nm であり、粒子当たり平均 2783 分子のトリプシンが結合したマイクロエマルジョンが得られた。トリプシン修飾マイクロエマルジョンは未修飾マイクロエマルジョンよりも自殺遺伝子の発現が高いことが明らかとなった。担癌マウスでのガンシクロビルと T-PEG-M による癌自殺遺伝子治療の予試験結果からもコントロールと比較して腫瘍サイズが小さく有意に高い抗腫瘍効果が認められた。(4) IFN 遺伝子導入による転移性癌細胞増殖の抑制：Mu β /正電荷リポソーム複合体をマウスに尾静脈内投与することにより肺での高い IFN- β 活性が認められた。また、Mu γ 複合体投与群では高い IFN- γ 活性が認められた。1 \times 10⁵ 個の CT-26 細胞を尾静脈内より移植後 17 日目には肺表面に 150 個以上の結節が形成された。移植後 7 日目に各プラスミド DNA 複合体を 25 μ g DNA/マウスの投与量で投与し、癌移植後 17 日目に肺表面の結節数を計数したところ、Mu β 複合体投与群においてのみ顕著な腫瘍増殖阻害効果が認められ、有意な生存日数延長効果を示した。この Mu β 複合体投与による腫瘍増殖阻害効果

は抗 IFN- β 抗体の腹腔内投与により完全に消失したことから、複合体の効果は肺で発現した IFN- β によるものであることが示された。また、門脈内投与された CT-26 細胞の肝臓での転移性癌細胞増殖は、Mu β および Mu γ のハイドロダイナミクス法による投与により有意に抑制され、中でも Mu β による効果が高かった。この場合には、非特異的な IFN は認められず、その抑制効果は導入遺伝子によるものであると推察された。肝臓での高レベルの IFN 発現は血清中でも十分検出可能であり、肝臓の場合と比較して若干効果は低いものの、肺における転移性癌細胞増殖に対しても抑制的であることも示された。

D. 考察

様々なベンジルエステルの加水分解率でほぼ同じ直径のミセルが形成されたことは、35 % のベンジルエステルでミセル形成に十分な疎水性があるためと考えられる。M-VCR は担癌マウスにおいて高い抗腫瘍効果と低い亜急性毒性を示した。T-PEG-M は高い抗腫瘍効果を示した。また、抗腫瘍活性を有する IFN- β を転移標的臓器に選択的に送達し、効率的な遺伝子発現の実現により、転移性癌細胞増殖を抑制可能であることが示された。IFN は非常に多種多様の免疫調節作用および賦活作用を有し、微量で活性を発揮することが知られている。IFN- β は他の IFN と比較して強い細胞増殖抑制効果を持つことやマクロファージなどの活性化などの生物学的活性を有しており、これらメカニズムを介して抗腫瘍効果を示すと考えられる。今回の検討ではこれらのうちどの作用が抗腫瘍効果に重要な役割を果たしているかは明らかでないが、各メカニズムがそれぞれ抗腫瘍効果に寄与していると思われる。

肝臓への遺伝子導入による癌細胞増殖抑制効果は肝臓で高かったことから、IFN- β による抗腫瘍効果は腫瘍細胞が存在する臓器・組織で

の産生が重要であることが示唆され、IFN 遺伝子の転移標的臓器への選択的導入が転移抑制には重要であることが示された。

E. 結論

様々なベンジルエステルの加水分解率でほぼ同じ直径のミセルが形成可能であった。マイクロエマルジョン化により高い抗腫瘍効果が得られた。また、抗腫瘍活性を有する IFN- β を転移標的臓器に選択的に送達し、効率的な遺伝子発現の実現により、転移性癌細胞増殖を抑制可能であることが示された。抗腫瘍活性を有する IFN- β を転移標的臓器に選択的に送達し、効率的な遺伝子発現の実現により、転移性癌細胞増殖を抑制可能であることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Sakurai F, Nishioka T, Saito H, Baba T, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: the role of the neutral helper lipid. *Gene Ther.* 8: 677-686 (2001).

(2) Kobayashi N, Kuramoto T, Yamaoka K, Hashida M, Takakura Y. Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamics-based procedures. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 297: 853-860 (2001).

(3) Takakura Y, Nishikawa M, Yamashita F, Hashida M. Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic

studies. *Eur. J. Pharm. Sci.* 13: 71-76 (2001)

2. 学会発表

(1) 寺田 武、櫻井文教、山下富義、高倉喜信、橋田充、転移性肺癌モデルマウスのインターフェロン (IFN) 遺伝子導入による抗腫瘍効果、第 17 回日本 DDS 学会、2001 年 7 月 12-13 日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（21世紀型医療開拓推進 研究事業）

分担研究報告書

抗癌剤の高分子ミセル型受動的ターゲティング製剤開発とその評価

分担研究者 岡野光夫 東京女子医科大学教授

研究要旨 難水性の抗ガン剤を安定・高収率で内包し、肝臓ガンへのターゲティングを達成する高分子ミセルキャリアーシステムの構築。

A. 研究目的

水に難溶性の各種抗ガン剤、特にカンプトテシンを安定・高収率で内包し、固形ガン、特に肝臓ガンに効率よく運ぶ高分子ミセルターゲティングシステムを設計・作成する。

B. 研究方法

高分子ミセルを形成するブロックコポリマーとしてポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマーを基とし、さらにベンジルエステルを部分的に加水分解したものを用いた。高分子ミセル形成は動的光散乱によって測定した。

C. 研究結果

ポリエチレングリコール-ポリ(β-ベンジル L-アスパルテート)ブロックコポリマー、及び加水分解率が25%、50%、65%ものはすべて直径70nm程度の高分子ミセルを形成した。

なお、現在までは化学合成実験のみであり、倫理面での問題はない。

D. 考察

様々なベンジルエステルの加水分解率で、ほぼ同じ直径のミセルが形成されたことは、35%のベンジルエステルでミセル形成に十分な疎水性があるためと考えられる。

E. 結論

様々なベンジルエステルの加水分解率で、ほ

ぼ同じ直径のミセルが形成されたことは、35%のベンジルエステルでミセル形成に十分な疎水性があるためと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) T. Nakanishi, S. Fukushima, K. Okamoto, M. Suzuki, Y. Matsumura, M. Yokoyama, T. Okano, Y. Sakurai, and K. Kataoka, "Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin",

J. Controlled Release, 74, 295-302 (2001)

2) Fukashi Kohori, Masayuki Yokoyama, Kiyotaka Sakai, and Teruo Okano, "Process design for efficient and controlled drug incorporation into polymeric micelle carrier systems", J. Controlled Release, 78, 155-163 (2002)

3) 高倉喜信、丸山一雄、横山昌幸、「ドラッグデリバリーシステムとマイクロマシン」、Drug Delivery System, 16 (2), 71-76 (2001)

2. 学会発表

1) 横山昌幸、岡野光夫、温度応答性高分子のDDSへの応用、第17回日本DDS学会、2001.7.12

2) 横山昌幸、高分子ミセルのナノバイオマテリアルとしての応用、第52回医用高分子研究会、

2001.11.22

なし

3) M. Yokoyama and T. Okano, Drug and Gene Targeting Using Polymeric Micelles and Thermo-responsive Polymers, The 6 th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2001.12.20

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1.特許取得

研究要旨 ビンクリスチン(VCR)は抗癌剤として癌化学療法に広く用いられているが、副作用が問題となっている。また、単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子は癌の遺伝子治療に自殺遺伝子として用いられているが、その遺伝子導入効率が低いために臨床応用に限界がある。抗癌剤 VCR と自殺遺伝子の腫瘍部位への薬物・遺伝子集積性を高めるために、薬物担体として注射可能な長期滞留性マイクロエマルジョン(M-VCR)と、遺伝子ベクターとしてトリプシン修飾長期滞留性マイクロエマルジョン(T-PEG-M)を調製した。M-VCR は高い抗腫瘍効果と低い亜急性毒性を示し、T-PEG-M は *in vitro* と *in vivo* で高い抗腫瘍効果を示した。今後は肝癌モデルにおける M-VCR による化学療法と、T-PEG-M による遺伝子治療の併用療法による抗腫瘍効果の可能性を調べる。

A. 研究目的

ビンクリスチン(VCR)は抗腫瘍効果のあるアルカロイドで癌の化学療法に広く用いられているが、副作用が問題となっている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ(HSVtk)遺伝子は癌の遺伝子治療に自殺遺伝子として用いられているが、その遺伝子導入効率が低いために現在、臨床応用に限界がある。抗癌剤 VCR の副作用を減らし、腫瘍部位への薬物集積性を高めるために、VCR の担体として注射可能な長期滞留性マイクロエマルジョンの調製と、遺伝子を腫瘍部位に近づけるために遺伝子ベクターとしてトリプシン修飾長期滞留性マイクロエマルジョンを調製する。各マイクロエマルジョン製剤の抗腫瘍効果を担癌マウスで評価する。

B. 研究方法

VCR の注射可能な長期滞留性マイクロエマルジョン(M-VCR)は次のような修正エタノール注入法で調製した。M-VCR は VCR/オレイン酸/ビタミン E/コレスレテロール/PEG-DSPE (1/5/5/5/5, w/w)からなる。調製はクリーンベンチで行い、すべての試薬はパイロ

ジェンフリー下で滅菌した。各成分を適当量のエタノールに溶解し、エタノールを窒素ガス下でロータリーエバポレーターを用いて留去すると、最終的に半固形液になる。VCR を溶解した適当量の生理食塩液をこの半固形液に入れると直ちにマイクロエマルジョンを形成する。この液を 0.1N NaOH で pH7.4 に調製する。その後 100 nm の孔径のメンブランを 3 回通してから、10ml のアンプルに充填する。M-VCR(o/w)の油相は VCR、オレイン酸とビタミン E、界面活性剤はコレスレテロールからなる。補助界面活性剤は、PEG-DSPE (PEG の分子量 2000)である。M-VCR への VCR への封入率は Sephadex G 50 カラムクロマトグラフィを用いて測定した。M-VCR の安定性は遮光下 7℃で 1 年間保存して、粒子径と VCR の封入率の変化から調べた。M-VCR の亜急性毒性、抗腫瘍効果とファーマコキネティクスは M5076 の担癌マウスで調べた。

トリプシン修飾長期滞留性マイクロエマルジョン(T-PEG-M)は CaCl₂ で安定化したトリプシン/DC-コレスレテロール/PEG-DSPE/オレイン酸・ヒドロキシサクシイミドエステル (1/88/62/2, モル比)からなる。トリプシン以外

のすべての成分をエタノールに溶解し、その後エタノールを留去すると、半固形液になる。これにトリプシン水溶液を加えて T-PEG-M を調製する。T-PEG-M に Midkine プロモーターで制御された自殺遺伝子プラスミド DNA を加えると自動的にマイクロエマルションになる。また、T-PEG-M 中のトリプシンとその活性も定量した。in vitro は HepG2 細胞と臍臓細胞を用いて、in vivo は担癌マウスを用いて遺伝子導入効率を測定した。また、担癌マウスにおいて、ガンシクロビルと T-PEG-M による遺伝子治療後の腫瘍のサイズも測定した。

粒子の状態は、走査電子顕微鏡(日本電子、JEOL JSM-5600LV)によって観察した。

C. 研究結果・考察

調製後の M-VCR と T-PEG-M 粒子の SEM 写真を Figs.1、2 に示す。粒子サイズは共に 100 nm ぐらいで丸い粒子であることが観察された。

M-VCR を遮光下 7℃で 1 年間保存すると、M-VCR の粒子径と VCR の封入率は、138.1 ± 1.2 nm で 94.6 ± 4.7% から、127.1 ± 2.4 nm で 91.3 ± 4.8%(n=3) に変化し、このとき VCR の 7.4 ± 0.3% が分解された。VCR はマイクロエマルションにすると、水中よりもより安定になることが明らかになった。また、この M-VCR は遮光下 7℃で 1 年間では安定であることが明らかになった。

M-VCR はフリー VCR (F-VCR) よりも有意に亜急性毒性は低下し、抗腫瘍効果は高くなった(Fig. 3、Table 1)。M-VCR は F-VCR よりも血中に長く滞留し(Fig. 4)、ファーマコキネティクスから求めた M-VCR の半減期 $t_{1/2}$ と AUC の値のわずかにそれぞれ 6% と 2% が F-VCR の $t_{1/2}$ と AUC の値であった(Table 2)。したがって、M-VCR は F-VCR よりも体内に長く滞留することによって、抗腫瘍効果が高く、亜急性毒性が低下したと推察した。

T-PEG-M の粒子サイズは 113.0 ± 1.3 nm(n=3)であった。T-PEG-M あたりの平均のトリプシンは、 2783 ± 97 分子であり、T-PEG-M あたりの平均のトリプシン活性は、 1294 ± 46 分子であった。In vitro でのトランスフェクションの結果より、Fig. 5 に示すようにトリプシン修飾マイクロエマルションは未修飾マイクロエマルションより、自殺遺伝子の発現が高いことが明らかになった。担癌マウスでのガンシクロビルと T-PEG-M による癌自殺遺伝子治療の予試験結果からも、コントロールに比べて腫瘍サイズが小さく、有意に高い抗腫瘍効果が見られた(n=3)。

D. 考察

E. 結論

M-VCR は担癌マウスにおいて高い抗腫瘍効果と低い亜急性毒性を示した。T-PEG-M は in vitro と in vivo で高い抗腫瘍効果を示した。肝癌モデルにおける M-VCR による化学療法と、T-REG-M による自殺遺伝子治療の併用療法による抗腫瘍効果を今後は調べる予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

王俊平、米谷芳枝、高山幸三、腫瘍標的プロモーターによる自殺遺伝子を含むトリプシン-PEG 修飾マイクロエマルションの調製と抗腫瘍効果、日本薬学会第 122 年会(千葉)、2002 年 3 月予定

Y. Maitani, W. Junping, T. Nagai, K. Takayama, Preparation and antitumor effects of trypsin-modified PEGlated microemulsions as carriers of suicide gene controlled by tumor-targeting promoter, the

Controlled Release Society 29th annual
meeting, 2002, July, Korea

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

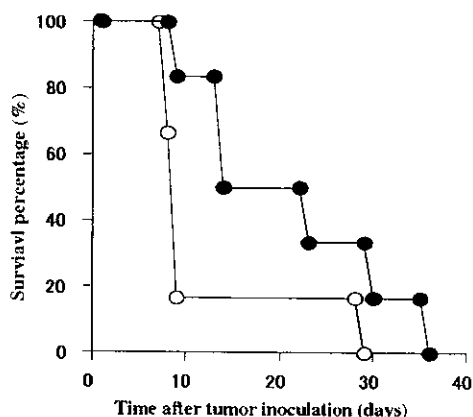


Fig. 1. Acute toxicity comparison of M-VCR) and F-VCR in C57BL/6 mice bearing solid M5076 tumors. On day 5 after tumor inoculation, both agents were administered by single i.v. injection at a dose of 6 mg VCR/kg (n = 12). . , M-VCR; . , F-VCR.

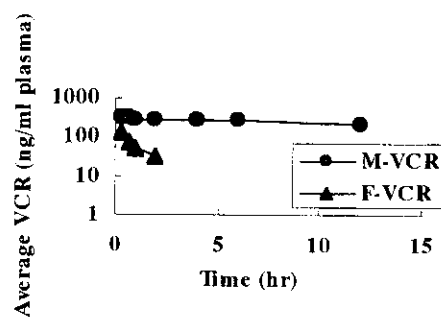


Fig.2 Pharmacokinetics comparison of M-VCR and F-VCR. The dose was 2mg/kg iv injection in C57BL/6mice.

Table 1. Antitumor effect comparison of F-VCR and M-VCR.

Agents	Dose (mg VCR/kg)	MTW (g, \pm SD)	TWR (%)
Blank	Control	1.2 \pm 0.2	---
Vehicle	Control	1.2 \pm 0.3	0
F-VCR	1.25	0.7 \pm 0.2	42 *
M-VCR	1.25	0.4 \pm 0.2	67

Dose: ivx4 with interval of 5 days starting on the day 5 after tumor inoculation.MTW: mean tumor weight. TWR: tumor weight reduction. *, p<0.01.

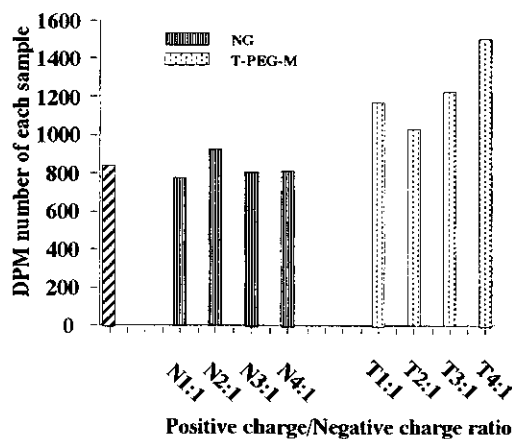


Fig. 3 In vitro transfection efficiency comparisons between T-PEG-M (trypsin-modified PEGlate microemulsion gene delivery system and PEGlated microemulsion gene delivery system.

Table 2. Pharmacokinetic parameters of M-VCR and F-VCR (VCR dose: 2mg/kg, iv administrated in C57BL/6 mice)

Agents	C ₀ (ng/ml)	K _e (1/hr)	TI/2 (hr)	Vd(ml/g)	AUC(. g hr/ml)	Cl(ml/hr/g)
F-VCR	83.32	0.49	1.41	24.00	0.17	11.82
M-VCR	292.45	0.03	25.48	6.84	10.75	0.19

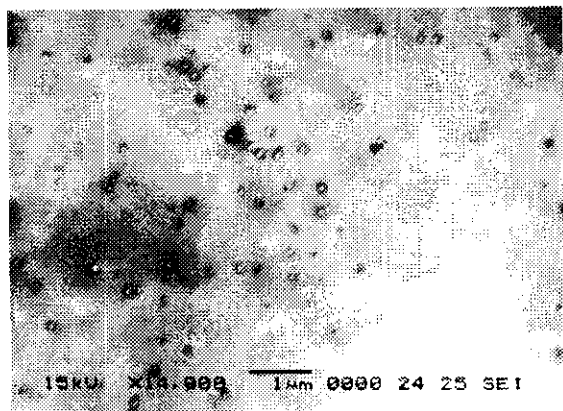


Fig. 4 Scanning electronic micrograph of M-VCR on 50 nm membrane.

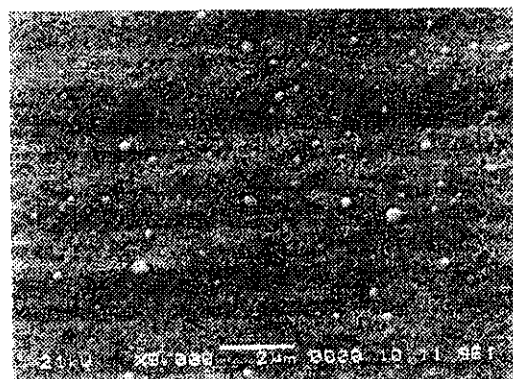


Fig. 4 Scanning electronic micrograph of T-PEG-M on 50 nm membrane.

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Kawakami, A. Sato, M. Yamada, F. Yamashita, M. Hashida	Effect of lipid composition on receptor-mediated in vivo gene transfection using mannosylated cationic liposomes	S. t. p. Pharma sci.	11(1)	117-120	2001
S. Kawakami, C. Munakata, S. Fumoto, F. Yamashita, M. Hashida	Novel galactosylated liposomes for hepatocyte-selective targeting of lipophilic drugs	J. Pharm. Sci.	90(2)	105-113	2001
P. Opanasopit, K. Shiraishi, M. Nishikawa, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida	In vivo recognition of mannosylated proteins by hepatic mannose receptors and mannan-binding protein	Am. J. Physiol.	280	G879-G889	2001
P. Opanasopit, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, M. Hashida	P. Opanasopit, Y. Higuchi, S. Kawakami, F. Yamashita, and M. Hashida	Biochim. Biophys. Acta	1511(1)	134-145	2001
F. Sakurai, T. Nishioka, H. Saito, T. Baba, A. Okuda, O. Matsumoto, T. Taga, F. Yamashita, Y. Takakura, M. Hashida	Interaction between DNA-cationic liposome complexes and erythrocytes is an important factor in systemic gene transfer via the intravenous route in mice: The role of the neutral helper lipid	Gene Ther.	8(9)	677-686	2001
A. Sato, S. Kawakami, M. Yamada, F. Yamashita, M. Hashida	Enhanced gene transfection in macrophages using mannosylated cationic liposomes-polyethylenimine-plasmid DNA complexes	J Drug Targeting	9(3)	201-207	2001
N. Kobayashi, T. Kuramoto, K. Yamaoka, M. Hashida Y. Takakura	Hepatic uptake and gene expression mechanisms following intravenous administration of plasmid DNA by conventional and hydrodynamicsbased procedures	J. Pharmacol. Exp. Ther.	297(3)	853-860	2001
Y. Yabe, N. Kobayashi, T. Nishihashi, R. Takahashi, M. Nishikawa, Y. Takakura M. Hashida	Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by SOD and catalase derivatives	J. Pharmacol. Exp. Ther.	298(3)	894-899	2001
F. Sakurai, T. Nishioka, F. Yamashita, Y. Takakura M. Hashida	Effects of erythrocytes and serum proteins on lung accumulation of lipoplexes containing cholesterol or DOPE as a helper lipid in the single-pass rat lung perfusion system	Eur. J. Pharm. Biopharmaceutics	52	165-172	2001
P. Opanasopit, M. Nishikawa, F. Yamashita,	Pharmacokinetic analysis of lectin-dependent biodistribution of fucosylated bovine serum albumin: A	J. Drug Targeting	9	341-351	2001

Y. Takakura, M. Hashida	possible carrier for kupffer cells				
K. Akamatsu, Y. Yamasaki, M. Nishikawa, Y. Takakura M. Hashida	Synthesis and pharmacological activity of a novel water-soluble hepatocyte-specific polymeric prodrug of prostaglandin E1 using lactosylated poly (L-glutamic hydrazide) as a carrier	Biochem. Pharmacol.	62	1531-1536	2001
P. Opanasopit, M. Sakai, M. Nishikawa, S. Kawakami, F. Yamashita M. Hashida	Inhibition of liver metastasis by targeting of immunomodulators using mannosylated liposome carriers	J. Controlled Release	in press		
Y. Yamasaki, K. Sumimoto, M. Nishikawa, F. Yamashita, K. Yamaoka, M. Hashida Y. Takakura	Pharmacokinetic analysis of in vivo disposition of succinylated proteins targeted to liver non-parenchymal cells via scavenger receptors: importance of molecular size and negative charge density for in vivo recognition by receptors	J. Pharmacol. Exp. Ther.	in press		
M. Nishikawa, A. Tamada, H. Kumai, F. Yamashita M. Hashida	Inhibition of experimental pulmonary metastasis by controlling biodistribution of catalase in mice	Int. J. Cancer	in press		
P. Opanasopit, K. Hyoudou, M. Nishikawa, F. Yamashita M. Hashida	Serum mannan binding protein inhibits mannosylated liposome-mediated transfection to macrophages	Biochim. Biophys. Acta	in press		
Y. Takakura, M. Nishikawa, F. Yamashita, M. Hashida	Development of gene drug delivery systems based on pharmacokinetic studies	Eur. J. Pharm. Sci.	13	71-76	2001
M. Hashida, M. Nishikawa, F. Yamashita, Y. Takakura	Cell-specific delivery of genes with glycosylated carriers	Adv. Drug Delivery Rev.	52	187-196	2001
M. Nishikawa M. Hashida	Nanviral Approaches Satisfying Various Requirements for Effective In Vivo Gene Therapy	Biol. Pharm. Bull.	25(3)	275-283	2002
橋田 充	細胞特異的遺伝子デリバリー	医薬ジャーナル	37(5)	1553-1557	2001
橋田 充	遺伝子デリバリー	分子がん治療	2(3)	188-196	2001
A. Kushida, M. amato, A. Kikuchi T. Okano	Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney(MDCK) cell sheets : the noninvasived harvest from temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces	J.Biomed.Mater.Res.	54	37-46	2001
M. Yamato, O.H.Kwon, M. Hirose, A. Kikuchi T. Okano	Novel Patterned cell co-culture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces	J.Biomed.Mater.Res.	55	137-140	2001
J. Kobayashi, A.Kikuchi, K. Sakai T. Okano	Aqueous chromatography utilizing pH-/temperature-responsive polymers as column matrix surfaces for separation of ionic bioactive	Analytical Chemistry	73(9)	2027-2033	2001

	compounds				
T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi T. Okano	Two-dimensional manipulation of cardiac myocyte sheets utilizing temperature-responsive culture dishes augments the pulsatile activity	Tissue Engineering	7(2)	141-151	2001
N. Nakajima, S. nda, Y. Nakamura, F. Redondo, S. Kohsaka, M. Yamato, A. Kikuchi T. Okano	Intact microglia are cultured and non-invasively harvested without pathological activation using a novel cultured cell recovery method	Biomaterials	22	1213-1223	2001
H. Otsuka, Y. Nagasaki, Y. Horiike, T. Okano K. Kataoka	Novel micropatterned surface fabricated from heterobifunctional poly(ethylene glycol)/polylactide block copolymers for patterned cell culture	J Photopolym Sci Technol	14(1)	101-104	2001
M. Yokoyama M. Kurisawa T. Okano	Influential factors on temperature-controlled gene expression using thermoresponsive polymeric gene carriers	J Artif Organs	4	138-145	2001
M. Yamato, M. Utsumi, A. Kushida, C. Konno, A. Kikuchi T. Okano	Thermo-responsive culture dishes allow the intact harvest of multilayered keratinocyte sheets without disperse by only reducing temperature	Tissue Engineering	7(4)	473-480	2001
T.Nakanishi, S.Fukushima, K.Okamoto, M.Suzuki, Y.Matsumura, M.Yokoyama, T.Okano, Y.Sakurai K.Kataoka	Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin	J.Contorol.Rel.	74	295-302	2001
H. Kanazawa, T. Sunamoto, E. Ayano, Y. Matsushima, A. Kikuchi T. Okano	Temperature-responsive chromatography using poly(N-Isopropylacrylamide) hydrogel-modified silica	Anal. Sci.	18	45-48	2002
T. O. Collier, J. M. Anderson, A. Kikuchi T. Okano	Adhesion behavior of monocyte, macrophages and foreign body giant cells on poly(N-isopropylacrylamide) temperature-responsive surfaces	J Biomed Mater Res	59	136-143	2001
M.Yokoyama T.Okano	A decrease in Sendai virus infection potency by interaction with cationic thermo-responsive polymers	J.Biomater.Sci.Polymer Edn	12(7)	769-782	2001
E. Uchimura, H. Otsuka T. Okano Y. Sakurai	Totally synthetic polymer with lectin-like function : Induction of killer cells by the copolymer of 3-acrylamidophenylboronic acid with N,N-dimethylacrylamide	Biotechnology and Bioengineering	72(3)	307-314	2001
M. Yamato, C. Konno,	Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate	Biomaterials	23	561-567	2002

M. Utsumi, A. Kikuchi T. Okano	patterned cell seeding and co-culture				
F. Kohori, M. Yokoyama, K. Sakai T. Okano	Process design for efficient and controlled drug incorporation into polymeric micelle carrier systems	J.Control.Rel.	78	155-163-8	2002
M.A.Nandkumar, M. Yamato, A. Kushida, C. Konno, M. Hirose, A. Kikuchi T. Okano	Two-demensional cell sheet manipulation of heterotypical co-cultured lung cells utilizing temperature-responsive culture dishes results in long-term maintenance of differentiated epithelial cell function	Biomaterial	23	1121-1130	2002
T. Shimizu, M. Yamato, T. Akutsu, T. Shibata, Y. Isoi, A. Kikuchi, M. Umezu T. Okano	Electrically communicating three-dimensional cardiac tissue mimic fabricated by layered cultured cardimyocyte sheets	J Biomed Mater Res	60	110-117	2002
大和雅之 岡野光夫	細胞シート工学による新しい組織・臓器構築	臨床外科	56(1)	53-60	2001
大和雅之 岡野光夫	ティッシュ エンジニアリング	未来材料	1(3)	33-38	2001
H. Kanazawa, Y. Matsushima T. Okano	Temperature-Responsive Chromatography	Advances in Chromatography	41	311-336	2001
M. Yamato, T. Shimizu, M. Harimoto, M. Hirose, A. Kushida, O. H.Kwon, A. Kikuchi T. Okano	Cell sheet engineering : toward the next generation tissue engineering	Tissue Engineering for Therapeutic Use 5., Ikada and N.Oshima Editors		93-100	2001
M. Yamato T. Okano	Cell sheet engineering for regenerative medicine	Macromol. Chem. Symp.	14(2)	21-29	2001
大和雅之 岡野光夫	細胞基質との接着	再生医工学		33-44	2001
岡野光夫	温度応答性高分子の動的特性とそのバイオメディカル応用	高分子	50	438-441	2001
岡野光夫 大和雅之	組織工学を支える細胞シート工学	組織培養工学	27(10)	21-29	2001
播元政美 岡野光夫	再生医工学の現状と展望	化学と生物	39(10)	671-677	2001
大和雅之 A. マヤナンド クマール 岡野光夫	細胞シート工学:その肺胞再生への可能性	分子呼吸器病	5(5)	87-90	2001
岡野光夫 大和雅之	細胞シートと再生医療	今日の移植	14(5)	549-553	2001
A Kikuchi T. Okano	Pulsatile drug release control using hydrogels	Advanced Drug Delivery Reviews	54	53-77	2002
清水達也	細胞シート工学による心筋組織再生技術	生物と化学	40(1)	48-52	2002

Y. Maitani, S. H. Hwang, S. Tanaka, K. Takayama T. Nagai	Physicochemical characteristics and transfection efficiency of DNA in cationic and neutral liposomes with soybean-derived sterylglucoside into HepG2 cells	J. Pharm. Sci. Technol. Jpn.	61(1)	1-10	2001
S. Ungphaiboon Y. Maitani	In vitro permeation studies of triamcinolone acetonide mouthwashes	Int. J. Pharm.	220(1-2)	111-117	2001
Y. Maitani, H. Soeda, J. Wang K. Takayama	Modified ethanol injection method for liposomes containing . -sitosterol. -D-glucoside	J. Liposome Research	11(1)	115-125	2001
Y. Maitani, K. Kawano, K. Yamada, T. Nagai K. Takayama	Efficiency of liposomes surface-modified with soybean-derived sterylglucoside as a liver targeting carrier in HepG2 cells	J. Contr. Release	75(3)	381-389	2001
S. H. Hwang, K. Takayama Y. Maitani	Liver-targeted gene transfer into a human hepatoblastoma cell line and in vivo by sterylglucoside-containing cationic liposomes	Gene Therapy	8(16)	1276-1280	2001
K. Tamagawa, K. Shimizu, T. Ebine, Y. Maitani, T. Fukui, KiK. Kawai, N. Takahashi	Antitumor efficacy in vitro and in vivo of falconensones, a new type of polyene	Clin. Cancer Res.	7(11)	3551-3558	2001
K. Nakamura, Y. Maitani K. Takayama	Enhancement of FITC-dextran absorption via nasal mucosa by nanoparticle based on . -sitosterol . -D- glucoside and its aglycon	S.T.P. Pharma. Sci.	12(1)	63-68	2001
K. Nakamura, Y. Maitani K. Takayama	Mechanism of the enhancement of nasal absorption of FITC-dextran 4400 by . -sitosterol . -D- glucoside in rabbits	J. Contr. Release	79	147-155	2002
J. Wang, Y. Maitani K. Takayama	Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol and PEG-lipid	J. Pharm. Sci.	in press		

20010552

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。