

厚生労働科学研究研究費補助金

ヒトゲノム・再生医療等研究事業

「静止細胞への非ウイルス性ベクターシステムの開発」に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 石坂幸人

平成15(2003)年3月

目 次

I 総括研究報告書

「静止細胞に対する非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究 石坂幸人	1
--	---

II 分担研究報告

1 「HIV-Vpr由来ペプチドを用いた遺伝子導入」に関する研究 石坂幸人	3
2 「Vpr由来ペプチドを用いた蛋白質輸送システム構築」に関する研究 志村まり	5
3 静止細胞へのウイルス性遺伝子導入ベクターの開発 片岡一則	7

III 研究成果の刊行に関する一覧表	14
--------------------	----

IV 研究成果の刊行物 別冊	16
----------------	----

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム再生医療等研究事業）
総括研究報告書

「静止細胞に対する非ウイルス性遺伝子導入ベクターの開発」に関する研究
主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

研究要旨 Vpr は HIV が静止細胞へ感染する際に重要な役割を担っていることが知られている。Vpr を用いた非ウイルス性ベクターシステムの構築を試みている。Vpr 由来ペプチド Vpr27 を細胞の培養液中に添加すると効率良く核内に取り込まれることが示された。Vpr ペプチドをリコンビナント蛋白質に付加させると、ペプチド同様蛋白質も胞体内に取り込まれた。このペプチドはプラスミド DNA と複合体を形成し、外来遺伝子発現を誘導できたが、必ずし遺伝子発現効率は高く無かった。今後このペプチドの高分子化合物の胞体内トラフィッキング誘導能を応用して、現在開発中のナノミセルの表面に付加することにより、効率的な遺伝子導入システムの可能性を明らかにしたい。

研究組織

主任研究者，国立国際医療センター研究所
石坂幸人

分担研究者，国立国際医療センター研究所
志村まり
東京大学工学部
片岡一則

A 研究目的

静止細胞への外来遺伝子導入を可能にする安全で簡便なベクターシステムの開発は重要であり、突破口を切り開く新しい技術として HIV 改変ベクターが期待されている。HIV はレトロウイルスでありながら、単球細胞などの静止細胞に対しても感染することが可能で、改変 HIV ベクターが現在この目的のために用いられている。しかし、ベクターの安全性や倫理的な側面から、将来的には HIV の特性を生かしながら、より安全性の高い非ウイルスベクターの開発を行うことが重要と考えられる。

HIV アクセサリー遺伝子 Vpr は HIV の静止細胞への感染様式を可能にする因子の一つと考えられており、ウイルス感染後に形成されるウイルス DNA を核内へ輸送する機能が備わっている。そして近年、Vpr のこのような機能を利用した外来遺伝子導入も試みられ、Vpr による外来遺伝子発現増加も期待されるようになった (J Virol 74, 5424-5431, 2000)。

平成 13 年度では Vpr が有するトランス作用に必要な最少ドメインを明らかにした。即ち、96 アミノ酸からなる Vpr のタンパク質の内、C-末 45 個のアミノ酸から C-末側 18 個または 20 個のアミノ酸を欠失した変異体（それぞれ Vp27 及び Vpr25）が効率良く胞体内へ取り込まれる機能を有していた。さらに Vpr27 を β -ガラクトシラーゼに付加し、ヒト臍帯血由来単核球細胞の培養液中に添加すると、約 90% の細胞に同タンパク質の活性が誘導されることが明らかとなった。平成 14 年度では、Vpr25 ま

たは 27 が遺伝子導入ベクターとしての機能を明らかにする一方、タンパク質を用いた形質転換誘導を行うベクター機能もあわせて明らかにする。

B 研究方法

① Vpr27 及び Vpr25 の静止細胞への取り込み

同定されたそれぞれのペプチドにビオチンを付加した形で化学合成し、牛胎児血清無し状態で 3 日間培養した非分裂細胞の培養液中に添加し、一晚 37 度で培養した後、ペプチドの胞体内への取込みの有無をアビジン化 FITC を用いて検出した。

② Vpr27 とプラスミド DNA の複合体形成能と遺伝子導入

プラスミド 100 ng に対して、種々の Vpr27 を添加し、室温で 1 時間放置した後、アガロース電気泳動を行い、DNA の泳動の様子を観察した。

③ Vpr27 とリコンビナント蛋白質の複合体の細胞内への取り込み

リコンビナント GFP を調整し、これに種々のモル比で Vpr27 を-S-S-結合で付加し、培養細胞の培養液中に添加した。一晚置いた後、細胞を固定し、抗 GFP 抗体を用いて取り込まれたリコンビナントを検出した。また、癌抑制遺伝子である p53 の GST 融合蛋白質に同しく Vpr27 を付加し、p53 遺伝子が欠失しているヒト骨肉腫細胞株である SAOS-2 細胞の培養液中に添加した。翌日、細胞を固定し、抗 p53 抗体を用いた免疫染色法により取り込まれた p53 蛋白質を検出した。取り込まれた蛋白質の機能を見るために DNA 損傷誘発因子である MMC を添加し、p53 の核内への移行の有無を同様の方法で解析した。

C 研究成果

① Vpr27 及び Vpr25 の静止細胞への取り込み

牛胎児血清非存在下で 3 日間培養した後、BrdU の取り込みを行い、細胞周期の動きを観察した。その結果、コントロールと比較して これら細胞の

BrdU の取込みは検出されず、G0 期で細胞周期が停止していることが示された。このような細胞の培養液に約 10 ug/ml の濃度で各ペプチドを添加し、一晚 37 度で培養し、ペプチドの胞体内への取込みを解析すると、Vpr27 では核内や細胞質中に、Vpr25 は主として核内にペプチドの集積が認められた。

② Vpr27 とプラスミド DNA の複合体形成能と遺伝子導入

Vpr27 ペプチドとプラスミド DNA の複合体形成の有無をケルシフトを用いて行ったところ、約 100 ng のプラスミド DNA に対して 4 ug 以上の Vpr27 ペプチドを添加するとプラスミド DNA のマイナス荷電が中和されることにより電気泳動上、泳動されないことが明らかになり、2 者が複合体を形成することが示された。リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いて、遺伝子導入効率を定量した。その結果、コントロールのプラスミド DNA により誘導される活性に比較して、ペプチドを添加した群では約 25 倍の遺伝子導入効率の上昇が認められた。

③ Vpr27 とリコンビナント蛋白質の複合体の細胞内への取り込み

GFP 蛋白質に対して Vpr27 ペプチドをモル比として 1:1、3:1 及び 10:1 で付加し、培養液中に添加された蛋白質の胞体内への取り込みを観察した。その結果、モル比の増加に比例して胞体内に取り込まれる量及び頻度が上昇した。また取り込まれた GFP は、主として核内に存在することが示された。P53 遺伝子産物についても同様の方法で胞体内への取り込みを観察した。その結果、3 ug/ml の付加体を添加すると、効率良く細胞質内に取り込まれた。MMC 後、核内への移行を観察したが、核内への移動は認められなかった。

D 考察

Vpr 由来ペプチドが Vpr 自身と同様、細胞の培養液中に添加されるだけで、効率良く胞体内に取り込まれることが示され、さらにこの取込みが細胞の分裂を必要としないことが分かった。特に Vpr25 では、核内に集積する傾向が認められた。Vpr27 を用いた遺伝子導入の可能性が示されたが、導入効率は必ずしも高くは無かった。一方、蛋白質へ付加することにより、究めて効率良く胞体内へのラフィッキングが可能になった。

E 結論

Vpr 由来ペプチドが蛋白質などの高分子を細胞外から胞体内また核内に効率的に運搬させることが分かった。しかし、プラスミド DNA とは複合体を形成するものの、遺伝子発現効率は低く、このペプチドを用いた遺伝子導入を効率的に行うためには、他の

分子との併用して行く必要性が考えられる。分担研究者の片岡博士をはじめとして種々のナノミセルが開発されている。これらナノミセルの内部にはプラスミド DNA が包埋され、遺伝子が標的細胞に導入される。この際、ほとんどがエンドゾームを介した導入であり、エンドゾーム膜が破壊され、遺伝子が胞体内へ流入することが必須である。しかし、エンドゾームから胞体内へのトラフィッキング効率は一般的に低く、遺伝子導入ベクターシステムとして機能させるための大きな障害になっている。今回 Vpr 由来ペプチドは高分子を効率良く核内にも輸送できたことから、今後 Vpr25 または 27 をナノミセルに付加し、遺伝子導入ベクターとしての可能性を明らかにしたいと考えている。

F 健康危険情報 無

G 研究発表

1 論文発表

1 Minemoto, Y, Uchida, S, Ohtsubo, M, Shimura, M, Sasagawa, T, Hirata, M, Nakagama, H, Ishizaka, Y, and Yamashita, K Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation *Archives of Biochemistry and Biophysics*, in press

2 Mishima, T, Mishima, Y, Terui, Y, Katsuyama, M, Yamada, M, Mori, M, Ishizaka, Y, Ikeda, K, Watanabe, J, Mizunuma, N, Hayasawa, H, and Hatake, K Resistance mechanisms of CD133/Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells *J Natl Cancer Inst* 94 1020-1028, 2002

3 Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka, Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K New human myelodysplastic cell line, TER-3 G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV *J Cell Physiol* 191 183-190, 2002

2 口頭発表

1 Shimura, M, and Ishizaka, Y Abnormal mitosis induced by human immunodeficiency virus accessory gene VPR The 18th annual meeting on oncogenes Salk, June, (2002)

H 知的財産権の出願登録状況 (予定を含む。)

- 1 特許取得、出願準備中
- 2 実用新案登録、無
- 3 その他、無

厚生労働科学研究費補助金（ヒトケノム再生医療等研究事業）
分担研究報告書

「HIV-Vpr 由来ペプチドを用いた遺伝子導入」に関する研究
主任研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所

研究要旨 Vpr は HIV が静止細胞へ感染する際に重要な役割を担っていることが知られている。Vpr を用いた非ウイルス性ベクターシステムの構築を試みている。Vpr 由来ペプチド Vpr27 とプラスミド DNA が複合体を形成すること、これを細胞に添加することにより、コントロールと比較して、約 2.5 倍の外来遺伝子導入効率の上昇が得られた。しかし、必ずしも遺伝子発現量は高く無いため、今後このペプチドが有する高分子化合物胞体内トラフィッキング能を応用して、新しい形の遺伝子導入システムの開発が必要であると思われる。

A 研究目的

静止細胞への外来遺伝子導入を可能にする安全で簡便なベクターシステムの開発は重要であり、突破口を切り開く新しい技術として HIV 改変ベクターが期待されている。HIV はレトロウイルスでありながら、単球細胞などの静止細胞に対しても感染することが可能で、改変 HIV ベクターが現在この目的のために用いられている。しかし、ベクターの安全性や倫理的な側面から、将来的には HIV の特性を生かしながら、より安全性の高い非ウイルスベクターの開発を行うことが重要と考えられる。

HIV アクセサリー遺伝子 Vpr は HIV の静止細胞への感染様式を可能にする因子の一つと考えられており、ウイルス感染後に形成されるウイルス DNA を核内へ輸送する機能が備わっている。そして近年、Vpr のこのような機能を利用した外来遺伝子導入も試みられ、Vpr による外来遺伝子発現増加も期待されるようになった (J Virol 74, 5424-5431, 2000)。

平成 13 年度では Vpr が有するトランス作用に必要な最少ドメインを明らかにした。即ち、96 アミノ酸からなる Vpr のタンパク質の内、C-末 45 個のアミノ酸から C-末側 18 個または 20 個のアミノ酸を欠失した変異体（それぞれ Vp27 及び Vpr25）が効率良く胞体内へ取り込まれる機能を有していた。さらに Vpr27 を β -ガラクトシラーゼに付加し、ヒト臍帯血由来単核球細胞の培養液中に添加すると、約 90% の細胞に同タンパク質の活性が誘導されることが明らかとなった。平成 14 年度では、Vpr27 の遺伝子導入ベクターとしての機能を明らかにした。

B 研究方法

① Vpr27 及び Vpr25 の静止細胞への取り込み

同定されたそれぞれのペプチドにビオチンを付加した形で化学合成し、牛胎児血清無し状態で 3 日間培養した非分裂細胞の培養液中に添加し、一晚 37 度で培養した後、ペプチドの胞体内への取込みの有無をアビジン化 FITC を用いて検出した。

② Vpr27 とプラスミド DNA の複合体形成能と遺

伝子導入

プラスミド 100 ng に対して、種々の Vpr27 を添加し、室温で 1 時間放置した後、アガロース電気泳動を行い、DNA の泳動の様子を観察した。ゲルシフトアッセイの結果を基に、一定量のプラスミド DNA に対してペプチドの量を変化させ、細胞に作用させた。

C 研究成果

① Vpr27 及び Vpr25 の静止細胞への取り込み

牛胎児血清非存在下で 3 日間培養した後、BrdU の取り込みを行い、細胞周期の動きを観察した。その結果、コントロールと比較してこれら細胞の BrdU の取込みは検出されず、G0 期で細胞周期が停止していることが示された。このような細胞の培養液に約 10 μ g/ml の濃度で各ペプチドを添加し、一晚 37 度で培養し、ペプチドの胞体内への取込みを解析すると、Vpr27 では核内や細胞質中に、Vpr25 は主として核内にペプチドの集積が認められた。

② Vpr27 とプラスミド DNA の複合体形成能と遺伝子導入

Vpr27 ペプチドとプラスミド DNA の複合体形成の有無をゲルシフトを用いて行ったところ、約 100 ng のプラスミド DNA に対して 4 μ g の Vpr27 ペプチドを添加すると、泳動されないことが明らかになり、2 者が複合体を形成することが示された。リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いて、遺伝子導入効率を定量した。その結果、コントロールのプラスミド DNA により誘導される活性に比較して、ペプチドを添加した群では約 25 倍の遺伝子導入効率の上昇が認められた。

D 考察

Vpr 由来ペプチドが Vpr 自身と同様、細胞の培養液中に添加されるだけで、効率良く胞体内に取り込まれることが示され、さらにこの取込みが細胞の分裂を必要としないことが分かった。特に Vpr25 では核内に集積する傾向が認められた。Vpr27 を用いた

遺伝子導入の可能性が示されたが、導入効率は必ずしも高くは無かった。

E 結論

Vpr 由来ペプチドがプラスミド DNA と複合体を形成し、遺伝子導入が可能になることが示された。そして、ペプチドを添加することにより、プラスミド DNA 単独で細胞に処理した場合の遺伝子導入効率の約 2.5 倍の導入効率の上昇が得られた。しかしこの導入効率は極めて低く、これによって臨床に資することは可能では無い。このペプチドを用いて効率的に遺伝子導入を行うためには、他の分子との併用して行く必要性が示唆される。即ち、分担研究者の片岡博士をはじめとして種々のナノミセルが開発されている。これらナノミセルの内部にはプラスミド DNA が包埋され、遺伝子が標的細胞に導入される。この際、ほとんどがエンドゾームを介した導入であり、エンドゾーム膜が破壊され、遺伝子が胞体内へ流入することが必須である。しかし、エンドゾームから胞体内へのトラフィッキング効率は一般的に低く、遺伝子導入ベクターシステムとして機能させるための大きな障害になっている。今回 Vpr 由来ペプチドは高分子を効率良く核内にも輸送できたことから、今後 Vpr27 をナノミセルに付加し、遺伝子導入ベクターとしての機能を解析したいと考えている。

F 健康危険情報 無

G 研究発表

1 論文発表

1 Minemoto, Y, Uchida, S, Ohtsubo, M, Shimura, M, Sasagawa, T, Hirata M, Nakagama, H, Ishizaka, Y, and Yamashita, K Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation *Archives of Biochemistry and Biophysics*, in press

2 Mishima, T, Mishima, Y, Terui, Y, Katsuyama, M, Yamada, M, Mori, M, Ishizaka, Y, Ikeda, K, Watanabe, J, Mizunuma, N, Hayasawa, H, and Hatake, K Resistance mechanisms of CD13/ Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells *J Natl Cancer Inst* 94 1020-1028, 2002

3 Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K New human myelodysplastic cell line, TER-3 G-CSF specific downregulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase IV *J Cell Physiol* 191 183-190, 2002

2 口頭発表

1 Shimura, M, and Ishizaka, Y Abnormal mitosis induced by human immunodeficiency virus accessory gene VPR The 18th annual meeting on oncogenes

Salk, June, (2002)

H 知的財産権の出願登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得、出願準備中
- 2 実用新案登録、無
- 3 その他、無

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

「Vpr 由来ペプチドを用いた蛋白質輸送システムの構築」に関する研究
分担研究者 志村まり 国立国際医療センター研究所

研究要旨 HIV は静止細胞へ感染することが可能で、アクセサリ一遺伝子産物 Vpr は、ウイルス DNA を細胞質から核内へ運搬させる機能を有している。本研究では、Vpr のこのような機能を用いてリコンビナント蛋白質などのマクロ分子を細胞内に運搬させるための至適条件を設定することを目的としている。Vpr 由来ペプチド Vpr27 を種々のモル比でリコンビナント蛋白質に結合させ、複合体を細胞の培養液中に添加すると、付加したペプチドのモル比に依存して胞体内へ運搬される蛋白質の量が増加した。また細胞内に運搬された EGFP 蛋白質は核内に認められた。今後この機能を利用して、ナノ粒子を直接核内へトラフィッキングさせるためのシステムを開発が必要であると思われた。

A 研究目的

HIV アクセサリ一遺伝子 Vpr には細胞の培養液中に添加されると、胞体内に取り込まれる特性がある。平成 13 年度では Vpr が有するトランス作用に必要な最少ドメインを明らかにした。即ち、96 アミノ酸からなる Vpr のタンパク質の内、C-末 45 個のアミノ酸から C-末側 18 個または 20 個のアミノ酸を欠失した変異体（それぞれ Vp27 及び Vpr25）が効率良く胞体内へ取り込まれる機能を有していた。さらに Vpr27 を β -ガラクトシラーゼに付加し、ヒト臍帯血由来単核球細胞の培養液中に添加すると、約 90% の細胞に同タンパク質の活性が誘導されることが明らかとなった。平成 14 年度では、Vpr27 による高分子の胞体内へのトラフィッキングのための基礎検討を行った。

B 研究方法

① Vpr27 及び Vpr25 の静止細胞への取り込み

同定されたそれぞれのペプチドにビオチンを付加した形で化学合成し、牛胎児血清無しの状態にて 3 日間培養した非分裂細胞の培養液中に添加し、一晚 37 度で培養した後、ペプチドの胞体内への取り込みの有無をアビジン化 FITC を用いて検出した。

② Vpr27 とリコンビナント蛋白質の複合体の細胞内への取り込み

リコンビナント GFP を調整し、これに種々のモル比で Vpr27 を S-S 結合で付加し、培養細胞の培養液中に添加した。一晚置いた後、細胞を固定し、抗 GFP 抗体を用いて取り込まれたリコンビナントを検出した。また、癌抑制遺伝子である p53 の GST 融合蛋白質に同様に Vpr27 を付加し、p53 遺伝子が欠失しているヒト骨肉腫細胞株である SAOS-2 細胞の培養液中に添加した。翌日、細胞を固定し、抗 p53 抗体を用いた免疫染色法により取り込まれた p53 蛋白質を検出した。取り込まれた蛋白質の機能を見るために DNA 損傷誘発因子である MMC を添加し、p53 の核内への移行の有無を同様の方法で解

析した。

C 研究成果

① Vpr27 及び Vpr25 の静止細胞への取り込み

牛胎児血清非存在下で 3 日間培養した後、BrdU の取り込みを行い、細胞周期の動きを観察した。その結果、コントロールと比較して、これら細胞の BrdU の取り込みは検出されず、G0 期で細胞周期が停止していることが示された。このような細胞の培養液に約 10 μ g/ml の濃度で各ペプチドを添加し、一晚 37 度で培養し、ペプチドの胞体内への取り込みを解析すると、Vpr27 では核内や細胞質中に、Vpr25 は主として核内にペプチドの集積が認められた。

② Vpr27 とリコンビナント蛋白質の複合体の細胞内への取り込み

GFP 蛋白質に対して Vpr27 ペプチドをモル比として 1:1、3:1 及び 10:1 で付加し、培養液中に添加された蛋白質の胞体内への取り込みを観察した。その結果、モル比の増加に比例して胞体内に取り込まれる量及び頻度が上昇した。また取り込まれた GFP は、主として核内に存在することが示された。P53 遺伝子産物についても同様の方法で胞体内への取り込みを観察した。その結果、3 μ g/ml の付加体を添加すると、効率良く細胞質内に取り込まれた。MMC 後、核内への移行を観察したが、核内への移動は認められなかった。

D 考察

Vpr 由来ペプチドが Vpr 自身と同様、細胞の培養液中に添加されるだけで、効率良く胞体内に取り込まれることが示され、さらにこの取り込みが細胞の分裂を必要としないことが分かった。特に Vpr25 では、核内に集積する傾向が認められた。Vpr27 を用いた遺伝子導入の可能性が示されたが、導入効率は必ずしも高くは無かった。一方、蛋白質へ付加することにより、究めて効率良くトラフィッキングが誘導された。

E 結論

Vpr 由来ペプチドが蛋白質などの高分子を細胞外から胞体内また核内に効率的に運搬させることが分かった。近年種々のナノミセルが開発され、これらナノミセルの内部にはプラスミド DNA が包埋され、遺伝子が標的細胞に導入される。この際、ほとんどがエンドゾームを介した導入であり、エンドゾーム膜が破壊され、遺伝子が胞体内へ流入することが必須である。しかし、エンドゾームから胞体内へのトランスフェクション効率は一般的に低く、遺伝子導入ベクターシステムとして機能させるための大きな障害になっている。今回 Vpr 由来ペプチドは高分子を効率良く核内にも輸送できたことから、今後 Vpr25 または 27 をナノミセルに付加し、形質転換ベクターとしての機能を解析したいと考えている。

F 健康危険情報 無

G 研究発表

1 論文発表

- 1 Shimura, M and Ishizaka, Y Disrupted nuclear HP1 with premature chromatid separation by epigenetic effects of VPR Submitted
- 2 Minemoto, Y, Uchida, S, Ohtsubo, M, Shimura, M, Sasagawa, T, Hirata, M, Nakagama, H, Ishizaka, Y and Yamashita, K, Loss of p53 induces M-phase retardation following G2 DNA damage checkpoint abrogation Arch Biochem Biophys, in press
- 3 Shimura, M, and Ishizaka, Y, Inhibition by quercetin of micronuclei formation via Vpr, an accessory gene of HIV Recent Res, Devel Cancer 3, 1-5, 2001

2 口頭発表

- 1 Shimura, M, and Ishizaka, Y Abnormal mitosis induced by human immunodeficiency virus accessory gene VPR The 18th annual meeting on oncogenes Salk, June, (2002)

H 知的財産権の出願登録状況（予定を含む。）

- 1 特許取得、出願準備中
- 2 実用新案登録、無
- 3 その他、無

厚生科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

静止細胞へのウイルス性遺伝子導入ベクターの開発

分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科教授

本研究の目的は、生体内異物認識系による排除、ベクター自体の毒性、搭載可能な DNA 分子量に関する制約などの問題点を解決する新しい遺伝子ベクターシステムを、高分子ミセルを基盤として構築し、その遺伝子治療における有用性を明らかとすることにある。本年度は、ミセルを構成するポリカチオンセグメントの構造を制御し、かつミセル表面を形成する親水性の poly(ethylene glycol)末端にリガンドを導入することによって、血清共存下で優れた遺伝子導入が可能なベクター系の構築に成功し、かつ生体内環境応答型ベクター構築のための方法論を確立した。

A 研究目的

近年、ナノテクノロジーという百万分の一ミリ規模の超微小スケールでの集積化技術が長足の進歩を遂げつつある。本分担研究請者である片岡が世界に先駆けて高分子のナノ集積手法に基づいて創製した高分子ナノミセルは、ウイルス（～50ナノメートル）と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究においては図に示すように、遺伝子等

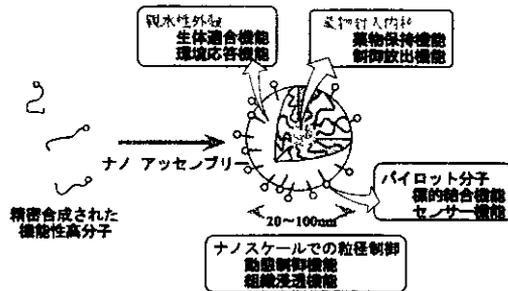


図 高分子ナノテクノロジーに基づく超機能化高分子ミセルの創製

を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時 (timing) に、必要な部位 (location) で、必要な診断や治療 (action)」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出する。

体内動態の正確な制御を達成するために、高分子ミセルのサイズ分布は天然のウイルス並みに狭くなるように揃え、かつ遺伝子やオリゴ核酸など、特性の異なる搭載分子に適合するような内核構造設計を達成する (第1世代)。更に、外殻への効率的な標的指向分子 (センサー分子) の導入法を確

立し、細胞選択的なターゲティングを可能とする (第2世代)。第3世代高分子ミセルにおいては、局所温度変化等の環境変化に鋭敏に応答するように内核・外殻の構造制御を行う。

B 研究方法

1) DNA 内包高分子ミセル調製用ブロック共重合体の合成

poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)ブロック共重合体(PEG-PLL)及び、酸処理によってアルデヒド基に変換が可能なアセタール基(3,3-diethoxy-1-propanol)を末端に有する acetal-PEG-poly(N,N-dimethylaminoethylmethacrylate) (PDMAEMA)ブロック共重合体(acetal-PEG-PDMAEMA)、の合成手法を確立した。構造確認は、GPC 測定及び ^1H NMR 測定により行った。

2) 高分子ミセル型ベクターの調製

pDNA 溶液(10mM TrisHCl,pH7.4)に対し、混合時のカチオン電荷と pDNA のアニオン電荷の比(混合電荷比 $r = [\text{Lys or DMAEMA}] / [\text{Nucleotide}]$)が様々な値となるようにブロック共重合体溶液(10mM Tris-HCl,pH7.4)を加え、DNA 濃度一定で様々な混合電荷比 (r) の高分子ミセルを調製し、動的光散乱法によって平均粒径を決定した。また、高分子ミセル中における pDNA の凝縮程度は、ethidium bromide (EtBr) を用いた dye exclusion assay より評価した。また、Label-IT Nucelic Acid Labeling Kit を用いて、fluorescein と X-rhodamine の二重蛍光標識

を施した pDNA を内包するミセル型ベクターを調製し、492 nm の励起波長を用いる事によって、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の効率から pDNA の凝縮状態を評価した。

3) 高分子ミセル型ベクターの機能評価

発現活性の評価は培養細胞系として 293 細胞あるいは HepG2 細胞を用い、pDNA 導入に基づくルシフェラーゼ活性より評価した。Acetal-PEG-PDMAEMA については、アセタール基をアルデヒド基へ変換した後、ラクトース残基を導入し、ガラクトースレセプターを発現している Hep G2 細胞に対する遺伝子発現効率へのリガンド分子導入の効果を評価した。

4) 環境応答機能を付与したブロック共重合体の合成

血流中で安定に pDNA を保持し、細胞内へ取り込まれることにより不安定化し、pDNA を放出可能な状態へ変化するベクターシステムの構築を目指して、ブロック共重合体の合成を検討した。細胞内の方が血流中と比較して高いグルタチオン濃度であることに着目し、PEG-PLL の PLL 側鎖アミノ基へのチオール基 (SH 基) の導入を検討した。PEG-PLL へ導入された SH 基はミセル内核においてポリマー鎖間のジスルフィド結合 (SS 結合) を生起させることが可能であると予想される。SH 基の導入は、2 種類の試薬 (3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), 2-iminothiolane) を用いて検討した。構造の確認は、¹H NMR 測定により行った。

C 研究結果

1) DNA 内包高分子ミセルの特性解析

PEG-PLL 及び PEG-PDMAEMA のいずれのブロック共重合体についても pDNA との混合比を最適化することにより、平均粒径 90nm 程度の内核に DNA を保持した高分子ミセルが形成されることが動的光散乱測定により確認された。EtBr を用いた dye exclusion assay により pDNA の高分子ミセルへの内包により pDNA が凝縮状態となっていることが示唆された。

PEG-PLL を用いたミセルに関しては、二重標識した pDNA の蛍光スペクトルを 492nm の励起波長で測定したところ、pDNA

がブロック共重合体と complex 化して凝縮することにより、fluorescein を donor、X-rhodamine を acceptor とする FRET が明瞭に観察された。37°C、20%血清中に静置し、経時的に蛍光スペクトルを測定したところ、lipoplex では数分のうちに FRET が消失し、血清の影響による不安定化がごく早期に起こることが示唆された。一方、ミセルではほぼ 24 時間に渡り FRET が明瞭に観察され、非常に優れた安定性を持つことが確認された。この安定化効果は PLL/pDNA よりも優れており、PEG 鎖がベクターの溶解性のみならず安定性の向上にも役立っていることが明らかとなった。

2) 遺伝子導入効率の評価

PEG-PLL 及び PEG-PDMAEMA を用いた場合の遺伝子発現効率をルシフェラーゼ活性により評価した結果、両者ともクロロキン存在下においては、lipofectun に匹敵する高い遺伝子発現効率を示した。クロロキン非存在下においては、PEG-PLL を用いた場合には、ほとんど発現を示さなかったのに対し、PEG-PDMAEMA に関しては、明らかな遺伝子発現が確認された。これは、カチオン性連鎖の pKa の違いによるものであると推測される。PDMAEMA の pKa は、7.4 であり、PLL (pKa=9.5) に比べて低い値である。一般的に、水溶性高分子が細胞内に取り込まれる経路としてはエンドサイトーシスであると考えられているか、高分子ミセル型ベクターについても同様の経路であると仮定すると、低い pKa 値を有するという事は、エンドソーム内で poly(ethylene imine) について報告されているようなバッファー効果と呼ばれる効果が働き、エンドソームから細胞質への移行が高 pKa 値のものと比較して効果的に行われていると推測される。このような違いが遺伝子発現効率での PEG-PLL と PEG-PDMAEMA の違いに起因していると考えられる。クロロキン非存在下でも有意な遺伝子発現効率が確認された PEG-PDMAEMA に関しては、リガンド分子導入効果に関しても評価を行った。ラクトース導入高分子ミセル、未導入高分子ミセル、lipofectamine の 3 つについて遺伝子発現効率の細胞接触時間依存性を評価した。Lactose 導入高分子ミセル型ベクターは 20%血清存在下において、リガンド無しの

ミセル型ベクターに比べて時間依存的に効果的な遺伝子導入が行えることが明らかとなった。リガンドの有無に関わらず高分子ミセル型ベクターは既存のカチオン性脂質を用いた lipoplex 型ベクターに比べて優れた遺伝子導入活性を有していることも明らかであったが、これは FRET による評価で示された血清共存下でのミセル型ベクターの優れた安定性に帰因するものと考えられる。

3) 高分子ミセルへの環境応答機能付与

上述してきたような *in vitro* における遺伝子発現効率も遺伝子ベクターの機能としては重要な因子であるが、*in vivo* 法での投与を考えた場合には、血流中において安定で、細胞内に取り込まれた後に、安定性が変化（不安定化）し、DNA を放出することが理想的である。そこで、グルタチオン濃度が血流中に比べて細胞内で大幅に上昇することを検知して、安定性変化を惹起する高分子ミセル型ベクターを構築するために、新たなブロック共重合体設計を推進した。グルタチオンはシステイン残基を含むオリゴペプチドであり、グルタチオン濃度が異なるということは SH 基濃度が異なるということになる。従って、高分子ミセル内核をブロック共重合体間でのジスルフィド結合により安定化すれば、血流中と細胞内において安定性の違いを誘導できると考えられる。そこで、2種類の試薬を用いて、PEG-PLL への SH 基の導入を検討した。この2種類の試薬（3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), 2-*iminothiolane*) を用いた理由は、SPDP の場合、SH 基を導入すると PLL 側鎖のアミノ基が消失することになりブロック共重合体の荷電密度が低下することになるのに対し、*iminothiolane* の場合には、荷電密度を維持したまま SH 基の導入が可能となる。Polyplex 型ベクターの安定性は、荷電密度が重要な因子であることから、荷電密度と SH 基導入率のバランスを取ることで、理想的な環境応答性及び血流中での安定性を示す高分子ミセル型ベクターの構築が実現できると考えられる。SPDP 及び *iminothiolane* のいずれを用いても PEG-PLL の PLL 連鎖に SH 基の導入が可能であり、その導入効率を制御することが可能であることが確認された。また、SH 基導入 PEG-

PLL と pDNA の間でも PEG-PLL の場合と同様、平均粒径 100nm 程度の高分子ミセル型ベクターが調製可能であることが動的光散乱測定により確認された。

D 考察

1) 達成度について

ブロック共重合体のポリカチオンセグメントの構造を制御し、かつ PEG 末端にリガンドを導入することによって、血清共存下で優れた遺伝子導入が可能なベクター系の構築に成功した。さらに、*in vivo* 法での利用を目指して環境応答機能付与のためのブロック共重合体の分子設計手法を確立した。これより、当初計画を十分に達成する成果が得られたものと判定される。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

凝縮状態にある遺伝子 DNA を親水性外殻が包み込むというウイルス類似の明確な二相構造を特徴とする高分子ミセル型ベクターは溶解性、安定性、生体適合性のいずれにおいても従来から知られている合成ベクターの特性を凌駕するものであり、特に、本年度得られた成果である血清共存下における安定性と遺伝子導入活性の確認は、本システムの将来の臨床応用にとって特筆すべき意義を有している。本研究の成果は国際的にも注目されており、6 研究発表の項に示すように国外における国際研究集会での講演招請という形で表れている。

3) 今後の展望について

次年度以降は、ラクトース以外のリガンドについても検討を行い、本システムの普遍性を検証する。さらには、細胞内分布や核内移行等の *intracellular trafficking* についても検討を行う。また、環境応答機能を付与したシステムの有用性に関して *in vitro* での培養細胞を用いた実験で実証し、さらには、動物実験による *in vivo* 評価を行い、臨床へ向けた最適な高分子ミセル型ベクターシステムを構築していく。

E 結論

以上のように、本研究を通して、高分子ミセル型遺伝子ベクターの生体条件における安定性ならびに遺伝子導入活性を確認する事が出来た。更に、ミセル表層へのリガ

ンド導入法やポリカチオン構造の制御に基づいて広範な性質を有するミセル型ベクターの構築が可能である事が明らかとなり、臨床応用へ向けた素地が築かれたと言える。

F 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性は皆無である。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) H Otsuka, E Uchimura, H Koshino, T Okano, K Kataoka, Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH, *J Am Chem Soc*, **in press**
- 2) N Nishiyama, F Koizumi, S Okazaki, Y Matsumura, K Nishio, K Kataoka, Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin- and cisplatin-incorporated polymeric micelles, *Bioconjugate Chemistry*, **ASAP on the Web**
- 3) G-D Zhang, N Nishiyama, A Harada, D-L Jiang, T Aida, K Kataoka, pH-sensitive assembly of light-harvesting dendrimer zinc porphyrin bearing periphery groups of primary amine with poly(ethylene glycol)-b-poly(aspartic acid) in aqueous solution, *Macromolecules*, **36**(4), 1304-1309 (2003)
- 4) E Jule, Y Nagasaki, K Kataoka, Lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity towards a protein bed simulating a cell surface A surface plasmon resonance study, *Bioconjugate Chemistry*, **14**(1), 177-186 (2003)
- 5) N Nishiyama, H R Stapert, G-D Zhang, D Takasu, D-L Jiang, T Nagano, T Aida, K Kataoka, Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy, *Bioconjugate Chemistry*, **14**(1), 58-66 (2003)
- 6) E Jule, Y Nagasaki, K Kataoka, A surface plasmon resonance study on the

interaction between lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles and lectins immobilized on a gold surface, *Langmuir*, **18**(26), 10334-10339 (2002)

- 7) Y Yamamoto, K Yasugi, A Harada, Y Nagasaki, K Kataoka, Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *Journal of Controlled Release*, **82**(2-3), 359-371 (2002)
 - 8) K Itaka, A Harada, K Nakamura, H Kawaguchi, K Kataoka, Evaluation by fluorescence resonance energy transfer of the stability on nonviral gene delivery vectors under physiological conditions, *Biomacromolecules*, **3**(4), 841-845 (2002)
 - 9) Y Kakizawa, K Kataoka, Block copolymer self-assembly into monodispersive nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate, *Langmuir*, **18**(2), 4539-4543 (2002)
 - 10) M Harada-Shiba, K Ymauchi, A Harada, K Shimokado, K Kataoka, Polyion complex micelles as a vector for gene therapy -Pharmacokinetics and in vivo gene transfer-, *Gene Therapy*, **9**(6), 407-414 (2002)
 - 11) Y Kakizawa, K Kataoka, Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv Drug Deliv Rev*, **54**(2), 203-222 (2002)
 - 12) N-P Huang, G Csucs, K Emoto, Y Nagasaki, K Kataoka, M Textor, N D Spencer, Covalent attachment of novel poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactic acid) block copolymeric micelles to TiO₂ surfaces, *Langmuir*, **18**(1), 252-258 (2002)
- ##### 2 学会発表
- 1) K Kataoka, Development of a non-viral gene vector based on the self-assembly of charged block copolymers, Symposium on "Carrier-based Drug

- Delivery" (223rd Spring National Meeting of American Chemical Society), Orlando, Florida, USA, 2002 4 9 (招待講演)
- 2) K Kataoka, N Nishiyama, H R Stapert, G-D Zhang, D-L Jiang, T Aida, Polyion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer porphyrins for photo-dynamic therapy, 3rd Asian International Symposium on Polymeric Biomaterials Science, Chien Tan Overseas Youth Activity Center, Taipei, ROC, 2002 4 14 (招待講演)
 - 3) K Kataoka, Multi-functional block copolymer micelles as vehicle for gene and drug delivery -Toward artificial viruses-, Seminar at University of Alabama Huntsville, University of Alabama Huntsville, USA, 2002 4 19 (招待講演)
 - 4) K Kataoka, Core-shell nano-assembly of block copolymers for gene and drug delivery, Particles 2002, Orlando, Florida, USA, 2002 4 21 (招待講演)
 - 5) 片岡一則, ナノテクフロンティアとしての DDS ケミカル・ナノマシンへの挑戦, 新適塾「21世紀の薬箱」第47回会合「次世代遺伝子治療を目指したベクター開発」, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 2002 5 27 (招待講演)
 - 6) 片岡一則, 薬物・遺伝子デリバリーのためのナノ会合体デザインー人工ウイルスを目指してー, 第16回バイオハイブリッド研究会, 桐蔭横浜大学, 2002 5 29 (招待講演)
 - 7) Youn-soo Bae, 福島重人, 原田敦史, 片岡一則, pH 応答性高分子ミセル型薬物キャリアーの機能評価, 第51回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 2002 5 30
 - 8) K Kataoka, Functionalized PEG-poly(Lactide) block copolymers for biomedical and pharmaceutical application, 7th World Conference on Biodegradable Polymers and Plastics, Pisa, Italy, 2002 6 6 (招待講演)
 - 9) 片岡一則, メディカルフロンティアへ向けての高分子ナノアッセムブリー設計ードラッグ・遺伝子デリバリーへの展開ー, 日本化学会生体機能関連化学部会若手の会サマーセミナー2002, おたる自然の村, 北海道, 2002 6 28 (招待講演)
 - 10) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子デリバリー, 箱根山ワークショップ「バイオ・ナノテクノロジーの展開」, 国立国際医療センター研究所, 東京, 2002 7 10 (招待講演)
 - 11) K Itaka, A Harada, K Nakamura, H Kawaguchi, K Kataoka, Effective gene trasfection in serum-containing medium by polymeric micelle-type gene vector with serum-tolerable structure, 29th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Seoul, Korea, 2002 7 23
 - 12) K Kataoka, Virus-inspired design of polymeric micelles for drug delivery, 29th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Seoul, Korea, 2002 7 24 (招待講演)
 - 13) E Jule, Y Nagasaki, K Kataoka, Sugar-installed micelles based on acetal-poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymers Their preparation, characterization, and biological significance, 29th Annual Meeting of the Controlled Release Society, Seoul, Korea, 2002 7 25
 - 14) K Kataoka, Nano-assembly of block copolymers for gene and drug delivery, 5th France-Japan DDS Symposium, Hokkaido University, Sapporo, Japan, 2002 7 30 (招待講演)
 - 15) K Kataoka, Core-shell type supramolecular assembly of charged block copolymers Design, characterization and biological significance in the field of drug delivery, 11th International Pharmaceutical Technology Symposium, Istanbul, Turkey, 2002 9 10 (招待講演)
 - 16) 片岡一則, 製剤フロンティアへ向けての高分子ナノミセル設計, 第4回製剤研究フォーラム「ナノサイエンス・ナノテクノロジーによる次世代薬物療法を目指して」, 千里ライフサイエンスセンター(大阪), 2002 9 13 (招待講演)

- 17) 片岡一則, メディカルフロンティアへ向けてのナノマテリアル設計—薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー・システムを目指して—, ナノテク・材料フェア2002テクニカルセミナー, 東京ビッグサイト, 2002 9 26 (招待講演)
- 18) 分林大輔, 原田敦史, 長崎幸夫, 片岡一則, 細胞特異性リガンドを導入したプラスミド DNA 内包ミセルの標的細胞に対する遺伝子導入, 第 51 回高分子討論会, 九州工業大学戸畑キャンパス, 2002 10 2
- 19) 片岡一則, 高分子ミセル型ナノ微粒子製剤 その特性と機能, 製剤機械技術研究会第 1 2 回大会, 江戸川区総合区民ホール, 2002 10 8 (招待講演)
- 20) 片岡一則, メディカルフロンティアに向けてのナノマテリアル設計, 高分子学会木曜勉強会, 高分子学会, 2002 10 10 (招待講演)
- 21) 片岡一則, 薬を運ぶ高分子ミセル, ゴム技術フォーラム第 2 回調査委員会, 日本ゴム協会 (東京), 2002 10 22 (招待講演)
- 22) 片岡一則, 高分子のドラッグデリバリー機能 薬を運ぶ高分子ナノミセル, 日本学術振興会「材料の微細組織と機能性」第 1 3 3 委員会第 1 7 5 研究会, 東京大学山上会館, 2002 10 25 (招待講演)
- 23) 片岡一則, 遺伝子ベクターとして機能するナノ構造デバイスの創製, ナノ・インテリジェント材料/システム国際シンポジウム, タイム 2 4 ビル (東京), 2002 10 30 (招待講演)
- 24) 片岡一則, 薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ナノミセル設計, 東海化学工業会セミナー「生物に学び、生物を超える材料づくり」, 名古屋大学, 2002 11 5 (招待講演)
- 25) K Kataoka, Tumor-targeted drug delivery by block copolymer micelles, 44th Annual Meeting of the American Association of Physicists in Medicine, Toronto, Canada, 2002 11 11 (招待講演)
- 26) 片岡一則, 超機能化高分子ナノミセルによるピンポイント治療への挑戦, 第 16 回エム・イー学会秋季大会「分子・細胞医療に役立つ ME 技術の展望」, アクロス福岡, 2002 11 15 (招待講演)
- 27) 片岡一則, ナノバイオ基礎から最前線—薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーシステムを目指して—, 平成 1 4 年度 K A S T フォーラム 3 「ナノバイオ基礎から最前線」, 神奈川科学技術アカデミー, 2002 11 29 (招待講演)
- 28) 片岡一則, 遺伝子ベクターとしての機能高分子ナノミセル その設計と機能評価, 文部科学省科研費特定領域研究 (A) 分子シンクロ材料ミニシンポジウム「細胞内デリバリーのための分子シンクロナイズーション」, 千里ライフサイエンスセンター (大阪), 2002 12 10 (招待講演)
- 29) 片岡一則, ナノ微粒子最前線—DDS キャリアの開発—, 東京理科大学新素材最新セミナー, 家の光会館 (東京), 2002 12 12 (招待講演)
- 30) 片岡一則, 遺伝子ベクターとして機能するナノ構造デバイスの創製, 産総研ジーンファンクションラボセミナー, 産業技術総合研究所 (つくば), 2002 12 24 (招待講演)
- 31) K Kataoka, Tumor-targeted drug delivery by block copolymer micelles, Mini-Symposium "Nanomedicine and Drug Delivery", University of Nebraska Medical Center, USA, 2003 1 6 (招待講演)
- 32) 片岡一則, 超機能化高分子ナノミセルによるピンポイント治療への挑戦, 東京大学「再生医学と組織工学の連携強化のためのシンポジウム」, 東京大学医学部附属病院, 2003 1 17 (招待講演)
- 33) 片岡一則, 薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ナノミセル設計, 富士裾野 2 1 世紀フォーラム, 富士教育研修所 (裾野市), 2003 1 24 (招待講演)
- 34) 片岡一則, ドラッグデリバリーとナノテクノロジー, 第 2 6 回未来医学研究会, 東京女子医科大学, 2003 2 1 (招待講演)
- 35) 片岡一則, 高分子ミセルによる薬

物・遺伝子のピンポイントデリバリー
ー ナノテクノロジーが拓くフロンティア
メディシンー, 第1回ナノテクノロジー総合シンポジウム
(JAPAN NANO 2003) (文部科学省
ナノテクノロジー総合支援プロジェクト), 東京ファッションタウン,
2003 2 3 (招待講演)

- 36) K Kataoka, Tumor-targeted drug delivery by block copolymer micelles, NCI-JSPS Conference on Tumor-specific Delivery by Non-viral Systems Approaching a Reality, Maui, Hawaii, USA, 2003 2 13 (招待講演)
- 37) 片岡一則, 遺伝子・薬物キャリアとして機能する超分子ナノデバイスの創製 ～メディカル・フロンティアに挑戦するナノ治療～, 北海道大学 21世紀 COE シンポジウム, 北海道大学薬学研究科, 2003 2 19 (招待講演)
- 38) 片岡一則, 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー, 公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」, 東京フォーラム, 2003 2 20 (招待講演)
- 39) K Kataoka, Nano-structured polymeric micelles for gene and drug targeting, nano tech 2003 + Future, Makuhari, Chiba, Japan, 2003 2 28 (招待講演)
- 40) K Kataoka, Poly-ion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer porphyrins for photo-dynamic therapy, CRS Winter Symposium & 11th International Symposium on Recent Advances in Drug Delivery Systems, Salt Lake City, Utah, USA, 2003 3 3 (招待講演)
- 41) K Kataoka, Nano-assembly of multi-functional block copolymers as vehicles for gene and drug delivery, International Symposium on Fusion of Nano- and Bio-Technology (FNB 2003), Tsukuba, Japan, 2003 3 10 (招待講演)

H 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 横山昌幸、片岡一則、岡野光夫、櫻井靖久、勢藤隆、福島重人、町田芽久美、浴本久雄、岡本一也、真柴洋子、ブロック共重合体—抗癌剤複合

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
Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, <u>Ishizaka Y</u> , Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K	New human myelodysplastic cell line, TER-3 G-CSF specific downregulation of Ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein kinase IV	J Cell Physiol	191	183-190	2002
Mishima, T, Yuko Mishima, Y, Terui, Y, Katsuyama, M, Yamada, M, Mori, M, <u>Ishizaka, Y</u> , Ikeda, K, Watanabe, J, Mizunuma, N, Hayasawa, H, and Hatake, K	Leukemic cell-surface CD13/ Aminopeptidase-N and resistance to apoptosis mediated by endothelial cells	J Natl Cancer Inst	94	1020-1028	2002
Minemoto, Y, Uchida, S, Ohtsubo, M, Shimura, M, Sasagawa, T, Hirata M, Nakagama, H, <u>Ishizaka, Y</u> , and Yamashita, K	Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation	Arch Biochem Biophys			in press
G -D Zhang, N Nishiyama, A Harada, D -L Jiang, T Aida, K Kataoka,	pH-sensitive assembly of light-harvesting dendrimer zinc porphyrin bearing periphery groups of primary amine with poly(ethylene glycol)-b-poly(aspartic acid) in aqueous solution,	Macromolecules	36,	1304-1309	2003
E Jule, Y Nagasaki, K Kataoka,	Lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity towards a protein bed simulating cell surface A surface plasmon resonance study,	Bioconjugate Chemistry	14	177-186	2003
N Nishiyama, F Koizumi, S	Differential gene expression profile	Bioconjugate	14	58-66	2003

Okazaki, Matsumura, Nishio, Kataoka,	Y K K	between PC-14 cells treated with free cisplatin- and cisplatin-incorporated polymeric micelles	Chemistry			
E Jule, Nagasaki, Kataoka,	Y K	A surface plasmon resonance study on the interaction between lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles and lectins immobilized on a gold surface	Langmuir,	18	10334-10339	2002
Y Yamamoto, Yasugi, Harada, Nagasaki, Kataoka	K A Y K	Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu	Journal of Controlled Release	82,	359-371	2002
K Itaka, Harada, Nakamura, Kawaguchi, Kataoka	A K H K	Evaluation by fluorescence resonance energy transfer of the stability on nonviral gene delivery vectors under physiological conditions	Biomacro molecules	3	841-845	2002
Y Kakizawa, Kataoka	K	Block copolymer self-assembly into monodispersive nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate	Langmuir	18	4539-4543	2002
M Harada- Shiba, Ymauchi, Harada, Shimokado, Kataoka	K A K K	Polyion complex micelles as a vector for gene therapy - Pharmacokinetics and in vivo gene transfer	Gene Therapy	9	407-414	2002
Y Kakizawa, Kataoka	K	Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds	Adv Drug Deliv Rev	54	203-222	2002
N -P Huang, G Csucs, K Emoto, Y Nagasaki, K Kataoka, M Textor, N D Spencer	G K K M N D	Covalent attachment of novel poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactic acid) block copolymeric micelles to TiO ₂ surfaces	Langmuir	18	252-258	2002

20020449

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P 14-P 15の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。