

イゼーションを行い、血中安定性を判定した。

2. in vitro 遺伝子導入実験

in vitro 遺伝子導入は、血管内皮細胞、Cos-1 細胞、HepG2 細胞、THP-1 細胞、血管平滑筋細胞を用いた。それぞれの細胞を24穴プレートに培養、10%FCS存在下にそれぞれのSS結合を持った架橋ミセルを加え、24時間培養した。さらに48時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

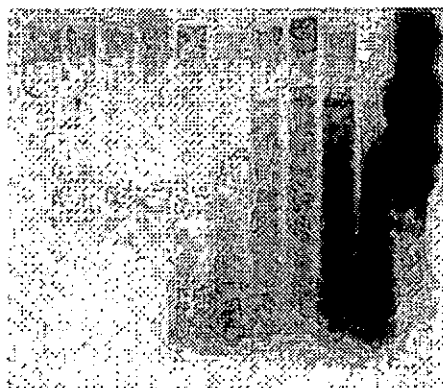
3. in vivo 遺伝子導入実験

in vivo 遺伝子導入は、アポEノックアウトマウス頸静脈よりそれぞれのSS結合を持った架橋ミセルの注射を行い、1日後、臓器のルシフェラーゼの活性測定を行った。

C. 研究結果

(1) 架橋ミセルのin vivo ターンオーバースタディ

遺伝子導入ベクターの条件として、DNAを安定に存在させること、ターゲット臓器にまで安定に運ぶことがあげられる。PICミセルの内核にSS結合を導入することにより、架橋ミセルはPICミセルに比し血中という荷電分子が多い液体中でより安定に存在することが考えられた。架橋ミセルをマウス尾静脈から投与、30分後に血液を回収し、DNAを抽出、サザンブロッティングを行うと図2のようになった。



DNA 0 4.6 12.7 28.2%

(架橋%)

図2

SS結合を12.7%および28.2%導入した架橋ミセルは、30分後に血中にインタクトな分子量のDNAを認めた。SS結合がそれ以下のもの(4.6%)は、30分後の血液中にDNAが分解した産物を認めた。また、SS結合を導入しないPICミセルは、投与30分後の血液中にDNAの存在を認めなかった。ミセルの内核にSS結合を12.7%~28.2%導入することにより、血中での安定性を増加させることが示された。

(2) in vitro 遺伝子導入実験

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルを評価するため、種々の細胞および細胞株を用いて、in vitro 遺伝子導入実験を行った。HepG2細胞(図3)、Cos-1細胞(図4)への遺伝子導入は、SS結合の有無とは関係がなかった。

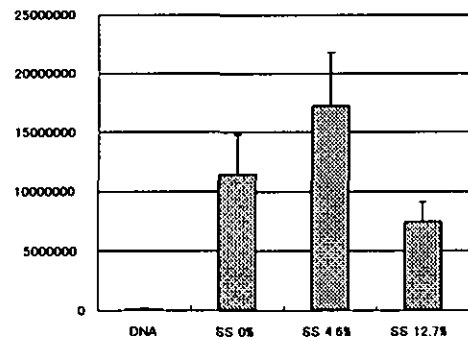


図3 架橋ミセルによるHepG2細胞への遺伝子導入

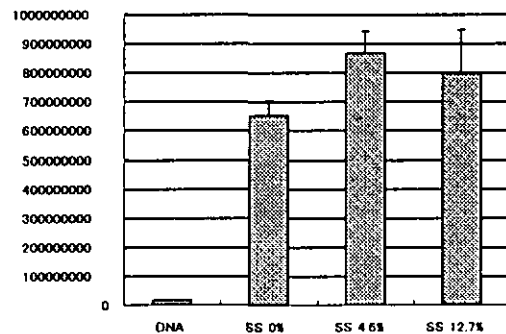


図4 架橋ミセルによるCos-1細胞への遺伝子導入

一方、血管内皮細胞、ヒト単球由来白血病細胞株 THP-1 では、SS 結合導入により、遺伝子発現が高値となった。以上より、SS 結合を内核に導入することにより、*in vitro* で遺伝子発現を増加させることが可能であった。

(3) *in vivo* 遺伝子導入実験

アポ E ノックアウトマウスは、血中総コレステロール値が 500~600mg/dl であり、早期の動脈硬化を呈する動物モデルである。アポ E ノックアウトマウスに右頸静脈より架橋ミセルを投与した。投与 24 時間後、各臓器をホモゲナイズし、ルンフェラーゼ活性を測定したところ、28.2%の SS 結合を導入した架橋ミセルでのみ、肝臓で有意な遺伝子発現を認めた。

D. 考察

1) 達成度について

遺伝子導入ベクターは、合成ベクターは安全性が高いが遺伝子導入効率に問題があった。今回の研究で、以前のものよりさらに血中安定性が高く、発現効率のよいベクターが開発されたと言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

近年、ウィルスベクターによる遺伝子治療の安全性に疑問が深まる中、ウィルスに代わるベクターとして、カチオン性ポリマーやリポソームに関心が寄せられるようになってきた。しかしながら、これらの合成ベクターと DNA とのポリプレックスは、溶解性、安定性、粒子径、表面電位のコントロールなど解決すべき問題点が多く、ウィルスベクターと同様の機能を持つには至っていない。我々は、ポリマーベクターの安全性を保ちながら、*in vivo* での遺伝子導入を可能とするベクターの開発を行っている。我々がベクターとして用いているのは、ポリカチオンとポリエチレングリコールのブロック共重合体であり、これはこれまでのホモポリマーと違い、ポリカチオンを内核、ポリエチレングリコールを外殻としたナノ粒子を形成し、溶解性、安定性にすぐれている。今年の課題は、このポリイオンコンプレックスミセルの血中安定性、遺伝子発現効率の改善である。ポリイオンコンプレックスミセルの内核に SS 結合を導入する

ことにより、血中安定性を上昇、*in vitro* および *in vivo* において遺伝子発現効率を上昇させることができた。これらは、内核に SS 結合を導入したことにより、細胞外では DNA と固く結合し、血中安定性を増した。また、細胞内では、還元条件下におかれるため、DNA が遊離することも、遺伝子発現上昇に寄与すると考えられる。

3) 今後の展望について

次年度以降は、架橋ミセルをベクターとして疾患モデル動物の治療を行う予定である。

E. 結論

本研究において、架橋ミセルがポリイオンコンプレックスミセルに比し血中安定性が高く、*in vitro* および *in vivo* における遺伝子発現効率も上昇させることができ、遺伝子導入ベクターとしての基礎データを作ることができた。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tokunaga N, Nagaya N, Shirai M, Tanaka E, Ishibashi-Ueda H, Harada-Shiba M, Kanda M, Ito T, Shimizu W, Tabata Y, Uematsu M, Nishigami K, Sano S, Kangawa K, Mori H. Adrenomedullin Gene Transfer Induces Therapeutic Angiogenesis in a Rabbit Model of Chronic Hind Limb Ischemia. Benefits of a Novel Nonviral Vector, Gelatin. Circulation. in press
2. Saito M, Tada Y, Harada-Shiba M, Yamamoto A, Kusakabe N, Yokogawa M, Kodama H, Asada H, Miyagawa S. Homozygous familial hypercholesterolaemia: development of xanthogranuloma in a boy at puberty under long-term low-density lipoprotein apheresis and drug therapy. Br J Dermatol. 2003;149:1302-1303.
3. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y,

Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H, Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation*. 2003;108:889-895.

4. Makino H, Harada-Shiba M. Long-term effect of low-density lipoprotein apheresis in patients with homozygous familial hypercholesterolemia. *Therap Apher Dial*. 2003;7:397-401.

5. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A. Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:2541-2547.

2. 学会発表

国際学会

1. Harada-Shiba M, Makino H, Takamisawa I, Hiuge A, Yoshimasa Y, Yamamoto A: Long term effect of LDL-apheresis on Homozygous FH. The 4th World Congress of International Symposium for Apheresis (Nashville), ワークショップ

2. Harada-Shiba M, Takagi A, Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Ikeda Y, Asada Y, Yokoyama S: Analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse. 第13回国際動脈硬化学会(京都)、一般演題

3. Abe E, Ohira M, Miyamoto Y, Asada Y, Harada-Shiba M: Regulatory mechanism of autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) protein expression. 第13回国際動脈硬化学会(京都)、一般演題

4. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A: Clinical Features and Genetic Analysis of Autosomal Recessive Hypercholesterolemia. 第13回国際動脈硬化学会(京都)、一般演題

国内学会

1. 斯波真理子、高木敦子、安部映里、大平望都、宮本恵宏、池田康行、浅田祐太郎、横山信治：Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)ノックアウトマウスの解析、日本動脈硬化学会第36回総会(京都)、一般演題

2. 安部映里、大平望都、宮本恵宏、浅田祐

太郎、斯波真理子：Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH)蛋白質合成制御機構の検討、日本動脈硬化学会第36回総会(京都)、一般演題

3. 高見澤格、大平望都、安部映里、浅田祐太郎、斯波真理子：高脂血症に対する気管内投与による遺伝子治療の試み、日本動脈硬化学会第36回総会(京都)、一般演題

H. 知的所有権の出願・取得状況
特許出願
なし

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

分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科 教授
協力研究者 山崎 裕一 東京大学大学院工学系研究科 講師
協力研究者 今井 豊 (財)医療機器センター流動研究員

本研究の目的は、合成高分子であるブロック共重合体の分子設計を通して、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、種々カチオン構造を有するブロック共重合体からなるベクターの培養細胞に対する遺伝子導入効率を測定するとともに、側鎖に細胞内環境で選択的に開裂する架橋を施すことによって発現効率を大幅に高めることに成功した。

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1に示すように、遺伝子等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

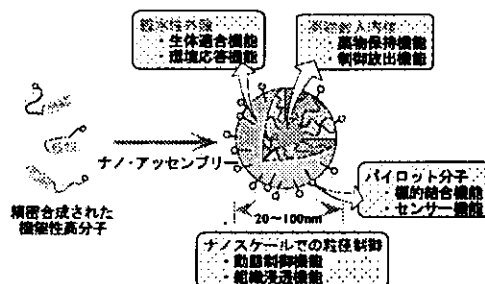


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築など、特性の異なる搭載分子に適合するよ

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) 高分子ミセル型ベクターの調製と機能評価

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: $r = [\text{cation unit}] / [\text{Nucleotide}]$)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た。各ブロック共重合体の合成については昨年度の報告書記載の方法に依った。得られた pDNA 内包高分子ミセル型ベクターについては、その粒径ならびに表面電荷を、それぞれ動的光散乱法及び電気泳動光散乱法によって決定した。また、各ベクター内での pDNA の凝縮程度を Ethidium bromide (EtBr)の蛍光消光法より評価した。なお、昨年度に報告した高分子側鎖アミノリシス法によって合成したブロック共重合体を MeO-PEG-X (X はポリカチオン連鎖)と略称し、その構造を図2に示す。

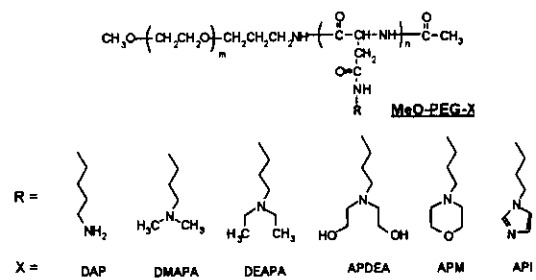


図2 アミノリシス法によって合成したブロック共重合体の構造式

高分子ミセル型遺伝子ベクターによる発現活性は、培養細胞系として 293T 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。各ミセルを細胞に 24 hr 接触させ、培地交換を行いさらに 24 hr 培養を行った後、評価をおこなった。

2) 環境応答機能を付与したブロック共重合体の合成とミセル型ベクター調製

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、poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) (PEG-PLL) ブロック共重合体の 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) (IT) を用いて検討した。構造の確認は、¹H NMR 測定により行った。

この様にして合成した SH 基導入 PEG-PLL を用い、前項と同様に pDNA の内包を行い、更に透析を行うことによって、SS 架橋をベクター内部に形成させた。

C. 研究結果

1) 側鎖アミノリシス法で合成した各種ブロック共重合体 (MeO-PEG-X) から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの特性解析

Tris-HCl Buffer (10 mM, pH= 7.4) 中、各 N/P 比 (= [MeO-PEG-X 中のカチオン残基濃度] / [p-DNA 中のリン酸基濃度]) でベク

ター調製を行った。全ての種類の MeO-PEG-X において、溶液は透明であり凝集体の形成は見られなかった。電気泳動、動的光散乱 (DLS) 測定により、各溶液中では粒径が 80 - 100 nm 程度の単峰性の会合体が形成されていることが確認された。また、会合体のゼータ電位はほぼ 0 mV を示し、これら会合体が従来検討を行ってきた PEG-PLL と同様にコア-シェル構造のミセル型ベクターであることが明らかとなった。さらに、EtBr アッセイによりミセル内部の p-DNA の凝縮状態を評価したところ、p-DNA の凝縮の程度は MeO-PEG-X のカチオン構造によって大きく異なり、全体的にポリカチオンブロックの pKa 値の高いものほど強く p-DNA の凝縮が誘起されている傾向が認められた。

2) MeO-PEG-X と p-DNA からなる高分子ミセル型ベクターの機能評価

MeO-PEG-X と p-DNA からなる PIC ミセルの培養細胞 (293T 細胞) に対する遺伝子導入効率をルシフェラーゼアッセイにより評価した結果を図 3 に示す。その結果、ポリカチオンブロックの化学構造の差異に起因すると考えられる発現効率の差が見られ、ジメチルアミノ基導入型 (X=DMAPA) は

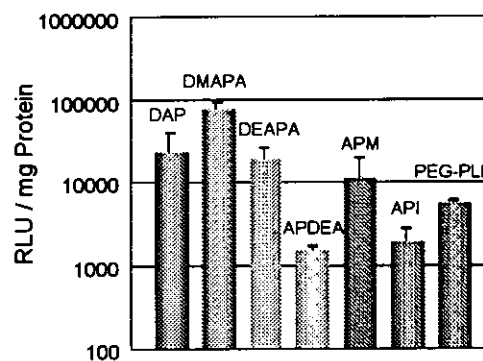


図3 MeO-PEG-X 型高分子ミセルベクターによる 293T 細胞への遺伝子導入

これまでの PLL 型に比べて一桁ほど高い発現効率を示した。遺伝子ベクターとして求められる特性として、培地中や血中で安定にコンプレックスを形成することは必須であるが、一方で細胞内に取り込まれた後は内包した p-DNA をスムーズに細胞質へ放出移行させることが肝要となる。ここで見られた発現効率の差は、カチオンブロックの化学構造が変わることで、培地中・細胞

内それぞれで要求されるコンプレックスの安定性のバランスが変化したこと起因するものと考えられる。一方、エンドソームから細胞質への物質移行を促進するとされるヒドロキシクロロキン (HCQ) の添加によって発現効率の上昇が認められることから、MeO-PEG-X 型ミセルによる遺伝子導入においては、エンドソームから細胞質への移行過程にバリアが存在していることが明らかとなった。

3) エンドソームからの積極的な移行を促す MeO-PEG-X の設計・評価

ベクター内包 p-DNA のエンドソームから細胞質への移行を促進するため、新たなブロック共重合体 MeO-PEG-DET を設計・合成した (図4参照)。このポリマー

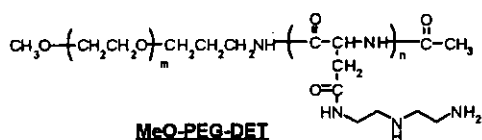


図4 MeO-PEG-DET の構造式

は、コンプレックス形成に関与する一級アミノ基と、バッファ能を発揮することが期待される二級アミノ基が一つのアスパルタミドユニットに導入された構造を有する。MeO-PEG-DET は、p-DNA と水溶液中で混和することにより粒径が 80 nm 程度のミセルを自発的に形成することが確認された。このミセルの遺伝子ベクターとしての性能を評価したところ、HCQ 非共存下においても、MeO-PEG-X よりも高

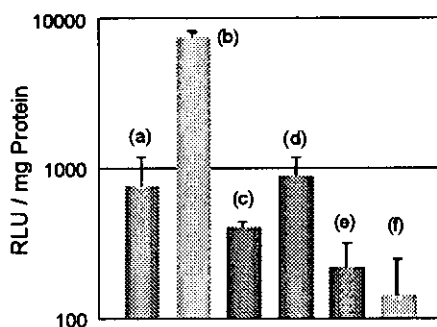


図5 MeO-PEG-X ミセルベクターによる遺伝子導入：N/P 比とポリカチオン pKa の効果。(a) X= DET, N/P= 5 (b) X= DET, N/P= 10 (c) X= DMAPA, N/P= 5, (d) X= DMAPA, N/P= 10, (e) X= DAP, N/P= 5 (f) X= DAP, N/P= 10

い発現効率を示すことが明らかとなった (図5)。この理由は、カチオンブロックに

二種類のアミンを導入することで、p-DNA とのコンプレックス形成後も脱プロトン化状態のアミンがベクター内に保たれる結果、有効なバッファ効果が惹起され、細胞質への p-DNA の移行が促進されたためであると考えられる。すなわち、ミセル型遺伝子ベクターのポリカチオン部に、コンプレックス形成とバッファ能を示すカチオンをそれぞれ分けて導入する分子設計は、発現効率を向上させる上で有効な戦略であることが明らかとなった。

4) 細胞内還元環境応答機能を有するミセル型ベクターの調製と遺伝子デリバリー機能の評価

細胞内還元環境で開裂する SS 架橋を内核に施したミセルの粒径は、動的光散乱測定より約 100nm であり、原子間力顕微鏡観察におけるサイズと良く一致した。また、ゲル電気泳動により行った安定性評価では、架橋を導入したミセルにおいては過剰量のポリアニオン添加後も、free の pDNA が検出されなかったことから、ミセルの解離抑制が確認された。還元環境において同様の実験を行ったところ、荷電密度を減少する形で架橋を導入した SPDP 型ミセルからは、pDNA の放出が見られたが、荷電密度を維持する形で架橋を導入した IT 型ミセルからは、pDNA の放出が見られなかった。さらに、遺伝子発現の結果では、還元環境で pDNA が放出される SPDP の系では非架橋型に比べて大幅に遺伝子発現効率が増加したが、放出が見られなかった系では逆にその効率は低下した。これより側鎖の荷電密度は架橋の開裂挙動に大きな影響を与え、安定化と開裂応答性のバランスが効果的なインテリジェント遺伝子ベクターの設計にとって重要であることが示された。なお、この SPDP 型ベクターについては、動物実験による予備的な発現実験を行い、尾静脈投与によって肝実質細胞に効率的にレポーター遺伝子 (YFP) を導入可能であることを確認している。

D. 考察

1) 達成度について

昨年度に合成法を確立した各種のブロック共重合体を用いた高分子ミセル型遺伝子ベクターの作成法を確立し、かつ、その遺伝子発現実験から、優れた発現効率を達成

するための構造パラメータを確認出来たことは大きな成果であった。また、細胞内の還元環境に反応して内包 DNA を放出するインテリジェントベクターについても、一段と高い遺伝子発現を達成し、かつ動物実験において遺伝子発現を認めたことは当初目標を上回る達成度であると考えられる。

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 *in vitro* における一段と高い遺伝子発現の達成ならびに *in vivo* における環境応答型ミセルベクターの有用性の確認は、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、G. 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多数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

現在、ベクターの機能評価と平行して、ミセルベクター表層に細胞指向性リガンドを効率良く導入する方法論の開発を行っている。次年度においては、この手法に基づいて細胞特異的な遺伝子導入を検討し、本システムの標的遺伝子治療における有用性を明らかとしていく。さらに、*in vivo* での検討を強化し、遺伝子の体内動態ならびに発現プロファイルを時間依存的に評価して治療効果を得るための指針を明らかとする。また、これまでに確立した細胞内動態評価法を利用して、細胞内分布や核内移行等の *intracellular trafficking* についても検討を行う。さらに、内包物質を pDNA のみならず oligo-DNA や siRNA にも広げ、本システムの機能性核酸医薬デリバリーシステムとしての有用性をも明らかとしていく。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、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、細胞内環境に反応し

て高い遺伝子発現活性を実現する系の構築にも成功し、将来の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) D. Wakebayashi, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Kanayama, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Lactose-installed polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: Their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells, *J. Controlled Release*, in press
- 2) M. Tabuchi, M. Uedda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yoshikawa, K. Kataoka, Y. Baba, Nano-spheres for DNA separation chips, *Nature Biotechnology*, in press
- 3) K. Itaka, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, *In situ* single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine, *J. Gene Med.*, 6(1), 76-84 (2004)
- 4) T. Ishii, H. Otsuka, K. Kataoka, Y. Nagasaki, Preparation of functionally PEGylated gold nanoparticles with narrow distribution through auto-reduction of auric cation by α -biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethyl amino)ethyl methacrylate)], *Langmuir*, 20(3), 561-564 (2004)
- 5) N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, K. Kataoka, Novel Cisplatin-Incorporated Polymeric Micelles Can Eradicate Solid Tumors in Mice, *Cancer Research*, 63(24), 8977-8983 (2003)
- 6) A. Harada, K. Kataoka, Switching by pulse electric field of the elevated enzymatic reaction in the core of

- polyion complex micelles, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(50), 15306-15307 (2003)
- 7) G.-D. Zhang, A. Harada, N. Nishiyama, D.-L. Jiang, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer, *J. Controlled Release*, **93**(2), 141-150 (2003)
 - 8) T. Matsuya, S. Tashiro, N. Hoshino, N. Shibata, Y. Nagasaki, K. Kataoka, A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive poly(ethylene glycol) tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorometric immuno-assay, *Anal. Chem.*, **75**(22), 6124-6132 (2003)
 - 9) Y. S. Bac, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka, Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change, *Angew. Chem., Int. Ed.*, **42**(38), 4640-4643 (2003)
 - 10) Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka, K. Yoshikawa, PEG-PLL block copolymers induce reversible large discrete coil-globule transition in a single DNA molecule through cooperative complex formation, *Macromolecules*, **36**(16), 6276-6279 (2003)
 - 11) A. Harada, K. Kataoka, Effect of charged segment length on physico-chemical properties of core-shell type polyion complex micelles from block ionomers, *Macromolecules*, **36**(13), 4995-5001 (2003)
 - 12) K. Itaka, K. Yamauchi, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physico-chemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency, *Biomaterials*, **24**(24), 4495-4506 (2003)
 - 13) T. Uwatoku, H. Shimokawa, K. Abe, Y. Matsumoto, T. Hattori, K. Oi, T. Matsuda, K. Kataoka, A. Takeshita, Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats, *Circulation Research*, **92**(7), e62-69 (2003)
- ## 2. 学会発表
- 1) 長崎幸夫, 大塚英典, 片岡一則, 免疫診断ナノ粒子, 第26回日本医学学会総会シンポジウム「ナノテクノロジーと医療」, 2003.4.4. (招待講演)
 - 2) 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, 第3回遺伝子・デリバリー研究会, KKR ホテル東京竹橋会館, 東京, 2003.5.9. (招待講演)
 - 3) K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymers as carrier for gene and drug delivery, Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Palm Coast, USA, 2003.5.14. (招待講演)
 - 4) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—, 神奈川大学講演会, 神奈川大学, 横浜, 2003.6.17. (招待講演)
 - 5) 片岡一則, 高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子デリバリー, 第19回日本DDS学会シンポジウム, 京都国際会議場, 京都, 2003.6.19. (招待講演)
 - 6) 片岡一則, フロンティア・ナノメディスンに向けた精密高分子界面の設計, 日立中央研究所セミナー, 2003.6.23. (招待講演)
 - 7) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—, 顕微鏡学会幹事会セミナー, 2003.6.28. (招待講演)
 - 8) K. Kataoka, Smart polymeric micelles for gene and drug delivery, 2nd International symposium on molecular synchronization for design of new material system, Tokyo Institute of

- Technology, Yokohama, 2003.7.18. (招待講演)
- 9) K. Kataoka, Smart polymeric micelles for gene and drug delivery, Distinguished Seminar, Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Chemistry, University of Utah, Salt Lake City, Utah, USA, 2003.8.20. (招待講演)
 - 10) K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymers as carrier for gene and drug delivery, COE 21 International symposium on Human-friendly materials based on chemistry, The University of Tokyo, Tokyo, 2003.8.27. (招待講演)
 - 11) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—, 第34回中部化学関係協会支部連合秋期大会と区別討論会「再生医工学の未来」, 信州大学, 上田, 2003.9.9. (招待講演)
 - 12) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる遺伝子・核酸医薬のデリバリー, 第3回遺伝子デリバリー研究会夏季セミナー, ラフォーレ南紀白浜, 和歌山, 2003.9.13. (招待講演)
 - 13) 片岡一則, メディカルフロンティアに向けての高分子設計, 日本技術士会講演会, 東京田中山ビル, 東京, 2003.9.18. (招待講演)
 - 14) 片岡一則, ナノバイオ新産業創出に向けた精密高分子設計-DDS(薬物・遺伝子デリバリーシステム)への展開-, 第2回2003年度ナノ高分子ワークショップ「再びナノ: これからのナノと高分子」-合成、構造、機能からビジネスまで-, 山口大学, 2003.9.24. (招待講演)
 - 15) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—, 日本学術振興会アモルファス・ナノ材料第147委員会第5分科会研究会, 主婦会館プラザエフ, 東京, 2003.9.30. (招待講演)
 - 16) 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, 科学技術振興機構「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」第1回公開シンポジウム, 日本科学未来館, 東京, 2003.10.2. (招待講演)
 - 17) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, US-Japan symposium on nanotechnology in advanced therapy and diagnosis, Yokohama Prince Hotel, Yokohama, 2003.10.9. (招待講演)
 - 18) 片岡一則, ドラッグデリバリーシステムを指向したライフサイエンスとナノテクノロジーの融合-ナノ治療戦略の可能性, 第76回日本生化学会大会シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2003.10.18. (招待講演)
 - 19) 片岡一則, 高分子ナノミセルによるピンポイントドラッグデリバリー, バイオフォーラム2003大阪シンポジウム, インテックス大阪, 2003.10.22. (招待講演)
 - 20) 片岡一則, 高分子ナノミセルによるピンポイントデリバリー—ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—, 神奈川科学技術アカデミー教育講座「ナノバイオ基礎から最前線コース」, 神奈川科学技術アカデミー, 2003.10.27. (招待講演)
 - 21) 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, 第2回ナノファイバー技術戦略研究会講演会「21世紀を開くナノファイバーテクノロジー」, 東京工業大学百周年記念館, 東京, 2003.10.29. (招待講演)
 - 22) K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymer as carrier for gene and drug delivery, 2nd Japan-Swiss Workshop on Biomaterials, International Congress Center, Epochal Tsukuba, Tsukuba, 2003.11.6. (招待講演)
 - 23) K. Kataoka, Intelligent polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, Sweden-Japan Workshop on Bionanotechnology, Kyoto Kokusai Hotel, Kyoto, 2003.11.10. (招待講演)
 - 24) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—ナノテクノロジーが拓くフロ

- ンティアメディシンー, 日本油化学会界面科学部会秋期セミナー「化粧品、食品、医薬における界面活性物質の応用と機能化技術」, ホテル箱根アカデミー, 箱根, 2003.11.13. (招待講演)
- 25) K. Kataoka, A. Matsumoto, Totally synthetic polymer gels responding to external glucose concentration: Their preparation and application to on-off regulation of insulin-release, ISSP International Workshop 5th Gel Symposium "Polymer Gel; Fundamentals and Nano-Fabrications", ISSP Kashiwa, The University of Tokyo, Kashiwa, 2003.11.20. (招待講演)
- 26) N. Nishiyama, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymer as carrier for gene and drug delivery, American Institute of Chemical Engineering 2003 Annual meeting, San Francisco Hilton, San Francisco, USA, 2003.11.20. (招待講演)
- 27) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・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, 日本バイオインダストリー協会バイオエンジニアリング研究会講演会「Chemical Biology の潮流」, 鉄鋼会館, 東京, 2003.11.21. (招待講演)
- 28) K. Kataoka, Nano-micellar assembly of multi-functional block copolymer as carrier for gene and drug delivery, 2003 MRS Fall Meeting, Sheraton Boston Hotel, Boston, USA, 2003.12.2. (招待講演)
- 29) A. Matsumoto, K. Kataoka, Development of totally synthetic glucose-responsive polymer gel for use as a novel type of insulin delivery, 2003 MRS Fall Meeting, Sheraton Boston Hotel, Boston, USA, 2003.12.2.
- 30) A. Hirano, H. Otsuka, Y. Nagasaki, Y. Horiike, T. Okano, K. Kataoka, Creation of hepatocyte spheroid array for high throughput screening, 2003 MRS Fall Meeting, Sheraton Boston Hotel, Boston, USA, 2003.12.3.
- 31) H. Otsuka, T. Satomi, J. Itadani-Harada, Y. Nagasaki, Y. Horiike, T. Okano, K. Kataoka, Multi-layer formation of hepatocyte hetero-spheroids on microfabricated PEG-brush surface, 2003 MRS Fall Meeting, Sheraton Boston Hotel, Boston, USA, 2003.12.4.
- 32) 片岡一則, 薬物・遺伝子キャリアとして機能する高分子ナノミセルーメディカルフロンティアに挑戦するナノ治療ー, 日本薬学会関東支部学術講演会「バイオマテリアルと薬学の接点」, 東京工業大学, 横浜, 2003.12.8. (招待講演)
- 33) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nano-carriers for gene and drug delivery, Seminar at Institute of Bioengineering and Nanotechnology (IBN), Singapore, 2003.12.11. (招待講演)
- 34) K. Kataoka, Design of bio-nanointerface for biological application, International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2003), Suntec Singapore International Convention and Exhibition Centre, Singapore, 2003.12.12. (招待講演)
- 35) 片岡一則, 高分子ミセルを用いる DDS, (社) 農林水産技術情報協会公開シンポジウム「食の安全とドラッグデリバリーシステム」, 東京大学弥生講堂, 東京, 2003.12.15. (招待講演)
- 36) 片岡一則, バイオマテリアルの基礎・応用研究と将来展望 バイオマテリアルと DDS-ナノテクノロジーが拓く DDS のフロンティア, 第 25 回バイオマテリアル学会, 大阪国際会議場, 大阪, 2003.12.17. (招待講演)
- 37) 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 回広島癌先端治療セミナー, 広島大学医学部広仁会館, 広島, 2003.12.17. (招待講演)
- 38) 位高啓史, 林寿人, 長崎幸夫, 川口浩, 中村耕三, 片岡一則, pH 応答性ナノゲルを用いた遺伝子・ドラッグデリバリー, 第 25 回バイオマテリアル学会, 大阪国際会議場, 大阪, 2003.12.17.

39) 林寿人, 飯島道弘, 長崎幸夫, 位高啓史, 片岡一則, pH 応答性 PEG 化ナノゲル粒子の調整と高機能薬物キャリアへの展開, 第 15 回高分子ゲル研究討論会, 東京大学山上会館, 東京, 2004.1.14.

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 片岡一則、金山直樹、位高啓史、福島重人、原田敦史、ポリ（エチレングリコール）—ポリカチオンブロック共重合体 特願 2003-315858 号
- 2) 片岡一則、張祐銅、西山伸宏、イオン性フタロシアニン dendrimer を内包した高分子ミセル構造体、特願 2003-330725 号

平成 15 年度 QD 等 DDS 班会議

日時： 平成 16 年 1 月 8 日(木) 10 時 00 分～12 時 30 分

場所： 国立国際医療センター研究所 B 棟地下 1 階 中会議室

司会 山本健二(国際医療セ研究所)

10 時 00 分～10 時 05 分 はじめに 山本健二

10 時 05 分～10 時 15 分 片岡一則(東京大学大学院工学系研究科)

「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」

10 時 15 分～10 時 25 分 斯波真理子(国循・研究所バイオサイエンス部)

「遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価」

10 時 25 分～10 時 35 分 落谷孝広(国立がんセンター研究所・がん転移研究室)

「アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS」

10 時 35 分～10 時 45 分 太田敏博(東京薬科大・生命科学)

「CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性検討」

10 時 45 分～10 時 50 分 (休憩)

10 時 50 分～11 時 00 分 近藤昭彦 (神戸大学工学部)

「中空バイオナノ粒子による遺伝子・タンパク質デリバリー」

11 時 00 分～11 時 10 分 土肥多恵子 (国際医療セ研究所・消化器疾患研究部)

「QD を用いた in vivo 細胞トラフィックの解析」

11 時 10 分～11 時 20 分 石坂幸人 (国際医療セ研究所・難治性疾患研究部)

「ペプチド標的治療に対するモニターリング法の可能性」

11 時 20 分～11 時 30 分 名取泰博 (国際医療セ研究所・臨床薬理研究部)

「腎尿細管上皮を標的にした DDS」

11 時 30 分～11 時 40 分 鈴木和男 (国立感染症研究所・生物活性物質部)

「MPO-ANCA 関連血管炎の発症機構とガンマグロブリン開発」

11 時 40 分～11 時 50 分 (昼食)

11 時 50 分～12 時 00 分 切替照雄 (国際医療セ研究所・感染/熱帯病研究部)

「量子ドットの感染症への応用」熱帯病研究部

12 時 00 分～12 時 10 分 湯尾 明 (国際医療セ研究所・血液疾患研究部)

「ナノサイズ非ウイルスベクターを用いた DDS に関わる基礎検討」

12 時 10 分～12 時 20 分 山本健二 (国際医療セ研究所・医療生態学研究部)

「量子ドットによる DDS」

12 時 20 分～12 時 30 分 来年度に向けて 山本健二

国立国際医療センター研究所・医療生態学研究部：山本健二

〒162-8655 新宿区戸山 1-21-1, Tel: 03-3202-7181 ext. 2856

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

片岡一則（東大院工） kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

非ウイルス性の遺伝子キャリアは、DNA を安定な粒子へコンプレックス化する機能と、細胞内で DNA を放出し遺伝子を発現させる機能が必要とされる。これらの相反する二つの機能を実現させるために、本研究では、poly(ethylene glycol)と poly(L-lysine)から成るブロック共重合体 (PEG-PLL)とプラスミド DNA(pDNA)から、静電相互作用を駆動力として形成される高分子ミセルに、ジスルフィド結合による架橋を導入した。ジスルフィド結合は、還元環境である細胞内では開裂すると考えられていることから、架橋ミセルは、細胞に取り込まれるまでは架橋により安定化されるが、取り込まれると架橋が開裂し、治療用の DNA を放出することが期待される。SH 基の導入法として、PEG-PLL の PLL 側鎖の荷電密度を減少させる形で SH 基を導入する方法と、荷電密度を維持する形で SH 基を導入する方法の二つを採用した。これらの SH 基導入ポリマーをそれぞれ用いて架橋ミセルを調製し、その側鎖の荷電密度が、架橋ミセルの安定性や還元環境への応答性、さらには遺伝子発現効率に至る機能にどのような影響を与えるかを評価した。その結果、前者において培養細胞に対して大幅な遺伝子導入効率の上昇を達成可能であることが明らかとなった。さらに、遺伝子導入効率に関しては、最適なジスルフィド架橋効率が存在することも判明した。この架橋ミセルについては、凍結乾燥保存後も物性ならびに遺伝子導入活性に変化は生じず、製剤学的にも優れた実用性を有している。一方、遺伝子キャリアの細胞内動態を検証するために、キャリア内部からの DNA 分子放出過程を単一細胞レベルで把握する方法論として、ドナー・アクセプター蛍光二重標識 DNA における蛍光エネルギー移動 (FRET) を利用した評価法を確立し、キャリアを構成するポリカチオン鎖の構造によって、細胞内 DNA 移行と放出過程の制御が行われることをはじめて明らかとした。

A block cationer polyplex, showing high stability in the extracellular medium and an efficient release of plasmid DNA (pDNA) in the intracellular compartment, was developed by controlling both the cationic charge and disulfide-crosslinking densities of the backbone polycations. Poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer (PEG-PLL) was thiolated using either of two thiolation reagents, *N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP) or 2-iminothiolane (Traut's reagent), to investigate the effects of both charge and disulfide-crosslinking densities on the properties of polyplexes. The introduction of thiol groups by SPDP proceeds through the formation of amide linkage to concomitantly decrease the cationic charge density of PLL segment, whereas Traut's reagent promotes the thiolation with an introduction of cationic imino group to keep the charge density constant. Both thiolation methods were similarly effective in introducing disulfide-crosslinks to prevent the polyplex from the dissociation through counter polyanion exchange in an extracellular oxidative condition. On the other hand, the efficient release of pDNA responding to the reductive condition mimicking the intracellular environment was only achieved for the polyplex thiolated with SPDP, a system compensating for the decrease in the charge density with the disulfide crosslinking. This distinctive sensitivity toward oxidative/reductive environments was nicely correlated with the remarkable difference in transfection efficiency between these two types of thiolated-polyplexes (SPDP- and Traut's reagent-types): the former revealed 50 times higher transfection efficiency toward 293T cells than the latter.

遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

斯波真理子

[背景] *in vivo* 遺伝子導入のためのベクターとして、1.DNA を *in vivo* で一定の時間、安定した粒子として存在させることができること、2.DNA を目的の臓器まで送付できること、3.目的の細胞内への取り込み機構を有すること、4.細胞に取り込まれてから、ライソゾームなどでの分解を回避できること、5.核内への移行が可能であること、6.遺伝子発現が可能であることなどが必要である。我々は、片岡らとの共同研究で、これらの条件を充たすベクターの開発を行っており、共重合体を用いた DNA 複合体である PIC ミセルが血中で安定であること、*in vitro* および *in vivo* で遺伝子発現が可能であることを既に報告した。さらに PIC ミセルの遺伝子発現効率を上昇させるため、SS 結合で PIC ミセルの内核を架橋したベクターを用い、ターンオーバースタディ、*in vitro* および *in vivo* における遺伝子発現実験を行った。[方法] 内核を SS 結合で 0%、4.6%、12.7%、28.2% 架橋し、pGL3-Cont を含んだ PIC ミセルを用意した。マウス尾静脈より投与、30 分後の血液を採取、DNA を抽出後サザンブロッティングを行い、血中安定性を判定した。*In vitro* 遺伝子導入は、血管内皮細胞、Cos-1 細胞、HepG2 細胞、THP-1 細胞、血管平滑筋細胞を用い、ルシフェラーゼ活性測定にて判定した。*In vivo* 遺伝子導入は、アポ E ノックアウトマウス頸静脈より架橋ミセルの注射を行い、1 日後、ルシフェラーゼの活性測定を行った。[結果] 架橋のパーセントが上昇するに従い、血中安定性が上昇し、SS 結合の割合が 28.2% のもので最高であった。*In vitro* 遺伝子導入では、血管内皮細胞、Cos-1 細胞、HepG2 細胞では遺伝子発現を認めたが、THP-1 細胞、血管平滑筋細胞では遺伝子発現を認めなかった。HepG2 細胞、Cos-1 細胞では、SS 結合のないミセルでも遺伝子発現を認めたが、血管内皮細胞では 12.7%、28.2% のもので発現を認めた。*In vivo* 遺伝子導入では、28.2% のもので、肝臓、腎臓、肺に遺伝子発現を認めた。

[Background] The characteristics that are required as vectors for gene therapy are as follows; 1. Ability to support DNA as a stable particle. 2. Ability to carry DNA to the target organ. 3. Having the mechanism for uptake across the cell membrane. 4. Having the escaping mechanism of degradation in the lysosome. 5. Ability to carry DNA to the nuclei. 6. Ability of gene expression. We have already reported polyion complex (PIC) micelles consisting of poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer (PEG-PLL) as having characters needed for gene expression vectors, such as high solubility in aqueous solution, high stability in blood stream and ability of gene expression *in vitro* and *in vivo*. In order to increase the transfection efficiency, PEG-PLL was thiolated and evaluated for stability in the blood stream, transfection efficiency *in vitro* and *in vivo*. [Methods] Cross-linked micelles were prepared by introducing disulfide-crosslinks by 0%, 4.6%, 12.7%, 28.2%. The cross-linked micelles were injected into mice via tail vein. Blood samples were collected and DNA was extracted for Southern blot analysis. For *in vitro* transfection, vascular endothelial cells, Cos-1 cells, HepG2 cells, THP-1 cells and vascular smooth muscle cells were used. For *in vivo* gene expression, cross-linked micelles were injected into mice via jugular vein. Gene expression was evaluated by measuring the activity of luciferase. [Results] The stability in the blood stream became higher as the percent of disulfide-crosslinks increased. *In vitro* gene expression was observed in Cos-1 cells and HepG2 cells by PIC micelles and cross-linked micelles. In vascular endothelial cells, gene expression was observed only by the cross-linked micelles of 12.7% and 28.2% of disulfide introduction. *In vivo* gene expression was observed by cross-linked micelles in the liver, kidney and lung.

アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

落谷孝広 (国立がんセンター研究所・がん転移研究室) tochiya@ncc.go.jp

我々はバイオマテリアルの一種であるアテロコラーゲンが DNA と相互作用して複合体を形成し、効率よく細胞に取り込まれた後、遺伝子を発現させる能力があることを明らかにしてきた。アテロコラーゲンは複合体を形成した DNA の細胞への取り込み、酵素分解に対する抵抗性、さらには徐放効果を促進する働きがあるため、遺伝子治療用ベクターの生体内へのデリバリー方法として優れている。さらに最近この複合体はナノサイズの粒子であることが明らかとなり、これは部位特異的な導入ばかりでなく、全身的な投与も可能であることを示す結果であり、疾患部位に応じた様々なデリバリーシステムの構築が可能なことを意味する。2003年度は、この複合体の粒子形成の詳細な検討を行い、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA の遺伝子医薬の安定なナノ粒子形成の条件設定に至った。

Atelocollagen-based nano particle allows efficient delivery of gene medicines

Takahiro Ochiya (Section for Studies on Metastasis, National Cancer Center Research Institute) tochiya@ncc.go.jp

We have previously demonstrated that Atelocollagen complexed with DNA molecules was efficiently transduced into cells and allowed for long-term gene expression in mammalian cells. Because Atelocollagen allowed increased cellular uptake, nuclease resistance, and prolonged release of genes and oligonucleotides, an Atelocollagen complex could be a powerful method to deliver gene medicines *in vitro*. Recently we found that Atelocollagen/DNA complex forms nano-size particle. This finding allows intravenous injection and delivery of gene medicines systemically as well as site-specifically to target organs. Furthermore, Atelocollagen has a characteristic of low antigenicity when it is transplanted *in vivo*. Thus, for clinical application of gene therapy, an Atelocollagen-based nano-particle transfer could be a reliable method to accomplish the maximal function of gene medicines *in vivo*. In 2003, studies were focused on analyzing detailed conditions for making 100-300 nm size particles of Atelocollagen/gene medicines complex including antisense oligonucleotides and siRNA.

CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討

太田 敏博 (東京薬科大・生命科学) ohta@ls.toyaku.ac.jp

佐々木 有 (八戸高専・物質工学) yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp

親水性有機化合物 (11-メルカプトウンデカン酸 : MUA) で表面被覆した CdSe/ZnS コアシェル型ナノ粒子 (QD-MUA)、およびサンプル中に混在する MUA の DNA 損傷性の有無について、ヒトのリンパ腫由来の WTK1 細胞を用いたコメットアッセイで調べることを目的とした。WTK1 細胞を 2 種の QD-MUA (遠心分離調製品、限外濾過精製品)、および MUA で 2、12、24 時間処理した後、常法にしたがってアガロースゲルに包埋したスライド標本を作成し、細胞を低温でアルカリ溶解後、アルカリ条件下 (pH13, 0°C) で DNA unwinding と電気泳動を行った。1 本鎖 DNA 切断によって核から流れ出す DNA 断片を、エチジウムブロマイドで染色して DNA 移動距離 (tail length) を 50 個の核について測定した。QD-MUA は 50 µg/ml 以上の用量で WTK1 細胞に DNA 損傷を誘発したが、その作用は精製品の方が弱かった。一方、MUA は 25 µg/ml 以上の用量で強い DNA 損傷性を示した。QD-MUA の DNA 損傷性の原因が親水性加工に用いた MUA に起因している可能性について検討するため、現在、2-アミノエタンチオールで表面被覆したナノ粒子 (QD-NH₂)、α-チオグリセロールで表面被覆したナノ粒子 (QD-OH)、および、混合表面被覆した QD-MUA/OH、QD-OH/NH₂ について実験を行っている。

Comet assay of CdSe/ZnS-core shell nanocrystals with cultured WTK1 cells

Toshihiro OHTA (Tokyo Univ. Pharm. & Life Sci.) : ohta@ls.toyaku.ac.jp

Yu F. SASAKI (Hachinohe Natl. Coll. Tech.) : yfsasaki-c@hachinohe-ct.ac.jp

Genotoxic potential of CdSe/ZnS-core/shell quantum dots coated with 11-mercapto-undecanoic acid (QD-MUA) and their ingredients 11-mercaptoundecanoic acid (MUA) was evaluated with comet assay using cultured human lymphoma WTK1 cells *in vitro*. Cells were treated with two kinds of QD-MUA (crude and purified samples) or MUA for 2, 12, and 24 hr in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. After treatment cells were embedded in 1% GP42 agarose gel, and the slides were placed in a chilled lysing solution (pH10) at 0°C for 60 min. DNA unwinding and electrophoresis was conducted under chilled alkaline condition of pH13. The slides were then neutralized and stained with ethidium bromide. The length of the whole comet was measured for 50 nuclei for each dose and differences between the means in treated and control cells were statistically analyzed. Crude QD-MUA sample was positive at a dose range of 50-200 µg/ml. The purified QD-MUA sample seemed to be less active in the comet assay. On the other hand, MUA caused strong DNA-damaging effect at doses of 25 µg/ml or more. To investigate the possibility that MUA is responsible for the positive responses in the comet assay of QD-MUA, other QD samples coated with 2-aminoethanethiol or α-thioglycerol are now under the experiments.

中空バイオナノ粒子による遺伝子・タンパク質デリバリー

近藤昭彦 (神戸大学工学部) kondo@cx.kobe-u.ac.jp

遺伝子治療は、癌などの難治療性疾患の治療法として期待されているが、安全でピンポイントに目的組織・細胞に高効率に遺伝子導入可能なキャリアーの開発が望まれている。本研究では、ウイルスの感染効率に着目して、ウイルスの表面抗原からなるタンパク質中空ナノ粒子を、遺伝子やタンパク質を目的細胞や組織にピンポイントで効率よく導入するナノキャリアーとして利用することを試みている。このために、ヒト肝臓に特異的な B 型肝炎ウイルス (HBV) の表面抗原である L タンパク質 (pre-S1 ペプチド+pre-S2 ペプチド+S タンパク質) を酵母細胞に発現させて得られるナノ粒子を用いている。L タンパク質を酵母で発現させた場合、可溶性タンパク質の 42%程度まで生産できる。この酵母を破砕して、超遠心分離を繰り返すことで、L タンパク質ナノ粒子を得ることができる (平均粒子径 80 nm 程度)。精製した L 粒子内部に遺伝子をエレクトロポレーション法で導入し、培養細胞培養液に添加したところ、ヒト肝臓由来細胞にのみ効率的に遺伝子導入できた。また、ヌードマウス背部皮下にヒト肝細胞がん由来組織を移植したものでは、尾静脈からの注射だけで、ヒト肝癌組織のみに遺伝子導入できた。この様に、L 粒子は *in vitro* および *in vivo* ともにヒト肝臓に対して高い特異性を示すことが明らかとなった。さらに、L タンパク質の C 末端側に導入したいタンパク質を融合すると、L 粒子の内部にタンパク質を封入でき、肝細胞内に効率良く導入できることが明らかになりつつある。また、pre-S1 領域の一部を抗体や各種のリガンドに置き換えることで、特異性を変換した各種ナノ粒子を作製して、各種細胞への標的化を行っている。こうした試みの現状を紹介する。

Hollow bionanoparticles for the delivery of genes and proteins

Akihiko Kondo (Kobe University) kondo@cx.kobe-u.ac.jp

Since gene therapy is recognized as one of the most promising cures for many diseases such as cancer, it is very important to develop the gene carrier, which are safe and can specifically and efficiently introduce genes into the target cells and organs. We have found that hepatitis B virus (HBV) envelop L particles, which are overproduced in yeast cells, form hollow nanoparticles displaying a peptide that is indispensable for liver-specific infection by hepatitis B virus in humans. In the present studies, the L particles have been purified, characterized, and examined for the applicability to the gene delivery system. To examine the L particles as gene carriers, a mammalian expression plasmid for GFP (green fluorescence protein) was incorporated into L particles by electroporation. The L particles containing the plasmid were added to the culture medium of human hepatoma HepG2 cells. In addition, the nude mice transplanted with human hepatoma HuH-7 cells were injected intraperitoneally with the L particles containing the plasmid. These experiments showed that L particles can specifically and efficiently deliver gene into human liver cells both *in vivo* and *in vitro*. In addition, we found that the L-particles containing proteins were prepared by fusing them to the C-terminus of L protein. Since pre-S1 region of L protein contain a specific host cell receptor-binding domain for human hepatocytes, we attempted to alter the cell specificity by genetically substituting a tailor-made receptor for the pre-S1 region. We are now evaluating the effectiveness of L particles as the novel drug delivery system, together with the genetically engineered L particles that can be applied for the pinpoint gene/protein delivery system to different tissues.

QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析

土肥 多恵子 (国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部)

dohi@ri.imcj.go.jp

背景と目的: 生体防御の第一線である消化管粘膜局所においては、物理的および機能的バリアーの形成とともに、病原体と常在菌の認識、抗原に対する免疫応答と免疫寛容の緻密な調節がごくあたりまえに行われている。しかしその調節機構はいわゆる全身免疫とは作用する細胞もその作用機構も異なっていることが解明されつつある。本研究では消化管に存在する免疫担当細胞がどの様にその特徴的な機能を獲得していくかを明らかにすることを目的として、消化管と他の臓器との細胞交通を解析する。**方法:** マウス腹腔内単核細胞を調整し、種々のリポソームを用いて QD520 を細胞に効率よく取り込ませラベルするための条件検討を行った。さらに、QD ラベルした細胞をマウス腹腔内にもどし、48 時間後、腹腔、小腸・大腸粘膜固有層、パイエル板、腸管膜リンパ節、脾臓より細胞を回収し、フローサイトメトリーにて解析した。**結果:** リポソーム (Promega 社 TRANSfast) を用い、腹腔内マクロファージ系の細胞の QD ラベルが可能であった。さらにこれらの細胞は移植後 48 時間でパイエル板に移行していることが明らかとなった。組織移行後の表面マーカーの変化等につき現在解析中である。QD によるラベルの輝度は *vivo* に戻すことによってやや減弱する傾向にあった。**結論:** リポソーム法により腹腔内マクロファージ様細胞を QD ラベルすることができ、その *in vivo* での動きを捉えられた。

Backgrounds and Aims: The normal mucosal immune system in the gastrointestinal (GI) tract maintains a delicate balance between immunity to microbial pathogens and tolerance to food antigens and indigenous microflora. This balance mechanism is unique in GI site and distinct from that in systemic immune system. Aiming to clarify how immune cells acquire the characteristics of GI immune system, we here examine the cell traffic between GI tract and other tissues and organs. **Methods:** We first examined various conditions to label mouse Peritoneal cells with QD520 using liposomes. Further, labeled cells were transferred into the peritoneal cavity. After 48 hours, single cell suspension was prepared from peritoneal cavity, lamina propria of the small and large intestine, Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen, and analyzed by flow cytometry. **Results:** Peritoneal macrophage-like cells were successfully labeled with QD in the aid of liposome (TRANSfast, Promega). We found labeled cells distributed in the Peyer's patches in the small intestine. Further analysis on surface marker molecules after tissue distribution is currently under investigation. The intensity of the fluorescence labeling had tendency to attenuate after *in vivo* transfer. **Conclusions:** Using liposome, peritoneal macrophage type cells were labeled with QD and enabled us to observe cell traffic *in vivo*.

ペプチド標的治療に対するモニターリング法の可能性

国立国際医療センター研究所 石坂幸人 zakay@ri.imcj.go.jp

標的治療は病巣局所治療薬の濃度を向上させ、薬剤使用量や副作用の軽減につながり、臨床上大変有用である。我々は、ペプチドによる特定分子 (RET 蛋白) に対する標的化について検討を行ってきた。RET binding peptide (RBP1) は、8つのペプチドからなり神経芽腫に好発する RET 蛋白を認識する。臨床診断応用のために、3価の Fe を有する磁性体ナノパーティクルに RBP1 を結合させることに成功し、これまでに、MRI (4.7T) により 5×10^6 個の RET 陽性細胞を認識している。さらに、RBP1 と化学療法剤との複合体形成により、治療効果の増大も期待される。しかしながら、実際の標的化の効果について、磁性体や化学療法剤を細胞レベルで直接評価することは困難である。今回、われわれは蛍光放射光顕微鏡 (SX-FM) の開発により、細胞内元素分布の画像化を可能とした。SX-FM は、磁性体である Fe や Pt 製剤 (シスプラチン) の細胞内での局在を明らかにした。SX-FM により、磁性体や Pt 製剤の経過時間に従った取り込み量や局在の詳細に明かとなり、標的化のモニターに有用と考えられる。

Novel monitoring system for a cellular targeting therapy

International Medical Center of Japan, Yukihiro ISHIZAKA zakay@ri.imcj.go.jp

A cellular targeting therapy is promising for reducing doses of chemotherapeutic agents and their side effects, as a result of increased drug concentration at local target tissue. We have been studying on tumor targeting by peptides against RET which is frequently expressed in neuroblastoma (NB) cells. Octa-peptides (RET binding peptide; RBP1) could bind RET in NB cells. Furthermore, we combined magnetic nanoparticle (Fe^{3+}) with RBP1 for the purpose of future clinical diagnostic evaluation using MRI. In fact, 5×10^6 RET positive cells could be determined by RBP1 combined with magnetic nanoparticle using 4.7 T of MRI. Combination of RBP1 with anti-cancer drug would be also expected for anti-cancer treatment. Although it is hard to image directly intracellular magnetic nanoparticle or anti-cancer drug, we have invented novel monitoring system of intracellular chemical element with X-ray scanning fluorescence microscopy (SX-FM). SX-FM can image intracellular Fe^{3+} in magnetic particle and Pt in anti-cancer drug (cisplatin), providing a versatile system to monitor RBP1 combined molecule to the target.

腎尿細管上皮を標的とした DDS

名取泰博 (国立国際医療センター研究所臨床薬理) natoriya@ri.imcj.go.jp

慢性腎炎のほとんどは糸球体障害が原因であるが、腎炎の進展に伴って尿細管間質領域に障害が拡大し、尿細管間質障害の程度に比例して腎機能が低下する。また障害が糸球体から間質に拡大する機序には尿細管の関与が重要と考えられている。以前は慢性腎炎の治療の標的は糸球体のみであったが、最近、この尿細管間質障害の抑制を目指した腎炎の新規治療法の開発が試みられるようになった。また糸球体障害の原因は各疾患によりそれぞれ異なるが、それに伴う尿細管間質障害は共通のメカニズムによると考えられていることから、それに対する治療法は、糖尿病性腎症を含めた進行性腎障害に広く適用可能と推測される。

我々はこれまで、腎炎モデルにおけるステロイド剤の治療効果について、リポソームに封入したステロイド剤が、フリーのステロイド剤より少ない用量で得られることを報告してきた。しかし、腎炎モデルにおいて、炎症細胞が間質に浸潤するような病態においてもリポソーム製剤が尿細管間質に蓄積することはなく、そのためには新たな DDS の開発が求められている。

本研究において我々は、尿細管上皮を標的とする新たな DDS の開発を試みる。そのために、山本らが開発した新規シリコンナノ粒子を用いる。シリコンナノ粒子は直径 2 nm であることから糸球体血管壁を通過すると考えられることから、尿細管の管腔側から尿細管上皮への再吸収の系を利用する予定である。

Most types of chronic nephritis result from initial glomerular injuries, but all of the chronic glomerular diseases are followed by tubulointerstitial injuries, the degree of which correlates well with the decline of renal function. It is also suggested that the disease expansion from glomeruli to tubulointerstitium is mediated by the activation and/or dysfunction of tubular epithelium. Recent attempts for the development of new drugs on chronic renal diseases have focused on not only glomerular but tubulointerstitial injuries. Although the mechanisms of glomerular injuries vary among the disease types, those of tubulointerstitial injuries are considered to be common, and so the therapeutic strategy for tubulointerstitial lesion should be applied on most types of chronic nephritis.

We have been studying a DDS for diseased glomeruli, a cationic liposome, which enables us to reduce total doses of glucocorticoid necessary for the treatment of a rat model of progressive glomerular disease. However, the liposome did not accumulate in the tubulointerstitial lesion in the model, and another system is needed for drug delivery to tubulointerstitial area.

In the present project, we are attempting to develop a DDS that targets diseased tubular epithelium. We will use a silicone nano-particles, which are small enough to go through the glomerular capillary walls and are potentially reabsorbed by tubular epithelial cells, if their surface is appropriately modified.