

を観察し得る。

また、硝子体手術においても、ナノ粒子で染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高かった。

#### D. 考察

##### 1. 達成度について

豚眼による実験にて良好な結果を得ているが健康危険対策に更なる改良を試みてゆく方針である。

##### 2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

###### 1) 学術的意義

硝子体が可視化されることによって眼科学の進歩が期待される。

###### 2) 国際的意義

国際学会にて他国の学者より関心が向けられている。

###### 3) 社会的意義

日々の臨床における診察治療から手術治療に及ぶまで適応範囲は広く、社会的意義は高いと思われる。

##### 3) 今後の展望について

上記達成度にも記してあるが健康危険対策を充実させ、より早く臨床分野への普及を促進させたいと考えている。

#### E. 結論

ナノ粒子は日常臨床における硝子体観察には有用な染料となり得る。

また、硝子体手術においては、ナノ粒子利用によって、より簡易で安全性の高い手術とすることが可能である。

#### F. 健康危険情報

本研究で使用している QD に関して更に安全性の高いものを目指して研究中である。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

現在投稿考慮中

(国際学会)

- 1) S. Yamamoto, N. Manabe, A. Hoshino, K. Yamamoto, Application of colloidal quantum dots to visualization of transparent

vitreous of the eye at clinical situation, Bios 2006 (Photonics West) (January, 2006, San Jose, California, U.S.A.).

(国際シンポジウム)

- 1) Satoru Yamamoto, An application of quantum dots in ophthalmology, International Symposium on Colloidal Quantum Dots for Biomedical Applications and Their Safety (November 2005 Kobe, Hyogo, Japan)

(知的所有権の出願・取得状況)

##### 1) 特許出願

発明の名称 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体染色剤及び染色方法

請求項 1 蛍光ナノ粒子を含む眼の硝子体染色剤。

請求項 2 蛍光ナノ粒子が、コア単層構造又はコア・シェル重層構造を有する、請求項 1 記載の染色剤。

請求項 3 蛍光ナノ粒子が、半導体元素を含む、請求項 1 または 2 記載の染色剤。

請求項 4 請求項 1～3 のいずれか 1 項記載の染色剤を眼の硝子体に注入することを含む、眼の硝子体の染色方法。

特許願

整理番号 P005HST-30

受付番号 50600113344

提出日 平18.1.23

出願番号通知(事件の表示)

特願2006-13760

特許庁長官よりの受領書

(平成18年1月23日付け)

識別番号 100113402

氏名(名称) 前 直美

##### 2) その他なし

アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所 室長  
研究協力者 竹下文隆 国立がんセンター研究所 リサーチレジデント

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 や核酸医薬と静電的な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、遺伝子の発現や制御に有効であることを明らかにしてきた。このアテロコラーゲンと小さな二重鎖 RNA (siRNA) とのナノサイズの複合体は生体に投与した場合、血清や体液中のヌクレアーゼから siRNA を保護し、さらに腫瘍部位に集積する傾向があることを見出した。これらの性質は、アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS が siRNA を全身性にデリバリーし、転移性の腫瘍に対する治療戦略として有用であることを示唆するものである。

A. 研究目的

我が国の死因の第一位の座を占める疾病は 21 世紀に入っても「がん」である。がんは働き盛りの青壮年の最大の死因でもあり、保健医療上の対策の重要性は極めて高い。がんの本態はゲノムの不安定性そのものであり、多段階発がん過程によって複数の遺伝子構造・発現異常が集積することにある。このような研究を背景に、がんの大規模なゲノム解析が、診断・治療の創薬標的を同定し、個別化された予知医療を確立するために行われてきた。その成果が新たながん関連遺伝子・治療応答性関連遺伝子やその候補領域を多数同定することにつながっている。これからの研究の焦点は、従来の研究から多数同定されつつある創薬標的候補遺伝子の絞り込みをいかに効率的に実施し、魅力的な創薬標的をひとつでも多く同定することである。ついで求められるのは、それらの候補をいかに効率よく新薬開発と臨床試験の推進へと導くかである。この一連の過程でいくつかのテクノロジーが急発展をみせている。そのひとつが遺伝子の機能を制御することのできる RNAi テクノロジーである。その本体である siRNA の核酸医薬品としての期待は大きく、がんを含めた多くの疾患や感染症に対する新規の治療法として注目されている。本研究ではその siRNA のデリバリー方法として注目されるアテロコラーゲン

DDS によるナノ粒子のデリバリー・テクノロジーを中心に解析を進めており、本年度はヒト前立腺がんの骨点モデルマウスを用いて、siRNA の全身性デリバリーに関するアテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS の能力を検証した。

B. 研究方法

コラーゲンは皮膚真皮 (dermis) など結合組織を形成している繊維状蛋白質で、細胞の足場蛋白質として各組織、器官の形態保持に重要な役割を果たしている。コラーゲン分子の両末端にはコラーゲンの持つ抗原性の大部分を有するテロペプチドが付いており、ペプシンによる分解でテロペプチドだけが消化切断されたものがアテロコラーゲンである。アテロコラーゲンの医療材料としての特性は広く、コラーゲンやアテロコラーゲンは医用材料として、生分解性の縫合糸、止血剤、創傷被覆剤、皮膚陥没部修復用皮内注入剤などに汎用されている。昨年度までの研究成果によって、このアテロコラーゲンは 21mer の小さな二重鎖 RNA である siRNA と結合し、そのナノサイズの粒子が体内のヌクレアーゼによる siRNA の分解から保護し、かつ細胞内への取り込みを上げることが証明した。

siRNA をベースにした核酸医薬による治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内

の目的の細胞へと的確に送り届ける DDS 技術が要求される。本年度は、まずこの siRNA とアテロコラーゲンのナノ複合体の動物モデルへの投与と体内動態についての詳細を引き続き検討した。用いた動物モデルは全身性に骨転移をするヒト前立腺がんのマウスモデルであり、アテロコラーゲン・ナノ粒子による siRNA の全身性のデリバリーを、転移腫瘍、正常の臓器へのデリバリー量をもとに検討を加えた。

### C. 研究結果

すでに前年度に確立した、ルシフェラーゼを発現するヒト前立腺がん細胞を免疫不全マウスの左心室から投与し、20日前後で、全身の骨に転移したマウスモデルをイメージングする系をもとに、本研究を遂行した。骨転移巣への siRNA のデリバリーは、ルシフェラーゼを抑制する GL3siRNA をアテロコラーゲンとのナノ粒子として投与し、バイオイメージング解析を行った結果、顎や大腿骨といった骨点移送の隅々まで siRNA がデリバリーされ、そのルシフェラーゼの発現を 90%も抑制することが判明している(図1)。

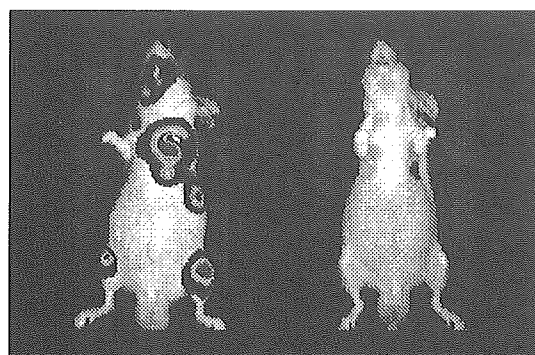


図1。In vivo イメージングによるアテロコラーゲン・ナノ粒子の DDS 効果の検討。左のマウスはヒト前立腺がんの骨転移のモデルで、全身の骨にがんの転移が確認できる。このマウスに、アテロコラーゲンとルシフェラーゼを抑制する siRNA のナノ粒子を尾静脈から投与すると、骨転移部位に siRNA がデリバリーされ、右のマウスのように骨転移のシグナルが消失した。

ナノ粒子による siRNA の抑制効果と腫

瘍や正常の臓器へのデリバリーは、ルシフェラーゼによる in vivo イメージングを光子数で定量することにより、さらに RNase protection 法によって評価した。まず siRNA のナノ粒子は正常の組織にも到達したが、がん組織にはその 1.7 から 2.2 倍の量がデリバリーされていることが判明推した(図2)。

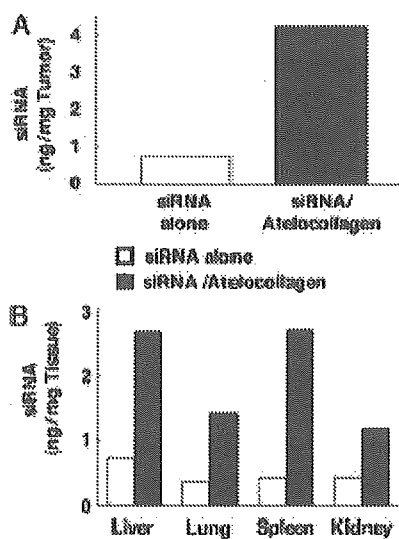


図2。(A)アテロコラーゲン・ナノ粒子は siRNA を腫瘍に高率にデリバリーする。(B)正常組織にも siRNA はデリバリーされる。その量は、臓器の重量 1 mg あたり、例えば肝臓では、2-3 ng の siRNA が到達している。腫瘍ではその正常組織の 2 倍量のデリバリーが認められた。

さらに正常組織からは siRNA のほとんどが 5-7 日で消失するのに対し、腫瘍組織ではその 60%が残存していた。また転移巣の腫瘍における遺伝子発現抑制効果は 90%以上に達し、さらに転移腫瘍そのものの増殖も 4 週間以上に渡って抑制した。

### D. 考察

#### 1) 達成度について

我が国独自の材料と技術によってもたらされたアテロコラーゲン・ナノ粒子によるデリバリーテクノロジーが siRNA の全身性投与に対しても有効であることを証明した。さらに組織への siRNA のデリバリー量を正確に算定した結果、本方法は正常組織に比較して、腫瘍への siRNA

の集積を促進することが、明らかとなった。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

siRNA をベースにした核酸医薬による治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内の目的の細胞へ的確に送り届ける DDS 技術が要求される。この点で siRNA を生体由来の分解酵素から保護し、他の遺伝子導入方法や蛋白質を導入する方法と比べて、生体内で長期間にわたって核酸医薬を安定に保持するアテロコラーゲンの諸性質は大きなアドバンテージとなる。このアテロコラーゲンのデリバリーの特長を生かして、この技術を用いた動物疾患モデルでの siRNA の治療薬としての可能性を実証検討することが今年度の研究成果によって成し遂げられた。

3) 今後の展望について

本研究成果により、アテロコラーゲン・ナノ粒子による siRNA の全身性骨転移モデルへのデリバリーが可能になった事実は、がん等の固形腫瘍ばかりではなく、全身の恒常性の維持に働く基礎代謝などの生理現象や疼痛、倦怠、疲労、さらには精神活動に対する現象の制御として siRNA は有用であることを示唆している。我々のアテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS は、動物の全身性の臓器、組織にまで siRNA をデリバリーしうることから、今後、siRNA の核酸医薬品としての利用価値が確立すれば、様々な疾患を標的にした医療への応用が期待できる。

#### E. 結論

本年度の研究成果は、アテロコラーゲンと siRNA 複合体のナノ粒子の全身性デリバリーの基礎となる研究成果であり、今後の siRNA の臨床応用に向けてのナノ粒子デリバリー技術の開発に道が開けた。

#### 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ない。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表 (欧文)

1) Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I,

Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol*, in press.

2) Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in *Dicer1*-hypomorphic mice. *Cytogenet Genome Res.* in press.

3) Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. “Stem cells into liver”-Basic research and potential clinical application. *Adv. Exp. Med. Mol. Biol*, in press.

4) Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 12177-12182, 2005.

5) Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Komatsu T, Fukumoto H, Koizumi F, Nishio K, Ochiya T, Ino Y, Hirohashi S. Development and biological analysis of peritoneal metastasis mouse models for human scirrhus stomach cancer. *Cancer Sci.* 96: 323-332, 2005.

6) Saito S, Honma K, Kita-Matsuo H, Ochiya T, Kato K. Gene expression profiling of cerebellar development with high-throughput functional analysis. *Physiol Genomics.* 22: 8-13, 2005.

7) Teratani T, Quinn G, Yamamoto Y, Sato T, Yamanokuchi H, Asari A, Ochiya T. Long-term maintenance of liver-specific functions in cultured ES cell -derived hepatocytes with hyaluronan sponge. *Cell Transplant.* 14:629-635.

8) Yamamoto Y, Teratani T, Yamamoto H, Quinn G, Murata S, Ikeda R, Kinoshita K, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from embryonic stem cells, *Hepatology*, 42: 558-567, 2005.

9) Teratani T, Yamamoto H, Aoyagi K,

Sasaki H, Asari A, Quinn G, Sasaki H, Terada M, Ochiya T. Direct hepatic fate specification from mouse embryonic stem cells. *Hepatology*. 41: 836-846, 2005.

(和文)

- 1) 落谷孝広: siRNA デリバリーシステムのがん治療への応用, *Pharm Tech JAPAN* 21: 104-107, 2005 (時報社)
- 2) 竹下文隆、落谷孝広: アテロコラーゲンによる遺伝子治療用ベクターの生体内制御, *Molecular Medicine*, 42: 292-297, 2005 (中山書店)
- 3) 竹下文隆, 落谷孝広: アテロコラーゲンによるがん治療を目的とした siRNA の in vivo デリバリーシステム, *RNA 工学の最前線*, 88-96, 2005. 中村義一(編), (シーエムシー出版)

## 2. 学会発表

- 1) Atelocollagen-mediated delivery system for nucleic meducunes. Nagahara S., Takeshita F., Honma K., Hanai K., Sano A. and Ochiya T., 第5回レトロメタボリズムカンファレンス (2005. 5. 8-11 神奈川)
- 2) アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイによる抗がん剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、阿蘇雄、伊藤博、加藤菊也、落谷孝広 (ポスター)、第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9. 14 札幌)
- 3) HST-1/FGF-4高発現による脳の発達異常、上田しのぶ、高濱靖、朝元誠人、竹下文隆、坂本裕美、寺田雅昭、落谷孝広 (ポスター)、第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9. 15 札幌)
- 4) HPV18型のE6, E7遺伝子を標的とした small interference RNA の腫瘍増殖抑制効果に関する検討、藤井多久磨、林茂徳、落谷孝広、武井佳史、塚崎克己、久布白兼行、青木大輔、野澤志朗 (ワークショップ) 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9. 16 札幌)
- 5) 白血病関連遺伝子MOZの造血における役割、勝本拓夫、相川祐規子、落谷孝広、北林一生 (ポスター) 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9. 16 札幌)
- 6) siRNA/アテロコラーゲンデリバ

リーシステムの腫瘍組織特異性の検討、竹下文隆、永原俊治、本間紀美、落谷孝広 (ワークショップ) 第64回日本癌学会学術総会 (2005. 9. 16 札幌)

7) サイクリンD1過剰発現による腫瘍形成促進に関与する遺伝子の検索、生田目奈知、竹下文隆、加藤尚志、落谷孝広 (ポスター) 第28回日本分子生物学会年会 (2005. 12. 7 福岡)

8) アテロコラーゲン siRNA 導入技術による薬剤耐性関連遺伝子の機能解析、本間紀美、小泉恭子、竹下文隆、根本一樹、小野寺純、阿蘇雄、伊藤博、加藤菊也、落谷孝広 (ポスター) 第28回日本分子生物学会年会 (2005. 12. 8 福岡)

9) siRNA/アテロコラーゲン複合体の全身投与における臓器・腫瘍組織特異性の検討、竹下文隆、生田目奈知、水口佳子、本間紀美、加藤尚志、落谷孝広 (ポスター) 第28回日本分子生物学会年会 (2005. 12. 9 福岡)

10) アテロコラーゲンナノ粒子による siRNA の全身性投与、落谷孝広 (シンポジウム) 日本薬理学会第126年会 (2006. 3. 28 仙台)

(海外発表)

1) The 2nd International Conference on Tissue Engineering, Greece, May 22-27 2005, Ochiya T., Yamamoto Y., Teratani T. Title: Long-term maintenance of ES cell -derived hepatocytes with hyaluronan sponge. 招待講演

2) American Society of Gene Therapy, Minneapolis, June 1-5 2005, Nagahara S, Takeshita F, Honma K, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Title: Efficient inhibition of bone metastasis via systemic delivery of siRNA using atelocollagen-mediated delivery system.

3) 64<sup>st</sup> Annual Meeting of Society for Developmental Biology, San Francisco, June 27- August 1 2005, Yamamoto Y., Teratani T., Quinn G., Kato T., Ochiya T., Title: Recapitulation of in vivo gene expression during hepatic differentiation from mouse embryonic stem cells. March 12-18 2006,

H. 知的所有権の出願・取得状況  
特許出願今年度は特になし

生物・医療応用  
PEG-DET による *in vivo* 遺伝子導入の試み

分担研究者 斯波 真理子 国立循環器病センター研究所 室長

本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、*in vitro* および *in vivo* の遺伝子導入実験を行うこと、さらに遺伝子導入ベクターとしての評価を行い、遺伝子治療の臨床応用の基とすることである。我々は、昨年までの研究で、*in vivo* において遺伝子発現効率の非常に良好である遺伝子導入ベクター (PEG-DET) の開発に成功している。本年度は、PEG-DET を用いた *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入を行った。*in vitro* では、transfection が困難であった血管内皮細胞やマクロファージ系の細胞でも、遺伝子導入、発現が可能であることを示した。また、*in vivo* では、動脈硬化症の進展したアポ E ノックアウトマウスに対して、左心室内投与により、大動脈に特異的に遺伝子の発現を認めた。また、疾患動物モデルを用いて、PEG-DET による遺伝子導入の試みを行い、治療の評価を行った。疾患モデル動物としては、まず、モノクロタリン投与によって肺高血圧症を引き起こしたラットを用いた。PEG-DET を用いて気管内よりアドレノメデュリン遺伝子を投与し、その効果をカテーテルによる右室圧測定にて行ったところ、肺高血圧の改善を認めた。合成ベクターを用いた遺伝子導入により、疾患モデル動物の治療に成功したことは、遺伝子治療の臨床応用に向けて、飛躍的な前進をとげたと言える。

A. 研究目的

近年のウイルスベクターによる副作用の報告から、ウイルスベクターに対する安全性が懸念されている。合成ベクターは、安全性の面からはウイルスベクターより優れるが、特に *in vivo* での遺伝子発現効率の低さが、その臨床応用を阻んできたと言える。

我々は、遺伝子導入ベクターとして、カチオニックポリマーとポリエチレングリコールのブロック共重合体を使用し、DNA との会合により高分子ナノ粒子を作製し、*in vitro* および *in vivo* での遺伝子導入を行ってきた。ポリカチオンとしては、最初はポリ L リジンをを用い、遺伝子導入効率を上昇させることを考慮して、現在は DET (polyaminoethylene aminopropyl aspartamide) を用い、特に *in vivo* において良好な遺伝子導入、発現効率を示している。昨年度の研究では、PEG-DET を用いたルシフェラーゼ遺伝子の気管内投与により、従来のポリマーに比べて 100 倍程度の遺伝子発現を認め

ていた。本年度は、これらの遺伝子導入の系を用いて、疾患モデル動物の治療を行い、治療効果の評価を行った。

B. 研究方法

1. 遺伝子導入ベクターの作製

ポリエチレングリコール (PEG) (12,000) と、カチオニックポリマーとして polyaminoethylene aminopropyl aspartamide; (DET; 重合度 68) の共重合体を用いた。DNA 溶液と PEG-DET を 20 mM HEPES 存在下に混和して PEG-DET ポリプレックスとして、室温で約 16 時間静置した後、実験に供した。

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、血管内皮細胞を用いた。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条件の PEG-DET ポリプレックスを加え、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、蛋白質定量後、活性を RLU/mg prot で表した。

### 3. アポ E ノックアウトマウスに対する PEG-DET ポリプレックスを用いたルシフェラーゼ遺伝子の左心室内投与

52 週齢以上のアポ E ノックアウトマウスおよび対照として ICR マウスを麻酔し、経横隔膜より左室内に PEG-DET ポリプレックスを投与した。1 日後、各臓器をホモゲナイズし、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### 4. 肺高血圧モデルラットの作製

180 g の Wister ラットに、モノクロタリン 12 mg/100 g 体重を皮下注射して、4 週間放置し、肺高血圧モデルを作製した。

### 5. 血行動態測定

モノクロタリン投与 4 週間後のラットの頸静脈よりカテーテルを挿入して、PowerLab につなぎ、血圧を測定した。圧波形より、カテーテルの先端が右室に挿入されたことを確認後、右室圧を測定した。気管内遺伝子導入 3 日後、再度、右室圧測定を行った。

### 6. 気管内遺伝子導入

ラットの気管切開の後、ラット気管内投与器具を用いて PEG-DET ポリプレックスの気管内投与を行った。

## C. 研究結果

### (1) PEG-DET ポリプレックスの *in vitro* 遺伝子導入

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。DET の重合度は 68 と 101、N/P は 20、40、80 のもので検討を行った。

Cos-1 細胞への遺伝子導入は、いずれの条件でも、PEI と同等あるいはそれ以上の発現効率を得た (図 1)。重合度は 101 のもので 68 よりも遺伝子発現効率は高く、また、N/P 比は 80 のもので最大であった。

HepG2 細胞への遺伝子導入は、重合度は影響がなく、N/P 比は大きいほど遺伝子発現が高率であった (図 2)。

血管内皮細胞では、PEI および重合度 101 のもので毒性効果がでて多くの細胞が死んでしまい、図 3 のような結果となった。重

合度 68 の中でも N/P 比 80 のもので、良好な遺伝子導入効率を認めた。

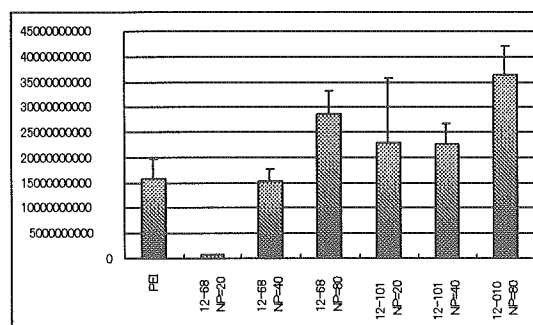


図 1. PEG-DET による Cos-1 細胞への遺伝子導入

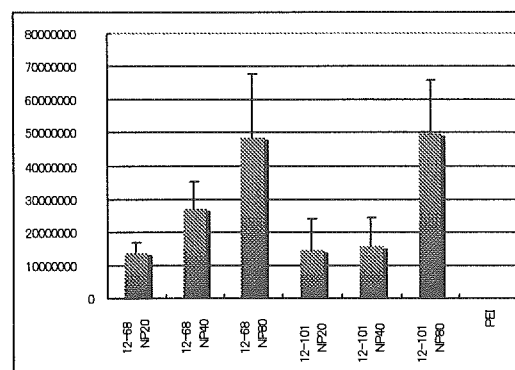


図 2. PEG-DET による HepG2 への遺伝子導入

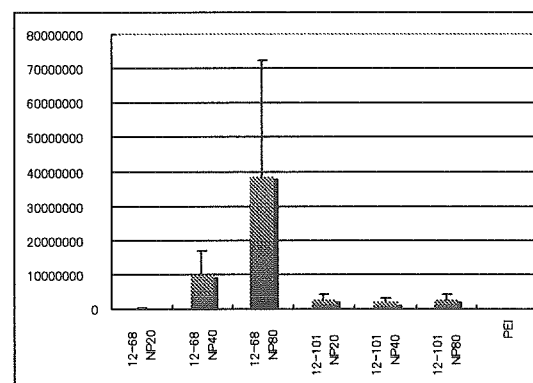
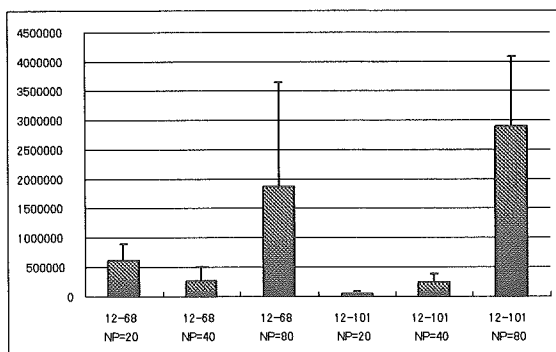


図 3. PEG-DET による血管内皮細胞への遺伝子導入

単球由来白血病細胞株 THP-1 では、68、101 いずれの重合度でも、N/P 比 80 のもので高率な遺伝子発現を認めた (図 4)。以上より、*in vitro* では、N/P 比が高値、重合度が 101 である方が、遺伝子発現効率が高値であること、重合度が 101 の場合、毒性がでる細



胞もあることがわかった。

図 4. PEG-DET による THP-1 細胞への遺伝子導入

(4) アポ E ノックアウトマウスに対する PEG-DET ポリプレックス左心室内投与

PEG-DET を用いてアポ E ノックアウトマウスにルシフェラーゼ遺伝子の左室内投与による *in vivo* 遺伝子導入実験を行った。投与 3 日後には、いずれの臓器においても有意な遺伝子発現を認めなかったが、7 日後において、アポ E ノックアウトマウスの大動脈においてのみ、有意な遺伝子発現を認めた (図 5)。通常のマウスは、血中コレステロール値が低く、動脈硬化を引き起こさないことが知られている。一方、アポ E ノックアウトマウスは、血清総コレステロール値が 700 mg/dl という高値を示し、8 週齢頃より動脈硬化が進行することが知られている。本研究で使用したものは、52 週齢を過ぎたもので、著明な動脈硬化をきたしていた。これらのことから、動脈硬化巣で PEG-DET ポリプレックスにより遺伝子導

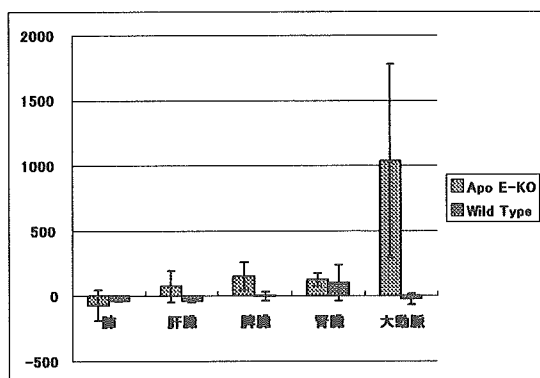


図 5. PEG-DET ポリプレックス左心室内投与 7 日目の各臓器における遺伝子発現

入、発現が可能であったのは、動脈硬化巣

で炎症がおき、EPR(enhanced permeability reaction)の機序で高分子である PEG-DET が取り込まれ、その場に滞留した結果であると考えられる。

(4) 肺高血圧ラットに対する PEG-DET ポリプレックスによるアドレノメデュリン遺伝子の導入の効果

Wister ラットにモノクローリンを皮下注して 4 週間後、カテーテルを用いて右室圧を測定したところ、 $92 \pm 10$  mmHg であり、肺高血圧モデルの作製に成功していることを確かめた。アドレノメデュリン発現ベクターと PEG-DET を N/P 比 20、40、80 として混和し、PEG-DET ポリプレックスとし、ラット気管内投与を行った。N/P 比 20 の PEG-DET ポリプレックスは、ほとんど効果を認めず、40 は、全例で右室圧の低下を認めた (図 6)。N/P 比 80 のポリプレックスは、投与後数時間で 1 例を除き、死亡した。

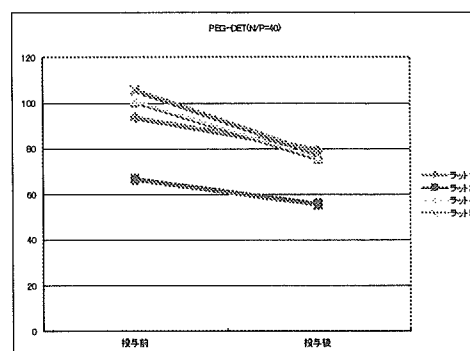


図 6 PEG-DET (N/P 比 40) を用いたアドレノメデュリン遺伝子の導入による肺高血圧ラットの治療効果

D. 考察

1) 達成度について

遺伝子導入ベクターの開発において、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 PEG-DET の研究開発で、発現効率が著明に改善されたベクターが開発されたと言える。また、PEG-DET という新しいベクターは、現在、市販されている、*in vivo* 遺伝子導入試薬 (Exgen) および架橋ミセルに比し、50-100 倍もの高度な発現効率を持っており、本年度の研究結果より、疾患モデル動物の治療にも効果があることがわかった。これらのことは、合成ベクターの臨床応用へむけて、大きな前進



をとげたと言える。本研究は、遺伝子導入ベクターの開発の世界でも、画期的なことである。

## 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

今回、PEG-DET という、*in vivo* での遺伝子発現効率が、従来のものの 50-100 倍という、新しいベクターの開発に成功し、疾患モデル動物での治療に一定の効果を認めたことは、画期的なことである。臨床応用にむけて、大きなブレイクスルーがなされたと考えられる。

## 3) 今後の展望について

次年度以降は、疾患モデル動物に対する治療効果をさらに大きくする条件の検討と、臨床応用にむけて、安全性の検討を中心に行っていく予定である。

## E. 結論

本研究において、我々は、*in vivo* において、発現効率の非常に高い遺伝子導入ベクターの開発に成功し、疾患モデル動物の治療に一定の効果を認めた。

## 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. Yamamoto A, Harada-Shiba M, Endo M, Kusakabe N, Tanioka H, Kato H, Shoji T. The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia undergoing LDL-apheresis therapy. *Atherosclerosis*. in Press.

2. Umeda M, Harada-Shiba M, Uchida K, Nakayama Y.

Photo-Control of the polyplexen formation between DNA and photo-cation eneratable water-soluble polymers. *Current Drug Delivery*. 2005;2:207-214

3. Nakayama Y, Masuda T, Nagaishi M, Hayashi M, Ohira M, Harada-Shiba M, High performance gene delivery polymeric vector: Nano-Structured cationic star polymers (star vectors). *Current Drug Delivery*. 2005;2:53-57

## 2. 学会発表

### 国内学会

1. 南雲彩子、榎野久士、宮本恵宏、岡田定規、吉政康直、斯波真理子: LD L-アフェレシスを行いながら、妊娠、出産を行ったFHホモ接合体2例について、日本アフェレシス学会関西地方会、一般演題 (2005年12月)

2. 斯波真理子、横山信治、都島基夫、山崎卓、山本章、高木敦子、吉政康直、友池仁暢: 家族性高コレステロール血症 (FH) と Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) の臨床像、第37回日本動脈硬化学会、ジンポジウム (2005年7月東京)

3. 安倍映里、高木敦子、大平望都、神野桂子、前田律子、斯波真理子: *in vitro*におけるLDL受容体の細胞内取り込み機構のARH依存性について-*in vivo*との差異-、第37回日本動脈硬化学会、一般演題 (2005年7月東京)

4. 大平望都、斯波真理子、安倍映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則: PEG-DETによる*in vitro*および*in vivo*の遺伝子導入の試み、第37回日本動脈硬化学会、一般演題 (2

005年7月東京)

5. 斯波真理子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、片岡一則：Enhanced *in vivo* gene expression using PEG-DET、The 6<sup>th</sup> International Conference on Intelligent Materials and Systems (2005年7月東京)

6. 斯波真理子：循環器病に対する遺伝子治療への試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム、招待講演 (2005年5月東京)

7. 大平望都、斯波真理子、安倍映里、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、位高啓史、山崎裕一、福島重人、片岡一則：PEG-DETによる *in vitro* および *in vivo* の遺伝子導入の試み、遺伝子デリバリー研究会第5回シンポジウム、一般演題 (2005年5月東京)

8. 斯波真理子、横山信治、吉政康直、山本章：Target LDL-cholesterol levels in familial hypercholesterolemia for prevention of cardiovascular events (横浜)、日本循環器学会、一般演題

立循環器病センター総長

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

### 研究協力者

国立循環器病センター研究所  
バイオサイエンス部

大平望都

安倍映里

神野桂子

前田律子

東京大学大学院工学系研究科

片岡一則

西山伸宏

宮田完二郎

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1 染色体性劣性高コレステロール血症遺伝子における新規変異/特許第 3709438 号/出願番号：特願 2002-130779/発明者：斯波真理子/出願人：国立循環器病センター総長/出願日：平成14年5月2日/公開番号：特開2003-319783/公開日：平成15年11月11日

2. 高コレステロール血症の疾患モデルマウス/出願番号：特願 2005-243938/発明者：斯波真理子/出願人：国

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

本研究の目的は、ブロック共重合体から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの機能評価と細胞に対する作用メカニズムの解析を通して、ベクター設計の最適化を行うことである。前年度までに確立したアミノリシス法により側鎖カチオン構造が異なるブロック共重合体を合成し、培養細胞および細胞スフェロイドに対する遺伝子発現および毒性評価を行ったところ、側鎖にエチレンジアミン構造を有するポリマーにより効率的な遺伝子発現と低毒性を実現できることが確認された。さらに、その細胞内における機能を、細胞による取り込み、細胞内におけるDNAのリリース、遺伝子導入に伴うハウスキーピング遺伝子の発現変化の観点から評価した。

A. 研究目的

遺伝子治療における最も重要な課題の一つはベクターの開発であり、安全性と製剤性に優れ、比較的安価な非ウイルス型遺伝子ベクターに対する期待が高まっている。これに関連して、分担研究者である片岡らは、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がDNAと静電的に相互作用することで形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発を行ってきた。このような合成ベクターの開発においてはポリカチオンの化学構造が極めて重要であることが知られているが、これまでは有用な合成ベクターの設計に関する明確な知見が得られていなかった。これは、合成ベクターの合成法に加えて、それらの評価系が十分に確立されていなかったためであると考えられる。そこで本研究では、化学構造が異なるポリカチオンを合成し、それらの機能について我々が独自に開発した評価法を用いて検討を行い、ベクターの化学構造-機能相関を明確にすることを目的としている。さらには、それらの合成ベクターの細胞内における挙動について様々な検討を行うことで有用な合成ベクターを開発するための基本要件を明らかにすることを目指す。

B. 研究方法

1) ポリカチオンの合成とポリプレックスの調製

前年度までに確立したアミノリシス法を利用してポリアスパラギン酸(P[Asp])側鎖にジエチレントリアミン(DET)およびジプロピレントリアミン(DPT)を導入したP[Asp(DET)]およびP[Asp(DPT)]ホモポリマー(重合度 101)ならびにそれらのポリエチレングリコール(PEG)とのブロック共重合体を合成した(PEG 分子量 12000, ポリアミノ酸重合度 98) (図 1)。

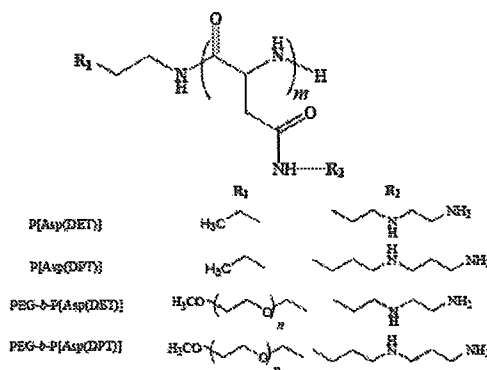


図 1. ポリカチオンの化学構造

ポリプレックスは、10mM トリス緩衝液 (pH7.4) 中でDNAとポリマーを異なるN/P比 (DNAのリン酸残基に対するカチオン性アミノ基のモル数) で混合することにより調製した。

2) がん細胞スフェロイドを用いた遺伝子導

## 入実験

ヒト肝がん細胞 Huh-7 細胞をスフェロイド作製用 96 穴プレート(住友ベークライト)に播種し、培養することで直径 100 $\mu$ m のガンスフェロイドを作成した。蛍光タンパク質 YFP を発現するプラスミドを内包したポリプレックスをスフェロイドと 24 時間接触させ、その一定時間後の YFP の発現をレーザー共焦点顕微鏡 (CLSM) により観察した。

### 3) 蛍光エネルギー移動 (FRET) を利用した細胞内の DNA のリリース挙動の CLSM 観察

DNA を 2 種類の蛍光色素 (fluorescein (FL), Cy3) でラベル化し、その FRET の変化によって細胞内におけるポリプレックスからの DNA のリリース挙動を評価した。すなわち、ポリプレックスが形成されている状態においては FRET が起こり、解離することによって FRET が解消されるが、本実験では細胞内におけるその様子を CLSM により観察した。

### 4) 定量 PCR を用いた DNA の取り込み量の評価

ポリプレックス化 DNA の細胞内取り込み量を内包 DNA (Luc) に対する primer set を用いて定量 PCR を用いることで評価した。

### 5) ポリプレックスの毒性とハウスキッピング遺伝子の発現量の評価

ポリプレックスの毒性評価は MTT アッセイにより行った。また、ポリプレックスを用いた遺伝子導入に伴う細胞のハウスキッピング遺伝子の変化をそれぞれの遺伝子に対する primer を用いた定量 PCR により評価した。これらの実験の対照としては、BPEI もしくは LPEI を用いた。

## C. 研究結果

### 1) がん細胞スフェロイドを用いたポリプレックスの機能評価

P[Asp (DET)] および P[Asp (DPT)] ホモポリマーからなるポリプレックスの単層培養およびスフェロイド培養 Huh-7 細胞に対する遺伝子導入効率を行った結果をそれぞれ図 2 (a) および (b) に示す。単層培養実験における遺伝子導入効率はルシフェラーゼアッセイにより評価し、対照として汎用遺伝子導

入ポリマーとして知られる線形および分岐形ポリエチレンイミン (LPEI, BPEI) を用いた。その結果、単層培養実験においては、P[Asp (DPT)] は N/P の増加に伴う細胞毒性を示し、遺伝子導入活性はそれほど高くはなかった。一方、P[Asp (DET)] は細胞毒性を示すことなく LPEI や BPEI と同等の遺伝子発現活性を示した。一方、スフェロイド培養実験においては、P[Asp (DPT)] と LPEI および BPEI は顕著な細胞毒性を示し、スフェロイドが崩壊することが確認された。これに対し、P[Asp (DPT)] は N/P=40 ではスフェロイドが崩壊したが、それ以下の N/P 比では、毒性を示すことなく、4-8 日間に渡り顕著な YFP の発現を示した。このようにスフェロイド培養を用いることで、従来の単層培養では困難であった長期における遺伝子発現評価と感度に優れた毒性評価が可能となった。その結果、低毒性と高い遺伝子発現活性を兼ね備えた P[Asp (DET)] が優れた合成ベクターであることが明らかとなった。

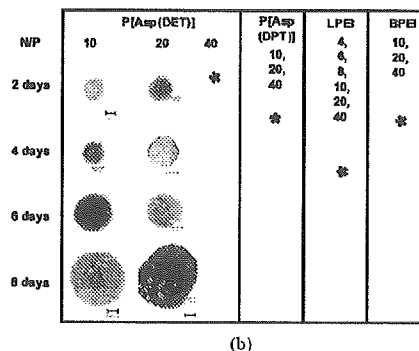
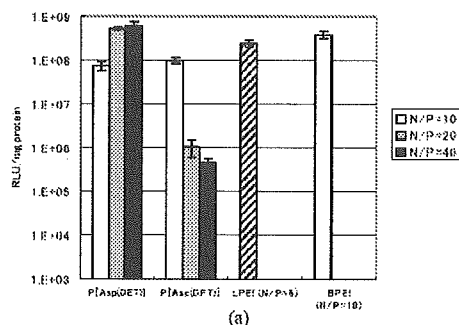


図 2. (a) Huh-7 細胞の単層培養における遺伝子 (Luc) 導入効率, (b) Huh-7 細胞のスフェロイド培養における遺伝子 (YFP) 導入効率 (\* 毒性のためにスフェロイドが崩壊)

次に、PEG-b-P[Asp (DET)] および PEG-b-P[Asp (DPT)] ブロック共重合体の遺伝子発現

評価を同様に行った結果を図 3 に示す。その結果、PEG とポリカチオンをブロック共重合体化し、高分子ミセル化することでポリプレックスの細胞毒性が著しく減少することが確認された。さらに、スフェロイド培養実験において、PEG-b-P [Asp(DET)] は、高い N/P 比においても、スフェロイドを崩壊させることなく、明確な YFP の発現を示した。PEG-b-P[Asp(DPT)] は、N/P=10 ではスフェロイドの崩壊が確認されなかったが、遺伝子発現はほとんど確認することができなかった。これらの結果は、ポリカチオンの PEG 化を行い、高分子ミセルを形成させることで、毒性が著しく減少することと、高分子ミセル型ベクターにおいても P[Asp(DET)] は極めて優れたポリカチオンであることを示唆しているものと考えられる。

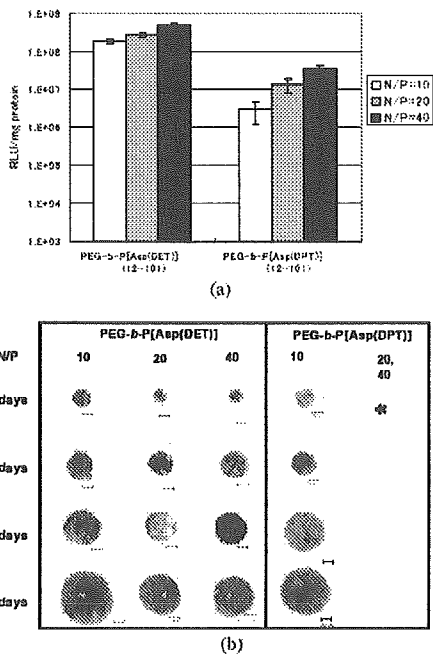


図 3. PEG-b-P[Asp(DET)] および PEG-b-P[Asp(DPT)] の単層培養における遺伝子(Luc)導入効率 (a) およびスフェロイド培養における遺伝子導入効率 (b)

## 2) FRET を利用した細胞内におけるポリプレックスからの DNA のリリース挙動の観察

図 4 に P[Asp(DET)] および LPEI からなるポリプレックスの培養 24 時間後の CLSM 像を示す。図 4 の右の図は、FL を励起した時の蛍光強度 (FL/Cy3) 比であり、FRET の解消

によって黒→白に変化する。その結果、P[Asp(DET)] から形成されたポリプレックスは、24 時間以内にすべての FRET が解消し、DNA が細胞内に一様に分布していることが確認された。これは LPEI の結果と一致するものであった。このように、P[Asp(DET)] からなるポリプレックスは、細胞内で速やかに DNA を放出することで効率的な遺伝子発現を示すことが示唆された。

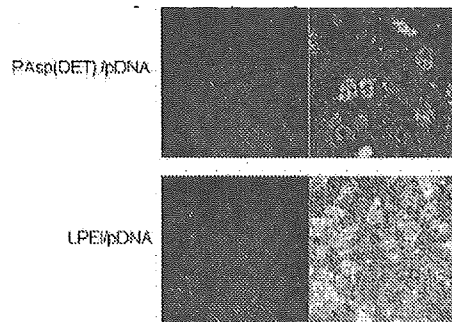


図 4. FRET を利用したポリプレックスから DNA のリリースの観察 (右:FL/Cy3 蛍光強度比)

## 3) ポリプレックスの細胞内取り込みから発現に至るまでの定量的解析

図 5 に単位細胞当たりに取り込まれた DNA 量、Luc の mRNA 発現量およびタンパク質発現量を評価した結果を示す。その結果、P[Asp(DET)] からなるポリプレックスは、BPEI のそれよりも高い細胞内取り込み量を示し、その差は時間依存的に大きくなることを確認された (24 時間後に最大の 16 倍)。また、mRNA の発現量も DNA の取り込み量に相関していることが確認された。その結果、P[Asp(DET)] は BLEI よりも一桁以上高い遺伝子発現を示した。

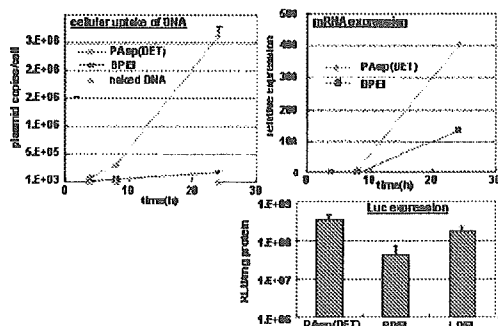


図 5. DNA の細胞内取り込み量、導入した遺伝子 (Luc) の mRNA 発現量、Luc 発現量の定量的解析

## 4) ポリプレックスを利用した遺伝子導入に伴う毒性の評価

上述の P[Asp(DET)] からなるポリプレッ

クスの細胞内への効率的な取り込みは、P[Asp(DET)]が細胞の正常機能を障害しないことに起因するものと考えられる。そこで、遺伝子導入に伴う細胞生存率の変化をMTT アッセイにより評価した結果を図 4 上に示した。その結果、LPEI からのポリプレックスにおいて細胞生存率の減少傾向が見られたが、ポリプレックス間に有意な差は認められなかった。さらに、ポリプレックスを利用した遺伝子導入に伴うハウスキーピング遺伝子の発現変化を定量 PCR により評価した結果を図 6 下に示した。その結果、LPEI による遺伝子導入ではハウスキーピング遺伝子の発現が顕著に減少することが確認された。この結果は、PEI による遺伝子導入が細胞に致命的なダメージを与えないまでも、細胞のホメオスタシスに大きな影響を及ぼしていることを示唆するものと考えられる。一方、P[Asp(DET)]は、細胞のハウスキーピング遺伝子の発現に影響を与えないことが確認された。このように、P[Asp(DET)]は、細胞の正常機能を阻害しないことが示唆され、これは遺伝子導入による細胞機能の人為的制御において重要な特性であると考えられる。

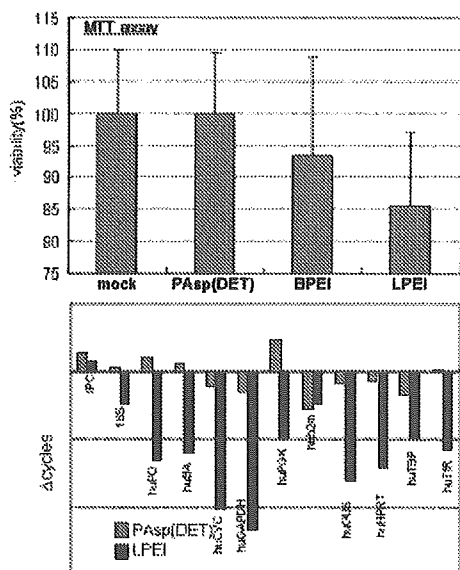


図 6. 遺伝子導入に伴う細胞生存率(上)およびハウスキーピング遺伝子の発現量変化(下)

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

本年度までに、新しい遺伝子発現評価系

として細胞スフェロイドを用いた遺伝子発現評価法を立ち上げ、これを利用して低毒性かつ効率的な遺伝子発現を示すポリカチオンを見いだすことができた。さらに、FRETによるDNAのリリース観察、DNA取り込み量とmRNA発現量の定量的解析およびハウスキーピング遺伝子の発現量変化に基づく毒性評価など、ポリプレックスの細胞内挙動を解析するための新しい評価系を確立することにも成功した。このように本研究では、ポリプレックスの機能発現メカニズムを解明するという当初の目標を着実に達成している。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

低毒性と効率的な遺伝子発現を備えた人工ベクターの開発のためには、適切な評価系の確立が必要である。このような目的において、本研究では、スフェロイドを用いた遺伝子発現評価系を確立した。この評価系は、(i)長期にわたる *in vivo* に近い環境での遺伝子発現評価、(ii)感度に優れた毒性評価、を可能とし、この評価系を利用することで、低毒性と効率的な遺伝子発現を達成するポリカチオン P[Asp(DET)]を見いだすことに成功した。この評価系は、我々が独自に確立したものであり、人工ベクターの開発において革新的なものとなることが予想される。さらに、遺伝子治療や再生医療などの目的において、遺伝子導入により細胞の機能を人為的に制御するためには、細胞の正常機能を損なうことなく、目的遺伝子を導入する必要があるが、本研究では、ポリカチオンの細胞機能への影響をハウスキーピング遺伝子の発現変化により評価した。その結果、P[Asp(DET)]が効率的な遺伝子導入を達成する一方で、細胞の正常機能に影響を及ぼさないことが明らかとなった。このような観点から、ベクターを評価したのは、我々が世界で初めてであり、人工ベクターを実用化するために考慮すべきであると考えられる。

##### 3) 今後の展望について

本年度は、スフェロイド評価系を利用して低毒性と効率的な遺伝子発現を達成するポリカチオンを見いだすことに成功した

めに、今後は、PEG-b-ポリカチオンブロック共重合体の細胞内における機能発現メカニズムの解明を行う予定である。さらに、これらによって得られた知見が、ベクターの *in vivo* 応用において重要であることを実証するために、骨誘導因子発現 DNA の筋肉注射による異所性骨再生などの実験を行う。*in vitro* と *in vivo* の機能相関を解明することで、実用的な人工ベクターの設計法が確立できるものと期待される。

#### E. 結論

以上のように、新しい評価系としてスフェロイドに対する遺伝子導入実験を行い、低毒性と効率的な遺伝子発現を達成するポリカチオンを見いだすことに成功した。また、人工ベクターの細胞内の機能発現メカニズムを解明することを目的として、細胞内の DNA 取り込み量、mRNA 発現量、タンパク質発現量の定量的解析を行った。さらに、ハウスキーピング遺伝子の発現量変化を通じて、本研究で開発したポリカチオンが細胞の正常機能に影響を及ぼさないことを実証した。これらの評価系は、実用的な人工ベクターを開発する上で極めて有用であると考えられる。

#### 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) N. Nishiyama, Arnida, W. -D. Jang, K. Date, K. Miyata, K. Kataoka, Photochemical enhancement of transgene expression by polymeric micelles incorporating plasmid DNA and dendrimer-based photosensitizer. *J. Drug Target.* in press
- 2) N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. -D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. Chung, K. Kataoka, PEG-based biocompatible block cationer with high-buffering capacity for the construction of

polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem* in press

- 3) R. Ideta, F. Tasaka, W. -D. Jang, N. Nishiyama, G. -D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida, K. Kataoka, Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer. *Nano Lett.* 5 (12) 2426-2431 (2005)
- 4) K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, T. Watanabe, M. Kohara, K. Kataoka, Freeze-dried formulations for *in vivo* gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *J. Control. Release* 109 (1-3) 15-23 (2005)
- 5) N. Nishiyama, A. Iriyama, W. -D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama, K. Kataoka, Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat. Mater.* 4 (12) 934-941 (2005)
- 6) X. Yuan, Y. Yamasaki, A. Harada, K. Kataoka, Characterization of stable lysozyme-entrapped polyion complex (PIC) micelles with crosslinked core by glutaraldehyde. *Polymer* 46 (18) 7749-7758 (2005)
- 7) Y. Bae, W. -D. Jang, N. Nishiyama, S. Fukushima, K. Kataoka, Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Molecular BioSystems* 1 (3) 242-250 (2005)
- 8) K. Osada, Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka, A synthetic block copolymer regulates S1 nuclease fragmentation of supercoiled plasmid DNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (23) 3544-3548 (2005)

- 9) S. Fukushima, K. Miyata, N. Nishiyama, N. Kanayama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated polyplex micelles from triblock cationers with spatially ordered layering of condensed pDNA and buffering units for enhanced intracellular gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 127 (9) 2810-2811 (2005)
- 10) X. Yuan, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Stabilization of lysozyme-incorporated polyion complex micelles by the  $\omega$ -end derivatization of poly(ethylene glycol)-poly( $\alpha$ ,  $\beta$ -aspartic acid) block copolymers with hydrophobic groups. *Langmuir* 21 (7) 2668-2674 (2005)
- 11) S. Takae, Y. Akiyama, H. Otsuka, T. Nakamura, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Ligand density effect on biorecognition by PEGylated gold nanoparticles: regulated interaction of RCA120 lectin with lactose installed to the distal end of tethered PEG strands on gold surface. *Biomacromolecules* 6 (2) 818-824 (2005)
- 12) Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, Y. Matsumura, K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: Tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy. *Bioconjug. Chem.* 16 (1) 122-130 (2005)
- 13) W. -D. Jang, N. Nishiyama, G. -D. Zhang, A. Harada, D. -L. Jiang, S. Kawauchi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, H. Koyama, T. Aida, K. Kataoka, Supramolecular nanocarrier of anionic dendrimer porphyrins with cationic block copolymers modified with poly(ethylene glycol) to enhance intracellular photodynamic efficacy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44 (3) 419-423 (2005)
- 14) H. Cabral, N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Koyama, K. Kataoka, Preparation and biological properties of dichloro(1,2-diaminocyclohexane)platinum(II) (DACHPt)-loaded polymeric micelles. *J. Control. Release* 101 (1-3) 223-232 (2005)
2. 学会発表
- 1) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, Society for Biomaterials, 30<sup>th</sup> Annual Meeting & Exposition, Memphis Cook Convention Center, Memphis, TN, USA, 2005. 4. 30 (招待講演)
- 2) Kazunori Kataoka, Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 5<sup>th</sup> Retrometabolism Based Drug Design and Targeting Conference, Hakone Hotel Kowaki-en, Janapn, 2005. 5. 9 (招待講演)
- 3) 片岡一則, 高分子ナノミセルデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, インターフェックスジャパン 2005, 東京ビッグサイト, 東京, 2005. 5. 18 (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 DNA デリバリー, 第54回高分子学会年次大会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2005. 5. 25 (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・遺伝子のピンポイントデリバリー, 東京肝臓シンポジウム, 東京プリンスホテル, 東京, 2005. 6. 4 (招待講演)
- 6) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, ESF Research Conference 'Biological Surfaces & Interfaces, Hotel Eden Roc, Sant Feliu de Guixols, Spain, 2005. 6. 18 (招待講演)
- 7) 片岡一則, 高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第9回がん分子標的治療研



- 究所会総会「新しいドラッグデリバリーシステムの開発」, 京都国立会館, 京都, 2005. 6. 30 (招待講演)
- 8) 片岡一則, 遺伝子・核酸医薬デリバリーのための高分子ミセル型ナノキャリア設計, 「がん研究における RNAi の可能性」, 中央大学駿河台記念館, 東京, 2005. 7. 6 (基調講演)
- 9) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDSへピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計へ, 第21回日本DDS学会ワークショップ「ナノテクノロジーの応用」, ハウステンボス全日空 JR ホテル, 長崎, 2005. 7. 23
- 10) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, The 8<sup>th</sup> SPSJ International Polymer Conference (IPC2005), Fukuoka International Congress Center, Fukuoka, 2005. 7. 29 (招待講演)
- 11) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来型 DDSへピンポイント診断・治療のための高分子ミセル型ナノデバイス設計へ, 第3回 Translational Medicine Seminar, 経団連ベストハウス, 静岡, 2005. 7. 30 (特別講演)
- 12) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓くフロンティアメディシンへピンポイント診断・治療のための高分子ナノデバイス設計へ, 第43回茅コンファレンス, ハケ岳ロイヤルホテル, 山梨, 2005. 8. 23 (招待講演)
- 13) Kazunori Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, 11<sup>th</sup> Asian Chemical Congress/13<sup>th</sup> General Assembly, Seoul, 2005. 8. 24 (招待講演)
- 14) 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, 創薬薬理フォーラム第13回シンポジウム, 日本薬学会長井記念館, 東京, 2005. 9. 9 (招待講演)
- 15) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療へ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へ, 日本油化学会年会, 慶應大学矢吹キャンパス, 横浜, 2005. 9. 15 (特別講演)
- 16) 片岡一則, バイオマテリアルが先導するナノ医療:ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計, 第49回日本学術会議材料研究連合会議, 京大会館, 京都, 2005. 9. 16 (基調講演)
- 17) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles As Nanocarriers For Gene, Oligonucleotides, and siRNA delivery, 4<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyushu University, Fukuoka, 2005. 9. 20 (招待講演)
- 18) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療-ピンポイントデリバリーのためのナノデバイス設計-, 第53回日本産科婦人科学会北日本連合地方部会, 福井自治会館, 福井, 2005. 9. 30 (特別講演)
- 19) Kazunori Kataoka, Block copolymer micelles as nanocarriers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, 2005 Robinson Symposium, School of Pharmacy, University of Wisconsin, USA, 2005. 10. 14 (招待講演)
- 20) Kazunori Kataoka, Nanomaterial and Its Medical Use: Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 36<sup>th</sup> ICFA Advanced Beam Dynamics Workshop (Nanobeam 2005), Kyoto University-Uji Campus, Kyoto, 2005. 10. 19 (招待講演)
- 21) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療へピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計へ, 北海道科学技術ネットワークセッション, 京王プラザホテル札幌, 札幌, 2005. 10. 25 (基調講演)
- 22) 片岡一則, 薬物・遺伝子ナノキャリアとしてのブロック共重合体ミセルへ高分子が先導するナノ医療システム実現に向けてへ, 平成17年度日本化学会高分子化学コロキウム, 秋田大学工学資源学部, 秋田, 2005. 10. 28 (招待講演)
- 23) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未

来型 DDSへピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計へ，第20回日本DDS学会創立20周年記念シンポジウム，お茶の水ガーデンパレス，東京，2005.11.8（招待講演）

- 24) 片岡一則，ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディスン：ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計，第14回日本コンピュータ外科学会大会，海外職業訓練協会研修施設，千葉，2005.11.20（招待講演）
- 25) 片岡一則，ナノテクノロジーが拓く未来医療へピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計へ，（財）ヒューマンサイエンス振興財団第130回研究委員会セミナー，（財）ヒューマンサイエンス振興財団，東京，2005.12.6（招待講演）
- 26) 片岡一則，ナノバイオテクノロジーが拓くフロンティアメディスン—ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計—，理研シンポジウム（第6回コンピナトリアル・バイオエンジニアリング/ナノバイオテクノロジージョイントシンポジウム，理化学研究所，和光市，2006.1.12（招待講演）
- 27) 片岡一則，ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療へピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計へ，第1回ナノメディスン討論会，岡崎コンファレンスセンター，岡崎，2006.2.12（招待講演）
- 28) へ薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーのためのナノデバイス設計へ，DDS熊本シンポジウム，熊本大学薬学部，熊本，2006.3.13（招待講演）

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 片岡一則、位高啓史、西山伸宏、福島重人、張祐銅、宮田完二郎、中西政崇、金山直樹、ポリカチオン荷電性ポリマー及び核酸のキャリアーとしての使用、特願 2005-035233
- 2) 片岡一則、大庭誠、西山伸宏、位高啓史、福島重人、金山直樹、ペプチドリガンドを有するブロック共重合体、特願 2005-054260
- 3) 片岡一則、斐 潤秀、西山伸宏、福島重人、

張 祐銅、pH応答性高分子ミセルの調製に用いる新規ブロック共重合体及びその製造法の提供、特願 2005-125336

研究の成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
		Yu.Dahnovsky, V. D. Krevchik, V. Krivnov, M. Semenov, and K. Yamamoto	Transfer Processes in Low-Dimensional Systems	UT Research Institute Press	Tokyo	2005	全 691 ページ
山屋駿一、山本健二	抗ストレプトリジンO抗体、スピロヘータ類梅毒血清	高久史麿、黒川清、春日雅人、北村聖	臨床検査ハンドブック(コンパクト版、第3版)	医学書院	東京	2005	244-245, 255

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K. Omata, K. Yamamoto	Structure Factors of Supercritical Fluids	Theoretical and Applied Mechanics Japan	54	349-355	2005
Hoshino A, Fujioka K, Manabe N, Yamaya S, Goto Y, Yasuhara M, Yamamoto K.	Simultaneous Multicolor Detection System of the Single-Molecular Microbial Antigen with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy.	Microbiol Immunol.	49	461-470	2005
Warner JH, Hoshino A, Yamamoto K, Tilley RD.	Water-Soluble Photoluminescent Silicon Quantum Dots	Angew. Chem. Int. Ed.	44	4550-4554	2005
Wayne Dawson, Kazuya Fujiwara, Yasuhiro Futamura, Kenji Yamamoto, Gota Kawai.	A new paradigm for finding optimal RNA secondary structures by thermodynamics alone.	Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	in press.		2005
Yasuhiro Futamura and Kenji Yamamoto	Hydrothermal Synthesis of Olygoglysines with Adiabatic Expansion Cooling	Viva Origino	in press		2005
Tomomasa Goto, Yasuhiro Futamura, Yukio Yamaguchi, Kenji Yamamoto.	Condensation Reactions of Amino Acids under Hydrothermal Conditions with Adiabatic Expansion Cooling.	Journal of Chemical Engineering of Japan	38	295-299	2005

Amane Shiohara, Noriyoshi Manabe, Kazumi Omata and Kenji Yamamoto	Novel surface processing with sulfonic acid for quantum dot and its characteristics	Chemical Engineering	in press		2005
Kenji Yamamoto	Nanotechnology and Trends in Drug Delivery Systems with Self-Assembled Carriers.	Biomedical Nanotechnology (Ed. By Neelina H. Malsch) Taylor & Francis.		29-40	2005
Yu.Dahnovsky, V.D. Krevchik, E.I. Kudryashov, V. Mayorov, M.B. Semenov, V. Zhukovsky K. Yamamoto	One - dimensional quantum dissipative tunneling in structures with quantum dots	UT Rearch Institute Press		348-360	2005
A.Aringazin, Yu.Dahnovsky, V.Krevchik, M. Semenov, A.A., V.A. Veremyev, K.Yamamoto	Two-dimensional tunnel correlations with dissipation	UT Rearch Institute Press			2005
A. Aringazin, Yu. Dahnovsky, V. Krevchik, M. Semenov, A.A., V.Veremyev, K. Yamamoto	Two - dimensional tunnel bifurcations with dissipation	UT Rearch Institute Press			2005
Wayne Dawson, Kenji Yamamoto	Harnessing the biophysical princeples of chaperons to process specialized materials for nanotechnology applications	UT Rearch Institute Press		434-443	2005
Kenji Yamamoto	The fluorescence intensity of the quantum dots in the water depends on the surface processing	UT Rearch Institute Press		444-450	2005
Wayne Dawson , Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto	A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking Entropy: I	UT Rearch Institute Press		451-492	2005
Wayne Dawson, Kazuo Suzuki, Kenji Yamamoto	A Physical Origin for Functional Domain Structure in Nucleic Acids as Evidenced by Cross-linking	UT Rearch Institute Press		493-532	2005