

平成18年11月1日

3)「硝子体病変の可視化～水溶性量子ドットを用いて」

真鍋 法義、山本 悟、藤岡 宏樹、木津
純子、星野 昭芳、山本 健二

日本薬学会 第127年会、富山県;富山市、
平成19年3月28日～30日。

4.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 特定研究員

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核酸医薬と静電的な相互作用を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) との複合体の正常を詳細に解析した。その結果、siRNA (21-23 塩基) 1 分子に対して 3 から 5 分子のアテロコラーゲンが結合していること、またその粒子の直径のサイズは 75 - 100 ナノメートルであることが判明した。さらにこのナノサイズの複合体はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることも証明することが出来た。

A. 研究目的

従来のゲノムワイドな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、魅力的な創薬標的に到達するかは極めて重要な課題である。この一連の過程で疾患関連遺伝子の機能を制御することのできる RNAi テクノロジーは重要なツールとなる。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、本年度はアテロコラーゲンと siRNA の複合体の性状解析に力点を置いた。

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を証明するとともに、マウス腫瘍モデルにおける複合体の集積や治療効果に注目してデータ解析を行った。

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の的確に送り届ける DDS 技術が要求される。本年度は、特にこの siRNA とアテロコラーゲンのナノ複合体の製剤化の基礎検討として粒子の性状解析を、光散乱法による粒子径解析、蛍光ラベル法による細胞内への取り込みの解析などを実施した。

C. 研究結果

これまでの研究結果からはアテロコラーゲンと核酸医薬、特にアンチセンスオリゴヌクレオチドと siRNA などとの結合は静電的な者であることが歯難瞑している。本研究で主役となる 21 ヌクレオチド長の siRNA (二重鎖 RNA) との複合体の正確な粒子径を光散乱法によって求めた。アテロコラーゲン 0.08%, siRNA

150nM の終濃度で混合し、複合体を形成させた後、低温で一晩放置し、粒子径の安定な形成を待った。その後、MiliQ 水で希釈し、光散乱法にて粒子直径を解析した。その結果、図 1 に示すように、直径は 100 ナノメートル以下の粒子が形成されていることが判明した。

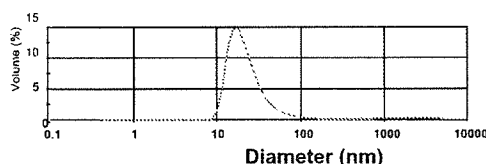


図 1. アテロコラーゲン 0.08%, siRNA 150nM の終濃度で混合し、光散乱法にて粒子径の解析を行ったもの。

この粒子径が小さいことは細胞内への導入に不可欠な要素であり、アテロコラーゲンと siRNA の複合体はその条件を満たしていると考えられた。

さらに、図 2 に示すように、この複合体が、どのように細胞内へ取り込まれるかの検討を蛍光ラベル法にて解析した。アテロコラーゲンを青色の色素で、また核酸をメチルグリーンの緑色で標識した結果、細胞質での両方の色素分布が一致したことから、アテロコラーゲンと siRNA の複合体は細胞質へ取り込まれた段階でも複合体を形成しているものと考えられた (図 2、上段)。

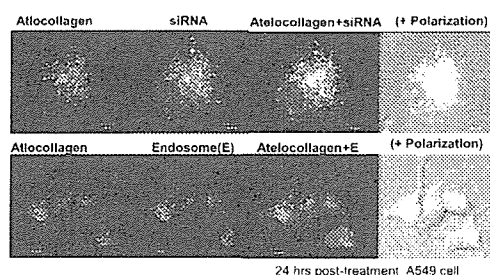


図 2. アテロコラーゲン複合体の細胞内局在。

さらに、このような複合体が細胞質内でどのような挙動を示すかを、エンドサイトーシスに特有なエンドゾームの形成を見

分けることの出来る赤い色素で標識した結果、アテロコラーゲンと siRNA の複合体はエンドゾーム内に局在していることが示唆された (図 2、下段)。以上の結果から、アテロコラーゲン複合体は細胞内にエンドサイトーシスによって取り込まれ、エンドゾーム内でもアテロコラーゲンと siRNA は複合体を形成している可能性が示唆された。

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・ナノ粒子の性状を、複合体の粒子径、細胞質内への取り込みの様式、複合体中の siRNA とアテロコラーゲンの分子比などについての解析データを取得することが出来、当初の目的を達成した。

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と的確に送り届ける 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 RNAi 創薬とがん治療への応用が図られようとする中、本技術の製剤化を見据えた研究を展開する上で、本年度の複合体の性状解析のデータは貴重な材料となる。

3) 今後の展望について

本研究成果により、我々のアテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS の詳細なメカニズムの解明が進み、動物の全身性の臓器、組織にまで siRNA をデリバリーするナノテクノロジーの特色が明らかとなった。今後、siRNA の核酸医薬品としての利用価値を確立することで、様々な疾患を標的と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 複合体のナノ粒子としての性状を解明し、製剤化に直結する研究成果であり、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) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. Expert Opin. Drug Discov. 2: 159-167, 2007.
- 2) Hanai K, takeshita F, Honma K, nagahara S, maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. Ann N Y Acad Sci. 1082: 9-17, 2006.
- 3) 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, 28: 383-391, 2006.
- 4) Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, Okochi H, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of stem cells for liver regeneration. Hepatology, in press.
- 5) Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. Diabetologia. 49: 2948-2958, 2006.
- 6) Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. Int J Oncol. 29: 541-548, 2006.
- 7) Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. FASEB J. 20: 1484-1485, 2006.
- 8) Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T and Ochiya T. "Stem cells into liver"-basic research and potential clinical applications. Adv Exp Med Biol. Vol.585: 3-17, 2006.
- 9) Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. Cancer Res. 66: 7532-7539, 2006.
- 10) Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. Genes & Dev.20: 1321-1330, 2006.
- 11) Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. Cancer Sci. 97: 689-696, 2006.
- 12) Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. Gastroenterology, 131: 14-29, 2006.
- 13) Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in *Dicer1*-hypomorphic mice. Cytogenet Genome Res. 113: 138-143, 2006.
- 14) Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. Carcinogenesis. 27: 2497-2510, 2006.

(和文)

- 1) 落谷孝広：アテロコラーゲン DDS による転移性がんの RNAi 治療、Biotherapy, 20: 527-533, 2006 (癌と化学療法社)
- 2) 寺谷工、山本雄介、落谷孝広：研究用ヒト細胞ソースとしての間葉系幹細胞の可能性、Organ Biology, 13: 419-431, 2006 (日本臓器保存生物医学会)
- 3) 落谷孝広：がん治療と RNAi 創薬、ファルマシア, 42: 1223-1227, 2006 (日本薬学会)
- 4) 落谷孝広：アテロコラーゲン DDS による転移性がんの RNAi Therapy, 61:1110-1116, 2006 (最新医学社)

2. 学会発表

- 1) イメージング技術によるがん細胞の可視化と RNAi 治療評価系への応用、落谷孝広、第 1 回医療バイオワークショップ (2006. 4. 24 東京工業大学)
- 2) ヒト幹細胞から分化した肝細胞、落谷孝広、第 13 回 HAB 研究機構学術年会 シンポジウム (2006. 5. 19 東京)
- 3) Functional screening of the genes correlated with drug resistance in breast cancer using Atelocollagen-mediated siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Kazuki Nemoto, Jun Onodera, Yu Aso, Hiroshi Itoh, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第 20 回国際生化学・分子生物学会議 (2006. 6. 22 京都)
- 4) ステム細胞の肝細胞分化制御、落谷孝広、(シンポジウム) 第 13 回肝細胞研究会 (2006. 7. 1 旭川)
- 5) アテロコラーゲン DDS による siRNA のがん治療モデル、落谷孝広、(シンポジウム) 第 65 回日本癌学会学術総会 (2006. 9. 30 横浜)
- 6) 転移性ヒト乳がん細胞に対する RNAi による治療効果の検討、竹下文隆、アグネスバナス、落谷孝広、第 65 回日本癌学会学術総会 (2006. 9. 30 横浜)
- 7) 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、西尾和人、加藤菊也、落谷孝広、第 65 回日本癌学会学術総会 (2006. 9. 30 横浜)
- 8) アテロコラーゲン DDS で siRNA のがん治療は可能なのか、落谷孝広 (セミナー) バイオテクノロジー ジャパン セミナー (2006. 11. 13 東京)
- 9) がん転移モデルの *in vivo* イメージング、落谷孝広 (シンポジウム) 第 23 回日本疾患モデル学会総会 (2006. 11. 30 群馬)
- 10) アテロコラーゲン DDS による RNAi 創薬、落谷孝広 (セミナー) 第 27 回ヒューマンサイエンス総合セミナー (2007. 1. 23 東京)
- 11) siRNA によるがん治療モデル：RNA 干渉による抗がん剤増感の試み、落谷孝広 (シンポジウム) 第 9 回癌治療増感研究シンポジウム (2007. 2. 11 奈良)

(海外発表)

- 1) FASEB Liver Conference on Liver Growth, Development & Disease, (July 22-27 2006, Colorado, USA) Ochiya T. Title: Generation of hepatocytes from ES cells. 招待講演
- 2) The 5th Sino-Japan Joint Conference, (October 5-8 2006, Shanghai, China) Ochiya T. Title: Therapeutic potential of atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer. 招待講演
- 3) Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, (Oct 19-21, 2006, NY, USA) Ochiya T., Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Title: Atelocollagen-mediated delivery of siRNA against cancer.
- 4) 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. Kyoto, Japan, June 18-23, 2006 Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome profiling of hepatic differentiation from mesenchymal stem cell.
- 5) Gordon Research Conference-Molecular cell biology July 2-7, 2006, USA, Yamamoto Y, Teratani T, Murata S, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. Transcriptome Analysis to Define the Hepatic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cell.
- 6) 9th International Conference Drug and Gene-based Therapeutics, Agia Pelagia, island of Crete, Greece, September 2-8, 2006. Takeshita F, Ochiya T.: Efficient Small Interfering RNA delivery to metastatic tumors.

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

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

肺動脈性高血圧症モデル動物に対する PEG-PAsp(DET)を用いた
アドレノメデュリン遺伝子導入の効果

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）

研究要旨

我々は、昨年度までの研究成果で、PEG-PAsp(DET)をベクターとして用いることにより、*in vivo* において著明な遺伝子発現が可能であることが解っていた。本年度は、PEG-PAsp(DET)を用いたアドレノメデュリン遺伝子の気管内投与による肺への遺伝子導入を行い、肺動脈性肺高血圧症のモデル動物の治療実験を行った。PEG-PAsp(DET)により、アドレノメデュリン遺伝子の導入が可能であり、治療効果として、右室圧の有意な低下を認めた。PEG-PAsp(DET)を用いた気管内への遺伝子導入により、肺の組織に異常を認めず、ポリエチレンイミン(PEI)によって、激しい炎症を認めたこととは対照的であった。これらのことから、PEG-PAsp(DET)は、*in vivo* で治療効果を得るのに十分な治療遺伝子の導入が可能であること、炎症などを引き起こさず、安全な治療法であることが示唆された。これらのことは、臨床試験にむけて、大きな進歩であると考えられる。

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

安部映里

前田律子

神野桂子

宮崎大学医学部

第一病理

丸塚浩助

浅田祐士郎

東京大学大学院工学系研究科

片岡一則

山崎裕一

西山伸宏

A. 研究目的

特発性肺動脈性肺高血圧症(PAH)は、肺動脈血管床の成長、増殖により、血管抵抗が増加して、右心不全をきたす。PAHは、診断後5年間の間に80%の患者が死亡するという、予後の悪い病気である。プロスタサイクリン、ボセンタンやワーファリンなどが使用されるようになった現在でも、予後が不良であることには変わりがない。

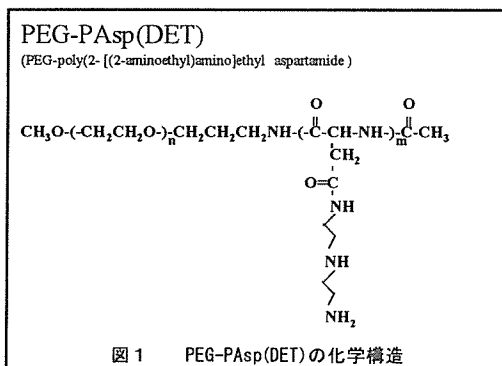
我々は、PEGを用いたブロック共重合体を用いた新しい遺伝子導入法を既に開発しており、DNA存在下にコア-シェル構造をとることを報告している。エチレンジアミンをサイドチェーンに持つPEG-PAsp(DET)が、初代培養オステオブラストにおいて、著明な遺伝子発現を認めることも報告している。

本研究においては、肺動脈性肺高血圧症モデル動物に対して、アドレノメデュリン遺伝子をPEG-PAsp(DET)を用いて経肺投与を行い、治療効果の評価するとともに、毒性効果も判定することを目的とする。

B. 研究方法

PEG-PAsp(DET)は、以前に報告した方法で作製した(図1)。ICRマウスをネブタールを腹腔内注射をして麻酔し、PEG-PAsp(DET)とルシフェラーゼ遺伝子とのポリプレックスミセルを気管内投与した。示された時間後に、肺を採取してホモゲナイズし、ルシフェラーゼ活性の測定を行った。

雄ウイスターラットはモノクローリンを皮下注射して4週間放置して、肺動脈性肺高血圧症モデル動物とした。4週間後に、右頸静脈よりカテーテルを挿入して血行動態検査を行い、PEG-PAsp(DET)とアドレノメデュリン発現遺伝子とのポリプレックスミセルを気管内投与し、3日後に再度、血行動態検査を行った。肺組織は凍結し、Real Time-RT PCRによるmRNA測定を行った。



C. 研究結果 D. 考案

ICRマウスに対してPEG-PAsp(DET)とルシフェラーゼ遺伝子とのポリプレックスミセル、およびPolyethyleneimine(PEI)とルシフェラーゼ遺伝子とのポリプレックスの気管内投与による遺伝子発現を図2に示す。PEG-PAsp

(DET)は、PEIに比べて著明な遺伝子発現を認めた。

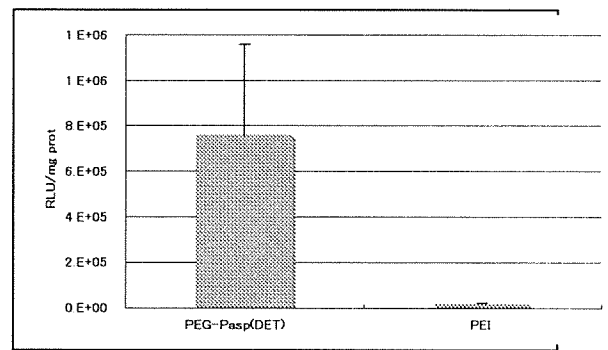


図2 気管内投与による肺でのルシフェラーゼ活性

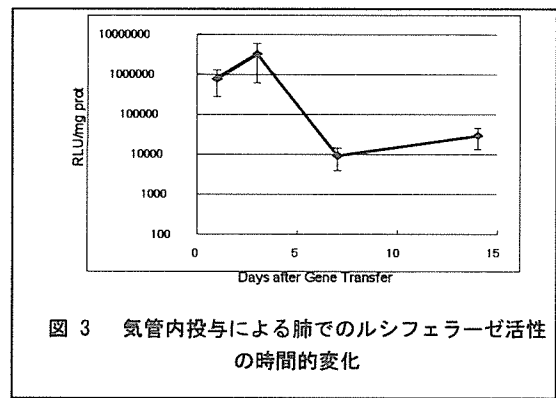


図3 気管内投与による肺でのルシフェラーゼ活性の時間的变化

PEG-PAsp(DET)によるルシフェラーゼ遺伝子の発現の時間的变化を図3に示す。遺伝子導入後3日で最大の遺伝子発現を認め、その後低下を認めたが、2週間目でも有意な遺伝子発現を認めた。PEG-PAsp(DET)とYFPのポリプレックスミセル、およびPEIとYFPのポリプレックスによる肺での遺伝子発現を蛍光実体顕微鏡で撮影した写真を図4に示す。PEG-PAsp(DET)により、蛍光照射により気管支に沿って光る物質の存在が確認された。遺伝子導入による毒性を調べるため、PEG-PAsp(DET)およびPEIを用いた遺伝子導入の後に、肺組織の顕微鏡写真を撮影した(図5)。PEIを用いた遺伝子導入後は、炎症性細胞浸潤、及び浸出液を認め、肺組織のダメージが大きいのに比較し、PEG-PAsp(DET)による遺伝子導入後は炎症の所見などの異常を認めなかった。これらのことから、PEG-PAsp(DET)は、毒性が低く、遺伝子導入

効果が高い、非常に有用な遺伝子導入ベクターであることが示唆された。

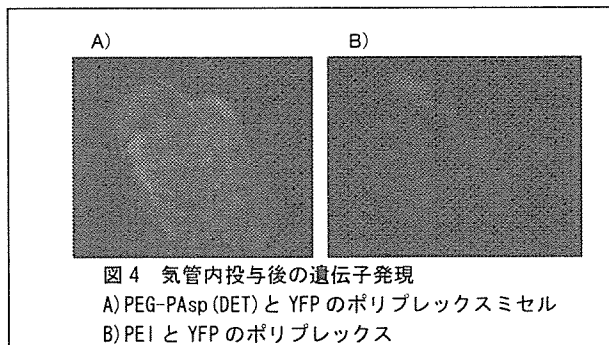


図4 気管内投与後の遺伝子発現
A) PEG-PAsp(DET)とYFPのポリプレックスミセル
B) PEIとYFPのポリプレックス

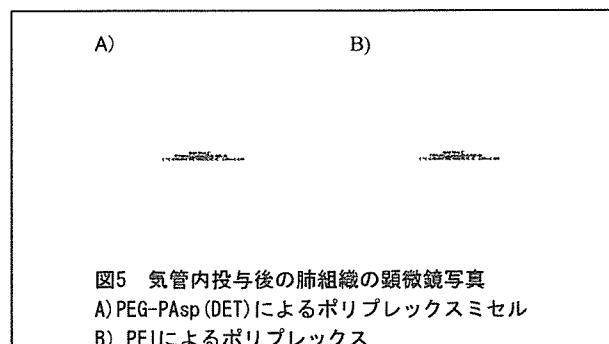


図5 気管内投与後の肺組織の顕微鏡写真
A) PEG-PAsp(DET)によるポリプレックスミセル
B) PEIによるポリプレックス

モノクローリン投与 4 週間後のラットに対して、PEG-PAsp(DET)を用いてアドレノメデュリン発現遺伝子の導入を行ったところ、右室圧は有意に低下を認めた (図 6)。また、肺組織におけるアドレノメデュリン mRNA の量は、4 倍に増加を認めた (図 7)。

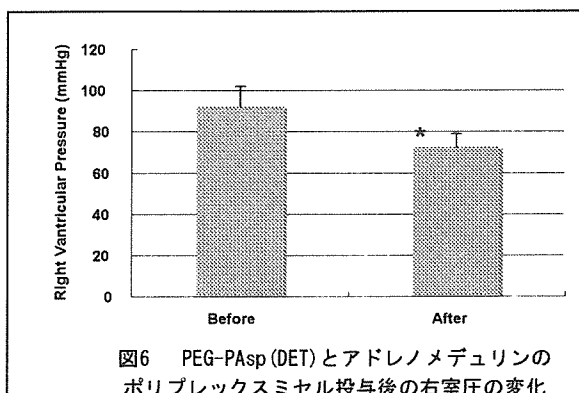


図6 PEG-PAsp(DET)とアドレノメデュリンのポリプレックスミセル投与後の右室圧の変化

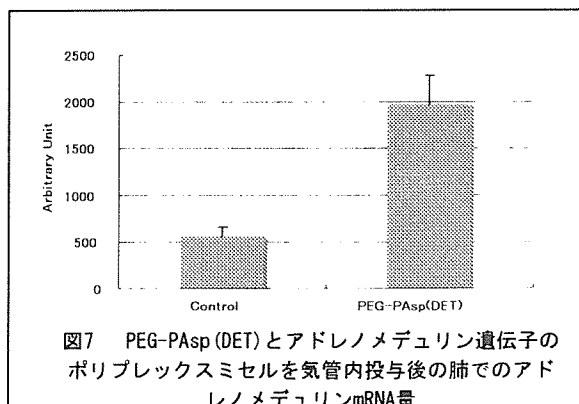


図7 PEG-PAsp(DET)とアドレノメデュリン遺伝子のポリプレックスミセルを気管内投与後の肺でのアドレノメデュリンmRNA量

E. 結論

我々は、*in vivo* で毒性が低く、遺伝子発現効果が著明な遺伝子導入ベクターを開発に成功し、疾患モデル動物の治療効果を認めた。臨床試験にむけて、大きな前進であると言える。

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) 欧文

- 1) J. Jo, N. Nagaya, Y. Miyahata, M. Kataoka, M. Harada-shiba, K. Kangawa, Y. Tabata, Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue Engineering* (in press) 2006
- 2) I. Ichi, K. Nakahara, Y. Miyashita, A. Hida-ka, S. Kutsukake, K. Inoue, T. Maruyama, Y. Miwa, M. Harada-Shiba, M. Tsushima, S. Kojo and Ki-sei Cohort Study Group, Association of ceramides in human plasma with risk factors of atherosclerosis. *Lipids*. 2006; 41(9): 859-863
- 3) A. Yamamoto, M. Harada-Shiba, M. Endo, N. Kusakabe, T. Tanioka, H. Kato, and T. Shoji, The effect of ezetimibe on serum lipids and lipoproteins in patients with homozygous familial hypercholesterolemia going LDL-apheresis therapy. *Atherosclerosis*. 2006; 186(1): 126-131

2) 和文 無し

(総説)

1) 欧文 無し

2) 和文

1. 斯波真理子、杉沢貴子、常染色体劣性高コレステロール血症 循環器病研究の進歩 2006;46(XXV II):49-55
2. 斯波真理子 高脂血症 スズケンメデイカル 2006;9(2):246-260
3. 斯波真理子 高脂血症と遺伝の関係は？高脂血症と遺伝の関係について教えてください。肥満と糖尿病 2006;5(3):420+421
4. 斯波真理子 生活習慣病 高脂血症 Modern Physician 2006;26(5):819-823
5. 斯波真理子 ナノテクノロジー (ナノDDS) を用いた動脈硬化性病変の治療・予防 分子心血管病 2006;7(1):57-62
6. 榎野久士、斯波真理子 LDL アフェレーシスー効果と限界— The Lipid 2006;17(1): 49-54

2, 著書 無し

3, 学会発表

1) 国際学会

1) Harada-Shiba M, Makino, Sugisawa T, Nagumo A, Nakahata H, Yoshimasa Y, tomoike H ; Factors that determine the prognosis of FH under LDL-apheresis therapy.

6th World Congress of the International Society for Apheresis; ISFA、Symposium 2007.03.2-4, Yokohama・Japan

2) Sugisawa T, Makino H, Nagumo A, Nakahata H, Yoshimasa Y, Harada-Shiba M ; Skin perfusion pressure can be recovered by LDL-apheresis in familial hypercholesterolemia.

6th World Congress of the International Society for Apheresis; ISFA、General presentation.

2007.03. 2-4, Yokohama・Japan

3) Nagumo A, Makino H, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Nakahata H, Harada-Shiba M ; Analysis of Changes of Lipoprotein Profile during and after LDL-apheresis. 6th World Congress of the International Society for Apheresis; ISFA、General presentation.

2007.03. 2-4, Yokohama・Japan

4) Harada-Shiba M, Ohira M, Nishiyama N, Miyata K, Itaka K, Yamasaki Y, Kataoka K ; Effect of Adrenomedullin Gene Transfer Using PEG-DET in Model Animals for Pulmonary Arterial Hypertension. UT Symposium on Nano-Bio Integration. General presentation

2006.12. 4-7, Tokyo・Japan

5) Harada-Shiba M, Takagi A, Marutsuka K, Moriguchi S, Yagyu H, Ishibashi S, Asada Y, Yokoyama S ; Autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) knockout mouse has delayed catabolism of LDL in vivo but normal internalization of LDL in vitro. XIV International Symposium on Atherosclerosis, XIV

International symposium on Atherosclerosis. Workshop. 2006.06. 18-22, Rome・Italy

6) Nagumo A, Makino H, Okada S, Miyamoto Y, Yoshimasa Y, Ikeda T, Yamamoto A, Harada-Shiba M ; Pregnancy of homozygous familial hypercholesterolemic patients with coronary artery disease treated with LDL-apheresis, XIV International Symposium on Atherosclerosis, XIV

International symposium on Atherosclerosis. Poster. 2006.06. 18-22, Rom・Italy

7) Harada-Shiba M, Minamino N, Kuwahara H, Ito T, Maeda R, Ohira M, Abe E, Jinno K, Tomoike H ; Proteome analysis of hyper-

triglyceridemic rabbits. XIV International symposium on Atherosclerosis. Poster. 2006.06. 18-22, Rome · Italy

2) 国内学会

1) 斯波真理子; Discovery and clinical characterization of autosomal recessive hypercholesterolemia、

日瑞循環器代謝学シンポジウム、シンポジウム 2007.3、東京

2) 斯波真理子、大平望都、西山伸宏、宮田完二郎、山崎裕一、片岡一則; Effect of Adrenomedullin Gene Transfer Using PEG-PAsp(DET) in a Model Animal of Pulmonary Arterial Hypertension、

第 71 回日本循環器学会学術集会、一般演題 2007.3、兵庫県・神戸

3) 斯波真理子; Autosomal Recessive

Hypercholesterolemia の臨床症状、診断と遺伝子改変動物による解析、第 17 回生物試料分析科学大会、シンポジウム、2007.01 長野県・松本

4) 南雲彩子、槇野久士、杉沢貴子、中濱肇、吉政康直、斯波真理子; LDL アフェレシスにより除去されるリポ蛋白分画とその推移の検討、アフェレシス学会関西地方会、一般演題、2006.12、奈良

5) 斯波真理子、槇野久士、中濱肇、南雲彩子、横山信治、都島基夫、吉政康直、山本章、友池仁暢; 家族性高コレステロール血症(FH)ホモ接合体およびヘテロ接合体に対する LDL アフェレシス施行の長期予後について、第 26 回日本アフェレシス学会学術大会、シンポジウム、2006.7、滋賀

6) 斯波真理子; 家族性高コレステロール血症 (FH) の予後を決定する因子としての耐糖能、第 7 回 Atherosclerosis and Biolipid Conference、

シンポジウム、2006.7、北海道・小樽

7) 斯波真理子; Autosomal Recessive Hypercholesterolemia (ARH) 遺伝子の機能解析、第 38 回日本動脈硬化学会総会、シンポジウム、2006.7、東京

8) 安部映里、高木敦子、大平望都、前田律子、神野桂子、横山信治、浅田祐士郎、寒川賢治、友池仁暢、斯波真理子; ニューロメジン U(NMU)の脂質代謝における役割—遺伝子改変動物での検討—、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京

9) 大平望都、高見沢格、安部映里、前田律子、神野桂子、西山伸宏、宮田完二郎、寒川賢治、片岡一則、斯波真理子; 遺伝子導入ベクター PEG-DET を用いた肺高血圧モデル動物の治療効果、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京

10) 前田律子、斯波真理子、伊藤恒賢、大和田一雄、大平望都、安部映里、神野桂子、桑原大幹、南野直人、友池仁暢; 高中性脂肪血症ウサギの内臓脂肪および血清のプロテオーム解析、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京

11) 南雲彩子、槇野久士、吉政康直、都島基夫、千葉喜英、池田智明、横山信治、山本章、友池仁暢、斯波真理子; LDL-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、第 38 回日本動脈硬化学会総会、一般演題、2006.7、東京

12) Mariko Harada-Shiba, Moto Ohira, Nobuhiro Nishiyama, Kanjiro Miyata, Keiji Itaka, Yuiichi Yamasaki, Kazunori Kataoka; Effect of Adrenomedullin gene transfer using PEG-DET in model animals for pulmonary hypertension、The First FIP-APSTJ Joint Workshop on Gene Delivery、一般演題、2006.7、北海道・札幌

13) 大平望都、安部映里、高見沢格、神野桂子、前田律子、西山伸宏、宮田完二郎、寒川賢治、片岡一則、斯波真理子；遺伝子導入ベクター-PEG-DET を用いた肺高血圧モデル動物の治療効果、遺伝子デリバリー研究会第6回シンポジウム、一般演題、2006.5.19、福岡

4. 知的財産権の出願・取得状況

1) 特許

出願番号：特願2005-243938

発明者：斯波真理子

発明の名称：高コレステロール血症の疾患モデルマウス

出願人：国立循環器病センター総長

出願日：平成17年10月28日

特許第3709438号

出願番号：特願2002-130779

発明者：斯波真理子

発明の名称：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

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

2) その他 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

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。本年度は、高分子ミセル型遺伝子ベクターの組織浸透性を評価するために、細胞スフェロイドに対する遺伝子導入実験を行った。さらに、前年度までに確立した環状 RGD ペプチドリガンド導入高分子ミセルの内核にジスルフィド架橋を導入したところ、リガンドを介した遺伝子導入効率が顕著に高まることを確認した。

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。高分子ミセルは、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」を創出することを目的としている。

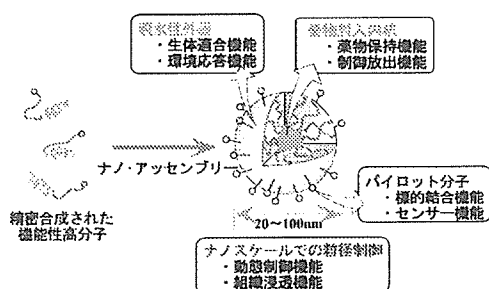


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

固形がんに対する遺伝子デリバリーにおいては、がん組織に対する遺伝子キャリアの浸透性が重要となるが、本研究では、高分子ミセル型遺伝子ベクターの組織浸透性を評価するために、前年度までに確立したがん細胞スフェロイドに対する遺伝子導入実験を行う。また、がん細胞に選択的かつ効率的な遺伝子導入を実現するために、プラスミド DNA を内包した内核に細胞内還元的環境下で選択的に開裂するジスルフィド (SS) 架橋を導入し、さらに、がん細胞や腫瘍血管内皮細胞に受容体の過剰発現が認められる RGD ペプチドをリガンド分子として表層に搭載したインテリジェント型高分子ミセルを開発し、その機能を解析することを目的とする。

B. 研究方法

1) 高分子ミセル型遺伝子ベクターによるがん細胞スフェロイドへの遺伝子導入

前年度までに効率的かつ低毒性の遺伝子導入が可能であることを確認した側鎖にエチレンジアミン構造を有するポリアミノ酸誘導体(PAsp(DET))とその PEG 化ブロック共重合体(PEG-PAsp(DET))を用いて、10mM トリス緩衝液(pH7.4)中でプラスミド DNA と混合することにより、遺伝子ベクター(ポリプレックス)を構築した。調製における 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)は、高い遺伝子導入活性が得られた 40 に固定した。得られたポリプレックスの性質は、粒径およびゼータ電位測定により評価した。

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、数日間培養することで直径 400-500 μm のがん細胞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。プラスミドのプロモーターとしては、hypoxia に関係なく遺伝子発現する CAG と hypoxia 条件で選択的に遺伝子発現する 5-HRE (hypoxia-responsive element)の 2 種類を用いた。

スフェロイドに対するポリプレックスの浸透性については、Cy5 で蛍光標識したプラスミドを用いてポリプレックスを調製し、CLSM によって観察した。本実験では、200 μm のスフェロイドを用いた。

2)環状 RGD リガンドと内核 SS 架橋を具備したインテリジェント型高分子ミセルの構築と機能評価

ポリエチレングリコール(PEG)末端に反応性基としてアセタール基を有する Acetal-PEG-poly(L-lysine) を合成し、poly(L-lysine)(PLL)側鎖に N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート (SPDP)を反応させることによってチオール基を導入した。さらに PEG 末端アセタール基に対して酸性条件(pH4)で N 末端に Cys を有する環状 RGD ペプチド(c(RGDfK))を混合することによって、thiozolidine 環を形成させた。このようにして、PEG 末端に環状 RGD ペプチド、PLL 側鎖にチオール基を有するブロック共重合体を合成した。このポリマーとプラスミド DNA を N/P=2 で混合し、酸化剤として DMSO を添加したバッファ中で透析することによって、内核が SS 架橋により安定化された高分子ミセルを

調製した。高分子ミセルの遺伝子導入効率は、環状 RGD ペプチドの受容体である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現するヒト子宮

頸がん HeLa 細胞を用いて評価した。さらに、環状 RGD ペプチドのミセルの細胞内動態に対する効果を検討するためにペプチドを導入していないミセルおよび環状 RGD ペプチドを導入したミセルのプラスミド DNA をそれぞれ 2 種類の異なる蛍光色素 (Cy5、Cy3)でラベルし、蛍光の局在の違いを観察することにより評価した。

C. 研究結果

1) 高分子ミセル型遺伝子ベクターによるがん細胞スフェロイドへの遺伝子導入

400-500 μm のがん細胞スフェロイドに対して、CAG プロモーターを有する YFP 発現プラスミドを PEG-PAsp(DET)との混合によって形成される高分子ミセルを用いて遺伝子導入したところ、ネクロシスにより細胞死(赤の蛍光)が顕著なスフェロイドの中心部で明らかな遺伝子発現(緑の蛍光)が認められた(図 6A)。この効果をさらに評価するために、5-HRE プロモーターを有する YFP 発現プラスミド DNA を、linear および branch polyethylenimine (LPEI および BPEI)、PAsp(DET)から形成されるポリプレックスならびに PEG-PAsp(DET)から形成

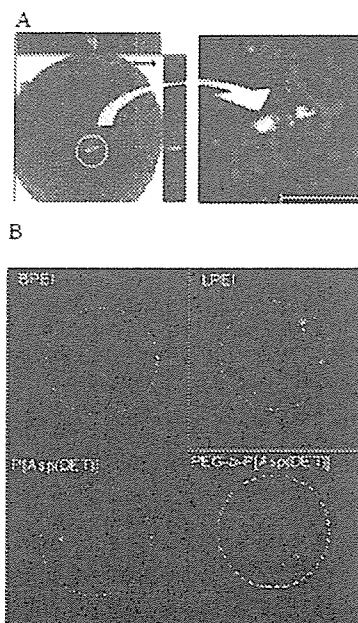


図 2.スフェロイドへ内部での YFP の遺伝子発現 (A)CAG promoter 含有 Plasmid を高分子ミセルにより遺伝子導入(赤:死細胞、緑:YFP)(B)ポリプレックスおよび高分子ミセルによる 5HRE promoter 含有 Plasmid の遺伝子導入

される高分子ミセルを用いて、がん細胞スフェロイドに対し遺伝子導入を行った(図 6B)。その結果、PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルによってのみ顕著な遺伝子発現がスフェロイド内部に認められた。このようなスフェロイド内部での遺伝子発現は、ポリプレックスおよび高分子ミセルのスフェロイド中心への浸透性に起因するものと思われる。そこで本研究では、200 μ mのスフェロイドに対するポリプレックスの浸透性を、Cy5 で蛍光標識したプラスミドを用いて CLSM によって観察することにより評価した(図 3)。その結果、PAsp(DET)ホモポリマーから形成されたポリプレックスはスフェロイドの辺縁部にしか浸透できないが、PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセルはスフェロイドの深部にまで到達できることが明らかとなった。ゼータ電位が+30mV のカチオン性ポリプレックスは、細胞との相互作用のために、スフェロイドの深部にまで到達できないが、PEG に覆われており、ゼータ電位が+6mV の高分子ミセルは、細胞と強く相互作用しないためにスフェロイドの深部にまで到達できるものと考えられる。

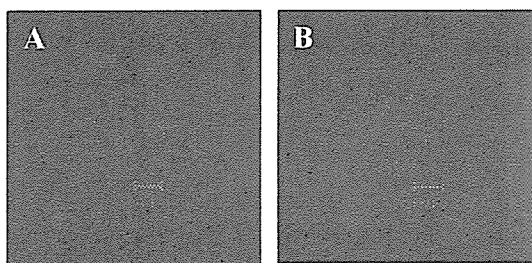


図 3. Cy5 で標識されたプラスミド DNA のスフェロイド内部への浸透性(A)PAsp(DET)から形成されるポリプレックス (B)PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセル

2) 環状 RGD リガンドと内核 SS 架橋を具備したインテリジェント型高分子ミセルの構築と機能評価

環状 RGD リガンドの有無、内核 SS 架橋の導入率が高分子ミセルの遺伝子発現効率に及ぼす影響を HeLa 細胞への遺伝子導入効率により評価したところ、内核 SS 架橋の導入によりリガンド分子の選択性が向上し、SS 架橋導入率が 11%の場合において、環状

RGD リガンドにより遺伝子発現効率が 32 倍に高まることが確認された(図 4)。さらに、この遺伝子発現の向上が、RGD ペプチドの受容体との結合によるものであることを確認するために、培地中にフリーの環状 RGD ペプチドを競合分子として添加したところ、RGD ペプチドリガンド導入高分子ミセルの遺伝子発現の減少が確認された(図 4)。

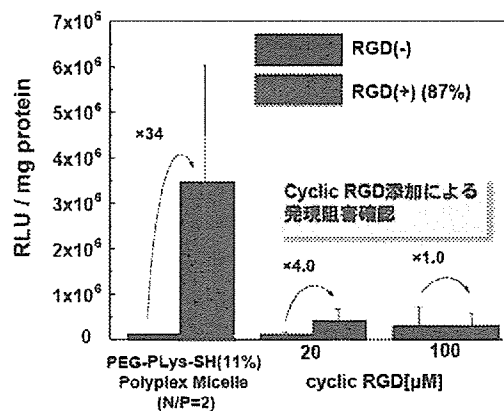


図 4. 内核を SS 架橋により安定化した高分子ミセルの遺伝子発現における環状 RGD ペプチドリガンドの効果

このようなリガンド分子の受容体による認識を介した遺伝子発現の上昇のメカニズムとして、(1)細胞内への取り込み効率の上昇と(2)細胞内 trafficking の変化が考えられるが、リガンドを導入していない高分子ミセルと環状 RGD ペプチド導入高分子ミセルの細胞内取り込み量を同位体標識した DNA の取り込み実験により比較したところ、有意な差異は認められず、リガンド分子は、ミセルの細胞内 trafficking を変化させることに寄与しているものと考えられた。そこで本研究では、環状 RGD ペプチドのミセルの細胞内 trafficking の違いを検討するためにペプチドを導入していないミセルおよび環状 RGD ペプチドを導入したミセルのプラスミド DNA をそれぞれ 2 種類の異なる蛍光色素(Cy5、Cy3)でラベルし、蛍光の局在の違いを観察することにより評価した。その結果、ミセルは、リガンドの有無に拘わらず、細胞の表面近傍に濃縮され、環状 RGD ペプチドを導入したミセルが迅速に細胞内に内在化することが確認された(図 5)。これは、リガンド導入高分子ミセルの受容体介在エンドサイトーシスによる取り

込みに起因するものと考えられる。細胞内 Trafficking の違いがどのように遺伝子発現効率に寄与することは今後の課題であるが、RGD ペプチド導入高分子ミセルは、受容体を介して細胞に取り込まれ、その細胞内 Trafficking が変化することにより効率的に遺伝子発現するものと思われる。

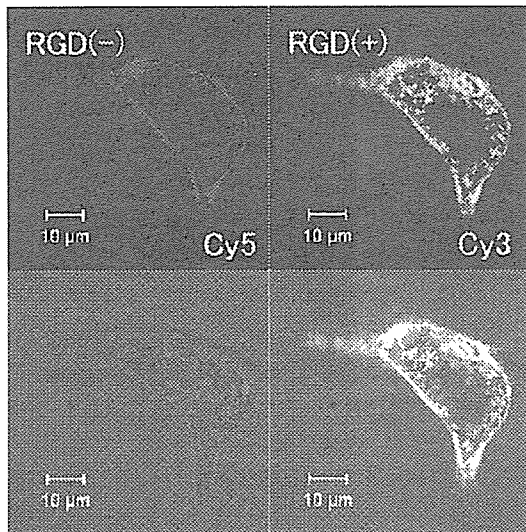


図 5. リガンドを導入していない高分子ミセル (Cy5(赤)で標識)と環状 RGD ペプチドリガンド導入高分子ミセル (Cy3(緑)で標識)の細胞内分布 (HeLa 細胞、培養から 3 時間後)

D. 考察

1) 達成度について

本年度は、がん細胞スフェロイドを用いた遺伝子導入実験により、高分子ミセル型遺伝子ベクターが優れた組織浸透性を有しており、hypoxia に遺伝子導入が可能であることが明らかとなった。さらに、環状 RGD リガンドと内核 SS 架橋を具備したインテリジェント型高分子ミセルを構築し、リガンドの導入によって、細胞内 Trafficking が変化すること、その結果、遺伝子導入効率が高まることを明らかとした。このように本研究では、新しい高分子ミセル型遺伝子ベクターを構築し、その機能発現メカニズムを明らかにするという当初の目標をほぼ達成することができた。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子ベクターが腫瘍の深部に到達できないことは、がん遺伝子治療における最大の問題の一つであるが、本研究では、我々

が独自に開発した高分子ミセルによって、優れたがん組織浸透性が達成され、hypoxia に遺伝子導入できることが明らかとなった。このような優れた組織浸透性は、他の遺伝子ベクターでは未だ達成されておらず、本研究成果は、がん遺伝子治療において極めて画期的であると言える。さらに、本研究では、精密高分子合成技術によって、高分子ミセルに環境応答性と標的認識機能を同時に賦与した高分子ミセルの構築を行い、それらの機能が相乗的に働くことを世界で初めて明らかとした。このようなインテリジェント機能は、天然のウイルスを超越した人工ベクターを開発するためには必要不可欠であり、本研究成果は、そのような人工ベクターの設計において極めて重要な知見を与えるものと考えられる。

3) 今後の展望について

本年度は、スフェロイド培養や CLSM 観察などを利用した遺伝子発現メカニズム解析を通じて、インテリジェント機能の創り込みを行った高分子ミセルの様々な優れた機能を明らかにすることができた。今後は、in vivo 実験を推進することによって、高分子ミセルの有用性を明らかにしていく予定である。高分子ミセル型遺伝子ベクターは、独創的かつ極めて優れた人工ベクターとして、将来、実用化されることが期待される。

E. 結論

以上のように、高分子ミセル型遺伝子ベクターは、リポプレックスなどの他の人工ベクターとは異なり、優れたがん組織浸透性を有することを明らかとした。さらに、高分子ミセルに、環境応答性(内核 SS 架橋)と標的認識機能(環状 RGD ペプチドリガンド)を賦与し、それらが相乗的に機能することを明らかとした。高分子ミセル型遺伝子ベクターは、その構成要素であるブロック共重合体の創り込みによって、様々なインテリジェント機能を賦与することが可能であり、ウイルス機能を模倣した人工ベクターとして今後の展開が期待される。

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) J. -S. Park, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Preparation and characterization of polyion complex micelles with a novel thermo-sensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) shell via the complexation of oppositely charged block ionomers. *Langmuir* 23 (1) 138-146 (2007)
 - 2) Arnida, N. Nishiyama, N. Kanayama, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated gene nanocarriers based on block cationomers bearing ethylenediamine repeating units directed to remarkable enhancement of photochemical transfection. *J. Control. Release* 115 (2) 208-215 (2006)
 - 3) J. -S. Park, K. Kataoka, Precise control of lower critical solution temperature of thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) via gradient copolymerization with 2-ethyl-2-oxazoline as a hydrophilic comonomer. *Macromolecules* 39 (19) 6622-6630 (2006)
 - 4) 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.* 14 (6) 413-424 (2006)
 - 5) W. -D. Jang, Y. Nakagishi, N. Nishiyama, S. Kawachi, Y. Morimoto, M. Kikuchi, K. Kataoka, Polyion complex micelles for photodynamic therapy: incorporation of dendritic photosensitizer excitable at long wavelength relevant to improved tissue-penetrating property. *J. Control. Release* 113 (1) 73-79 (2006)
 - 6) W. Kim, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Development of a fitting model suitable for the isothermal titration calorimetric curve of DNA with cationic ligands. *J. Phys. Chem. B* 110 (22) 10919-10925 (2006)
 - 7) A. Koide, A. Kishimura, K. Osada, W. -D. Jang, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Semipermeable polymer vesicle (PICsome) self-assembled in aqueous medium from a pair of oppositely charged block copolymers: physiologically stable micro-/nano- containers of water-soluble macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 128 (18) 5988-5989 (2006)
 - 8) M. M. Ali, M. Oishi, F. Nagatsugi, K. Mori, Y. Nagasaki, K. Kataoka, S. Sasaki, Intracellular inducible alkylation system that exhibits antisense effects with greater potency and selectivity than the natural oligonucleotide. *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (19) 3136-3140 (2006)
 - 9) M. Oishi, K. Kataoka, Y. Nagasaki, pH-responsive three-layered PEGylated polyplex micelle based on a lactosylated ABC triblock copolymer as a targetable and endosome-disruptive nonviral gene vector. *Bioconjugate Chem.* 17 (3) 677-688 (2006)
 - 10) Y. Kakizawa, S. Furukawa, A. Ishii, K. Kataoka, Organic-inorganic hybrid-nanocarrier of siRNA constructing through the self-assembly of calcium phosphate and PEG-based block anionomer. *J. Control. Release* 111 (3) 368-370 (2006)
 - 11) N. Kanayama, S. Fukushima, N. Nishiyama, K. Itaka, W. -D. Jang, K. Miyata, Y. Yamasaki, U. -I. Chung, K. Kataoka, A PEG-based biocompatible block cationomer with high buffering capacity for the construction of polyplex micelles showing efficient gene transfer toward primary cells. *ChemMedChem* 1 (4) 439-444 (2006)
2. 学会発表
- 1) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型DDSーピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計ー, 第6回 Cardiovascular Frontier Conference, 六本木

- フォーラム 東京, 2006.4.22 (招待講演)
- 2) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS—ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計—, 慶應義塾大学 21 世紀 COE プログラム 『機能創造ライフコンジュゲートケミストリー』(LCC) 講演会, 慶應義塾大学理工学部矢上キャンパス 横浜, 2006.5.10 (招待講演)
 - 3) 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—, 平成 18 年度関東東治会, 東京大学山上会館大会議室, 2006.5.12 (招待講演)
 - 4) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, Quadruple Research Network Opening Symposium -Fusion of Biotechnology and Biomaterials-, Hanyang University, Seoul, Korea, 2006.05.19 (招待講演)
 - 5) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS—ピンポイント診断・治療のための高分子ミセル型ナノキャリア設計—, 第 54 回循環力学研究会, 興和株式会社東京支店 11 階大ホール, 2006.5.20 (招待講演)
 - 6) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, 11th International Symposium on Colloidal and Molecular Electronics (ELOPTO 2006), Institute for Chemical Research, Kyoto University, Uji City, Kyoto, Japan, 2006.05.23 (招待講演)
 - 7) K. Kataoka, Smart nano-assemblies of block copolymers for gene and nucleic acid delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, 3rd IUPAC-sponsored International Symposium on Macro- and Supramolecular Architectures and Materials (MAM-06): Practical Nano-Chemistry and Novel Approaches, Waseda, Tokyo, Japan, 2006.05.29 (基調講演)
 - 8) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療—超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療—, 第 8 回 阪大医療組織工学フォーラム, 銀杏会館 大阪大学吹田キャンパス 大阪府, 2006.6.8 (招待講演)
 - 9) K. Kataoka, Smart polymeric conjugates and micelles for nucleic acid delivery, 2006 AAPS National Biotechnology Conference Biomaterials for Site Specific Delivery of Oligonucleotides and siRNA, Boston, Massachusetts, USA, 2006.06.20 (招待講演)
 - 10) K. Kataoka, Self-organized nanodevices of block copolymers for gene and drug delivery -Challenge to intracellular nanomedicine-, SONS Conference 2006 (Conference on Self-Organized Nanostructure sponsored by European Science Foundation), San Giuliano Terme, Italy, 2006.07.01 (基調講演)
 - 11) 片岡一則, DDS のためのドラッグデザイナー—主薬とキャリアーの適合性を高めるために, 第 22 回日本 Drug Delivery System (DDS) 学会, 東京国際交流会館 東京, 2006.7.7 (招待講演)
 - 12) K. Kataoka, Smart nano-assemblies of block copolymers for gene and nucleic acid delivery, The 1st FIP-APSTJ Joint Workshop in Gene Delivery Hokkaido University, Sapporo, Japan, 2006.7.10 (基調講演)
 - 13) 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, ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会, 東京国際フォーラム ホール B7, 2006.7.15 (招待講演)
 - 14) 片岡一則, 遺伝子・核酸医薬デリバリーのためのインテリジェント・ナノキャリア設計, 第 12 回日本遺伝子治療学会総会, 日本医科大学 東京, 2006.8.24 (教育講演)
 - 15) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, Novel Polymers and Supramolecular Structure, 33rd Annual Meeting of the Controlled Release Society, Austria Center, Vienna, Austria, 2006.07.25 (招待講演)
 - 16) K. Kataoka, Smart nano-assemblies of block copolymers for drug and gene delivery, 7th Asian Symposium on Biomedical Materials

- (Conjunction with the 10th Anniversary Meeting of the Korean Society for Biomaterials), Jeju Grand Hotel, Jeju Island, Korea, 2006.08.21 (基調講演)
- 17) 片岡一則, DDS: その設計と現象解明, ナノビット検討会, 科学技術振興機構研究開発戦略センター 東京, 2006.8.25
 - 18) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, 19th International Symposium on Medicinal Chemistry (ISMC 2006), Istanbul Convention and Exhibition Center (ICEC), Istanbul, Turkey, 2006.08.30 (招待講演)
 - 19) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来型 DDS—ピンポイント診断・治療のための高分子ミセル型ナノキャリア設計—, 動脈硬化 Update2006, 東京プリンスホテル 東京, 2006.9.2 (招待講演)
 - 20) 片岡一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療—超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー—, 第1回次世代バイオナノ研究会, 産業技術総合研究所四国センター 高松市, 2006.9.4 (招待講演)
 - 21) 片岡一則, 超分子ナノデバイス: 最近の話題, 第6回遺伝子・デリバリー研究会 夏期セミナー, みのお山荘風の杜 箕面市 大阪, 2006.9.7 (招待講演)
 - 22) K. Kataoka, Nanobiotechnology-based pharmaceuticals in the medical frontier ~Supramolecular assembly of block copolymers as nanocarriers for smart drug delivery~, Barré Award Lecture 1, University of Montreal, Montreal, Canada, 2006.09.14 (受賞講演)
 - 23) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, 12th Samsung International Symposium on Molecular Medicine (SISMM) “Nanomedicine in Cancer”, Samsung Medical Center, Seoul, Korea, 2006.09.23 (招待講演)
 - 24) K. Kataoka, Novel supramolecular assemblies from block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery, 7th France-Japan DDS Symposium “Recent Trends in Gene and Drug Delivery”, Biwako Hotel, Otsu, Japan, 2006.09.25 (招待講演)
 - 25) 片岡一則 西山伸宏, ピンポイント診断・治療のためのナノキャリア設計, 第65回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 2006.9.28 (招待講演)
 - 26) K. Kataoka, Nanobiotechnology-based pharmaceuticals in the medical frontier ~Supramolecular assembly of block copolymers as nanocarriers for smart drug delivery~, Latta Lecture, University of Nebraska Medical Center, Omaha, USA, 2006.10.06 (Latta 記念講演)
 - 27) K. Kataoka, Smart supra-macromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, 4th International Nanomedicine and Drug Delivery Symposium (NanoDDS' 06), Embassy Suites Hotel Downtown/Old Market, Omaha, Nebraska, USA, 2006.10.08 (招待講演)
 - 28) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, IUPAC International Symposium on Advanced Polymers for Emerging Technologies - Commemorating the 30th Anniversary of the Polymer Society of Korea (PSK30), BEXCO, Busan, Korea, 2006.10.13 (招待講演)
 - 29) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療—超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療—, 第44回日本癌治療学会総会シンポジウム 13「細胞内デリバリーの現状と未来」, 京王プラザホテル 東京, 2006.10.19
 - 30) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療—超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療—, 新拠点形成シンポジウム「次世代先端医療の創出と産学官連携—ナノバイオ標的医療の融合的創出拠点の形成—」, 岡山コンベンションセンター 岡山市, 2006.10.24 (招待講演)
 - 31) 片岡一則, 高分子が先導するナノバイオテクノロジー—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—,

- 2006年度若手社員のための高分子基礎講座（高分子学会関東支部），横浜ゴム湘南セミナーハウス 平塚市, 2006.10.26 (招待講演)
- 32) K. Kataoka, Smart self-assemblies of block copolymers as nanocarriers for drug and gene delivery, AsiaNANO 2006 (Asian Conference on Nanoscience & Nanotechnology), Busan, Korea, 2006.11.02 (招待講演)
- 33) K. Kataoka, Nanobiotechnology in the medical frontier ~Supramolecular assembly of block copolymers as nanocarriers for smart drug delivery~, Seminar, Ajou University, 2006.11.03
- 34) 片岡一則, 次世代の産業技術創出を担うマイクロ・ナノものづくり拠点の構築を目指して, 仙台国際フォーラム 2006 マイクロ・ナノ異分野システム融合国際フォーラム 仙台サンプラザ 宮城県, 2006.11.6 (パネルディスカッション)
- 35) K. Kataoka, Smart supra-macromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, 4th Sweden-Japan Workshop on Bio-Nanotechnology, National Institute for Materials Science, Tsukuba, Japan, 2006.11.13 (招待講演)
- 36) K. Kataoka, Self-organized nanodevices of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery ~Challenge to intracellular nanomedicine~, 13th Yonsei International Symposium for Cancer Reserch: Emerging Role of Nanomedicine: Opprotunities and Challenges, Yonsei University, Seoul, Korea, 2006.11.17 (招待講演)
- 37) 片岡一則, ピンポイント薬物・遺伝子治療のための超分子ナノデバイス・デザインーナノバイオテクノロジーが先導する未来医療の実現に向けてー, 第67回高分子若手研究会 (関西), 大阪大学吹田キャンパス コンベンションセンターMOホール 吹田市 大阪府, 2006.11.18 (招待講演)
- 38) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーー, かわさきサイエンス&テクノロジーフォーラム 2006, かながわサイエンスパーク KSP ホール 川崎市, 2006.11.20 (招待講演)
- 39) K. Kataoka, Self-organized nanodevices of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery ~Challenge to intracellular nanomedicine~, Public Research Lecture, The University of Hong Kong, Hong Kong, China, 2006.11.24
- 40) 片岡一則, ピンポイント薬物・遺伝子デリバリーのための高分子ミセル設計ーナノバイオテクノロジーが先導する未来医療の実現に向けてー, オレオナノサイエンスシンポジウム 2006, 東京理科大学森戸記念館第1フォーラム, 2006.11.28 (招待講演)
- 41) 片岡一則, 高分子ナノミセルによるがんの標的治療, 文部科学省科学研究費補助金 がん特定領域研究「発がん」A01/A02 研究成果合同発表会, せとうち児島ホテル 倉敷市, 2006.11.30
- 42) K. Kataoka, Self-organized nanodevices from block copolymers for gene and drug delivery ~Challenge to intracellular nanomedicine~, Biomaterials From 2D to 3D to Larger Than Life Symposium on the Future of Biomaterials to celebrate Buddy Ratner's 60th Birthday "Sheraton Hotel Kaanapali, Maui, Hawaii, 2006.12.16 (招待講演)
- 43) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療ー, 先端医療開発研究クラスターシンポジウム (第3回) 第2回疾患生命工学センター 第2回22世紀医療センター第4回医工連携研究会合同シンポジウム, 東大病院中央診療棟 2-7階, 2006.12.21
- 44) 片岡一則, DDS が拓く未来医療, 第1回ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会超早期診断と低侵襲医療の実現と一体化 生活の安全・安心を目指して日本科学未来館みらい CAN ホール 東京都, 2006.12.21 (招待講演)

- 45) 片岡一則, セル・セラピーのためのナノテクノロジー材料技術ー超分子ナノデバイスによるピンポイント診断・治療ー, 近畿化学協会第3回フロンティア材料セミナー「新しい材料が拓くバイオメディカルの世界」, 大阪科学技術センター 大阪, 2007.1.23 (招待講演)
- 46) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療ー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, エーザイ研究技術交流会講演会, エーザイ株式会社川島工園 各務原市 岐阜, 2007.1.29 (招待講演)
- 47) K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, International Symposium on Polymer Therapeutics(ISPT-07), Freie University Berlin, Germany, 2007.2.20(基調講演)

H. 知的所有権の出願・取得状況

- 1) 片岡一則、山崎裕一、高江誓司、核酸内包高分子ミセル複合体、特願2006-54332
- 2) 片岡一則、山崎裕一、アルニダ アンワール、張祐銅、西山伸宏、核酸内包高分子ミセル複合体、特願2006-54327
- 3) 片岡一則、宮園浩平、狩野光伸、平川弘聖、八代正和、野出學、TGF- β シグナル阻害剤と抗腫瘍剤の組み合わせ使用、特願2006-24845
- 4) 片岡一則、宮園浩平、狩野光伸、Bac Younsoo、西山伸宏、TGF- β シグナル阻害剤と抗腫瘍剤の組み合わせ使用、特願2006-24843