

- Yu, D., Fukuda, T., Tuoya, Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, T., Tada, H., and Seno, M. IUBMB Life 58 (2006), 1-6.
- 3) Gene Therapy of Liver Tumors with Human Liver-Specific Nanoparticles. Iwasaki, Y., Ueda, M., Yamada, T., Kondo, A., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Sakamoto, M., and Kitajima, M. Cancer Gene Ther. 14 (2007) 74-81.
- 4) Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification. Nagaoka, T., Fukuda, T., Yoshida, S., Yu, D., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M. J Control Release (2007) in press.
- 5) 中空バイオナノ粒子を用いた DDS の開発とその産業化 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和 Drug Delivery System (2006), Vol.21, No. 4, 435-443.
- 6) 遺伝子・薬剤の生体内ピンポイントデリバリーを可能にするバイオナノカプセルの現状とこれから 粕谷武司、鄭周姫、谷澤克行、黒田俊一 化学と生物 (2006) , Vol.44, No.11, 760-766.
- 7) バイオナノカプセルの開発とバイオメディカル分野での応用 黒田俊一、粕谷武史、鄭周姫、谷澤克行 化学工業 (2006) , Vol. 57, No.11, 869-874.
- 8) バイオナノカプセルの開発と医薬品分野での応用 黒田俊一 PHARM STAGE (2006) , Vol. 6, No. 8, 61-69.
- 9) バイオナノキャリアの開発とがん遺伝子治療への応用 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和 バイオテクノロジージャーナル (2007) , Vol. 7. No. 1, 41-47.
- 10) 黒田俊一 (分担) ナノパーティクルテクノロジー・ハンドブック (細川益男・野城清編集) (2006) 日刊工業新聞社 (大阪) ワンポイントデリバリー
- 11) Shun' ichi KURODA (分担) A Manual on Gene Transfer Vector and Genetic Modification Technology (John Rossi & Ted Friedmann Eds.) (2006); Cold Spring Harbor Press. Bionanocapsules for *In Vivo* Pinpoint Gene and Drug Delivery System.
2. 学会発表
なし
- G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)
1. 特許取得
- 1) バイオナノカプセル内部への効率的な物質封入方法 黒田俊一、植田淳子、名木田真奈(出願人：科学技術振興事業機構 (RX03P48)、国立大学法人 大阪大学、(株) ビークル) 優先権主張 2005-267573(2005 年 9 月 14 日)出願 2006-240746 (2006 年 9 月 5 日)
- 2) 基板およびその製造方法 平松伸吾、鄭基晩、畠平智子、金森大典、黒田俊一、谷澤克行 (出願人：東レ、(株)ビークル) 特願 2006-257829 (2006 年 9 月 22 日)
- 3) 免疫学的測定用ナノ粒子 平松伸吾、鄭基晩、畠平智子、金森大典、黒田俊一、谷澤克行 (出願人：東レ、(株)ビークル) 特願 2006-258398 (2006 年 9 月 25 日)
- 4) バイオナノカプセルの効率的な精製方法 黒田俊一、前川圭美、名木田真奈(出願人：科学技術振興事業機構、国立大学法人 大阪大学、(株)ビークル) 特願 2006-35666 (2006 年 2 月 13 日)
- 5) 中空バイオナノ粒子への遺伝子導入剤及び導入法 黒田俊一、鄭周姫、谷澤克行、大石潤、片山佳樹、カン貞勲、山田忠範(出願人：国立大学法人 大阪大学、

- 国立大学法人 九州大学、(株)ビークル)
特願 2006-205698 (2006 年 7 月 28 日)
- 6) ビオチン化ないしホーミングペプチド
提示型バイオナノカプセル 黒田俊一、
植田淳子、名木田真奈、殿井裕之 (出願
人：科学技術振興機構 (RX03P63), 国
立大学法人 大阪大学、(株)ビークル) 特
願 2006-356378 (2006 年 12 月 28 日)
- 7) 免疫学的測定用ビオチン化ナノ粒子 平
松伸吾、鄭 基晩、畠平智子、金森大典、
角矢博保、黒田俊一、谷澤克行 (出願人：
(株)東レ、国立大学法人 大阪大学) 特願
2007-3677 (2007 年 1 月 11 日)
- 8) ドラッグデリバリーシステムに用いる
複合粒子 清水宣明、荻野千秋、黒田俊
一 (出人:国立大学法人 金沢大学、国立
大学法人 大阪大学)特願 2007-032765
(2007 年 2 月 13 日)
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

バイオナノキャリアを利用する *in vivo* イメージングに関する研究

分担研究者 妹尾 昌治 岡山大学大学院自然科学研究科・助教授

B 型肝炎ウイルスの特性を生かしたヒト肝臓細胞に特異的な DDS ベクター「バイオナノキャリア」の性能の向上を目的として研究を進めている。B 型肝炎ウイルスの表面抗原タンパク質を遺伝子組換えで発現させると、直径約 100 ナノメートルの中空粒子を形成する。これを、ヒト肝臓細胞に特異的に物質を送達するドラッグデリバリー用ナノカプセル（バイオナノキャリア）として用いることが可能であることを示してきた。本研究は、このバイオナノキャリアをさらに発展的に実用化に近づける方法を開発することを目的としている。本年度は、B 型肝炎ウイルスの特性を生かしたヒト肝臓細胞に特異的な DDS ベクター「バイオナノ粒子」の性能の向上を目的として研究を進めている。粒子に遺伝子的に融合させるタンパク質の候補として緑色蛍光タンパク質 GFP とホタルルシフェラーゼを融合したタンパク質を調製し、*in vitro* および *in vivo* で投与し、イメージングの可能性を検討した。融合タンパク質は *in vitro* では簡便に蛍光でモニター可能であるのに対し、*in vivo* ではルシフェリンを投与することにより強い発光を検出して、その局在を知ることができることを確認した。また、 Mg^{2+} と CoenzymeA を同時に注射して、発光時間を 1 時間まで持続させることができた。さらに、このレポーターを用いた分子標的系を構築していく。

A. 研究目的

B 型肝炎ウイルスの表面タンパク質は L タンパク質と呼ばれ、ウイルスのワクチンを開発する目的で多くの研究グループがこの表面抗原遺伝子の組み換え発現に取り組んできた。種々の工夫の成果により現在では酵母により生産されたものが、ワクチンとして広く利用されるようになった。ウイルスの L 遺伝子を酵母細胞で発現させこの L タンパク質を、原子間力顕微鏡で観察すると、平均直径 100–200 nm の粒子像が確認できる。興味深いことに拡大像では、B 型肝炎ウイルスの電顕像に酷似している。すなわち L タンパク質はそれ自身が粒子形

成能を有することが示唆された。さらに、L タンパク質のアミノ末端に位置する Pre-S1 領域は、このヒト肝臓細胞の表面構造に非常に特異的な親和性を持っているため、この L タンパク質には B 型肝炎ウイルス同様にヒト肝臓細胞を特異的に認識する能力が保持されている。

そこで、私たちは生体内において効率良く特定の分子を標的する技術へこの中空のナノ粒子を「バイオナノキャリア」として応用する研究を行っている。しかし、このバイオナノキャリアはジチオスレイトールのような還元剤に対しても不安定であることから必須のジスルフィド結合が存在する

と考えられる。さらに、この粒子を構成する L タンパク質は保存中にジスルフィド結合の架橋によりポリマー形成を起こし、同時に感染効率を低下させることがわかったのでシステイン残基を置換した L-タンパク質の発現を試みた。この結果、8 個のシステインが置換可能で、タンパク質の安定化に寄与した。

さらに、このバイオナノキャリアにタンパク質を封入する場合には変性や失活を伴いやすいと予想されるため、L-タンパク質の C 末端に外来タンパク質を遺伝子的に融合する形で封入する方法を考案した。GFP やルシフェラーゼを融合したバイオナノキャリアは、*in vivo* で投与した場合、その局在を知る事ができるレポーターとして有用であり、分子標的によるバイオイメーjing を視野に入れた形の癌の標的は標的に到達する制がん剤の濃度をコントロールできる可能性があり、分子標的をさらに確実な技術にすると考えられた。

B. 研究方法

1. 抗体分子親和性ルシフェラーゼの構築

スタフィロコッカスの表面タンパク質プロテイン A は抗体分子 IgG に高い親和性を持つが、これは Z 領域と呼ばれる α ヘリックスの繰り返し構造に依存している。そこで、IgG に依存して抗原を標的して可視化するタンパク質分子デザインとして、この Z 領域を二つ持つ ZZ-タグ遺伝子とホタルルシフェラーゼ遺伝子を融合し、ZZ-LUC 融合タンパク質を大腸菌で発現させ、これを精製した。

2. *in vivo* イメーjing

抗体と結合したルシフェラーゼが抗原特異的に送達された場合、その局在を *in vivo* で観察することを目的として、ルシフ

ェラーゼに特異的な基質であるルシフェリンを腹腔内に注射することにより、ルシフェラーゼの局在を高感度 *in vivo* イメーjing CCD カメラにより撮影する方法を検討した。

3. ルシフェラーゼ-緑色蛍光タンパク質 (LUC-GFP) 融合遺伝子発現ベクターの構築

細胞を *in vivo* イメーjing で可視化するために、CMV プロモーターの支配下に LUC と GFP を融合した LUC-GFP タンパク質を発現するベクターを構築した。これを発現する細胞は、蛍光顕微鏡下で観察できるとともに、*in vivo* においてはルシフェリン存在下で局在を観察することができるメリットがある。

4. LUC-GFP 融合タンパク質発現細胞株の樹立

少ない細胞数でも *in vitro* および *in vivo* の両方での イメーjing による観察が可能な細胞を作製することを目的として、ヒト前立腺癌細胞株 LNCap に LUC-GFP 融合タンパク質発現プラスミドを導入後、G418 存在下で形質転換細胞をスクリーニングし、LUC-GFP 融合タンパク質を安定発現する細胞株を樹立した。

C. 研究結果

1. 抗体分子親和性ルシフェラーゼによる *in vivo* イメーjing

LUC 融合バイオナノキャリアの系を確立するために、まず LUC による *in vivo* イメーjing の可能性を検討開始した。ZZ-LUC 融合タンパク質を大腸菌で発現させた。この融合タンパク質 ZZ-LUC はジスルフィド結合を持たないので、リフォールディングの過程を経ずに活性タンパク質を可溶性画

分から ZZ タグを利用して IgG 吸着カラムにより調製することが可能である。また、抗体分子と結合させ抗原部位を標的するデザインとなっているので、適当な抗体を選択して局所イメージングも可能になると考えられた。事実 EGF 受容体に対する抗体と結合させた ZZ-LUC を用いて、EGF 受容体過剰発現細胞株 A431 を特異的に標的することができることを *in vitro* において確認している。この ZZ-LUC をマウスの大腿部筋肉中へ注射し、腹腔内へルシフェリンを注射して *in vivo* イメージングを試みた（図

15 分で顕著に発光が減弱するのが観察された。しかし、ルシフェリンに Mg^{2+} と Coenzyme A を加えて投与すると一時間は減弱が認められず、長時間の観察が可能であることが分かった。このようにルシフェラーゼを局所に集積させてやることにより、*in vivo* においてイメージングが可能であることを示した例は少ない。さらに、減弱までの時間を 1 時間以上まで延長できることはルシフェラーゼ発光による *in vivo* イメージングが実用的であることを極めて強く示唆するものである

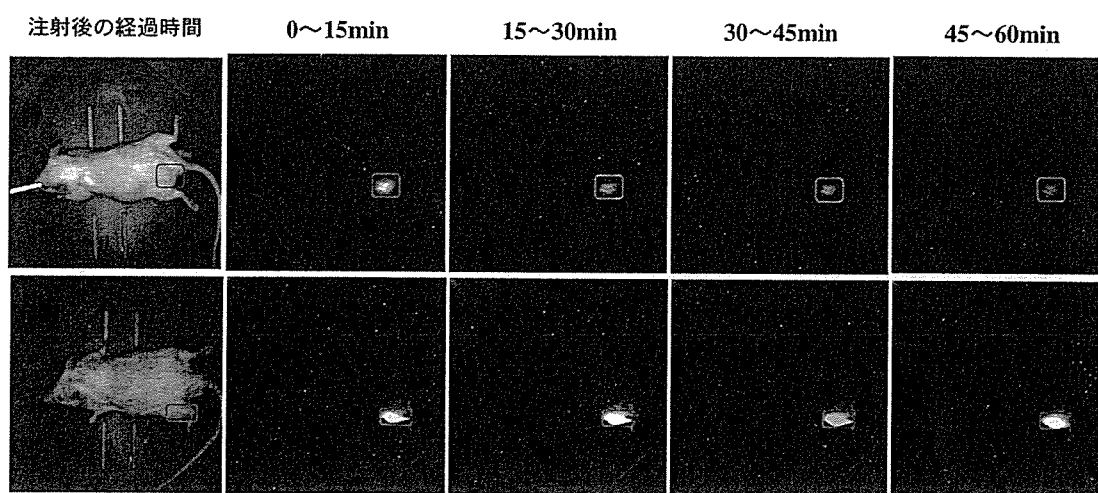


図 1 ZZ-LUC 融合タンパク質による *in vivo* イメージング。マウスの大腿部へ ZZ-LUC 融合タンパク質を筋肉注射した（赤枠部分）後、ルシフェリンを腹腔内に投与し、経時的に高感度 CCD カメラにより撮影した。上段は D-Luciferin (30mg/ml) のみ、下段は D-Luciferin (30mg/ml)、 Mg^{2+} (26.7mM) および Coenzyme A (2.7mM) を 100 μ L 腹腔内注射した場合。

1)。このとき、ルシフェリン単独投与では、

2. ルシフェラーゼ-GFP 融合タンパク質を発現する細胞

ルシフェラーゼ-GFP 融合タンパク質を発現させるための遺伝子を構築し、サル腎由来細胞株 Cos7 を用いて、GFP およびルシフェラーゼの活性が同時にモニターできることを確認した上で、ヒト前立腺癌由来細胞株 LNCap に対して、この LUC-GFP 融合タンパク質発現ベクターを導入した。この結果樹立した形質転換細胞株 LNCap-Luc-GFP 細胞をヌードマウスに

1×10^7 個移植して一週間で *in vivo* イメージングを検討した。LNCap 細胞は増殖が遅く、ある程度の大きさの固形癌が生着した担癌マウスの作製には 3 週間から 1 ヶ月の時間を要する。たとえ皮下移植の場合でも移植後一週間では、移植部位を外観で視認することは不可能である（図 2）。しかし、このヌードマウスの腹腔にルシフェリンを注射して、高感度 CCD カメラにより撮影を行うと、移植細胞の局在が鮮明に観察された。これを利用すれば、時間経過ごとの細

胞の局在を知ることができるので、転移の様子をモニターしたり、制癌剤の効果を把握したりすることが可能と考えられ、より現実的に即した薬剤のスクリーニング系になると期待できる。

D. 考察

能動的な分子標的技術として研究開発が進んでいるバイオナノキャリアはB型肝炎ウイルスの表面抗原を利用していることからヒト肝臓細胞を特異的に標的する事が可能である。また、肝臓細胞認識部位を細胞表面認識が可能な様々な分子（リガンドや抗体など）に置換する事で、標的を変化さ

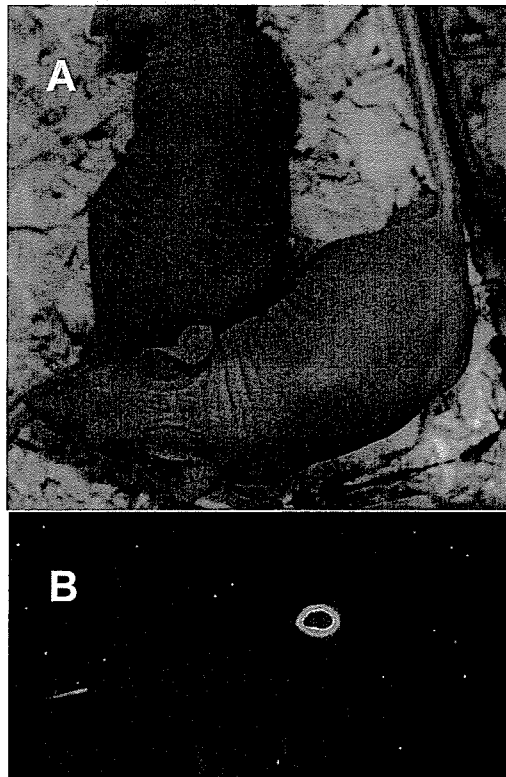


図2 LNCap-Luc-GFP細胞を移植したヌードマウス。A、皮下移植後一週間経過時。移植部位を視認することは困難。B、ルシフェリンを投与後の *in vivo* イメージング。

せる事も可能である。細胞表面マーカーを特定することが可能になれば、このようなナノキャリアを利用する事で従来には無かつ

た新しい形の能動的ドラッグデリバリーシステム（DDS）によりピンポイントで薬剤を送達できる段階へ一歩踏み込んだと言える。

バイオナノキャリアを使用する事で考えられる特長として、薬剤の副作用を抑えながら患部を標的にして効率よく治療を行えることにある。しかし、薬剤や症状により投与量がコントロールできれば、副作用を効果的に回避しながら治療効果はさらに上げられ、治療期間の大幅な短縮が期待できる。このためには、投与したナノキャリアがどの程度効率的に到達しているかを無侵襲でモニターするのが最も現実的な手法である。そこで、考えられるのはバイオナノキャリアにレポーターとなる分子が付随している事である。発光を利用して検出感度も良く定量性のあるルシフェラーゼがそのレポーターとなる可能性が期待される。

本研究で構築した ZZ-Luc は抗体を提示することにより、必要な細胞や組織を *in vivo* で特異的に標的化することが可能で、発光量によって到達したタンパク質量の推定が可能となる。この延長線上で発光レポーターをもつバイオナノキャリアが実用化できれば、この発光を *in vivo* でモニターするには冷却型 CCD カメラがあれば可能である。現状では *in vivo* カメラとしてもっとも安価であり、画像解析ソフトがあれば、定量性も得られるなどのメリットがある。

大腸菌から遺伝子組み換えで調製した ZZ-Luc は、生体中で発光可能な分子である事が確認されていたが、発光寿命が短いのが難点であった。しかし、Coenzyme A 等を併用することによりその寿命も十分長く、観察を用意にすることができた。これにより抗体を提示した ZZ-Luc が分子標的した場合の局在を発光レポーターにより *in vivo* でイメージングする具体性が高まり、DDS で投与される薬剤の送達量モニターリング

システムへの完成の準備が整いつつある。

さらに、LNCap-Luc-GFP 細胞の樹立は、バイオナノキャリアの可能性を *in vivo* で実証するために重要な材料となることは確実である。レポーターをモニターすることにより分子標的の効果が生体内において、しかも同一個体で時間経過を追ってモニターすることが可能になったからである。これに加えて重要なポイントは、従来の担癌マウスは細胞の移植から生着まで約1ヶ月を要していたのに対して、レポーターをモニターするシステムにすることにより、移植後1週間以内にその存在をモニターすることが可能となることである。このことは、生体内における癌細胞の動態を解剖することなく具にとらえることができるとともに、従来のような大きな腫瘍塊を標的する訳ではないので、標的に用いる制癌剤の用量を現実的なものにして実験が行えることを意味する。

E. 結論

バイオナノキャリアをレポーター型としてデザインするために外来タンパク質遺伝子的に融合する場合にはルシフェラーゼが候補として十分期待できるものであることが示唆された。*in vitro* および *in vivo* での分子標的が可能で、*in vivo* イメージングにおいても発光寿命の問題は障壁ではなくなったことも大きな進展である。さらに、発光細胞の樹立は少数細胞で *in vivo* イメージングを可能にすることから具体的な薬剤のスクリーニング系を与えるので、バイオナノキャリアがもつ薬剤送達効率可能性を試験していく上で大変重要であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yagi H, Ueda M, Jinno H, Aiura K, Mikami S, Tada H, Seno M, Yamada H, Kitajima M. Anti-tumor effect in an *in vivo* model by human-derived pancreatic RNase with basic fibroblast growth factor insertional fusion protein through antiangiogenic properties. *Cancer Sci.* 97(12):1315-1320 (2006).
- 2) Shishido T, Muraoka M, Ueda M, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Fukuda H, Kondo A. Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line. *Appl Microbiol Biotechnol.* 73(3):505-511 (2006).
- 3) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和「中空バイオナノ粒子を用いた DDS の開発とその産業化」*Drug Delivery System*, vol.21, no.4, pp. 435-443 (2006).
- 4) Murata H, Sakaguchi M, Futami J, Kitazoe M, Maeda T, Doura H, Kosaka M, Tada H, Seno M, Huh NH, Yamada H. Denatured and Reversibly Cationized p53 Readily Enters Cells and Simultaneously Folds to the Functional Protein in the Cells. *Biochemistry* 45(19):6124-6132 (2006).
- 5) Sanderson MP, Abbott CA, Tada H, Seno M, Dempsey PJ, Dunbar AJ. Hydrogen peroxide and endothelin-1 are novel activators of betacellulin ectodomain shedding. *J Cell Biochem.* 99(2):609-623 (2006).
- 6) Hoshimoto S, Ueda M, Jinno H, Kitajima M, Futami J, Seno M. Mechanisms of the growth-inhibitory effect of the RNase-EGF fused protein against EGFR-overexpressing cells. *Anticancer Res.* 26(2A):857-863 (2006).

- 7) Yu D, Fukuda T, Tuoya, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada T, Tada H, Seno M. Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system. IUBMB Life 58(1):1-6 (2006).
 - 8) 近藤昭彦, 黒田俊一, 谷澤克行, 妹尾昌治, 上田政和「バイオナノキャリアの開発とがん遺伝子治療への応用」バイオテクノロジージャーナル, vol.7, no.1, pp. 41-47 (2007).
 - 9) Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. Cancer Gene Ther. 14(1):74-81 (2007).
 - 10) Nagaoka T, Fukuda T, Yoshida S, Nishimura H, Yu D, Kuroda S, Tanizawa K, Kondo A, Ueda M, Yamada H, Tada H, Seno M. Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification. J Control Release in press (2006).
 - 11) Kitamura RI, Ogata T, Tanaka Y, Motoyoshi K, Seno M, Takei I, Umezawa K, Kojima I. Conophylline and Betacellulin-delta4: an Effective Combination of Differentiation Factors for Pancreatic beta Cells. Endocr J. in press, 2007.
2. 学会発表
- 1) Hitoshi Murata, Junichiro Futami, Midori Kitazoe, Megumi Kosaka, Hiroko Tada, Masaharu Seno, Hidenori Yamada. Artificial regulation of cell proliferation by protein transduction of N-terminal domain of simian virus 40 large T antigen using PEI-cationization method. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress, Program, p.121, 2P-C-241, 2006.6.20, Kyoto.
 - 2) Hiroyuki Tonoi, Hiroko Tada, Atsuko Ueda, Akihiko Kondo, Masaharu Seno, Masakazu Ueda, Katsuyuki Tanizawa, Shun-ichi Kuroda, Pinpoint Drug and Gene Delivery System Using ZZ tag-displaying Bio-nanocapsule and Targeting Molecule-fused IgG Fc protein. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress, Program, p.334, 2P-B-178, 2006.6.20, Kyoto.
 - 3) Hiroko Tada, Takayuki Suyama, Tetsu Hayashida, Megumi Kosaka, Junichiro Futami, Masakazu Ueda, Masaharu Seno, Hidenori Yamada, Design and characterization of hybrid proteins constructed by domain insertion fusion. 20th IUBMB international congress of biochemistry and molecular biology and 11th FAOBMB congress, Program, p.684, 5P-A-018, 2006.6.23, Kyoto.
 - 4) Hidenori Yamada, Kohei Miyata, Shinya Fujiki, Masaru Tano, Masayuki Moriya, Takeshi Ino, Megumi Kosaka, Hiroko Tada, Junichiro Futami, Mamoru Yamanishi, Hiroshi Yamaguchi, Masaharu Seno, Takashi Nomoto, Tomoko Hirata, Motonobu Yoshimura, Eijiro Honjo, Taro Tamada, Ryota Kuroki, Crystal Lattice Engineering: Crystallization and Structure Determination of Human RNase 1 Mutants with a Hydrophobic Interface of Leucines. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, Meeting program, p.S180,

1P136, 2006.11.13-14, Okinawa.

- 5) 二見翠、二見淳一郎、多田宏子、妹尾昌治、西川光郎、山田秀徳、前田宜丈、 β -catenin タンパク質導入による人為的 Wnt シグナル制御. 2006 年分子生物学フォーラム、プログラム・講演要旨集, P317, 1P-430, 2006.12.6, 名古屋.
- 6) Tadahiro Nagaoka, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Masaharu Seno, Separation of Dual Affinity of Betacellulin to ErbB Receptors. The American Society for Cell Biology 46th Annual Meeting, Late Abstracts, L4, 2006.12.10, San Diego, USA.
- 7) Tuoya, Yuh Sugii, Tadahiro Nagaoka, Takayuki Fukuda, Hiroko Tada, Hidenori Yamada, Yasaburo Matsuura*, Heizo Tokutaka**, Masaharu Seno, Interpreting

patterns of gene expression with spherical self-organizing maps (sSOM): application to search for cell surface markers. The 17th International Conference on Genome Informatics, Program & Abstracts p.128, 2006.12.18, Yokohama.

- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
なし

肝細胞がん治療への応用

分担研究者 上田 政和 慶應義塾大学医学部・助教授

研究要旨

本年度は、HBs 抗原を結合させヒト肝細胞認識能を有し、かつパクリタクセルを封入した生体適応 2 重脂質膜でおよそ 50－100 nm の直径を有する MPC ポリマーによる肝細胞癌に対する特異的殺細胞効果と MPC ポリマーに遺伝子を組み込んだプラスミドを結合させてヒト肝細胞癌特異的に蛋白を発現させることが出来るようになったので、そのことを報告する。

（材料と方法） 1）MPC ポリマーにエステル結合により HBs 抗原を結合させ、パクリタクセルと混合させることによりパクリタクセルを封入した。その後、ヒト肝細胞癌である HepG2 とヒト扁平上皮癌である A431 に *in vitro* で添加して、その殺細胞効果を対照であるパクリタクセル封入 MPC ポリマーと比較検討した。

2）MPC ポリマーにエステル結合により HBs 抗原を結合させ、GFP および Flt-1cDNA を組み込んだ plasmid をイオンの吸着させたものを、ヒト肝細胞癌株である HepG2 とヒト大腸癌 WiDr に *in vitro* および *in vivo* で投与して、それぞれ培養液や癌組織中および各種マウス臓器中のタンパクの発現を ELISA 法や蛍光顕微鏡を使用して検討した。

（結果） 1）HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーでは、ヒト肝細胞癌である HepG2 では、対照であるパクリタクセル封入 MPC ポリマーよりも *in vitro* でのほぼ 2 倍の殺細胞効果が認められたが、ヒト扁平上皮癌である A431 ではこのような差異はまったく認められなかった。

2）HepG2 の培養液中には ELISA 法により Flt-1 タンパクの発現が認められたが、A431 ではまったく認められなかった。また、それぞれの細胞株に、GFPcDNA を組み込んだプラスミドを培養液中に添加すると HepG2 でのみ緑色蛍光が認められた。それぞれの細胞株をヌードマウス皮下に移植したモデルに、各々のプラスミドを静注して、ラット各種臓器および移植腫瘍組織を採取し、各組織中 Flt-1 濃度を ELISA 法で測定すると HepG2 腫瘍組織中でのみ Flt-1 タンパクが検出され、WiDr やラットの肝臓、脾臓、筋肉、腎臓などには全く検出されなかった。

（結語）ヒト肝細胞を特異的に標的とするナノカプセルが開発された。

A. 研究目的

ヒト肝細胞癌は日本の国民病とも言うべき疾患であり、日本を始めとした東南アジアに多い。この肝細胞癌は主として肝炎を母体として発生するものであり、再発・再燃が高率であることや肝機能障害を伴っていることなどが特徴であるから出来るだけ生体に侵襲の少ない治療法が望ましい。そのためには、ヒト肝細胞癌に対する特異性の高くしかも生体にとって安全性も高い治療法の開発が必要である。そこで、われわれはヒト肝細胞癌に対してピンポイントに遺伝子・薬物・タンパク・siRNAなどをデリバリーするバイオナノキャリアの開発を試みた。ところで、MPCポリマーは人工腎臓や人工心臓などにバイオマテリアルとして広く臨床応用され、その安全性は認められている。このMPCポリマーは側鎖にリン脂質極性基を有し、優れた血液適合性を有する2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)とn-ブチルメタクリレート(MBA)との水溶性共重合体(PMB30W)であり、水溶性でかつ疎水性物質を安定に内包することが出来る。もともと抗癌剤には難溶性のものが多く、本物質により徐放性で易水溶性となりしかも、このミセル体は大きさが平均50 nmで腫瘍組織集積性も高くなりしかもセンチネルノードに集積するスズコロイドと同じ大きさであり抗癌剤を経リンパ流的に到達させることも可能になり、新たな投与方法が生まれることも予想される。また、p-ニトロフェニルカルボニルオキシエチルメタクリレート(NPMA)を加えたpoly(MPC-co-BMA-co-NPMA)(PMBN)はエステル結合により増殖因子や抗体などを結合させ、特定の組織や細胞に特異性や指向性を持たせることが可能となる。本年度は、HBs抗原を結合させヒト肝細胞認識能を有し、かつパクリタクセルを封入した生体適応2重脂質膜でおよそ50-100 nmの直径を有するMPCポ

リマーによる肝細胞癌に対する特異的殺細胞効果とMPCポリマーに遺伝子を組み込んだプラスミドを結合させてヒト肝細胞癌特異的に蛋白を発現させることが出来るようになったので、そのことを報告する。

B. 研究方法

1) 4mgのMPCポリマーと1mgのHBs抗原(Biodesign International, Saco, Me., USA)を4mlの燐酸緩衝液(pH7.8)に溶解して4℃で48時間反応させた後、p-nitrophenolを透析により除去し、エステル結合によりHBs抗原を結合させた。反応量はp-nitrophenolを400nmの波長で測定することにより推測した。このHBs抗原結合MPCポリマーにエタノールに溶解したパクリタクセルと混合させ、その後エタノールを蒸発させることによりパクリタクセルを封入した。ヒト肝細胞癌であるHepG2とヒト扁平上皮癌であるA431を96穴のプレートに撒いて、培養液中にHBs抗原結合パクリタクセル封入MPCポリマーを添加して、MTT assay法でその殺細胞効果を対照であるパクリタクセル封入MPCポリマーと比較検討した。

2) 前記と同様にMPCポリマーにエステル結合によりHBs抗原を結合させ、GFPおよびFlt-1cDNAを組み込んだplasmidをイオンの吸着させたものを、ヒト肝細胞癌株であるHepG2とヒト大腸癌WiDrを96穴のプレートに撒き、生着させてから遺伝子結合MPCポリマーを培養液中に添加して、培養液中のFlt-1タンパク濃度をELISA法で測定した。また、GFPタンパクに関しては、蛍光顕微鏡にて蛍光を観察した。HepG2およびWiDrをヌードマウス皮下に移植し、腫瘍を形成してから尾静脈から投与して、それぞれ培養液や癌組織中および各種マウス臓器中のタンパクの発現をELISA法や蛍光顕微鏡を使用して検討した。

C. 研究成果

1) HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの肝細胞特異的殺細胞効果：

HepG2 にパクリタクセル及び HBs 抗原を添加しても、図 1 に示すようにこの濃度では、全く殺細胞効果を示さなかった。さらに、HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーとパクリタクセル封入 MPC ポリマーとの殺細胞効果を MTT assay で測定すると有意に HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの殺細胞効果が明らかであった。図 2 には、パクリタクセル濃度をさらにあげた時の HepG2 に対する殺細胞効果を示しているが、図 1 と同様に、HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーの殺細胞効果が強力であった。

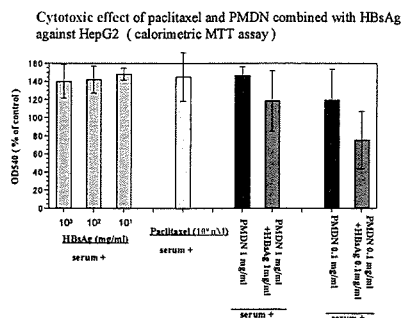


図 1.

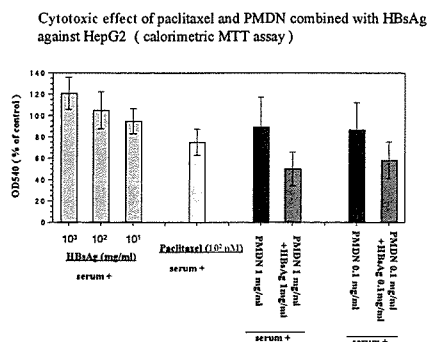


図 2.

一方、ヒト扁平上皮癌細胞株である A431 にパクリタクセル封入 MPC ポリマーと

HBs 抗原結合パクリタクセル封入 MPC ポリマーを培養液に添加しても、その殺細胞効果には図 3 で示すように両者間には、有意の差を認めなかった。高濃度で比較しても図 4 のように、やはり両者間では有意の差を認めなかった。

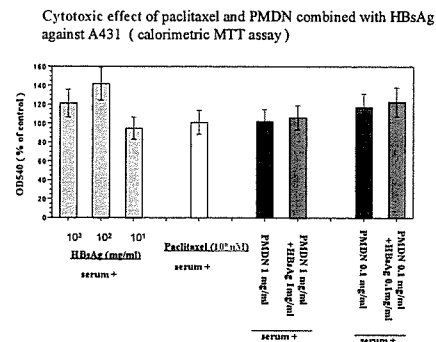


図 3.

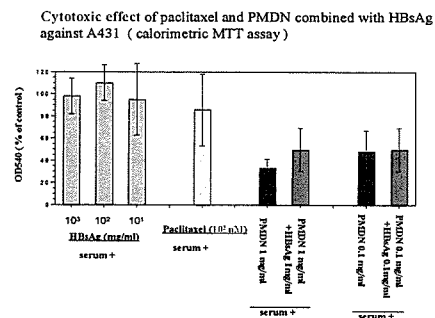


図 4.

2) HBs 抗原結合 Flt-1 c DNA 組み込み plasmid 封入 MPC ポリマーに関する研究：

HBs 抗原結合 Flt-1cDNA 封入 MPC ポリマーを HepG-2 と WiDr に *in vitro* で投与してその培養液中の Flt-1 タンパク濃度を ELISA 法で測定すると、図 5 のように HepG-2 に HBs 抗原結合 Flt-1cDNA 封入 MPC ポリマーを添加したものだけでタンパクの発現が認められたが、他の条件ではいずれにおいてもその発現は認められなかった。

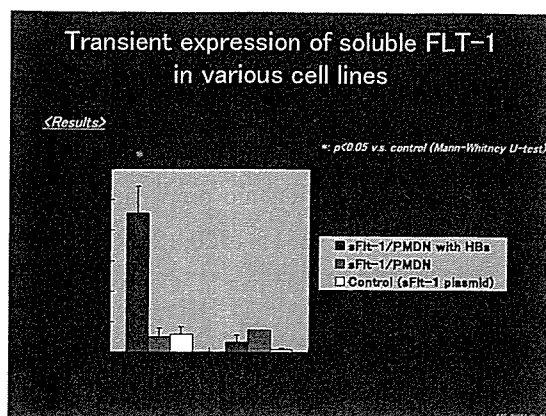


図 5.

ヌードマウス皮下にヒト肝細胞癌 HepG-2 とヒト大腸癌 WiDr 移植し、上記各種 MPC-ポリマーを尾静脈から注入して、7日後にと殺して各種臓器の Flt-1 濃度を ELISA 法で測定すると図 6 のように、ヒト肝細胞癌である HepG-2 の腫瘍組織内にはのみ Flt-1 が発現しており、他のヒト癌組織やマウス各臓器では発現が認められなかった。

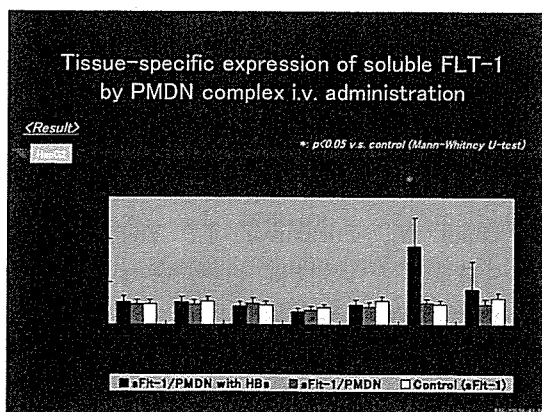


図 6.

D. 考察

HBs 抗原を用いてナノサイズでしかも生体適合性が高い肝細胞に特異的な Drug delivery system や Gene delivery system が構築可能であることが我々の研究により明らかとなった。このような、手法を用いれば、日本における国民病とも言える肝細胞癌に対するより作用が強く、副作用の少ない治

療法が確立されるものと期待される。しかし、本手法をそのまま臨床に用いることは HBs 抗原の抗原性や肝細胞癌は肝炎ウイルスを背景として発生してくることから肝細胞癌患者では高率に HBs 抗体を既に有している可能性があり、問題点が多い。これらの重要な問題点に関しては、HBV のなかにはヒトに感染してもなかなか HBs 抗体が出来ない変異体があり、それらには共通した箇所に変異があることが知られているので、臨床に応用するにはそれらの変異体を用いれば可能になると考え、これから研究を進めて行こうと考えている。

E. 結論

ヒト肝細胞を特異的に標的とし、肝細胞癌を選択的に死滅させることが可能なナノカプセルが MPC ポリマーに HBs 抗原をエステル結合させパクリタクセルを封入させることにより開発された。さらに、

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugiura K., Ozawa S., Kitagawa Y., Ueda M., Kitajima M.: Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology Rep.* 17,557-564.(2007).
- 2) Iwasaki Y., Ueda M., Yamada T., Kondo A., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticels. *Cancer gene therapy* 14,74-81.(2007)
- 3) Nagaoka T., Fukuda T., Yoshida S., Yu Dongewi., Kuroda S., Tanizawa K., Kondo A., Ueda M., Yamada H., Tada H., Seno M.: Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human

- hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modificatgion. M. J Control Release (2007) in press.
- 4) Chiba T., Ueda M., The novel immuinosuppressant agents targeting activated lymphocytes by biocompatible MPC polymer conjugated with interleukin2. J Surgical Research 39:103-110.(2007)
 - 5) Wada M., Jinno H., Ueda M., Ikeda T., Kitajima M., Konno T., Watanabe J., Ishihara K.: Efficacy of an MPC-BMA co-polymer as a nanotransporter for paclitaxel. Anticancer Res in press
 - 6) Chiba T., Ueda M., Shimada T., Jiino H., Watanabe J., Ishihara K., Kitajima M. :Development of gene vectors for pinpoint targeting to human hepatocytes by cationically modified polymer complexes. J Surgical Research 39:23-34 (2007).
 - 7) Yagi H., Shimazu M., Kawachi S., Tanabe M., Aiura K., Wakabayashi G., Ueda M., Nakamura Y., Kitajima M.: Retrospective analysis of outcome in 63 gallbladder carcinoma patients after radical resection. J Hpetobiliary Panreat Surg 13:530-536 (2006).
 - 8) Shibata R., Mori T., Du Wenlin., Chuma M., Gotoh, M., Shimazu M., Ueda M., Hirohashi S., Sakamoto M., Overexpression of cyclase-associated protein 2 in mutlistage hepatocarcinogenesis. Human Cancer Biology, 12(18) :5363-5368 (2006).
 - 9) Suda,K., Kitagawa Y., Ozawa S., Saikawa Y., Ueda M., Ebina M., Yamada Y., Hashimoto S., Fukata S., Abraham E., Maruyama I., Kitajima M., Ishizaka A.: Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis. World J Surg 30:1755-1762 (2006)..
 - 10) Yagi H., Ueda M., Jinno H., Aiura K., Seno M., Tada H., Yamada H., Mikami S., Kitajima M., Anti-tumor effect *in vivo* model by human-derived pancreatic RNase with basic FGF insertional fusion protein through anti-angiogenic properties. Cancer Science. 97(12);1315-1320, (2006)..
 - 11) Nakamura E., Kitagawa Y., Ozawa S., Suda K., Ando N., Ueda M., Kitajima M.: Role of steroid administration to reduce inflammation after thoracotomy in a rat surgical stress model. J.Surgical Research 135,364-369. 2006.
 - 12) Muraoka M., Jung.,J., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., Fukuda H., Kuroda S., Kondo A.: Anbigody mediated specific gene and drug delivery of hepatitis B virus envelope L particles displaying IgGV-binding domain.
 - 13) Shishido T., Muraoka M., Ueda M., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S., Fukuda H., Kondo A.: Secretory production system of bionanocapsules using a stably trasfected insect cell line. Appl Microbiol Biotechnol. 73;505-511.2006.
 - 14) Otani Y., Furukawa T., Yoshida M., Saikawa Y., Wada N., Ueda M., Kubota T., Mukai M., Kameyama K., Sugino Y., Kumai K., Kitajima M.: Operative indications for relatively small (2-5cm) gastrointestinal stromal tumor of the stomach based on analysis of 60 operated cases. Surgery 139:484-492 (2006).
 - 15) Hoshimoto S., Ueda M., Jinno H., Kitajima M.: Mechanisms of growth inhibitory effect of RNase-EGF fused proteins against EGFR-overexpressing cells. Anticancer Res. 26:857-864 (2006).
 - 16) Asaga S., Ueda M., Jinno H., Ikeda T., Kitajima M.: Identification of a new breast cancer related gene by restriction landmark

- genomic scanning. Anticancer Res. 26:35-42 (2006).
- 17) Yu Dongwei, Fukuda T., Tuoya, Kuorda S., Tanizawa K., Kondo A., Ueda M., Yamada T., Tada H., Seno M.: Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system. IUBMB Life, 58(1):1-6 (2006).
- 18) Suda K., Kitagawa Y., Ozawa S., Saikawa Y., Ueda M., Abraham E., Kitajima M., Ishizaka A.: Serum concentration of high-mobility group box chromosomal protein 1 before and after exposure to the surgical stress of thoracic esophagectomy:a predictor of clinical course after surgery? Diseases of the esophagus 19,5-9 (2006).
- 19) Nakamura T., Ozawa S., Kitagawa Y., Ueda M., Kubota T., Kitajima M.: Antiangiogenic agent SU6668 suppresses the tumor growth of xenografted A431 cells. Oncology Rep. 15:79-83 (2006)
- G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）
なし

脳内デリバリー可能な中空バイオナノ粒子の創製 -膜透過ペプチド (PTD) を用いたL粒子の修飾-

分担研究者 平岡真寛 京都大学医学研究科腫瘍放射線科学・教授

分担研究者 近藤科江 京都大学医学研究科腫瘍放射線科学・COE特任助教授

本研究は、膜透過性を有する 10 個程度のポリペプチド (PTD) を用いて、脳内にデリバリー可能な中空バイオナノ粒子を構築するための基礎的技術を確立することを目的として行うものである。一昨年度、脳内にデリバリー可能な PTD の設計・構築・デリバリー能の検証を行い、中空バイオナノ粒子に付加すべき PTD の候補を決定するための研究を行った。その結果、新規に構築した PTD 配列が脳への移行効率がよいことがわかった。昨年度は、構築した PTD 配列をもった融合たんぱく質の透過性の評価について検討した。PTD 配列を付加した中空バイオナノ粒子の構築を試みたが、安定したバイオナノ粒子を構築できなかったため、PTD 付加の無い状態のバイオナノ粒子の生体内動態の情報を得るため、光イメージングを用いて観察を試みた。

A. 研究目的

腫瘍内の血管は、構造が未熟であるために、正常組織の血管からは漏れでないような大きなものも、腫瘍血管から出て行くことができる。また、腫瘍内ではリンパ管からの排出効率も低下しているため、ある一

定の大きさのものを腫瘍内にとどめておくことができる。この EPR 効果 (Enhanced Permeability and Retention) を利用してバイオナノ粒子を 100 nm 程度の大きさに調整できれば、腫瘍特異的に分布させることができる (図 1)。

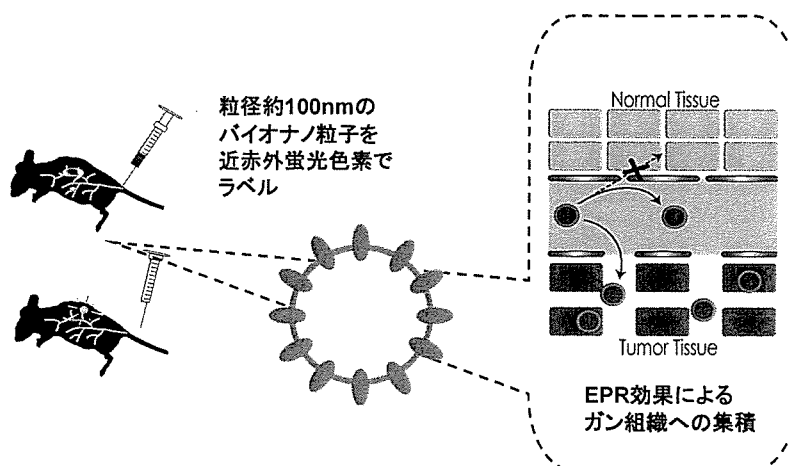


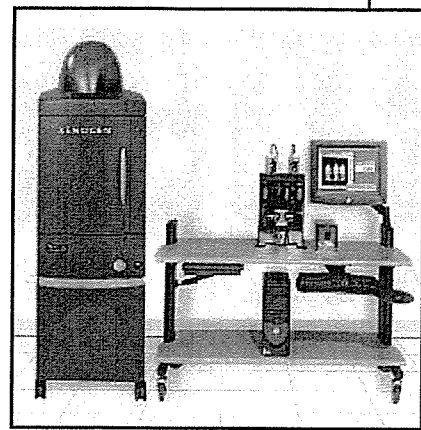
図 1 EPR 効果による腫瘍内へのバイオナノ粒子の蓄積

B. 研究方法

光イメージングによる可視化

蛍光や化学発光を観察する方法は、細胞レベルから個体レベルに適応範囲が広がりつつある。プロモーターの制御下に蛍光タンパク質 GFP や、化学発光酵素ルシフェラーゼの遺伝子を繋いだレポーターベクターを構築し、これを安定に組み込んだがん細胞株を樹立する。この細胞を移植して形成した腫瘍内でレポーター遺伝子の発現が誘導され、レポータータンパク質の蓄積が起こる。我々は、プロモーターの下流にルシフェラーゼを繋いだプラズミドを組み込んだヒトがん細胞を樹立した。これをヌードマウスに移植すると、形成した腫瘍内でルシフェラーゼタンパク質が発現され基質であるルシフェリンを投与後一定期間、発光反応を起こす。この化学発光を、冷却高感度 CCD カメラを搭載したイメージング機器 *in*

vivo imaging system (IVIS)を用いて可視化することができる (図2)。



IVIS® Imaging System 200 Series

図2 Xenogen 社 IVIS200

つまり、このシステムを用いることにより、同一担がんマウスの腫瘍の変化を定量的に、リアルタイムで、何度でも経時的に観察することが可能である (図3)。

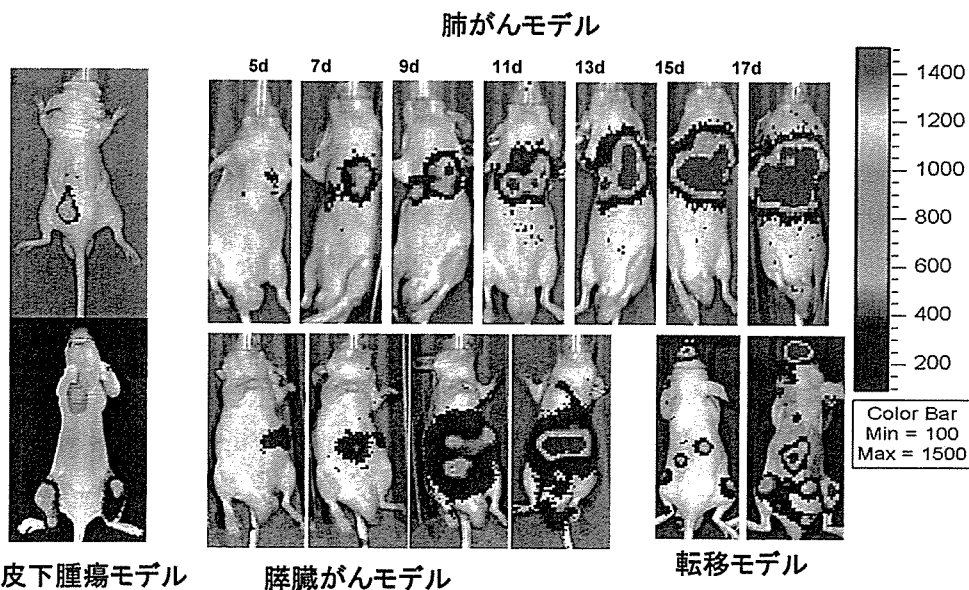


図3 ルシフェラーゼによる腫瘍の可視化

ルシフェラーゼを発現するがん細胞を移植すると、表面からは見えないような場所の腫瘍も可視化することができ、同一マウスを経時的に観察することができる。

C. 研究結果

近赤外蛍光標識をつけたリポソームを内包したバイオナノ粒子を構築して、実験

動物に投与することにより、バイオナノ粒子の生体内動態を調べる準備を行った。リ

ポソームは、投与後速やかに肝臓に集積し、8 時間後には腸に、24 時間後には、ほぼ完

全にクリアランスされて体外に排泄されることがわかった (図4)。

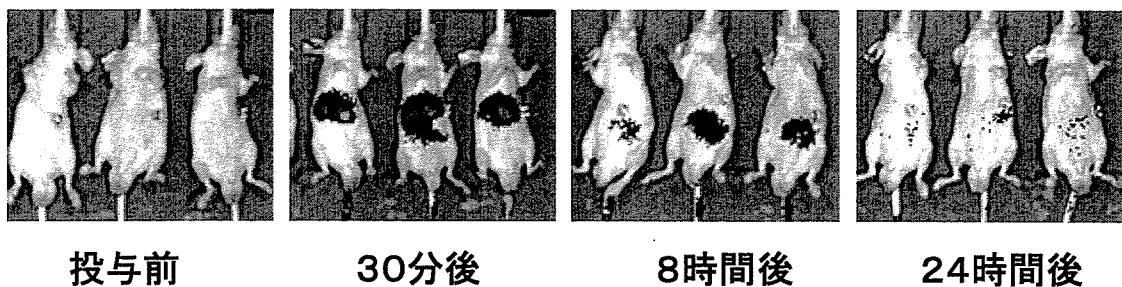


図4 イメージングによるリポソームの体内動態の解析

D. 考察

PTD アミノ酸配列は、バイオナノ粒子が、粒子を形成する上で、大きな阻害作用を有すると考えられた。今後、PTD の機能を持ちつつ、粒子形成に阻害作用を示さないようなアミノ酸配列をさがす必要がある。本研究期間中に粒子の形成における PTD 配列の影響を検討している期間が十分確保できないと考えられたため、今回は粒子の体内動態を観察することを試みた。今後は、今回得られたリポソームを内包したバイオナノ粒子の体内動態を観察することにより、今後の粒子の改良法のための情報を得ることができると考えられる。

E. 結語

肝がんへの特異性を有するバイオナノ粒子に汎用性を持たせるための PTD を融合するという目的を今回は達成することができなかった。しかし、今後 PTD アミノ酸配列を工夫することによって、この目的を達成できると期待できる。体内動態の観察は、今後の研究にとっては必須の情報になるため、引き続きイメージングにより生体内動態を観察する研究を行う予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanaka S, Kizaka-Kondoh S, Harada H, Hiraoka M. Development of a novel fluorescent imaging probe for tumor hypoxia by use of a fusion protein with oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α . Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV, Proceedings of SPIE Volume 6449, 64490Y (2007)
- 2) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564. *FEBS Lett.* 580:5718-5722 (2006)
- 3) Y Kageyama, H Sugiyama, H Ayame, A Iwai, Y Fujii, L Eric Huang, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. and Kihara K. Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells using pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element. *Acta Oncologica.* 45(3):317-324 (2006)
- 4) Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M.

- Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer*;13(1):16-26. (2006)
- 5) Oka S, Masutani H, Liu W, Horita H, Wang D, Kizaka-Kondoh S, Yodoi J. Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2)-like inducible membrane protein (TLIMP) is a novel Vitamin D3- and PPAR- γ ligand target protein that regulates PPAR- γ signal. *Endocrinology*. 147(2):733-743 (2006).
 - 6) Aoki T., Takahashi J., Ueba T., Oya N., Hiraoka M., Matsui K., Fukui T., Nakashima Y., Ishikawa M., Hashimoto.: Phase II study of nimustine, carboplatin, vincristine, and interferon- β with radiotherapy for glioblastoma multiforme: experience of the Kyoto Neuro-Oncology Group., *J Neurosurg.*, 105(3): 385-91 (2006)
 - 7) Fujino M., Shirato H., Onishi H., Kawamura H., Takayama K., Koto M., Onimaru R., Nagata Y., Hiraoka M.: Characteristics of patients who developed radiation pneumonitis requiring steroid therapy after stereotactic irradiation for lung tumors., *Cancer J.*, 12(1): 41-6, 2006
 - 8) Hiraoka M., Matsuo Y., Nagata Y.: Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early-stage lung cancer., *Cancer Radiother*, 2006.
 - 9) Kamino Y., Takayama K., Kokubo M., Narita Y., Hirai E., Kawawda N., Mizowaki T., Nagata Y., Nishidai T., Hiraoka M.: Development of a four-dimensional image-guided radiotherapy system with a gimbaled X-ray head., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 66(1):271-8, 2006
 - 10) Kawashita M., Domi S., Saito Y., Aoki M., Ebisawa Y., Kokudo T., Saito T., Takano M., Araki N., Hiraoka M: In vitro heat generation by ferrimagnetic maghemite microspheres for hyperthermic treatment of cancer under an alternating magnetic field., Submitted to *Biomaterials*, 2006
 - 11) Kawashita M., Sadaoka K., Kokubo T., Saito T., Takano M., Araki N., Hiraoka M.: Enzymatic preparation of hollow magnetite microspheres for hyperthermic treatment of cancer., *J Mater Sci Mater Med.*, 17(7): 605-10, 2006
 - 12) Kawashita M., Takayama T., Kokubo T., Takaoka G.G., Araki N., Hiraoka M.: Enzymatic Preparation of Hollow Yttrium Oxide Microspheres for In Situ Radiotherapy of Deep-Seated Cancer., *J.Am. Ceram. Soc.*, 89(4): 1347-51, 2006
 - 13) Kazawa, N., Kitaichi, M., Hiraoka, M., Togashi, K., Mio, N., Mishima, M., Wada, H.: Small cell lung carcinoma: Eight types of extension and spread on computed tomography., *J Comput Assist Tomogr*, 30(4): 653-61, 2006
 - 14) Kosaka Y., Mitsumori M., Araki N., Yamauchi C., Nagata Y., Hiraoka M., Kodama H.: Avascular necrosis of bilateral femoral head as a result of long-term steroid administration for radiation pneumonitis after tangential irradiation of the breast., *Int J Clin Oncol.*, 11(6): 482-6., 2006
 - 15) Kubo T., Shibata T., Itoh K., Maetani Y., Isoda H., Hiraoka M., Egawa H., Tanaka K., Togashi K.: Outcome of percutaneous transhepatic venoplasty for hepatic venous outflow obstruction after living donor liver

- transplantation., *Radiology*, 239(1): 285-90 (2006)
- 16) Mitsumori M., Sasaki Y., Mizowaki T., Takayama K., Nagata Y., Hiraoka M., Negoro Y., Sasai K., Kinoshita H., Kamoto T., Ogawa O.: Results of radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy for stage III prostate cancer: comparison of two different definitions of PSA failure., *Int J Clin Oncol.*, 11(5): 396-402 (2006)
 - 17) Narabayashi M., Mitsumori M., Araki N., Yamauchi C., Kawamura S., Sakamoto T., Tachiiri S., Oya N., Nagata Y., Hiraoka M., Mise K., Kodama H.: A Case of Metachronous Bilateral Breast Cancer with Bilateral Radiation Pneumonitis After Breast-conserving Therapy., *Breast Cancer*, 13(3): 313-6 (2006)
 - 18) Nishio T., Kunieda E., Shirato H., Ishikura S., Onishi H., Tateoka K., Hiraoka M., Narita Y., Ikeda M., Goka T.: Dosimetric verification in participating institutions in a stereotactic body radiotherapy trial for stage I non-small cell lung cancer: Japan clinical oncology group trial (JCOG0403)., *Phys Med Biol.*, 51(21): 5409-17 (2006)
 - 19) Okada T., Miki Y., Fushimi Y., Hanakawa T., Kanagaki M., Yamamoto A., Urayama S., Fukuyama H., Hiraoka M., Togashi K.: Diffusion-tensor fiber tractography: intraindividual comparison of 3.0-T and 1.5-T MR imaging., *Radiology*, 238(2): 668-78 (2006)
 - 20) Oya N., Sasai K., Tachiiri S., Sakamoto T., Nagata Y., Okada T., Yano S., Ishikawa T., Uchiyama T., Hiraoka M.: Influence of radiation dose rate and lung dose on interstitial pneumonitis after fractionated total body irradiation: acute parotitis may predict interstitial pneumonitis., *Int J Hematol.*, 83(1): 86-91 (2006)
 - 21) Oya N., Shibuya K., Sakamoto T., Mizowaki T., Doi R., Fujimoto K., Imamura M., Nagata Y., Hiraoka M.: Chemoradiotherapy in patients with pancreatic carcinoma: phase-I study with a fixed radiation dose and escalating doses of weekly gemcitabine., *Pancreatology*, 6(1-2): 109-16 (2006)
 - 22) Saga T., Kawashima H., Araki N., Takahashi J. A., Nakashima Y., Higashi T., Oya N., Mukai T., Hojo M., Hashimoto N., Manabe T., Hiraoka M., Togashi K.: Evaluation of primary brain tumors with FLT-PET: usefulness and limitations., *Clin Nucl Med.*, 31(12): 774-80.(2006)
 - 23) Sakamoto M., Oya N., Mizowaki T., Araki N., Nagata Y., Takayama K., Takahashi J. A., Kano H., Katsuki T., Hashimoto N., Hiraoka M.: Initial experiences of palliative stereotactic radiosurgery for recurrent brain lymphomas., *J Neurooncol.*, 77(1): 53-8 (2006)
 - 24) Shibata T., Shibata T., Maetani Y., Isoda H., Hiraoka M.: Radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma: prospective comparison of internally cooled electrode and expandable electrode., *Radiology*, 238(1): 346-53 (2006)
 - 25) Tachiiri S., Katagiri T., Tsunoda T., Oya N., Hiraoka M., Nakamura Y.: Analysis of gene-expression profiles after gamma irradiation of normal human fibroblasts., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64(1): 272-9 (2006)
 - 26) Yoshimura K., Kamoto T., Nakamura E., Segawa T., Kamba T., Takahashi T.,