

厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)
分担研究報告

半導体などナノ粒子による生物・医療応用

量子ドットを利用した硝子体可視化の試み

分担研究者 山本 悟 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科・部長代行

協力研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・副所長

協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者 真鍋 義則 国立国際医療センター研究所・研究生

協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生

研究要旨

本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾したものを透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能なようにするものであり、これによって安全で簡易な硝子体手術も可能となる。これらにより硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することを目指す。

A. 研究目的

近年、多くの眼疾患が硝子体の病理学的及び／又は生理学的変化と関連していることが知られてきている。たとえば、加齢による硝子体の液化融解（liquefaction）は網膜剥離や網膜裂傷（retinal tear）を誘導し、また黄斑浮腫（macular edema）は黄斑（macula）への硝子体牽引（traction）に関連し、それぞれを原因として重症例、進行例では失明をもたらす。

そのため、硝子体内の混濁状態や病変の有無を観察することは重要である。し

かし、硝子体は透明なゲル上物質から構成されるため、硝子体内の観察は困難であり、日常的な臨床的状況で透明な硝子体を観察するための適切な方法はない。

更に、硝子体の手術においても透明なゲルを対象とするため視認性の高い組織の手術に較べると難しく、また、手術によるリスクも高い。

以上のことから日常的な診断及び／又は手術において、眼の硝子体を簡便に安全に観察し得る手段及び方法を提供することを目的とする。

B. 研究方法

ナノ粒子を摘出豚眼内に27Gの注射針にて注入し、日常外来で使用する細隙灯顕微鏡で観察する。

他の染色材料も同様に注入して比較検討を行なう。

また、硝子体手術を豚眼にてシュミレーションし、注入したナノ粒子で染色された豚眼と、その他の染料にて染色された豚眼における手術の簡易性・安全性を比較検討する。

C. 研究結果

他の染料に較べ、ナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得る。

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

○1) 欧文

Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kouki Fujioka, Akiyoshi Hoshino, and Kenji Yamamoto IEEE Transactions on Nanobioscience. Vol. 6, No. 1 March 2007

2. 著書

なし

3. 学会発表

1) 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.).

2) N. Manabe, S. Yamamoto, Kouki, Fujioka, A. Hoshino, K. Yamamoto, Imaging Transparent Vitreous of The Eye Using Nano Particles. Particle 2008 (May 2008, Orlando, Florida, 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)

2) 国内学会

1) 「量子ドットの一つの医療応用」
山本悟1)、星野昭義2)、真鍋法義2)、
山本健二2)

1) 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院、2) 国立国際医療センター
ナノ学会第4回大会
京都大学百周年時計台記念館
平成18年5月19日

2) 「水溶性量子ドットを用いた

硝子体病変の視覚化」

真鍋法義, 山本悟, 藤岡宏樹,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

第15回日本バイオイメーシング
学会学術集会

岩手医科大学60周年記念館

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,

星野昭芳, 山本健二

(国立国際医療センター研,

横浜栄共済病院, 東京医歯大院)

第127回日本薬学会

富山

平成17年3月15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

総括

表面加工および表面修飾した量子ドットを豚眼の透明な眼球硝子体腔に入れることによって量子ドットが持つ蛍光で硝子体を染色し、硝子体の詳細を観察可能にする実験を行ってきた。

これによりナノ粒子によって染色された硝子体の観察は容易であり、詳細を観察し得ることが判明した。

また、量子ドットを注入した豚眼を使用して硝子体手術を試みたところ、量子ドットで染色された硝子体の切除は簡易で、かつ安全性が高いことも判明した。

以上のことから日常臨床における硝子体の診断において、眼の硝子体を容易に観察し得る方法と硝子体手術に関しては簡易で安全性の高い手術法を提供することができるのではないかと考えられた。

また、硝子体が引き起す眼疾患の病理の解明や治療法の進歩に貢献することも期待される。

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究)
分担研究報告

ナノデリバリーシステム構築による核酸医薬の選択的輸送

分担研究者 落谷 孝広 国立がんセンター研究所・がん転移研究室・室長
協力研究者 竹下 文隆 国立がんセンター研究所・がん転移研究室・研究員
協力研究者 外岩戸尚美 国立がんセンター研究所・がん転移研究室・レジデント

研究要旨

アテロコラーゲンを構成するペプチド鎖にどのアミノ酸がいくつ含まれるかを検討した。アテロコラーゲンを化学修飾する場合の標的としては、一般的にリジン、あるいはアルギニンの様にアミノ酸側鎖にアミノ基を有するアミノ酸が標的となるからである。その結果、アテロコラーゲンを構成する3本のポリペプチド内にリジン、アルギニンは複数箇所存在することがわかった。次にアミノ基指向性の試薬を用いて化学修飾を試みた場合、アテロコラーゲン一分子あたり8から10分子結合したところで反応が停止することが判明した。この結果は、アテロコラーゲン分子においては、化学修飾できるような外側に側鎖を突き出したようなアミノ酸はごくわずかであることを示した。

ポリオーマウイルス属のSV40をベースにしたデリバリーシステムの開発をめざして、ヒトの悪性腫瘍の85%以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み込んだベクターを開発した。このベクターは、*in vitro*の培養細胞への導入実験においては、複数のヒトがん細胞株のうち、乳がん細胞(MCF7)においてのみ、高度に働くことが判明した。

A. 研究目的

本研究は、ナノ粒子を用いた薬物や遺伝子の伝達システムの開発を目的としている。具体的には、成体親和性物質であるアテロコラーゲンや人工ウイルス粒子等のナノ粒子をモチーフに、がん細胞だけを攻撃するがん治療用アクティブ・ターゲティング（能動的標的指向性）機能を有するナノ粒子による核酸医薬デリバリーシステムの構築を検討する。

従来のアテロコラーゲンナノ粒子に特定のアミノ基や糖鎖を付加した形態の核酸医薬複合体を作製し、がん細胞への

指向性を検討する。さらにウイルスの細胞内侵入機能を巧みに利用したキャリアベクターとして、ポリオーマウイルス属のSV40をベースにしたデリバリーシステムの開発を行っており、ヒトの悪性腫瘍の85%以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み入れる等の工夫をして、がん細胞にアクティブ・ターゲティング可能なナノ粒子の開発を試みる計画である。

B. 研究方法

1) アテロコラーゲンの修飾

本研究に用いるアテロコラーゲンは、TYPE-I コラーゲンから精製された抗原性の無い生体親和性材料であり、すでにアテロコラーゲンと核酸医薬は、静電的に結合し、直径100ナノメートル以下のナノサイズの粒子を形成することが明らかとなった。このナノ粒子である核酸とアテロコラーゲンの複合体は、細胞に取り込まれるとともに、内包された核酸医薬がその遺伝子発現抑制効果を発揮することになる。このナノ粒子は、核酸医薬を生体内のヌクレアーゼによる分解から保護する効果があるため、生体内でその効果を発揮し、核酸医薬を安定化させ、その効果を持続させる。したがって、siRNA や microRNA などの核酸医薬を生体内の腫瘍に効率よくデリバリーし、腫瘍を抑制するのに役立つ。しかし、そのデリバリーは、がん細胞、がん組織のみならず、正常の臓器にも及ぶため、予期せぬ副作用の出現が危惧される。現在までの観察では、アテロコラーゲンと核酸のナノ粒子は、動物への全身性投与直後は正常臓器に比べて、およそ1.7—2倍の量の核酸医薬をがん組織にデリバリーする能力があり、また投与後1週間後では、がん部には十分量の核酸が残存しているのに対し、正常部からは、そのほとんどが消失していることが判明している。これはアテロコラーゲンが、ある程度のがん部への選択性を示す証拠であるが、より高い安全性を確保するためには、積極的ながん組織へのデリバリーの特性を付与する必要がある。そのためには、アテロコラーゲン分子を科学修飾することで、例えばがん細胞に特異的に発現する分子に対する抗体やペプチドを用いた標的指向性を持たせる工夫を試みた。

また、ウイルスの細胞内侵入機能を巧みに利用したキャリアベクターとして、ポリオーマウイルス属のSV40をベースにしたデリバリーシステムの開発を行う。

C. 研究結果

まず、アテロコラーゲンを構成するペプチド鎖にどのアミノ酸がいくつ含まれるかを検討した。アテロコラーゲンを化学修飾する場合の標的としては、一般的にリジン、あるいはアルギニンの様にアミノ酸側鎖にアミノ基を有するアミノ酸が標的となるからである。その結果、アテロコラーゲンを構成する3本のポリペプチド内にリジン、アルギニンは複数箇所存在することがわかった。次にアミノ基指向性の試薬を用いて化学修飾を試みた場合、アテロコラーゲン1分子あたり8から10分子結合したところで反応が停止することが判明した。この結果は、アテロコラーゲン分子においては、化学修飾できるような外側に側鎖を突き出したようなアミノ酸はごくわずかであることを示している。

ポリオーマウイルス属のSV40をベースにしたデリバリーシステムの開発をめざして、ヒトの悪性腫瘍の85%以上で活性を示すテロメラーゼのプロモーターを組み込んだベクターを開発した。このベクターは、*in vitro* の培養細胞への導入実験においては、複数のヒトがん細胞株のうち、乳がん細胞(MCF7)においてのみ、高度に働くことが判明した。このベクターをウイルス用の粒子にしたり、あるいはアテロコラーゲンに複合体を形成させることで、がん細胞にアクティブ・ターゲティング可能なナノ粒子の開発を試みる計画である。

本研究におけるアテロコラーゲン・ナノ粒子や人工ウイルスベクターの研究成果により、直接的に副作用の軽減、治療効果の向上、疾病治療にあたってQOLの向上を実現できることを期待している。

D. 考察

1) 達成度について

がん細胞だけを攻撃するがん治療用アクティブ・ターゲティング（能動的標的指向性）機能を有する基礎的な情報の入手や、ツールの基盤を構築することに成功した。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

アテロコラーゲン・ナノ粒子によるsiRNAあるいはmicroRNAなどの核酸医薬のデリバリー技術は、独創性の高い研究であり、世界中から注目を浴びている。すでに分担研究者らはヒト前立腺がん細胞の骨転移の動物モデルを用いて、このアテロコラーゲン・ナノ粒子が、siRNAを転移巣に有効にデリバリーし、治療効果を発揮することを報告している。本研究によって、がん細胞への標的指向性を高めることが出来れば、核酸医薬によるがん治療がより現実化する可能性があり、国際的、社会的貢献度は大きい。

E. 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

(欧文)

1. Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraiishi M, Kashimoto N,

Myojin Y, Kamiya K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 354:841-845, 2007

2. Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, *Eif2c2 (Ago2)*, is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, 89:687-696, 2007

3. 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 human hepatocytes. *Hepatology*, 46:219-228, 2007

4. ○Honma K, Miyata T, Ochiya T. Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 7, 2007

5. Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. *Dev Dyn*, 236:3228-3241, 2007

6. ○Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology*. In press

7. Yamamoto Y, Banas A, Kato T, Ochiya T. Plasticity of adult stem cells into liver. *Curr.Res. in Hepatology* 1:1-18, 2007.

(和文)

○Honma K, Takeshita F, Ochiya T. Application of atelocollagen-mediated siRNA delivery for RNAi therapies. *Yakugaku Zasshi*. 127:807-812, 2007.

2. 総説・(欧文と和文、分けて下さい)
(欧文)

○Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated drug discovery technology. *Expert Opin Drug Discov*, 2:159-167, 2007

3. 著書・(欧文と和文、分けて下さい)

4. 学会発表

(海外)

1) Ochiya T, Hokaiwado N, Takeshita F,

- Nagahara S. "Optical imaging of RNAi Therapy" SPIE Photonics West 2008 Biomedical Optics Meeting. (Jan. 21-22, 2008 San Jose, CA, USA.) invited
- 2) Yamamoto Y, Kosaka N, Kato T, Ochiya T. "MicroRNA expression profile to define mouse liver development" 2007 Keystone symposia-MicroRNA and Cancer. (Jun. 10, 2007 Colorado USA.)
 - 3) Banas A, Yamamoto Y, Kato N, Yamada Y, Suzuki S, Enosawa S, Ochiya T. "CYP's metabolizing activities in hepatocytes generated in vitro from human adipose tissue-derived stem cells" The 8 th International ISSX Meeting. (Oct. 9-12, 2007 Sendai, Japan)
 - 4) Ochiya T. "RNAi-based anti-cancer strategy" 1st International Conference on Drug Design & Discovery. (Feb. 3-6, 2008 Dubai, UAE) invited
 - 5) Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. 12th Annual Fall Symposium of Korean Cancer Association. (Nov. 9. 2007 Seoul, Korea) invited
 - 6) Takeshita F, Ochiya T. "MicroRNA therapy for inhibition of bone metastatic human prostate tumor cells." 2008 Keystone symposium. (Mar. 25-30, 2008 British Columbia, Canada) invited
 - 7) Banas A, Yamamoto Y, Tokuhara M, Teratani T, Okochi H, Ochiya T. "Adipose tissue-derived stem cells as a source of hepatocytes. Genetic and functional studies" 7th International Federation of Adipose Therapeutics and Science. (Oct. 18-20, 2007 Indianapolis, USA.)
- (国内)
- 1) 光イメージングによるがんの RNAi 治療法の開発、落谷孝広(シンポジウム)、第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 2) がんの分子標的治療モデルにおける分子イメージングの実際、落谷孝広、第 2 回日本分子イメージング学会学術大会 (2007.6.28-29 福井)
 - 3) Efficacy of RNAi-based molecular target therapy against metastatic human breast cancer cells. Fumitaka Takeshita, Agnieszka Banas, Naomi Hokaiwado, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 4) MicroRNA therapy against bone metastasis of prostate cancer. Naomi Hokaiwado, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 5) MicroRNA involvement in liver development and hepatocarcinoma. Yusuke Yamamoto, Fumiaki Koizumi, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 6) Genome-wide DNA methylation analysis of cancers. Izuho Hatada, Akira Sakurada, Masami Sato, Takashi Kondo, Akira Horii, Yusuke Yamamoto, Takahiro Ochiya, Riu Yamashita, Kenta Nakai, Katsumi Nakanishi, Ryo Matoba, Kenichi Matsubara 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 7) RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Teruhiko Yoshida, Kasuto Nishio, Shunji Nagahara, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 8) Presence of multiple mechanisms in lymph node metastasis of esophageal cancers. Masayuki Sano, Fumitaka Takeshita, Kazuhiko Aoyagi, Yukihiko Nakanishi, Takahiro Ochiya, Yuji Nimura, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 9) Establishment and Maintenance of Rat Embryonic Stem Cell. Shinobu Ueda, Takumi Teratani, Hiroyuki Tsuda, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 10) Cancer Patients' Own Adipose Tissue Mesenchymal Stem Cells as a source for stem cell-based therapy for the liver cancer. Agnieszka Banas, Yusuke Yamamoto, Makoto Tokuhara, Takumi Teratani, Takahiro Ochiya 第 6 6 回日本癌学会学術総会 (2007.10.3-5 横浜)
 - 11) A novel culture technology utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata useful for regulating cell behavior. Toshiaki Takezawa, Tomoyo Takeuchi, Kana Yanagihara, Satoshi Terada, Takahiro Ochiya 第 6 回国際動物実験代替法会議 (2007.8.21-25 東京)
 - 12) RNA 干渉による発がんの分子標的の同定と治療への応用、落谷孝広(シンポジウム)、第 3 0 回日本分子生物学会年会・第 8 0 回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
 - 13) 合成 microRNA 導入によるヒト転移性前

- 立腺がん細胞における機能解析、竹下文隆、外岩戸尚美、本間紀美、落谷孝広、第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 14) 薬剤抵抗性獲得に関与する microRNA の探索、外岩戸尚美、竹下文隆、山本雄介、箕浦加穂、田谷敏貴、本間紀美、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 15) マウス肝臓発生と肝がん形成に関わる microRNA の同定、山本雄介、田中稔、宮島篤、小泉史明、金井弥栄、加藤尚志、落谷孝広 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会 (2007.12.11-15 横浜)
- 16) siRNA による放射線感受性増強、落谷孝広 (シンポジウム)、第37回放射線による制癌シンポジウム (2007.7.20 つくば)
- 17) 画像イメージングと毒性病理学の接点、落谷孝広 (ワークショップ)、第24回日本毒性病理学会学術集会 (2007.2.6-7 名古屋)
- 18) RNAi 創薬とがん治療、落谷孝広 (ワークショップ)、第145回日本獣医学会 (2008.3.30)
- 19) バイオフォトニクスと Non-coding small RNA の融合がもたらすがん研究の革新、落谷孝広、バイオフォトニクス技術研究会 (2007.12.7 神戸)
- 20) がん治療戦略における RNAi 創薬の意義、落谷孝広 (シンポジウム)、ゲノム創薬フォーラム第10回シンポジウム (2008.11.7 東京)
- 21) 再生肝由来の切片担体を利用して ES 細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術とその創薬研究への応用構想、竹内朋代、寺谷工、落谷孝広、竹澤俊明、日本薬学会第128年会 (2008.3.26-28 横浜)

H. 知的所有権の出願・取得状況
なし

循環器疾患に対する遺伝子治療用ベクターの開発

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

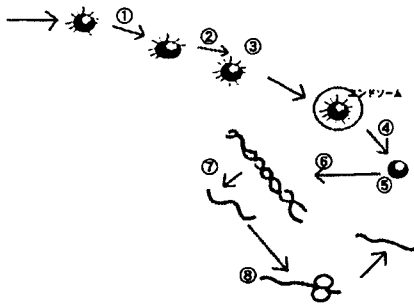
本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を搭載した遺伝子導入ベクターを開発し、*in vitro* および *in vivo* において、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターを開発すること、さらに、循環器疾患モデル動物を用いて治療実験を行い、遺伝子治療の臨床応用の基礎とすることである。我々は、ポリカチオンとポリエチレングリコール(PEG)のブロック共重合体を用いて、DNA と会合させると、DNA を内包して PEG が外殻を覆う core-shell 構造を形成し、DNA を外部環境より守ることを見出していた。本研究において、我々は、ブロック共重合体を改良し、*in vivo* において著明な遺伝子発現が可能で、安全性が高い遺伝子導入ベクターの開発に成功した。カチオン性ポリマー部分に、緩衝能を有するポリマー PAsp(DET) を選択し、気管内投与による肺での著明な遺伝子発現増強に成功した。また、遺伝子導入後の肺組織の病理学的所見および炎症性サイトカインの遺伝子発現が、従来のポリマーに比べて非常に低く、安全性の面でも優れていることがわかった。さらに、PEG-PAsp(DET) を用いて、肺高血圧症モデルラットにアドレノメデュリンの遺伝子を気管内投与し、右室圧の低下および生存率改善という治療効果を認めた。本研究の成果により、臨床応用への道が開けたと言える。

A. 研究目的

遺伝子治療は、外来遺伝子を *in vivo* で発現させて治療効果を得る必要がある。外来遺伝子を *in vivo* で発現させるためには、いくつかのステップが考えられる。図 1 に外来遺伝子の発現までの道のりを示す。まず、投与した遺伝子が intact な形で標的細胞へ到達するステップ(図 1 の①)、標的細胞の表面に接着するステップ(図 1 の②)、細胞内に取り込まれるステップ(図 1 の③)、エンドソームから細胞質への遊離のステップ(図 1 の④)、細胞質から核への移行のステップ(図 1 の⑤)、核膜の通過のステップ(図 1 の⑥)、遺伝子の転写のステップ(図 1 の⑦)、遺伝子の翻訳のステップ(図 1 の⑧) などである。ウィルスは、これらのステップをクリアする機能を有しており、感染が成立する。合成ベクターを用いて遺伝子導入を可能にするために、ベクターに仕組みを搭載する必要がある。

我々は、片岡らとの共同研究で、*in vivo* 遺伝子導入のためのベクターの開発を行っ

ており、ポリエチレングリコール(PEG)とポリ L リジンのブロック共重合体を用いて、DNA との複合体を作製し、ポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルという core shell 構造のミセルができる。この PIC ミセルが血中で 6 時間以上という長時間、DNA を安定に存在し得ること、*in vitro* および *in vivo* で遺伝子発現が可能であることを既に報告した。今回、我々は、ポリマー部分に緩衝能を有する PAsp(DET) を用いて、経肺投与による遺伝子導入を行い、*in vivo* における著明な遺伝子発現効率を認めた。さらに、循環器疾患のモデル動物である原発性肺動脈性肺高血圧症モデルラットに対して、アドレノメデュリン遺伝子導入により、治療効果を認めた。また、遺伝子導入後の肺において、炎症性サイトカイン遺伝子の発現が低いことも確かめられ、遺伝子治療の臨床応用にまた一歩近づいたと考えられる。



- ① 標的細胞へのターゲット
- ② 細胞表面に付着
- ③ 細胞内への取り込み
- ④ 細胞質への離脱
- ⑤ キャリヤーからの離脱
- ⑥ 核移行
- ⑦ 転写
- ⑧ 翻訳

図1 外来遺伝子の発現までの道のり

B. 研究方法

1. 遺伝子導入ベクターの作製

片岡らの作製による、PEG(MW=12,000)と PAsp(DET) (polyaminoethylene aminopropyl aspartamide)のブロック共重合体を遺伝子導入ベクターとして用いた。

2. in vivo 遺伝子導入実験

in vivo 遺伝子導入は、PEG-PAsp(DET)とリポーター遺伝子、あるいは治療遺伝子の発現ベクターを用いて DNA コンプレックスを作製した。経肺遺伝子導入は、マウスあるいはラット気管切開の後、気管内投与器具を用いて気管内投与を行い、一定時間後に肺組織をホモゲナイズした。ルシフェラーゼ活性測定は、蛋白質定量後、活性を RLU/mg prot で表した。

3. 原発性肺動脈性肺高血圧症モデルラットの作製

Wister ラットにモノクロタリンを皮下注射し、4 週間放置して、肺動脈性肺高血圧症モデル動物を作製した。

4. モデル動物に対する治療実験

肺動脈性肺高血圧症モデルラットに対して、アドレノメデュリン遺伝子を PEG-PAsp(DET)を用いて気管内投与を行い、右室圧の変化をカテーテルを用いて測定し

た。

5. 遺伝子発現の定量

肺での遺伝子発現は、肺組織から mRNA を精製し、real time RT-PCR を用いて定量した。

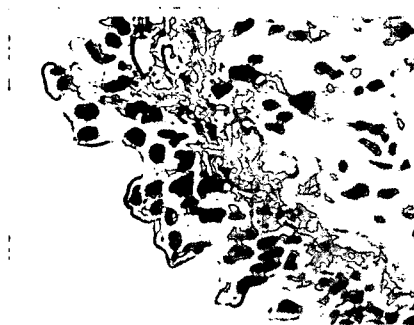
6. 毒性試験

DNA コンプレックスを気管内投与後、肺を取り出して、組織学的変化を観察した。

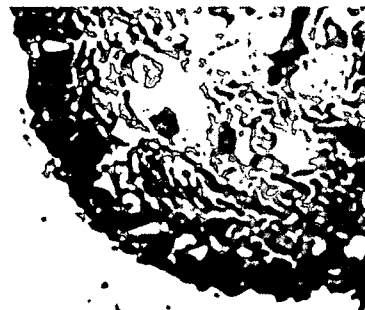
C. 研究結果

(1) in vivo 遺伝子導入実験

PEG-PAsp(DET)を用いて気管内投与による遺伝子導入効果を評価するため、ルシフェラーゼ遺伝子を導入し、気管上皮への遺伝子導入を免疫染色法にて検出した。



(A) Saline+Luciferase



(B) PEG-PAsp(DET)+Luciferase

図2 経肺投与による遺伝子導入

PEG-PAsp(DET)を用いてルシフェラーゼ遺伝子を導入した気管上皮は、抗体に強く染色しているのがわかった。

(2) 肺高血圧症モデル動物に対するアドレノメデュリン遺伝子導入の効果の評価

モノクローリン投与後 4 週間で、ラットの右室圧は、70-90 mmHg に上昇し、肺動脈性肺高血圧症のモデルが完成していることを確認した。さらに、PEG-PAsp(DET)+アドレノメデュリン、生理食塩液+ルシフェラーゼ、PEG-PAsp(DET)+ルシフェラーゼ、Exgen(linear PEI)+アドレノメデュリンの経肺投与を行った。前の右室圧に比べて、投与 3 日後において、右室圧は、PEG-PAsp(DET)+アドレノメデュリンを投与した群のみ、有意な低下を認めた(図 3)。

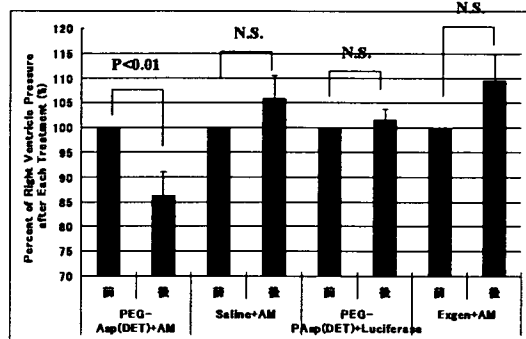


図 3 遺伝子導入前後の右室圧の変化

(3) 遺伝子導入後の肺における炎症性サイトカイン遺伝子発現

遺伝子導入後の肺における TNF- α 遺伝子発現を図 4 に示す。現在市販されている遺伝子導入試薬である Exgen を用いると、TNF- α は上昇するのに比し、PEG-PAsp(DET)を用いた遺伝子導入後には、発現の上昇を認めなかった。これらのことから、PEG-PAsp(DET)を用いた遺伝子導入法は、安全であることが示唆された。

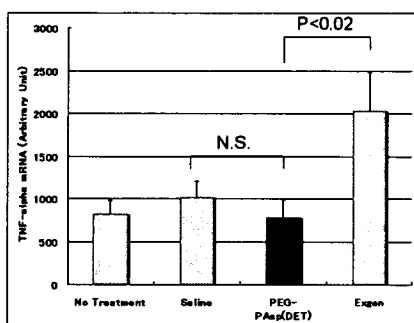


図 4. 経肺遺伝子導入後の肺における TNF- α 遺伝子発現

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-PAsp(DET)の開発で、以前のものに比べて格段に発現効率が改善されたベクターが開発されたと言える。また、従来のものに比べて安全性が高く、遺伝子導入ベクターの開発の世界でも、画期的な進歩であると言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

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

今回、PEG-PAsp(DET)という、*in vivo*での遺伝子発現効率が、著明な改善をみとめることができ、疾患モデル動物において、治療効果を認めた。また、安全性も確認され、臨床応用にむけて、大きなブレークスルーがなされたといえる。

3) 今後の展望について

さらに遺伝子発現量、発現期間の改善とともに、安全性の確保が重要な課題となってくる。

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く、安全性に富む遺伝子導入ベクターの開発に成功した。

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

(欧文)

1.) 斯波真理子: 家族性高コレステロール血症患者に対するロスバスタチンの使用経

験
Progress in Medicine. 2007; 27(9) 2153-2157

2.) Ichi I, Takashima Y, Adachi N, Nakahara K, Kamikawa C, Harada-Shiba M, Kojo S, "Effects of Dietary Cholesterol on Tissue Ceramides and Oxidation Products of Apolipoprotein B-100 in ApoE-Deficient Mice"

Lipids. 2007; 42(10) 893-900

3) Jo J, Nagaya N, Miyahata Y, Kataoka M, Harada-shiba M, Kangawa K, Tabata Y, "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. 2007; 13(2) 313-322

(和文) なし

2. 総説 (欧文なし)

1) 斯波真理子 「autosomal recessive hypercholesterolemia (ARH) の1症例」
治療学 vol.41 no.9 2007

2) 斯波真理子、榎野久士 「家族性高コレステロール血症の治療—LDL アフェレーション」
medicina Vol.44 No.8 別冊 1532-35 2007-8

3) 斯波真理子、杉沢貴子 「実地医家が知っておくべき基礎知識と臨床的意義 LDL/LDL受容体」
Medical Practice Vol.24 no.7 別冊 1173-77

2007

4) 斯波真理子、南雲彩子 「動脈硬化の危険因子としての脂質異常症」

医学のあゆみ Vol.221 No.13
2007-6-30

5) 斯波真理子、南雲彩子 「脂質代謝異常—高脂血症・低脂血症—」(家族性高コレステロール血症)
日本臨床 65巻 増刊号7 2007 別冊

6) 斯波真理子 「脂質代謝異常—高脂血症・低脂血症—」(遺伝子治療)

日本臨床 65巻 増刊号7 2007 別冊

3. 著書

なし

学会発表

(国内)

Harada-Shiba Mariko

Effect of Adrenomedullin gene transfer using PEG-PAsp(DET) in a model animal of pulmonary arterial hypertension.

第71回日本循環器学会総会・学術集会、
2007年3月、神戸

大平望都、西山伸宏、宮田完二郎、石井武彦、片岡一則、斯波真理子、PEG-PAsp(DET)を用いた in vivo 遺伝子導入の効果と毒性について
遺伝子・デリバリー研究会第7回シンポジウム、ポスター発表、2007年5月、東京

Harada-Shiba Mariko,

Non-viral gene delivery ~Towards clinical application~

第13回日本遺伝子治療学会総会 教育講演、2007年6月、名古屋

斯波真理子、杉沢貴子、榎野久士、宮本恵宏、太田直孝、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ヘテロ接合体における若年心筋梗塞例の特徴
第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム、2007年7月

安部映里、大平望都、高木敦子、神野桂子、

前田律子、菫澤貴子、斯波真理子、
ARH 過剰発現マウスの解析
第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
一般講演、2007 年 7 月

杉沢貴子、斯波真理子、槇野久士、吉政康直、及川眞一、友池仁暢、
家族性高コレステロール血症 (FH) の冠動脈疾患危険因子の解析
第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
一般講演、2007 年 7 月

太田直孝、斯波真理子、宮本恵宏、槇野久士、吉政康直、友池仁暢
LDL 受容体遺伝子異常と家族性高コレステロール血症(FH)の病態
第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
一般講演、2007 年 7 月

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 アフェレシス療法により除去されるリポ蛋白分画とその推移の検討
第 39 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、
一般講演、2007 年 7 月

斯波真理子、槇野久士、中濱肇、南雲彩子、杉沢貴子、山本章、吉政康直、友池仁暢、
家族性高コレステロール血症(FH)の病態と LDL アフェレシス治療の効果
第 28 回日本アフェレシス学会学術大会、ランチョンセミナー、2007 年 11 月、久留米

Mariko Harada-Shiba, Takako Sugisawa, Yoshihiro Miyamoto, Hisashi Makino, Ayako Nagumo, Motoo Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike
Has statin delayed the first event of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia (FH)?
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会、
2008 年 3 月、口頭発表

Ayako Nagumo, Mariko Harada-Shiba, Hisashi Makino, Takako Sugisawa, Hajime Nakahama, Yasunao Yoshimasa, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike
A discontinuation of LDL apheresis deteriorates prognosis of heterozygous familial hypercholesterolemia (FH)

第 72 回日本循環器学会総会・学術集会、
2008 年 3 月、ポスター発表

Takako Sugisawa, Mariko Harada-Shiba, Hisashi Makino, Yoshihiro Miyamoto, Yasunao Yoshimasa, Motoo Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike
Predicting high risk patients of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia from clinical features
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会、
2008 年 3 月、ポスター発表

(国際)

Harada-Shiba Mariko,
Discovery and clinical characterization of autosomal recessive hypercholesterolemia.
Sweden-Japan Cardiovascular and Metabolic Science Symposium, 2007 年 3 月, Tokyo

Harada-Shiba Mariko

Long term effect of LDL-apheresis in homozygous and heterozygous familial hypercholesterolemia.
Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and the 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs, Presentation in the Symposium, October, 2007, Osaka

Nagumo Ayako, Makino Hisashi, Sugisawa Takako, Yoshimas Yasunao a, Hajime Nakahama, Harada-Shiba Mariko
Analysis of Changes of Lipoprotein Profile during and after LDL-apheresis.
Joint Congress of the 45th Annual Meeting of the Japanese Society for Artificial Organs and the 2nd Meeting of the International Federation for Artificial Organs, Presentation in the Symposium, October, 2007, Osaka

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 非ヒトトランスジェニック動物

出願番号：特願 2007-064457

発明者：斯波真理子、高木敦子

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願日：平成 19 年 3 月 14 日

2. コレステロール低下作用を有する

水溶性高分子架橋体

出願番号：特願 2007-060874

出願人：国立大学法人筑波大学

発明者：長崎幸夫、大石基、斯波真理子

出願日：平成 19 年 2 月 13 日

管理番号：P18-58-1

3. 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：国立循環器病センター
総長

出願日：平成 17 年 8 月 25 日

4. 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

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

鈴木 朗

神野 桂子

大洞 嗣子

宮田 浩子

合田 睦美

安部 映里

薬理部

高木 敦子

再生医療部

永谷 憲哉

国立循環器病センター

病院長

友池 仁暢

研究所長

寒川 賢治

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、PEG とポリカチオンがジスルフィド結合で連結されたブロック共重合体を合成し、プラスミド DNA と混合することによって、細胞内環境で PEG が脱離する高分子ミセル型遺伝子ベクターを開発した。さらに、この PEG 脱離型の高分子ミセル型遺伝子ベクターの物性ならびに培養細胞に対する遺伝子導入効率、細胞内動態を解析し、ベクター設計の有用性を明らかにした。

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。

我々は、これまでに、高分子ミセル型遺伝子ベクターが、血液細胞や血漿蛋白質などの生体成分と相互作用することなく、動脈壁などに効率的な遺伝子発現活性を示すことを明らかにしてきた。しかしながら、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は、ポリカチオンホモポリマーと比較して、比較的高い遺伝子導入効率を得るためには、過剰量のブロック共重合体を DNA に作用させる必要があり、PEG の導入による遺伝子発現活性の低下が示唆されてきた。さらに、ガン細胞スフェロイドを用いた研究によって、高分子ミセル型ベクターが、ポリカチオンからなるポリプレックスと比較して、比較的遅い遺伝子発現挙動を示すことが確認されており、これらの特性は PEG の導入による負の効果 (PEG ジレンマ) が存在することを示唆している。そこで本年度は、PEG とポリカチオンが細胞質内の還元的環境下や細胞膜表面に存在する酵素(plasma membrane-associated protein disulfide isomerase や NADH-oxidase) によって切断される SS 結合で PEG とポリカチオンが連結されたブロック共重合体を合成し、生体内で PEG が脱離する高分子ミセル型ベクターを構築し、PEG ジレンマの克服を目指した。さらに、この PEG 脱離型

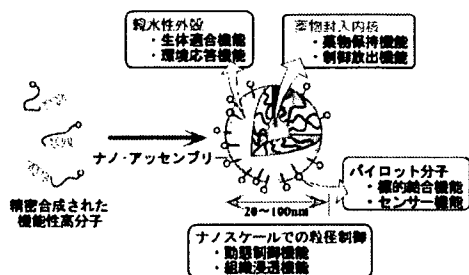


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

の高分子ミセル型ベクターの設計の有用性を明らかにするために、物性ならびに培養細胞に対する遺伝子導入効率、細胞内動態を解析した。

B. 研究方法

1) PEG-SS-P[Asp(DET)]の合成

本研究では、ベクターを構成するポリカチオンとして、ポリ(N-置換アスパルタミド)を骨格とし、側鎖にエチレンジアミン構造を有するP[Asp(DET)]を用いた。これまでの研究によって、P[Asp(DET)]は優れた遺伝子発現活性を示す一方で、著しく低い細胞毒性を示すことが確認されている。まず、PEG-SH(分子量 10,000)を2-アミノエタノールと反応させ、PEG-SS-NH₂を合成し、この一級アミノ基からβ-ベンジル-L-アスパルテート N-カルボン酸無水物(BLA-NCA)を重合することによって、PEG-SS-PBLAを得た(PBLAの重合度:100)。次に、PEG-SS-PBLAに50倍等量のジエチレントリアミン(DET)を加え、15°Cで15分間エステル-アミド交換反応を行うことによって、目的とするPEG-SS-P[Asp(DET)]を合成した。

2) 高分子ミセル型ベクターの調製と物性評価

高分子ミセル型ベクターは、10mM Tris-HCl 緩衝液中(pH7.4)でPEG-SS-P[Asp(DET)]とプラスミドDNA(pDNA)を異なるN/P比(=ポリカチオン中のアミノ基/DNA中のリン酸基)で混合することにより調製した。会合体の形成は、アガロースゲル電気泳動ならびに動的光散乱(DLS)測定により評価した。

3) 高分子ミセル型ベクターの in vitro 評価

高分子ミセル型ベクターの培養細胞(ヒト子宮頸ガン HeLa 細胞)による取り込み量をニクトランレーション法によって³²P 標識した pDNA を用いて評価した。また、HeLa 細胞に対する遺伝子発現効率をルシフェラーゼ遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイにより評価した(24時間接触、洗浄後、42時間後培養)。さらに、遺伝子発現の時間依存性を培養装置を備えたルミノメータ(AB-2550 Kronos Dio, ATTO)を用いて評

価した。

4) 共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)による高分子ミセル型ベクターの細胞内局在の評価

高分子ミセル型ベクターの細胞内局在を評価するために、Cy5 で標識した pDNA を内包した高分子ミセルを調製し、HeLa 細胞と培養した(6時間培養後に培地交換を行い、さらに6時間後培養を行った)。後期エンドソームのマーカとして、LysoTracker Green(Molecular Probes)を用い、各蛍光色素の細胞内分布を CLSM(LSM510, Carl Zeiss)によって観察した。

C. 研究結果

得られたPEG-SS-P[Asp(DET)]のGPCチャートを図2-1に示す。SS結合の還元環境に対する応答性を確認するために、10mM ジチオスレイトール(DTT)存在下で4時間培養したところ、PEG-SHとP[Asp(DET)]が重なった2山のピークが観察された(図2-2)。このように目的とするPEG脱離型のPEG-ポリカチオンを合成することに成功した。

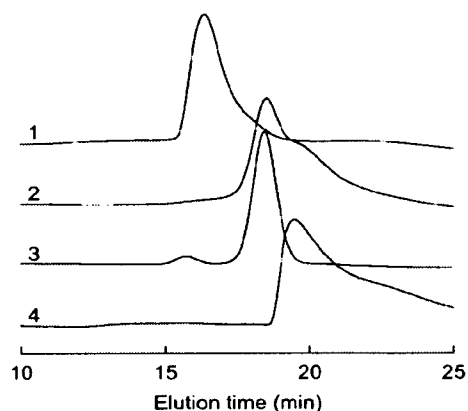


図2. PEG-SS-P[Asp(DET)]のGPCチャート [1: PEG-SS-P[Asp(DET)], 2: 10mM DTT存在下で4h培養後, 3: PEG-SH, 4: P[Asp(DET)]] (column: Superdex 200 10/300 GL; eluent: 10mM Tris-HCl+500mM NaCl)

P[Asp(DET)]およびPEG-SS-P[Asp(DET)]とpDNAを異なるN/P比で混合した時のDLS測定の結果を図3示す。P[Asp(DET)]はN/P=2において600nmの凝集体を形成したが、N/P>4においては100nmの会合体を形成し

た。一方、PEG-SS-P[Asp(DET)]は、PEGの効果によって、N/P>1において80-90nmの会合体を形成することが確認された。次にN/P=2で形成させたPEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの還元環境応答性を確認するために、10mM DTT(50倍等量)および10 μ m DTT(0.05倍等量)存在下でDLS測定を行ったところ、10mM DTT存在下においてミセルのサイズの増大が確認された(図4)。一方、SS結合を持たないPEG-P[Asp(DET)]は、10mM DTT存在下においても、そのようなミセルサイズの増大を示さなかった(図4)。さらに、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルは、10mM DTT存在下において、そのゼータ電位が4mVから28mVに変化したことから、還元環境でPEGが脱離することが示唆された。

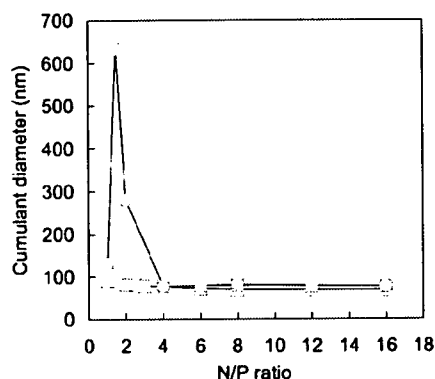


図3. P[Asp(DET)] (○)およびPEG-SS-P[Asp(DET)] (□)から形成された会合体のキュムラント粒径のN/P依存性

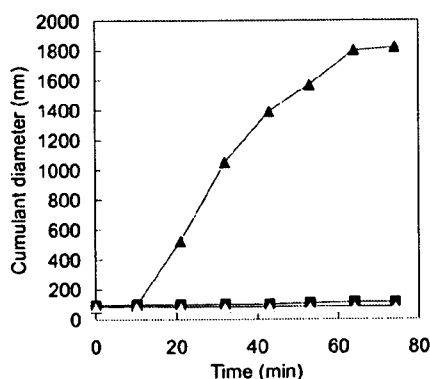


図4. P[Asp(DET)](△)、PEG-P[Asp(DET)](■)およびPEG-SS-P[Asp(DET)](▲)から形成された会合体(N/P=2)の10mM DTT中におけるキュムラント粒径の時間依存的変化

次に合成ベクターのHeLa細胞による取り込み量を³²Pで標識されたpDNAを用いて評価したところ、P[Asp(DET)]からなるポリプレックスはカチオン性の表面を有するためにPEG-P[Asp(DET)]ミセルよりも4-8倍高い細胞内取り込み量を示した。一方、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの取り込み量は、PEG-P[Asp(DET)]ミセルと同等であり、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルのPEG鎖は細胞外においてある程度安定であることが示唆された。

さらに、各ベクターのHeLa細胞に対するルシフェラーゼ遺伝子(Luc)の導入効率を評価した。本実験では、ベクターと細胞を6時間培養し、培地交換後、42時間後培養を行った。その結果、図5に示したように、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルは、N/P=16においてPEG-P[Asp(DET)]ミセルよりも100-1,000倍高い遺伝子発現効率を示した。この得られた遺伝子発現効率は、P[Asp(DET)]ポリプレックスのそれよりも低かったが、分岐型ポリエチレンジアミン(BPEI)のLuc発現効率と同等であった。また、各ベクターの細胞毒性を評価したところ、BPEIは顕著な細胞毒性を示したが、P[Asp(DET)]ポリプレックス、PEG-P[Asp(DET)]およびPEG-SS-P[Asp(DET)]は、N/P比に関係なく、ほとんど細胞毒性を示さなかった。

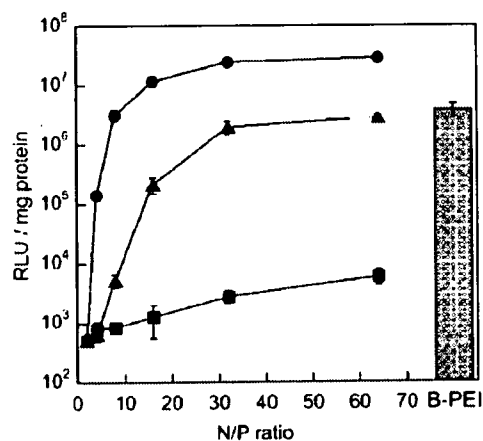


図5. P[Asp(DET)]ポリプレックス(●)、PEG-P[Asp(DET)](■)およびPEG-SS-P[Asp(DET)]ミセル(▲)のLuc遺伝子発現効率(HeLa細胞)

ここで得られた遺伝子発現の時間依存性をAB-2550 Kronos Dioを用いて評価した(図6)。その結果、P[Asp(DET)]ポリプレックスは培地交換後に速やかな遺伝子発現の上昇を示したが、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの遺伝子発現は11時間後に上昇し始め、16時間後に顕著に増加することが明らかになった。一方、PEG-P[Asp(DET)]ミセルは、非常に遅い遺伝子発現挙動を示した。以上の結果より、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルは、細胞内でPEG鎖が脱離することによって高い遺伝子発現活性を示すことが明らかとなった。

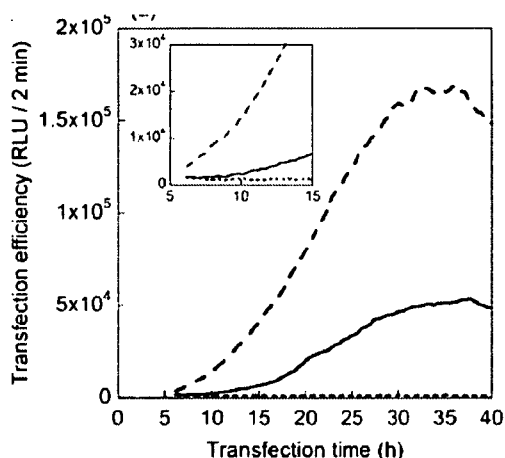


図6. P[Asp(DET)]ポリプレックス(dashed line)、PEG-P[Asp(DET)](dotted line) および PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルによるLuci遺伝子発現の時間依存性評価(HeLa細胞)

最後に、各ベクターの細胞内局在をCLSM観察によって評価した(図7)。ここではCy5(赤)で標識したpDNAを用いて調製したポリプレックスおよびミセルを細胞と培養し(接触6時間+培地交換後の後培養6時間)、後期エンドソームおよびリソソームをLysoTracker(緑)によって染色することによって、Cy5とLysoTrackerの局在の違いからベクターのエンドソーム脱出効率を評価した。すなわち、本実験では、ベクターがエンドソームから細胞質内に移行することによって、顆粒状の黄色の蛍光が拡散した赤の蛍光へと変化するものと考えられる。その結果、PEG-P[Asp(DET)]ミセルは、あまり細胞質へと移行しなかったが、PEG-SS-

P[Asp(DET)]ミセルはP[Asp(DET)]ポリプレックスよりも遅れて細胞質内に移行することが明らかとなった。この結果は、図5および6の遺伝子発現評価の結果とも良く対応している。また、図8の結果より、PEGの脱離は、後期エンドソーム内において起こっているものと考えられ、PEGの脱離によるP[Asp(DET)]のカチオン性表面の露出によってエンドソーム脱出が促進されるものと思われる。

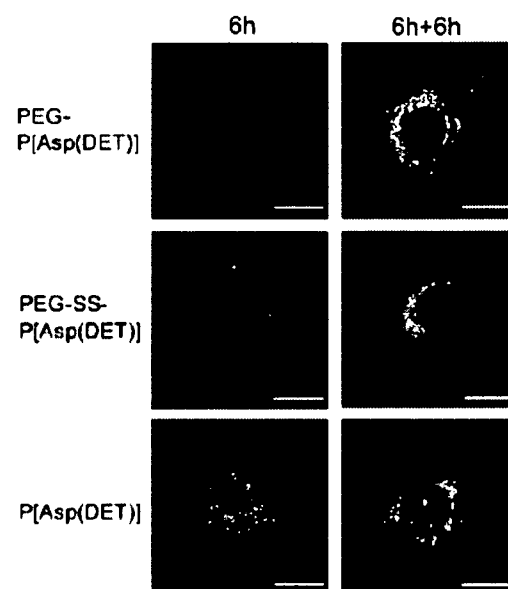


図7. CLSMによるP[Asp(DET)]ポリプレックス、PEG-P[Asp(DET)]およびPEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの細胞内局在の観察(HeLa細胞; 赤: Cy5標識pDNA, 緑: LysoTracker)

D. 考察

1) 達成度について

本年度は、PEGが脱離する環境応答性ミセル型ベクターを構築する一方で、遺伝子発現の時間依存性の評価やCLSMによるエンドソーム脱出の評価など新しい評価系を立ち上げ、それらの評価法を用いてベクターの設計の有用性を明らかにした。本研究は、マルチ機能を搭載した高分子ミセル型ベクターを構築し、その新しい評価系を構築することを目的としているため、本年度は大きく研究が進展したと言える。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究では、我々が独自に開発した低毒性と高遺伝子発現効率を実現するP[Asp(DET)]にSS結合を介してPEGを導入することによって、P[Asp(DET)]の高い遺伝子発現効率と高分子ミセルの低毒性および生体適合性を両立しうる新しい合成ベクターを構築することができた。PEIなどの市販品のベクターと比較したP[Asp(DET)]および高分子ミセルの優位性はこれまでの研究によって明らかにされており、本システムの今後の展開が期待される。また、これまでに酸開裂性結合などを利用したPEG脱離型ベクターの報告例はいくつか存在するが、その詳細な機能発現メカニズムは未だ明らかにされていない。これに対し、我々は、遺伝子発現の時間依存性の評価やCLSMによるエンドソーム脱出の評価など合成ベクターの新しい評価法を構築し、それらを利用することによって、PEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルの機能発現メカニズムを概ね明らかにすることができた。これらの評価系は、合成ベクターの評価法として極めて有用であるものと思われる。

3) 今後の展望について

PEG-SS-P[Asp(DET)]は、PEG鎖に覆われたミセル構造によって血液細胞や血漿蛋白質などの生体成分と低い相互作用を示し、さらに低毒性を示す一方で、細胞内においてはPEGが脱離することによって効率的な遺伝子発現を示すことが示唆された。PEG-SS-P[Asp(DET)]は、効率的な遺伝子発現を示すためには過剰のポリカチオンが必要であり、全身投与による遺伝子デリバリーに展開するためにはミセル構造の安定化が必要であるが、局所投与においては高い有用性が期待できる。今後の計画としては、PEG-SS-P[Asp(DET)]は、経肺投与などにおいて治療応用に展開していきたいと考えている。

E. 結論

本年度は、PEGが脱離する高分子ミセル型ベクターとしてPEG-SS-P[Asp(DET)]ミセルを構築し、本システムが細胞外においてはミセルとして振る舞うが、細胞内においてはPEGが脱離し、効率的な遺伝子発現を

示すことを新しいベクターの評価法を駆使することによって明らかにした。

本システムは、前述のPEGジレンマを解決した新しい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

(欧文)

1. K. Sugisaki, T. Usui, N. Nishiyama, W-D Jang, Y. Yanagi, S. Yamagami, S. Amano, K. Kataoka, Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. Invest. Ophthalm. Vis. Sci in press
2. S. Wu, S. Murai, K. Kataoka, M. Miyagishi, Yin Yang 1 induces Transcriptional Activity of p73 through Cooperation with E2F1. Biochem. Biophys. Res. Co. 365 (1) 75-81 (2008)
3. A. Harada, K. Kataoka, Selection between block- and homo-polyelectrolytes through polyion complex formation in aqueous medium. Soft Matter 4 (1) 162-167 (2008)
4. Y. Imai, E. Kaneko, T. Asano, M. Kumagai, M. Ai, A. Kawakami, K. Kataoka, K. Shimokado, A novel contrast medium detects increased permeability of rat injured carotid arteries in magnetic resonance T2 mapping imaging. J Athero. Thromb 14 (2) 65-71 (2007)
5. S. Hiki, K. Kataoka, A Facile Synthesis of Azido-Terminated Heterobifunctional Poly(ethylene glycol)s for "Click" Conjugation. Bioconjugate. Chem. 18 (6) 2191-2196 (2007)
6. Y. Li, W. -D. Jang, N. Nishiyama, A. Kishimura, S. Kawauchi, Y. Morimoto, S. Miake, T. Yamashita, M. Kikuchi, T. Aida, K. Kataoka, Dendrimer Generation Effects on Photodynamic Efficacy of

- Dendrimer Porphyrins and Dendrimer-Loaded Supramolecular Nanocarriers. *Chem. Mater.* 19 (23) 5557-5562 (2007)
7. O.K. Masago, K. Itaka, N. Nishiyama, U. Chung, K. Kataoka, Gene delivery with biocompatible cationic polymer: Pharmacogenomic analysis on cell bioactivity. *Biomaterials* 28 (34) 5169-5175 (2007)
 8. A. Kawamura, A. Harada, K. Kono, K. Kataoka, Self-Assembled Nano-Bioreactor from Block Ionomers with Elevated and Stabilized Enzymatic Function. *Bioconjugate Chem.* 18 (5) 1555-1559 (2007)
 9. M. Nakanishi, J. -S. Park, W. -D. Jang, M. Oba, K. Kataoka, Study of the quantitative aminolysis reaction of poly(beta-benzyl L-aspartate) (PBLA) as a platform polymer for functionality materials. *React. Funct. Polym.* 67 (11) 1361-1372 (2007)
 10. M. P. Xiong, Y. Bae, S. Fukushima, M. L. Forrest, N. Nishiyama, K. Kataoka, G. S. Kwon, pH-Responsive Multi-PEGylated Dual Cationic Nanoparticles Enable Charge Modulations for Safe Gene Delivery. *ChemMedChem* 2 (9) 1321-1327 (2007)
 11. M. Oishi, Y. Nagasaki, N. Nishiyama, K. Itaka, M. Takagi, A. Shimamoto, Y. Furuichi, K. Kataoka, Enhanced Growth Inhibition of Hepatic Multicellular Tumor Spheroids by Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA Conjugate Formulated in PEGylated Polyplexes. *ChemMedChem* 2 (9) 1290-1297 (2007)
 12. O. K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release* 122 (3) 252-260 (2007)
 13. O.M. Oba, S. Fukushima, N. Kanayama, K. Aoyagi, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. *Bioconjugate Chem.* 18 (5) 1415-1423 (2007)
 14. H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J. Control. Release* 121 (3) 146-155 (2007)
 15. O.M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, K. Kataoka, Transfection Study Using Multicellular Tumor Spheroids for Screening Non-viral Polymeric Gene Vectors with Low Cytotoxicity and High Transfection Efficiencies. *J. Control. Release* 121 (1-2) 38-48 (2007)
 16. S. Takae, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Colloidal Au Replacement Assay for Highly Sensitive Quantification of Low Molecular Weight Analytes by Surface Plasmon Resonance. *Bioconjugate Chem.* 18(4) 1241-1245 (2007)
 17. Y. Bae, N. Nishiyama, K. Kataoka, In Vivo Antitumor Activity of the Folate-Conjugated pH-Sensitive Polymeric Micelle Selectively Releasing Adriamycin in the Intracellular Acidic Compartments. *Bioconjugate Chem.* 18(4) 1131-1139 (2007)
 18. A. Kishimura, A. Koide, K. Osada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Encapsulation of myoglobin in PEGylated polyion complex vesicles made from a pair of oppositely charged block ionomers: a physiologically available oxygen carrier. *Angew. Chem. Int. Ed.* 46(32) 6085-6088 (2007)
 19. O.K. Itaka, S. Ohba, K. Miyata, H. Kawaguchi, K. Nakamura, T. Takato, U. -I. Chung, K. Kataoka, Bone regeneration by regulated in vivo gene transfer using biocompatible polyplex nanomicelles. *Mol Ther.* 15 (9) 1655-1662 (2007)
 20. T. Satomi, Y. Nagasaki, H. Kobayashi, H. Otsuka, K. Kataoka, Density Control of Poly(ethylene glycol)Layer To Regulate