

- Cellular Attachment. *Langmuir* 23(12) 6698-6703 (2007)
21. M. Oishi, H. Hayashi, K. Itaka, K. Kataoka, Y. Nagasaki, pH-Responsive PEGylated nanogels as targetable and low invasive endosomolytic agents to induce the enhanced transfection efficiency of nonviral gene vectors. *Colloid. Polym. Sci.* 285 1055-1060 (2007)
  22. O.D. Akagi, M. Oba, H. Koyama, N. Nishiyama, S. Fukushima, T. Miyata, H. Nagawa, K. Kataoka, Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. *Gene Ther.* 14 (13) 1029-1038 (2007)
  23. J. K. Oh, D. J. Siegwart, H. -I Lee, G. Sherwood, L. Peteanu, J. O. Hollinger, K. Kataoka, K. Matyjaszewski, Biodegradable Nanogels Prepared by Atom Transfer Radical Polymerization as Potential Drug Delivery Carriers: Synthesis, Biodegradation, in Vitro Release, and Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (18) 5939-5945 (2007)
  24. J. -S. Park, K. Kataoka, Comprehensive and accurate control of thermosensitivity of poly(2-alkyl-2-oxazoline)s via well-defined gradient or random copolymerization. *Macromolecules* 40 (10) 3599-3609 (2007)
  25. Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, S. Hiki, T. Ishii, K. Kataoka, A Protein Nanocarrier from Charge-Conversion Polymer in Response to Endosomal pH. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (17) 5362-5363 (2007)
  26. I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, S. Hama, H. Akita, M. Ueno, H. Kishida, M. Kudoh, Y. Mishina, K. Kataoka, M. Yamada, H. Harashima, Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Ther.* 14 (8) 682-689 (2007)
  27. M. R. Kano, Y. Bae, C. Iwata, Y. Morishita, M. Yashiro, M. Oka, T. Fujii, A. Komuro, K. Kiyono, M. Kamiishi, K. Hirakawa, Y. Ouchi, N. Nishiyama, K. Kataoka, K. Miyazono, Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling. *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 104 (9) 3460-3465 (2007)
  28. M. Kumagai, Y. Imai, T. Nakamura, Y. Yamasaki, M. Sekino, S. Ueno, K. Hanaoka, K. Kikuchi, T. Nagano, E. Kaneko, K. Shimokado, K. Kataoka, Iron hydroxide nanoparticles coated with poly(ethylene glycol)-poly(aspartic acid) block copolymer as novel magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging. *Colloids Surf., B Biointerfaces* 56 174-181 (2007)
  29. J.-S. Park, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Preparation and characterization of polyion complex micelles with a novel thermosensitive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) shell via the complexation of oppositely charged block ionomers. *Langmuir* 23 (1) 138-146 (2007)
  30. W. -D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, Preparation of naphthalocyanine dendrimer loaded polyion complex micelle for photodynamic therapy. *Key Eng. Mater.* 342-343(Advanced Biomaterials VII) 465-468 (2007)
- (和文) なし
2. 総説  
(欧文)
  1. N. Nishiyama, W. -D. Jang, K. Kataoka, Supramolecular nanocarriers integrated with dendrimers encapsulating photosensitizers for effective photodynamic therapy and photochemical gene delivery. *New J. Chem.* 31 1074-1082 (2007)
- (和文)
1. ○西山伸宏、片岡一則：人工ウイルスの実現に向けた高分子ミセル型ベクターの設計、細胞工学 27 (1) 56-61 (2008) 56-61
  2. ○西山伸宏、片岡一則：ドラッグデリバリーシステム(DDS)と血管、血管医学 8 (3) 313-317 (2007)
  3. ○西山伸宏、片岡一則：先端医療のためのインテリジェント型高分子ミセルの設計、高分子 56 (9) 736-739 (2007)

4. 西山伸宏、片岡一則：デンドリマー光増感剤を利用した部位選択的遺伝子導入、レーザー研究 35 (7) 441-444 (2007)
  5. 西山伸宏、片岡一則：分子標的治療薬とDDSの融合とのその可能性、ゲノム医学 7 (2) 59 (135)-62(138) (2007)
  6. 西山伸宏、片岡一則：高分子ミセルを利用したがん標的治療、Mebio Oncology, 松村保広編、メジカルレビュー社 東京 (2007) 18-26
  7. 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-、Therapeutic Research 28 (3) (2007)
  8. 岸村顕広、片岡一則：効率的なDDSを実現する超機能化高分子ナノデバイス、化学 62(7) 28-33 (2007)
  9. 片岡一則：DDSから人工細胞へ、再生医療 6 (2) 15 (2007)
  10. 位高啓史、片岡一則：高分子ナノキャリアを用いた遺伝子導入と再生医療への応用、再生医療 6 (2) 174-179 (2007)
  11. 位高啓史、片岡一則：ナノミセルによる生体適合性遺伝子・核酸デリバリーシステム、Drug Delivery System 22 (2) 168-169
  12. 西山伸宏、鄭雄一、片岡一則：循環器疾患の治療のためのナノ DDS、呼吸と循環 55(3) 317-324 (2007)
3. 学会発表
1. 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セルセラピー~, 第27回日本医学会総会, 大阪国際会議場, 大阪, 2007.4.8, 基調講演
  2. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療: ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計, 第4回「東京大学の生命科学」シンポジウム, 安田講堂, 東京大学, 2007.4.14
  3. K. Kataoka, Light-induced Gene and Drug Delivery by Supramolecular Nanocarrier, 3rd Pharmaceutical Sciences World Congress (PSWC2007), Amsterdam RAI, The Netherlands, 2007.4.24, 基調講演
  4. 片岡一則, 遺伝子デリバリーのための超分子ナノデバイス設計, 第23回日本DDS学会, ホテル日航熊本, 熊本, 2007.6.15
  5. K. Kataoka, Engineered Supramacromolecular Assemblies as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, Ratner Symp: workshop on Polymers in Medicine and Biology, the Sonoma Valley (Hilton Hotel, Santa Rosa, CA), 2007.6.19, 2007.6.15
  6. 片岡一則, Polymeric-micellar nano-device for smart gene vector, 第13回日本遺伝子治療学会, 愛知県がんセンター国際医学交流センター, 愛知, 2007.6.28, 招待講演
  7. K. Kataoka, Smart polymeric micelles as nanocarriers for gene and drug delivery, International Conference on Materials for Advanced Technologies 2007 (ICMAT2007), Singapore, SuntecSingapore International Convension and Exhibition Center, 2007.7.2, 基調講演
  8. 片岡一則, Light-induced gene and drug delivery by supramolecular nanocarrier, Keio International Symposium on "Photonics and Molecular Therapy", 慶応義塾大学医学部 (信濃町), 東京, 2007.8.6, 招待講演
  9. K. Kataoka, Multimolecular- Assembly of Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, GelSympo2007, 東京大学, 2007.8.7
  10. K. Kataoka, Engineered supramacromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, The 3rd SBE International Conference on Bioengineering and Nanotechnology (ICBN 2007), Biopolis, Singapore, 2007.8.13, 招待講演
  11. K. Kataoka, Nanocarriers for Gene and Drug Delivery Advances in Tissue Engineering 2007, 15th Annual Short Course, in Duncan Hall, Rice University, Houston, Texas, 2007.8.18
  12. K. Kataoka, Supramolecular nanocarriers assembled from block copolymers for gene and drug delivery, Polypeptide and Protein Materials, the 234th ACS National Meeting, Westin Boston Waterfront, Boston, 2007.8.21, 招待講演

- 演
13. 片岡一則, Supra-molecular nanodevices for gene and drug delivery ~Challenge to smart molecular therapy~The 2nd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis, 早稲田大学国際会議場井深大記念ホール, 東京, 2007.9.7, 招待講演
  14. 片岡一則, ナノマテリアルによるドラッグデリバリー特別講演会, 国立医薬品食品衛生研究所, 東京, 2007.9.12, 招待講演
  15. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療~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~, 第11回 Molecular Cardiovascular Conference, 小樽キロロ, 北海道, 2007.9.14, 基調講演
  16. 片岡一則, 薬物・遺伝子デリバリーと高分子ゲル-ナノバイオインターフェイスに挑む-, ゲルワークショップ 名古屋, KKR ホテル名古屋, 愛知, 2007.9.22, 基調講演
  17. 片岡一則, ナノ構造デバイスによる標的治療, 第66回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2007.10.4
  18. 片岡一則, 高分子ミセル型制がん剤の技術開発と臨床展開, 第69回日本血液学会・第49回日本臨床血液学会(合同総会), パシフィコ横浜, 神奈川, 2007.10.11
  19. 片岡一則, 超分子ナノデバイスによるDDSイノベーション, NEDO 公開シンポジウム「ダブルターゲットングDDS-次世代DDS型治療システム-, 東京女子医大弥生記念講堂, 東京, 2007.10.13
  20. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療, 第7回次世代医療システム産業化フォーラム, 大阪商工会議所7階国際会議ホール, 大阪, 2007.10.15
  21. K. Kataoka, Supramolecular assemblies of smart block copolymers for nanomedicine, Xiangshan Science Conference on Functional Supramolecular Systems: Self-assembly and Nanotechnology 2007, FRAGRANT HILL HOTEL in Beijing, 2007.10.22, 招待講演
  22. 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, 若手社員のための高分子基礎講座, 横浜ゴム湘南セミナーハウス, 神奈川, 2007.10.25
  23. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療, 第48回日本脈管学会総会, 松本ホテルブエナビスタ, 長野, 2007.10.26, 教育講演
  24. 片岡一則, Novel Supramolecular Nanovector for Non-viral Gene Therapy, 第4回21世紀 COE 国際シンポジウム, ヒルトン名古屋, 愛知, 2007.10.26
  25. 片岡一則, ナノバイオマテリアルが拓く未来医療, 本多記念会創立50周年記念事業, 学士会館(神田錦町), 東京, 2007.11.16, 一般講演
  26. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーと高分子の融合による未来医療の開拓, 第25回医用高分子研究会講座, 山上会館大会議室, 東京大学, 2007.11.19
  27. 片岡一則, ナノバイオ・インテグレーションが拓く未来医療, 第8回ナノ工学セミナー 京都大学桂キャンパス, ローム記念館大ホール, 2007.11.21, 特別講演
  28. 片岡一則, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery: Challenge to Smart Molecular Therapy, 台湾工業技術研究院との共同シンポジウム, 鉄門記念講堂, 東京大学, 2007.11.27
  29. 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療-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-, 第49回下野整形懇談会, 宇都宮市東日本ホテル, 栃木, 2007.11.28
  30. 片岡一則, ナノメディシンが拓く未来医療: ピンポイント診断・治療の実現を目指して, 第133回日本医学会シンポジウム, 日本医師会館大講堂, 東京, 2007.12.6
  31. 片岡一則, バイオマテリアルが先導する未来医療~高分子ミセル型ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~, 東大-関学シンポジウム, 武田先端知ホール, 東京大学, 2007.12.10, 基調講演
  32. 片岡一則, 高分子ミセル型超分子ナノ

デバイスによる薬物・遺伝子デリバリー、第 6 回遺伝子治療シンポジウム、千里阪急ホテル、大阪、2008.2.1

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 片岡一則、ジャン ミンゼン、石井篤史、西山伸宏、松本悟：ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウムの有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子、特願 2007-280803
2. 片岡一則、熊谷康顕、狩野光伸、関野正樹、松浦哲也、西山伸宏、宮園浩平：腫瘍撮像用 MRI 造影剤、特願 2007-124908
3. 片岡一則、原島秀吉、小暮健太郎、箕浦ありさ、ブロック共重合体ミセルの脂質被膜技術、特願 2007-085626



参加者名簿 (平成19年 6月 02日(土)～03日(日))

平成19年度厚生労働科学研究費補助金(医療機器開発推進 研究事業)

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発

主任研究者

山本健二

国立国際医療センター研究所

国際臨床研究センター

電話 ; 03-3202-7181 内線 2856

E-Mail; [backen@ri.imcj.go.jp](mailto:backen@ri.imcj.go.jp)

分担研究者

太田 敏博

東京薬科大学 生命科学部/環境分子生物学研究室

落谷 孝広

国立がんセンター研究所/がん転移研究室

片岡 一則

東京大学工学部大学院工学系研究科/マテリアル工学専攻

狩野 繁之

国立国際医療センター研究所/適正技術開発移転研究部

近藤 昭彦

神戸大学大学院工学部応用化学科

鈴木 恵子

昭和大学・歯学部/歯薬理学

鈴木 春巳

国立国際医療センター研究所/臨床病理研究部

土肥多恵子

国立国際医療センター研究所/消化器疾患研究部

(以上6月2日(土))

(以下 6月3日(日) 08時30分から)

鈴木 和男	千葉大学大学院医学研究院/免疫発生学・炎症制御学
斯波真理子	国立循環器病センター研究所/バイオサイエンス部 免疫応答研究室
山本 悟	国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科
宮坂 亮介	(株)サンギ 新規製品開発部
増田 茂	(株)神戸天然物化学
質疑応答	

会議は 6月2日(土) 17:00 から開始します。発表時間は制限いたしません、一人30分程度でお願いいたします。

連絡先 ; 国立国際医療センター研究所  
国際臨床研究センター  
山本健二研究室  
伊藤和幸  
電話 ; 03-3202-7181 内線 2856  
ファックス ; 03-3202-7364  
E-mail; ikazuyuki@ri.imcj.go.jp

2007年6月2日

半導体ナノ粒子による、分子・細胞動態観測  
国立国際医療センター研究所 山本健二

半導体ナノ粒子（量子ドット）を用いて、何かの追跡をすることは、興味深い。現在、分子と細胞、臓器を中心に考えている。ひとつは、分子に量子ドットを付けてその複合体の挙動を追うことに興味を持っている。これまでに、低分子とえばリュウマチ治療補助薬と高血圧治療薬、におい分子などで実際につけてみた。はじめの2者は、さすがに、薬になっているせいか、すこぶる安全性に富んでいる。現在われわれが安全性を見るのはせいぜいMTTアッセイ、コメットアッセイ、PI染色を用いてFAXで見る方法などであるが。におい分子については少々安全性に疑問が残るが、筆者をはじめ、この研究に参加している者は、十分被ばくしている。7回貫通型膜タンパクレセプターの準備を現在開始し、低分子との相互作用観察を計画している。

もう一つは、細胞染色である。これは、はじめ思っていたより実に興味深い。株化リンパ球をもちいて動体解析を行ったことから始まった。その後生体内を動く細胞に興味を持った。なぜなら、動体解析に都合がよいからである。生まれた細胞が、その生地から移動し行き着いた場所で現地の細胞と何か相互作用を持ち、一細胞または、少数の細胞で、大それたことを行うのは、非常に興味深い。それらは、星野氏が研究を展開している。

三番目は、臓器染色である。これについては、山本悟氏が研究を展開しており、実に興味深い結果を得ている。



「半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発」山本健二班

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)

### 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

アテロコラーゲン DDS を用いて、担がん動物モデルにおける核酸医薬のデリバリーとその治療効果について検討を重ねてきた。我々が用いたのはルシフェラーゼのバイオルミネッセンスを応用した評価系であり、ヒト前立腺がんや乳がん細胞の動物体内での挙動をリアルタイムにイメージングすることを可能にした。アテロコラーゲン DDS による siRNA などのデリバリーは、それらの評価系において優れた治療効果を発揮したが、正常細胞や組織を侵襲することなく、がん細胞を特異的に攻撃する能力に欠如していた。本分担研究では、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。

具体的な方策としては、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。

## 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

東京大学大学院工学系研究科・医学系研究科 片岡一則

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、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 (<math>< 100 \text{ナノメートル}</math>) 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。

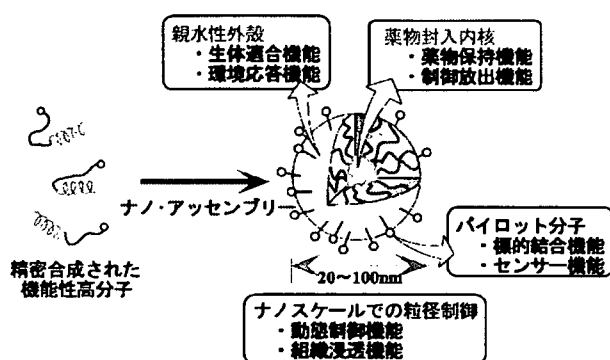


図 1 ブロック共重合体のナノアッセンブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

将来の臨床展開を見据えて、本研究においては、特に以下の 4 点について重点的に研究を推進したいと考えている。

- 1) 国立循環器病センター研究所の斯波真理子室長と共同で、肺動脈性肺高血圧症モデル動物に対し、アドレノメデュリン、CNP などの治療遺伝子を経肺投与する治療実験を行い、肺動脈圧への治療効果を評価するとともに、肺での遺伝子発現および治療効果発現のメカニズムを探る。
- 2) 膵臓がんなどの難治がんを対象とし、ミセル型ベクターと TGF-beta inhibitor との併用に基づいて腫瘍血管選択的な遺伝子導入条件を確立し、さらに、抗血管新生療法に基づくがん治療へと展開する。
- 3) 開発中の高分子ミセル型ベクター並びにその構成成分であるブロック共重合体の安全性および毒性評価を系統的に実施し、将来の臨床試験に備える。
- 4) 遺伝子以外の siRNA などの核酸医薬についても高分子ミセルへの内包を行い、その循環器疾患やがん治療への可能性について検討する。

平成19年度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）

半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発 (H19-ナノー一般-012)

### マラリアワクチン開発に向けてのナノメディシン研究

分担研究者 狩野繁之 国立国際医療センター研究所適正技術開発移転研究部・部長

協力研究者 奥 浩之 群馬大学大学院工学研究科応用化学生物化学専攻・准教授

熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼを標的とした薬剤・ワクチンの開発研究ならびに、同酵素をターゲットとした選択的ないわゆる薬剤・細胞伝達システムの開発を、同分子の機能と構造をナノスケールで詳細に検討することで行ってきた。

現在までの成果としては、1)組換えタンパクおよび人口ペプチドの立体構造を、ホモロジー解析によるコンピューターグラフィックス、CD スペクトルによる解析、NMR による構造解析を行った。2)熱帯熱マラリア患者血清のこれらのエノラーゼ分子に対する反応性を調べたところ、この酵素の機能上・構造上重要な部位に対する抗体を持つ患者は少なかった。一方、このような重要部位に対して高い反応性を示す血清を持つ患者の病状は極めて軽度であることが認められた。3)GL16 の一部のペプチドシーケンスを用いた MAPs (Multiple antigenic peptides)の作製を行い、その構造の解析を行った。CD スペクトル法により、Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs が、 $\alpha$  ヘリックス構造を示して抗原部位を強く提示することが判明した。4)GL16 の一部のペプチドシーケンスを合成して、炭素鎖にぶら下げて放射線重合を行ったところ、ナノスフェアを作成することが出来た。5)AD22 を材料として、ポリ乳酸グリコール酸共重合体と乳化させることでナノ粒子を生成することに成功した。6)原虫解糖系の酵素であるエノラーゼに対する特異抗体による増殖阻害の機構を形態的、経時的に解析するために、新たな蛍光プローブである量子ドット(半導体ナノ粒子)の導入を試みた。

以上の結果、上記材料がマラリアワクチン DDS の概念の中で、徐放性人工抗原として有用であることが示唆されたので、当該分担研究では具体的なワクチン材料の開発を目指す。

## 破骨細胞形成および活性化過程における細胞動態のバイオイメージング

—骨破壊病態モデル動物を用いて—

昭和大学歯学部歯科薬理学 鈴木恵子

脊椎動物は成長が停止した後でも骨形成と骨吸収のバランスがとれた骨代謝を行っている。

病的骨破壊＝骨吸収の異常亢進、これには破骨細胞の形成促進・活性化が必須

骨破壊がみられる疾患には以下のものがあるが、いずれも患者さんのQOLを著しく損なう重大な問題を内包しており、高齢社会を迎えた日本においては適切な治療法の確立が急務である。

- ▶ 骨粗鬆症 ⇒ 寝たきり
- ▶ 歯肉炎での歯槽骨破壊 ⇒ 歯の喪失
- ▶ 関節リウマチ ⇒ 人工関節
- ▶ 癌の骨転移 ⇒ 骨痛

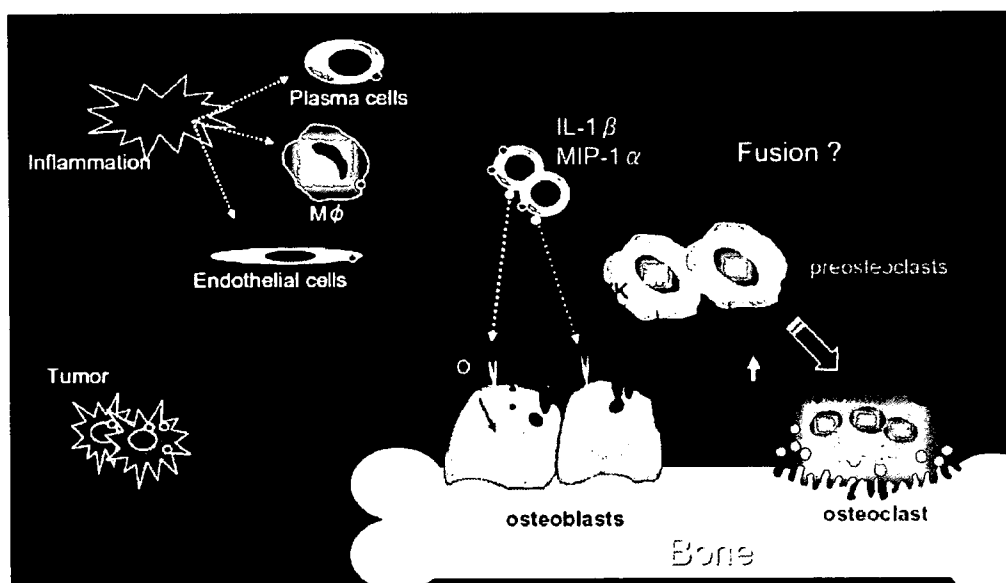
### 〔目的〕

1. 生理的骨吸収と病的骨破壊の違いは何かを知る。
2. 有効な治療薬の開発と評価法について検討する。

### 〔方法〕

イメージングの手法を用いて

In Virto では破骨細胞形成系、In Vivo では歯周病ラットでの歯槽骨破壊、コラーゲン誘導性関節炎マウスでの骨・軟骨破壊について、Qドットなどの蛍光標識細胞、あるいは Luc Tg ラット由来前駆細胞を用いることにより、生細胞および生きている動物体内での細胞動態について調べる。



## T 細胞分化における低分子 G タンパク質 RhoH の機能

分担研究者 鈴木春巳  
(国立国際医療センター研究所 臨床病理研究室)

我々は独自のデータベース解析から胸腺特異的に発現する新規遺伝子として RhoH 遺伝子を抽出し、cDNA クローニングおよびノックアウトマウスの作成を行ってきた。RhoH は抑制性の低分子量 G タンパク質であり、ヒト T 細胞株において Rac1、cdc42、RhoA および接着分子 LFA-1 の活性を負に制御することが報告されている。また、RhoH が ZAP70 と結合し、ZAP70 のアダプターとして LAT のリン酸化を正に制御していることが最近報告されている。

我々の作製した RhoH ノックアウトマウスのリンパ組織を解析した結果、胸腺での  $\beta$  セレクション、ポジティブセレクションおよびネガティブセレクションの全てが強く抑制されていること、それに伴い末梢組織における成熟 T 細胞数が顕著に減少していることが明らかとなった。しかしながらノックアウトマウスにおいて、末梢リンパ組織の  $\gamma \delta$  T 細胞および CD4 陽性 foxp3 陽性の制御性 T 細胞、および TCRab, CD8aa 型の腸管上皮細胞間 T 細胞 (IEL) の分化には大きな変化はみられなかった。また、T 細胞以外の血球系細胞の分化においても著明な変化は認められなかった。

以上の結果より、RhoH は胸腺におけるコンベンショナルな  $\alpha \beta$  型 T 細胞の分化には重要であるが、アゴニストセレクションを受けて分化する抑制性 T 細胞、CD8aa 型 IEL の分化には RhoH は関与しないことが示唆された。

## 腹腔内炎症応答制御法の開発と応用

分担研究者 土肥 多恵子

国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 部長

協力研究者

河村由紀 消化器疾患研究部 協力研究員

水谷紀子 消化器疾患研究部 協力研究員

川島 麗 消化器疾患研究部 協力研究員

我々はこれまでに、1)糖転移酵素の遺伝子導入によって、がんの腹膜播種および転移の防止が可能であること、2)ケモカイン作用の阻害によって腹膜癒着の防止が可能であることを示してきた。これらの作用機転の要は、腹腔内における炎症応答の制御であることが共通している。これらの成果の応用をめざした DDS の開発を検討している。

1) 糖転移酵素の遺伝子導入による腹膜播種および転移の防止: ヒト胃体部粘膜に発現しているが、癌組織で消失する糖脂質を精製分離し、その構造を、Sd<sup>a</sup> 糖鎖を含む糖脂質と決定した。また、Sd<sup>a</sup> 糖鎖を合成するβ1,4GalNAc 転移酵素 (β1,4GalNAcT) の性状を明らかにするとともに、癌組織では早期からその活性及び mRNA 発現が減少あるいは消失することを示すなど、がん組織での Sd<sup>a</sup> 糖脂質の消失メカニズム解明を進めてきた。β1,4GalNAcT の全長クローニングにも成功し、胃癌・大腸癌細胞株に導入して強制発現したところ、Sd<sup>a</sup> 糖鎖の発現が誘導されただけでなく、癌抗原でセレクトインリガンド機能を有するシアリルルイス x、シアリルルイス a 糖鎖の発現が劇的に減少することを見いだした。In vivo においてもβ1,4GalNAcT 導入癌細胞の転移能は著しく低下していた。さらに、改変型アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療によっても転移阻止可能であることが明らかとなった。

2) ケモカイン作用の阻害による腹膜癒着の防止: 腹腔由来マクロファージ(mφ)が炎症後及び外科手術後の臓器癒着部位の漿膜側細胞塊に特異的に集積することを見いだした。腹腔 mφ は炎症刺激により局所に遊走すると同時にケモカイン CCL1 を産生し、さらにその受容体 CCR8 のみをケモカイン受容体として特異的に発現するようになるため局所にとどまって細胞塊を形成するというメカニズムが明らかになった。さらに開腹手術後の癒着形成に CCL1/CCR8 相互作用が必要であることを示した。現在ヒト CCR8 低分子阻害剤のスクリーニングとの腹腔内洗浄液での解析を行っている。

腹膜播種のリスクは外科手術時に高くなるが、1)にみられる癌転移の阻止は炎症応答の一つとして発現する接着分子 E-selectin を介していることから、1)および2)を組み合わせた臨床応用の可能性もあると考えている。

## ナノ DDS

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 斯波真理子

我々は、H14-18年度の期間、「ナノ DDS」の研究を行った。本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターを開発すること、そして循環器疾患モデル動物を用いて治療実験を行い、循環器疾患に対する安全で効率的な新しい遺伝子治療法を開発することであった。

### 1. 遺伝子導入ベクターの開発

本研究では、東京大学大学院工学系研究科の片岡教授との共同研究で、種々の機能を搭載したナノ粒子を遺伝子導入ベクターとして用いた。ナノ粒子は、カチオニックポリマーとポリエチレングリコールのブロック共重合体を用い、DNA と会合させて、ナノのサイズの DNA 複合体としたものである。ナノ粒子は、外殻にポリエチレングリコールを有し、カチオニックポリマーが DNA を折り畳んで内包するという、core-shell 構造をとっているため、DNA は外的環境から保護される。ナノ粒子は、DNA を血中で 6 時間以上という長時間、安定に存在させることが可能であった。

### 2. 遺伝子導入効率上昇のための試み

PIC ミセルの遺伝子発現効率を上昇させるため、まず、SS 結合で PIC ミセルの内核を架橋したベクター（架橋ミセル）を用いた。ミセルの内核を SS 結合で架橋することにより、血中安定性が増すこと、細胞内に取り込まれた後、還元環境の中では SS 結合が容易にはずれ、ベクターと DNA が遊離することが期待された。架橋ミセルにより、*in vitro* および *in vivo* における遺伝子導入効率の改善に成功した。しかしながら、架橋ミセルでは、まだ、疾患モデル動物の治療効果を得るには至らなかった。そこで我々は、スクリーニングによって得られた polyaminoethylene aminopropyl aspartamide (PAsp(DET)) をポリマー骨格に持つナノ粒子が、*in vivo* において強力な遺伝子発現効率を持つことを発見した。PEG-PAsp(DET) を用いてマウス気管内投与による肺組織での遺伝子導入実験を行い、市販されているポリマーベクターの Exgen(linear PEI)、および架橋ミセルによる遺伝子導入と比較したところ、約 50 倍以上の遺伝子発現を認めたのである。

### 3. 循環器疾患モデル動物に対する遺伝子導入の治療効果と毒性

肺動脈性肺高血圧モデル動物は、Wister ラットにモノクロタリンを皮下投与して 4 週間放置して作製した。このラットに対して、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。コントロールとして、アドレノメデュリン発現遺伝子と生理食塩液、アドレノメデュリン発現遺伝子と Exgen、PEG-PAsp(DET) とルシフェラーゼ遺伝子を投与したが、いずれも右室圧に有意な差を認めなかった。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。PEG-PAsp(DET) による遺伝子導入の持つ毒性を調べるため、PEG-PAsp(DET) および Exgen 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ところ、Exgen 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。

厚生労働科学研究費補助金 萌芽的先端医療技術推進事業

「半導体などナノ粒子による薬剤・細胞伝達システムの開発」分担研究者合宿

平成19年6月2日（土）

## QD による硝子体可視化剤の作製

国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院

眼科 山本 悟

私達は、QD を眼の硝子体に注入することによって、透明な組織である硝子体を染色する研究をしております。

透明である硝子体に生じる様々な生理的・病的変化が詳細に観察でき、また、硝子体手術の際に、合併症が少なくなる可能性が大であれば、眼科学の進歩、また、眼科医療の質向上に寄与できるのではないかと考えております。

（硝子体は透明であるため、観察することが難しい組織であります。この硝子体の変化が引き金になって、網膜裂孔、硝子体出血、網膜剥離、黄斑円孔、黄斑上膜、糖尿病網膜症の増殖性変化などが生じます。

また、硝子体は透明であるため、硝子体手術とは、見えない物を手術するという大変、難易度・危険度共に高い手術であると言えます。）

現在は、更に開発を進めるべく、今までの研究手法に加え、QD の安定製造、製品化への問題点の把握、ニーズの掘り起こし等につきまして広く考察するため、QD の開発製造部門、眼科関連企業との話し合いを近日中に企画しております。

その際に出てきた問題点に向かって、焦点を定めながら更に研究を続行してゆく予定です。

また、今回の会では、皆様に様々御助言頂ければと考えておりますので、何卒宜しくお願い致します。



# 業績論文

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K.	Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo.	The Journal of Urban Health			in press
Hoshino A, Nagao T, Nakasuga A, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K	Nanocrystal Quantum Dot-Conjugated Anti-Myeloperoxidase Antibody as the Detector of Activated Neutrophils.	IEEE Transactions on NanoBioscience	6(4)	341-345	2007
Futamura Y, Fujioka K, Yamamoto K.	Hydrothermal Treatment of Glycine and Adiabatic Expansion Cooling: Implications for Prebiotic Synthesis of Biopolymers.	Journal of Materials Science			in press
Hoshino A, Ohnishi N, Yasuhara M, Yamamoto K, Kondo A.	Separation of Murine Neutrophils and Macrophages by Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles.	Biotechnology Progress	23(6)	1513-1516	2007
Hoshino A, Omata K, Takami S, Adschiri T, Terada N, Funatsu T, Yasuhara M, Yamamoto K.	Fluorescence Millisecond Oscillation in Polar Solvents regulates Fluorescence Intensity of Colloidal Quantum Dots' solution.	Journal of Nanophotonics	(1) 013516, doi:10. 1117/1. 2767608		2007 (E-publish)
Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K.	Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine surface modification regulates biological function, including cytotoxicity	The Journal of Artificial Organs	10(3)	149-157	2007
Krevchik VD, Novikov TV, Dahnovsky YI, Semenov MB, Shcherbakova EV, Yamamoto K	Nonlinear Dynamics of Infectious Diseases Transfer with Possible Applications for Tubercular Infection.	Arxiv Medical Physics	6	1434	2007
Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K.	Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice.	Microbiology and Immunology.	51(5)	551-566	2007

Futamura Y, Yahara K, Yamamoto K.	Evidence for the production of fluorescent pyridine derivatives using supercritical water.	The Journal of Supercritical Fluids	41(2)	279-284	2007
Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T.	Inhibition of CCL1-CCR8 Interaction Prevents Aggregation of Macrophages and Development of Peritoneal Adhesions.	The Journal of Immunology	178(8)	5296-5304	2007
Yamamoto S, Manabe N, Fujioka K, Hoshino A, Yamamoto K.	Visualizing Vitreous using Quantum Dots as Imaging Agents.	IEEE Transactions on NanoBioscience	6(1)	94-98	2007
Dai Chida, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Harumi Suzuki, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Yoichiro Iwakura,	Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis.	Proc. Natl. Acad. Sci. USA	104	18205-18210	2007
Fumiko Shiroki, Satoshi Matsuda, Tomomitsu Doi, Mari Fujiwara, Yoshito Mochizuki, Takashi Kadowaki, Harumi Suzuki and Shigeo Koyasu	The p85 $\alpha$ regulatory subunit of class IA phosphoinositide 3-kinase regulates $\beta$ -selection in thymocyte development.	J. Immunol.	178	1349-1356	2007
Hiroyo Oda, Harumi Suzuki, Kouhei Sakai, Seiji Kitahara, Michael S. Patrick, Yoshinao Azuma, Kazuro Sugi, Toshio Kitamura, Jonathan Kaye and Mutsunori Shirai.	Rac1 mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 single positive differentiation of a CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> immature thymocyte line	J. Leuko. Biol.	81	500-508	2007
Masayuki Murata, Yoshinao Azuma, Koshiro Miura, Mohd. Akhlakur Rahman, Minenosuke Matsutani, Masahiro Aoyama, Harumi Suzuki, Kazuro Sugi and Mutsunori Shirai	Chlamydial SET domain protein functions as a histone methyltransferase	Microbiology	153	585-592	2007
Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sorimachi N, Imai T, Dohi T.	Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine.	J. Immunol.	79	7478-7487	2007

Suzuki K, and Yamada S	Functional significance of intracellular form of osteopontin in the migration and fusion of osteoclasts	Dentistry in Japan	43	150-153	2007
Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami and Shoji Yamada.	Pharmacological topics of bone metabolism: A novel bisphosphonate for the treatment of periodontitis	J Pharmacol. Sci.			in press
Suzuki K, and Yamada S	Rac1 and Cdc42, members of Rho-family GTPase, have different subcellular distributions in osteoclasts.	Oral Ther Pharmacol			in press
Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi 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
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
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
Takahiro Ochiya, Kimi Honma, Fumitaka Takeshita and Shunji Nagahara	Atelocollagen-mediated drug discovery technology	Exper Opin. Drug Discov.	2(2)	159-167	2007
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

Banas A, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T.	Stem cell plasticity: learning from hepatogenic differentiation strategies. s	Dev Dyn.	236	3228-3241	2007
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
Yamamoto Y, Banas, A, Kato T, Ochiya T.	Plasticity of adult stem cells into liver.	Curr. Res. in Hepatology	1	1月18日	2007
Honma K, Takeshita F, Ochiya T.	Application of atelocollagen-mediated siRNA delivery for RNAi therapies.	Yakugaku Zasshi	127	807-812	2007
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	27(9)	2153-2157	2007
本間紀美、竹下文隆、落谷孝広	アテロコラーゲンsiRNA導入技術のRNAi医薬への応用	Yakugaku Zasshi	127(5)	807-812	2007
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	42(10)	893-900	2007