

2008/2005A

2008/2005B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

蛋白質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発
に関する研究

平成18年度～20年度

総合研究報告書

総括研究報告書

分担研究報告書

研究代表者 松井 秀樹

平成21(2009)年 3月

目 次

I. 総合研究報告 タンパク質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発 に関する研究	1
松井 秀樹	
II. 総括研究報告 タンパク質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性脳腫瘍治療薬の開発 に関する研究	11
松井 秀樹	
III. 分担研究報告	
1. 脳腫瘍標的化バイオナノカプセルの開発に関する研究	12
富澤 一仁	
2. 膜透過性癌抑制ペプチドの開発に関する研究	13
二木 史朗	
3. 抗癌剤封入バイオナノカプセルの開発に関する研究	14
妹尾 昌治	
4. 脳腫瘍モデル作製ならびに抗腫瘍効果判定に関する研究	15
伊達 勲	
5. 蛋白質セラピー型ペプチドの開発に関する研究	16
上田 政和	
6. 膜透過性ポロン製剤の開発に関する研究	17
宮武 伸一	
IV. 研究成果の刊行に関する一覧表	18
V. 研究成果の刊行物・別刷	21

タンパク質セラピー法とバイオナノカプセルによる持続性
脳腫瘍治療薬の開発に関する研究

研究代表者 松井 秀樹 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

研究要旨

本研究は、タンパク質セラピー法ならびにバイオナノカプセル（BNC）を応用し、抗ガン剤、癌抑制蛋白質もしくはボロン化合物を脳腫瘍細胞に特異的に導入する治療法を開発することを目的とする。EGFR 抗体を付加した BNC の開発を行い、さらにこの BNC に抗癌剤、ボロン化合物を封入することに成功した。さらに EGFR 抗体を付加した BNC が脳腫瘍細胞に標的化することを確認した。光学異性体である D 体から成るポリアルギニンにインフルエンザウイルスの HA2 ペプチドならびに p53C 末端ペプチドを付加した複合ペプチドの開発に成功した。このペプチドに抗腫瘍効果があることを確認した。さらにボロン化合物の BSH にポリアルギニンを結合させた新規ボロン化合物を作製した。このボロン化合物が腫瘍細胞内に効率よく導入されることを確認した。本研究成果は、新しい脳腫瘍治療法、あるいは中性子補足療法の開発に結びつくものである。

研究分担者

富澤一仁（熊本大院医学薬学・教授）
二木史郎（京都大院薬学・教授）
妹尾昌治（岡山大院自然科学・教授）
伊達 勲（岡山大院医歯薬学・教授）
上田政和（ピークル（株）・取締役）
宮武伸一（大阪医大医学部・准教授）

A. 研究目的

がんは 1981 年以来日本人の死亡原因の第 1 位であり厚生労働行政にとって最重要課題である。2007 年に報告された平成 17 年度の国民医療費 33 兆 1289 億円のうちがんの治療費は 3 兆円にものぼり、これを削減するためには安全・安価でしかも効果の高い画期的治療法の開発が必要である。脳腫瘍の半数は悪性であり、特に小児では悪性の割合が 75% と高率である。悪性脳腫瘍は脳というきわめて重要な場所に発生するため他臓器のがん手術のような広範囲切除ができない。しかも浸潤性であり、手術による完全摘

除が不可能で再発率がきわめて高い。

ガンマーナイフのような 3 次元位置計測による精密な放射線照射も行われているが、限界がある。従って脳腫瘍細胞のみを特異的に攻撃して有効性が高く、しかも持続的効果を発揮する薬剤を開発する本研究の必要性和緊急性は極めて高い。

本研究では 2 つのナノメディシン技術すなわち「蛋白質セラピー法」と「徐放性バイオナノカプセル（BNC）」を組み合わせ悪性脳腫瘍に対する画期的な治療薬を創出し、臨床応用への橋渡しをする。具体的には、蛋白質セラピー法の腫瘍標的化により抗ガン剤やがん抑制蛋白質をガン細胞特異的に効率良く導入して、副作用を最小にしながら抗ガン効果を飛躍的に高める。さらに有効成分を BNC に封入することにより、副作用を最小にしながら抗ガン効果を飛躍的に高める。さらに有効成分を BNC に封入することにより、徐放性にして長期にわたって効果を発揮させる。さらにボロン剤の脳腫瘍内導入法として蛋白質セラピー法を応

用し、熱中性子捕捉療法の実施のための画期的なボロン製剤を開発する。これらのナノメディシン技術(「蛋白質セラピー法」と「徐放性バイオナノカプセル」)

を組み合わせるにより相乗的に効果を高めながら、副作用も少なく安全であり他の方法に比べ安価な治療法を確立することを目的とする。

B. 研究方法

1. 脳腫瘍標的バイオナノカプセルの作製

①ヒトバリアントⅢ型 EGF 受容体を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製

ヒトバリアントⅢ型 EGF 受容体を大腸菌で発現し、精製後同蛋白を BALB/c マウスに免疫した。細胞融合後 EIA 法にてスクリーニングを行った。陽性クローンの内、野生型 EGF 受容体を認識しないクローンを選別し、培養上清から IgG を精製した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、学内の動物実験委員会の承認を得て、実施した。使用したマウスは安楽死処分した。

②バイオナノカプセル(BNC)の脳腫瘍への標的化

BNCのプレS1領域を protein A で置換し、BNC の肝細胞標的化能力を喪失させ、抗体が結合できる BNC の作製を行った。そしてバリアントⅢ型 EGF 受容体を特異的に認識するモノクローナル抗体を BNC と PBS 内で室温下において1時間混合し、抗 EGFR 抗体を BNC に結合させた。

さらに、抗体を付加した BNC に蛍光色素であるローダミン B イソチオシアネート(RITC)を結合させた。BNC と RITC を PBS 内、室温下で15分反応後、3.4mMEDTA を添加しさらに14時間、4℃で反応させた。その後、エタノールアミン内で2時間さらに反応させた。エタノールアミンは、PBS で置換した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

③抗体付加バイオナノカプセルの脳腫瘍細胞への標的化実証実験

バリアントⅢ型 EGF 受容体高発現ヒト脳腫瘍株化細胞である Gli36 細胞は、10%牛血清を添加した DMEM 培地で培養した。

コントロールとしてウイスターラットから単離培養したアストロサイト細胞を使用した。生後1日のラットから脳を摘出し、皮質を採取した。皮質をトリプシン、EDTA ならびに DNase を用い細胞を単離した。その後、コラーゲンでコートした培養皿に細胞を蒔き、10%牛血清および5%馬血清を添加した DMEM 培地で培養した。

ヒトバリアントⅢ型 EGF 受容体抗体付加型 BNC を Gli36 細胞ならびにラットアストロサイト細胞の培地に 0.1 μg/ml、1.0 μg/ml、5.0 μg/ml の濃度で添加した。4時間後、培地を除去し、細胞を PBS で3回洗浄した。その後新鮮な DMEM 培地を添加し、共焦点レーザー顕微鏡にて BNC の細胞内での導入効率について検討した。コントロールとして抗体を付加していない BNC を同様に培地内に添加した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、学内の動物実験委員会の承認を得て、実施した。使用したマウスは安楽死処分した。

④マウス腫瘍モデルを使った抗体付加バイオナノカプセルの脳腫瘍への標的化実証実験

ヌードマウス(BALB/c-nu/nu)の下肢皮下ならびに脳線状体に 2×10^5 個の Gli36 細胞を接種した。2週間後腫瘍細胞周囲に 2 μl のヒトバリアントⅢ型 EGF 受容体抗体付加型 BNC ならびに抗体を付加していない BNC を投与した。4時間後、マウスを安楽死処分し、下肢腫瘍部ならびに脳を摘出した。4%パラフォルムアルデヒドで固定した後、各組織を 25 μm の厚さで切片化した。

BNC の局在について BNC に付加した TRIC シグナルを共焦点顕微鏡にてイメージングすることにより検討した。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた動物実験は、学内の動物実験委員会の承認を得て、実施した。使用したマウスは安楽死処分した。

2. バイオナノカプセルへの抗癌剤ならびにボロン化合物の封入

リポソームとドキソルビシンを 1:10 あるいは 1:100 のモル比で混合することにより、リポソーム内にドキソルビシンを封入した。その後、同リポソームと BNC を PBS 内で超音波融合させた。リポソームと融合した BNC と未融合の BNC をカラムクロマトグラフィーにて分離した。抗癌剤が封入されているかどうか、分光高度計にて検討した。

またボロン化合物である BSH も同様の方法にて BNC 内に封入した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

3. 抗脳腫瘍作用を有する抗癌ペプチドの作製

①膜透過性光学異性体 p53C 末端ペプチドの作製

ヒト p53 アミノ酸配列の 361-381 番目に相当するペプチド (KKHRSTSQGEASELHSSHARSG) に膜透過性のポリアルギニン (RRRRRRRRR)、TAT (RRRQRKKRGY)、あるいは FHV (RRRRNRTRRRRRRVR) ペプチドを付加した合成ペプチドを L-isomer ならびに光学異性体の D-isomer で標準 Fmoc 法にて合成した。合成後、ペプチドは HPLC にて精製された。さらにインフルエンザウイルスの HA2 ペプチドを付加したペプチドを同様に人工合成した。コントロールペプチドとして、同じペプチド配列の L-isomer ペプチド、さらに

p53 アミノ酸配列の一部アミノ酸を置換した D-isomer ペプチドの作製も行った。

合成ペプチドの細胞内局在を検討するため、ジスルフィド結合法を用いてペプチドのアミノ末端に FITC を結合した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

②抗腫瘍効果実証実験

各ペプチドを Gli36 細胞の培地に 0.1-10 μM の濃度で添加した。1 時間後に PBS で細胞を洗浄し、新鮮な DMEM 培地を加えた。その後細胞内局在について、共焦点顕微鏡による生細胞イメージング法にて検討した。

腫瘍細胞増殖抑制効果については、ペプチドを添加後 24 時間毎に細胞を回収し、WST 測定法にて検討した。腫瘍細胞のアポならびにヘキスト染色により断片化 DNA を観察することにより評価した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

4. 蛋白質セラピー型ボロン化合物の作製

①ボロン化合物である BSH にポリアルギニンの付加

9 個ならびに 11 個から成るポリアルギニンのアミノ末端に S が付いたペプチドをペプチド合成機で合成した。このペプチドと BSH の S 基をジスルフィド架橋することにより、BSH にポリアルギニンを付加した。カラムクロマトグラフィーにて未反応化合物を除去し、精製した。

(倫理面への配慮)

該当無し。

②ポリアルギニン付加型 BSH の脳腫瘍細胞内局在の検討

ポリアルギニン付加型 BSH を Gli36 細胞の培養液中に 1 μM の濃度で添加した。1 時間後 PBS で細胞を洗浄し、新しい培地と交換し、さらに培養した。培養 4 時間、12 時間、24 時間後に細胞をパラフォルムアルデヒドで固定し、BSH の細胞内局在について

抗 BSH 抗体にて検討した。
(倫理面への配慮)
該当無し。

C. 研究結果

1. 脳腫瘍標的バイオナノカプセルの作製

バリエーション III 型 EGF 受容体特異的に認識するモノクローナル抗体の作製を行ったところ、13 個の陽性が得られた。その内の 2 クローンがバリエーション III 型 EGF 受容体特異的に認識することをウエスタンブロッティングで確認した。この 2 つのクローン抗体を多量発現・精製した。その後、同抗体を BNC に付加させた。

BNC のプレ S1 領域を protein A で置換することにより様々な抗体を BNC に付加できることを確認した。また、プレ S1 領域以外の BNC 表面領域を protein A で置換した場合、抗体親和性が弱くなったり、腫瘍特異性が喪失したりすることから、プレ S1 領域の置換が最も効果的であることが判明した。ヒトバリエーション III 型 EGF 受容体特異的に認識するマウスモノクローナル抗体を付加したバイオナノカプセル (BNC) は、バリエーション III 型 EGF 受容体を高発現している Gli36 細胞内に高効率に導入されることが明らかになった。またその導入は、BNC の濃度に依存적であった。一方、このマウスモノクローナル抗体を付加した BNC は、正常細胞であるラットアストロサイト細胞への導入効率は、非常に低かった。以上の結果から、マウスモノクローナル抗体を付加した BNC が、脳腫瘍特異的に標的化することが示唆された。また、抗体を付加していない BNC は、Gli36 細胞内に導入されなかった。

本研究では、マウス個体における BNC の脳腫瘍標的化についても検討した。異所ならびに同所脳腫瘍モデルにおいて、マウスモノクローナル抗体を付加した BNC は両腫瘍モデルとも腫瘍細胞内に効率よく導入されていることが明らかになった。一方、抗

体を付加していない BNC は、脳腫瘍への集積像は認められなかった。

2. バイオナノカプセルへの抗癌剤ならびにボロン化合物の封入

抗 EGFR 抗体を付加した BNC に抗癌剤のドキシソルピシンを BNC 1 μg あたり 0.62 μg まで封入できることを確認した。またボロン化合物の BSH も BNC 内に導入させることに成功した。BSH の封入量は、BNC 1.0 μg あたり 0.25 μg であった。さらに、ドキシソルピシンを封入した BNC は、Gli36 細胞内には効率的に導入されるが、ラットアストロサイト細胞には、ほとんど導入されないことが確認された。

ドキシソルピシン封入 BNC は、ドキシソルピシン未封入 BNC と比較して、脳腫瘍細胞の増殖を有意に抑制した。また各濃度の抗腫瘍効果について検討した結果、濃度依存的に脳腫瘍の増殖を抑制した。さらに、抗 EGFR 抗体を付加した BNC と付加していない BNC で比較検討したところ、脳腫瘍細胞増殖抑制効果に差は認められなかった。また、ドキシソルピシン封入 BNC を投与された脳腫瘍細胞では、多数の細胞がアポトーシス様細胞死を呈していることが TUNEL 染色ならびに核染色にて明らかになった。

3. 抗脳腫瘍作用を有する抗癌ペプチドの作製

ヒト p53 アミノ酸配列の 361-381 番目に相当するペプチドに膜透過性ペプチドのポリアルギニン、TAT ペプチド、あるいは FHV ペプチドを付加した合成ペプチドを L-isomer ならびに光学異性体の D-isomer で合成することに成功した。さらにこれらペプチドにインフルエンザウイルスのヘマングルチニンサブユニット (HA2) をジスルフィド架橋で付加したペプチドの作製にも成功した。

L 体 p53 C 末端ペプチドに 9 個から成る

ポリアルギニンを付加したペプチド (1-10 μM) を Gli36 細胞の培養液中に添加し、その腫瘍細胞増殖抑制効果について WST アッセイにて検討した。その結果、この L 体ペプチドは腫瘍抑制効果が無いことが明らかになった。腫瘍細胞内における同ペプチド分解について検討したところ 30 分以内に分解されることが明らかになった。これらの結果から、腫瘍細胞内でペプチド分解を受け難いペプチドの開発が必要であると考えられた。そこでポリアルギニン付加 p53C 末端ペプチドを光学異性体の D 体で作製した。さらにペプチドが腫瘍細胞内に取り込まれた後、ライソソームで分解されないようにするためマクロピノソームを選択的に破壊する作用があるインフルエンザウイルスが発現するヘマングルチニンサブユニットペプチド (HA2) をポリアルギニン付加光学異性体 p53C 末端ペプチドに付加した。そして、このペプチドが腫瘍細胞内に効率よく導入されるか検討した。同ペプチドに FITC を付加し、脳腫瘍細胞への導入についてリアルタイムイメージング技術で検討した。その結果、同ペプチドが脳腫瘍細胞に効率よく導入されることが明らかになった。

また、このペプチドの抗腫瘍効果について検討した。ペプチドを株化脳腫瘍細胞の培地に添加し、細胞増殖抑制効果ならびにアポトーシス誘導効果について WST アッセイ、TUNEL 染色にて検討した。この光学異性体ペプチドは、濃度依存的に癌細胞増殖抑制作用ならびにアポトーシス誘導効果を示した。5 μM 以上の濃度で腫瘍細胞の培地に添加する 90%以上の腫瘍細胞が死滅した。

4. 蛋白質セラピー型ボロン化合物の作製

BSH とペプチドをジスルフィド結合にて結合させることにより、BSH にポリアルギニンもしくは SV40 が有する核移行シグナル (NLS) を付加した BSH 化合物の開発に成

功した。

同化合物を株化脳腫瘍細胞の培地に添加し、その細胞内への導入効率ならびに細胞内局在について BSH 特異抗体を用いて検討した。同 BSH 化合物は、腫瘍細胞内に効率よく導入されることが明らかになった。また、細胞内局在について検討したところ、大部分の BSH 化合物は細胞内に導入されていることが明らかになった。細胞膜上には認められなかった。

D. 考察

1. 脳腫瘍標的バイオナノカプセルの作製

抗 EGFR 抗体の BNC への付加が BNC の脳腫瘍標的化に非常に有効であることが明らかになった。パリアンアント III 型 EGFR は、正常細胞での発現はほとんど無いため、副作用の少ない脳腫瘍ターゲティング技術として期待できる。D 体で作製した抗腫瘍ペプチドは 1 回投与で 4 日ほど効果が持続することが明らかになった。我々の予測では、1 週間ほど効果が持続するのではと期待していたが、同ペプチドの代謝速度が予測より速いことが原因であると考えられる。今後、D 体ペプチドの代謝経路、代謝速度を明らかにすることが重要である。

また本研究により、BNC のプレ S1 領域の Protein A への置換が抗体付加のために有効であることが明らかになった。本技術を応用することにより BNC を様々な組織・器官に導入することが可能となり、DDS として大変有用な技術だと考えられる。また各種腫瘍の腫瘍表面マーカーに対応して抗体を変えることにより、脳腫瘍だけでなく様々な癌の標的化に応用できる技術であると考えられる。

2. バイオナノカプセルへの抗癌剤ならびにボロン化合物の封入

本研究で開発した抗 EGFR 抗体付加型 BNC に抗癌剤ならびにボロン化合物を封入する

ことに成功した。さらに抗癌剤封入 BNC が脳腫瘍細胞を標的化することもモデル動物実験により明らかにすることができた。本研究成果は、持続性脳腫瘍治療薬の開発に応用することが期待される。

現在悪性脳腫瘍に対するボロン中性子捕捉療法は、我が国が中心となり発展してきており臨床試験が進行している。中性子捕捉療法は、抗癌剤治療あるいは放射線療法などと比較して、有意に延命効果が高い。しかし、現状では患者を寛解まで至らせることは困難である。これは、現在使用されているボロン化合物が、脳腫瘍内に高効率に導入されないことに起因する。本研究では、脳腫瘍に特異的にボロン化合物を導入できる技術開発に成功した。脳腫瘍に選択的に導入できるボロン化合物は、中性子の効果を増幅させ、副作用を低下させることが期待できる。

今後、ボロン化合物を封入したバイオナノカプセルを脳腫瘍モデルマウスに投与後、加速器により中性子線を照射し、抗腫瘍効果について検討することが重要である。

3. 抗脳腫瘍作用を有する抗癌ペプチドの作製

HA2 を付加していない膜透過性 p53C 末端ペプチドは、D 体、L 体とも抗腫瘍細胞効果を発揮しないことが判明した。HA2 を付加した透過性 p53C 末端ペプチドでは、L 体では高濃度では抗腫瘍効果が認められたが、D 体よりその効果は小さかった。一方、D 体で合成した p53 C 末端ペプチドは長期間抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。以上のことから、膜透過性 p53C 末端ペプチドは細胞内に取り込まれた後、マクロピノソームに取り込まれ、そしてリソソームで速やかに分解されることが推察された。HA2 ペプチドは、ペプチドのマクロピノソームからの離脱を促進し、D 体で合成したペプチドはペプチド分解を受けにくいいため長期

間抗腫瘍効果を発揮したことが推察された。以上の結果より、HA2 付加型膜透過性光学異性体 p53C 末端ペプチドが長期持続的に抗腫瘍効果を発揮する脳腫瘍治療薬になる可能性が示唆された。

今後、このペプチドを腫瘍細胞に標的化する技術の開発が重要であると思われる。

4. 蛋白質セラピー型ボロン化合物の作製

BSH に膜透過性ペプチドを付加したこれまでに無い新しい BSH を作製することに成功した。現在臨床研究に使用されているボロン化合物 (BSH と BPA) は、細胞膜透過性に乏しく中性子捕捉療法に使用するためには大量投与しなければならなかった。蛋白質セラピー型ボロン化合物は、効率よく細胞内に導入されるため少量でも中性子補足療法の効果が期待できると考えている。今後本化合物を臨床研究、臨床試験にもっていくためには、簡便で多量に合成出来る方法を開発することが重要である。

E. 結論

抗 EGFR 抗体付加型バイオナノカプセル (BNC) に抗癌剤のドキシソルピシンならびにボロン化合物の BSH を封入することに成功した。またこのバイオナノカプセルが脳腫瘍特異的に標的化することを *in vitro*、*in vivo* で示すことができた。

HA2 付加型透過性光学異性体 p53C 末端ペプチドの開発に成功した。このペプチドが長期間持続して強い抗腫瘍作用を有していることを明らかにした。

蛋白質セラピー型ボロン化合物の合成に成功した。本化合物が、腫瘍細胞内に効率よく導入されることを明らかにした。

本研究で開発することに成功した上記の 3 つの化合物が、ナノ医療の医薬品になり得ることを示すことができた。今後毒性試験などの前臨床試験を実施予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kuriyama M. et al. A cell-permeable NFAT inhibitor peptide prevents pressure-overload cardiac hypertrophy. **Chem. Biol. Drug Des.** 67, 238-243 (2006).
2. Inoue M. et al. p53 protein transduction therapy: Successful targeting and inhibition of the growth of the bladder cancer cells. **Eur. Urol.** 49, 161-168 (2006).
3. Yagi H. et al. 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, 1315-1320 (2006).
4. Shishido T. et al. Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line. **Appl Microbiol Biotechnol.** 73, 505-511 (2006).
5. Murata H. et al. Denatured and Reversibly Cationized p53 Readily Enters Cells and Simultaneously Folds to the Functional Protein in the Cells. **Biochemistry** 45, 6124-6132 (2006).
6. Sanderson M.P. et al. Hydrogen peroxide and endothelin-1 are novel activators of betacellulin ectodomain shedding. **J Cell Biochem.** 99, 609-623 (2006).
7. Hoshimoto S. et al. Mechanisms of the growth-inhibitory effect of the RNase-EGF fused protein against EGFR-overexpressing cells. **Anticancer Res.** 26, 857-863 (2006).
8. Yu D. et al. Engineered bio-nanocapsules, the selective vector for drug delivery system. **IUBMB Life.** 58, 1-6 (2006).
9. Kameyama S. et al. Distribution of Immunoglobulin Fab Fragment Conjugated with HIV-1 REV Peptide Following Intravenous Administration in Rats. **Mol. Pharm.** 3, 174-180 (2006)
10. Akita H. et al. Evaluation of the Nuclear

Delivery and Intra-nuclear Transcription of Plasmid DNA Condensed with μ (μ) and NLS- μ by Cytoplasmic and Nuclear Microinjection: A Comparative Study with Poly-L-lysine. **J. Gene Med.** 8, 198-206 (2006).

11. Ikramy A. et al. High Density of Octaarginine Stimulates Macropinocytosis Leading to Efficient Intracellular Trafficking for Gene Expression. **J. Biol. Chem.** 281, 3544-3551 (2006).
12. Al-Taei S. et al. Intracellular Traffic and Fate of Protein Transduction Domains HIV-1 TAT Peptide and Octaarginine. Implications for their Utilization as Drug Delivery Vectors. **Bioconjug. Chem.** 17, 90-100 (2006).
13. Nakamura Y. et al. Significant and Prolonged Antisense Effect of a Multifunctional Envelope-type Nano Device Encapsulating Antisense Oligodeoxynucleotide. **J. Pharm. Pharmacol.** 58, 431-437 (2006).
14. Nakamura T. et al. Delivery of Condensed DNA by Liposomal Non-viral Gene Delivery System into Nucleus of Dendritic Cells. **Biol. Pharm. Bull.** 29, 1290-1293 (2006).
15. Iwasa A. et al. Cellular Uptake and Subsequent Intracellular Trafficking of R8-liposomes Introduced at Low Temperature. **Biochim. Biophys. Acta - Biomembranes** 1758, 713-720 (2006).
16. Kobayashi K. et al. Control of dopamine-secretion by Tet-Off system in an in vivo model of parkinsonian rat. **Brain Res.** 1102, 1-11 (2006).
17. Tamiya T. et al. Successful chemotherapy for congenital malignant gliomas: a report of two cases. **Pediatr Neurosurg.** 42, 240-244 (2006).
28. Yasuhara T. et al. Ex vivo gene therapy: transplantation of neurotrophic factor-secreting cells for cerebral ischemia. **Front Biosci.** 11,

760-775 (2006).

19. Satoh T. et al. Differential diagnosis of the infundibular dilation and aneurysm of internal carotid artery: assessment with fusion imaging of 3D MR cisternography/angiography. **AJNR Am J Neuroradiol.** 27, 306-312 (2006).
20. Tokunaga K. et al. Transient memory disturbance after removal of an intraventricular trigonal meningioma by a parieto-occipital interhemispheric precuneus approach. **Surg Neurol.** 65, 167-169 (2006).
21. Muraoka K. et al. The high integration and differentiation potential of autologous neural stem cell transplantation compared with allogeneic transplantation in adult rat hippocampus. **Exp Neurol.** 199, 311-327 (2006).
22. Ogawa N. et al. Novel protein transduction method by using 11R. An effective new drug delivery system for the treatment of cerebrovascular diseases. **Stroke** 38, 1354-1361 (2007).
23. Iwasaki Y. et al. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. **Cancer Gene Ther.** 14, 74-81 (2007).
24. Wu YM. et al. Truncations of amphiphysin I by calpain inhibit vesicle endocytosis during neural hyperexcitation. **EMBO J.** 26, 2981-2990 (2007).
25. Yamada H. et al. Amphiphysin I is important for actin polymerization during phagocytosis. **Mol. Cell Biol.** 18, 4669-4680 (2007).
26. Liang, S. et al. Major Cdk5-dependent phosphorylation sites of amphiphysin 1 are implicated in the regulation of the membrane binding and endocytosis. **J. Neurochem.** 102, 1466-1476 (2007).
27. Tsutsui Y. et al. Development of bionanocapsules targeting brain tumors. **J. Control. Release** 122, 159-164 (2007).

28. Wu Y-M. et al. Inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids on apoptosis induced by etoposide, okadaic acid and AraC in neuro2a cells. **Acta Medica Okayama** 61, 147-152 (2007).
29. Wu H-Y. et al. Calpain-calcineurin signaling in the pathogenesis of calcium-dependent disorder. **Acta Medica Okayama** 61, 123-137 (2007).
30. Fujisawa T. et al. Colocalization of oxytocin and phosphorylated form of elongation factor 2 in the rat hypothalamus. **Acta Medica Okayama** 61, 161-166 (2007).
31. Kitani K. et al. A Cdk5 inhibitor enhances induction of insulin secretion by exendin-4 both in vitro and in vivo. **J. Physiol. Sci.** 57, 235-239 (2007).
32. Watanabe K et al. Growth factor induction of Cripto-1 shedding by glycosylphosphatidylinositol-phospholipase D and enhancement of endothelial cell migration. **J. Biol. Chem.** 282, 31643-31655 (2007).
33. Yamada H et al. 'Crystal lattice engineering,' an approach to engineer protein crystal contacts by creating intermolecular symmetry: Crystallization and structure determination of a mutant human RNase 1 with a hydrophobic interface of leucines. **Protein Sci.** 16, 1389-1397 (2007).
34. Nagaoka T et al. Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification. **J. Control. Release** 118, 348-356 (2007).
35. Hashimoto H et al. Characteristics of hollow microtubes consisting of amorphous iron oxide nanoparticles produced by iron oxidizing bacteria, *Leptothrix ochracea*. **J. Magnetism Magnetic Mat.** 310, 2405-2407 (2007).
36. Kitamura RI et al. Conophylline and

Betacellulin-delta4: an Effective Combination of Differentiation Factors for Pancreatic beta Cells. **Endocr J.** 54, 255-264 (2007).

37. Hayashi Y. et al. Development of oligoarginine-drug conjugates linked to new peptidic self-cleavable spacers toward effective intestinal absorption. **Bioorg Med Chem Lett.** 17, 5129-5132 (2007).

38. Maiti KK. et al. Guanidine-containing molecular transporters: sorbitol-based transporters show high intracellular selectivity toward mitochondria. **Angew Chem Int Ed Engl.** 46, 5880-5884 (2007).

39. Yan W. et al. Alpha-helical linker of an artificial 6-zinc finger peptide contributes to selective DNA binding to a discontinuous recognition sequence. **Biochemistry.** 46, 8517-8524 (2007).

40. Futaki S. et al. Ligand-induced extramembrane conformation switch controlling alamethicin assembly and the channel current. **Chem Biodivers.** 4, 1313-1322 (2007).

41. Nakamura Y. et al. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA. **J Control. Release** 119, 360-367 (2007).

42. Homhuan A. et al. New packaging method of mycobacterial cell wall using octaarginine-modified liposomes: enhanced uptake by and immunostimulatory activity of dendritic cells. **J Control. Release** 120, 60-69 (2007).

43. Kimura T. et al. NMR investigation of the electrostatic effect in binding of a neuropeptide, achatin-I, to phosphatidylcholine bilayers. **J Phys. Chem. B** 111, 3831-3838 (2007).

44. Kameyama S. et al. Acid wash in determining cellular uptake of Fab/cell-permeating peptide conjugates. **Biopolymers** 88, 98-107 (2007).

45. Fretz MM. et al. Temperature-, concentration- and cholesterol-dependent translocation of L- and D-octa-arginine across the plasma and nuclear membrane of CD34+ leukaemia cells. **Biochem J.** 403, 335-342 (2007).

46. Nakase I. et al. Interaction of arginine-rich peptides with membrane-associated proteoglycans is crucial for induction of actin organization and macropinocytosis. **Biochemistry.** 46, 492-501 (2007).

47. Miyatake S. et al. Fluorescence of non-neoplastic, magnetic resonance imaging-enhancing tissue by 5-aminolevulinic acid: case report. **Neurosurgery** 61, E1101-1103 (2007).

48. Miki Y. et al. Vascular endothelial growth factor gene-transferred bone marrow stromal cells engineered with a herpes simplex virus type 1 vector can improve neurological deficits and reduce infarction volume in rat brain ischemia. **Neurosurgery** 61, 586-594 (2007).

49. Ariyoshi Y. et al. Boron neutron capture therapy using epithermal neutrons for recurrent cancer in the oral cavity and cervical lymph node metastasis. **Oncol. Rep.** 18, 861-866 (2007).

50. Miyatake S. et al. Boron neutron capture therapy for malignant tumors related to meningiomas. **Neurosurgery** 61, 82-90 (2007).

51. Tanaka H. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by trandolapril after middle cerebral artery occlusion in rats. **Hypertens. Res.** 30, 469-475 (2007).

52. Kajimoto Y. et al. Use of 5-aminolevulinic acid in fluorescence-guided resection of meningioma with high risk of recurrence. Case report. **J. Neurosurg.** 106, 1070-1074 (2007).

53. Tamura Y. et al. Endoscopic identification and biopsy sampling of an intraventricular

malignant glioma using a 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence imaging system. Technical note. **J. Neurosurg.** 106, 507-510 (2007).

54. Inoue H. et al. Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. **J. Neurooncol.** 83, 223-231 (2007).

55. Yokoyama K. et al. Analysis of boron distribution in vivo for boron neutron capture therapy using two different boron compounds by secondary ion mass spectrometry. **Radiat. Res.** 167, 102-109 (2007).

56. Bokui N. et al. Involvement of MAPK signaling molecules and Runx2 in the NELL1-induced osteoblastic differentiation. **FEBS Lett.** 582, 365-371 (2008).

G. 知的所有権の取得状況
現在のところ該当無し。