

the basis for subsequent reactions to attach a variety of substances, in this case fluorescent dyes which can be reacted to amine groups on the QD surface via carboxy groups on the dye molecule using standard NHS-EDC linkage chemistry.

3. Assessment of Delivery to Mitochondria:

Delivery to mitochondria will firstly be assessed by intrinsic fluorescence of the quantum dot and/or the attached fluorescent molecule. Using confocal microscopy, this will be overlaid with known mitochondrial targeting dyes (e.g. mitotracker). To assess the localization of the QDs in more detail we will carry out transmission electron microscopy of cells and view the location of the QDs in the organelle in detail.

4. Toxicity tests: Toxicity will be assessed by adding the QD system to eukaryotic cells in culture and carrying a standard colorimetric assay in which the colour change of a tetrazolium salt can be correlated with activity of cells.

C. 研究結果

Since beginning the project I earlier in 2008 we have made the following progress:

1. With collaborators (Richard Tilley School of Chemical and Physical Sciences,

Victoria University of Wellington, New Zealand) we have designed QD systems that, upon delivery to mitochondria will give a dual signal, one intrinsic to the QD itself and a second due to modified Rhod-2 dye which will be attached to the QD surface (See Figure 1 for full explanation). The Silicon QDs are just 2 nm and diameter and Si rather than the more usual materials (e.g. cadmium selenide) were chosen as Si is likely to be considerably less toxic.

2. With collaborators (Yuma Yamada, Hokkaido University) we have carried out initial experiments to test the incorporation of the Si QDs into the MITO-Porter mitochondrial delivery system. MITO-Porter is novel lipid-based delivery system able to target mitochondria^[1]. Initial results show that the QDs can indeed be incorporated into the MITO-Porter System.

3. Working with collaborators at Victoria University of Wellington, New Zealand, who have carried out the inorganic synthesis, we have produced 2 nm QDs with modified surfaces (details currently under preparation for patent application). Modifications include amine groups which will allow attachment of Rhod-3 dye (Figure 2) Rhod-2 is a well-known dye that is

responsive to calcium. Calcium concentrations within mitochondria are very important in apoptosis. Producing this Si QD-Rhod-2 hybrid will give a Mitochondria-targeted dual dye system. Such a dye may be useful in giving the ability to detect calcium levels in mitochondria with less background noise and greater signal intensity than existing dyes. It will also allow the delivery of insoluble dyes into the mitochondria, something hitherto not possible. Finally, it will act as a start point for production of further modified QDs able to deliver more diverse and complex sensing systems and devices.

In the next year we hope to finalize synthesis of the QDs and begin testing *in vivo* and *in vitro* properties and toxicity.

D. 考察

1. Production of a dual dye system

2 Incorporation into MITO-Porter. The ability of MITO-Porter to deliver to the mitochondrial matrix has already been shown, but the efficiency is not yet clear. This may need to be improved if it is to be used commercially or therapeutically. Equally, while initial demonstration of encapsulation of QDs into MITO-porter has been successful,

efficiency of encapsulation will need to be improved before the system is useful.

3. Potential future uses:

In the field of therapeutics, mitochondria offer a good target for imaging and targeting of drug molecules as they are implicated in many diseases and aging. Quantum dots have many favourable characteristics for imaging work such as high brightness and low bleaching and could possibly be used as both *in vitro* and *in vivo* imaging systems, identifying for example diseased or malfunctioning mitochondria or related diseases such as cancer cells in which mitochondria are more active. In addition the system could be adapted to deliver quantum dot based therapeutics as it is known that nano sized inorganic particles can be useful as therapeutic agents (both carbon nanotubes and gold nanoparticles have recently been shown to be useful in thermal destruction of tumours).

4. Future Work plan

We will firstly work with the Tilley group to provide suitable solvent soluble silicon quantum dots and with the Harashima group who will further optimize incorporation of the QDs into the MITO-Porter system.

Once high efficiency incorporation is achieved we will carry out the toxicity tests (mentioned above) to assess the toxicity of both naked and encapsulated quantum dots on eukaryotic cells.

Next we will attach a dye (initially Rhod-2, see figure 1

E. 結論

In conclusion, this first year has research has proceeded well with initial experiments and preparations suggesting that we will be able to reach our goal of testing the toxicity and function of a mitochondrial delivery system for modified QDs.

F. 健康危険情報

In this current research we are not using substances that present a particular health risk.

G. 研究発表

1.論文発表

なし

(総説)

1.Heddle, J. G. (2008). Protein cages, rings and tubes: useful components of future nanodevices? *Nanotechnology, Science and Applications* **1**, 67-78.

2 学会発表

(国内学会)

1. March 2008 : Japan Association of applied Physics. Topic: Constructing nanoelectronic devices using proteins

2. 12-6-08 : 8th Protein Society of Japan Meeting, Tokyo, Topic:

Bionanoengineering with TRAP

(国際学会)

1. March 2008: Global COE International Symposium: Topic: Bionanoengineering with TRAP

(知的所有権の出願・取得状況)

1) 特許

なし

2) その他なし

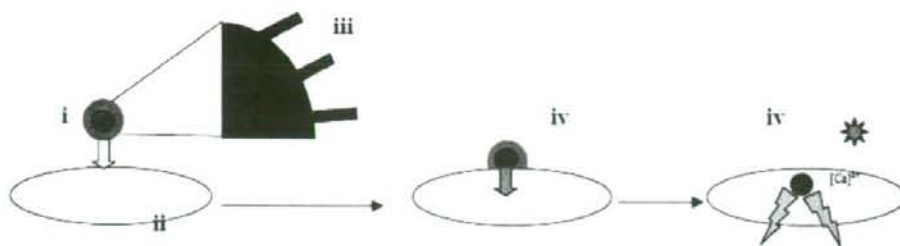


Figure 1: The MITO-porter system (i) is made of layers of different lipids with specificity to different biological membranes. A modified QD (blue) will be inserted into MITO-porter. The QD will be delivered to the mitochondria (ii). The surface of the QD is modified with rhodamine dye (purple in iii). In E, MITO porter fuses with the mitochondrial membrane and releases the QD. Once inside the mitochondria, the QD will give two fluorescent signals (iv), one intrinsic to the QD itself, another due to the rhodamine dye which is dependent on calcium levels.

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

研究要旨

アテロコラーゲンは様々な核酸物質と静電的な結合で複合体を形成し、細胞や組織へと内包した核酸類をデリバリーする。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目的として、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。このベクターとアテロコラーゲンの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、その動物個体レベルでのデリバリー解析の結果、この複合体は乳がんの腫瘍部位に特異的に集積し、その他の前立腺がんや大腸がんには無効であった。

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。

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。

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。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。その目的達成に向けて、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った。動物個体に、ルシフェラーゼを発現するように工夫したヒト前立腺がん細胞、乳がん細胞、大腸がん細胞を移植後、in vivo イメージング法により動物個体の腫瘍形成を追跡するとともに、このルシフェラーゼに対する siRNA ベクターを開発し、腫瘍局所に投与した。

C. 研究結果

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(東京工業大学・半田宏教授との共同研究の一部)。このベクター(ルシフェラーゼ siRNA 搭載)とアテロコラーゲンの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た。イメージング解析の結果、本新規ベクター複合体はヒト乳がんの腫瘍に特異的に作用し、ルシフェラーゼの発現を顕著に抑制したが、それ以外の腫瘍に対しては無効であった。

昨年度の成果で、アテロコラーゲン分子の修飾可能な側鎖はある程度限られていることがわかっている。本年度はこれらの側鎖に肝がんを高発現するトランスフェリン受容体に対する抗体を修飾した。その結果、培養細胞を用いた検討では、このトランスフェリン受容体特異的なアテロコラーゲンと siRNA との複合体は、肝がん細胞株に取り込まれることが判明した。しかし、対照とした乳がん細胞株に比べて、その効率は1.6倍ほどであり、顕著な特異性とは言いがたい結果であった。

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、ツールの基盤構築、ならびに動物モデルでの実証研究の段階に入ることが出

来た。ただ、アテロコラーゲン自体を修飾してがん特異性を高める方法論の確立には、十分な成果が出せなかった。

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 および miRNA 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く、本年度はそのための大きな基盤データを得ることが出来た。

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)

- Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, Yamamoto Y, Yoshida T, Nishio K, Nagahara S, Kato K, Ochiya T. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat Med*. 14: 939-948, 2008.
- Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, Ochiya T. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. *IDrugs*, 11:274-278, 2008
- Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29:1134-1138, 2008
- Kodama M, Takeshita F, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Pancreatic endocrine and exocrine cell ontogeny from renal capsule-transplanted embryonic stem cells in streptozocin-injured mice. *J Histochem Cytochem*, 56:33-44, 2008
- Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*, 142:293-300, 2008
- 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*, 28:286-294, 2008
- Takahashi R, Kanesashi S, Inoue T, Enomoto T, Kawano M, Tsukamoto H, Takeshita F, Imai T, Ochiya T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J Biotechnol*, 135:385-392, 2008
- Takeuchi T, Ochiya T, Takezawa T. Tissue array substratum composed of histological sections: a new platform for orienting differentiation of embryonic stem cells towards hepatic lineage. *Tissue Eng Part A*, 14:267-274, 2008
- Ueda S, Kawamata M, Teratani T, Shimizu T, Tamai Y, Ogawa H, Hayashi K, Tsuda H, Ochiya T. Establishment of rat embryonic stem cells and making of chimera rats. *PLoS ONE*, 3, 2008
- Yamamoto Y, Banas A, Murata S, Ishikawa M, Lim CR, Teratani T, Hatada I, Matsubara K, Kato T, Ochiya T. A comparative analysis of the transcriptome and signal pathways in hepatic differentiation of human adipose mesenchymal stem cells. *FEBS J*, 275:1260-1273, 2008
- Yu D, Sekine E, Fujimori A, Ochiya T, Okayasu R. Down regulation of BRCA2 causes radio-sensitization of human tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci*, 99:810-815, 2008
- Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res*.

- 66: 7532-7539, 2006.
- 1 3. Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes & Dev.* 20: 1321-1330, 2006.
 - 1 4. ○ Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* 97: 689-696, 2006.
 - 1 5. Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131: 14-29, 2006.
 - 1 6. Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in *Dicer1*-hypomorphic mice. *Cytogenet Genome Res.* 113: 138-143, 2006.
2. 総説・(欧文と和文、分けて下さい)
(欧文)
Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Proc of SPIE*, 6868, 2008
 3. 著書・(欧文と和文、分けて下さい)
 4. 学会発表

(海外)

1. Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. RNAi World Congress 2008, Boston, USA
2. Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Progress in Biomedical Optics and Imaging - SPIE 2008*, San Jose, CA, USA
3. Ochiya T. Therapeutic potential of adipose tissue derived mesenchymal stem cells in liver disease. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA
4. Yamamoto Y, Ochiya T. Global expression profiling of miRNA in liver development. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA
5. Ochiya T. Therapeutic potential of adipose derived stem cells on liver failure. The 2nd International Symposium on Regenerative Medicine and Stem Cell Research. 2008, Seoul, Korea
6. Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA against cancer. The Right

RNAi Meeting in 2008, Brussels, Belgium

(国内)

1. MicroRNAs AS THERAPEUTIC TARGETS: POTENTIAL EFFECT ON PROSTATE CANCER MANAGEMENT. Takahiro Ochiya 第 14 回日本遺伝子治療学会総会 (2008.6.13-15 札幌)
2. 幹細胞の持つ肝細胞分化能と肝疾患治療効果、落谷孝広、第 15 回肝細胞研究会総会 (2008.6.27-28 静岡)
3. RNAi によるがんの予防・診断・治療 (シンポジウム)、落谷孝広、第 36 回薬物活性シンポジウム (2008.10.23-25 徳島)
4. RNAi-mediated silencing of cancer. Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
5. Identification of MicroRNAs Involved in Drug Resistance in Human Breast Cancer Cell Lines. Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Kaho Minoura, Ryou-u Takahashi, Nobuyuki Kosaka, Kimi Honma, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
6. Detection of lung metastasis-related microRNA in human osteosarcoma cell. Mitsuhiro Osaki, Fumitaka Takeshita, Hisao Ito, Mitsuo Oshimura, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
7. The inhibition of human prostate cancer cells on bone-metastatic site by treatment with miR-16. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
8. Generation of Oct-4/Venus Transgenic Rat for Establishment of Embryonic Stem Cells. Masaki Kawamata, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
9. Identification and characterization of a novel tumor suppressor gene on chromosome arm 18q in human pancreatic cancer. Satoru Yokoyama, Fuyuhiko Motoi, Hideo Ohtsuka, Masaharu Ishida, Nobukazu Tsukamoto, Naoyuki Kaneko, Shinichi Egawa, Michiaki Unno, Toru Furukawa, Makoto Sunamura, Takahiro Ochiya, Akira Horii. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
10. Development of a mouse model for suppression of peritoneal metastasis for diffuse-type gastric cancer. Takeshi Fujita,

- Fumitaka Takeshita, Kazuyoshi Yanagihara, Hiroyuki Ohta, Tomoko Mabuchi, Kazuhiko Aoyagi, Takeo Fukagawa, Hitoshi Katai, Takeshi Sano, Takahiro Ochiya, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
11. Potential of miRNA as cancer diagnosis and a target for therapy. Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
12. Highly efficient microRNA delivery to tumor metastasis. Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008.10.28-30 名古屋)
13. 「Organ Biology における再生医学の役割」-ヒト間葉系幹細胞による肝再生医療の実現に向けて-、落谷孝広、(シンポジウム) 第 35 回日本臓器保存生物医学会定期学術集会 (2008.11.22-23 東京)
14. 未分化ラット ES 細胞の樹立を目指した Oct4/Venus トランスジェニックラットの作成. 川又理樹, 清水卓, 玉井淑貴, 落谷孝広. 第 31 回日本分子生物学会 (2008.12.9-12 神戸)
15. ヒト乳がん細胞株における薬剤抵抗性に関与する miRNA の同定. 高橋陵宇, 竹下文隆, 山本雄介, 箕浦加穂, 田谷敏貴, 小坂展慶, 落谷孝広. 第 31 回日本分子生物学会 (2008.12.9-12 神戸)
16. ヒト骨肉腫細胞における肺転移関連マイクロ RNA の検出. 尾崎充彦, 竹下文隆, 小坂展慶, 井藤久雄, 押村光雄, 落谷孝広. 第 31 回日本分子生物学会 (2008.12.9-12 神戸)

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
研究協力者	鈴木 朗	国立循環器病センター研究所・特任研究員
研究協力者	宮田 浩子	国立循環器病センター研究所・研究補助員
研究協力者	神野 桂子	国立循環器病センター研究所・研究補助員
研究協力者	合田 睦美	国立循環器病センター研究所・研究補助員
研究協力者	井上 麻衣	国立循環器病センター研究所・研究補助員

研究要旨

有効で安全性が高く、将来の臨床応用を目指して我々は、poly(ethylene glycol, PEG)-ポリカチオンのブロック共重合体を用いた高分子ミセル型ナノ構造デバイスの開発を行っている。ポリカチオン部分に P[Asp-(DET)]を用いて PEG-b-P[Asp-(DET)]にすることにより、in vivo での遺伝子導入効率を飛躍的に上昇することが昨年度までの研究成果より明らかになってきた。さらに、肺高血圧症モデル動物に対して PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いたアドレノメデュリン遺伝子を導入することにより、明らかな治療効果を得たこともすでに報告した。今回は、今後の臨床応用への展開に際して、安全性の検討を行なった。すなわち、ポリマーの精製法および重合度の相違するブロック共重合体について in vivo 実験による遺伝子導入効率測定および毒性試験を行い、経気管的遺伝子導入に最適な条件を検証し、臨床応用へのステップとした。

A. 研究目的

本研究は、poly(ethylene glycol, PEG)-ポリカチオンのブロック共重合体を用いた高分子ミセル型ナノ構造デバイスを用いた遺伝子導入による難治性循環器疾患に対する新しい治療法の開発を目的としている。ポリカチオン部分に P[Asp-(DET)]を用いて PEG-b-P[Asp-(DET)]にすることにより、in vivo での遺伝子導入効率を飛躍的に上昇することを昨年度までの研究成果より明らかにした。肺高血圧症モデル動物に対して PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いたアドレノメデュリン遺伝子を導入することにより、明らかな治療効果を得ており、臨床応用への展開が現実的になってきている。今回我々は、ポリマーの精製法および重合度の相違するブロック共重合体について in vivo 実験によ

る遺伝子導入効率測定および投与後の肺の炎症性サイトカイン mRNA 定量による毒性試験を行い、経気管的遺伝子導入に最適な条件を検証し、臨床応用へのステップとした。

B. 研究方法

1. in vivo 遺伝子投与による遺伝子発現量の検討

ICR マウスに麻酔下で精製法の異なる PEG-b-P[Asp-(DET)](従来法、Et₂O 精製後、AcOH 精製後)を用いて、N/P 比を変化させ、ルシフェラーゼ DNA との complex を作製し、経肺投与後、一定期間後に両肺を採取してホモゲナイズし、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性の測定を行なった。

2. in vivo 遺伝子投与による炎症性サイ

トカイン遺伝子発現量の検討

ICR マウスに麻酔下で精製法の異なる PEG-b-P[Asp-(DET)](従来法, Et₂O 精製後, AcOH 精製後)を用いて, N/P 比を変化させ、ルシフェラーゼ DNA との complex を作製し、経肺投与後、一定期間後に両肺を採取して液体窒素中で凍結し、-80℃保存した。凍結肺より RNA を精製し、reverse transcriptase により cDNA に逆転写を行い、real time RT-PCR を用いて炎症性サイトカイン mRNA (TNF- α 、IL-1 β および IL-6) 発現量を測定した。

C. 研究結果

PEG-b-P[Asp-(DET)]の精製法を従来法, Et₂O 法 (エーテルによる再沈で回収), AcOH 法 (酢酸を用いてクエンチ) を用いて精製した後、ルシフェラーゼ遺伝子発現を定量したものを図 1 に示す。

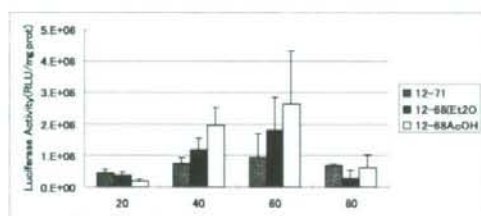


図 1 PEG-b-P[Asp-(DET)]の精製法、N/P 比別 in vivo 遺伝子発現

精製法を変更してホモポリマーの混入をなくすことによって、特に N/P 比 40 および 60 において遺伝子発現量を高率にすることができた。ポリマー投与後 1 日目の炎症性サイトカインの発現量を図 2 および図 3 に示す。

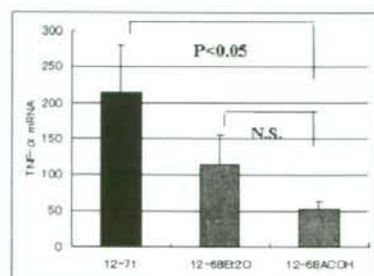


図 2 PEG-b-P[Asp-(DET)]の精製法別炎症性サイトカイン(TNF- α)遺伝子発現量

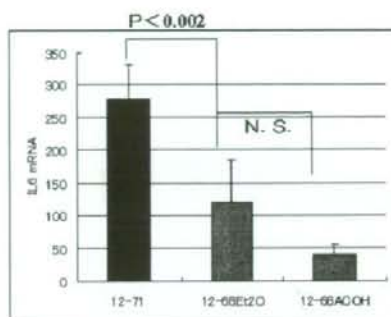


図 3 PEG-b-P[Asp-(DET)]の精製法別炎症性サイトカイン(IL-6)遺伝子発現量

炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量は、エーテルおよび酢酸による精製で、低く抑制することができた。これらの結果から、精製過程を加えてホモポリマーを出来るだけ減少させることにより、DNA コンプレックスを投与後の肺における遺伝子発現量を増加し、なおかつ炎症を抑えることができることがわかった。次に、それぞれの方法を用いて精製後のポリマーを投与後のマウスの生存率を図 4 に示す。

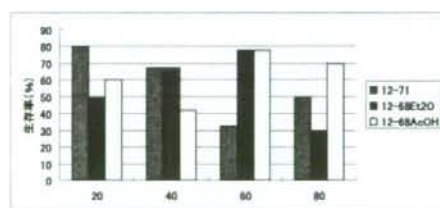


図 4 PEG-b-P[Asp-(DET)]の精製法、N/P 比別生存率

エーテルによる再沈、あるいは酢酸によるクエンチによってポリマーを精製する過程を加えることにより、投与後のマウスの生存率を改善することができた。

次に、重合度の違いによる in vivo 遺伝子発現量および炎症の惹起への影響について検討した。実験には酢酸クエンチによる精製後のポリマーを用いて、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量、および投与後の肺における炎症性サイトカイン遺伝子の発現量を検討した。PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長、N/P 比別 in vivo 遺伝子発現量を図 5 に示す。

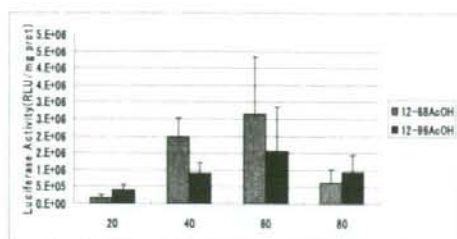


図5 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長、N/P 比別 in vivo 遺伝子発現

in vitro においては、ポリマーの鎖長の長いほうが遺伝子発現量は高いことは以前に報告したが、in vivo においては、98 マーよりは 68 マーのほうが発現量が高いことがわかった。ポリマーの鎖長による炎症性サイトカイン遺伝子の発現を図6、7に示す。

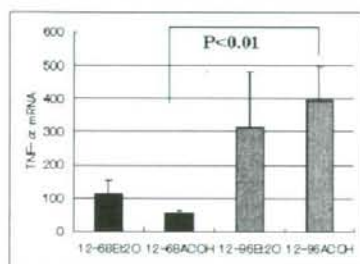


図6 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長別炎症性サイトカイン(TNF-α)遺伝子発現

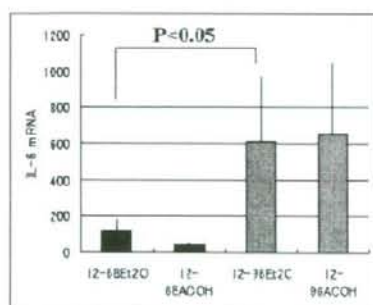


図7 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長別炎症性サイトカイン(IL-6)遺伝子発現

68 マーに比べて 96 マーのポリマー投与により、炎症性サイトカインである TNF-α、IL-6 の mRNA 発現量は、極めて低値であることがわかった。次に、それぞれの重合度のポリマーを投与後のマウスの生存率を図

8に示す。

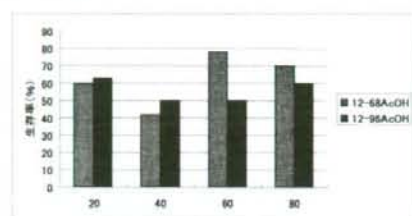


図8 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長、N/P 比別生存率

ポリマーの重合度を 96 マーから 68 マーに短くすることによって、投与後のマウスの生存率を改善することができた。

D. 考察

1. 達成度について

poly(ethylene glycol, PEG)-ポリカチオンのブロック共重合体を用いた高分子ミセル型ナノ構造デバイスを用いた遺伝子導入による難治性循環器疾患に対する新しい治療法の開発を目的としている。本年度の研究成果により、これまで問題となっていた遺伝子導入後の臓器における炎症の惹起のメカニズムが明らかになった。ホモポリマーを除去するステップである精製過程を加えることにより、遺伝子導入後の臓器において炎症性サイトカインの mRNA 発現を極端に抑制することができた。また、遺伝子導入後のマウスの生存率を改善することも可能になった。さらに、ポリマーの重合度を短くすることにより、遺伝子導入後の臓器において炎症性サイトカインの mRNA 発現を極端に抑制することができた。また、遺伝子導入後のマウスの生存率を改善することも可能になった。

我々は、肺高血圧症モデルラットに対する PEG-PAsp(DET)を用いたアドレノメデュリン遺伝子導入による治療効果をすでに得ているが、本ベクターの臨床応用にあたって問題となる安全性の検討をすすめることができたことは、実際の臨床応用に向けての大きな進歩となるといえる。

2. 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子導入ベクターとして以前はウィルスベクターを用いられていたが、安全性に懸念が広がっている昨今、合成ベクターの

臨床応用に注目が集まっている。本研究では、合成ベクターによる遺伝子導入によって、既にモデル動物の病態を改善できることがわかっており、さらに安全性の検討を行ったものである。合成ベクターの世界でも、最先端の技術であり、臨床応用が待たれている。

3) 今後の展望について

モデル動物を用いた病態の改善、安全性の検討を行っており、本研究期間終了後には前臨床試験にはいる予定である。

E. 結論

PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いた遺伝子導入法の安全性の検討を行い、より安全で確実に遺伝子導入を行なう条件を得た。

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

学会発表

《国内学会》

1. Tuyooshi Yamazaki, Masato Tamura, Motoi Oishi, Mariko Harada-Shiba, Akihiko Kikuchi, Yukio Nagasaki ; Enhanced Serum Cholesterol Reduction in Vivo by PEGylated Nanogels Containing Quaternary Polyamine Core as a Bile Acid Adsorbent, 3rd International Symposium on Atomic Technology / 3rd Polyscale Technology Workshop, 2009.3 東京

1. 斯波真理子 ; ワークショップ 家族性高コレステロール血症の小児期における薬物治療 追加発言
第 22 回日本小児脂質研究会、2008.12

東京

2. 斯波真理子 ; 家族性高コレステロール血症のガイドライン、ランチョンセミナー

2008.12 東京

3. 斯波真理子、杉沢貴子、榎野久士、南雲彩子、友池仁暢、横山信治 ; 家族性高コレステロール血症 (FH) の最近の動向

第 29 回日本アフェレーシス学会学術大会、シンポジウム 2008.11 広島

4. 榎野久士、南雲彩子、杉沢貴子、中濱肇、吉政康直、斯波真理子

第 29 回日本アフェレーシス学会学術大会、シンポジウム 2008.11 広島

5. 渡部和人、斯波真理子、菅尾祐輔、御供田理沙、栗原亮介、森健、片山佳樹、新留琢郎 ; デンドリティックポリリジンを利用した肝細胞への siRNA デリバリー、

日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 ポスター発表 2008.11 東京

6. 山崎毅、大石基、吉田吉行、斯波真理子、長崎幸夫 ; コア-シェル型ポリアミンナノゲルの 4 級化と胆汁酸吸着特性
日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2008 ポスター発表 2008.11 東京

7. 斯波真理子、宮田完二郎、石井武彦、西山伸宏、位高啓史、片岡一則 ; 高分子ナノミセルを用いたアドレメデュリン遺伝子導入によるモノクローリン肺

- 高血圧症の改善
第 57 回高分子討論会 2008.9 東京
8. Mariko Harada-Shiba, Takako Sugisawa, Yasunao Yoshimasa, Motoo Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Management of Atherosclerosis in Adult FH Patients. 第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、シンポジウム、2008.7、つくば
9. 杉沢貴子、斯波真理子、榎野久士、宮本恵宏、吉政康直、都島基夫、山本章、友池仁暢；スタチンは家族性高コレステロール血症 (FH) ヘテロ接合体における冠動脈疾患 (CAD) の発症年齢を遅らせたか？
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会一般演題、2008.7 つくば
10. 斯波真理子；遺伝子解析
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会座長、2008.7 つくば
11. 太田直孝、斯波真理子、宮本恵宏、杉沢貴子、浦敏郎、新井浩司、佐藤清、榎野久士、友池仁暢、吉政康直；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 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会一般演題、2008.7 つくば
12. 南雲彩子、安部映里、神野桂子、高木敦子、吉政康直、斯波真理子；ARH 遺伝子発現調節機構の検討
第 40 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 2008.7 つくば
13. 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・学術集会口頭発表 2008.3 福岡
14. Takako Sugisawa, Mariko Harada-Shiba, Hisashi Makino, Yoshihiro Miyamoto, Yasunao Yoshimasa, Motoo Tsushima, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Familial hypercholesterolemia (FH) associate with coronary artery disease (CAD)
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会ポスター発表 2008.3 福岡
15. Ayako Nagumo, Mariko Harada-Shiba, Hisashi Makino, Takako Sugisawa, Hajime Nakahama, Yasunao Yoshimasa, Akira Yamamoto, Hitonobu Tomoike; Applying LDL apheresis is vital for patients with not only homozygous FH ,but also statin-resistant heterozygous FH and coronary artery disease (CAD)
第 72 回日本循環器学会総会・学術集会ポスター発表 2008.3 福岡
- 《論文》
1. Shimano H, Arai H, Harada-Shiba M, Ueshima H, Ohta Y, Yamashita S, Gotoda T, Kiyohara Y, Hayashi T, Kobayashi J, Shimamoto K, Bujo H, Ishibashi S, Shirai

- K, Oikawa S, Saito Y, Yamada N, Proposed guidelines for hypertriglyceridemia in japan with non-HDL cholesterol as the second target. *J.Atheroscler Thromb.*200815(3):116-21
2. Yamashita S, bujyo H, Ari H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Long-term probucol treatment prevents secondary cardiovascular events : a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan, *J.Atheroscler. Thromb In press*
3. Hisashi Makino, Harada-Shiba M, Safety Aspects of Statins:Which Factors Create the Adverse Effects of Statins *Medicinal Chemistry*2008; 8(2):172-176
- 4.I. Ichi, Y. Takashima, N. Adachi, K. Nakahara, C.Kamikawa, M. Harada-Shiba, S. Kojo, Effects of Dietary Cholesterol on Tissue Ceramides and Oxidation Products of Apolipoprotein B-100 in ApoE-Deficient Mice *Lipids.*2007;42(10):893-900
- 《総説》
1. 杉沢貴子、斯波真理子 「高コレステロール血症」内科 Vol. 103 No.1 2009年1月発行
2. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症はどう治療するのか？」レジデント Vol.1 No.10 2009年1月発行
3. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症」 *ゲノム医学* Vol.8 No.2(2008-6)59-62(143-146)
4. 斯波真理子「脂質異常症の薬物療法および非薬物療法」呼吸と循環 第56巻 第11号 2008年11月発行
5. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症」*ゲノム医学* Vol.8 No.2 2008年発行
6. 南雲彩子、斯波真理子「脂質異常症(高脂血症) LDL アフェレーシス」最新医学 新しい診断と治療のABC13 2008年発行
7. 杉沢貴子、斯波真理子「脂質異常症(高脂血症) 病態生理：(3) ARH,PCSK9 と リポタンパク代謝」最新医学 新しい診断と治療のABC13 2008年発行
8. Hisashi Makino, mariko Harada-Shiba 「Safety Aspects OF Statins : Which Factors Create The Adverse Effects of Statins」 *Immun,Endoc,&Metab.Agents in Med.Chem.*2008年8月発行
9. 木下誠, 芳野原、田中朗、庄司哲雄、斯波真理子「small,dense LDL コレステロール測定試薬を用いた家族性複合型高脂血症診断における臨床評価」医療と検査機器・試薬 第31巻 第2号 2008年4月発行

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、ポリプレックスを用いた遺伝子デリバリーにおいて核内の DNA 脱凝縮過程と遺伝子発現の関連性を評価したところ、核内における DNA の脱凝縮が遺伝子発現において重要であることが分かった。この知見に基づいて、Poly(L-lysine)(PLys)鎖長の異なる PEG-b-PLys ブロック共重合体を用いることによって、DNA の折り畳みを制御した高分子ミセル型ベクターを構築し、cell-free 系での遺伝子発現を評価したところ、DNA の折り畳み構造が遺伝子発現において重要であることが確認された。

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

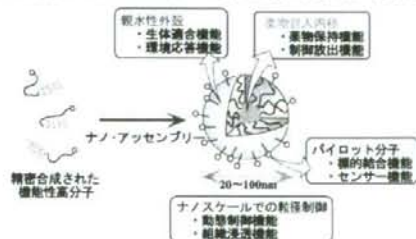


図1 ブロック共重合体のナノアセンブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

(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の遺伝子発現メカニズムについて検討を行い、細胞による取り込み過程やエンドソームから細胞質内への移行過程が重要であることを確認してきた。そこで本年度は、ポリプレックスを用いた遺伝子デリバリーにおける DNA の脱凝縮過程に着目し、Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)を利用した核内での DNA の脱凝縮過程の評価と蛍光タンパク質の遺伝子発現評価を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)を用いて同時に行い、その関連性を明らかにした。その結果、核内における DNA の脱凝縮が遺伝子発現において重要であることが分かった為、PLys 鎖長の異なる PEG-b-PLys ブロック共重合体によって DNA の折り畳みを制御した高分子ミセル型ベクターを構築し、cell-free 系での遺伝子発現を評価したところ、DNA の折り畳み構造が遺伝子発現において重要であることが明らかとなった。

B. 研究方法

1) ポリプレックスの核内での DNA 脱凝縮過程と遺伝子発現の関連性の解析

本研究では、ストークスシフトの大きい蛍光タンパク質 Keima-Red を発現するプラスミド DNA を Label IT Tracker Intracellular Nucleic Acid Localization Kit (Mirus) を用いて 2 種類の蛍光色素 (fluorescein, Cy3) で標識した。この蛍光標識プラスミド DNA (pDNA) を linear polyethylenimine (LPEI) および Lipofectamine 2000 でコンプレックス化し、ポリプレックスおよびリポプレックスを調製した。これらのポリプレックスおよびリポプレックスを Huh-7 細胞と 6 時間培養し、核内における fluorescein と Cy3 の FRET および Keima-Red の遺伝子発現を CLSM 観察によって評価した。

2) DNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの調製と解析

PEG-NH₂ (分子量 12,000) を開始剤として、Lys(TFA)-N-カルボン酸無水物 (NCA) を反応させ、TFA 基をアルカリ処理によって脱保護することによって、PLys 重合度が 20, 38, 70 の PEG-b-PLys ブロック共重合体を合成した。高分子ミセル型ベクターの調製は、10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) 中で、pDNA と PEG-b-PLys と異なる N/P 比 (PEG-b-PLys 中のアミノ基/DNA 中のリン酸残基) で混合することによって調製した。調製した高分子ミセル型ベクターの解析は、原子間力顕微鏡 (AFM) による形状の観察および cell free 系でのルシフェラーゼ遺伝子発現評価によって行った。

C. 研究結果

1) ポリプレックスの核内での DNA 脱凝縮過程と遺伝子発現の関連性の解析

fluorescein と Cy3 で標識した pDNA は、LPEI と混合した場合、470nm (fluorescein の励起波長) で励起することによって、530nm (fluorescein の蛍光波長) から 570nm (fluorescein の励起波長) への FRET が観察された。これは、LPEI との混合によって DNA が凝縮されたことを反映しているものと思われる。一方、Lipofectamine2000 と混合した場合は、FRET は観察されなかったが、細胞と incubation することによって、FRET が観察された。これは、Lipofectamine2000 単独では、DNA は凝縮されないが、血清タン

パク質等が共存することによって、aggregate が形成され、DNA が凝縮されるためであると考えられる。

次に、図 2 に示すように、上記のポリプレックスおよびリポプレックスを Huh-7 細胞と 6 時間培養し、核内における fluorescein と Cy3 の FRET および Keima-Red の遺伝子発現を CLSM 観察によって評価した (ここで、FRET が起らなかった場合および起こった場合の蛍光をそれぞれ Green および Red で表記している)。この結果を解析するために、Keima-Red の発現の有無と核内における核内における Green および Red の蛍光の有無で分類した結果を表 1 に示した。

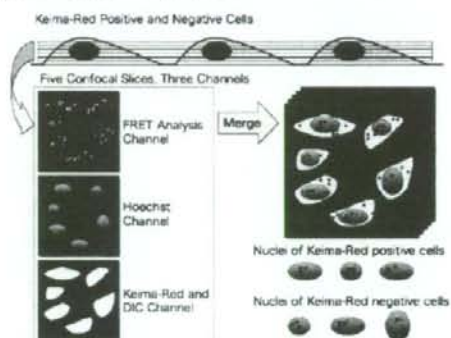


図2. ポリプレックスおよびリポプレックスの核内でのDNA脱凝縮過程と遺伝子発現の関連性を評価するための核内FRETおよびKeima-Red遺伝子発現のCLSMによる同時観察

表1. 核内FRETおよびKeima-Red遺伝子発現の解析

Intranuclear Localization of Green (Decompacted) and Red (Condensed) Plasmids	Keima-Red Expression			
	Polyplex		Liposome	
	Positive	Negative	Positive	Negative
Green (+) / Red (+)	38 (81.8%)	13 (10.7%)	10 (82.6%)	2 (3.8%)
Green (+) / Red (-)	0	0	3 (18.8%)	0
Green (-) / Red (+)	8 (18.2%)	51 (77.3%)	2 (12.5%)	13 (24.6%)
Green (-) / Red (-)	0	2 (3.0%)	1 (6.3%)	36 (71.7%)
Subtotal	44	66	18	53
Total	110		69	

上記の結果、表1に示したように、核内FRETとKeima-Red遺伝子発現に関連性が見られた。すなわち、LPEIポリプレックスにおいては、解析した110個の細胞に対して44個の

細胞にKeima-Red遺伝子の発現が認められ、その36個(81.8%)でFRETが起こった場合に見られるGreenのピクセルが観察された。遺伝子発現が認められなかった66個の細胞に関しては、53個(80.3%)でGreenのピクセルが観察されなかった。一方、リポプレックスの場合も、Keima-Red遺伝子の発現が認められた細胞の81.3%でGreenのピクセルが観察され、遺伝子発現が認められなかった細胞の96.2%でGreenのピクセルが観察されなかった。以上の結果より、ポリプレックスとリポプレックスのどちらの場合においても、遺伝子発現のためには、核内におけるDNAの脱凝縮が重要であることが示唆された。

2) DNAの折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの調製と解析

PLys重合度が20, 38, 70のPEG-b-PLysブロック共重合体とpDNAを混合したところ、PLys鎖長とN/P比に依存して、ロッド/トロイド状と球状の形態を取ることがAFMより観察された(図3,4)。すなわち、PLys鎖長が短く、N/P比が低い条件において、ロッド/トロイド状のポリプレックスが形成され、PLys鎖長が長く、N/P比が高い条件においては、DNAがcollapseして球状になることが分かった。そこで、それぞれのポリプレックスについてcell free系でのルシフェラーゼ遺伝子の発現量を評価したところ、ロッド/トロイド状にDNAが折り畳まれたポリプレックスではフリーのpDNAよりも高い遺伝子発現効率を得られ、球状にcollapseされることによってポリプレックスの遺伝子発現効率が著しく低下することが明らかとなった(図4)。

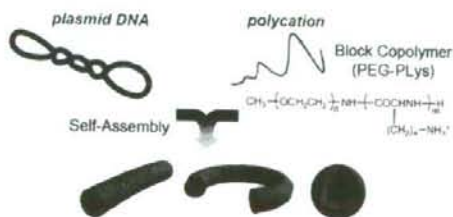


図3. PEG-b-PLysとpDNAによって形成されるポリプレックス(高分子ミセル型ベクター)の様々な形態

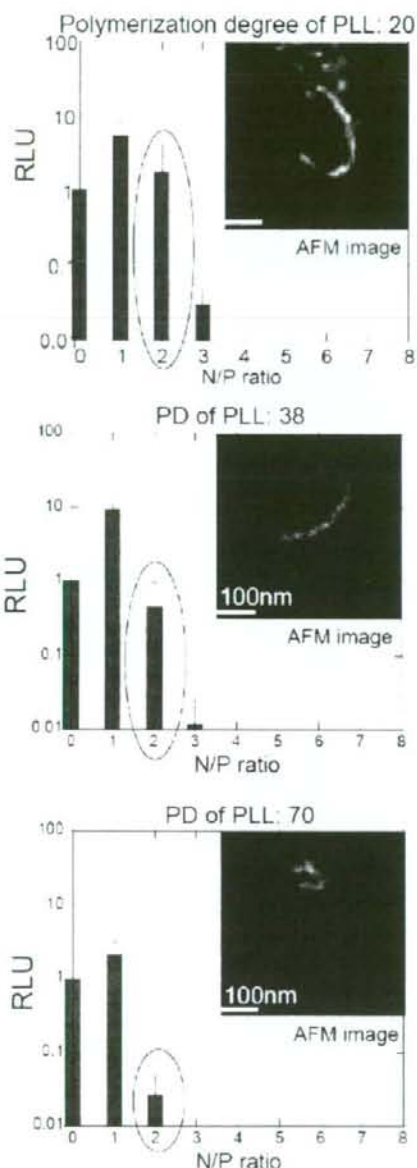


図4. PLys鎖長が20, 38, 70のPEG-b-PLysより形成されるポリプレックス(高分子ミセル型ベクター)のcell free系でのルシフェラーゼ遺伝子発現(AFMイメージは、○で囲まれたN/P比で調製されたポリプレックスを観察した結果)

D. 考察

1) 達成度について

本年度は、ポリプレックスの遺伝子発現

における核内でのpDNAの脱凝縮の重要性を、最も広く利用されているポリプレックスの一つであるLPEIを用いて明らかにした。さらに、本年度は、PLys鎖長の異なるPEG-b-PLysを合成し、N/P比を変化させることによって、形態の異なる高分子ミセル型ベクターを調製し、pDNAが球状にcollapseした場合には遺伝子発現が低下するが、ロッド/トロイド状にpDNAが折り畳まれたポリプレックスはフリーのpDNAよりも高い遺伝子発現効率を示すことを明らかにした。これらの結果は、高分子ミセル型遺伝子ベクターによるさらに効率的な遺伝子発現を実現するためには、pDNAをcollapseすることなく、規則的に折り畳むことが重要であることを示唆している。このようなpDNAの折り畳みは、核内で脱凝縮効率を高めるだけでなく、メカニズムは明らかではないが、pDNAの転写効率を高める可能性があるものと思われる。以上の知見は、遺伝子発現効率に優れた高分子ミセル型ベクターを構築するために極めて重要であり、本年度は大きく研究が進化したと言える。

2) 成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子治療の実現のためには、安全性に非ウイルス型遺伝子ベクターの開発が重要であるが、遺伝子発現効率がウイルスベクターと比較して低いことが課題とされている。非ウイルス型遺伝子ベクターが細胞内で遺伝子発現に至るまでには、細胞による取り込み、エンドソームからの脱出、核内への移行、pDNAの放出といった段階的な過程を経るが、本年度は核内におけるpDNAの脱凝縮に着目して検討を行い、最も広く利用されているポリプレックスの一つであるLPEIを用いて、核内でのpDNAの脱凝縮と遺伝子発現の関連性を世界で初めて明らかにした。さらに、PLys鎖長の異なるPEG-PLysを用いて、pDNAが規則的に折り畳まれたロッド/トロイド状の高分子ミセル型ベクターを調製したところ、メカニズムは明らかではないが、cell free系でフリーのpDNAよりも高い遺伝子効率を示すことを明らかにし、pDNAの折り畳みが、核内での遺伝子発現に極めて重要であることを世

界で初めて明らかにした。これらの知見は、遺伝子発現効率に優れた非ウイルス型遺伝子ベクターの開発において極めて有用な知見であり、関連分野に大きなインパクトを与えるものと思われる。

3) 今後の展望について

本研究では、pDNAが折り畳まれたロッド/トロイド状の高分子ミセル型ベクターが、cell free系で優れた遺伝子発現効率を示すことを明らかにしたが、実際の細胞へのトランスフェクションにおいては、上記のロッド/トロイド状の高分子ミセルよりもpDNAが球状にcollapseした高分子ミセルの方が高い遺伝子発現を示すことが確認されている。この結果より、核内での転写効率の観点からはロッド/トロイド状の高分子ミセルは非常に優れているが、ロッド/トロイド状の高分子ミセルは細胞内外での安定性に乏しく、核に到達する前に解離してしまう可能性があるものと思われる。さらに、PLys鎖長が短いPEG-b-PLysから形成された高分子ミセルは、高密度のPEGを有するものと考えられ、細胞への取り込みが低下している可能性も考えられる。そこで、今後は、ロッド/トロイド状の高分子ミセルの細胞外での安定性を高めるために、ミセル内核に細胞内還元環境下で選択的に開裂するジスルフィド(SS)架橋を導入する。また、ミセルの細胞による取り込みを促進するために、ミセル表面にリガンド分子を導入する。このような設計を行うことで、効率的に細胞内に取り込まれ、核まで安定にpDNAを送達する一方で、核内では効率的にpDNAが転写される高分子ミセル型ベクターが構築できるものと考えられる。

E. 結論

本年度は、非ウイルス型ベクターの遺伝子発現における核内でのpDNAの脱凝縮の重要性を明らかにした。また、DNAが折り畳まれたロッド/トロイド状の高分子ミセル型ベクターを構築し、核内での転写効率を反映するcell free系で高い遺伝子発現効率を示すことを明らかにした。今後、ミセル内核のSS架橋による安定化やミセル表面へのリガンド導入の導入によって、患部ま

でpDNAを安定に送達する一方で、標的細胞で効率的な遺伝子発現を示す高分子ミセル型ベクターを構築できるものと考えられる。

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. O S. Matsumoto, R.J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules*, in press
2. A. Kishimura, S. Liamsuwan, H. Matsuda, W. Dong, K. Osada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, pH-Dependent permeability change and reversible structural transition of PEGylated polyion complex vesicles (PICsomes) in aqueous media. *Soft Matter*, in press
3. N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release*, in press
4. H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W.-D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. *Pharm. Res.* 26 (1) 82-92 (2009)
5. O M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)
6. O K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)
7. O K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008)
8. S. Wu, N. Nishiyama, M. R. Kano, K. Itaka, U. -I. Chung, K. Kataoka, Enhancement of Angiogenesis through Stabilization of Hypoxia Inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain 2 Gene. *Mol. Ther.* 16 (7) 1227-1234 (2008)
9. O Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: A technique for efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)
10. O S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008)
11. 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