

dendrimer porphyrins. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 49 (3): 894-899 (2008)

(和文) なし

2. 総説

(欧文)

1. ○ K. Itaka, K. Kataoka, Recent development of nonviral gene delivery systems with virus-like structures and mechanisms. Eur. J. Pharm. Biopharm., in press

(和文)

1. 西山伸宏、片岡一則：シスプラチン内包高分子ミセル、MebioOncology 5 (1) 49-57 (2008)
2. 位高啓史、片岡一則：医療ナノテクノロジーから医療システムイノベーションへ、学術の動向 13 (9) 74-77 (2008)
3. 位高啓史、片岡一則：高分子ナノミセル型キャリアのドラッグデリバリーシステムへの展開、臨床血液 49 (5) 287-293 (2008)
4. 宮田完二郎、片岡一則：DDS・遺伝子治療とナノテクノロジー、分子細胞治療 7 (1) 26-33 (2008)

3. 学会発表

(国内学会)

1. 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～高分子ミセル型ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～、ナノ学会第6回大会、九州大学医学部百年記念講堂、福岡、2008.5.7、基調講演
2. 片岡一則、遺伝子治療実用化に向けたインテリジェント超分子ナノデバイスの構築、遺伝子・デリバリー研究会第8回シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、豊中市、2008.5.9、招待講演
3. 片岡一則、遺伝子治療実用化に向けた高分子ミセル型ナノデバイスの創製、日本薬剤学会第23年会、札幌コンベンションセンター、札幌市、2008.5.22、招待講演
4. 片岡一則、Supramolecular Nanodevice Assembled from Smart Block Copolymers as Non-viral Gene Vector、第14回日本遺伝子治療学会、札幌医科大学、札幌、

2008.6.14、招待講演

5. 片岡一則、ナノ治療イノベーションを実現する超分子ナノデバイス設計、第7回国際バイオフィォーラム、東京ビッグサイト、東京、2008.7.4、特別講演
6. 片岡一則、超分子ナノデバイスによるDDSイノベーション、第24回日本DDS学会学術集会、六本木ヒルズ、東京、2008.6.29、招待講演
7. 片岡一則、ナノ治療イノベーションを実現する超分子ナノデバイス設計、第7回国際バイオフィォーラム、東京ビッグサイト、東京、2008.7.4、特別講演
8. 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～、第57回高分子討論会、大阪市立大学杉本キャンパス、大阪市、2008.9.26、招待講演
9. 片岡一則、超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー、「オミクス・ナノバイオ・機能性食品科学」講演会、東京大学鉄門記念講堂、東京、2008.10.3、招待講演
10. 片岡一則、超分子ナノデバイスによるDDSイノベーション、第170回フォトポリマー懇話会、東京理科大学森戸記念館、東京、2008.10.15、招待講演
11. 片岡一則、超分子ナノデバイスによるDDSイノベーション、創剤フォーラム第14回シンポジウム、グランドヒル市ヶ谷、東京、2008.10.22、招待講演
12. 片岡一則、がん治療における高分子ミセル製剤の基礎、第67回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、名古屋市、2008.10.29、招待講演
13. 片岡一則、Recent Progress in Drug and Gene Delivery Systems for Cancer Treatment、第67回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、名古屋市、2008.10.29、招待講演
14. 片岡一則、未来型DDSに向けた高分子ナノキャリア設計、日本DDS学会 水島裕先生・瀬崎仁先生追悼シンポジウム、東京ガーデンパレス、東京、2008.11.5、招待講演
15. 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～、信州大学線維学部セミナー、

- 信州大学線維学部、上田市、長野県、2008.11.6, 招待講演
16. 片岡一則, ナノ治療イノベーションに向けた超分子ナノデバイス設計, 第3回耳鼻咽喉科臨床研修会, 東京大学医学部附属病院耳鼻咽喉科 医局、東京、2008.11.20, 招待講演
 17. 片岡一則, 高分子ミセル型超分子ナノデバイスによる遺伝子デリバリー, 様々な機能を備えた遺伝子導入技術の最前線 in 神戸 ~臨床応用に向けた課題と今後展開~, ニチイ学館神戸ポートアイランドセンター、神戸、2008.12.8, 基調講演
 18. 片岡一則, ドラッグデリバリーシステム開発の最前線 ~超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー~, ヒューマンサイエンス振興財団 情報委員会講演会, (財)ヒューマンサイエンス振興財団会議室、東京、2008.12.10, 招待講演
(国際学会)
 1. K. Kataoka, Supramolecular Devices as Smart Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, CeNS Seminar, Baeyer Lecture Hall, High-tech Campus, LMU Munich, Germany, 2008.6.20, 招待講演
 2. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery, TERMIS-EU 2008, Alfandega Congress Center, Porto, Portugal, 2008.6.24, 基調講演
 3. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenge to Smart Molecular Therapy-, The 42nd IUPAC World Polymer Congress (MACRO 2008), Taipei International Convention Center, Taipei, ROC, 2008.7.2, 招待講演
 4. K. Kataoka, Supramolecular assemblies of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery - Challenge to intracellular nanomedicine -, IUPAC 48th Microsymposium " Polymer Colloids: From Design to Biomedical and Industrial Applications ", Institute of Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Republic, 2008.7.21, 基調講演
 5. K. Kataoka, NanoBio Integration for Medical Innovation, NanoGagliato 2008, Gagliato, Italy, 2008.7.31, 招待講演
 6. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenge to Smart Molecular Therapy-, 8th International Biorelated Polymers Symposium 236th American Chemical Society National Meeting & Exposition, Philadelphia, PA, USA, 2008.8.18, チューブトリアル
 7. K. Kataoka, NanoBio Integration for Medical Innovation -Supramolecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery-, ASMeW International Symposium, Waseda University, Tokyo, 2008.8.28, 招待講演
 8. K. Kataoka, Supramolecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery -Challenges to Intracellular Nanomedicine-, Gordon Research Conference " Biointerface Science ", Aussois, France, 2008.9.17, 招待講演
 9. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery -Challenges to Smart Molecular Therapy-, 4th STIPOMAT Conference, Lacanau, France, 2008.9.22, 招待講演
 10. K. Kataoka, Supramolecular Assemblies from Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, 8th France-Japan Drug Delivery Symposium, Cannes, France, 2008.10.7, 招待講演
 11. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery - Challenge to Smart Molecular Therapy -, NanoDDS '08, University of Toronto, Toronto, Canada, 2008.10.19, 招待講演
 12. K. Kataoka, Polymeric Micelles and Polmersomes from Polyamino Acid-based Block Copolymers -From Chemistry to Biomedical Application-, Macromolecular Colloquium at University of Bayreuth, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany, 2008.11.26, 招待講演
 13. K. Kataoka, Multimolecular-Assembly of Smart Block Copolymers as Nanocarrier for Gene and Drug Delivery, CeNS Seminar, LMU Munich, Germany, 2008.11.28, 招待講演

H. 知的所有権の出願・取得状況

1. 片岡一則、石井篤史、西山伸宏、加藤泰己、宮田完二郎、キム ヒョンジン、武元宏泰、非荷電性親水性ブロック及び側鎖の一部に疎水性基が導入されたカチオン性のポリアミノ酸ブロックを含んでなる共重合体、その使用、特願2008-059886
2. 片岡一則、LEE,Yan、宮田完二郎、大庭誠、電荷変換型三元系ポリプレックス、アメリカ（Provisional 出願）61/126,077
3. 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、PCT/JP2008/070154

平成 20 年度 厚生労働省科学研究費補助金 (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
班会議プログラム

日時：平成 20 年 6 月 26 日(木) 11:40～

場所：国立国際医療センター研究所 地下 1 階 小会議室・中会議室

発表・質疑 20 分

- | | |
|-------------|---------------------------------|
| 11:40～12:00 | 山本 健二 挨拶と今年度方針 (於 小会議室)
(昼食) |
| 12:40～13:00 | 鈴木 春巳 |
| 13:00～13:20 | 狩野 繁之・奥 浩之 |
| 13:20～13:40 | 土肥多恵子 |
| 13:40～14:00 | 鈴木 恵子 |
| 14:00～14:10 | (休憩) |
| 14:10～14:30 | 鈴木 和男 |
| 14:30～14:50 | 近藤 昭彦 |
| 14:50～15:10 | 馬目 佳信・渡辺美智子・藤岡宏樹 |
| 15:10～15:30 | ジョナサン ヘドゥル (Jonathan HEDDLE) |
| 15:30～15:50 | (コーヒーブレイク) |
| 15:50～16:10 | 落谷 孝広 |
| 16:10～16:30 | 斯波真理子 |
| 16:30～16:50 | 片岡 一則・西山 伸宏 |
| 16:50～17:10 | 山本 悟・真鍋 法義 |

問い合わせ： 国立国際医療センター研究所

国際臨床研究センター

センター長 山本健二 (伊藤和幸)

電話； 03 - 3202 - 7181 内線 2856

ファックス； 03 - 3202 - 7364

E-mail; backen@ri.imcj.go.jp, ikazuyuki@ri.imcj.go.jp

新規胸腺特異的遺伝子 ISC4 の T 細胞分化における機能

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数個の「胸腺特異的遺伝子」を選別し、これらの遺伝子の 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。その胸腺特異的遺伝子の一つが ISC4 である。この遺伝子は脊椎動物においてよく保存されており、既知の機能ドメインを持たない新規の遺伝子である。

RT-PCR 法を用いて ISC4 の組織発現を調べたところ、予想通り胸腺に特異的な発現が見られ、T 細胞以外の他の造血系、リンパ系細胞には発現していなかった。T 細胞のサブセット解析では、胸腺内の未熟 CD4CD8 ダブルポジティブ (DP) 細胞に最も強く発現しており、シングルポジティブ (SP) 細胞に成熟するに従って発現は低下した。ISC4 タンパク質の細胞内局在を検討するため、我々は ISC4 全長タンパクをウサギに免疫しポリクローナル抗体を作製した。蛍光ナノ粒子 Qdot565 で標識した抗ウサギ2次抗体を用いて細胞内染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察したところ、ISC4 は細胞質にのみ局在するタンパク質であることがわかった。退色の少ない、蛍光強度の強い蛍光ナノ粒子を用いて初めて微弱なシグナルを検出することが可能となった。

この分子の機能をより詳細に検討する目的で ISC4 のノックアウトマウスを作製した。常法に従い、ISC4 遺伝子の第一エクソンを LacZ 発現カセットと置き換えるマウスを作製した。ノックアウトマウスの胸腺は細胞数は野生型と変わらず、DP の数も変わらなかったが、CD4-SP 細胞および CD8-SP 細胞は著しく減少していた。末梢においても脾臓、末梢血中の CD4-SP および CD8-SP は激減していた。

以上の結果より、胸腺特異的に発現する新規遺伝子 ISC4 は T 細胞の β 選択には必要ないが、正の選択に必須であることが初めて明かとなった。

平成 20 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 (H19-ナノ一般-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

これまでに我々は、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マラリアワクチン候補抗原と想定し、その人工抗原ペプチドの化学合成法とワクチンに関連したナノデバイス開発を目的として研究を行っている。現在は以下の3点について検討を進めている。即ち、(1)人工抗原ペプチドの化学合成法、(2)人工抗原ナノ微粒子の作成と *in vitro* および *in vivo* 解析、(3)マラリア原虫を可視化するためのナノ蛍光プローブの化学合成である。これらを総合的に用いることで、将来の効果的な予防ワクチンに向けて、特性評価や改良を進めてゆきたい。

(1) 人工抗原ペプチドの化学合成法

人工抗原ペプチドは将来の臨床展開を見据えて、化学合成法による大規模製造法について研究を進めている。例えば 22 残基の抗原配列は 5 つに分割してフラグメント縮合を行うことにより、実験室規模でも数 g (数万ドース) の合成を行うことが十分可能である。

(2) 生分解性高分子を用いた人工抗原ナノ微粒子

人工抗原ペプチドの抗原性を持続させることを目的として、生分解性高分子を用いたナノ微粒子の作成を行ってきた。これまでにナノ微粒子を作成し、蛍光標識によって *in vitro* および *in vivo* での抗原放出を観測する方法について改良を進めている。

(3) マラリア原虫を可視化するためのナノ蛍光プローブ

マラリア原虫を可視化する分子プローブを目的として、カルボキシフルオレセイン (CF) で蛍光標識化した、アンホテリシン B (AmB) を合成した。得られた化合物によって CF-AmB は赤血球内の原虫を選択的に蛍光標識することに成功し、現在は標的分子の探索を行っている。

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 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員

協力研究者 水谷紀子 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員

協力研究者 川島 麗 国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 協力研究員

申請者らは、マウスを用いて腹腔マクロファージ(Pmf)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だし、そのメカニズム研究を行った。その結果、以下に示す腹腔内の新規自然免疫応答が明らかになった。すなわち、腹腔壁と臓器を包む中皮細胞が、炎症刺激を受けるとケモカイン CCL1 を産生する。Pmfも炎症刺激及び CCL1 により 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。CCL1 のオートクリン機構には positive feedback 機構が働く。さらに Pmf の接着分子の発現も高くなる。このため Pmf は傷害中皮細胞の局所にとどまって細胞塊を形成しながら癒着を誘導する。これらの結果に基づき我々は CCL1-CCR8 作用の阻害により開腹術後の癒着を阻害できることを *in vivo* モデルでも示した。ヒトの術後癒着防止法開発に向けて現在、腹腔内滲出細胞におけるケモカイン受容体発現、腹腔内洗浄液におけるケモカイン・サイトカイン関連分子の測定、CCL1/CCR8 阻害剤の低分子化合物ライブラリーのスクリーニング、腹腔洗浄液のプロテオーム解析、CCL1/CCR8 阻害剤のマウスモデルにおける腹膜癒着抑制効果と免疫系における影響の解析等をすすめている。ヒトの腹腔内細胞から CCR8 は検出されたが、CCL1 の濃度は高くなかった。これにかわってヒトで開腹術後に上昇するケモカインが見いだされた。また、マクロファージ機能を抗炎症の方向に修飾すると予測される低分子化合物が、*in vivo* でも術後の癒着を阻害することが明らかになった。

炎症性骨破壊における破骨細胞の動態 — バイオイメージング手法による解析 — 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—Systemic factor, Local factor
2. 有効な治療薬の開発と評価法について検討する。

【方法】

蛍光(QDot, FM1-43, LavaCell, PKH26, GFPTg rat)、発光(LucTg rat)により可視化した破骨前駆細胞を骨破壊病態モデル動物に投与し、細胞の体内動態について調べる。さらに、新規に開発中の治療薬を投与した動物も同時に観察することにより、作用メカニズムおよび治療効果を検討する。

【成果】

1. 骨髄細胞を M-CSF 存在下で培養することにより分化させた破骨前駆細胞は上記の標識物質を効率よく取り込み、さらに融合過程を経て成熟破骨細胞に分化することが確認できた。すなわちイメージングに応用可能であることが示された。波長、減衰曲線など物理化学的性質の異なる標識を組み合わせることにより、相互作用を持つ複数の細胞種の体内動態について詳細に検討できると考えられる。
2. 骨吸収抑制および骨形成促進作用を有する新規治療薬候補化合物について培養細胞と骨破壊モデル動物を用いて検討してきた。その結果、いくつかの化合物群が細胞培養系で破骨細胞形成抑制作用を有するが確認できた。さらに、RANKL 投与により誘導した骨破壊を顕著に抑制する化合物もあった。
3. 骨吸収因子を投与することにより、病的骨破壊モデル動物を作製した。また、これらの動物において骨形態計測などを行い、in vivo imaging 手法による病態解明の予備実験として有用な情報を得ることができた。

平成20年度班会議

慢性炎症の治療法のための DDS による機能量子ドット (QD) の利用

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

ksuzuki@faculty.chiba-u.jp

量子ドット(QD)に炎症性細胞の酵素やサイトカインや Adhesion Molecules の抗体などを付加した「機能 QD」を開発する。これまで、Myeloperoxidase (MPO)抗体(Anti-MPO-QD)を付加した QD 標識 MPO 抗体を炎症モデルマウスに投与し、好中球およびこの分子と結合する細胞を腎糸球体あるいは肺の内皮細胞への移行を検討してきた(Microbiol. Immunol, 2007)。MPO は、自己抗体 ANCA の抗原となる好中球細胞質顆粒内分子で、急速進行性糸球体腎炎(RPGN)症候群の病態と相関関係を示し、RPGN などの血管炎のマーカーとなっており、MPO-ANCA は、好中球の活性化や血管内皮細胞の活性化および傷害性に関与しているが、MPO-ANCA が、どのように好中球を活性化し内皮細胞の傷害を誘導しているかを解析してきた(Microbiol. Immunol, 2007)。また、Anti-MPO-QD を、マウスに投与し、腎臓、肺への作用を検討してきた。QD 標識 MPO 抗体は、内皮細胞に特異的に結合した。

本年度は、活性化血管内皮細胞への好中球の関与および抑制剤の作用について「機能 QD」を用いて解析する。また、MPO 抗体を内皮細胞に直接作用・刺激させることにより、内皮細胞の ICAM-1 の発現が上昇に加えて、好中球走化性分子の関与を検討する。

臓器特異性は、ICAM-1 をはじめとしたインテグリンファミリーとケモカインレセプターCCR によって形成されていると考えられており、これまでの予備的結果と合せ、MPO-ANCA は、病巣などの局所に達したで活性化好中球の表面に出た MPO と anti-MPO-QD が反応して、好中球をさらに活性化して活性酸素などの放出をするとともに、内皮細胞にも直接結合して内皮細胞に作用して ICAM-1 の発現を上昇させ、炎症性サイトカインを上昇させて、修復回路を形成すると考えられる。

本年度の研究により、活性化血管内皮細胞への好中球の関与と修復・再生機構を「機能 QD」を用いて解析する。



甲状腺がんを認識するモノクローナル抗体 JT95 のナノ粒子修飾と応用

東京慈恵会医科大学 総合医科学研究センター

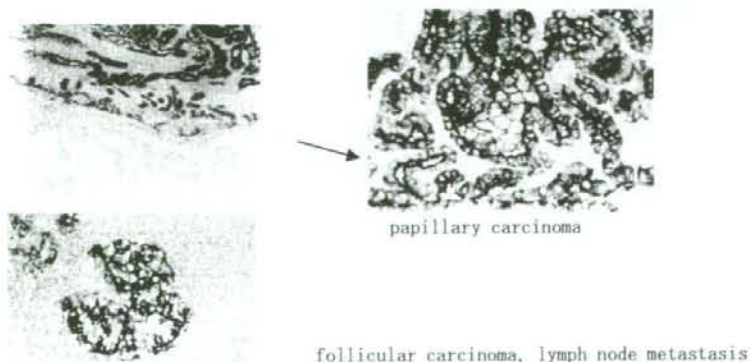
DNA医学研究所 分子細胞生物学研究部

馬目佳信 藤岡宏樹 渡辺美智子

甲状腺がんは超音波やシンチグラフィ、吸引針生検（FNA）などで診断が得られるが、良性と悪性で鑑別が難しい例もあり、より客観的な診断法の開発が求められている。そのため、甲状腺がん特異的なモノクローナル抗体がこれまでに作成されている（東京慈恵会医科大学武山・渡辺ら）。このなかでも JT95 は甲状腺がんとの認識率が特に高く、多施設間での調査では免疫組織検査で乳頭がん 158 例中 151 例と反応し、陽性率は 95% 以上である抗体であり、JT95 の認識する抗原は正常組織では発現していないことなどが知られている。この抗原は糖鎖修飾型のファイブロネクチンであり、このエピトープの利用によって分子診断や分子治療への応用が期待されている。今回はこの抗体のナノ粒子修飾による甲状腺がんの分子イメージングと血液中の抗原量の高感度測定を目指す。JT95 は 5 量体であり定常域が J 鎖で結合されているため蛍光色素やマイクロビーズなど通常の分子イメージングや診断のための担体とは結合が難しく応用には更なる検討が必要とされている。このため、まず安定した修飾法の確立を目的とする。

Immunohistochemical staining with monoclonal antibody Ref. Takeyama *et al.* Cancer Res.

56, 1817, 1996

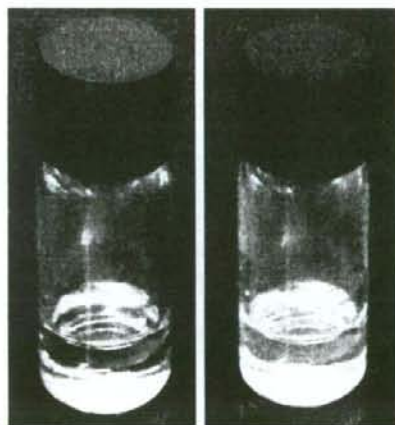


Protein Engineering and Quantum Dots

Jonathan Heddle Tokyo Institute of Technology, Global Edge Institute
4259-S2-17, Nagatsuta, Midori -ku, Yokohama, Kanagawa
Tel/Fax: +81 (0)45 924 5009 email: heddle.j.aa@m.titech.ac.jp

Abstract

Our area of bionanotechnology is concerned with the engineering of proteins to produce semi-artificial structures which can act as components of future nanodevices with applications in electronics and therapeutics. 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. However, for in vivo use, many are unsuitable because of their toxicity. Pure silicon quantum dots however are thought to be much less toxic and may have in vivo applications. We are currently working with collaborators to produce modified, water soluble silicon quantum dots to which peptides can be added which will direct the quantum dots to the mitochondria and furthermore, promote their uptake into the mitochondrial matrix. In this talk I will present some of previous and ongoing work in the general field of bionanotechnology. I will then present our ideas for targeting silicon quantum dots to the mitochondrial matrix including current status, and planned future work.



An example of our silicon quantum dots under normal (left) and UV (Right) illumination. We are currently modifying these quantum dots to target them to mitochondria. Image courtesy of Yimin Chao.

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)

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。

本発表では、アテロコラーゲンと核酸医薬である microRNA の複合体を、細胞内や動物の体内に移植、あるいは転移したがん細胞へデリバリーされる効率と、効果持続期間を検証するための方策を考案した。方法は、動物の体内に移植した場合、高率に転移をおこす細胞に、特定の microRNA の標的である遺伝子の3'UTR 領域を結合させたルシフェラーゼ遺伝子を持つコンストラクトを導入し、安定なクローンを作成した。この細胞に microRNA が導入された場合、microRNA は標的の3'UTR 領域に結合するため、ルシフェラーゼの働きを阻害し、発光が抑制されるはずである。この細胞を、動物に移植し、転移をおこさせた後に、microRNA とアテロコラーゲンの複合体を全身性に投与した。その結果、転移巣のルシフェラーゼの発光は光子数で60-80%も抑制され、その効果は3日間持続した。従って、アテロコラーゲンによるデリバリーは、microRNAs である non-coding small RNAs の腫瘍内デリバリー方法として優れている方法であることが判明した。今後は、アテロコラーゲンの腫瘍ターゲティングの構築を検討する予定である。

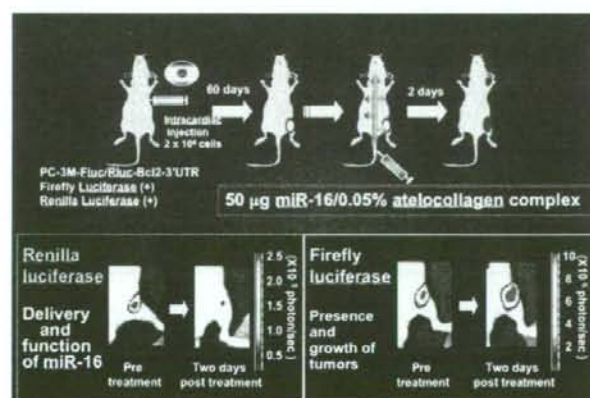


図1

がん細胞には、microRNA の標的となる 3'UTR 領域を含んだレニナルルシフェラーゼ遺伝子が導入されている。この細胞を移植され、転移した動物に、microRNA をアテロコラーゲンとともに投与すると、転移巣にデリバリーされ、ルシフェラーゼの発光を顕著に抑制した(左下)。Dual のホタルルシフェラーゼ(右下)は、24時間後では抑制されなかった。

高分子ミセル型ナノ構造デバイスの in vivo 投与による機能評価

斯波真理子¹⁾、片岡一則²⁾

¹⁾ 国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部

²⁾ 東京大学大学院工学系研究科

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。PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いることにより、in vivo での遺伝子導入効率を飛躍的に上昇すること、肺高血圧症モデル動物に対してアドレノメデュリン遺伝子による治療効果を得たことをすでに報告した。今回、我々はポリマーの精製法および重合度の相違する6種類の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た。

方法：ICR マウスに麻酔下で N/P 比の異なる PEG-b-P[Asp-(DET)]とルシフェラーゼ DNA の complex を経肺投与し、一定期間後に両肺を採材してルシフェラーゼ活性、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。

結果：PEG-b-P[Asp-(DET)]は精製時にホモポリマーの混入をなくすことによって遺伝子発現量を高く、投与後 1 日目の炎症性サイトカインの発現量を低くすることができた。SS 結合を持たない従来の PEG-b-P[Asp-(DET)]においては N/P=60 で遺伝子発現量が最高であったが、PEG と P[Asp-(DET)]の間に SS 結合を持つ PEG-SS- P[Asp-(DET)]において N/P=20 が最も遺伝子発現量が多く、N/P=40、60、80 になるに従い遺伝子発現量は減少した。炎症性サイトカインの発現量は PEG-SS- P[Asp-(DET)]の N/P=20 で高値であったが、投与後動物の生存率は約 90%を維持できた。

考察：ホモポリマーの混入がない SS 結合を持った PEG-SS- P[Asp-(DET)]について N/P=20 でも遺伝子発現量が高く、投与後高い生存率を維持できた。投与後 1 日目の N/P=20 での炎症性サイトカインの発現量は SS 結合を持たないものに比較して高値であったが、これは一過性に急激に上昇するものの致死的ではない生体反応によるものと思われる。PEG-SS- P[Asp-(DET)]は遺伝子の導入効率も安全性も高い非ウイルスベクターとして有望であり、臨床応用に向けてさらに一歩前進したと考えられる。

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。本研究では、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、側鎖にエチレンジアミン構造を有する PAsp(DET)が *in vitro* および *in vivo* において低毒性かつ高効率の遺伝子導入を実現することを明らかにしてきた。そこで、PAsp(DET)の遺伝子発現メカニズムについて詳細な検討を行った結果、PAsp(DET)が生理的 pH (=7.4) ではモノプロトン状態で存在し、細胞膜障害性を示さないが、エンドソーム内 pH (=5.5) ではジプロトン状態に変化し、強力な膜障害活性を示し、これによって遺伝子ベクターのエンドソームから細胞質内への移行を促進することが明らかとなった。すなわち、PAsp(DET)はエンドソーム膜選択的な膜障害を惹起することによって低毒性を示すものと考えられる。さらに我々は、PAsp(DET)よりもさらに低毒性の遺伝子導入を実現するために、PAsp(DET)の側鎖に *cis*-aconityl anhydride を反応させることによって、アニオン性の PAsp(DET-Aco) を合成した。PAsp(DET-Aco)は、プラスミド DNA (pDNA) と PAsp(DET) より形成されるカチオン性のポリプレックスの表面に配置させることによって、アニオン性の三元系コンプレックスを調製することができる。本システムは、アニオン性の表面を有するために細胞との相互作用が低く低毒性である一方で、エンドソーム内の低 pH 環境では *cis*-aconityl group が解離し、細胞膜障害性の PAsp(DET)が露出されるために、効率的なエンドソーム脱出を示すものと考えられる。その結果、一般的に細胞毒性のために遺伝子導入が困難である初代培養細胞 (HUVEC) に対しても効率的な遺伝子導入が可能になることが示された。

一方、PEG-PAsp(DET)から形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターに関しては、これまでに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、高分子ミセル型ベクターは、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、さらに 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。そこで我々は、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によって切断される SS 結合で PEG と PAsp(DET)が連結された PEG-SS-PAsp(DET) 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た。その結果、PEG-SS-PAsp(DET)は PEG が脱離することによって、効率的なエンドソーム脱出を示し、PEG-PAsp(DET)よりも 100-1,000 倍高い遺伝子発現効率を示すことが明らかとなった。

さらに本研究では、可溶性 VEGF 受容体 (sFlt-1) を発現する高分子ミセル型遺伝子ベクターのヒト膵がん BxPC3 細胞のマウス皮下移植モデルに対する治療効果を検討した。その結果、高分子ミセル型遺伝子ベクターは、膵臓がんの標準治療薬であるゲムシタビンよりも顕著に高い制がん活性を示すことが明らかとなった。

このように本研究では、設計した高分子ミセル型遺伝子ベクターの機能発現メカニズムを解明し、その機能の創り込みを行う一方で、*in vivo* での有効性を明らかにしてきた。今後は、機能を創り込んだ高分子ミセル型ベクターの機能解析をさらに進めることによって、*in vivo* 応用に向けたベクター機能の最適化を図る予定である。

平成20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」班会議

平成20年6月26日(木)
国立国際医療センター研究所 地下1階 中会議室

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はありますが、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。)

今回は新たに私達が試行しました幾つかのQDの結果を御報告したいと考えております。

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
H. Oku, K. Yamada, K. Kobayashi, R. Kataikai, M. Ashfaq, H. Hanaoka, Y. Iida, K. Endo, S. Hasegawa, Y. Maekawa, K. Yano, S. Kano, M. Suzuki.	Nano-Particle Materials Prepared From a Synthetic Antigenic Sequence of <i>Plasmodium falciparum</i> Enolase.	In <i>Peptide Science</i> 2008, M. Nomizu, Ed.; Protein Research Foundation: Osaka,			in press.
Dohi T, Borodovsky A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A and Burkly LC.	TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis.	<i>Gastroenterology</i>			In press
Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T,	DNA Hypermethylation Contributes to Incomplete Synthesis of Carbohydrate Determinants in Gastrointestinal Cancer	<i>Gastroenterology</i>	135:	142-151	2008:
Dohi, T and Kawamura YI,	Incomplete synthesis of the Sd ^a /Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer.	<i>Biochim Biophys Acta,</i>	1780	:467-471,	2008
Dai Chida; Tsuyoshi Sato; Yoshinori Sato; Mitsumasa Kubo; Tetsuya Yoda; Harumi Suzuki; Yoichiro Iwakura	Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix background	<i>Mol Cell Endocrinol.</i> (2008)			in press

Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki* and Mutsunori Shirai	[Corresponding author] RhoH plays critical roles in FcεRI-dependent signal transduction of mast cells	<i>J. Immunol.</i>			(2008) in press
Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Uno, N. Tateishi, S. Furuya, K. Yagi, K. Suzuki, S. Fujita.	The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains.	<i>J.</i> <i>Neuroimmunology.</i>			in press.
T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, K. Suzuki, H. Hashimoto.	A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe.	<i>Clin. Exp.</i> <i>Rheumatol.</i>			in press
R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Fujimoto, Y. Harabuchi, S. Kobayashi, K. Suzuki, H. Hashimoto.	Renal Vasculitis in Japan and UK – are there differences in epidemiology?	<i>Nephrol. Dialysis</i> <i>Transplant.</i>	23(12)	3928-3931,	2008.

S. Kobayashi, A. Ito, D. Okuzaki, H. Onda, N. Yabuta, I. Nagamori, K. Suzuki, H. Hashimoto and H. Nojima.	Expression profiling of PBMC-based diagnostic gene markers isolated from vasculitis patients.	DNA Research	15(4):	253-265,	2008(Aug)
A. Mabuchi, T. Nagao, O. Koshio, T. Ishiwata, A. Yano, K. Suzuki, K. Yokomuro, A.M Wheatley.	Role of F4/80+Mac-1 ^{high} adherent non-parenchymal liver cells in concanavalin A-induced hepatic injury in mice.	Hepatology Res.	38:	1040-1049,	2008(Oct).
A. Hoshino, T. Nagao, N. Nagi-Miura, N. Ohno, M. Yasuhara, K. Yamamoto, T. Nakayama, K. Suzuki.	MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical complement pathway-dependent manner.	J. Autoimmunity	31:	79-89,	2008.
Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto 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.	J Urban Health	85(4):	619-635,	2008.
Nguyen T. L., N. Nakajima, Phuc P., Y. Sato, Hoang N. T., Pham V.H., Luong T.S., H. Katano, T. Kumasaka, T.	H5N1-Infected Cells in Lung with Diffuse Alveolar Damage in Exudative Phase from a Fatal Case in Vietnam.	Jpn. J. of Infectious Dis.	61:	157-160,	2008.

Oka, S. Kawachi, T. Matsushita, T. Sata, K. Kudo, K. Suzuki.					
Y. Ogasawara, H. Kaya, G. Hiraoka, F. Yumoto, S. Kimura, Y. Kadota, H. Hishinuma, E. Senzaki, S. Yamagoe, K. Nagata, M. Nara, K. Suzuki, M. Tanokura, K. Kuchitsu.	Synergistic Activation of Arabidopsis NADPH Oxidase AtrbohD by Ca ²⁺ and Phosphorylation,	J. Biol. Chem.	283:	8885-8891,	2008.
Xiao G, Miyazato A, Inden K, Nakamura K, Shiratori K, Nakagawa K, Miyazawa T, Suzuki K, Kaku M, Kawakami K.	<i>Cryptococcus neoformans</i> inhibits nitric oxide synthesis caused by CpG-oligodeoxynucleotide-stimulated macrophages in a fashion independent of capsular polysaccharides.	Microbiol Immunol.	52:	171-179,	2008.
Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, Shiratori K, Takeda K, Akira S, Saijo S, Iwakura Y, Adachi Y, Ohno N, Suzuki K, Fujita J, Kaku M, Kawakami K.	Deoxynucleic acids from <i>Cryptococcus neoformans</i> activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway.	J Immunol.	15:	4067-1074,	2008..

Hisashi Shinoda, Sadaaki Takeyama, Keiko Suzuki, Shinobu Murakami and Shoji Yamada.,	Pharmacological Topics of Bone Metabolism: A Novel Bisphosphonate for the Treatment of Periodontitis,	<i>J Pharmacol. Sci.</i>			2008.
Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kouki Fujioka, Akiyoshi Hoshino, and Kenji Yamamoto	Visualizing Vitreous Using Quantum Dots as Imaging Agents	IEEE Transactions on Nanobioscience.	Vol. 6, No. 1 March		2007
Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kenji Yamamoto	High-Definition Slit Lamp Video Camera System	Ophthalmic Surgery, Lasers and Imaging			(In Press)
High-Definition Slit Lamp Video Camera System Satoru Yamamoto, Noriyoshi Manabe, Kenji Yamamoto	Ophthalmic Surgery,	Lasers and Imaging			(In Press)
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 <i>S</i> -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,	Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation.	Br J Haematol,	142:	293-300,	2008