

groups which can act as 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 in 2008 we have made the following progress:

4. 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 in diameter and Si rather than the more usual materials (e.g. cadmium selenide) were chosen as Si is likely to be considerably less toxic.
5. With collaborators (Yuma Yamada, Hokkaido University) we initially 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. *However, in the past year these collaborators have appeared to lose interest in the project and no further collaboration has been forthcoming.*
6. 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.

4. In the last year we have tried reacting Rhod dye with an amine-modified quantum dot. Initial reactions using standard rhodamine dye proved difficult so I moved to using NHS (N-hydroxysuccinimide)-labeled rhodamine (Figure 2)

We carried out reactions to attach the dye to the quantum dot. Samples were

passed through protein desalting columns to try to remove any excess rhodamine dye that may remain. Results (Figure 3) show the emission spectra resulting from excitation at 390 nm (left) and 552 nm (excitation wavelength of rhodamine dye). QD is expected to emit at 450 nm and the rhodamine dye at approx. 575 nm. For 390 nm excitation the emission of sample is barely above background levels, however the wide base of the peak shows that QDs are present. Similarly there is a relatively weak but clear signal for the dye. This suggests that the rhodamine successfully attached to the QD. However the amount of QD seems very low indeed. Because of this we cannot be certain that the low level of rhodamine dye signal we see is dye that is attached to QD or due simply to a very small amount of contaminating dye.

Further tests of QD alone, passing down the spin column and testing emission after recovery showed only a small fraction of the initial QDs were present.

Conclusion: QD precipitates on the spin column. Another method or different column should be found to separate the QD.

D. 考察

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. As our collaborators now seem to show no interest in this work an alternative delivery system may have to be looked into.

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.

E:結論

In conclusion. We have made some progress in trying to attach the dye to the quantum dot surface. However this has been made very difficult by the apparent

tendency of the quantum dot to aggregate. Our collaborative MITO-porter researchers appear to have lost interest in collaborating on this topic.

F:健康危機情報

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

G:研究発表

8. 論文発表

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

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

(イ)Masahiro Watanabe, Jonathan G. Heddle, Satoru Unzai, Satoko Akashi, Sam-Yong Park and Jeremy R. H. Tame. (2009) *Nature of the TRAP:Anti-TRAP complex revealed by symmetry remodeling. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 106, 2176-81

(ウ)Satoko Akashi Masahiro Watanabe, Jonathan G. Heddle, Satoru Unzai, Sam-Yong Park and Jeremy R. H. Tame (2009) RNA and Protein Complexes of

trp RNA-Binding Attenuation Protein Characterized by Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 2218–2226

(エ) Frederico F. Miranda, Kenji Iwasaki, Ichiro Yamashita, Jeremy R. H. Tame, Jonathan G. Heddle. (2009). #A self-assembled protein nanotube with a high aspect ratio. *Small* 5, 2077–2084

(ア)学会発表

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
3. October 2008 NTT, Basic Research

Laboratories, Japan. Topic: Bionanoengineering with TRAP protein.

4. February 2009 HITS International Workshop, Tokyo Institute of Technology, Japan. Topic: Bionanoengineering with TRAP protein.

9. その他の業績
書籍等

H:知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

4. 特許取得

None

5. 実用新案登録

None

6. その他

None

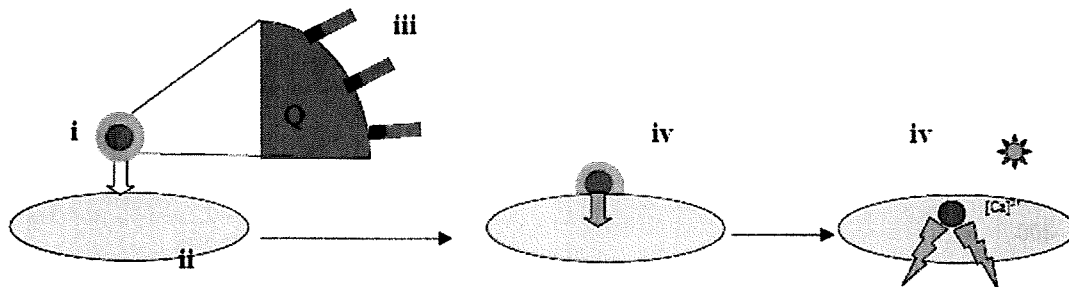


Figure 1: The MITO-porter system (i) is made of layers of different lipids with specificity to different biological membranes. A modified QD (blue) will be inserted into MITO-porter. The QD will be delivered to the mitochondria (ii). The surface of the QD is modified with rhodamine dye (purple in iii). 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.

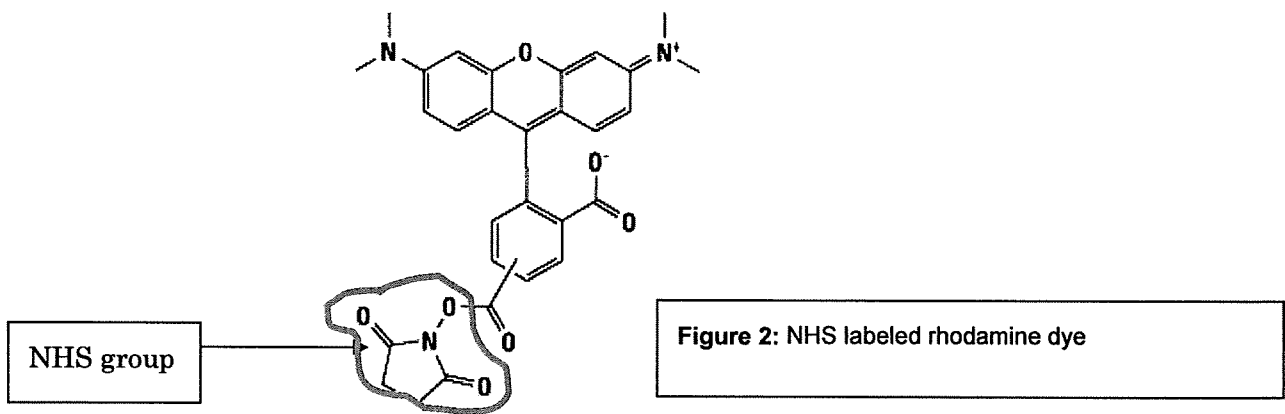


Figure 2: NHS labeled rhodamine dye

NHS-Rhodamine
 M.W. 527.52
 Em/Ex 552/575

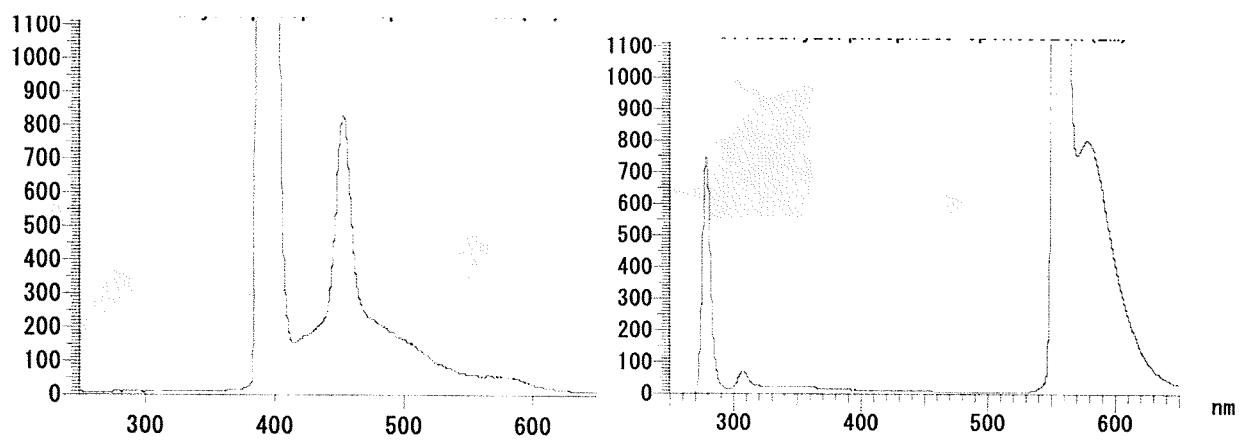


Figure 3: The emission spectra for dye-labeled silicon quantum dots resulting from excitation at 390 nm (left) and 552 nm (excitation wavelength of rhodamine dye).

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・省令室長
(研究協力者：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

A6K 合成ペプチドはアラニンが 6 残基、C 末端側にリジンが 1 残基で構成されるペプチドで、細胞膜より膜たんぱく質を分離する際、膜たんぱく質の安定化を目的とした安定化剤として開発が進められてきた。A6K は膜たんぱく質への毒性が低く、その活性を失活させないことが確認され、また溶液中で濃度依存的にミセルやナノチューブを形成すること、また表面電荷はプラスチャージで、マイナス荷電の siRNA と静電気的な結合をすると考え、siRNA 等の核酸医薬のデリバリーキャリアとしての用途に着目し、開発を進めた結果、動物個体モデルで腫瘍への有効なデリバリー効果を示した。

A:研究目的

本研究の目的は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である。デリバリーキャリアとしては、これまでに検討を重ねてきたアテロコラーゲンの他に、従来、細胞膜より膜たんぱく質を分離する際、膜たんぱく質の安定化を目的とした安定化剤として開発が進められてきた A6K 合成ペプチドを用いた。

B:研究方法

A6K 合成ペプチドは溶液中で

自己組織化により凝集しナノミセルやナノチューブを形成する。C 末端側のリジン残基側鎖は正電荷で親水性の頭部と疎水性の尾部から構成される (図 1)。従って、マイナス荷電の核酸医薬である siRNA と静電気的な結合をすると考え、siRNA 等の核酸医薬のデリバリーキャリアとしての用途

を、主に動物の腫瘍へのデリバリー効果を中心に検討した。移植するがん細胞はルシフェラーゼを発現することから、A6K 合成ペプチドによってデリバリー

する核酸は、Luc, EZH2 をノックダウンする siRNA を用いた。腫瘍への投与は尾静脈からの全身投与によって実施した。

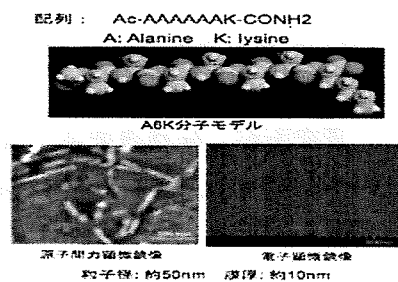


図1。合成ペプチド A6K の構造 (倫理面への配慮)

本研究は細胞及び動物を用いた研究であり、動物については国立がんセンターの定める動物実験指針に基づき、倫理委員会の承認のもと動物愛護に留意して実施された。

C:研究結果

まず A6K 合成ペプチドとルシフェラーゼを抑制する siRNA を混合し、動物に皮下移植した前立腺がん細胞 PC3M-luc の腫瘍に投与した結果、腫瘍のルシフェラーゼ活性は 60% 抑制された。さらに前立腺がん細胞の増殖を抑制する効果の有る EZH2siRNA を A6K ペプチドと混合し、前立腺がんの骨転移モデル動物に全身性に投与した結果、図2に示す結果のように、

投与後 15 日目には、対照としたコントロール siRNA に比較して EZH2siRNA と A6K の複合体は全身の骨転移巣の腫瘍の増殖を顕著に抑制した。

前立腺がん細胞の骨転移モデル

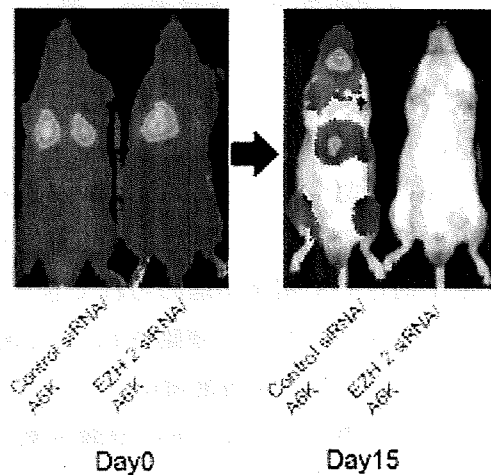


図2。A6K ペプチドによる siRNA デリバリーの腫瘍抑制効果の解析：腫瘍の増殖はイメージングによって定量されている。

D:考察

A6K 合成ペプチドと siRNA との複合体は、動物の腫瘍にデリバリーされ、その遺伝子発現抑制効果を発揮した。siRNA が主要組織にデリバリーされ、その RNA 干渉効果を発揮した証拠は、主要細胞の発現するルシフェラーゼを抑制する siRNA によって、腫瘍の増殖はそのままでありながら、ルシフェラーゼの発光が顕著に減弱したことから判断した。また、治療効果を

発揮する EZH2siRNA と A6K 合成ペプチドとの複合体は、全身の骨転移に有効であったことから、A6K は血液を介した全身投与に有効であると判断できる。この動物には肝臓等への毒性はなかったことも別の実験から判明している。

E:結論

新規合成ペプチド A6K の核酸医薬デリバリー効果を発見した。今後、そのデリバリー及び細胞内への取り込みのメカニズムを解明するとともに、核酸医薬の応用に向けて、臨床での使用が可能かどうかを動物モデルにより安全性を含めて詳細に検討する必要がある。

F:健康危機情報

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

10. 論文発表

1. Takeshita F, Hokaiwado N, Honma K, Banas A, Ochiya T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. In: Sioud M (eds), siRNA and miRNA Gene Silencing. USA, Humana Press, pp 83-92, 2009
2. Morita S, Hara A, Kojima I, Horii T, Kimura M, Kitamura

T, Ochiya T, Nakanishi K, Matoba R, Matsubara K, Hatada I. Dicer is required for maintaining adult pancreas. PLoS ONE, 4:e4212, 2009

3. Honma K, Takemasa I, Matoba R, Yamamoto Y, Takeshita F, Mori M, Monden M, Matsubara K, Ochiya T. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy. Int J Gen Med, 2:243-257, 2009
4. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. Biomarkers, 14:529-538, 2009

2. 学会発表

1. 「small RNA の drug delivery system の開発」(先端技術シンポジウム)、落谷孝広、第 82 回日本内分泌学会・招待講演 (2009.4.24 群馬)
2. 「micro RNA as a Novel Modality for Cancer Therapy」、落谷孝広、第 2 回 DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research Tokyo (2009.7.7-9 がんセンター研究所)
3. 「核酸デリバリーが拓く non-coding small RNA による疾患解明」、落谷孝広、遺伝子・デリバリー研究会 第 9 回シンポジウム (2009.7.9-11 大阪)
4. 「microRNA によるがんの診断治療」、落谷孝広、第 1 回日本 RNAi 研究会 (2009.8.28-29 広島大学)
5. 「マイクロ RNA によるがんの

診断と治療」、落谷孝広、第 68 回日本癌学会学術総会（がんにおける microRNA 制御異常シンポジウム/講演）（2009.10.1-3 横浜）

6. 「RPN2 による糖鎖修飾を介した薬剤耐性、浸潤転移の制御機構」、落谷孝広、第 82 回日本生化学会学会（/講演）（2009.10.21-25 神戸）

7. RNAi-based oligonucleotides therapy」、落谷孝広、Kashiwa Symposium on Cancer Biology 2009 (2009.11.13 がんセンター東病院)

8. 「microRNA による Cancer Stem Cell Therapy の可能性」、落谷孝広、第 32 回日本分子生物学会（/講演）（2009.12.9-12 横浜）

(海外)

1. Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA against cancer. MicroRNAi-meeting. RNAi World Congress Boston, USA. May 12-13, 2009

2. Ochiya T. CRS (Controlled Release Society). Oligonucleotides delivery 36TH ANNUAL MEETING AND

EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen ,Denmark. July 16-24, 2009

3. Ochiya T. RPN2 as a novel therapeutic target for cancer drug resistance. 9th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Brussels, Belgium. September 12-18, 2009

G. その他の業績

なし

H:知的所有権の出願・取得状況
(予定を含む)

7. 特許取得

特許出願予定：A6K 新規合成ペプチドによる核酸デリバリー

8. 実用新案登録

なし

9. その他

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、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はすでに報告した。今回は、今後の臨床応用への展開を目的として、より安全性を担保するために、炎症反応を惹起せずに、遺伝子の発現期間、発現量を保つ研究を行なった。すなわち、導入遺伝子に含まれる CpG の量を減少させること、ポリプレックスナノミセルにコンドロイチン硫酸を添加することなどにより、より安全でより効率の良いベクターの開発に成功した。

研究協力者

鈴木 朗	流動研究員
山本 剛史	研修生
和田 俊輔	研修生
宮田 浩子	研究補助員
井上 麻衣	研究補助員
柴田 栄子	研究補助員
合田 睦美	研究補助員

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、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、プラスミドに含まれる CpG 量を減少させる

こと、ポリプレックスナノミセルにコンドロイチン硫酸を添加することにより、より安全でより効率の良いベクターの開発に成功した。

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 マウスに麻酔下で従来のルシフェラーゼ発現ベクターと、ルシフェラーゼをコードする部位の CpG を無くした pORF- Δ Luc とを用いて、PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いてそれぞれの 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 マウスに麻酔下で従来のルシフェラーゼ発現ベクターと、ルシフェラーゼをコードする部位の CpG を無くした pORF- Δ Luc とを用いて、PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いてそれぞれの 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、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。

D. 研究結果

従来のルシフェラーゼ発現ベクターと、ルシフェラーゼをコードする部位の CpG を無くした pORF- Δ Luc とを用いて、PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いてそれぞれの 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結果を図 1 に示す。

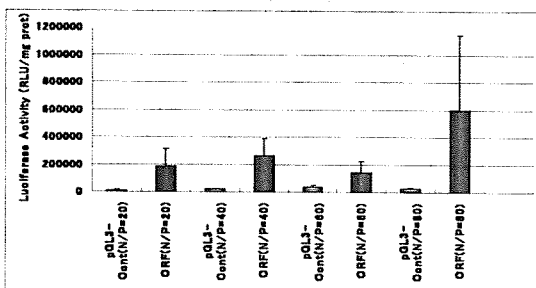


図 1 従来のルシフェラーゼ発現ベクター (pGL3-Cont)、ルシフェラーゼコード部位の CpG を除去したベクター (pORF- Δ luc) を用いた PEG-b-P[Asp-(DET)] による N/P 別 in vivo 遺伝子発現

肺における遺伝子発現量は、いずれの N/P 比においても pORF- Δ luc のほうが高値であり、in vivo における遺伝子発現において、CpG 量が影響することが示唆された。遺伝子発現の時間的変化に対する CpG 量の影響を調べたものを図 2 に示す。

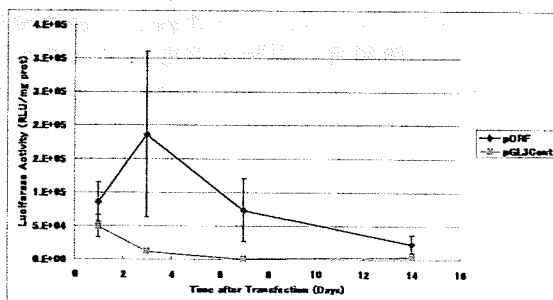


図 2 pGL3-Cont と pORF- Δ luc の in vivo 遺伝子発現の時間的変化

pORF- Δ luc による遺伝子発現は、pGL3-Cont に比べて極めて初期から発現量が高値であり、投与後 14 日目まで、その傾向は持続していた。

次に、pORF- Δ luc および pGL3-Cont とを用いて、PEG-b-P[Asp-(DET)]を用いてそれぞれの 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、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 および IL-6) 発現量を図 3、4 に示す。

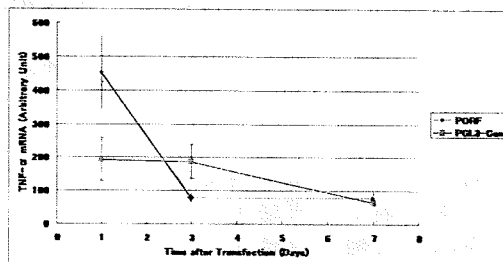


図 3 pGL3-Cont、pORF- Δ Luc / PEG-b-P[Asp-(DET)] 投与による炎症性サイトカイン (TNF- α) mRNA 発現量の時間経過

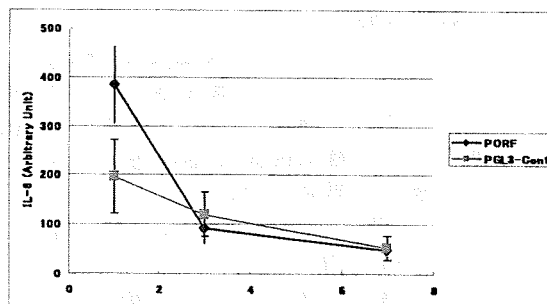


図 4 pGL3-Cont、pORF- Δ Luc / PEG-b-P[Asp-(DET)] 投与による炎症性サイトカイン (IL-6) mRNA 発現量の時間経過

炎症性サイトカインである TNF- α 、IL-6 の遺伝子発現量は、投与後 1 日目で pGL3-Co

nt に比べて pORF- Δ Luc が高値を示した。TNF- α は pORF- Δ Luc が 3 日後には低値をとり、IL-6 は 3 日後には同等の値を示し、いずれも 7 日後には低値を示した。

次に、コンドロイチン硫酸存在下の PEG-b-P[Asp-(DET)]による遺伝子導入効率、炎症性サイトカイン mRNA 発現量、生存率への影響を調べた。

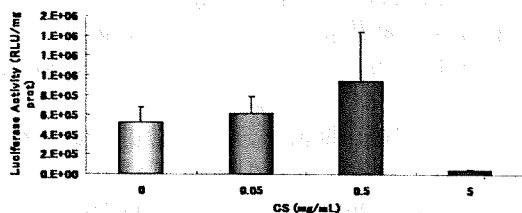


図 5 コンドロイチン硫酸の濃度とルシフェラーゼ遺伝子発現量との関係

コンドロイチン硫酸の濃度とルシフェラーゼ遺伝子発現量との関係を図 5 に示す。ルシフェラーゼ遺伝子の発現量は、コンドロイチン硫酸 0~0.5 mg/ml 存在下に変化を認めず、5 mg/dl 存在下に発現は抑制された。コンドロイチン硫酸の濃度と、遺伝子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との関係を図 6 に示す。

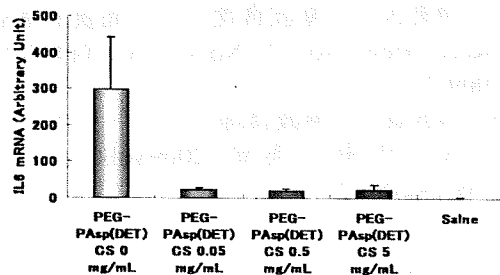


図 6 コンドロイチン硫酸の濃度と遺伝子投与後の肺における IL-6 mRNA 発現量との関係

コンドロイチン硫酸存在下に、炎症性サイトカインの IL-6 mRNA 発現量が著明に抑制されることがわかった。

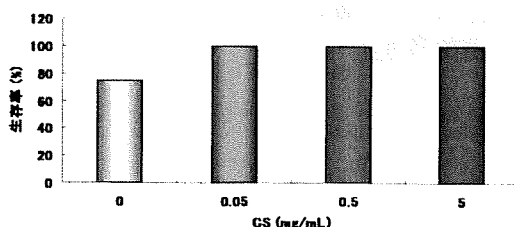


図 7 コンドロイチン硫酸の濃度と遺伝子投与後マウスの生存率の関係

コンドロイチン硫酸の濃度と、遺伝子導入後のマウスの生存率との関係を図 7 に示す。コンドロイチン硫酸存在下に遺伝子導入後のマウスの生存率が増加することがわかった。

D. 考察

1. 達成度について

我々は、本研究において 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。昨年度の研究成果により、これまで問題となっていた PEG-b-P[Asp-(DET)]ベクターのホモポリマー混入による遺伝子導入後の炎症の惹起のメカニズムが明らかになった。本年度の研究によりさらに導入プラスミド中の CpG の存在が炎症を惹起し、遺伝子発現を抑制していることがわかった。また、PEG-b-P[Asp-(DET)]ベクターによる遺伝子導入時にコンドロイチン硫酸を適度の濃度で添加することにより、遺伝子発現量を変化させずに炎症反応を強力に抑制することができるとわかった。

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、炎症反応を強力に抑制することができたことは、実際の臨床応用にむ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。合成ペクターの世界でも、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て、臨床応用に向けて、かなりの進歩が見られた。

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。

H. 研究発表

1. 論文発表

原著論文

- 1) Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino H, Abe M, Tsushima M, Yoshimasa Y, Yamashita T, Miyamoto Y, Yamamoto A, Tomoike H, Yokoyama S: Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb*, in press
- 2) Harada-Shiba M, Takamisawa I, Miyata K, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, Kangawa K, Yoshihara F, Asada Y, Hatakeyama K, Nagaya N and Kataoka K: Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol Ther*, 2009; 17:1180-1186.
- 3) Watanabe K, Harada-Shiba M, Suzuki A, Gokuden R, Kurihara R, Sugao Y, Mori T, Katayama Y and Niidome T: In vivo siRNA delivery with dendritic poly(L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Mol Biosyst*, 2009; 5:1306-1310.
- 4) Fujita Y, Kakino A, Harada-Shiba M, Sato Y, Otsui K, Yoshimoto R and Sawamura T: C-reactive protein uptake by macrophage via class A scavenger receptor. *Clin Chem*, in press
- 5) Harada K, Miyamoto Y, Morisaki H, Ohta

N, Yamanaka I, Kokubo Y, Makino H, Harada-Shiba M, Okayama A, Tomoike H, Okumura T, Saito Y, Yoshimasa Y, Morisaki T, A novel Thr56Met mutation of the autosomal recessive hypercholesterolemia gene associated with hypercholesterolemia. *J. Atheroscler Thromb*, in press

総説

1. 大畑洋子、斯波真理子「家族性高コレステロール血症(FH,LDL受容体遺伝子異常)」*The Lipid Vol.20* 14-19 (366-371) No.4
2. 斯波真理子「遺伝子異常によるLDL代謝異常—変異遺伝子の発見と装薬への応用—特集にあたって」*The Lipid Vol.20* No.4 12-13(364-365) 2009
3. 山下貴裕、斯波真理子「常染色体劣性遺伝性高コレステロール血症 (ARH)」*The Lipid Vol.20* No.4 20-25(372-377) 2009.
4. 鈴木朗、斯波真理子「高分子ナノキャリアによる遺伝子デリバリー」*The Lung perspectives Vol. 17* No.3 67-71(289-293) 2009
5. 斯波真理子「家族性高コレステロール血症と類縁疾患」*血管医学 Vol. 10* No.1 41-47 2009
6. 槇野久士、斯波真理子「循環器疾患に関する大規模臨床試験脂質異常症」*Heart View Vol. 13* No. 4, 67-71(415-419) 2009
7. 槇野久士、斯波真理子 「脂質異常症」*Heart View Vol.13* No.4 67-70(415-418) 2009
8. 杉沢貴子、斯波真理子 「トリグリセリド低下作用」*薬局* 2009Vol.60 55-58 (239-242)No.2

2. 学会発表

国内学会

1. 鈴木彩香、馬原淳、山下敦、姜貞勲、森反俊幸、斯波真理子、山岡哲二
血中LDL濃度の低下効果を有するガラクトース修飾デキストラン硫酸の合成と評価
日本再生医療学会 ポスター発表 2010年 3月 広島
2. 斯波真理子
家族性高コレステロール血症の性差
日本性差医学医療学会 シンポジウム
2010年2月 東京
3. 斯波真理子

Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia

日本循環器学会 シンポジウム 2010年3月 京都

4. Tachibana Y, Kamata W, Kang J, Harada-Shiba M, and Yamaoka T, Development of siRNA carrier for liver targeting, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium ポスター発表 2009年 福岡

5. Kamata W, Tachibana Y, Kang J, Miyata H, Harada-Shiba M, Obika S, Yamaoka T, Hepatocyte-specific siRNA delivery for treating familial hypercholesterolemia, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium ポスター発表 2009年 福岡

6. Yamamoto T, Harada-Shiba M, Wada S, Torigoe H, Yamamoka T, Narukawa K, Imanishi T and Obika S, Therapeutic application of 2', 4' -BNA/LNA-modified oligonucleotide for the treatment of hypercholesterolemia, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium ポスター発表 2009年 福岡

7. Watanabe K, Harada-Shiba M, Suzuki A, Higuchi Y, Kawakami S, Hashida M, Gokuden R, Kurihara R, Sugao Y, Mori T, Katayama Y, Niidome T, Systemic oligonucleotide delivery with dendritic poly(L-lysine) into the mouse models of the liver diseases, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium ポスター発表 2009年 福岡

8. Suzuki A, Miyata K, Itaka K, Nishiyama N, Miyata H, Inoue M, Shibata E, Yamaguchi S, Ishii T, Kataoka K, Harada-Shiba M, Safe and efficient gene delivery to cystic fibrosis cells by using polyplex nanomicelles, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium ポスター発表 2009年 福岡

9. 湯浅由美子、榎野久士、尾崎司、南野直人、宇佐美眞、吉政康直、斯波真理子

「LDL-アフェレーシス (LDL-A)」治療時に除去される物質のプロテオーム解析

日本アフェレーシス学会 一般演題 2009年9月 札幌

10. 斯波真理子、山本剛史、山岡哲二、小比賀聡、小川浩司、峠崎純一、西岡宏、西垣孝幸、吉田幸太郎、榎野久士「家族性高

コレステロール血症(FH)に対する治療法の変遷と今後の展望」第30回日本アフェレーシス学会 シンポジウム 2009年9月 札幌

11. 榎野久士、湯浅由美子、吉政康直、斯波真理子「LDLアフェレーシスにより除去される分子の検討」第30回アフェレーシス学会 シンポジウム 2009年9月 札幌

12. 宮本恵宏、吉政康直、斯波真理子、太田直孝、山本賢、藤山啓美、佐野隆宏、佐野道孝「遺伝子診断に基づく家族性高コレステロール血症の診断基準の有用性の検討」第16回日本遺伝子医療学会大会一般口演壇発表 2009年7月30日～8月1日 北海道

13. Suzuki A, Obika S, Yamaoka T, Torigoe H, Miyata H, Jinno K, Inoue M, Nagumo A, Gouda M, Harada-Shiba M, Therapeutic use of bridged nucleic acid(BNA) for the treatment of hypercholesterolemia」第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口

14. Yuasa Y, Makino H, Sugisawa T, Nishimura M, Osaki T, Minamino N, Usami M, Yoshimasa Y, Tomoike H, Harada-Shiba M, Proteomic analysis of substances removed by LDL-Apheresis(LDL-A) Treatment 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会 ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口

15. Harada-Shiba M, Yamashita S, Arai H, Bujo H, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Decrease in Achilles tendon xanthomas by probucol is associated with decreased LDL-C and TC levels in patients with familial hypercholesterolemia(FH) 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会ポスター発表2009年7月17日～18日 山口

16. Ohta N, Harada-Shiba M, Miyamoto Y, Ura T, Makino H, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yokoyama S, Tomoike H, Yamada N, Verification of the diagnostic criteria for familial hypercholesterolemia」第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会ポスター発表 2009年7月17日～18日 山口

17. Bujo H, Yamashita S, Arai H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Decrease in HDL-cholesterol levels by probucol treatment is not associated with cardiovascular risk in patients with familial hypercholesterolemia, 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日～18日 山口

18. Hirano K, Zang B, Yamaguchi S, Ikegami C, Nagasaka H, Miida T, Sasaguri Y, Okazaki M, Harada-Shiba M, Saku K, Tochino Y, Selective evaluation of high density lipoprotein from mouse small intestines by in

situ perfusion technique, 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日~18日 山口

19. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Makino H, Yoshimasa Y, Yokoyama S, Tomoike H, Non HDL-cholesterol as a risk factor for CAD in heterozygous familial hypercholesterolemia(FH), 第41回日本動脈硬化学会総会・学術集会シンポジウム 2009年7月17日~18日 山口

20. 鈴木朗、宮田完二郎、位高啓二、西山伸宏、宮田浩子、井上麻衣、柴田映子、山口知是、石井武彦、片岡一則、斯波真理子「嚢胞性線維症に対する経肺遺伝子治療法の開発」遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム ポスター発表 2009年7月9日~11日 大阪

21. 渡部和人、斯波真理子、鈴木朗、樋口ゆり子、川上茂、橋田充、御供田理沙、栗原亮介、菅尾祐輔、森健、片山佳樹、新留琢郎「肝疾患治療に向けたリジンデンドリマーによるオリゴ核酸デリバリー」遺伝子・デリバリー研究会第9回シンポジウム ポスター発表 2009年7月9日~11日 大阪

22. 山崎毅、大石基、田村磨聖、斯波真理子、菊池明彦、長崎幸夫「高いHDL/LDL比を示す高機能型胆汁酸吸着剤としての4級化ナノゲルの創製」

平成21年度繊維学会年次大会 ポスター発表 2009年6月10日~12日 東京

23. 山崎毅、大石基、田村磨聖、斯波真理子、菊池明彦、長崎幸夫「経口投与型胆汁酸吸着剤の設計—高いHDL/LDL比を示す4級化ナノゲルの設計と評価」

第58回高分子学会年次大会ポスター発表会2009年5月27日~29日 神戸

24. 杉沢貴子、斯波真理子、楨野久士、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106回日本内科学会ポスター発表 2009年4月10日 東京

25. 杉沢貴子、斯波真理子、楨野久士、宮本恵宏、吉政康直、都島基夫、山本章、友池仁暢「家族性高コレステロール血症(FH)ヘテロ接合体におけるLDL-C及びアキレス腱肥厚(ATT)による冠動脈疾患(CAD)高リスク患者の抽出」第106回日本内科学会ポスター発表 2009年4月10日 東京

国際学会

1. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Yokoyama S, Tomoike H, Impact of statins on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia, 2009 International Symposium on Atherosclerosis ポスター発表 2009年6月 Boston, USA

2. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimasa Y, Yamamoto A, Yokoyama S, Tomoike H, Identifying very high risk patients of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia from clinical features, 2009 International Symposium on Atherosclerosis ポスター発表 2009年6月 Boston, USA

3. Yamazaki T, Tamura M, Oishi M, Harada-Shiba M, Kikuchi A, Nagasaki Y, Enhanced serum cholesterol reduction in vivo by PEGylated nanogels containing quaternary polyammonium core as a bile acid adsorbent, 3rd International Symposium on Atomic Technology/3rd Polyscale Technology Workshop 2009年3月 東京

4. Arai H, Yamashita S, Bujyo H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Long-term probucol treatment prevents cardiovascular events in coronary artery disease patients with heterozygous familial hypercholesterolemia, International Symposium on Atherosclerosis 2009年6月 Boston, USA

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)

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

研究要旨

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、高分子ミセルを局所静脈内投与によって骨格筋にデリバリーしたところ、プラスミド DNA(pDNA)単独より2桁以上高い DNA 量と遺伝子発現が確認された。そこで治療遺伝子として可溶性 VEGF 受容体(sFlt-1)を骨格筋に遺伝子導入し、ヒト膵臓がんの皮下移植に対する血管新生阻害治療を行った結果、有意な治療効果が確認された。さらに、組織傷害のマーカー等の定量によって、本手法の高い安全性が示唆された。

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

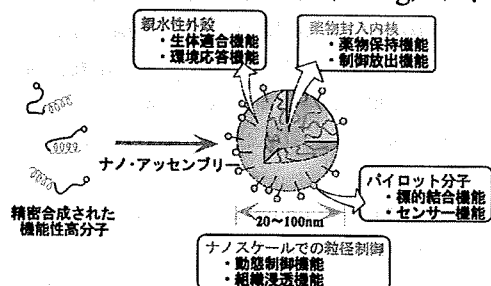


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリーに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

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。

我々はこれまでの研究において 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 in vitro における機能評価を行ってきた。そこで本年度は、これらの高分子ミセルの in vivo における機能評価を行った。高分子ミセル型ベクターを局所静脈内投与し、骨格筋におけるレポーター遺伝子の発現プロファイルを評価したところ、プラスミド DNA(pDNA)単独より顕著に高い遺伝子発現が確認された。また、骨格筋における pDNA の到達量を評価したところ、2桁以上高い DNA 量がミセル投与群で確認された。また、実際の治療遺伝子として可溶性 VEGF 受容体(sFlt-1)を骨格筋に遺伝子導入し、ヒト膵臓がんの皮下移植モデルに対する血管新生阻害治療を行った結果、有意な治療効果が確認された。さらに、組織傷害のマーカーである creatine phosphokinase (CPK)の血中濃度を評価したところ、CPK 値の上昇は確認されず、本手法の高い安全性が示唆された。

B:研究方法

1) 高分子ミセル型ベクターによる骨格筋への遺伝子導入

高分子ミセル型ベクターの調製は、poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) (PEG-b-PLys)(PEG 分子量 12000, PLys 重合度 16, 38, 88)と pDNA を N/P 比(PEG-b-PLys 中のアミノ基/DNA 中のリン酸残基)が 2 になるように混合することによって調製した。ベクターの投与は、マウスの下肢に四肢近位に止血帯を用いて一時的駆血を施し、その後、大伏在静脈からベクターを一定速度で投与する Wolff らによって開発された投与方法 (Mol. Ther. 10:386(2004))を利用した。遺伝子発現評価は、ルシフェラーゼ遺伝子の発現をフロンイメージャーによって経時的に定量することにより評価した。

2) 骨格筋における pDNA 到達量の評価

骨格筋における pDNA 到達量は、筋組織をホモジナイズし、pDNA を抽出後、pDNA に対するプライマーを用いることによる Real-Time PCR により定量した。pDNA 量は、骨格筋の β -アクチンに対する相対量として算出した。

3) sFlt-1 によるヒト膵臓がんモデルの治療

Balb/c マウス(メス)の皮下にヒト膵臓がん由来 BxPC3 細胞を移植し、体積が 60mm³に達した後、sFlt-1 発現プラスミドを搭載した高分子ミセル型ベクターを上記 1)と同様に 0 日目と 7 日目に局所 i.v.投与した。制がん活性は、腫瘍体積を経時的に測定することによって評価した。

4) 遺伝子導入法の安全性評価

高分子ミセル型ベクターの局所 i.v.投与の組織傷害性を血中 CPK 濃度の測定により評価した。

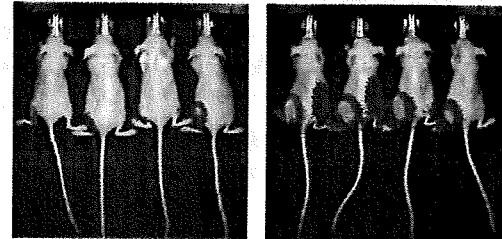
C:研究結果

1) 高分子ミセル型ベクターによる骨格筋への遺伝子導入

遺伝子導入 6 日後のルシフェラーゼ(Luc)発現量をフロンイメージャーによって評価した結果を図 2(A)に示す。また、PLys 重合度の異なる PEG-b-PLys からなる高分子ミセル型ベクターの Luc 発現量を経時的に定量した結果を図 2(B)に示す。これらの結果より、高分子ミセル型ベクターは naked pDNA の 2 桁以上高い遺伝子導入効率を示すことが明らかになった。また、遺伝子発

現期間に関しても高分子ミセル型ベクターは 1 ヶ月以上の持続的は遺伝子発現を示した。ここで naked pDNA の局所 i.v.投与は、既にヒトへと応用されている pDNA の筋肉内注射よりも高い遺伝子導入効率を示すことが知られており (Mol. Ther. 10:386(2004))、それらの結果より、高分子ミセル型ベクターの局所 i.v.投与は、骨格筋への新しい遺伝子導入法として期待される。一方、PLys 重合度に関しては、H20 年度に報告した cell free 系での遺伝子導入実験の結果に一致して、PLys 重合度が 88 の場合には遺伝子発現の低下が確認された。

(A) naked pDNA 高分子ミセル



(B)

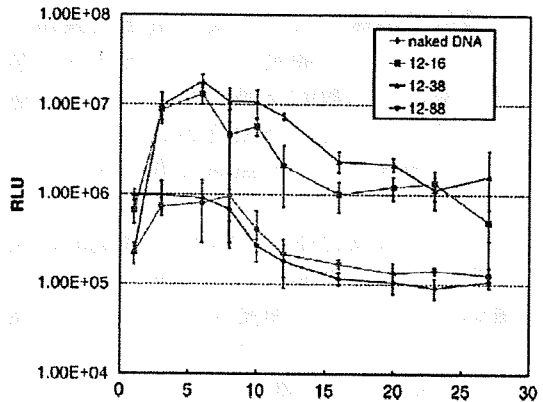


図 2. naked pDNA および高分子ミセル型ベクターの局所 i.v.投与後の下肢骨格筋における Luc 遺伝子発現

2) 骨格筋における pDNA 到達量の評価

投与 1 日および 5 日後に筋組織に送達された intact な pDNA 量を Real-time PCR によって評価した(表 1)。その結果、高分子ミセル(組成 12-38)投与群では、naked pDNA 投与群と比較して 2-3 桁高い pDNA が検出された。

表 1. 筋組織中の intact pDNA 量(ng/mg muscle)の定量(n=3)

	Day 1	Day 5
naked DNA	2.4	0.03
ミセル	457.3	14.53

コントロール undetected undetected

3) sFlt-1 によるヒト膵臓がんモデルの治療 pDNA および高分子ミセル投与後の相対腫瘍体積変化を図 3 に示す。その結果、naked pDNA と高分子ミセル(組成 12-38)のどちらの場合においても制がん活性が認められたが、高分子ミセルは naked pDNA よりも有意に高い制がん活性を示した。一方、Luc 発現 pDNA を搭載した高分子ミセル投与群では治療効果が認められなかった。

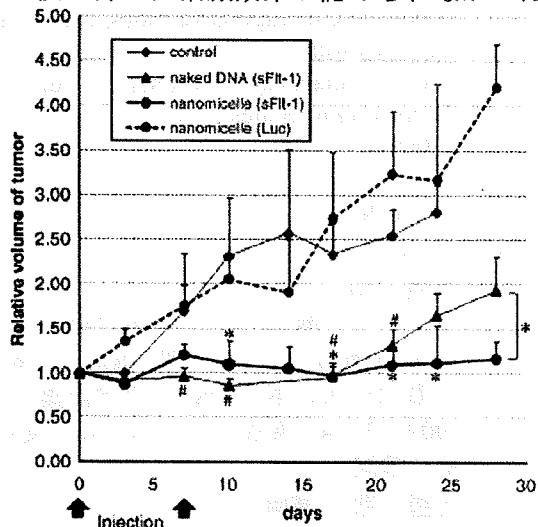


図 3. naked pDNA および高分子ミセル(組成 12-38)の i.v.投与後の相対腫瘍体積変化 (BxPC3 細胞) * <0.05

4) 遺伝子導入法の安全性評価

naked pDNA および高分子ミセル(組成 12-38)の i.v.投与 1 日後および 6 日後の血中 CPK 値を表 2 に示す。その結果、naked pDNA と高分子ミセルのどちらの場合においても 1 日後に CPK 値の上昇を示したが、6 日後にはコントロールと同程度まで低下することが確認された。

表 2. naked pDNA および高分子ミセル投与後の血中 CPK 値の定量(n=4)

	Day 1	Day 6
naked DNA	113.3	68.8
ミセル	163.1	67.8
コントロール	62.7	-

D:考察

本年度は、H20 年度までに開発した pDNA の折り畳み構造を制御した高分子ミ

セル型ベクターの in vivo 応用に関する研究を行った。その結果、H20 年度の in vitro における遺伝子発現挙動と一致して、PLys 重合度が 40 以下の PEG-b-PLys から形成された高分子ミセルにおいて naked pDNA より 2 桁以上高い遺伝子導入効率が in vivo において確認された。現在、naked pDNA は、下肢閉塞性動脈硬化症等の血管再生治療において筋注が実際にヒトへと応用されているが、Wolff らの研究によって naked pDNA の局所 i.v.投与(一時的駆血を施した下肢に対して大伏在静脈からベクターを一定速度で投与する方法)は、筋注よりも優れていることが明らかとなっている (Mol. Ther. 10:386(2004))。従って、本実験における高分子ミセルの局所 i.v.投与は、naked pDNA の筋注よりはるかに優れた骨格筋への遺伝子導入法として期待される。そこで、本研究では、実際に治療遺伝子として、sFlt-1 遺伝子を搭載した高分子ミセルを投与したところ、naked pDNA より優れた制がん活性が確認された。また、本手法の組織傷害性を血中 CPK 値の定量によって評価したところ、一過的な CPK 値の上昇が見られたが、6 日後の測定では正常レベルであったことから、本手法のヒトへの応用において致命的な組織傷害性はないものと思われる。

以上のように、本研究では、当初目標としていた非ウイルス型ベクターの構築から in vivo 機能評価までを実施し、その有用性を明らかにすることができた。DNA の折り畳み構造を制御した非ウイルス型ベクターを開発し、in vitro のみならず in vivo における有用性までを明らかにした研究はこれまでに報告例が無く、関連分野に大きなインパクトを与えるものと予想される。また、高分子ミセル型ベクターの局所 i.v.投与はがん治療のみならず様々な難治性疾患の遺伝子治療への展開可能であり、今後は虚血性疾患等の遺伝子治療へと展開していく予定である。

E:結論

本年度は、pDNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセルの局所 i.v.投与による骨格筋への遺伝子導入法の有用性を明らかにした。このように DNA の折り畳み構造を

制御した非ウイルス型ベクターを開発し、*in vitro*のみならず *in vivo* における有用性までを明らかにした研究はこれまでに報告例が無く、関連分野に大きなインパクトを与えるものと予想される。今後は、本手法を虚血性疾患等の遺伝子治療へと展開していく予定である。

F:健康危機情報

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

1. K. Itaka, K. Osada, K. Morii, P. Kim, S. -H. Yun, K. Kataoka, Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J. Control. Release* in press
2. S. Hiki, K. Kataoka, Versatile and selective synthesis of "Click Chemistry" compatible heterobifunctional poly(ethylene glycol)s possessing azide and alkyne functionalities. *Bioconjugate Chem.* in press
3. M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv. Mater.* 21 (34) 3520-3525 (2009)
4. M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M. R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.* 17 (8) 1404-1410 (2009)
5. M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y. Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol. Ther.* 17 (7) 1180-1186 (2009)
6. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient

nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* 48 (29) 5309-5312 (2009)

7. Y. Matsumoto, K. Itaka, T. Yamasoba, K. Kataoka, Intranuclear fluorescence resonance energy transfer analysis of plasmid DNA decondensation from nonviral gene carriers. *J. Gene. Med.* 11 (7) 615-623 (2009)
8. 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* 10 (1) 119-127 (2009)

2. 学会発表

(国内学会)

1. 片岡一則、ポリエチレングリコール-ポリアミノ酸ブロック共重合体を基盤とする高分子ミセル型 DDS の開発 (第 25 回日本 DDS 学会学術集会、2009/7/3-7/4、東京ドームホテル、東京) 招待講演
2. 片岡一則、健康サステイナブル社会を先導するナノバイオマテリアル ~ピンポイント DDS への展開~ (第 58 回高分子討論会、2009/9/16-9/18、熊本大学工学部黒髪地区、熊本県) 招待講演
3. 片岡一則、ポリペプチドを用いた新規高分子材料開発 ~医療、膜、繊維等への展開~ (NEDO 第一回環境化学セミナー、2009/10/29、NEDO 日比谷オフィス、東京) 招待講演
4. 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 18 回ポリマー材料フォーラム、2009/11/26-11/27、タワーホール船堀、東京) 招待講演

(国際学会)

1. K. Kataoka, Supramolecular Structures as Carriers in Gene and Drug Delivery ~Challenge to Smart Molecular Therapy~ (Biomaterials Asia 2009, 2009/4/5-4/8, Regal Airport Hotel, Hong Kong, China) Invited Lecture
2. K. Kataoka, Smart Nanocarrier Systems for Targeted Drug and Gene Delivery ~A