

- Future for the Pharmaceutical Industry~
(2nd European Conference for Clinical Nanomedicine, 2009/4/27-4/29, Messe Schweiz, Hall l'Entree, Basel, Switzerland) Keynote Lecture
3. K. Kataoka, Supramolecular Assemblies of Smart Block Copolymers as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (International Symposium Celebrating the 50th Anniversary of the Journal "Polymer", 2009/6/7-6/9, The Congress Centrum Mainz, Mainz, Germany) Plenary Lecture
 4. K. Kataoka, Importance of Nanotechnology in Healthcare in the 21st Century - The Japanese Perspective ~Towards Smart Molecular Therapy~ (2nd ESF/UB European Summer School in Nanomedicine, 2009/6/12-6/16, Quinta da Marinha, Cascais, Lisbon, Portugal) Plenary Lecture
 5. K. Kataoka, Supra-macromolecular Nanodevices for Smart Molecular Therapy (73rd Prague Meeting on Macromolecules (PMM 2009), 2009/7/5-7/9, Prague, Czech Republic) Invited Lecture
 6. K. Kataoka, Nanotherapeutics through Polymer Chemistry: Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (34th FEBS Congress, 2009/7/4-7/9, Prague Congress Centre, Prague, Czech Republic) Invited Lecture
 7. K. Kataoka, Nanotherapeutics through Polymer Chemistry ~Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery~ (2nd TERMIS World Congress, 2009/8/31-9/3, Lotte Hotel World, Seoul, Korea) Keynote Lecture
 8. K. Kataoka, Supramolecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery ~Challenges to Intracellular Nanomedicine~ (22nd European Conference on Biomaterials, 2009/9/7-9/11, Lausanne, Switzerland) Keynote Lecture
 9. K. Kataoka, Interface Aspects of Polymeric Drug Delivery Systems~Challenges in Gene Delivery~ (22nd European Conference on Biomaterials, 2009/9/7-9/11, Lausanne, Switzerland) Invited Lecture
 10. K. Kataoka, Supra-molecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (2nd Swiss-Japanese Symposium on Bionanotechnology, 2009/9/10-9/11, Aigle Castle, Switzerland) Invited Lecture
 11. K. Kataoka, Supra-molecular Structures as Nanodevices in Gene and Drug Delivery ~Challenges to Smart Molecular Therapy~ (The Norman Bethune International Medical Forum 2009 & 70th Anniversary Celebration for Former Norman Bethune University of Medical Sciences, 2009/9/23-9/26, Changchun, China) Invited Lecture
 12. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Block Copolymers for Smart Molecular Therapy (2nd Aquitaine Conference on Polymers, 2009/10/13-10/16, Palais des Congres, Arcachon, France) Invited Lecture
 13. K. Kataoka, Supramolecular Nanocarriers for Gene and Drug Delivery (1st Annual Conference of the American Society for Nanomedicine, 2009/10/22-10/25, Bolger Center, Potomac, Maryland, USA) Keynote Lecture
 14. K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices for Nucleic Acid Delivery (Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium, 2009/11/3-11/6, Centennial Hall, Kyushu University Hospital Campus, Fukuoka, Japan) Invited Lecture
 15. K. Kataoka, Block copolymer micelles and vesicles as nanocarriers for gene and drug delivery (The 10th US-Japan symposium on Drug Delivery System, 2009/12/16-12/20, Lahaina, Maui, Hawaii, USA) Plenary Lecture
- H:知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)
1. 片岡一則, 宮田完二郎, 西山伸宏, 石井武彦, 呉寿榮, キム ヒュンジン、カチオン性のポリ(アミノ酸)およびその使用出願、特願 2009-31799

平成 21 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
(H19-ナノ一般-012)
班会議

平成 21 年 11 月 28 日 (土)
国立国際医療センター研究所
中会議室 地下 1 階

10:25～10:55

山本 健二 国立国際医療センター
研究所 国際臨床研究センター センター長
あいさつ・今後の方針等

10:55～11:15

太田 敏博 東京薬科大学 環境分子生物学研究室 教授
「ナノ粒子の毒性・安全性について」

11:15～11:35

Jonathan HEDDLE 東京工業大学 グローバルエッジ研究院 准教
Modified Silicon Quantum Dots for targeting to Mitochondria

11:35～12:35 (昼食)

12:35～12:55

狩野 繁之 国際医療センター研究所 適正技術開発移転研究部 部長
奥 浩之 (発表者) 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
矢野和彦 (発表者) 群馬大学大学院工学研究科・産学連携研究員
「量子ドット(半導体ナノ粒子)のマラリアワクチン研究への応用」

12:55～13:15

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
「腹腔内炎症応答制御法の開発と応用」

13:15～13:35

鈴木 春巳 国立国際医療センター研究所 臨床病理研究室 部長
「新規遺伝子Gaspは胸腺細胞の正の選択に必須である」

13:35～13:55

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 教授

「慢性炎症のDDSのための機能量子ドット(QD)」

13:55~14:15

鈴木 恵子 昭和大学歯学部 歯科薬理学 講師

「炎症性骨破壊における破骨細胞の動態

ーバイオイメージング手法による解析ー」

14:15~14:45 (休憩)

14:45~15:05

山本 悟 国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科 医長

「細隙灯顕微鏡用デジタルビデオカメラシステムの開発」

15:05~15:25

馬目 佳信 東京慈恵会医科大学・DNA 医学研究所・分子細胞生物学研究部 教授

藤岡 宏樹(発表者)

(同上)

助教

「甲状腺癌特異的抗体(JT-95)と蛍光ナノ粒子QDを用いた検出システムの開発」

15:25~15:45

落谷 孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室 室長

「体液中のmicroRNAの意義とデリバリー技術への応用」

15:45~16:05

斯波真理子 国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 室長

「高分子ナノミセルのin vivo投与による機能評価」

16:05~16:25

片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科 教授

「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」

16:25~

山本健二 総括・閉会の挨拶

問い合わせ

〒162-8655

東京都新宿区戸山 1-21-1

国立国際医療センター研究所

国際臨床研究センター

伊藤和幸

電話; 03-3202-7181 内線 2856

Fax; 03-3202-7364

Name: Jonathan Heddle

Position Assistant Professor

Work Place: Tokyo Institute of Technology, Global Edge Institute, 4259-S2-17, Nagatsuta, Midori – ku, Yokohama, Kanagawa, 2268501

Modified Silicon Quantum Dots for targeting to Mitochondria

We are working with two collaborating labs to produce silicon quantum dots (QDs) which could be targeted to mitochondria (mt) where they would give a fluorescent signal that could be modified depending on conditions. The concept is summarized in Figure 1:

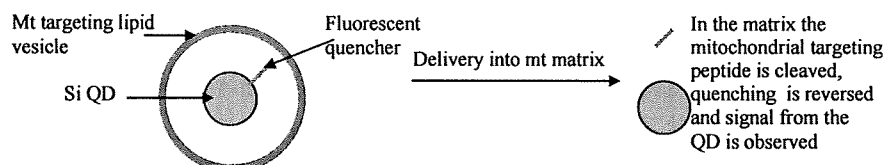


Figure 1: Summary of concept for mt-targeted specific dye. The Tilley lab in New Zealand provides Si QDs and the Yuma Yamada at the Laboratory for Molecular Design of Pharmaceutics at Hokkaido University incorporates QDs into the Mt targeting lipid vesicle

Aims

Our initial aim, as proof of principle is to attach a rhodamine dye to amine-decorated Si QDs. This would be the basis for future mitochondria delivered dye and analytical nanoparticles.

Background

Initial reactions using standard rhodamine dye proved difficult so I moved to using NHS (N-hydroxysuccinimide)-labeled rhodamine (Figure 2):

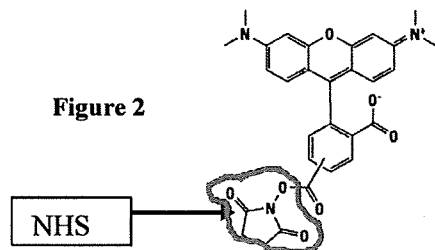


Figure 2

The NHS group is known to strongly react with amine groups so with the QDs, the reaction should proceed as smoothly

Results

Samples were passed through protein desalting columns to try to remove any excess rhodamine dye that may remain: Results below (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. We are now waiting for our collaborators in New Zealand to provide more Si QD.

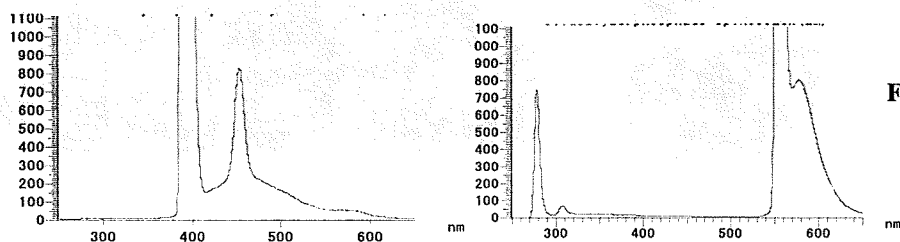


Figure 3

量子ドット（半導体ナノ粒子）のマラリアワクチン研究への応用

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 kano@ri.imcj.go.jp

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 oku@gunma-u.ac.jp

矢野和彦 群馬大学大学院工学研究科・産学連携研究員 yanok@ri.imcj.go.jp

福本 恵 群馬大学大学院工学研究科・産学連携研究員 mfukumoto@ri.imcj.go.jp

マラリア原虫抗原に対する特異抗体は、原虫の増殖を阻害する事が知られている。これまでに我々は、急性期や快復期の熱帯熱マラリア患者血清が、原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼに対して強く反応すること疫学調査により明らかにし、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼをマラリアワクチン抗原の第一候補として研究を行っている。前々回の本研究班（ナノメディシン）では、この特異抗体による増殖阻害の機構を形態的、経時的に解析するために、新たな蛍光プローブである量子ドット（Qdot）の導入を試みたが、赤血球内原虫のエノラーゼ抗原を間接蛍光抗体法で検出する際、Qdot 655 標識二次抗体を用いると抗原が検出できないことが判明した。これはエノラーゼ以外の抗原検出でも同様であった。（図-1）

これはラベルした Qdot 周辺に赤血球や原虫内部の Heme が高濃度に近接して存在すること、量子ドットの励起・蛍光スペクトルが Heme の吸収スペクトルと重なること、の2つの理由により蛍光検出が難しいと考えられた。よって Qdot は蛍光プローブとしての優れた特性を用い合わせているが、マラリア研究への応用には、量子ドットの種類、検出方法等、更なる条件検討が必要と考えられた。

そこで、直接赤血球や原虫内部の抗原検出ではなく、現在進めている人工抗原を用いたマラリアワクチン研究への応用を試みた、人工抗原ペプチドはエノラーゼの部分ペプチドである AD22 を用いた（22 残基：ASEFYNSENKTYDLDFKTPNND）。この人工抗原ペプチドの抗原性を長期的に持続させることを目的として、抗原を生分解性高分子であるポリ乳酸グリコール酸共重合体（PLGA）に内包させた徐放性微粒子を作製した。また微粒子の崩壊、抗原の放出の様子を観察するために、ヌードマウスに抗原を背中皮下投与し、投与箇所の皮膚組織、筋肉組織についてパラフィン切片を作製した。抗 AD22 ウサギ抗体と Qdot 605 標識抗ウサギ抗体を用いて投与抗原の検出を試みたところ、投与した抗原は、皮下の脂肪組織に蓄積していることが判明した。（図-2）

直接赤血球や原虫内部の Heme 近傍の抗原検出ではなく、マウス組織や抗原単体の検出には Qdot は有用であると考えられる。こうした結果をふまえ、現在抗原投与後の他の組織についても Qdot を用いた解析を行っている。

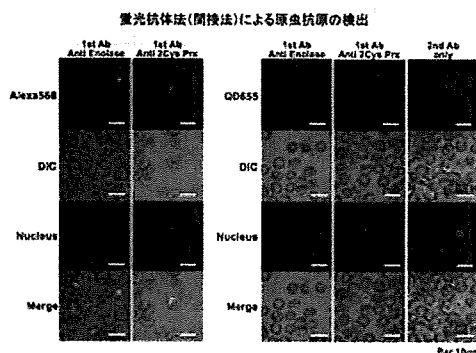


図-1 Q dot 標識抗体による原虫抗原の検出

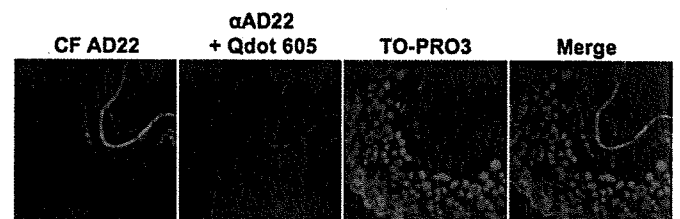


図-2 PLGA 皮下投与部位の皮下組織切片

腹腔内炎症応答制御法の開発と応用

国立国際医療センター研究所消化器疾患研究部 土肥多恵子 dohi@ri.imcj.go.jp

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。そこで、術後癒着防止法開発に向けて、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を行った。アッセイ系として、mouseCCR8 を発現した細胞 CCR8-CHO 細胞を作製し CCL1 を加えたときの Ca^{2+} 流入を測定した。96 ウェルプレートを用いた測定は、モレキュラーデバイス社 FlexStation を用いて行った。スクリーニング対象として、2 種類の低分子化合物ライブラリーを用いた。一つはファルマデザイン社より購入したケモカイン受容体特化ライブラリー (1000 化合物を含む) である。また、乙卯研究所にて合成された低分子化合物 134 種類も同様にスクリーニング対象とした。化合物は、いずれも DMSO に溶解し 10 mM の濃度で一次スクリーニングを行った。この結果、CCL1/CCR8 阻害剤候補となる低分子化合物を複数得たので、*in vivo* における盲腸焼灼癒着モデルにより validation を行った。現在のところ急性の細胞毒性のない 5 種の低分子化合物に癒着防止効果を認めている。

新規遺伝子 Gasp は胸腺細胞の正の選択に必須である

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)
hsuzuki@ri.imcj.go.jp 03-3232-3100

我々は胸腺特異的に発現する新規遺伝子 Gasp を *in silico* クローニングにより単離し、その機能についての研究を展開してきた。Gasp は脊椎動物でよく保存されており、ホモログを持たない新規の遺伝子である。

Gasp の発現を RT-PCR 法を用いて検討したところ、胸腺に特異的な発現がみられ、特に未熟な CD4CD8 ダブルポジティブ (DP) 細胞に最も強く発現していた。Gasp タンパクの細胞内局在を検討するため、我々は Gasp 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、Gasp 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た結果、微弱なシグナルでも検出することができた。

次に Gasp の機能を詳細に検討する目的で Gasp ノックアウトマウスを作製した。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、正の選択が強く阻害されていた。しかしながら、負の選択、末梢成熟 T 細胞の活性化、恒常性維持増殖などは正常であった。我々は免疫沈降実験、質量分析により Gasp が Grb2 と構成的に結合することを見いだしており、T 細胞受容体依存性のシグナル伝達に Gasp が何らかの形で関与している可能性が高い。

以上の結果より、胸腺特異的に発現する新規遺伝子 Gasp は胸腺細胞の正の選択にのみ必須であることが明らかとなった。

平成21年度班会議

慢性炎症の DDS のための機能量子ドット (QD)

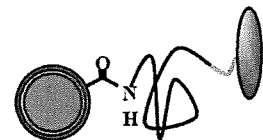
研究分担者：鈴木 和男

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

【背景】量子ドット(QD)を炎症性細胞の酵素、サイトカインや Adhesion Molecules の抗体などに付加した「機能 QD」を開発し、慢性炎症の DDS へ応用する。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、抗体および好中球など本抗体と結合する細胞が、腎糸球体あるいは肺の血管内皮細胞へ移行することを検討してきた(Microbiol. Immunol, 2007, J. Autoimmunity 31:79-89, 2008)。MPO 抗体は、ANCA 自己抗体として、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、血管炎のマーカとなっている。MPO-ANCA は、好中球や血管内皮細胞の活性化とその傷害性に関与しているが、どのように好中球を活性化し対象臓器の血管内皮細胞の傷害を誘導しているかを解析することが重要である。昨年度は、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」を用いて解析した。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した。一方、血管炎は腎臓や肺など臓器特異性があるため、DDS には、臓器特異性分子をターゲットとするため、その特異性を明らかに必要がある。そこで、本年度は、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るサイトカインの反応について検討した。

【方法】臓器特異性には、活性化した血管内皮細胞にあると推定し、血管内皮細胞の傷害抑制作用を *in vitro* で解析した。anti-MPO 抗体、TNF- α 刺激による血管内皮細胞の活性化を adhesion molecules、炎症性 cytokines、chemokines の発現を指標として、その活性化内皮細胞へ作用を解析した。TNF- α の細胞との反応は、量子ドット QD 標識 TNF- α により解析した (国立衛研・川西先生の協力)。

【結果・考察】adhesion molecules (ICAM-1, VCAM-1, E-selectin)、炎症 cytokines のうち、IL-6、IFN- β および chemokine の KC および MCP-1 の mRNA の発現は、TNF- α によって誘導された。その上昇は、IgG 添加により有意に抑制された。また、Cell ELISA により、ICAM-1 発現は、anti-MPO 抗体では認められなかったが、TNF- α 刺激では濃度依存的に増加した。TNF- α が血管内皮細胞に結合してシグナル応答を誘導していることが考えられたため、QD655-TNF- α を加えて検討し、反応性像が観察された。これらの結果から、血管炎などの炎症の臓器特異性をターゲットするには、TNF- α によって活性化されている血管内皮細胞を抑制し、臓器で活性化されている血管内皮細胞の adhesion molecules、炎症 cytokines および chemokines 産生の活性化を指標とすることが重要であると考えられる。



細隙灯顕微鏡用デジタルビデオカメラシステムの開発

山本 悟、国家公務員共済組合連合会横浜栄共済病院眼科、連絡先

(kg8s-ygmt@asahi-net.or.jp)

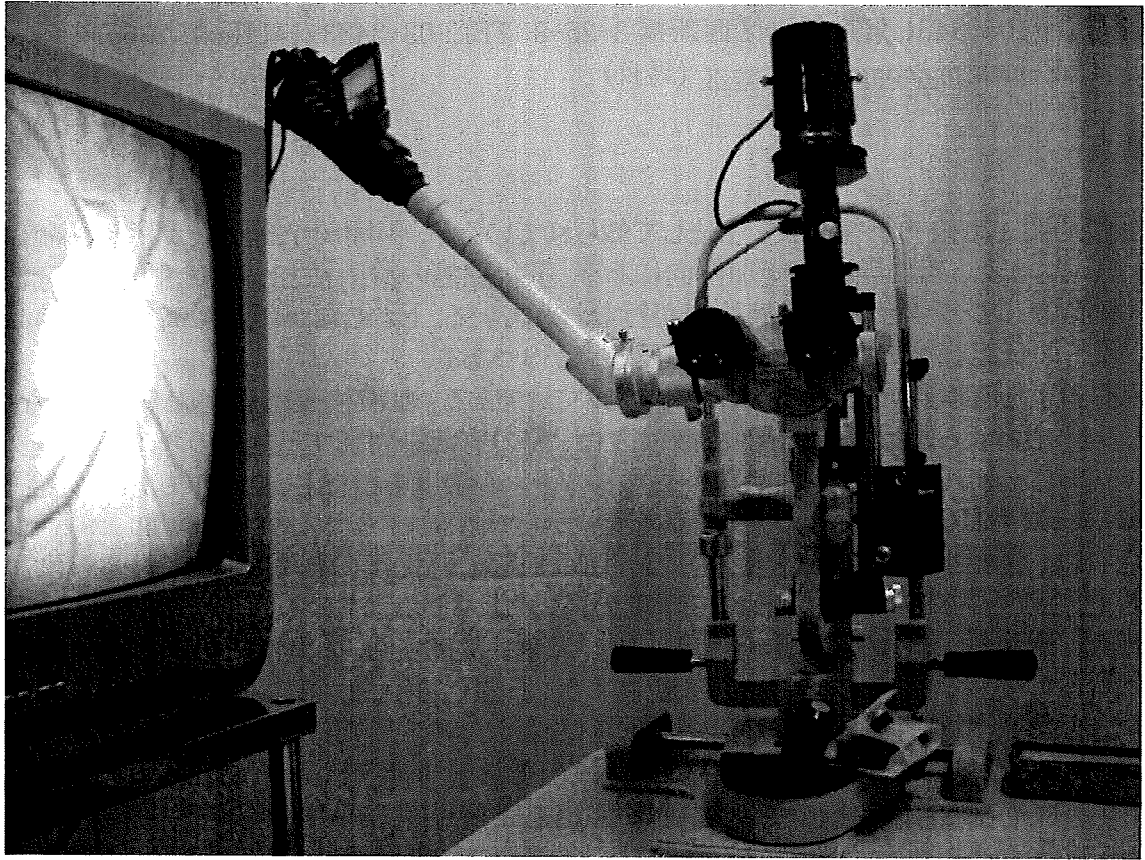
硝子体にナノ粒子を注入して硝子体染色を行なう研究を進めてゆくに当り、硝子体観察に必要なシステムを開発した。

“High-Definition Slit Lamp Video Camera System”

Satoru Yamamoto, MD、Noriyoshi Manabe, MS、Kenji Yamamoto, MD, PhD

この報告は、次号の *Ophthalmic Surgery, Laser and Imaging* に掲載予定である。

このシステムは本研究のみならず、眼科臨床においても、眼疾患を患者さんや患者さんの御家族に実際に見てもらって説明やインフォームド・コンセントを行なうことができる有用なシステムを非常に安価に作製できたということであり、臨床眼科医にも朗報となるであろう。



甲状腺癌特異的抗体(JT-95)と蛍光ナノ粒子 QD を用いた検出システムの開発

東京慈恵会医科大学・DNA 医学研究所・分子細胞生物学研究部
馬目佳信、藤岡宏樹

【連絡先】〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8 TEL: 03-3433-1111(ext. 2360)

E-mail: manome@jikei.ac.jp (馬目)

1. 背景

甲状腺癌は、比較的予後の良い癌として知られているが、年間約 7,500 人が罹患、約 1,500 人が亡くなっている。また、死亡者数は増加傾向にある。甲状腺癌の診断法としては、触診・超音波検査・穿刺吸引細胞診・シンチグラフィ・血液検査が行なわれている。しかしながら、より高精度な診断・治療、患者や医師への負担軽減のため、改善の必要な点が3つある。

1 点目は、血液検査で正確な診断ができないことである。血液検査は患者の負担も少なく、最も簡便な方法の1つと考えられるが、現行の血液検査は、癌の有無を判別するためのスクリーニング法としては適していない。それは、カルシトニンやサイログロブリンの濃度を指標としたものであり、炎症や他の甲状腺疾患によっても高値を示すため、判断が難しいからである。

2 点目は、穿刺吸引細胞診(針生検)における、腫瘍の悪性度の判断である。針生検は、腫瘍の分類及び、悪性度を判断する際に、極めて精度の高いことが知られている。しかしながら、甲状腺癌の分類(乳頭癌、濾胞癌、低分化癌、未分化癌、及び、髄様癌)のうち、2 番目に頻度の高い濾胞癌においては核異型が見られず、生検結果からは腫瘍の良性・悪性の判断が難しい。このため、術前では判断が付かない場合、濾胞性の腫瘍は摘出手術が行なわれる傾向がある。

3 点目は、放射性ヨード治療時の甲状腺全摘出である。同治療法は、甲状腺がヨードを取り込む性質を利用したものである。一般に甲状腺癌細胞よりも正常甲状腺細胞の方が取り込みやすいとされており、治療開始前に甲状腺の全摘出が必要となる。全摘出された患者は、その後一生に渡り、甲状腺ホルモンの投与が必要となり、QOL が下がる。

2. 研究の目的

上記の問題を克服するため、甲状腺癌の迅速かつ高感度な新規検出法の開発、並びに甲状腺癌特異的な薬剤送達担体の作製を目的とし、蛍光ナノ粒子 Quantum dot(QD)と、東京慈恵会医科大学で開発された甲状腺癌特異的抗体 JT-95 との組合せの有効性を検証した。

3. 結果・考察

始めに、甲状腺癌細胞 SW1736 細胞を三段階で検出する方法を試みた。甲状腺癌特異的抗体 JT-95 を、biotin-抗マウス IgM 抗体、並びに QD-streptavidin で検出を行なった。蛍光顕微鏡観察、並びに、ウェスタンブロッティングにおいて、抗原を特異的に検出することに成功した。しかしながら、同方法による、ELISA 様試験を用いた抗原検出法は開発ができなかった。動的散乱などの結果から、同方法においては、JT-95 抗体と QD との免疫複合体が大きくなりすぎ、凝集・沈殿が起きる可能性が示唆された。

次に、直接 JT-95 抗体に QD を結合させ SW1736 細胞を検出する方法を試みた。直接標識は、三段階反応に比べて分子量が小さくなるため、ELISA 様試験で有利であると考えられた。同方法では、標識効率が 5-10%前後であったため、向上の必要性があるが、ELISA 様試験での抗原検出に成功した。また、細胞染色にも成功した。

今後は、細分化した JT-95 抗体と QD との直接結合を検証し、標識効率・検出感度の向上、更に、薬剤送達担体としての機能を持たせるため、薬剤の結合を試みたいと考えている。

体液中の microRNA の意義とデリバリー技術への応用

国立がんセンター研究所がん転移研究室

落谷孝広

tochiya@ncc.go.jp

non-coding smallRNAであるmicroRNAの疾患における意義は、基礎研究のみならず、診断、治療、創薬へと大きな進展を見せている。本研究では、体液中に存在するmicroRNAの意義を解析するとともに、核酸医薬のデリバリー技術へのお応用をはかることを目的としている。本年度は、血液中からmicroRNAを搭載しているexosomeの回収方法と精製法を確立するとともに、このexosomeを利用した細胞間デリバリーの方法について検討したので報告する。

2009年度関連業績

1. Takeshita F, et al., Systemic Delivery of Synthetic MicroRNA-16 Inhibits the Growth of Metastatic Prostate Tumors via Downregulation of Multiple Cell-cycle Genes. *Mol Ther.* In press
2. Yamamoto Y, et al., MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers.* In press
3. Tanooka H, et al., Mutant mouse p53 transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. *Cancer Gene Ther.* In press
4. Takeshita F, et al., Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. *Methods Mol Biol*, 487:83-92, 2009

高分子ナノミセルの 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

背景: 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ナノミセルによる遺伝子導入法の循環器疾患への応用を目指して、開発を行なっている。PEG-b-P[Asp-(DET)]をベクターとして用いることにより、in vivo での遺伝子導入効率が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導入による顕著な治療効果を得たことをすでに報告した。今回、我々は遺伝子治療の臨床応用にむけて、高分子ナノミセルによる遺伝子導入の際の炎症の惹起を可能な限り抑制する試み、および複数回投与の試みを行なった。

方法: ICR マウスに麻酔下で N/P 比の異なる PEG-b-P[Asp-(DET)]とルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターとの 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: ルシフェラーゼ発現ベクターに含まれる CpG を取り除いたベクター (pORF-Luc Sh- Δ CpG) を用いて N/P=20、40、60、80 の経肺投与による遺伝子導入を行なったところ、コントロールベクターに比べていずれの N/P 比においても約 20 倍の遺伝子発現効果を認めた。ルシフェラーゼ活性も、pORF-Luc Sh- Δ CpG において 3 日、7 日、14 日後の値はコントロールベクターに比べて高値であった。複数回投与後のルシフェラーゼ活性は、コントロールベクターは半減したが、pORF-Luc Sh- Δ CpG は低下を認めなかった。コンドロイチン硫酸存在下に、マウスの生存率の改善、炎症性サイトカインの発現の低下を認めた。

考察: 近年、導入遺伝子の中の CpG が炎症を引き起こすことが報告されている。そこで我々は今回、ルシフェラーゼ遺伝子から CpG を取り除いた pORF-Luc Sh- Δ CpG を用いて、in vivo 遺伝子導入実験を行ない、CpG を取り除いたベクターにより、遺伝子発現効果の上昇および炎症性サイトカインの発現の低下を認めた。また、高分子ナノミセルにコンドロイチン硫酸を加えることにより、毒性効果の低減を図ることができた。これらの知見は、PEG-SS-P[Asp-(DET)]の臨床応用に際し、重要であり、安全で効果的な遺伝子導入法の確立ができたと考えられる。

高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー

東京大学大学院工学系研究科 教授 片岡 一則
E-mail: kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

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、我々は、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 nm) 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1,2-diaminoethane構造を有するポリアルパルアミド誘導体 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) の遺伝子導入メカニズムについて検討を行ったところ、PAsp(DET) は pH が 7.4 (細胞外環境) から 5.5 (エンドソーム内環境) に変化することによって側鎖1,2-diaminoethane構造がモノプロトン状態からジプロトン状態へと変化し、エンドソーム内酸性環境下で強力な細胞膜傷害活性を示すことが明らかになった。さらに、PAsp(DET) は、酸性条件もしくは低温(4°C)において安定であるが、生体内条件(pH7.4, 37°C)においては自己触媒反応に基づくゆっくりとした主鎖分解を示し、最終的にはモノマー単位まで分解することが明らかになった。主鎖分解した PAsp(DET) は、細胞毒性が極めて低く、マウスに投与した際のサイトカイン産生も大きく抑制されることが確認された。このように本研究では、PAsp(DET) は、効率的な遺伝子導入を示す一方で、主鎖分解を示すことによって短期および長期の毒性を示さないことが明らかになった。

一方、上記のように、PAsp(DET) は、高効率かつ低毒性の遺伝子導入を可能にするが、PEG-PAsp(DET) はプラスミド DNA (pDNA) と安定なポリイオンコンプレックス (PIC) を形成することが困難であり、本研究では PAsp(DET) を全身投与型の遺伝子デリバリーシステムへと展開するために、PEG と PAsp(DET) の連結部に短鎖アルキル基 (C₆H₁₂) を導入した PEG-C6-PAsp(DET) トリブロック共重合体を開発した。第一に、PEG-C6-PAsp(DET) と pDNA の会合体形成について検討したところ、PEG-C6-PAsp(DET) は安定な PIC ミセルを形成し、電気泳動による安定性評価においては、アルキル鎖長が C₃H₈ の PEG-C3-PAsp(DET) から形成されるミセルが N/P 比 (DNA のリン酸残基に対するポリマーのカチオン性アミノ基の比率) = 8 以下において pDNA の放出を示したのに対して、PEG-C6-PAsp(DET) からなるミセルでは N/P = 1.5 以上で pDNA のリリースは全く示さなかった。また、HuH7 細胞に対する遺伝子導入効果を検討したところ、PEG-C6-PAsp(DET) は PEG-C3-PAsp(DET) と比較して 100 倍近く高い遺伝子導入効果を示した。さらに、PIC ミセルの血中滞留性を評価したところ、PEG-C3-PAsp(DET) から形成されたミセルの 1 時間後の血中濃度は 4% 以下であったのに対して PEG-C6-PAsp(DET) からなるミセルは 10% 以上の血中濃度を示した。一方、本システムの疾患モデル治療への展開として、可溶性 VEGF 受容体 (sFlt-1) を発現する pDNA を搭載した PIC ミセルを構築し、ヒト膵がん BxPC3 細胞のマウス皮下移植モデルの血管新生阻害治療へと展開したところ、PEG-C6-PAsp(DET) 型ミセルは、従来型の PIC ミセルと比較して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 PEG-C6-PAsp(DET) は全身投与による遺伝子デリバリーのための有用なベクターとして期待される。

Nano-Imaging and DDS

財団法人医療機器センター・研究成果等普及啓発事業

DATE; January 19th, 2010 13:00-16:55

Place; NINS Okazaki Conference Center

自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター

〒444-0864 岡崎市明大寺町字伝馬 8-1

[Session 1]

Takanori TOGASHI

Supercritical Hydrothermal Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticle;

Toward Bio-imaging and Medical Applications

World Premier Research Initiative, Advanced Institute of Materials Research, Tohoku University

Mitstuo UMETSU

Protein Engineering for Bioimaging

Graduate School of Engineering, Tohoku University

Akihiko KONDO

Affibody Displaying Bionanocapsules for Cancer Cell Specific Drug Delivery

Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University

[Session 2]

Hidehiro KAMIYA

Direct Measurement of Surface Interaction Between Microcapsule for DDS and Artificial Mucin Layers by Using Colloid Probe AFM

Tokyo University of Agriculture & Technology

Hirofumi TAKEUCHI

Design and Characterization of Liposomal Nano-particles for Effective Drug Delivery

Gifu Pharmaceutical University

Hideki ICHIKAWA

Pharmaceutically Engineered Nanoparticles for MR Imaging and Neutron-capture Therapy of Cancer

Faculty of Pharmaceutical Sciences and Cooperative Research Center of Life Sciences, Kobe Gakuin University

Kenji YAMAMOTO

Quantum Dots for the Biomedical Engineering

International Medical Center of Japan

Shinae KIZAKI-KONDOH

In Vivo Imaging of Tumor Malignancy with Near-Infrared Fluorescence Probes Targeting
HIF-Active Cells

Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School
of Medicine

Kazuo SUZUKI

Session-Closing Comments

Chiba University Graduate School of Medicine

問合せ先; 国立国際医療センター研究所

国際臨床研究センター

山本健二, 伊藤和幸

電話; 03-3202-7181 内線 2856

E-Mail; ikazuyuki@ri.imcj.go.jp

主催: 財団法人医療機器センター

共済: バイオイメーjing学会

Nano-Imaging & DDS

財団法人医療機器センター・研究成果等普及啓発事業

[Session 1]

Tadafumi ADSCHIRI

Opening Remarks

World Premier Research Initiative, Advanced Institute of Materials Research, Tohoku University

Takanari TOGASHI

**Supercritical Hydrothermal Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticle;
Toward Bio-imaging and Medical Applications**

World Premier Research Initiative, Advanced Institute of Materials Research, Tohoku University

Mitsuo UMETSU

Protein Engineering for Bioimaging

Graduate School of Engineering, Tohoku University

Akihiko KONDO

Affibody Displaying Bionanocapsules for Cancer Cell Specific Drug Delivery

Department of Chemical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Kobe University

[Session 2]

Hidehiro KAMIYA

Direct Measurement of Surface Interaction Between Microcapsule for DDS and Artificial Mucin Layers by Using Colloid Probe AFM

Tokyo University of Agriculture & Technology

Hirofumi TAKEUCHI

Design and Characterization of Liposomal Nanoparticles for Effective Drug Delivery

Gifu Pharmaceutical University

Hideki ICHIKAWA

Pharmaceutically Engineered Nanoparticles for MR Imaging and Neutron-capture Therapy of Cancer

Faculty of Pharmaceutical Sciences and Cooperative Research Center of Life Sciences, Kobe Gakuin University

Kenji YAMAMOTO

Quantum Dots for the Biomedical Engineering

International Medical Center of Japan

Shinae KIZAKI-KONDOH

In Vivo Imaging of Tumor Malignancy with Near-Infrared Fluorescence Probes Targeting HIF-Active Cells

Department of Radiation Oncology and Image-applied Therapy, Kyoto University Graduate School of Medicine

Kazuo SUZUKI

Closing Remarks

Chiba University Graduate School of Medicine

Date: January 19th, 2010 13:00-16:55

Place: NINS Okazaki Conference Center

自然科学研究機構・岡崎コンファレンスセンター

〒444-0864 岡崎市明大寺町字伝馬8-1

問合せ先：国立国際医療センター研究所／国際臨床研究センター 山本健二、伊藤和幸

電話：03-3202-7181 内線2856 E-Mail: ikazuyuki@ri.imcj.go.jp

主催：財団法人医療機器センター

共催：バイオイメージング学会

Supercritical Hydrothermal Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticle -Toward bio-imaging and medical applications-

○Takanari Togashi¹, Takafumi Sasaki², Varu Rani², Seiichi Takami², Keiko Nakata³, Shogo Yamada³, Keietsu Abe⁴, Kazuyoshi Kawakami⁵, and Tadafumi Adschiri¹,

¹Advanced Institute of Materials Research, Tohoku University, Japan

²Institute of Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Japan

³ Graduate School of Medicine, Tohoku University, Japan

⁴New Industry Creation Hatchery Center, Tohoku University, Japan

⁵Department of Medical Microbiology, Tohoku University, Japan

Recently, medical applications of nanoparticles (NPs) has attracted keen attentions, especially for imaging probe for X-CT, MRI, and photoluminescence (PL), DDS carrier, anti-tumor therapy including hyperthermia (HT), neutron capture therapy (NCT), manipulator, and so on. For these medical applications, NPs should be covered with bio-friendly molecules, so that NPs may be dissolved in water at neutral pH and avoid attacking from bio-self-guard system, such as phagocyte.

We have developed supercritical hydrothermal synthesis method of organic-inorganic hybrid nanoparticles that can be dissolved in water. In the method, metal salt aqueous solution is mixed with high temperature water to rapidly increase the temperature of the metal salt solution, so that it may suppress the reactions and crystallizations during the heating up period. By using this method, we have succeeded in the continuous and rapid production of nanocrystals.

In this presentation, first we will briefly introduce specific features of this Supercritical hydrothermal synthesis and show some results on the synthesis of Ga(OH)₃ (MRI and NCT), GdVO₄ (MRI, X-ray CT, and Photoluminescence), MgFeO₃ (MRI, HT), and Fe₃O₄, (MRI, HT). Then we demonstrate that thus synthesized NP's can be dispersed in water and evaluate of the water soluble NPs by the capping hydrophilic modifier.

Furthermore, we have tried to develop functionalized nanoparticles that can escape from phagocyte and travel through blood vessels with high blood half-time by conjugation of functional bio molecule. It is also important function for bio-imaging and bio medical application of NP's.

Protein engineering for bioimaging

Mitsuo Umetsu

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Engineering,
Tohoku University, Sendai, Japan

The down-sizing of materials have enabled us to apply several inorganic nanoparticles with photonic function in the field of bioimaging. Physical and chemical properties of the nanoparticles are varied by changing the size and morphology of the nanoparticles, and the organization of nanostructures into functional systems has been expected as the expression of unique electric, photonic, and magnetic functions. However, the construction of applicable nanoparticles for bioimaging needs surface design on nanoparticles. The applicable nanoparticles for bioimaging should be completely dispersed in hydrophilic solution and should has sites where biomolecules, such as proteins and DNA, can be displayed.

Recent advance in biotechnology enables us to generate various functional proteins with artificial structures by using recombinant protein engineering and molecular evolutionary technology. In the field of material engineering, gene and protein engineering are coupled with the downsizing technology of materials to nano-sized particles for the innovation of sensor and therapeutic devices, and biomineralization are attractive for hybrid materials because strictly shape-controlled inorganic materials are synthesized at room temperature in biomineralization. We have innovated peptide and antibodies as integrated interface molecules for “inorganic-inorganic matters”, and “biomolecule-inorganic matter” for the application in the field of peptide/protein engineering and nanomaterial engineering. In this study, we describe how to innovate the peptide and antibodies with high affinity for the surface of bulk materials, to show the potential of their molecules in the field of bioimaging.

Affibody displaying bionanocapsules for cancer cell specific drug delivery

Akihiko Kondo, Takuya Shishido, Hiroaki Mieda, Yuya Nishimura, Tsutomu Tanaka and
Chiaki Ogino

Department of Chemical Science and Engineering,
Graduate School of Engineering, Kobe University, Kobe, Japan

We have developed bionanocapsule (BNC), which is composed of L-protein derived from the hepatitis B virus surface antigen with a lipid bilayer derived from yeast endoplasmic reticulum membrane. BNC has a high specificity for human hepatocytes. In targeting other types of cells, the specificity of BNC can be modified by genetically substituting the pre-S region in the L-protein with other biorecognizable molecules. However, some ligands, which have complex structures, are limited to display on the surface of BNC. Therefore, a novel targeting molecule, which has a simple structure and specificity, is desirable to be applied on BNC.

HER2 is a member of the human epidermal growth factor receptor (EGFR) family and is highly expressed in several types of cancer, especially breast and ovarian cancers. The over-expression of HER2 is associated with resistance to chemotherapy and with poor prognosis. Thus, HER2 has been an attractive target for molecular therapy. One of the most successful approaches is using trastuzumab, which is a humanized monoclonal antibody that recognizes the extracellular domain of HER2. However, less than 50% of patients responded to the treatment. Alternatively, application of conventional chemotherapy and/or radiotherapy has been attempted. Therefore, it is important to develop carriers that can efficiently deliver drugs into HER2 over-expressed cancer cells.

In this study, we constructed ZHER2 displaying BNC (ZHER2-BNC) by genetically substituted pre-S region with ZHER2. Affibody molecule is a new class of affinity ligands derived from one of the IgG-binding domains of staphylococcal protein A. One of the advantages of affibody is that the binding selectivity can be altered easily by random mutations, hence wide variety of targeting molecule are available using affibody variations. We have focused on HER2-specific affibody. A variety of HER2-binding Affibody molecules have been investigated. Among these variants, monomeric ZHER2 shows very high affinity. We demonstrated that ZHER2-BNC has a high binding capacity and high specificity for HER2 receptor and cellular uptake on ZHER2-BNC was increased in a dose-dependent manner. Therefore, ZHER2-BNC can be a powerful tool for the therapy of HER2 over-expressed cancer cells.

References

- 1) Shishido, T., Yonezawa, D., Iwata K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2009) Construction of Arginine-rich peptide displaying Bionanocapsules., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(5), 1473-1476.
- 2) Shishido, T., Azumi, Y., Nakanishi, T., Umetsu, M., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2009) Biotinylated bionanocapsules for displaying diverse ligands toward cell specific delivery., *Journal of Biochemistry*, 146(6), 867-874.
- 3) Kurata, N., Shishido, T., Muraoka, M., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H., Kondo, A. (2008) Specific protein delivery to target cells by antibody-displaying bionanocapsules., *Journal of Biochemistry*, 144(6), 701-707.