

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)

**Developing and testing the toxicity of mitochondria-targeted Silicon Quantum Dots**

分担研究者：Jonathan Heddle, Assistant Professor, Global Edge Institute, Tokyo  
Institute of Technology

研究要旨

In our project we are attempting to work with collaborating partners to construct artificial delivery systems that can produce therapeutic and diagnostic material with high specificity to the interior of mitochondria. In particular we are interested in the possibility of delivering quantum dots (QDs) as imaging and diagnostic agents.

A:研究目的

Our aims during this project are as follows:

1. Design a suitable QD imaging system for delivery to mitochondria.
2. Test incorporation of the QD system into a mitochondria delivery system.
3. Construct the QD system including modification of the QD surface and attachment of a fluorescent dye.
4. Test the ability of quantum dot system to give signal in response to presence of preferred ligand (initially calcium).
5. Test the ability of the delivery system to deliver QDs to target mitochondria in cell culture.

6. Test the toxicity of both the QD system alone and after incorporation into the mitochondrial delivery system, on cultures of eukaryotic cells.

B:研究方法

1. Design of mitochondria targeting system: The system will be designed by Designed by collaborators in the group of Hideyoshi Harashima, (Hokkaido University) based on their MITO-porter lipid-based system. QDs are incorporated into MITO-porter based on proprietary methods.
2. Design of Quantum Dot: Silicon quantum dots are designed to include a surface covered with carboxy or amine 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.

(倫理面への配慮)

Our experiments have no ethical implications.

#### C:研究結果

Since beginning the project 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 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 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<sup>[1]</sup>. 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.*

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.

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.

#### 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

##### 1. 論文発表

##### 2. 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.

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

2. 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

3. 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

4. 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 : 8<sup>th</sup> 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.

H:知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得

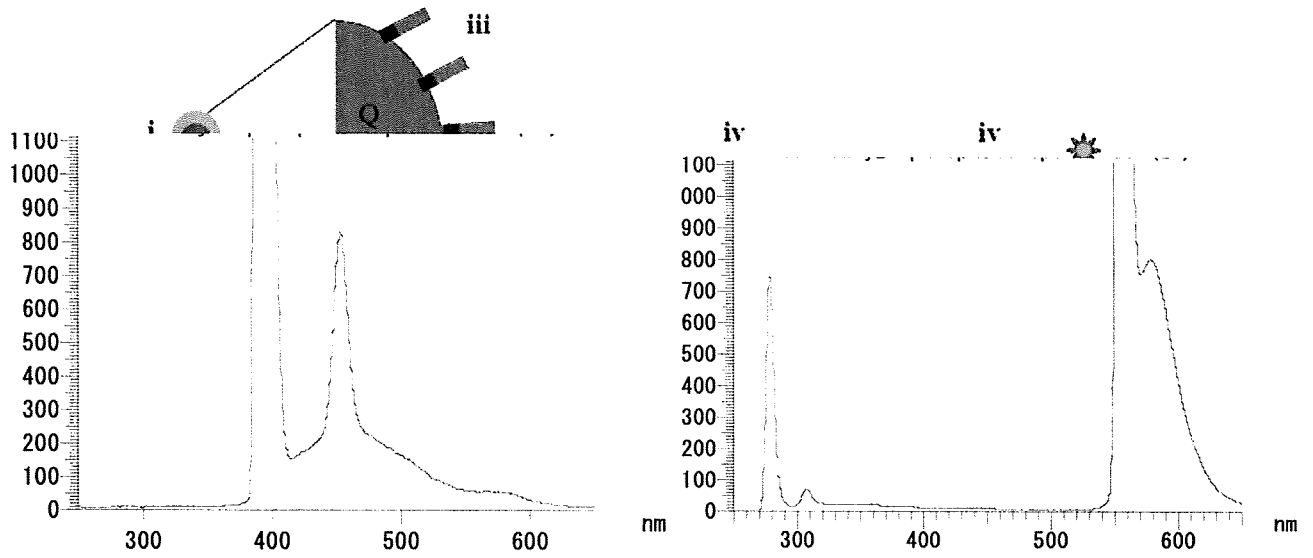
None

2. 実用新案登録

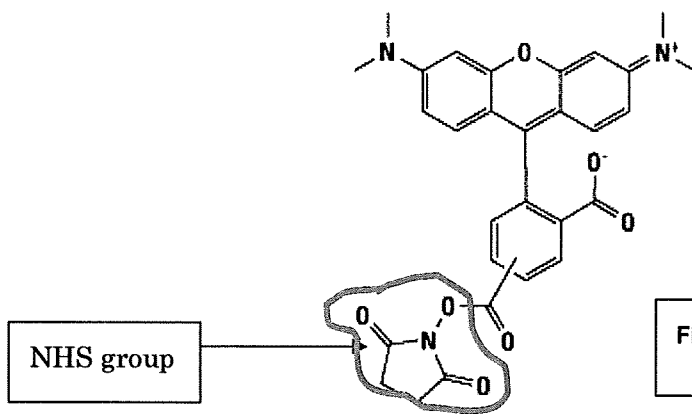
None

3. その他

None



**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).



**Figure 2:** NHS labeled rhodamine dye

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

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)

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**

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、A6K 合成新規ペプチドのがん細胞特異的デリバリー技術の開発に関する検討を実施した。まず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、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。また A6K 合成新規ペプチドは膜たんぱく質への毒性が低く、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、さらに表面電荷はプラスチャージで、マイナス荷電の siRNA と静電的な結合による複合体を形成し、siRNA 等の核酸医薬のデリバリーキャリアとして動物個体モデルで腫瘍への顕著なデリバリー効果を示した。

**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、新規ペプチド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。さらに新規合成ペプチドであるA6Kによ

る核酸医薬デリバリーの検討も行った。

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、合成ペプチドの研究成果により、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。

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 と静電的な結合を考えると考え、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。

## C. 研究結果

1) 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。

2) 初年度、次年度の成果で、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。最終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。またこれを動物に投与したが、肝臓への特異的な集積は認められなかった。

3) 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

#### 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。新規合成ペプチドに有望な腫瘍特異的デリバリー効果を認めたことから、今後この新規合成ペプチドの作用機序について検討する価値がある。

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い。

#### 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)

1. ○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.
2. O Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, Ochiya T. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. **IDrugs**, 11:274-278, 2008
  3. O 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
  4. 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
  5. O 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
  6. O 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
  7. O Takahashi R, Kaneshashi 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
  8. 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
  9. 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
  10. 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
  11. O 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
  12. 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.
  13. 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.
  14. O Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. **Cancer Sci**. 97: 689-696, 2006.
  15. 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.
  16. 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.
  17. 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
  18. 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
  19. 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
  20. 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. 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 2<sup>nd</sup> 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
7. Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA against cancer. MicroRNAi-meeting. RNAi World Congress Boston, USA. May 12-13, 2009
8. Ochiya T. CRS (Controlled Release Society). Oligonucleotides delivery 36<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen, Denmark. July 16-24, 2009
9. Ochiya T. RPN2 as a novel therapeutic target for cancer drug resistance. 9th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Brussels, Belgium. September 12-18, 2009

(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)
  17. 「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)
  18. 「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)
  19. 「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)
  20. 「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)
  21. 「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)
  22. 「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)
  23. 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)

24. 「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)

#### H. 知的所有権の出願・取得状況

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

## 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すでに得ている。本研究では、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、ポリマーの精製法および重合度による安全性面での最適化および導入遺伝子に含まれる CpG 量、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 |

いて我々は、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、および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 を作製した。また、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、それぞれを経肺投与後、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

### 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。本研究にお

ICR マウスに麻酔下で精製法の異なる PEG-b-P[Asp-(DET)] (従来法、Et<sub>2</sub>O 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 を作製した。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 を作製した。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-1β 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、Et<sub>2</sub>O 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。

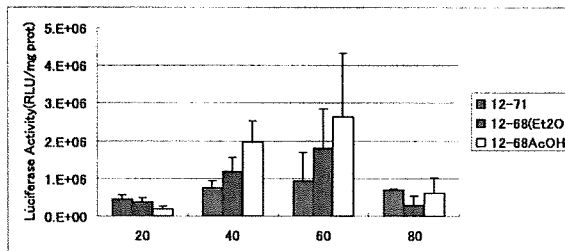


図 1 PEG-b-P[Asp-(DET)] の精製法、N/P 比別 in vivo 遺伝子発現

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。

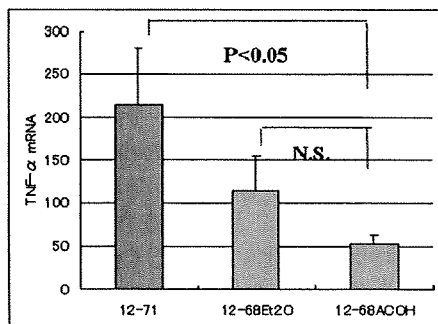


図 2 PEG-b-P[Asp-(DET)] の精製法別炎症性サイトカイン(TNF-α)遺伝子発現量

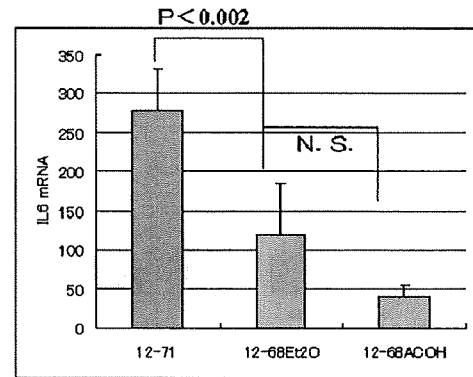


図 3 PEG-b-P[Asp-(DET)] の精製法別炎症性サイトカイン(IL-6)遺伝子発現量

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。

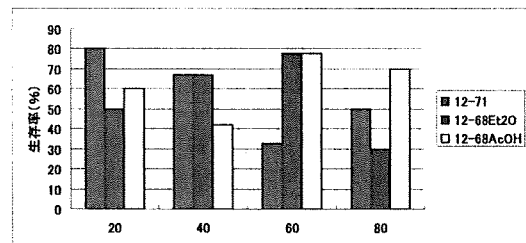


図 4 PEG-b-P[Asp-(DET)] の精製法、N/P 比別生存率

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。

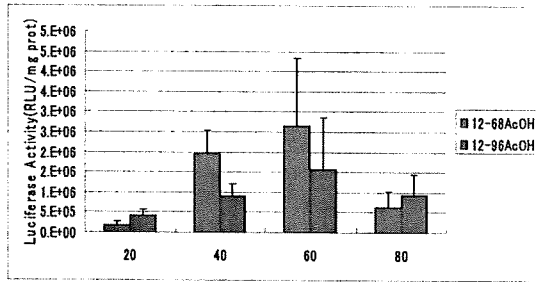


図5 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長、N/P 比別 in vivo 遺伝子発現

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。

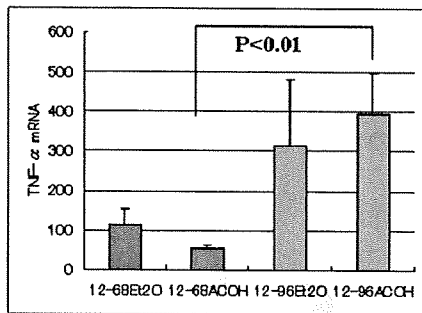


図6 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長別炎症性サイトカイン(TNF-α)遺伝子発現

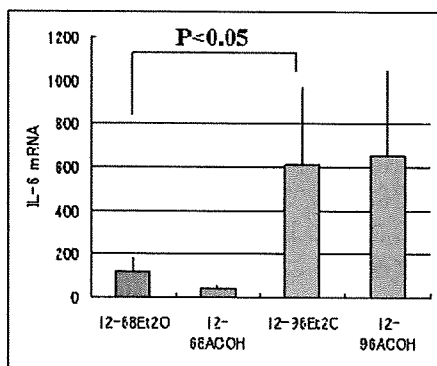


図7 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長別炎症性サイトカイン(IL-6)遺伝子発現

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。

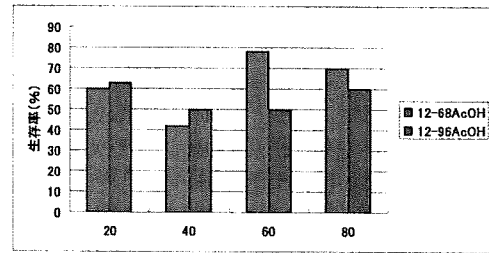


図8 PEG-b-P[Asp-(DET)]の鎖長、N/P 比別生存率

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。

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った結果を図9に示す。

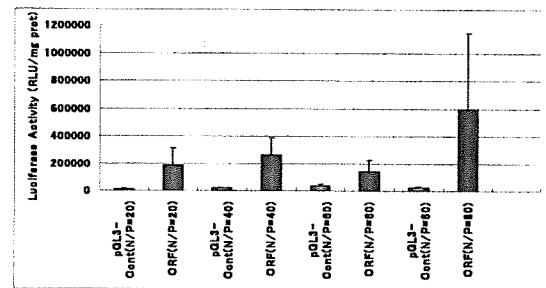


図9 従来のルシフェラーゼ発現ベクター(pGL3-Cont)、ルシフェラーゼコード部位の CpG を除去したベクター(pORF-Δ luc)を用いた PEG-b-P[Asp-(DET)]による N/P 比別 in vivo 遺伝子発現

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10に示す。

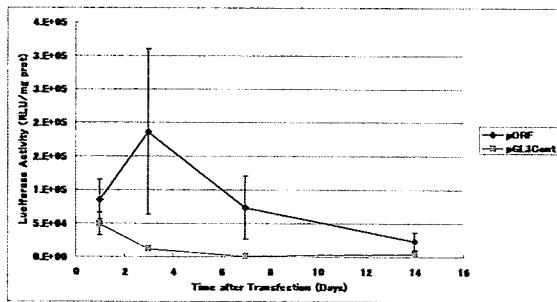


図10 pGL3-Cont と pORF-Δ luc の in vivo 遺伝子発現の時間的変化

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 11、12 に示す。

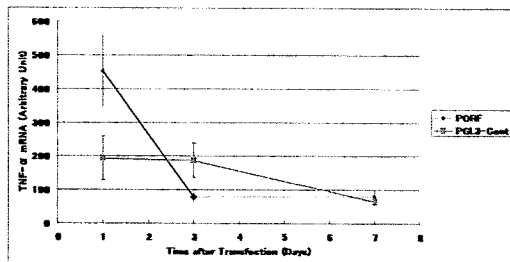


図11 pGL3-Cont, pORF-Δ Luc/PEG-b-P[Asp-(DET)]投与による炎症性サイトカイン (TNF-α) mRNA 発現量の時間経過

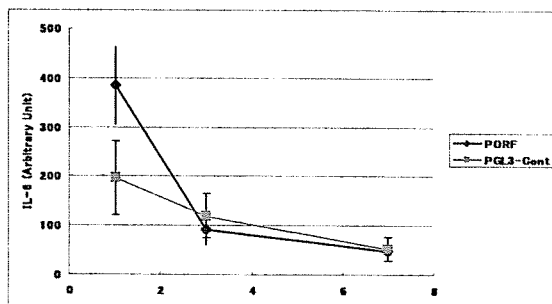


図12 pGL3-Cont, pORF-Δ Luc/PEG-b-P[Asp-(DET)]投与による炎症性サイトカイン (IL-6) mRNA 発現量の時間経過

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-Cont 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。

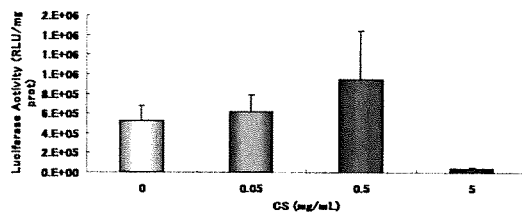


図13 コンドロイチン硫酸の濃度とルシフェラーゼ遺伝子発現量との関係

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 13 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 14 に示す。

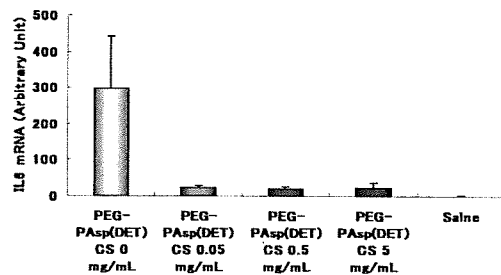


図14 コンドロイチン硫酸の濃度と遺伝子投与後の肺における IL-6 mRNA 発現量との関係

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。



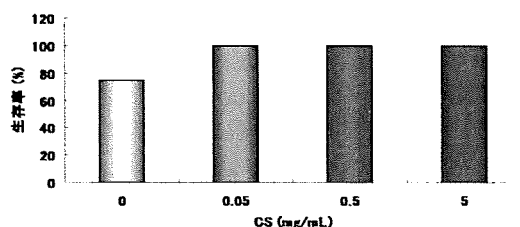


図 15 コンドロイチン硫酸の濃度と遺伝子投与後マウスの生存率の関係

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 15 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增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。本研究成果により、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ことがわかった。

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。

#### G. 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受容体遺伝子異変)」  
The Lipid Vol.20 14-19 (366-371) No.4
2. 斯波真理子「遺伝子異変による 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 hypercholesterol emia

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、槇野久士、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、槇野久士「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. 槇野久士、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口頭発表 2009年7月30日～8月1日 北海道

13. Suzuki A, Obika S, Yamaoka T, Torige 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エ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、槇野久士、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、槇野久士、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

26. 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

27. 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

28. 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タリン肺高血圧症の改善

第57回高分子討論会 2008.9 東京  
国際学会

1. Harada-Shiba M, Sugisawa T, Yoshimas a 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, Yoshimas a 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 pol yamine 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

H.