

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。本研究では、H19-21年の3年間において、(1)非ウイルス型遺伝子ベクターの核内でのDNA脱凝縮過程と遺伝子発現の解析、(2)DNAの折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの構築と機能評価、(3)細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築、の主に3つの研究テーマを推進した。その結果、*in vivo*で有効に機能させるための高分子ミセル型遺伝子ベクターの基本構造を明らかにすることができた。

A:研究目的

遺伝子治療における最も重要な課題の一つはベクターの開発であり、安全性と製剤性に優れ、比較的安価な非ウイルス型遺伝子ベクターに対する期待が高まっている。これに関連して、分担研究者である片岡らは、ポリエチレングリコール-ポリカチオンブロック共重合体がDNAと静電的に相互作用することで形成される高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発を行ってきた。高分子ミセルは、ウイルス（～50ナノメートル）と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究において、は図1に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時（timing）に、必要な部位（location）で、必要な診断や治療（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。

本研究では、上記の研究目的を達成するために、H19-21年の3年間において、(1)非ウイルス型遺伝子ベクターの核内でのDNA脱凝縮過程と遺伝子発現の解析、(2)DNAの折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの構築と機能評価、(3)細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築、の主に3つの研究テーマを推進した。

細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築、の主に3つの研究テーマを推進した。

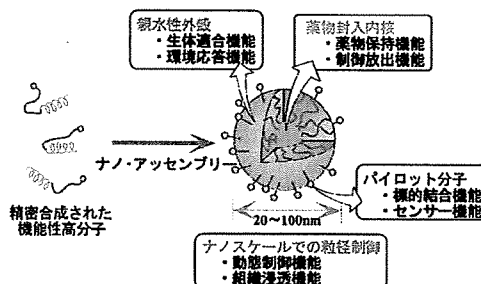


図1 ブロック共重合体のナノアッセムブリに基づく超機能化高分子ミセルベクターの構築

B:研究方法

(1)非ウイルス型遺伝子ベクターの核内でのDNA脱凝縮過程と遺伝子発現の解析

本研究では、ストークスシフトの大きい蛍光タンパク質 Keima-Red を発現するプラスミドDNAを2種類の蛍光色素(fluorescein, Cy3)で標識した。この蛍光標識プラスミドDNA(pDNA)を linear polyethylenimine (LPEI) および Lipofectamine 2000 でコンプレックス化し、ポリプレックスおよびリポプレックスを調製した。これらのポリプレックスおよびリポプレックスを Huh-7 細胞と一定時間培養し、核内における fluorescein と Cy3 の FRET および Keima-Red の遺伝子発現を共焦点顕微鏡観察によって評価した。

(2)DNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの構築と機能評価

PLys 重合度が 20, 38, 70 の PEG-b-PLys ブロック共重合体と pDNA を異なる N/P 比 (PEG-b-PLys 中のアミノ基/DNA 中のリン酸残基) で混合することによって高分子ミセル型ベクターを調製した。調製した高分子ミセル型ベクターの解析は、原子間力顕微鏡 (AFM) による形状の観察および cell free 系でのルシフェラーゼ遺伝子発現評価によって行った。また、高分子ミセル型ベクターの in vivo 機能評価に関しては、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ハイドロダイナミック法による骨格筋への遺伝子デリバリーを行い、レポーター遺伝子の発現量を評価した。さらに、治療遺伝子として、可溶性 VEGF 受容体 (sFlt-1) を使用し、ヒト膀胱がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対する治療効果を検証した。

(3)細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築

本研究では、PEG とポリカチオンが細胞質内の還元的環境下や細胞膜表面に存在する酵素 (plasma membrane-associated protein disulfide isomerase や NADH-oxidase) によって切断される SS 結合で PEG とポリカチオンが連結されたブロック共重合体を合成し、生体内で PEG が脱離する高分子ミセル型ベクターを構築した。ベクターを構成するポリカチオンとして、ポリ (N-置換アスパルタミド) を骨格とし、側鎖にエチレンジアミン構造を有する P[Asp(DET)] を用いた。高分子ミセル型ベクターは、PEG-SS-P[Asp(DET)] とプラスミド DNA (pDNA) を異なる N/P 比で混合することにより調製し、培養細胞 (ヒト子宮頸がん HeLa 細胞) による取り込み量、HeLa 細胞に対する遺伝子発現効率をルシフェラーゼアッセイにより評価した。さらに、Cy5 で標識した pDNA を内包した高分子ミセルを使用して、その細胞内局在を CLSM (LSM510, Carl Zeiss) によって観察した。

C:研究結果

(1)非ウイルス型遺伝子ベクターの核内での DNA 脱凝縮過程と遺伝子発現の解析

2 種類の蛍光色素で標識した pDNA は、LPEI と混合した場合、fluorescence resonance energy transfer (FRET) を示したことから、DNA の凝縮が示唆された。一方、Lipofectamine2000 と混合した場合は、FRET は観察されなかったが、細胞と incubation することによって、FRET が観察された。これは、Lipofectamine2000 単独では、DNA は凝縮されないが、血清タンパク質等が共存することによって、aggregate が形成され、DNA が凝縮されるためであると考えられる。

次に、上記のポリプレックスおよびリポプレックスを Huh-7 細胞と 6 時間培養し、核内における FRET および Keima-Red の遺伝子発現を CLSM 観察によって評価したところ、核内 FRET と Keima-Red 遺伝子発現に関連性が見られた。LPEI ポリプレックスにおいては、解析した 110 個の細胞に対して 44 個の細胞に Keima-Red 遺伝子の発現が認められ、その 36 個 (81.8%) で FRET が観察された。遺伝子発現が認められなかった 66 個の細胞に関しては、53 個 (80.3%) で FRET が観察されなかった。一方、リポプレックスの場合も、Keima-Red 遺伝子の発現が認められた細胞の 81.3% で FRET が観察され、遺伝子発現が認められなかった細胞の 96.2% で FRET が観察されなかった。以上の結果より、ポリプレックスとリポプレックスのどちらの場合においても、遺伝子発現のためには、核内における DNA の脱凝縮が重要であることが示唆された。

(2)DNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの構築と機能評価

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

球状にcollapseされることによってポリプレックスの遺伝子発現効率が著しく低下することが明らかとなった。

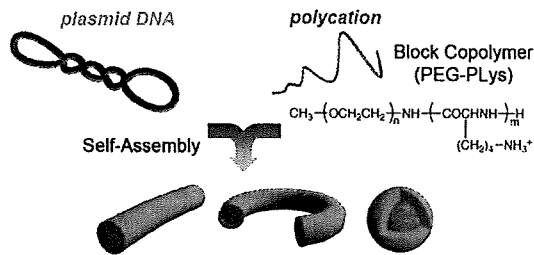


図2. PEG-b-PLysとpDNAによって形成される高分子ミセル型ベクターの様々な形態

次に、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局所 i.v. 投与による骨格筋へのルシフェラーゼ遺伝子の導入効率をフォトイメージャーによって評価したところ、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ヶ月以上の持続的遺伝子発現を示した。PLys 重合度に関しては、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70以上の場合には遺伝子発現の低下が確認された。

このような結果に基づいて、sFlt-1の遺伝子導入によるヒト膵臓がん BxPC3細胞の皮下移植モデルの血管新生阻害治療を行ったところ、naked pDNA と高分子ミセル (PLys 重合度 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。

(3)細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築

PEG-SS-P[Asp(DET)] と pDNA を異なる N/P 比で混合したところ、N/P > 1 において 80-90nm の会合体を形成することが確認された。次に、N/P = 2 で形成させた PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルの還元環境応答性を確認するために、10mM dithiothreitol (DTT)(50倍等量)存在下で粒径およびゼータ電位測定を行ったところ、粒径とゼータ電位の増加が確認された。一方、SS結合を

持たない PEG-P[Asp(DET)] は、10mM DTT 存在下においても、そのような変化を示さなかったことから、PEG-SS-P[Asp(DET)] から形成された高分子ミセルは、還元環境にตอบสนองすることによって、ミセルから PEG が脱離することが示唆された。

次に合成ベクターの HeLa 細胞による取り込み量を ^{32}P で標識された pDNA を用いて評価したところ、P[Asp(DET)] からなるポリプレックスはカチオン性の表面を有するために PEG-P[Asp(DET)] ミセルよりも 4-8 倍高い細胞内取り込み量を示したが、PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルの取り込み量は、PEG-P[Asp(DET)] ミセルと同等であり、PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルの PEG 鎖は細胞外においてある程度安定であることが示唆された。さらに、HeLa 細胞に対するルシフェラーゼ遺伝子 (Luc) の導入効率を評価したところ、PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルは、N/P = 16 において PEG-P[Asp(DET)] ミセルよりも 100-1,000 倍高い遺伝子発現効率を示した。また、PEG-SS-P[Asp(DET)] は、N/P 比に関係なく細胞毒性を示さないことが確認された。また、遺伝子発現の時間依存性を評価したところ、P[Asp(DET)] ポリプレックスは培地交換後に速やかな遺伝子発現の上昇を示したが、PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルの遺伝子発現は 11 時間後に上昇し始め、16 時間後に顕著に増加することが明らかになった。一方、PEG-P[Asp(DET)] ミセルは、非常に遅い遺伝子発現挙動を示したことから、PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルは、細胞内で PEG 鎖が脱離することによってエンドソムを脱出し、高い遺伝子発現活性を示すことが示唆された。そこで、遺伝子ベクターの細胞内局在を CLSM 観察によって評価したところ、PEG-P[Asp(DET)] ミセルは、あまり細胞質へと移行しなかったが、PEG-SS-P[Asp(DET)] ミセルは P[Asp(DET)] ポリプレックスよりも遅れて細胞質内に移行することが明らかとなった。この結果は、上記の遺伝子発現評価の結果とも良く対応しており、後期エンドソム内において PEG の脱離が起こり、それによる P[Asp(DET)] のカチオン性表面の露出によってエンドソム脱出が促進されるものと思われた。

D:考察

1) 達成度について

(1)非ウイルス型遺伝子ベクターの核内での DNA 脱凝縮過程と遺伝子発現の解析では、非ウイルス型遺伝子ベクターの遺伝子発現における核内での pDNA の脱凝縮の重要性を明らかにすることができた。また、(2)DNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセル型ベクターの構築と機能評価では、PLys 鎖長の異なる PEG-b-PLys を合成し、N/P 比を変化させることによって、形態の異なる高分子ミセル型ベクターを調製し、pDNA が球状に collapse した場合には遺伝子発現が低下するが、ロッド/トロイド状に pDNA が折り畳まれたポリプレックスはフリーの pDNA よりも高い遺伝子発現効率を示すことを明らかにした。また、それらのミセル型ベクターの局所 i.v.投与によって骨格筋に遺伝子導入したところ、上記の cell free 系の結果と一致して、ロッド/トロイド状に pDNA が折り畳まれたミセル型ベクターが in vivo においても優れた遺伝子発現効率を示すことが明らかとなった。これらの結果は、非ウイルス型遺伝子ベクターの構築において効率的な遺伝子発現を実現するためには、pDNA を collapse することなく、規則的に折り畳むことが重要であることを示唆している。最後に、(3)細胞内環境応答型高分子ミセル型ベクターの構築に関しては、PEG が脱離する環境応答性ミセル型ベクターを構築し、遺伝子発現の時間依存性の評価や CLSM によるエンドソーム脱出の評価を通じて、ベクター設計の有用性を明らかにした。本研究は、細胞外における高い安定性と細胞内における効率的な細胞質移行を実現する高分子ミセル型ベクターを構築するための基盤技術として今後の展開が期待される。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

遺伝子治療の実用化は、ベクターの開発に依存していると言っても過言ではない。本研究で開発した高分子ミセル型遺伝子ベクターは、従来の合成ベクターと比較して低毒性かつ効率的な遺伝子導入を可能とし、遺伝子治療の実用化を実現するベクターとして期待される。本研究では、3 年間の計

画研究の推進によって、非ウイルス型ベクターにおける DNA の折り畳み構造の重要性を明らかにし、DNA の折り畳み構造を制御した高分子ミセルが in vivo においても有効に機能することを確認した。また、細胞内環境で PEG が脱離することによって、細胞外における高い安定性と細胞内における効率的な細胞質移行を実現する高分子ミセル型ベクターの基本設計の確立に成功した。高分子ミセル型遺伝子ベクターの最大の特徴は、構成要素であるブロック共重合体の創り込みによって様々な機能を賦与できる点であり、本研究成果はベクターの高機能化のための分子設計として重要な知見を与えるものと考えられる。以上のように、これらの研究成果は、関連分野に大きなインパクトを与えることが確信される。

3) 今後の展望について

今後は、高分子ミセル型遺伝子ベクターの実用化に向けた in vivo 研究をさらに進める予定である。本研究で確立された高分子ミセル型遺伝子ベクターの局所 i.v.投与による骨格筋への遺伝子導入に関しては、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。一方、がん治療に関しては、全身投与によるがん組織への遺伝子デリバリーを実現するために、環境応答性と標的認識機能を賦与した高分子ミセルの開発を進めていきたいと考えている。

E:結論

本研究では、DNA の折り畳み構造の制御や環境応答性機能の付与を行った高分子ミセル型遺伝子ベクターを構築し、その有用性を in vitro および in vivo 実験により明らかにした。高分子ミセル型遺伝子ベクターは、遺伝子治療の実現に向けた安全性と有効性を兼ね備えたベクターとして今後の展開が期待される。

F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性は皆無である。

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)
 9. M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)
 10. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)
 11. K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008)
 12. Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: A technique for efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)
 13. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18) 6001-6009 (2008)
 14. K. Masago, K. Itaka, N. Nishiyama, U. Chung, K. Kataoka, Gene delivery with biocompatible cationic polymer: Pharmacogenomic analysis on cell bioactivity. *Biomaterials* 28 (34) 5169-5175 (2007)

15. K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release* 122 (3) 252-260 (2007)
16. M. Oba, S. Fukushima, N. Kanayama, K. Aoyagi, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. *Bioconjugate Chem.* 18 (5) 1415-1423 (2007)
17. M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, K. Kataoka, Transfection Study Using Multicellular Tumor Spheroids for Screening Non-viral Polymeric Gene Vectors with Low Cytotoxicity and High Transfection Efficiencies. *J. Control. Release* 121 (1-2) 38-48 (2007)

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
5. 片岡一則、ナノバイオ・インテグレーションが拓く未来医療～高分子ミセル型ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～、ナノ学会第 6 回大会、九州大学医学部百年記念講堂、福岡、2008.5.7、基調講演
6. 片岡一則、遺伝子治療実用化に向けたインテリジェント超分子ナノデバイスの構築、遺伝子・デリバリー研究会第 8 回シンポジウム、千里ライフサイエンスセンター、豊中市、2008.5.9、招待講演
7. 片岡一則、遺伝子治療実用化に向けた高分子ミセル型ナノデバイスの創製、日本薬剤学会第 23 年会、札幌コンベンションセンター、札幌市、2008.5.22、招待講演
8. 片岡一則、Supramolecular Nanodevice Assembled from Smart Block Copolymers as Non-viral Gene Vector、第 14 回日本遺伝子治療学会、札幌医科大学、札幌、2008.6.14、招待講演
9. 片岡一則、ナノ治療イノベーションを実現する超分子ナノデバイス設計、第 7 回国際バイオフィォーラム、東京ビッグサイト、東京、2008.7.4、特別講演
10. 片岡一則、超分子ナノデバイスによる DDS イノベーション、第 24 回日本 DDS 学会学術集会、六本木ヒルズ、東京、2008.6.29、招待講演
11. 片岡一則、がん治療における高分子ミセル製剤の基礎、第 67 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、名古屋市、2008.10.29、招待講演
12. 片岡一則、未来型 DDS に向けた高分子ナノキャリア設計、日本 DDS 学会 水島裕先生・瀬崎仁先生追悼シンポジウム、東京ガーデンパレス、東京、2008.11.5、招待講演
13. 片岡一則、ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療～超分子ナノデバイスによるセルセラピー～、第 27 回日本医学会総会、大阪国際会議場、大阪、2007.4.8、基調講演
14. 片岡一則、遺伝子デリバリーのための超分子ナノデバイス設計、第 23 回日本 DDS 学会、ホテル日航熊本、熊本、2007.6.15
15. 片岡一則、ナノマテリアルによるドラッグデリバリー特別講演会、国立医薬

- 品食品衛生研究所, 東京, 2007.9.12, 招待講演
16. 片岡一則, 薬物・遺伝子デリバリーと高分子ゲル-ナノバイオインターフェイスに挑む-, ゲルワークショップ イン 名古屋, KKR ホテル名古屋, 愛知, 2007.9.22, 基調講演
- (国際学会)
1. K. Kataoka, Smart Nanocarrier Systems for Targeted Drug and Gene Delivery ~A 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
 2. 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
 3. 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
 4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 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
 9. 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
 10. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery, TERMIS-EU 2008, Alfandega Congress Center, Porto, Portugal, 2008.6.24, Plenary Lecture
 11. K. Kataoka, Supramolecular assemblies of smart block copolymers as nanocarriers for gene and drug delivery - Challenge to intracellular nanomedicine -, IUPAC 48th Microsymposium "Polymer Colloids: From Design to Biomedical and Industrial Applications", Institute of Macromolecular Chemistry, Prague, Czech Republic, 2008.7.21, Plenary Lecture
 12. K. Kataoka, Supra-Molecular Nanodevices for Gene and Drug Delivery - Challenge to Smart Molecular Therapy -, NanoDDS '08, University of Toronto, Toronto, Canada, 2008.10.19, Invited Lecture
 13. K. Kataoka, Polymeric Micelles and Polmersomes from Polyamino Acid-based Block Copolymers -From Chemistry to Biomedical Application-, Macromolecular Colloquium at University of Bayreuth, University of Bayreuth, Bayreuth, Germany, 2008.11.26, Invited Lecture
 14. K. Kataoka, Engineered supra-macromolecular assemblies as nanocarriers for gene and drug delivery, The 3rd SBE International Conference on Bioengineering and Nanotechnology (ICBN 2007), Biopolis, Singapore,

2007.8.13, Invited Lecture

15. K. Kataoka, Supramolecular nanocarriers assembled from block copolymers for gene and drug delivery, Polypeptide and Protein Materials, the 234th ACS National Meeting, Westin Boston Waterfront, Boston, 2007.8.21, Invited 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, 呉寿栄, 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
2. 片岡一則, 石井篤史, 西山伸宏, 加藤泰己, 宮田完二郎, キム ヒョンジン、武元宏泰、非荷電性親水性ブロック及び側鎖の一部に疎水性基が導入されたカチオン性のポリアミノ酸ブロックを含んでなる共重合体、その使用、特願 2008-059886
3. 片岡一則, LEE, Yan, 宮田完二郎、大庭誠、電荷変換型三元系ポリプレックス、アメリカ（Provisional 出願）61/126,077
4. 片岡一則, ジャン ミンゼン, 石井篤史, 西山伸宏, 松本悟：ポリエチレングリコールの結合した核酸のコンジュゲートとリン酸カルシウムの有機-無機ハイブリッド型ナノ粒子、特願 2007-280803

Ⅲ. 研究成果の刊行に関する業績一覧

発表者名	論文タイトル名	発表雑誌名	巻号	ページ	出版年
Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Manome Y.	Detection of thyroid carcinoma antigen with Quantum dots and monoclonal IgM antibody (JT-95) systems.	<i>J. Nanomater.</i>		IN PRESS	2010
Yamamoto S, Manabe N, Yamamoto K.	High-Definition Slit Lamp Video Camera System. Ophthalmic Surgery	<i>Lasers & Imaging</i>	Vol 41, No 1		2010
Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K, Lim T, Yamamoto K, Northcote P, Tilley RD.	Chemical Reactions On Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	Jan 13;132(1)	248-253	2010
Fujioka K, Arakawa E, Kita J, Aoyama Y, Okuda T, Manome Y, Yamamoto. K.	Combination of Real-Value Smell and Metaphor Expression Aids Yeast Detection.	<i>PLoS ONE</i>	4 (11)	e7939	2009
Shiohara. A, Hanada. S, Prabakar. S, Fujioka. K, Lim. T, Yamamoto. K, Northcote. P, and Tilley. RD	Chemical Reactions On Surface Molecules Attached to Silicon Quantum Dots	<i>J. Am. Chem. Soc.,</i>			2009
Prabakar. S, Shiohara. A, Hanada. S, Fujioka. K, Yamamoto. K, and Tilley. RD	Size Controlled Synthesis of Germanium Nanocrystals with Hydride Reducing Agents and their Biological Applications	<i>Chemistry of Materials,</i>			2009
Sudoh K, Hirakuri K, Fujioka K,	Nanocrystalline diamond particles dispersed by solutions	<i>Tran.s Mater. Res. So. Jpn .</i>	34(2)	313-316	2009

Manabe N, Yamamoto K					
Fujioka K, Futamura Y, Shiohara T, Hoshino A, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K.	Amino Acid Synthesis in Supercritical Carbon Dioxide with Water System.	<i>International Journal of Molecular Sciences</i>	9(6),	2722-2732. doi:10.3390/ijms10062722 Epub ahead of print, 15 June 2009.	2008
Hoshino A, Hanada S, Manabe N, Nakayama T, Yamamoto K	Immune Response Induced by Fluorescent Nanocrystal Quantum Dots in vitro and in vivo.	<i>IEEE Transactions on Nano-Bioscience</i>	Mar;8(1)	51-57. Epub ahead of print, Mar 16, 2009	2009
Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Hanada S, Yasuhara M, Kondo A, Yamamoto K.	GFP expression by intracellular gene delivery of GFP-coding fragments using nanocrystal quantum dots	<i>Nanotechnology</i>	19(49)	1-12 Epub ahead of print, 18 November 2008	2008
Fujioka K, Hiruoka M, Sato K, Manabe N, Miyasaka R, Hanada S, Hoshino A, Tilley RD, Manome Y, Hirakuri K, Yamamoto K.	Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration.	<i>Nanotechnology</i>	19(41)	415102. Epub ahead of print, Sep 3, 2008	2008
Osinski M, Jovin TM, Yamamoto K.	Biomedical applications of colloidal nanocrystals..	<i>J. Biomed. Biotechno.</i>	82752	Published online 2008 June 4. doi:10.1155/2007/82752.	2008
Yamamoto M, Futamura Y, Fujioka K, Yamamoto K.	Novel production method for plant polyphenol from livestock excrement using subcritical water.	<i>International Journal of Chemical Engineering</i>			2008
Hoshino A, Nagao T, Nagi-Muira	MPO-ANCA induces IL-17 production by activated neutrophils in vitro via classical	<i>Journal of Autoimmunity</i>	31(1)	79-89. Epub ahead of	2008

N, Ohno N, Yasuhara M, Yamamoto K, Nakayama T, Suzuki K.	complement pathway-dependent manner.			print, Apr 21, 2008	
Futamura Y, Fujioka K, Yamamoto K.	Hydrothermal Treatment of Glycine and Adiabatic Expansion Cooling: Implications for Prebiotic Synthesis of Biopolymers.	<i>Journal of Materials Science</i>	43(7)	442-244 6 doi:10.1007/s10853-007-2040-9 Published online: 13 November 2007	2008
Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, Suzuki K.	Preparedness for the Spread of Influenza: Prohibition of Traffic, School Closure, and Vaccination of Children in the Commuter Towns of Tokyo.	<i>The Journal of urban Health</i>	85(4)	619-35. Epub ahead of print, May 1, 2008	2008
Hoshino A, Nagao T, Nakasuga A, Ishida-Okawara A, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K.	Nanocrystal Quantum Dot-Conjugated Anti-Myeloperoxidase Antibody as the Detector of Activated Neutrophils.	<i>IEEE Transactions on Nano-Bioscience</i>	6(4)	341-345	2007
Hoshino A, Ohnishi N, Yasuhara M, Yamamoto K, Kondo A.	Separation of Murine Neutrophils and Macrophages by Thermoresponsive Magnetic Nanoparticles.	<i>Biotechnology Progress</i>	23(6)	1513-16	2007
Hoshino A, Omata K, Takami S, Adschiri T, Terada N, Funatsu T, Yasuhara M, Yamamoto K.	Fluorescence Millisecond Oscillation in Polar Solvents regulates Fluorescence Intensity of Colloidal Quantum Dots' solution.	<i>Journal of Nanophotonics</i>		(E-pub only journal). Published online; 10 July 2007	2007
Hoshino A, Manabe N, Fujioka K, Suzuki K, Yasuhara M,	Use of fluorescent quantum dot bioconjugates for cellular imaging of immune cells, cell organelle labeling, and nanomedicine -surface	<i>The Journal of Artificial Organs.</i>	10 (3)	149-157	2007

Yamamoto K.	modification regulates biological function, including cytotoxicity-				
Krevchik VD, Novikov TV, Dahnovsky YI, Semenov MB, Shcherbakova EV, Yamamoto K.	Nonlinear Dynamics of Infectious Diseases Transfer with Possible Applications for Tubercular Infection	<i>Arxiv. Medical Physics 2</i>		1434.11Jun 2007 arXiv:0706.1434v1(E-pub only journal).	2007
Hoshino A, Nagao T, Ito-Ihara T, Ishida-Okawara A, Uno K, Muso E, Nagi-Miura N, Ohno N, Tokunaka K, Naoe S, Hashimoto H, Yasuhara M, Yamamoto K, Suzuki K.	Trafficking of QD-conjugated MPO-ANCA in Murine Systemic Vasculitis and Glomerulonephritis model mice.	<i>Microbiology and Immunology</i>	51 (5)	551-556	2007
Futamura Y, Yahara K, Yamamoto K.	Evidence for the production of fluorescent pyradine delivertives using supercritical water.	<i>The Journal of Supercritical Fluids</i>	41(2)	279-284	2007 doi:10.1016/j.supflu.2006.10.008 Available online: 4 December 2006
Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sorimachi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T.	Inhibition of CCL1-CCR8 Interaction Prevents Aggregation of Macrophages and Development of Peritoneal Adhesions.	<i>The Journal of Immunology</i>	178(8)	5296-5304	2007
Yamamoto S, Manabe N, Fujioka K,	Visualizing Vitreous using Quantum Dots as Imaging Agents.	<i>IEEE Transactions on Nano-</i>	6(1)	94-98	2007

Hoshino A, Yamamoto K.		<i>Bioscience</i>			
H Oku, K Yamada, K Kobayashi, R Katakai, M Ashfaq, H Hanaoka, Y Iida, K Endo, S Hasegawa, Y Maekawa, K Yano, S Kano, M Suzuki	Nano-Particle Materials Prepared From a Synthetic Antigenic Sequence of Plasmodium falciparum Enolase.	<i>Peptide Science 2008</i>		439-442	2008
Hoshino A, Kawamura YI, Yasuhara M, Toyama-Sori machi N, Yamamoto K, Matsukawa A, Lira SA, Dohi T.	Inhibition of CCL1-CCR8 interaction prevents aggregation of macrophages and development of peritoneal adhesions.	<i>J. Immunol.</i>	178	5296-53 04	2007
Mizutani N, Sakurai T, Shibata T, Uchida K, Fujita J, Kawashima R, Kawamura YI, Toyama-Sori machi N, Imai T, Dohi T.	Dose-dependent differential regulation of cytokine secretion from macrophages by fractalkine.	<i>J. Immunol.</i>	79	7478-74 87.	2007
Kawamura, YI, Toyota M, Kawashima R, Hagiwara T, Suzuki H, Imai K, Shinomura Y, Tokino T, Kannagi R, and Dohi T.	DNA hypermethylation contributes to incomplete synthesis of carbohydrate determinants in gastrointestinal cancer	<i>Gastroentero- logy</i>	135	142-151	2008
Dohi, T and Kawamura YI,	Incomplete synthesis of the Sd(a)/Cad blood group carbohydrate in gastrointestinal cancer	<i>Biochim. Biophys Acta</i>	1780	467-471	2008
Dohi T, Borodovsky	TWEAK/Fn14 Pathway: a nonredundant role in intestinal	<i>Gastroentero- logy</i>	136	912-923	2009

A, Wu P, Shearstone JR, Kawashima R, Runkel L, Rajman L, Dong X, Scott ML, Michaelson JS, Jakubowski A, Burkly LC.	damage in mice through a TWEAK/intestinal epithelial cell axis.				
Michael S. Patrick, Hiroyo Oda, Kunihiro Hayakawa, Yoshinori Sato, Koji Eshima, Teruo Kirikae, Shun-ichiro Iemjura, Mutsunori Shirai, Takaya Abe, Tohru Natsume, Takehiko Sasazuki and Harumi Suzuki	Gasp, a Grb2 associating protein, is critical for positive selection of thymocytes	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. US</i>	106	16345-1 6350	2009
Yoshinori Sato, Hiroyo Oda, Michael S. Patrick, Yukari Baba, Ahmed A. Rus'd, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Mutsunori Shirai and Harumi Suzuki	Rac GTPases are involved in development, survival and homeostatic proliferation of T cells	<i>Immunol. Let.</i>	124	27-34	2009
Dai Chida; Tsuyoshi Sato;	Characterization of mice deficient in Melanocortin 2 receptor on a B6/Balbc mix	<i>Mol. Cell. Endocrinol.</i>	300	32-36	2009

Yoshinori Sato; Mitsumasa Kubo; Tetsuya Yoda; Harumi Suzuki; Yoichiro Iwakura	background				
Hiroyo Oda, Manabu Fujimoto, Michael S. Patrick, Dai Chida, Yoshinori Sato, Hiroki Aoki, Yoshinao Azuma, Takaya Abe, Harumi Suzuki and Mutsunori Shirai	RhoH plays critical roles in FceRI-dependent signal transduction of mast cells	<i>J. Immunol.</i>	182	957-962	2009
Dai Chida, Shinichi Nakagawa, So Nagai, Hiroshi Sagara, Harumi Katsumata, Toshihiro Imaki, Harumi Suzuki, Fumiko Mitani, Tadashi Ogishima, Chikara Shimizu, Hayato Kotaki, Shigeru Kakuta, Katsuko Sudoa, Takao	Melanocortin receptor 2 is required for adrenal gland development, steroidogenesis and neonatal gluconeogenesis	<i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i>	104	18205-18210	2007

Koike, Mitsumasa Kubo and Yoichiro Iwakura					
Fumiko Shiroki, Satoshi Matsuda, Tomomitsu Doi, Mari Fujiwara, Yoshito Mochizuki, Takashi Kadowaki, Harumi Suzuki and Shigeo Koyasu	he p85a regulatory subunit of classIA phosphoinositide 3-kinase regulates b-selection in thymocyte development.	<i>J. Immunol.</i>	178	1349-1356	2007
Hiroyo Oda, Harumi Suzuki, Kouhei Sakai, Seiji Kitahara, Michael S. Patrick, Yoshinao Azuma, Kazuro Sugi, Toshio Kitamura, Jonathan Kaye and Mutsunori Shirai	Rac1 mediated Bcl-2 induction is critical in antigen-induced CD4 single positive differentiation of a CD4+CD8+ immature thymocyte line.	<i>J. Leuko. Biol.</i>	81	500-508	2007
Kazuo Tomizawa, Tomokazu Nagao, Reina Kusunoki, Kan Saiga, Masamichi Oshima, Kazuo Kobayashi, Toshinori Nakayama,	Reduction of MPO-ANCA epitopes in SCG/Kj mice by 15-Deoxyspergualin treatment restricted by IgG2b associated with crescentic glomerulonephritis	<i>Rheumatol.</i>		IN PRESS	2010

Masaru Tanokura, Kazuo Suzuki.					
Kei Takahashi, Toshiaki Oharaseki, Noriko Nagi-Miura, Naohito Ohno, Akiko Ishida-Okawara, Hitomi Yamada, Yoshiaki Kaneshiro, Shiro Naoe, Kazuo Suzuki.	Administration of human immunoglobulin inhibited development of vasculitis in a murine model of vasculitis induced with CAWS, <i>Candida albicans</i> water soluble fraction.	<i>Modern Rheumatol.</i>	Nov 27	Epub ahead of print	2009
Masumitsu Hatta, Natsuo Yamamoto, Akiko Miyazato, Kiwamu Nakamura, Ken Inden, Tetsuji Aoyagi, <u>Kazuo Suzuki</u> , Mitsuo Kaku, Kazuyoshi Kawakami	Early production of tumor necrosis factor- α by Gr-1+CD11b+ mononuclear cells and its role in the host defense to pneumococcal infection in lungs.	<i>FEMS Immunol. Med. Microbiol.</i>		IN PRESS	2009
Akihiro Hasegawa, Katsuhiro Hayashi, Hiroyuki Kishimoto, Meng Yang, Soichi Tofukuji, <u>Kazuo Suzuki</u> , Hiroshi Nakajima,	Color-coded real-time cellular imaging of T lymphocyte accumulation and focus formation in mouse asthma model.	<i>J. Allergy Clin. Immunol.</i>	125	461-8	2010

Robert Hoffman, Mutsunori Shirai, Toshinori Nakayama.					
Miura NN, Komai M, Adachi Y, Osada N, Kameoka Y, Suzuki K, Ohno N.	IL-10 is a negative regulatory factor of CAWS-vasculitis in CBA/J mice as assessed by comparison with Bruton's tyrosine kinase-deficient CBA/N mice.	<i>J. Immunol.</i>	183	3417-24	2009
Yuka Osaki, Yasuhiro Maehara, Masaki Sato, Akiyoshi Hoshino, Kenji Yamamoto, Tomokazu Nagao, <u>Kazuo Suzuki</u> , Shoji Kawachi.	Analysis of cytokines in broncho-alveolar lavage fluids of patients with ARDS: Increase of IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β .	<i>JJSCM (Journal of Japanese Society of Intensive Care.</i>		IN PRESS	2009
Shoji Kawachi, San Thi Luong, Mika Shigematsu, Hiroyuki Furuya, Thuy Thi Bich Phung, Phuc Huu Phan, Hiroyuki Nunoi, Liem Thanh Nguyen, <u>Kazuo Suzuki</u> .	Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children.	<i>J. Infectious Dis.</i>	200	510-515	2009
Chiaki Kaga, Shigeyuki Nomura, Mina Okochi, Tomoko Nozu,	Screening of epithelial cell-adhesive peptides from fibronectin loop region and its cell specificity.	<i>J. Chem. Engineering Japan</i>	4	298-302	2009

Tomokazu Nagao, Atsushi Nagai, Toshinori Nakayama, <u>Kazuo Suzuki</u> , Hiroyuki Honda.					
Tomoko Nozu, Mitsuko Kondo, <u>Kazuo Suzuki</u> , Jun Tamaoki, Atsushi Nagai.	A Comparison of the Clinical Features of ANCA-Positive and ANCA-Negative Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients.	<i>Respiration</i>	77	407-415	2009
長尾朋和、鈴木和男	ANCA 関連血管炎と Neutrophil Extracellular Traps(NETs、好中球細胞外補足構造)	リウマチ科(科学評論社)		IN PRESS	2009
Y. Yasuda, T. Shimoda, K. Unoa, N. Tateishi, S. Furuya, K. Yagi, <u>K. Suzuki</u> , S. Fujita.	The effects of MPTP on the activation of microglia/astrocytes and cytokine/chemokine levels in different mice strains.	<i>J. Neuroimmunology.</i>	204	:43-51	2008
T. Ito-Ihara, E. Muso, S. Kobayashi, K. Uno, N. Tamura, Y. Yamanishi, A. Fukatsu, R. A. Watts, D.G.I. Scott, D. R.W. Jayne, <u>K. Suzuki</u> , H. Hashimoto.	A comparative study of the diagnostic accuracy of ELISA systems for the detection of anti-neutrophil cytoplasm antibodies available in Japan and Europe.	<i>Clin. Exp. Rheumatol.</i>	26	1027-103	2008
R. A. Watts, D.G.I. Scott, D.R.W. Jayne, T. Ito-Ihara, E. Muso, S.	Renal Vasculitis in Japan and UK – are there differences in epidemiology?	<i>Nephrol. Dialysis Transplant.</i>	23(12)	3928-3931	2008