

## D. 考 察

肝癌細胞特異的ペプチドSP94とナノカプセルとのコンジュゲーションは使用した架橋剤のリンカー長に関係なく進行し、カプセル1個あたり12~23個のSP94ペプチドを修飾できることが分かった。このコンジュゲートによりナノカプセルの粒径は若干増大したことが動的光散乱法によって観察された。SM(PEG)<sub>12</sub>の鎖長は5.3nm、SM(PEG)<sub>24</sub>では9.5nmであり、これらに加えてSP94ペプチドの付加によるものと考えられる。しかし、これらの複合化によってもナノカプセルはほぼ単分散であり、凝集体等は観察されなかった。

SP94-ナノカプセルは期待通り肝癌特異性を示しナノカプセルの構造を損なうことなく、SP94ペプチドの特性を付与することができた。この肝癌特異性はSP94ペプチドのN末端で架橋したナノカプセルの方がトランスフェクションの効率が良かったことから、SP94ペプチドと肝癌細胞の相互作用には何らかの方向性が関係することが示唆された。また同じN末端修飾体のなかでもPEG鎖長が長い方が有利であったことから、ナノカプセル表面におけるSP94ペプチドの可動性も重要であると考えられる。

## E. 結 論

固相合成した肝癌細胞特異的ペプチドSP94をナノカプセル表面にコンジュゲートしたSP94-ナノカプセルの合成に成功した。本研究の結果から、ナノカプセルに合成ペプチドや小分子をコンジュゲートする際の重要な知見を得ることができた。今後はSP94-ナノカプセルを実験動物へ応用すると共に、本コンジュゲートシステムを応用して他のアンテナ分子の修飾を試みる予定である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Ryohsuke Kurihara, Dakrong Pissuwan, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Biodistribution and tumor localization of PEG-modified dendritic poly(L-lysine) oligonucleotide complexes, *J. Biomater. Sci.-Polym. Ed.*, in press
- 2) Shuji Yamashita, Hiromitsu Fukushima, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Controlled-release system mediated by a retro Diels-Alder reaction induced by the photothermal effect of gold nanorods, *Langmuir in press*
- 3) Hirotao Kitazaki, Takeshi Mori, Jeong-Hun Kang, Takuro Niidome, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Yoshiki Katayama, A colorimetric assay of protein kinase activity based on peptide-induced coagulation of gold nanorods, *Coll. Surf. B*, in press
- 4) Akira Tsuchiya, Daisuke Asai, Jeong-Hun Kang, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Correlation between phosphorylation ratios by MALDI-TOF MS analysis and radioactivities by radioactive assay, *Anal. Biochem.*, in press
- 5) Haruka Koga, Riki Toita, Takeshi Mori, Tetsuro Tomiyama, Jeong-Hun Kang, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Fluorescent nanoparticles consisting of lipopeptides and fluorescein-modified polyanions for monitoring of protein kinase activity, *Bioconjugate Chem.*, 22, 1526-1534 (2011)
- 6) Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Akira Tsuchiya, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Peptide substrates for Rho-associated kinase 2 (Rho-kinase 2/ROCK2), *PLoS ONE*, 6, e22699 (2011)
- 7) Tetsuro Tomiyama, Riki Toita, Jeong-Hun Kang, Haruka Koga, Shujiro Shiosaki, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Effect of the introduction of chondroitin sulfate into polymer-peptide conjugate responding to intracellular signals, *Nanoscale Res. Lett.*, 6, 532 (2011)

- 8) Yoji Asami, Jun Oishi, Hirotaro Kitazaki, Jumpei Kamimoto, Jeong-Hun Kang, Takuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, A simple set-and-mix assay for screening of protein kinase inhibitors in cell lysates, *Anal. Biochem.*, *418*, 44-49 (2011)
- 9) Shujiro Shiosaki, Masanori Kuramoto, Riki Toita, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A hydrophilic polymer grafted with a histone tail peptide represents an artificial gene regulator activated by a histone acetyltransferase, *Bioorg. Med. Chem.*, *19*, 4101-41405 (2011)
- 10) Akira Tsuchiya, Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Transgene regulation system responding to Rho associated coiled-coil kinase (ROCK) activation, *J. Controlled Release*, *155*, 40-46 (2011)
- 11) Shuji Yamashita, Hiromitsu Fukushima, Yasuyuki Akiyama, Yasuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Controlled-release system of single-stranded DNA triggered by the photothermal effect of gold nanorods and its in vivo application, *Bioorg. Med. Chem.*, *19*, 2130-2135 (2011)
- 12) Takashi Shimomura, Xiaoming Han, Akito Hata, Takuro Niidome, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Optimization of peptide density on microarray surface for quantitative phosphoproteome, *Anal. Sci.*, *27(11)*, 13-17 (2011)
- 13) Dakrong Pissuwan, Keisuke Nose, Ryohsuke Kurihara, Kenji Kaneko, Yoshiro Tahara, Noriho Kamiya, Masahiro Goto, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, A solid-in-oil dispersion of gold nanorods can enhance transdermal protein delivery and skin vaccination, *Small*, *17*, 215-221 (2011)
- 14) Yoshiro Tahara, Takeshi Kaneko, Riki Toita, Chiharu Yoshiyama, Takuya Kitaoka, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Noriho Kamiya, Masahiro Goto, A novel double-coating carrier produced by solid-in-oil and solid-in-water nanodispersion technology for delivery of genes and proteins into cells, *J. Controlled Release*, *in press*
- 15) Keisuke Nose, Dakrong Pissuwan, Masahiro Goto, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Gold nanorods in an oil-base formulation for transdermal treatment of Type 1 diabetes in mice, *Nanoscale*, *in press*
- 16) Hiromitsu Fukushima, Shuji Yamashita, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Sequential release of single-stranded DNAs from gold nanorods triggered by near-infrared light irradiation, *Chem. Lett.*, *in press*
- 17) Riki Toita, Takeshi Mori, Yuki Naritomi, Jeong-Hun Kang, Shujiro Shiosaki, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Fluorometric detection of protein kinase C $\alpha$  activity based on phosphorylation-induced dissociation of a polyion complex, *Anal. Biochem.*, *in press*
- 18) Akira Tsuchiya, Yuki Naritomi, Satoshi Kushio, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Makoto Hashizume, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Improvement in the colloidal stability of protein kinase-responsive polyplexes by PEG modification, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, *100*, 1136-1141 (2012)
- 19) Hiroyuki Tanaka, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Creating a unique environment for selecting reactive enzymes with DNA: "Sticky" binding of oligocation-grafted polymers to DNA, *Bioorg. Med. Chem.*, *20*, 1346-1353 (2012)

## 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## 肝特異的ナノカプセルの細胞選択性とその機序に関する研究

研究分担者 富川盛雅（九州大学病院 先端医工学診療部准教授）

### 研究要旨

ヒトB型肝炎ウイルスに由来する肝細胞特異的ペプチドPreS1を外表面に有するナノカプセルを用いて、その細胞特異性と形質転換機序について検討した。この結果、PreS1ナノカプセルはヒト肝由来細胞株に対して高い特異性を有し、その機序はPreS1ペプチドが関与するエンドサイトーシス経路で形質転換されることが分かった。

### 共同研究者

を表面に有するナノカプセル(HSP16.5-PreS1)を用いて、その機能評価を行った。

神代竜一（九州大学大学院医学研究院）

田畑栄一（九州大学大学院医学研究院）

## B. 研究方法

### A. 研究目的

特定の臓器や細胞を特異的に認識し、そこへ薬物や造影剤を送り込むことができれば極めて有効な診断・治療システムとなる。本研究では *Methanococcus jannaschii* 由来のタンパク質ナノカプセルをベースとして、その表面に様々なアンテナ分子を導入することで新しい薬物送達システムを開発している。このウイルスカプシドをモデルとする新しいナノドラッグキャリアは、完全なシーケンス制御に基づく極めて精緻な構造制御が可能であり、従来のリポソームや高分子ミセルのような化学合成による薬物輸送キャリアとは一線を画する。本年度はヒトB型肝炎ウイルス(HBV)に由来する肝特異的ペプチドPreS1

ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2, Huh-7)、ヒト子宮頸癌由来細胞株 (HeLa)、ヒト乳癌由来細胞株 (MCF-7) をそれぞれ  $1 \times 10^4$  cells/well ずつ  $\mu$ -スライド™ (9-well) に播種し、10% (v/v) FBS と 1% (v/v) antibiotic-antimycotic mix を含む DMEM 培地(カラーレス)で常法に従って一晚培養した。これにあらかじめ蛍光色素 Alexa488 をその内孔に固定化した HSPG41C-preS1 ナノカプセルおよび HSPG41C ナノカプセルを、終濃度 1 $\mu$ M となるようにそれぞれ添加した。6 時間後、培地を交換し、共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Bio-Rad Radiance 2100 CLSM system) で観察した。なお蛍光画像はすべて同一条件下 (接眼レンズ, レーザー強度, ゲイン, イメージサイズ) で取得した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針、組み換え DNA 実験指針に基づいて実施した。

### C. 研究結果

共焦点顕微鏡による観察の結果、HSPG41C-preS1 ナノカプセルは二つの肝由来細胞 (HepG2, Huh-7) に対して高い親和性を有することが示された (図1)。これらの細胞において、HSPG41C-preS1 ナノカプセルは広く細胞質に存在し、核には観察されなかった。また HeLa や MCF-7 の他の臓器に由来する細胞株に対してはほとんど形質転換されなかった。一方で、コントロールとなる HSPG41C ナノカプセルは、同一条件下で Huh-7, HepG2, そして MCF-7 にわずかに取り込まれたものの、HSPG41C-preS1 ナノカプセルのそれとは有意な差が確認された (図2)。

ナノサイズの粒子はほとんどの場合において、エンドサイトーシスによって細胞に取り込まれることが知られている。エンドサイトーシスは主に、①クラスリン介在性エンドサイトーシス (CME)、②カベオラ依存性エンドサイトーシス、③マクロピノサイトーシス、そして④クラスリ、カベオラ非依存性エンドサイトーシスの四つの経路に分類される。そこで HSPG41C-preS1 ナノカプセルがどのようにして肝由来細胞に取り込まれるか、各経路に対する阻害実験を行った。ここでは、CME に対する阻害剤として Chlorpromazine (CPZ)、カベオラ依存性エンドサイトーシスに対する阻害剤として Filipin III (Filip)、そしてマクロピノサイトーシス阻害剤として Amiloride (Amil) を用いた。poly-L-lysine-coated 48 穴プレートに 50,000 cells/well の HepG2 細胞を播種し、そのまま一昼夜培養した。これに chlorpromazine (10 mg/mL)、Amiloride (500 mM) あるいは Filipin III (10 mg/mL) をそれぞれ添加し、1 時間処理した。その後、84 nM の蛍光ラベル化した

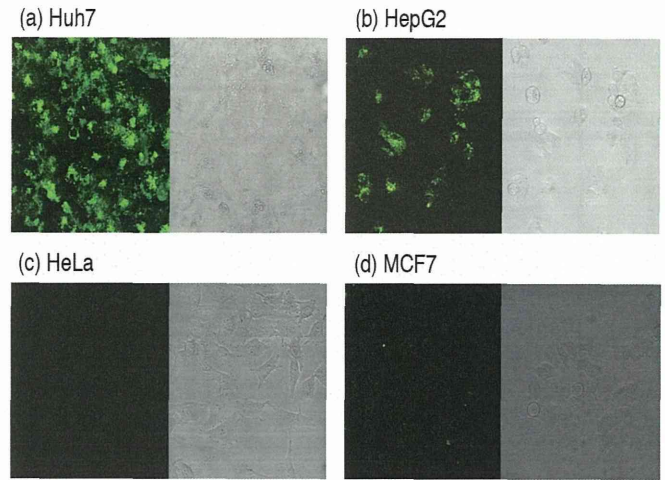


図1 HSPG41C-preS1 ナノカプセルの細胞特異性

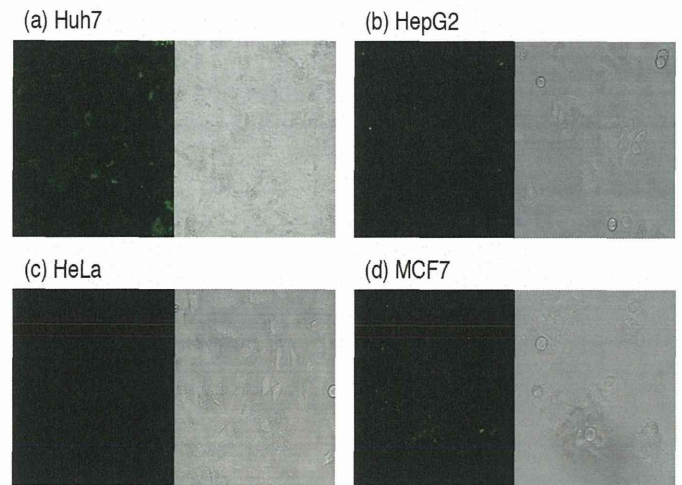


図2 HSPG41C ナノカプセルの細胞特異性

HSPG41C-preS1 ナノカプセルを加え、2 時間培養した。細胞を PBS で十分に洗浄した後、細胞に取り込まれた HSPG41C-preS1 ナノカプセルを蛍光プレートリーダーでカウントした。さらに生存する細胞数を CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay で測定し、細胞一個あたりに取り込まれた HSPG41C-preS1 ナノカプセルを算出した。

この結果、HSPG41C-preS1 ナノカプセルの HepG2 への形質転換は、Amiloride と Filipin III の添加により、それぞれ 5% および 6% とわずかに減少した。一方で Chlorpromazine の添加においては 23% の減少が確認された (図3)。

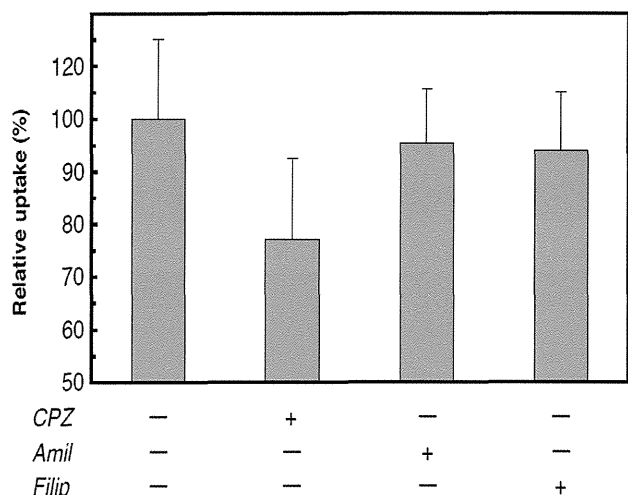


図3 各種阻害剤の添加によるHSPG41Cナノカプセルのエンドサイトーシス機序の解明

次にSPG41C-preS1ナノカプセルの肝由来細胞への形質転換に際して、ナノカプセル外表面に呈示したPreS1ペプチドの関与を調べるために、合成PreS1ペプチドの添加による競合阻害実験を行った。Huh-7、HepG2、そしてHela細胞を96穴プレートに $1 \times 10^4$  cells/wellずつ播種した。10% (v/v) FBSと1%(v/v) antibiotic-antimycotic mixを含むDMEM培地で常法に従って一昼夜培養し、これに終濃度25 $\mu$ Mの合成PreS1ペプチド(PLGFFPDHQ LDPAFGANSNNPDWDFNP)を加えた。3時間後、さらに終濃度1 $\mu$ Mの蛍光ラベル化したHSPG41C-preS1ナノカプセルを添加した。そのまま6時間培養を続けた後、細胞に取り込まれたHSPG41C-preS1ナノカプセルを蛍光プレートリーダーでカウントした。さらに生存する細胞数をCellTiter-Glo® luminescent cell viability assayで測定し、細胞一個あたりに取り込まれたHSPG41C-preS1ナノカプセルを算出した。なお統計的解析はStudent's t検定で行った。

この結果、Huh-7とHepG2の二つの肝由来細胞に関しては、合成PreS1ペプチドの添加によってHSPG41C-preS1ナノカプセルの形質転換が有意に減少した。そのプロファイルは合成PreS1ペプチド濃度

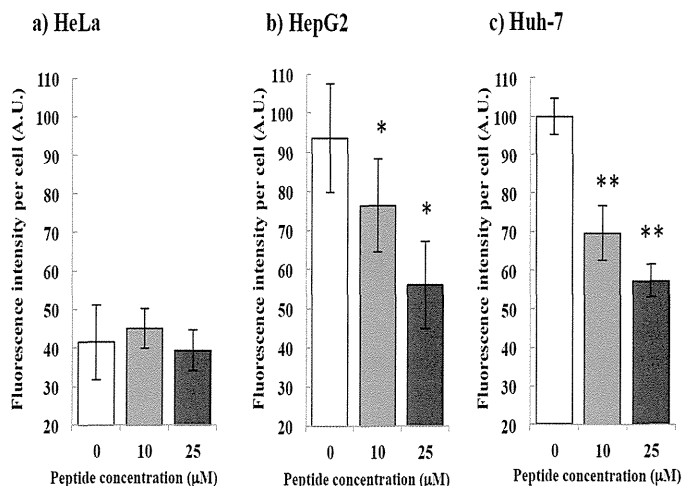


図4 合成PreS1ペプチドの添加によるHSPG41Cナノカプセルの阻害実験

依存的であった。対照的に、Hela細胞への形質転換に際しては有意な影響を与えなかった。

## D. 考 察

HBVに由来する肝細胞特異的ペプチドPreS1をナノカプセル表面に呈示したHSPG41C-preS1ナノカプセルは、ヒト肝由来細胞に対して特異的にトランスフェクションされることが分かった。その機序を各種の阻害実験で調べたところ、クラスリン介在性エンドサイトーシス (CME)経路がもっとも有力であった。この結果は、HSPG41C-preS1ナノカプセルの形質転換が細胞外物質 (リガンド) と細胞膜上の受容体 (レセプター) 間の複合体形成を経たエンドサイトーシスであることを示している。さらに、HSPG41C-preS1ナノカプセルの形質転換が合成PreS1ペプチドによって濃度依存的に阻害されたことを考え合わせると、HSPG41C-preS1ナノカプセルはその外表面に露出したPreS1領域によって肝細胞表面の何らかのレセプターに結合して細胞内へ取り込まれていることになる。HBVのヒト肝細胞への感染機序はいまだ完全に解

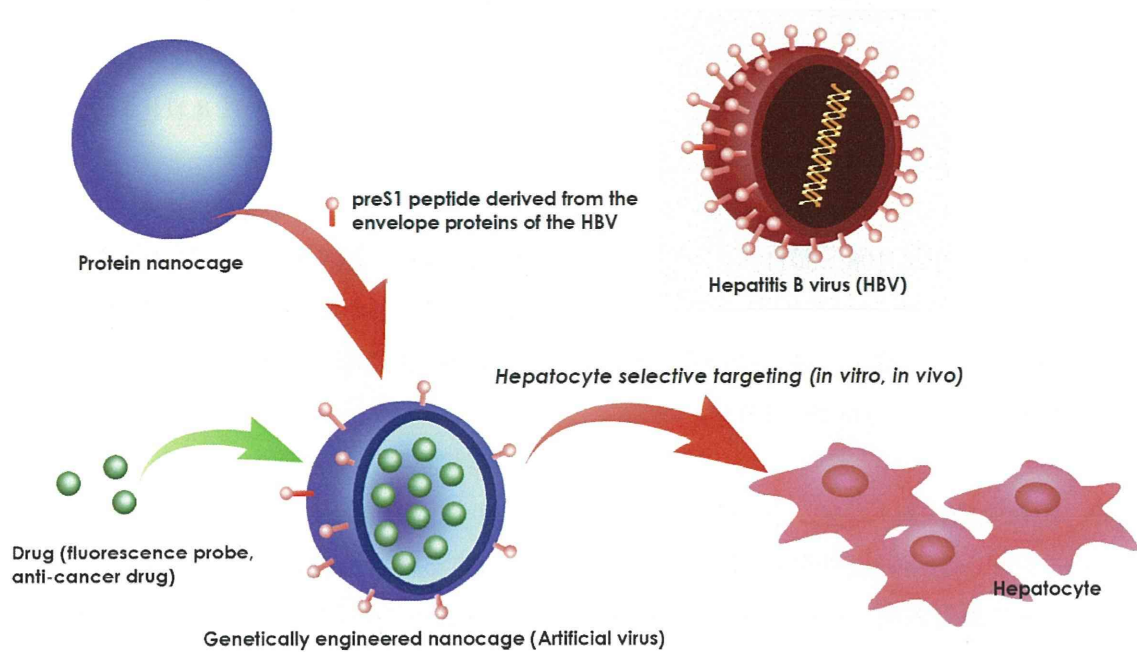


図5 PreS1ペプチドの呈示によるナノカプセルへの肝細胞特異性の付与

明されているわけでは無いが、エンベロープタンパク質のPreS1ドメインN末端領域のペプチド（21-47残基）が極めて重要な役割を演じていることが明らかとなっている。本研究においても、同じアミノ酸配列をカプセル表面に露出させている。この結果、このHSPG41C-preS1ナノカプセルはHBVと同様な肝細胞特異性を獲得した。HSPG41C-preS1ナノカプセルは感染性もなく、熱的にも極めて安定であり、その内部空洞には様々な薬剤を取り込んで輸送することが可能である。我々はこれらの成果を元に肝実質細胞を標的とする分子イメージングや薬物送達（DDS）に応用する予定である（図5）。さらに、今後は*in vivo*での評価に備え、PreS1ペプチドのミリスチル化等によってナノカプセルの肝特異性の向上を図る必要がある。

## E. 結論

ヒトB型肝炎ウイルスに由来する肝細胞特異的ペプチドPreS1をナノカプセル表面に呈示することによって、ナノカプセルにHBVと同様な機序に基づく肝細胞特異性を付与することに成功した。本法は、PreS1ペプチドだけでなく特定の分子や細胞、あるいは臓器に対する標的能のある分子をナノカプセルの表面に呈示することによって、ナノカプセルの指向性を制御できる可能性があることを示唆している。今後は標的化の範囲を拡大し、ナノカプセルの汎用性を確立したい。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Hashizume M, Akahoshi T, Tomikawa M: Management of gastric varices. Journal of Gastroenterology and Hepatology 26(1): 102-108, 2011

2) 富川盛雅, 家入里志, 橋爪 誠: 低侵襲ロボット手術. 臨床と研究 88(4): 19-23, 2011

3) 富川盛雅, 小西晃造, 家入里志, 田上和夫, 橋爪 誠: シュミレーションを用いた外科専門医教育. シュミレーション医学教育入門: 71-77, 編集; 日本医学教育学会教材開発, SP 委員会, 篠原出版新社, 東京, 2011

4) 富川盛雅, 植村宗則, 堤 敬文, 家入里志, 橋爪 誠: 画像ガイド下内視鏡外科手術の現状. 映像情報メディカル 43(6): 474-478, 2011

5) 富川盛雅, 橋爪 誠: 外科医のトレーニングシステム バーチャルリアリティシュミレータを用いた内視鏡外科手術トレーニングシステム. 日本外科学会雑誌 112(4): 255-261, 2011

6) 植村宗則, 田代泰隆, 洪 在成, 小西晃造, 富川盛雅, 松田秀一, 岡崎 賢, 岩本幸英, 橋爪 誠: 関節鏡手術における Augmented Reality 技術を用いた病変可視化システムのためのシステム構築. 日本コンピュータ外科学会誌 13(4): 453-459, 2011

7) 大内田研宙, 家入里志, 剣持 一, 富川盛雅, 橋爪 誠: ロボット手術によるがん治療. 癌と化学療法 39(1): 1-7, 2012

### 2. 学会発表

1) 村田正治, 檜原佐由子, 岡田夕佳里, 田畑栄一, 崔 林, 大内田研宙, 富川盛雅, 橋爪 誠:

分子標的化能を有する新規肝特異的MR I 機能化造影剤の開発. 平成 22 年度日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2011 年 1 月 8 日, 福岡

2) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 家守雄大, 堤敬史, 橋爪 誠, 前原喜彦: 脾臓摘出による肝機能改善効果における検討. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011 年 6 月 3 日, 東京

3) 富川盛雅, 赤星朋比古, 堤 敬史, 長尾吉泰, 神代竜一, 家守雅大, 前原喜彦, 橋爪 誠: 胃静脈瘤に対する外科治療のエビデンス確立に向けた臨床研究の提案. 第 47 回日本肝臓学会総会, 2011 年 6 月 3 日, 東京

4) 植村宗則, 小西晃造, 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠: CFD(数値流体力学)を用いた血管血流シュミレーションにおける feasibility の検討. 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011 年 4 月 29 日, 東京

5) 富川盛雅, 洪 在成, 植村宗則, 小西晃造, 家入里志, 塩谷聡子, 徳永えり子, 前原喜彦, 橋爪 誠: Open MRI を応用した 3 次元バーチャル画像によるリアルタイムナビゲーション下乳腺部分切除術. 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011 年 5 月 1 日, 東京

6) 鄭 載憲, 洪 在成, 豊田和孝, 富川盛雅, 橋爪 誠: 4 自由度マスター装置を用いた針穿刺用遠隔トレーニングシステムの開発. 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011 年 5 月 1 日, 東京

7) 豊田和孝, 鄭 載憲, 村田正治, 家入里志, 大平猛, 富川盛雅, 橋爪 誠: マスタ・スレーブ型 MR 対応内視鏡ロボットの開発. 第 50 回日本生体医工学会大会, 2011 年 5 月 1 日, 東京

8) 富川盛雅, 洪 在成, 赤星朋比古, 大内田研宙, 家入里志, 大平 猛, 橋爪 誠: 消化器・一般外科

領域におけるナビゲーションサージェリーの現状と今後の展望. 第 36 回日本外科系連合学会学術集会, 2011 年 6 月 16 日, 東京

9) 家守雅大, 長尾吉泰, 橋本直隆, 堤 敬, 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠, 前原喜彦:  
肝硬変の支援療法としての NOTES 脾摘の可能性と将来展望. 第 97 回 日本消化器病学会九州支部例会, 第 91 回 日本消化器内視鏡学会九州支部例会  
2011 年 6 月 25 日, 福岡

10) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 橋本直隆, 家守雄大, 橋爪 誠, 前原喜彦: 血小板減少を伴う C 型肝炎/肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後インターフェロン治療についての検討. 第 97 回 日本消化器病学会九州支部例会, 第 91 回 日本消化器内視鏡学会九州支部例会 2011 年 6 月 25 日, 福岡

11) 富川盛雅, 洪 在成, 堤 敬文, 大内田研宙, 赤星朋比古, 家入里志, 大平 猛, 掛地吉弘, 前原喜彦, 橋爪 誠: 医用画像を応用したリアルタイムナビゲーションの有用性-低侵襲治療の適応拡大と安全性向上を目指して-. 第 66 回日本消化器外科学会総会, 2011 年 7 月 13 日, 名古屋

12) 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠: 当科における食道胃静脈瘤における治療の変遷と成績. 第 81 回日本消化器内視鏡学会総会, 2011 年 8 月 18 日, 名古屋

13) 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋本直隆, 長尾吉泰, 家守雄大, 調 憲, 橋爪 誠, 前原喜彦: 腹腔鏡下脾臓摘出術の Latest modern technique. 第 21 回九州内視鏡下外科手術研究会, 2011 年 9 月 3 日, 福岡

14) 宗崎良太, 家入里志, 石井裕之, 富川盛雅, 松岡紀之, 高西淳夫, 橋爪 誠, 田口智章: 小児内視鏡外科手術における客観的技術評価システム開発の

試み-小児内視鏡外科手術の安全性を求めて-. 第 21 回九州内視鏡下外科手術研究会, 2011 年 9 月 3 日, 福岡

15) 長尾吉泰, 赤星朋比古, 家守雅大, 上原英雄, 橋本直隆, 富川盛雅, 橋爪 誠, 前原喜彦: セロトニンを介した脾臓摘出術の硬変肝における肝再生に及ぼす影響. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 15 日, 福岡

16) 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋本直隆, 長尾吉泰, 家守雄大, 橋爪 誠, 前原喜彦: 血小板減少を伴う C 型肝炎・肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後 PEG-IFN+RBV 療法の治療成績についての検討. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 16 日, 福岡

17) 富川盛雅, 川中博文, 金城 直, 赤星朋比古, 橋爪 誠: 易出血性食道胃静脈瘤に対する塩酸プロプラノロールの効果と安全性. 第 18 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2011 年 9 月 16 日, 福岡

18) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 家守雄大, 橋本直隆, 橋爪 誠, 前原喜彦: 血小板減少を伴う C 型肝炎・肝硬変症患者における腹腔鏡下脾臓摘出後インターフェロン治療についての検討. 第 24 回日本内視鏡外科学会総会, 2011 年 12 月 7 日, 大阪

19) Hashizume M, Tomikawa M, Kiguchi K, Konishi K, Ieiri S, Tanoue K, Hong J, Suzuki N: Clinical Application of the Diagnostic and Therapeutic Model Assisted by the Computational Anatomy. The Second International Symposium on Computational Anatomy, March 6, 2011, Nagoya

20) Tomikawa M, Hong J, Akahoshi T, Tsutsumi N, Ohuchida K, Ieiri S, Ohdaira T, Hashizume M: Usefulness of a real-time virtual reality



navigation system using an open magnetic resonance imaging: tumor ablation therapy for 50 liver cancers. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2011) June 23, 2011, Berlin, Germany

21) Chung J, Toyoda K, Hong J, Tomikawa M, Hashizume M: Implementation of a 4-DOF master device with a hybrid structure for a needle insertion task. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2011) June 22-25, 2011, Berlin, Germany

22) Tomikawa M, Maehara Y, Hashizume M: A laparoendoscopic rendezvous in spatium peritonealis on megasplenectomy for cirrhotic patients with slim chance. 第81回日本消化器内視鏡学会総会, 2011年8月19日, 名古屋

23) Tomikawa M, Oda M, Uemura M, Nagao Y, Akahoshi T, Ieiri S, Mori K, Hashizume M: Clinical Application of Image-Based Simulation Systems for Surgery. The 7th Asian Conference on Computer Aided Surgery2011 (ACCAS 2011), August 27, 2011, Bangkok, Thailand

24) Tomikawa M, Akahoshi T, Kinjo N, Nagao Y, Hashimoto N, Uehara H, Maehara Y, Hashizume M: A laparoendoscopic rendezvous in spatium peritonealis on megasplenectomy for cirrhotic patients with slim chance: a feasibility study. International Surgical Week/ ISW 2011, August 29, 2011, Yokohama, Japan

25) Akahoshi T, Maehara Y, Tomikawa M, Hashizume M: Laparoscopic splenectomy in one hundred

HCV-cirrhotic patients with hypersplenism and thrombocytopenia. International Surgical Week/ ISW 2011, August 30, 2011, Yokohama, Japan

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

1) PCT特許「タンパク質ナノカプセルによる薬物輸送システム」を九州大学知財本部および担当弁理士と最終打ち合わせ中

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## Gemcitabine耐性膵癌細胞株の網羅的発現解析による 新規治療標的の探索

研究分担者 大内田研宙（九州大学大学院医学研究院助教）

### 研究要旨

2種のGemcitabine耐性膵癌細胞株を樹立し網羅的発現解析を行い、標的となりうる24のmiRNAを選別した。miR142-5p, miR204が治療抵抗性に関与しており、miR17-5p, miR200c, miR203が予後と相関し、miR21およびmiR155が膵液を用いた癌のbiomarkerとなる可能性を明らかにした。また、miR21の抑制実験で膵癌の遊走、浸潤、増殖のすべてを抑制し、Gemcitabine耐性を減弱する効果を認めた。

### A. 研究目的

他の消化器癌などでの飛躍的な治療法の改善とは対照的に、膵癌はここ30年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫である。その主要な原因の一つとして抗がん剤や放射線に対する治療抵抗性が挙げられる。難治癌である膵癌の治療成績向上のためには、早期診断法の確立と、治療効果予測に基づく的確な個別化治療が重要である。近年、癌の進展に関与するmiRNAが急速に同定されており、マイクロアレイにより膵癌の網羅的miRNA解析が可能となり注目されている。

### B. 研究方法

1) 治療抵抗性膵癌細胞株の樹立とそのmiRNAの網羅的発現解析

Gemcitabine耐性株のmiRNAを対象としたBioarray(Ambion社)を用いて網羅的発現解析を行う。

2) ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)サンプルにおけるmiRNA定量解析

治療効果が判明している膵癌切除組織パラフィン包埋(FFPE)サンプルからRNAを抽出し、リアルタイムPCRによって上記arrayによる網羅的解析により絞り込まれたmiRNAの定量解析を行う。

3) マイクロダイセクションサンプルにおける癌関連miRNA定量解析

マイクロダイセクションで標的細胞のみ収集して治療抵抗性に関与するmiRNA定量解析を行う。

4) miRNA解析による治療効果や予後予測、治療感受性制御治療標的としての可能性

miRNAを対象に、そのinhibitorやprecursorを用いて抑制実験や発現増強実験を行い、その機能や抗癌剤や放射線治療に対する併用効果を検討する。また術前診断に有用な膵液中miRNAの検索を行う。

## C. 研究結果

### 1) 治療抵抗性膵癌細胞株の樹立とその miRNA の網羅的発現解析

Gemcitabine の濃度が 100nM から連続培養をつづけ、600nM にも耐える耐性株を 2 種樹立した。耐性株の miRNA を対象とした Bioarray (Ambion 社) を用いて網羅的発現解析を行い、24 の miRNA が耐性に関与していることが分かった。miRNA142-5p および miRNA204 が Gemcitabine 耐性にもっとも関与していることを突き止めた。(Ohuchida et al, Ann Surg Oncol, 2011)

### 2) ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) サンプルおよびマイクロダイセクションサンプルにおける癌関連 miRNA 定量解析

治療効果が判明している膵癌切除組織パラフィン包埋 (FFPE) サンプルとマイクロダイセクションサンプル得られた RNA をリアルタイム PCR によって上記 array による網羅的解析により絞り込まれた 24 の miRNA の定量解析を行った。その結果、Gemcitabine 投与した群では miRNA142-5p および miRNA204 の発現が高いと生命予後の延長がみられた。(Ohuchida et al, Ann Surg Oncol, 2011) Gemcitabine を投与していない群では差はみられなかった。あるいはその他の臨床病理学的因子に対して有意に影響を与える miRNA17-5p (Ohuchida et al, Ann Surg Oncol, 2011) および miRNA200c) を同定した。また治癒切除群で miRNA203 高発現群は予後が悪いことが分かった。

### 3) miRNA 解析による治療効果や予後予測、治療感受性制御治療標的としての可能性

膵癌細胞株に miRNA21 の precursor を導入すると、膵癌細胞の遊走能、浸潤能、増殖能がすべて上昇し、また FFPE サンプルでも miRNA21 高発現群は予後が悪いことがわかった。逆に膵癌細胞株の miRNA21 を抑制すると遊走能、浸潤能、増殖能をすべて抑制し、ま

た、Gemcitabine 耐性を減弱させる効果があった。膵液と FFPE サンプルにおいてともに miRNA21 ないし miRNA155 が高発現している群では予後が悪く、膵液中の miRNA21 と miRNA155 は予後予測に有用であることが示された。

## D. 考察

microRNA はその配列の長さのため比較的安定的であると考えられ、微量な臨床検体を用いた発現解析に適していると考えられている。膵癌は予後不良ながんであり、新規の診断法、治療法の開発が急務である。microRNA は膵癌においても特有の profiling を有しており、今後の有望な分子生物学的なマーカーになるとともにその多彩な機能は個別化治療のより標的分子になると考えられる。

## E. 結論

最新の分子生物学的手法を用いて、膵癌治療抵抗性に関わる microRNA を profiling して、有望な microRNA を複数選択し、その機能解析を行うことにより、有望な標的分子を同定することは、標的細胞に特異的に作用する DDS の構築の足がかりとなると思われる。本研究の結果は、癌幹細胞、癌細胞、癌間質細胞に特異的に作用する DDS の確立への基盤となる。本研究の成果により、効率的かつ副作用の少ない、新たな治療戦略の開発が期待できる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kenoki Ohuchida\*, Kazuhiro Mizumoto, Tadashi Kayashima, Midori Sato, Hayato Fujita, Taiki Moriyama, Takao Ohtsuka, Junji Ueda, Shunichi Takahata, Makoto Hashizume, and Masao Tanaka  
MicroRNA expression as a predictive marker for gemcitabine response after surgical resection of pancreatic cancer  
Annals of Surgical Oncology, 18(8):2381-7, 2011

### 2. 学会発表

該当なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

## ナノカプセルへの封入を目指したMRI造影剤および 遺伝子診断プローブの開発

研究分担者 井原敏博（熊本大学大学院自然科学研究科教授）

### 研究要旨

タンパク質ナノカプセルの内孔に封入する MRI 造影剤および蛍光プローブの分子設計と合成を行った。市販の MRI 造影剤マグネビストの基本骨格である Diethylene triamine pentaacetic acid (DTPA) をカップリング反応によってマレイミド化し、さらにガドリニウム (Gd) と錯体形成させることに成功した。またナノカプセルと組み合わせることで、細胞内での遺伝子診断を目的とした新規蛍光分子の開発についてもあわせて実施した。

### A. 研究目的

画像診断法の発展は疾病の早期発見とその治療効果の改善にめざましい進歩をもたらした。なかでも MRI (magnetic resonance imaging) は非侵襲・無障害であること、そして軟部組織コントラストが高く、空間分解能に優れていることから臨床医学の現場において重要な位置を占めている。また超音波診断や CT で評価困難な病変の広がりを容易に把握できることや、骨などのアーチファクトが少ないことも MRI の大きな特徴である。

しかし MRI には、病巣検出能は高いものの疾患特異性が低いという欠点があり、ほとんどの場合、単純な形態診断法として使われている。この欠点を補完し、病変部位のコントラストを増強するために使われているのが MRI 造影剤である。既に、肝臓、脾臓、そして骨髄といった網内系に特異的な造影剤が臨床において広く使われており、組織選択性という観点では大きな成果を上げている。しかし現在臨床で使

用されている MRI 造影剤は、癌など特定の疾患に対する特異性は低く、未だ開発途上と言わざるを得ない。MRI を単なる形態診断から機能診断へと発展させるためには、病態の分子医学的情報に応答する新しい機能化造影剤の開発が不可欠である。そこで本研究では、本プロジェクトで開発中の指向性ナノカプセルに内封する新規 MRI 造影剤の分子設計と合成を行った。

さらに、ナノカプセルを組み合わせることで細胞内部での遺伝子診断を実現するため新たな機能性蛍光プローブの設計にも着手した。機能性核酸複合体を利用したこの分子では、様々な機能を持つ人工核酸を構成要素とするボトムアップ型の超構造を合理的に形成させる。さらに、そのプログラミングされた超構造の可逆的刺激性を利用して、その独特の環境でのみ進行する反応を制御する。核酸の構造は、温度、イオン強度、金属イオンなどの様々な外部刺激により可逆的にコントロールすることができる。すなわち、核酸複合体は、その特殊な環境で

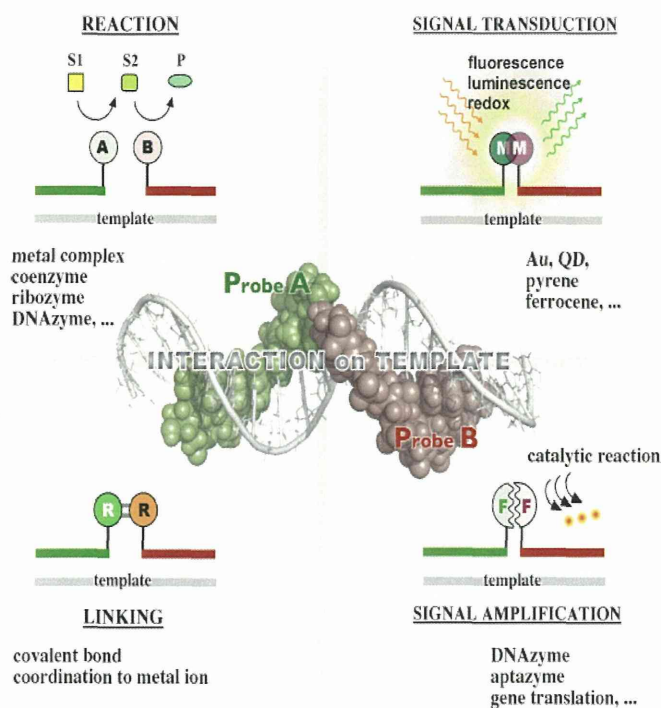


図1 核酸複合体は数Å レベルでの精密なプログラミングが可能な特定の分子間相互作用のためのインターフェース

のみ起こる反応を制御し、ある種の特異的の反応、触媒反応などを可能にするプログラム可能なインターフェース（配位空間）であるとの見方ができる（図1）。核酸は化学的に安定であり、酵素合成はもちろん、その化学合成、化学修飾技術は既に成熟の域に達しており、様々な機能を併せ持つコンジュゲート分子を比較的自由に合成することができる。今年度は、機能性 DNA コンジュゲートを利用して、核酸をターゲット（mRNA、siRNA など）とする2つの蛍光分析法の研究を行った。ターゲット上で協同的に形成する希土類金属錯体の発光、および同様に、ターゲット上で特異的に形成する包接錯体の発光を利用した手法である。

## B. 研究方法

### マレイミド化 Gd-DTPA の合成

また新規 MRI 造影剤は下記の反応式により合成し

た。具体的な操作を下記に示す（図2）。p-NH<sub>2</sub>-Bz-DTPA 30.9 mg (48 μmol)、Sulfo-EMCS 16.5 mg (40 μmol) をそれぞれ、100mM HEPES Buffer (pH 8.5) 0.25 ml に溶解し、室温で 20 時間攪拌した。反応追跡は TLC (ODS, メタノール/水 = 1/1) で行った。マレイミド化 DTPA は ODS カラムクロマトグラフィー（展開溶媒：メタノール/酢酸アンモニウム buffer (pH7.5) = 5/95) によって精製した。さらにこの溶液を 1M HCl にて pH を 5 付近に調製した後、1M GdCl<sub>3</sub> 溶液 48 μl (48 μmol) を加え、室温で 20 時間攪拌して錯体させ目的物マレイミド化 Gd-DTPA を得た。

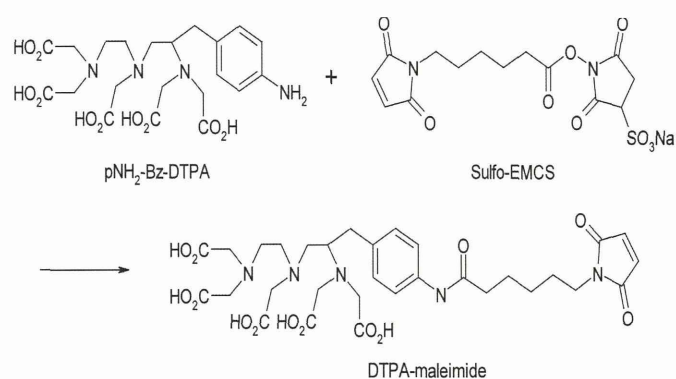


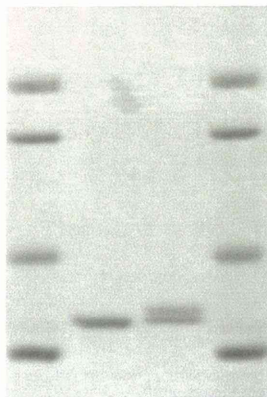
図2 マレイミド化 DTPA の合成法

## C. 研究結果と考察

### ナノカプセル内孔への MRI 造影剤の固定化

hsp16.5-G41C (10 mg, 0.6 μmol) を 500mM HEPES Buffer (pH 7.5) 3.0 ml に溶解し、10 当量のマレイミド化 Gd-DTPA 溶液 (75 μl, 6.0 μmol) を加えて 4°C で 20 時間ゆっくり攪拌して反応させた。その後、この溶液を SDS-PAGE で分析したところ、造影剤を内包したナノカプセルはその分子量が増大していることが確認された（図3）。また ICP-MS によりサンプル中の Gd を定量したところ、Gd-DTPA の修飾率は 14.3% であることがわかった。

M ① ② M



21.5 kDa  
14.4 kDa

図3 ナノカプセルによる造影剤の内包

- ① HSP only 16.5 kDa
- ② HSP-Gd-DTPA 17.4 kDa

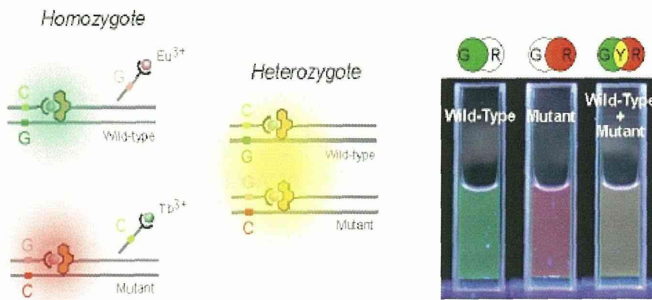


図4 鋳型上での発光性希土類錯体の協同的形成を利用した多色アレリク解析 (左図) 検出原理の模式図  
バイアレリックなサンプルに対しWT プローブはTb<sup>3+</sup> (緑) でMut プローブはEu<sup>3+</sup> (赤) でラベル化し、検出実験に供した。(右図) WT/WT、Mut/Mut、WT/Mut サンプルはそれぞれのプローブで特異的にラベル化され、緑、赤、黄で明るく発色した。

### 希土類錯体の発光を利用した蛍光イメージング

核酸末端に金属配位基を導入したコンジュゲート (プローブ) は適当な金属イオン共存下、テンプレート DNA、または RNA 上でそのシーケンスに依存して多量体を形成する。金属イオンとして発光性の希土類金属 (Ln<sup>3+</sup>) を用い、さらに金属配位基として光増感剤としてはたらき得る適当なものを組み合わせると、特定のシーケンスを有するターゲット (テンプレート) 上でのみ発光性の希土類錯体が選択に

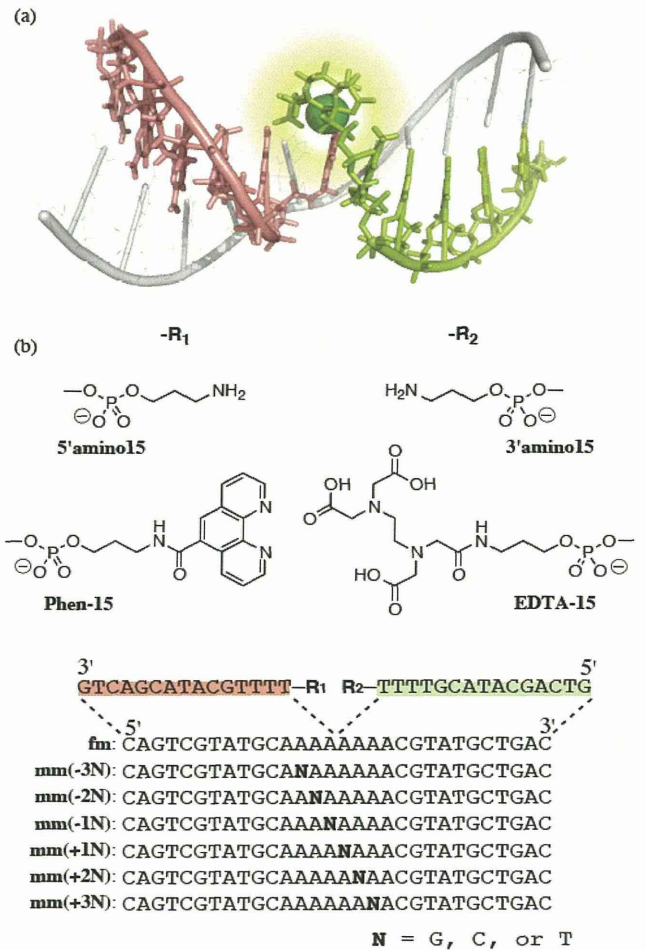


図5 複合体の立体構造と実験に用いたDNA の構造およびシーケンス

形成する。テンプレートがあってはじめて錯体を形成するので、ターゲットが存在するときにしか光らない (B/F 分離不要の) 均一溶液で使用できるプローブである。希土類金属錯体の発光の特徴である長い発光寿命を利用した時間分解発光測定法により、高感度な遺伝子検出が可能になることは既に明らかにされている (図 4)。ミスマッチの有無によるプローブのハイブリダイゼーションの on/off、すなわちプローブがターゲットと形成する二本鎖の熱力学的な安定性の差を利用して高選択的な発光シグナルが得られることは既に判っていたが、今年度は、本手法の生体イメージングへの応用を想定して、より実用的な識別モードの利用の可能性を検討した。すなわち、プローブがターゲットと形成する二本鎖中のミスマッチの与える局所的な構造の乱れが希土類錯

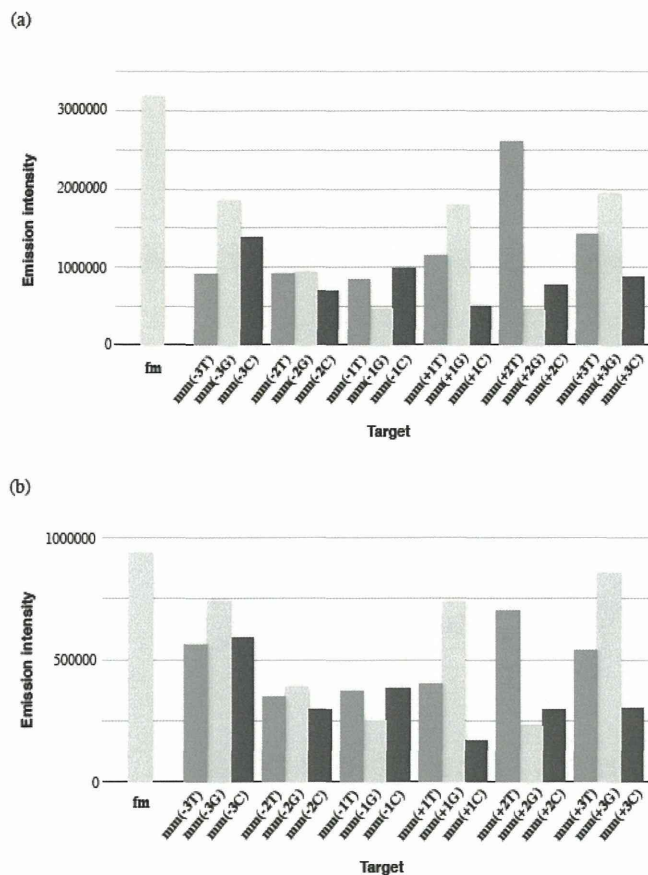
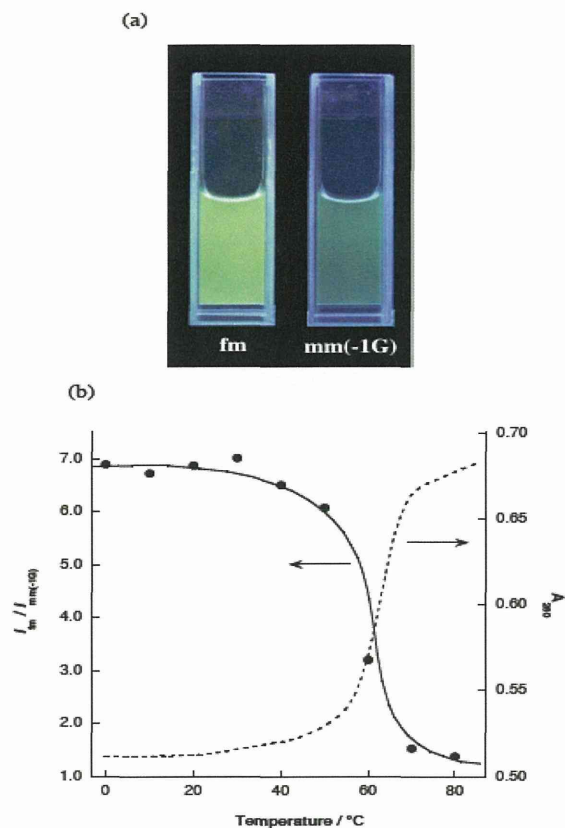


図 6 ターゲットとの複合体の発光強度 (a) Tb<sup>3+</sup>、および (b) Eu<sup>3+</sup>存在下における発光強度を時間分解計測法によりプレートリーダーで測定した

体の発光に与える影響について系統的に検討した。実験には、すでに Eu<sup>3+</sup>、Tb<sup>3+</sup>と錯体を形成し、非常に強い発光を示すことが判っている EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) と Phen (1,10-Phenanthroline) を末端に導入した一組の 15 量体の DNA コンジュゲート (それぞれ、EDTA-ODN と Phen-ODN) をプローブとして使用した。これら 2つのプローブはターゲットにタンデムに結合し、両配位子が向かい合っ、Eu<sup>3+</sup>や Tb<sup>3+</sup>を収容するミクロ環境を与える。30 量体のターゲットの中心部、すなわち両プローブが会合して形成する Ln<sup>3+</sup>錯体周辺には、ミスマッチ塩基を系統的に導入した一連のものを使用した (図 5)。フルマッチ、および 18 種類のみスマッチターゲットを EDTA-ODN と Phen-ODN でラベル化し、Eu<sup>3+</sup>または Tb<sup>3+</sup>存在下、発光強度を測

図7 (a) fm およびmm (-1G)のTb<sup>3+</sup>系での発光強度のイメージ (b) 発光強度比 ( $I_{fm}/I_{mm(-1G)}$ ) の温度依存性と複合体の融解曲線



定した結果、ミスマッチ導入により有意に発光強度が減少していることがわかった。両プローブは 15 量体と比較的長いので、ミスマッチの有無、位置、種類によらず融解温度 ( $T_m$ ) は全て 60 °C 前後である。つまり、発光測定実験を行った室温付近では、全てのプローブがターゲットと安定な二本鎖を形成している。したがって、実験結果は、Ln<sup>3+</sup>錯体周辺の二本鎖の局所構造の乱れが錯体構造に影響を与え、その結果として発光が抑制されたことを示している。発光強度は、概ねミスマッチが錯体部位に近いほどより減少していることがわかった。これは、近傍の二本鎖構造の乱れが錯体構造により大きく影響するという合理的な結果である (図 6)。

同様の発光測定を 0 °C から 80 °C まで 10 °C 間隔で行い、フルマッチに対するシグナル強度比をそ



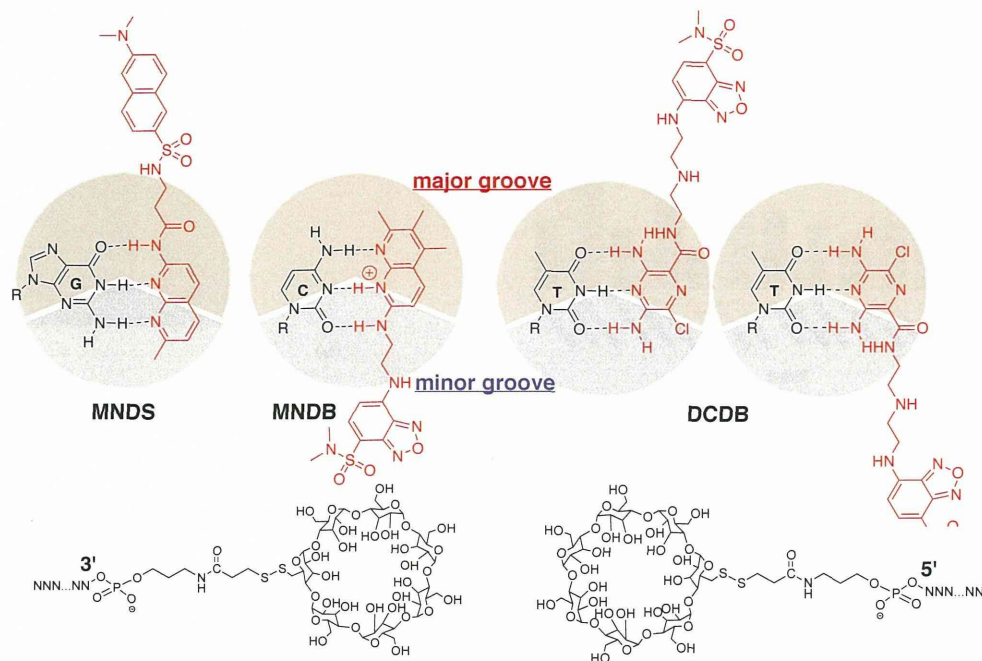


図 8 蛍光性リガンドとその核酸塩基との結合、および CyD-ODN の構造

それぞれの温度で測定した結果を、典型的な融解曲線と併せて図 7 に示す。シグナル強度そのものは測定温度上昇に伴って減少するが、それはおもに  $\text{Ln}^{3+}$  錯体の発光そのものの性質によるものであり、フルマツチとの比をとると広い温度範囲で一定値を示していることがわかる。すなわち、本法はプローブ結合の熱力学的安定性の差でなく、二本鎖の局所構造の乱れを利用するために、基本的に  $T_m$  以下でありさえすれば、一塩基の違いを検知することができる。この特長は、DNA アレイ、細胞内イメージングなど、多くのターゲットを対象とする分析において非常に有効である。

### 包接錯体の発光を利用した蛍光イメージング

シクロデキストリンやシクロファンは長い間、超分子化学の主役であり、それら包摂型ホストと様々なゲスト分子との相互作用が詳細に研究されている。これらの研究においては、ゲスト分子が、包摂分子との相互作用により、その分光学的、あるいは電気化学的な性質（シグナル）等を変化させることが利用されてきた。DNA を反応場として利用すれば、反

応系を正確にデザインし、相互作用を制御することが可能である。そこで、我々は  $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -CyD) やシクロファンを修飾した DNA を化学合成した。以下、 $\beta$ -CyD 修飾 DNA (CyD-ODN) と塩基識別能を有する蛍光性小分子 (MNDS、MNDB、および DCDB) (図 8) とを組み合わせた SNP 識別の検討を行った。

CyD-ODN は、 $\beta$ -CyD を DNA の 5'-、または 3'-末端に修飾した 2 種類のを合成した。MNDS と MNDB はナフチリジン (AcMND) と環境応答性の蛍光色素であるダンシルおよび DBD を連結した分子であり、それぞれ、二本鎖ギャップに提示されたグアニン (G)、およびシトシン (C) に結合すると、蛍光色素部位を、メジャーグループと、マイナーグループに突き出す。DCDB はジアミノピラジンと DBD 連結化合物であり、チミン (T)、またはウラシル (U) に結合して、DBD 部位をどちらのグループにも突き出すことができる。DNA 上でこれらの蛍光性リガンドが特定の塩基を認識して光る仕組みを以下のように設計した。コンジュゲート CyD-ODN と短い化学合成 DNA である mask はターゲット DNA に相補的であり、

ターゲット上の SNP 塩基を挟んでその両側にタンデムにハイブリダイズするように設計されている。すなわち、CyD-ODN/target/mask のタンデム二本鎖には CyD-ODN と mask の間に SNP 塩基が提示された一塩基ギャップがあり、ギャップに臨む 5'-または 3'-末端のいずれかに  $\beta$ -CyD が配置した構造となっている。この系に上記蛍光性リガンドが添加され、タンデム二本鎖のギャップ部位に対応する塩基を見つけるとそこに塩基認識部位を挿入し結合する。同時に分子内の蛍光性部位はすぐ近くに存在する  $\beta$ -CyD に包接されて疎水環境に入り、発光することを期待している (図 9)。

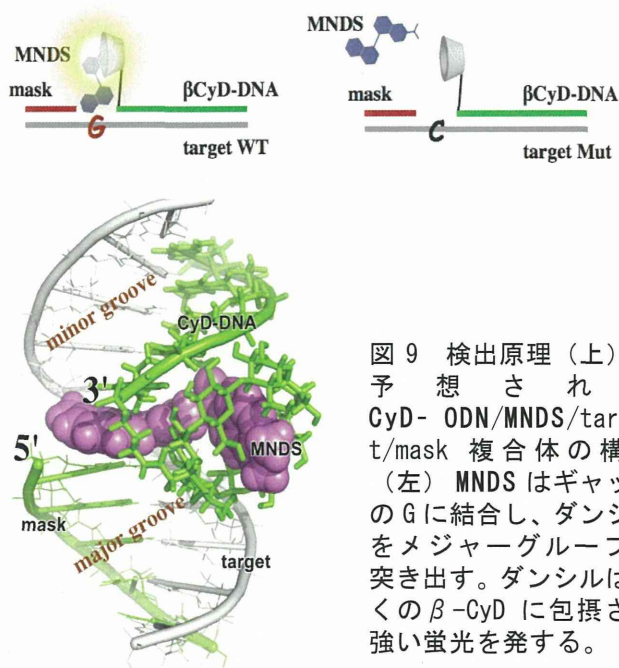


図 9 検出原理 (上) と予想される CyD-ODN/MNDS/target/mask 複合体の構造 (左) MNDS はギャップの G に結合し、ダンシルをメジャーグループに突き出す。ダンシルは近くの  $\beta$ -CyD に包接され強い蛍光を発する。

3' 修飾 CyD-ODN を用いた系では期待したとおり提示塩基が G の場合のみダンシル基の蛍光が僅かなブルーシフトを伴いながら大きく増大した。一方、5' 修飾 CyD-ODN を用いた場合には G 特異的なシグナル変化は観察されなかった。MNDS は G と対を形成した際にはそのダンシル部位を DNA のメジャーグループ側に突き出す。一方、水素結合二本の結合が許されれば、他の塩基と結合できるが、そのためには MNDS は裏返る必要があり、そうなるダンシルはマイナーグループ側に位置することになる。二本鎖 DNA の立体構造を考慮すると、5' 末端に比べ、3' 末端は

その間のギャップのメジャーグループに近い。そのために、ギャップの G と結合した MNDS のダンシルは 3' 末端に修飾された  $\beta$ -CyD とは相互作用できるが、5' 末端に導入された  $\beta$ -CyD との距離が遠く、相互作用し難いと考えられる。実際に、蛍光滴定実験の結果、両系の結合定数はそれぞれ、 $2.4 \times 10^5$ 、 $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$  と算出された。MNDB、および DCDB を用いて同様の実験を行うことで、上記仮説を検証することができた。すなわち、C を認識して、蛍光発色団をマイナーグループに突き出す MNDB は期待したとおり C に応答して光ったが、この場合は、MNDS と逆で 3' 修飾 CyD-ODN でなく 5' 修飾 CyD-ODN と併用する必要があった。一方、DCDB は T で強く発光したが、3' 修飾 CyD-ODN および 5' 修飾 CyD-ODN のいずれのコンジュゲートも有効であった。

さらに、本法の mRNA や siRNA への適用を想定して、ターゲット分子として RNA を用いた系についても検討した。DNA/RNA 二本鎖は DNA/DNA (B 型) と異なる A 型の二本鎖構造を形成することが知られている。B 型と比較すると、A 型構造のメジャーグループは非常に狭くて深く、一方、マイナーグループは広くて浅い。このため、DNA ターゲットに関して得られていた選択性は再現されない可能性がある。実際、メジャーグループに蛍光部位を突き出す MNDS はいずれの CyD-ODN とも有効なシグナルを発することはなかったが、MNDB は両方の CyD-ODN と協調して C を検出することができることがわかった。分子シミュレーションの結果、狭くて深いメジャーグループに突き出した MNDS のダンシル周辺には、もはや空間が残されておらず、 $\beta$ -CyD と接触不能であることが示唆された。一方、マイナーグループに突き出した MNDB の DBD は、グループが浅いため、ほぼ溶液中に飛び出したかたちになり、 $\beta$ -CyD が 5' と 3' の両側からアクセス可能になったと考えられる。

蛍光シグナル変化の温度依存性を MNDS の系に関して検討した。結果を図 8 に示す。本法におけるターゲットの識別は、従来型のプローブのように mismatches の有無に基づく二本鎖の熱安定性のわずかな

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) T. Ihara, Y. Kitamura, Y. Tsujimura, A. Jyo, “DNA Analysis Based on the Local Structural Disruption on the Duplexes Carrying a Luminous Lanthanide Complex”, *Anal. Sci.*, **27**, 585-590 (2011). **Hot article & Front cover**
- 2) Md. R. Awual, A. Jyo, T. Ihara, N. Seko, M. Tamada, K. T. Lim, “Enhanced Trace Phosphate Removal from Water by Zirconium(IV) Loaded Fibrous Adsorbent”, *Water Res.*, **45**, 4592-4600 (2011).
- 3) T. Ihara, T. Wasano, R. Nakatake, P. Arslan, A. Futamura, A. Jyo, “Electrochemical Signal Modulation in Homogeneous Solutions Using the Formation of an Inclusion Complex between Ferrocene and  $\beta$ -cyclodextrin on DNA Scaffold”, *Chem. Commun.*, 12388-12390 (2011).
- 4) 井原敏博 (共同執筆), “核酸とカチオンの特異な相互作用”, CSJ カレントレビュー 核酸化学のニュートレンド, 化学同人 (2011).

### 2. 学会発表

- 1) 井原敏博, “機能性核酸複合体のプログラミングと分析化学的应用”, 中央大学理工学研究科学術講演会, 2011年7月, 東京
- 2) T. Ihara, “Rational regulation of nucleic acid structures by specific formation of metal complexes”, The 14th Asian Chemical Congress, 2011年9月, Bangkok

差に依拠するのではなく、特定の塩基のみを提示する枠組みの中での蛍光性リガンドのデジタル的な認識を利用している。すなわち、ギャップに提示されている塩基が何であれ、完全相補鎖からなるタンデム二本鎖を形成させ、生じた反応場（ギャップ）での認識を利用する。したがって、基本的に二本鎖が形成してさえいれば ( $T_m$  以下でありさえすれば) 塩基を識別することができるため、計測の際に厳密に温度をコントロールする必要がない。

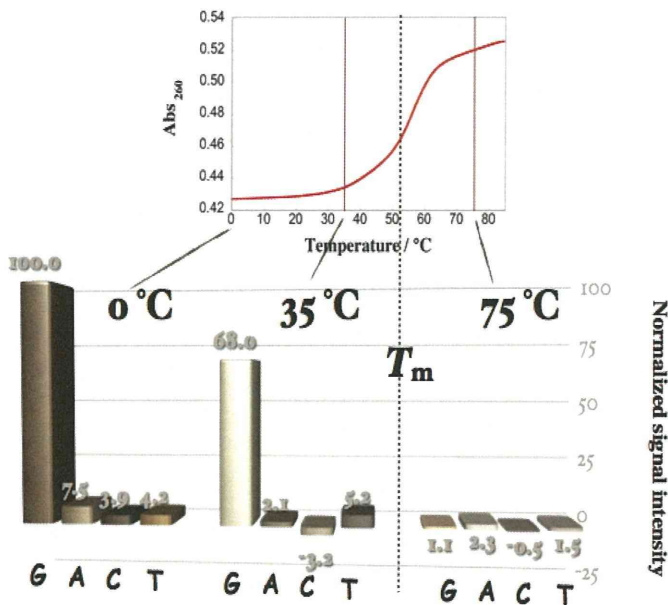


図 10 MNDS の蛍光応答の温度依存性

蛍光シグナルの温度依存性は低い。 $T_m$  以下の広い温度範囲で測定可能

## E. 結 論

ナノカプセルに封入可能な二つの分子を合成した。マレイミド化Gd-DTPAはナノカプセルの内孔に化学的にコンジュゲートすることが可能であり、来年度以降に緩和度等の基本特性を評価する予定である。一方の機能性核酸複合体は将来的に細胞内での遺伝子診断を実施する上で、多数の貴重な知見が得られた。今後は分子設計の最適化とナノカプセルとの複合化について検討したい。

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

該当なし

### 2. 実用新案登録

該当なし

### 3. その他

該当なし

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表