

Figure 22. Anti-tumor activity and anti-metastatic activity of ADR on 4T1 cells 4T1 cells (1×10^5 cells) were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and ADR was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. Tumor volume (A) were monitored. On day 35, the mice were sacrificed, their lungs were stained with India ink, and the number of spontaneous metastases were determined (B). Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

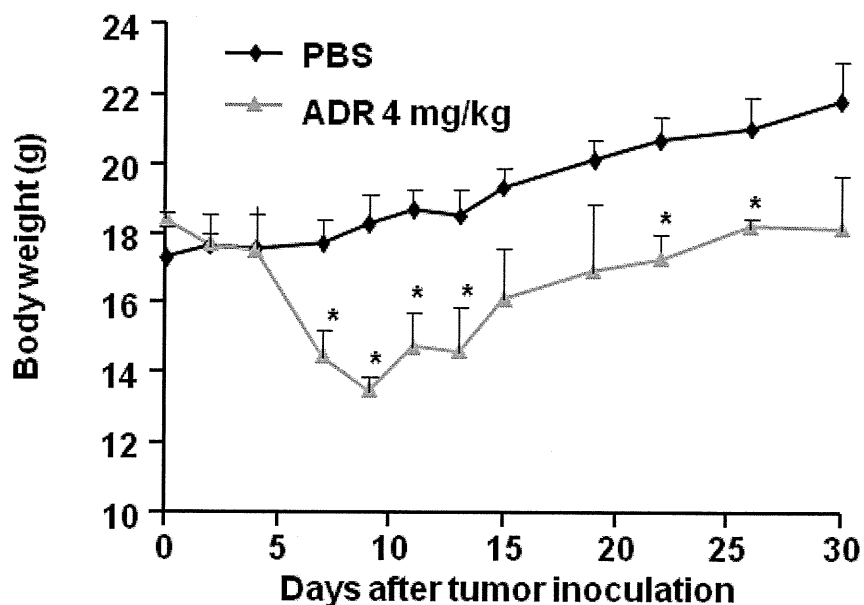


Figure 23. Monitoring of side effect of ADR on mice inoculated with 4T1 cells
 4T1 cells (1×10^5 cells) were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and ADR was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. Body weight were monitored. Data are shown as means \pm SD (n=5).
 *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

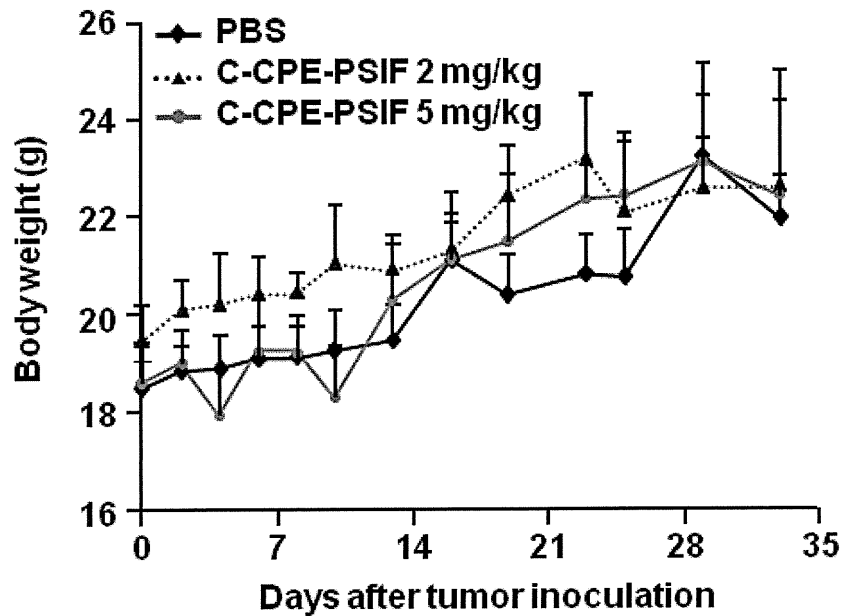


Figure 24. Monitoring of side effect of C-CPE-PSIF on mice inoculated with 4T1 cells
 4T1 cells (1×10^5 cells) were intradermally inoculated into the right flanks of mice, and C-CPE-PSIF was intravenously injected three times or two times a week at the indicated dose, respectively. Body weight were monitored. Data are shown as means \pm SD (n=5). *Significantly different from the vehicle-treated group ($p < 0.01$).

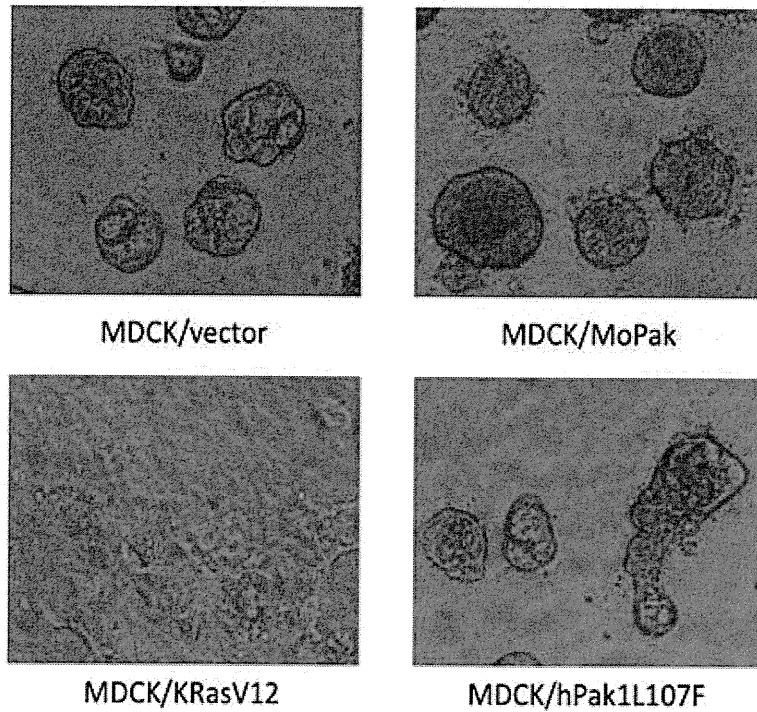


Figure 25. *In vitro* tissue structures of MDCK cells expressed various oncogenes in 3D culture.

MoPak, hPak1L107F and KRasV12 were transfected in MDCK cells, and the effects on the morphogenesis of the cells in matrigel were observed under microscopy after 14 days in 3D culture.

Table 1 Competitive inhibition of C-CPE-PSIF-induced lactate dehydrogenase release by mutant C-CPEs.

C-CPE mutants	Inhibitory ratio (% of C-CPE)
C-CPE	100
S304A	125.6 ± 0.7
S305A	126.8 ± 0.2
Y306A	63.8 ± 0.4
S307A	123.6 ± 2.2
G308A	99.1 ± 2.7
N309A	125.6 ± 1.8
Y310A	72.2 ± 2.3
P311A	114.9 ± 0.5
Y312A	73.1 ± 2.4
S313A	132.9 ± 0.8
I314A	94.3 ± 3.1
L315A	69.1 ± 2.7
Q317A	96.8 ± 1.6
K318A	126.2 ± 2.1
F319A	111.5 ± 3.9

After a 1 h treatment with C-CPE or C-CPE mutants at 5 µg/ml, claudin-4-expressing L cells were treated with C-CPE-PSIF as a claudin-4-directed toxin (0.2 µg/ml) for 36 h, and the release of lactate dehydrogenase (LDH) was determined. The results are shown as the percent of C-CPE-induced LDH release, and the values are the means ± SD (n=4).

Table 2 Effects of mutant C-CPEs on TJ barrier in Caco-2 cells.

C-CPE mutants	Decreased ratio of TEER (% of C-CPE)
C-CPE	100
S304A	100.3 ± 0.5
S305A	100.1 ± 2.3
Y306A	64.1 ± 4.3
S307A	100.4 ± 1.8
G308A	98.1 ± 0.2
N309A	104.4 ± 1.3
Y310A	93.8 ± 1.2
P311A	101.4 ± 2.3
Y312A	100.1 ± 1.5
S313A	104.6 ± 0.8
I314A	98.3 ± 1.4
L315A	45.1 ± 5.3
Q317A	98.8 ± 1.3
K318A	99.3 ± 0.8
F319A	103.5 ± 0.9

Caco-2 cells were seeded on a Transwell™. After development of the TJ barrier in Caco-2 cells, C-CPE or C-CPE mutants was added at 20 µg/ml, and transepithelial electric resistance (TEER) was calculated from the following equation: $100 \times (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment of the cells with each mutant C-CPE}) / (\text{difference in TEER between 0 and 18 h after treatment with C-CPE})$. The values are the means ± SD (n=4).

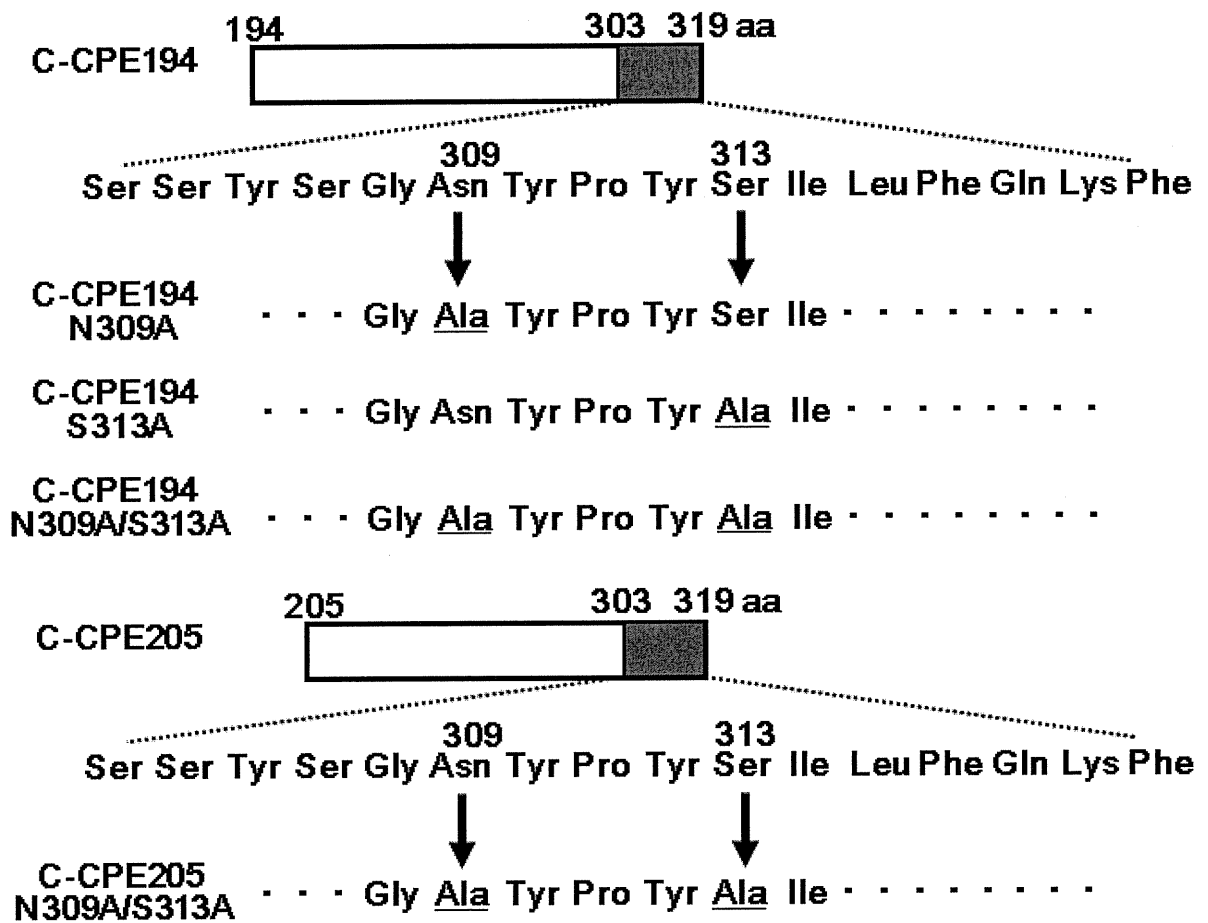


Figure 26. Schematic illustration of C-CPE mutants

The C-terminal 16 amino acid fragment contains claudin-4-binding domains. A site-directed mutagenesis analysis of the C-terminal domain revealed that alanine substitution with Asn at position 309 or Ser at position 313 increased its binding to claudin-4. C-CPE194 and C-CPE205 are the C-terminal fragments of CPE corresponding to amino acids 194-319 and 205-319, respectively.

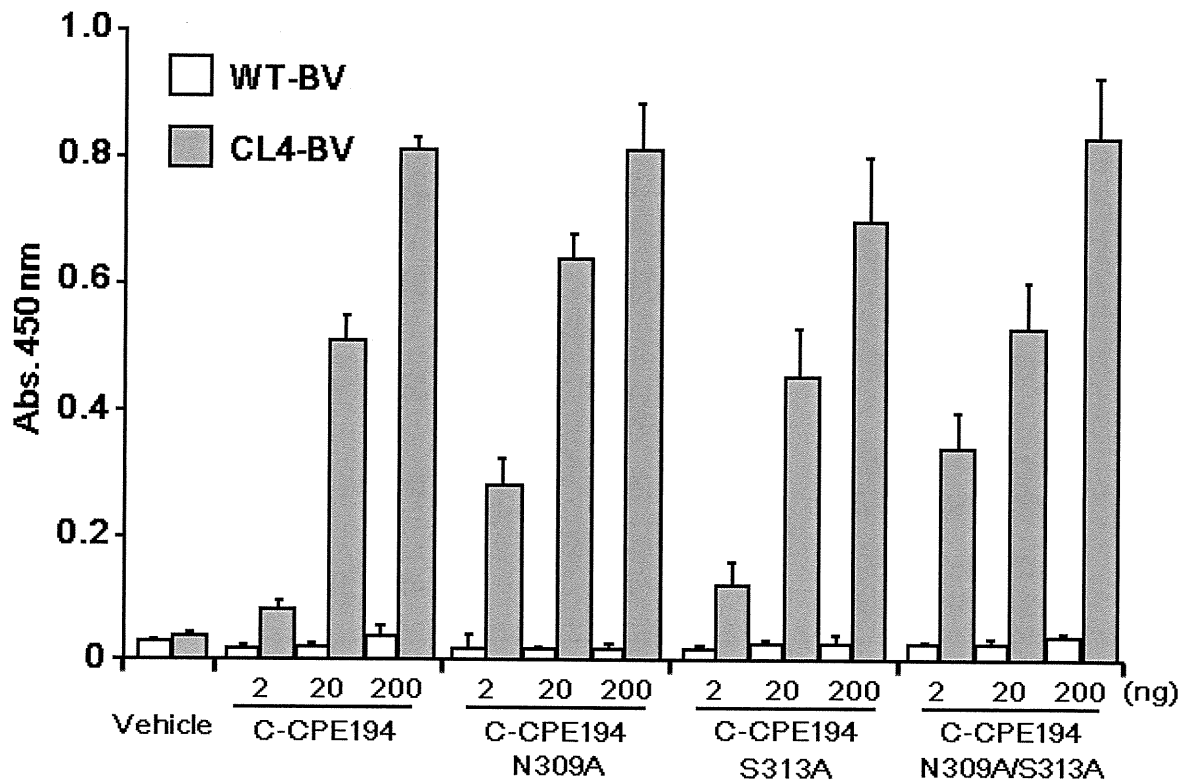


Figure 27. Interaction of C-CPE mutants with claudin-4

Vehicle or C-CPE mutants were added to the wells of immunoplates coated with wild-type BV (WT-BV) or claudin-4-displaying BV (CL4-BV). After 2 h of incubation, anti-tag antibody, which recognized C-CPE mutants, was added to the wells, and then the C-CPE mutant-bound BV was detected by the addition of the horseradish peroxidase-labeled antibody. The data are means \pm SD (n=4).

Table 3. Binding kinetics of C-CPE mutants to claudin-4

Derivatives	ka (1/Ms)	kd (1/s)	K_D
C-CPE194	7.13 × 10⁵	3.24 × 10⁻⁴	455 pM
C-CPE194 N309A	6.50 × 10⁵	2.93 × 10⁻⁴	451 pM
C-CPE194 S313A	5.59 × 10⁵	6.53 × 10⁻⁵	117 pM
C-CPE194 N309A/S313A	6.67 × 10⁵	3.05 × 10⁻⁵	46 pM
C-CPE205 N309A/S313A	7.55 × 10⁵	1.45 × 10⁻⁵	19 pM

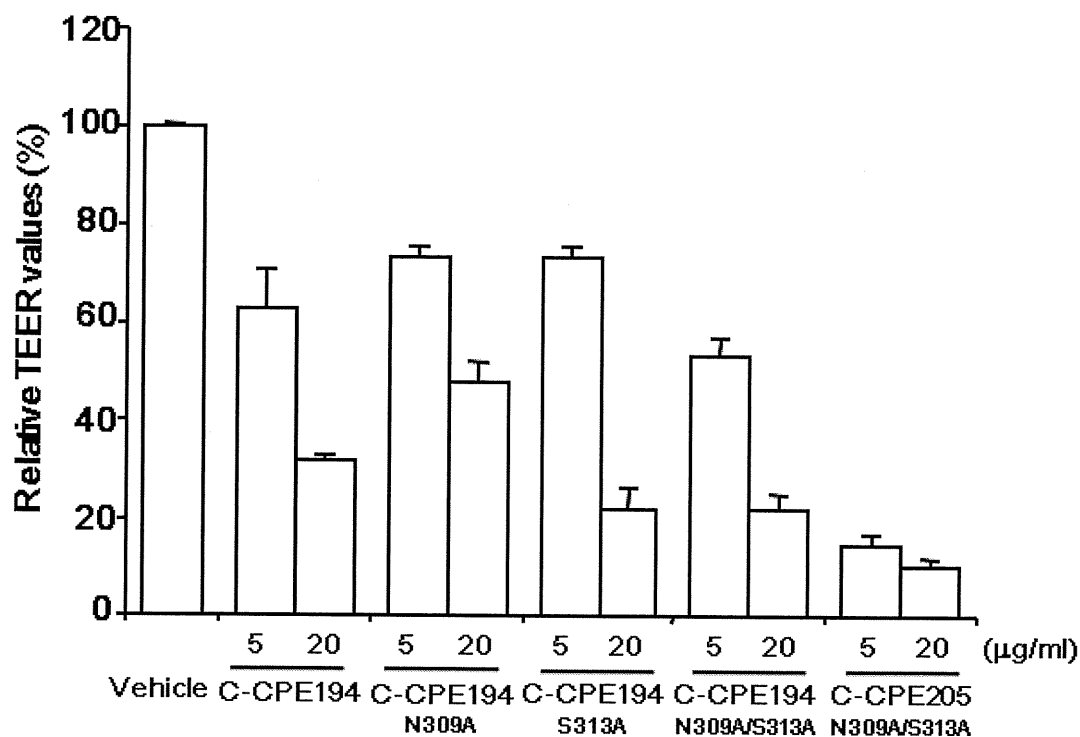


Figure 28. Effect of C-CPE mutants on TJ-integrity

Caco-2 cells were cultured on Transwell™ inserts. When TEER values reached a plateau, the cells were treated with C-CPE or C-CPE mutants at 0, 5 or 20 µg/ml. After 18 h of C-CPE mutant treatment, the TEER values were monitored. The results were calculated as the percent of the TEER values to that of the vehicle-treated group. The data are means ± SD (n=4).

Table 4. Claudin-1-binding phages

C-CPE	304	305	307	309	313	318
	S	S	S	N	S	K
m 5	R	A	P	R	H	N
m 9	R	R	R	R	R	K
m 10	R	S	A	R	K	K
m 11	R	V	R	R	R	K
m 17	L	P	R	R	K	Q
m 19	A	P	R	H	H	K
m 21	A	P	R	D	R	K
m 24	R	R	Q	Q	R	K
m 36	R	P	R	R	H	K
m 37	R	P	R	F	H	Q
m 86	Y	P	R	R	H	K
m 89	A	P	R	A	R	T

The sequences of C-CPE mutant in the claudin-1-binding phages were analyzed.

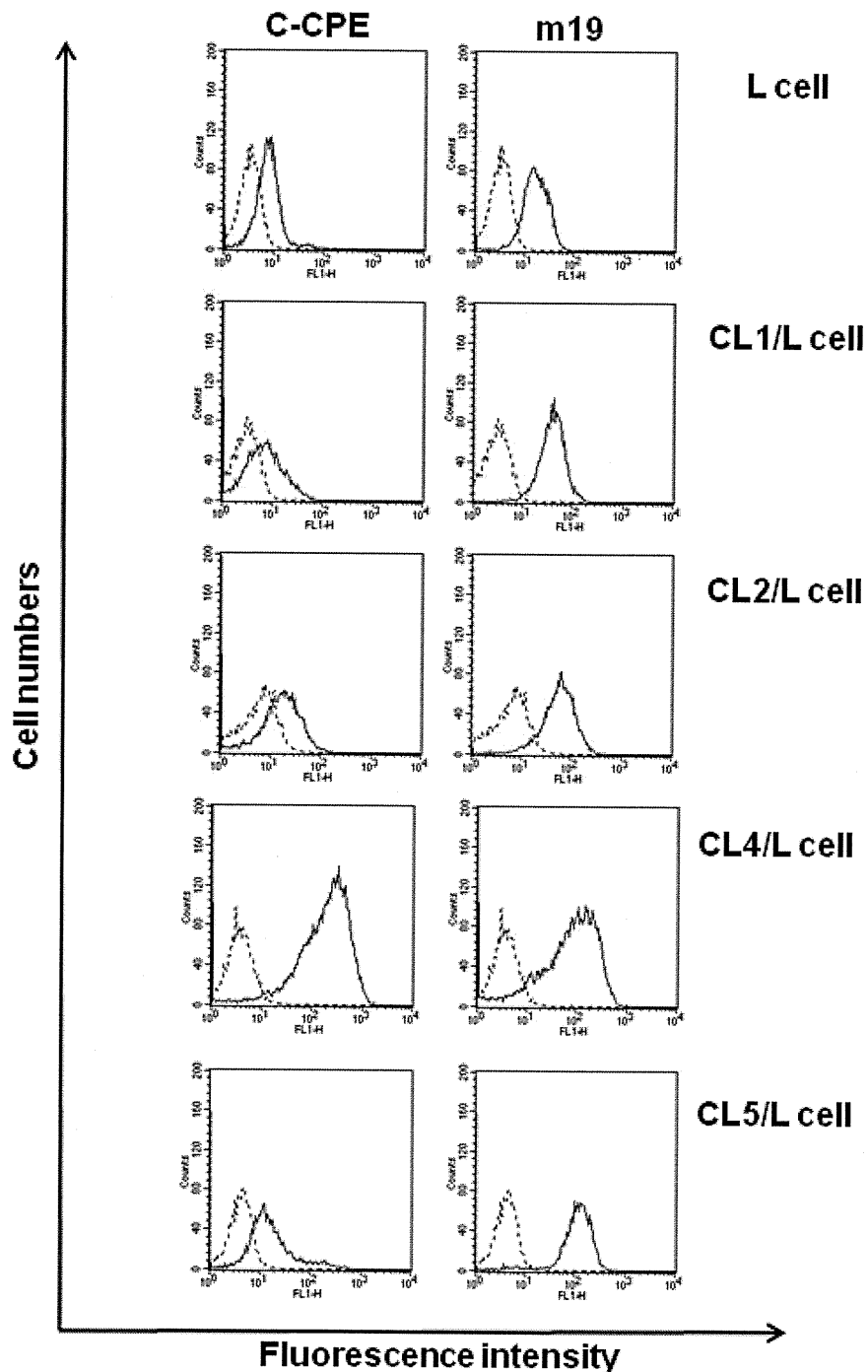


Figure 29. FACS analysis of the interaction between m19 and CLs-cells

CLs-L cells were treated with C-CPE or m19. The bound C-CPE or m19 was detected by labeled secondary antibodies. Lined histograms indicate the level of reactivity of C-CPE or m19; dotted lined histograms indicate background binding level of anti-his tag and FITC-labeled antibodies without C-CPE or m19. The binding cells were detected by FACS.

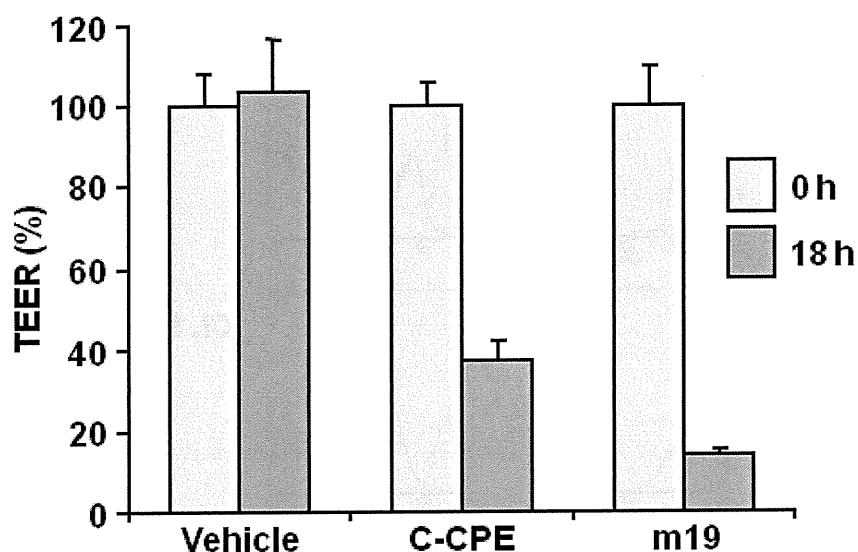


Figure 30. Effect of m19 on TJ-integrity in Caco-2 monolayer cell sheets

Caco-2 cells were seeded in BD BioCoat™ Fibrillar Collagen Cell Culture Inserts (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) at a subconfluent density. The TEER of the Caco-2 monolayer cell sheets on the chamber was monitored with a Millicell-ERS epithelial volt-ohmmeter (Millipore, Billerica, MA). The Caco-2 monolayers were cultured for 5 days, and then treated with C-CPE or m19 on the basal side of the insert. The cells were exposed to the C-CPEs for 18 h. Changes in TEER values were monitored during the C-CPE treatment. Relative TEER values were calculated as the ratio of TEER values at 0 h. The TEER values were normalized by the area of the Caco-2 monolayer, and the TEER value of a blank Transwell™ chamber (background) was subtracted. Data are presented as means \pm SD (n=3).

Claudin binder 修飾リポソームの創製に関する研究

分担研究者 鈴木 亮 帝京大学薬学部 講師

研究要旨

Claudin-4 (CL-4) に対する親和性を有するペプチド (C-CPE) を修飾したリポソームを創製した。このリポソームは、CL-4 発現細胞に特異的に結合することが明らかとなった。また、CL-4 結合ペプチド (C-CPE) の改変で CL-4 への親和性が高められた新規ペプチド (C-CPE22) についてもリポソームに修飾し、CL-4 発現細胞へのリポソームの結合性を評価した。その結果、本リポソームの CL-4 発現細胞への結合性は C-CPE04 修飾リポソームと同等であった。また、C-CPE22 修飾抗がん剤封入リポソームのがん細胞傷害性を評価したところ、CL-4 発現がん細胞に対してコントロールペプチド修飾リポソームより C-CPE22 修飾リポソームの方が細胞傷害性が高い傾向にあることが示された。

C. 研究目的

正常上皮細胞は水平方向に細胞分裂し、一定の細胞密度に達すると密着結合 (TJ) により接触阻害機構が作動し、細胞分裂を停止する。一方、上皮細胞の癌化超早期では、分裂軸が水平方向から垂直方向に回転し、TJ による接触阻害機構が利かなくなり、無秩序な細胞増殖を繰り返すようになる。このように、癌化した上皮細胞は分裂軸の回転に伴い、claudin (CL) が細胞表面に露出した状態となる。そのため、この露出した CL を標的とすることで上皮癌の早期診断・治療が可能になると考えられる。

これまでに、当該研究代表者の近藤は、膵臓癌、卵巣癌、大腸癌、膀胱癌、舌癌に高発現している CL-4 に対し特異的に結合するポリペプチド (C-CPE) を見出した。また、本研究にて Claudin-4 (CL-4) 結合ペプチド (C-CPE) の改変で CL-4 への親和性が高められた新規ペプチド (C-CPE22) が見出された。この C-CPE や C-CPE22 と薬物キャリアとして期待されているリポソームを組み合わせることで、上記の上皮癌に対する早期診断・治療薬の開発につながると期待される。そこで本研究では、C-CPE 修飾リポソーム (図1) を調製し、CL-4 発現細胞への結合性について評価した。

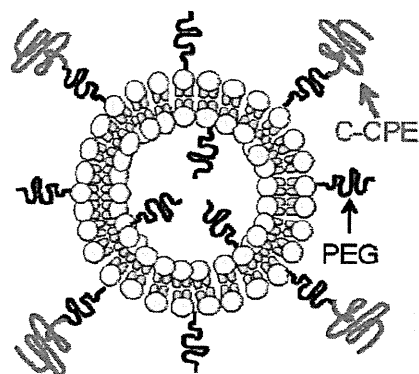


図1 C-CPE 修飾リポソームの模式図

D. 研究方法

1. C-CPE について

本実験ではアミノ酸配列の異なる 3 種類の C-CPE を使用した。なお、C-CPE14 は CL-4 に結合性を示さないコントロールペプチドである。また、C-CPE04 および C-CPE22 は、CL-4 に特異的に結合するペプチドで、C-CPE22 は C-CPE04 に比べ約 20 倍高い CL-4 親和性を有するペプチドである。

2. 各種 C-CPE 修飾リポソームの調製方法

Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylcholine (POPC):
Cholesterol : Distearoylphosphatidylethanolamine
-polyethylenglycol (Mw: 2,000) (DSPE-PEG(2k)) :
DSPE-PEG(2k)-N-hydroxysuccinimide (NHS) =
63:31:3:3(モル比) の脂質 76.2 mg をエタノール
0.8 mL に溶解し、NBD で蛍光ラベルした
Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (NBD-PE)
を上記脂質の 1%(モル比)となるように添加した。
この脂質エタノール溶液を 8 mL のリン酸緩衝液
(pH7.4) にポルテックスミキサーによる攪拌下で注
入しリポソームを作製した。このリポソームに
C-CPE : DSPE-PEG(2k)-NHS = 1 : 200, 400 また
は 800 となるように混合し、4°Cで一晩反応させ
C-CPE04、14、22 をリポソーム表面に修飾した。
なお、未反応のポリペプチドは超遠心操作により除
去した。

3. CL-4 発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの取 り込み性評価方法

CL-4 遺伝子を導入し CL-4 を発現させたマウス
線維芽細胞 (L 細胞) に NBD で蛍光ラベルし
た C-CPE 修飾リポソームを添加し、37 °Cで 6 時
間作用させた。細胞を洗浄後、細胞へのリポソーム
の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡にて観察し
た。細胞に結合または取り込まれた NBD ラベル
C-CPE 修飾リポソームを観察した。また、C-CPE
修飾リポソームの細胞への結合特性を評価するた
め、競合阻害実験として遊離 C-CPE (0.5 μM) また
はコントロールとしてウシ血清アルブミン (BSA)
(0.5 μM) 存在下で C-CPE 修飾リポソームを CL4
発現細胞に作用させた時の細胞への結合や取り
込みについて評価した。

4. CL-4 発現細胞への C-CPE 修飾リポソームの結 合能力の評価方法

CL-4 遺伝子を導入し CL-4 を発現させたマウス
線維芽細胞 (L 細胞) に NBD で蛍光ラベルし
た C-CPE 修飾リポソームを添加し、37 °Cで 1 時間
作用させた。細胞を洗浄後、細胞へのリポソーム
の取り込み効率をフローサイトメトリーにて評価し

た。また、C-CPE22 修飾リポソームの細胞への結
合特性を評価するため、競合阻害実験として遊離
C-CPE 22 (20 μg/mL) 存在下で C-CPE22 修飾リ
ポソームを CL-4 発現細胞に作用させた時の細胞
への結合や取り込みについても評価した。

5. C-CPE 修飾抗がん剤封入リポソームの調製方法

Dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) :
cholesterol : DSPE-PEG(2k) = 33.9 mg: 17.0 mg:
2.8 mg をエタノール (0.7mL) に溶解し、50°Cに加
温した抗がん剤水溶液 (4 mL) (5-フルオロウラシ
ル (5-FU)(10mg/mL) またはメトトレキサート (25
mg/mL) に注入した。その後、エクストルーダーで
サイジングを行い、抗がん剤封入リポソームを調
製した。

DSPE-PEG(2k)-NHS14.9mg をガラスチューブ内
でクロロホルムに溶解し、エバポレーターにてクロ
ロホルムを除去し、ガラス表面に
DSPE-PEG(2k)-NHS の薄層を作製した。
DSPE-PEG(2k)-NHS: C-CPE14 または 22 = 200 :
1 となるように C-CPE 溶液を添加し、薄層を剥離
した。その後、4 °Cで 1 晩放置し、
DSPE-PEG(2k)-NHS と C-CPE を反応させ
DSPE-PEG(2k)-C-CPE とした。この
DSPE-PEG(2k)-C-CPE 懸濁液を先に調製したリ
ポソーム懸濁液に添加し、37°Cで1時間攪拌し、リ
ポソーム表面に DSPE-PEG(2k)-C-CPE を挿入し
た。最後に未封入の抗がん剤を超遠心により除去
し、C-CPE 修飾抗がん剤封入リポソームとした。

6. 細胞傷害性評価方法

マウス乳がん細胞 (4T1 細胞) を 2.5×10^4
cells/well となるように 96 well プレートに播種した。
24 時間培養後、培地を交換し、各種抗がん剤封
入 C-CPE 修飾リポソームを添加した。48 時間培
養後、MTT アッセイにより細胞傷害性を評価した。

C. 研究結果

結果は D 項にまとめて記載。

D. 考 察

1. 各種 C-CPE 修飾リポソームの調製

C-CPE04, 14, 22 修飾リポソームの調製を行い、それぞれ平均粒子径 176 nm、149nm および170 nm のリポソームを得た。

2. CL-4 発現細胞への各種 C-CPE 修飾リポソームの取り込み評価

まずはじめに、当該研究代表者の近藤が有していた C-CPE04 をリポソームに修飾し、そのリポソームについて検討を行い、C-CPE04 のリポソームへの修飾による CL-4 発現細胞へのターゲティングに関する可能性評価を行った。NBD ラベルした C-CPE04 未修飾リポソームを L細胞、CL-1, CL-4 または CL-5 発現 L 細胞に作用させてもリポソームの細胞への結合や取り込みは認められなかった。一方、C-CPE04 修飾リポソームを細胞に作用させたところ CL-4 発現細胞のみリポソームの結合および取り込みが認められた(図2)。

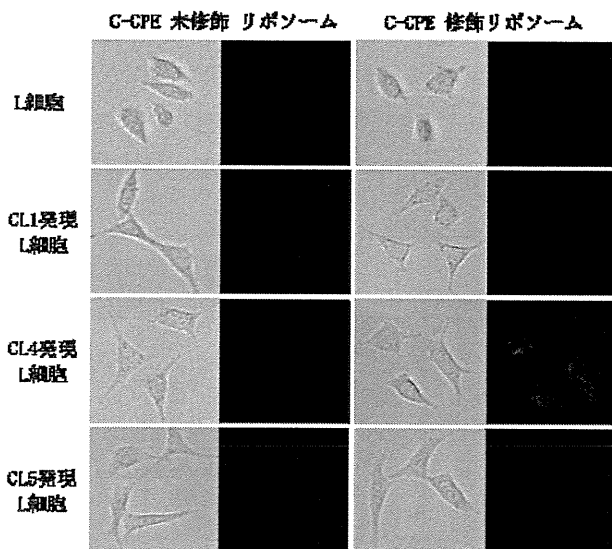


図2 C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合・取り込み評価

そこで、遊離の C-CPE04 を用いた競合阻害実験を行ったところ、C-CPE04 添加により CL-4 発現細胞への C-CPE04 修飾リポソームの結合や取り込みが阻害された(図3)。なお、コントロールとして BSA 存在下では C-CPE04 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合や取り込みは阻害されなかった。以上の結果より、C-CPE04 を表面修飾したリポソームは、CL-4 特異的に細胞に結合し、取り込まれ

ることが明らかとなった。

当該研究を進めていくなかで、C-CPE04 に比べ

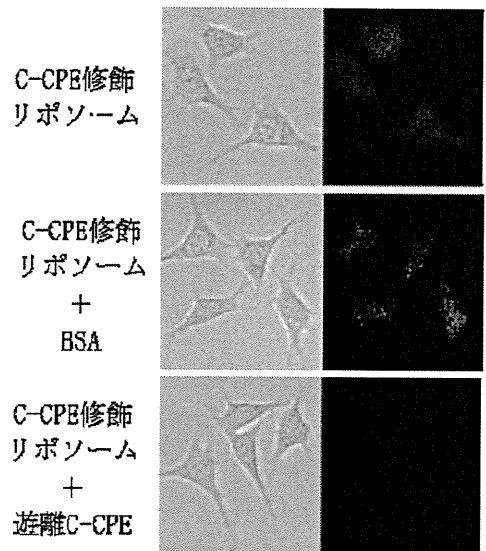


図3 C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合・取り込みにおよぼす遊離 C-CPE の影響

CL-4 に対して親和性が 20 倍高い C-CPE22 が見出された。そこで次に、この C-CPE22 を修飾したリポソームの CL-4 発現細胞への結合や取り込みを C-CPE04 修飾リポソームと比較した。NBD ラベルした各種 C-CPE 修飾リポソームを CL-4 発現細胞に作用させリポソームの細胞への結合や取り込みを検討した(図4)。その結果、CL-4 に親和性を示さない

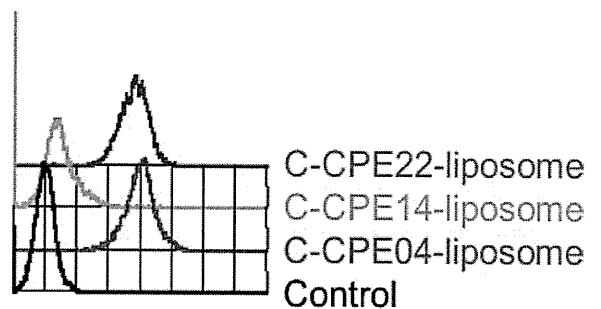


図4 各種 C-CPE 修飾リポソームの CL-4 発現細胞への結合・取り込み評価

C-CPE14を修飾したリポソームの CL-4 発現細胞への結合・取り込みはほとんど認められなかった。一方、CL-4 に対し親和性を有する C-CPE04 や C-CPE22 を修飾したリポソームを CL-4 発現細胞に作用させたところ、いずれのリポソームも同程度細胞に結合・取り込まれることが明らかとなった。C-CPE22 修飾リポソームの細胞への結合・取り込みが CL-4 を介した

ものであることを確認するため、遊離 C-CPE 22 を用いた結合・取り込みに対する競合阻害実験を行った(図5)。その結果、遊離 C-CPE 22 添加により、細胞への結合・取り込みが阻害された。このことから、C-CPE 22 修飾リポソームは確かに CL-4 を介して細胞に結合・取り込まれていることが示唆された。

さて、C-CPE22 はペプチド単独において C-CPE04

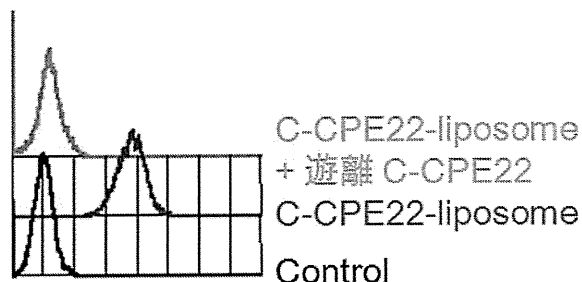


図5 C-CPE22 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込みにおよぼす遊離 C-CPE22 添加の影響(競合阻害実験))

より CL-4 に対し親和性の高いことが明らかとなっている。しかし、リポソーム表面に C-CPE22 を修飾した場合、C-CPE04 とほぼ同等の細胞への結合活性しか示さなかった。これはリポソーム表面に細胞への結合に必要な十分量のペプチドが修飾されていたため、細胞への結合・取り込み量が両者のペプチドで同等になったのではないかと考えられた。そこで次に、リポソームへのペプチド修飾量を変えて細胞への結合・取り込み活性について検討した。

今回の検討では、リポソームへのペプチドを修飾する際にペプチドの仕込み量を C-CPE/DSPE-PEG-NHS= 1/200, 1/400, 1/800 とし、リポソーム調製した。これらリポソームを用い細胞への結合・取り込みを検討したところ、ペプチドの仕込み量の減少に伴い、リポソームの細胞への結合・取り込み量も低下した(図6)。しかし、残念ながら C-CPE04 と C-CPE22 を修飾したリポソーム間で細胞への結合・取り込み量は同等であり、C-CPE22 修飾による細胞への結合・取り込み活性の違いは認められなかった。ペプチド単独とリポソームへの修飾による結合活性の違いに関して理由はよくわからないが、リポソーム表面のような固相に C-CPE22 を修飾すると遊離の分子

のときより細胞への結合活性が低下してしまったためではないかと考えられた。

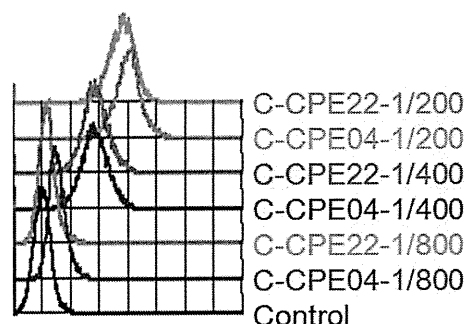


図6 C-CPE04, 22 修飾リポソームの CL4 発現細胞への結合・取り込みに対するペプチド修飾量の影響

次に C-CPE22 修飾リポソームに抗がん剤を封入し、がん細胞に対する抗がん剤デリバリーについて検討した。今回の検討では、CL-4 の発現が確認されているマウス乳がん細胞を用い検討を行った。5-FU またはメトトレキサート封入リポソームを用い検討したところ、C-CPE22 修飾リポソームの方が C-CPE14 リポソームより若干高い細胞傷害性を示す傾向が認められた。これは、CL-4 を特異的に認識する C-CPE22 修飾リポソームが 4T1 細胞表面上の CL-4 を積極的に

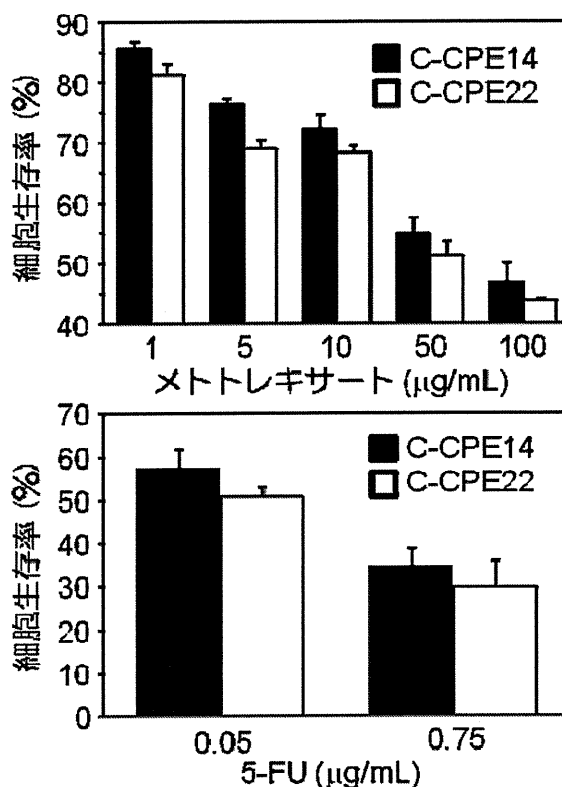


図7 C-CPE 修飾抗がん剤封入リポソームによる細胞傷害性評価

認識することで C-CPE14 修飾リポソームより効率よく細胞に取り込まれたためではないかと考えられた。

E. 結論

CL-4 に対し親和性の高い新規ペプチド C-CPE22 を修飾したリポソームを調製した。このリポソームは、CL-4 特異的に CL-4 発現細胞に結合することが明らかとなった。また、この C-CPE22 修飾リポソームに抗がん剤を封入したリポソームは、C-CPE14 修飾リポソームより CL-4 発現がん細胞に対して若干ではあるが細胞傷害性が高い傾向にあることが示された。今後、さらなる抗腫瘍効果向上に向け C-CPE22 修飾方法や修飾量、抗がん剤の選択などリポソームの最適化が必要になると考えられる。様々な課題は残されているが、CL-4 をターゲティング可能な C-CPE 修飾リポソームは上皮癌細胞を標的とした薬物デリバリーのためのアクティブターゲティング型薬物キャリアとして利用可能になるものと期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

G-1 論文発表

1. Omata D, Negishi Y, Yamamura S, Hagiwara S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y, Involvement of Ca²⁺ and ATP in Enhanced Gene Delivery by Bubble Liposomes and Ultrasound Exposure, Mol. Pharm. (In press)
2. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y., Enhanced gene delivery using Bubble liposomes and ultrasound for folate-PEG liposomes., J. Drug Target. (In press)
3. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M., Efficient suppression of murine ICAM-1 using ultrasound-responsive and mannose-modified lipoplexes inhibits acute hepatic inflammation., Hepatology (In press)
4. Oda Y, Suzuki R, Otake S, Nishiie N, Hirata K, Koshima R, Nomura T, Utoguchi N, Kudo N, Tachibana K, Maruyama K, Prophylactic immunization with Bubble liposomes and ultrasound-treated dendritic cells provided a four-fold decrease in the frequency of melanoma lung metastasis. J Control Release (In press)
5. Negishi Y, Tsunoda Y, Endo-Takahashi Y, Oda Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y. Local gene delivery system by bubble liposomes and ultrasound exposure into joint synovium. J Drug Deliv (In press)
6. Endo-Takahashi Y, Negishi Y, Kato Y, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y.: Efficient siRNA delivery using novel siRNA-loaded Bubble liposomes and ultrasound. Int J Pharm., 422: 504-509 (2012)
7. Sugano M, Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamamoto M, Aramaki Y.: Gene delivery system involving Bubble liposomes and ultrasound for the efficient in vivo delivery of genes into mouse tongue tissue. Int J Pharm.422: 332-337 (2012)
8. Omata D, Negishi Y, Hagiwara S, Yamamura S, Endo-Takahashi Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Aramaki Y.: Bubble Liposomes and Ultrasound Promoted Endosomal Escape of TAT-PEG Liposomes as Gene Delivery Carriers. Mol Pharm., 8: 2416-2423 (2011)
9. Un K, Kawakami S, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: Involvement of activated transcriptional process in efficient gene transfection using unmodified and mannose-modified bubble lipoplexes with ultrasound exposure. J Control Release 156: 355-363 (2011)
10. Shiraishi K, Endoh R, Furuhata H, Nishihara M, Suzuki R, Maruyama K, Oda Y, Jo J, Tabata Y, Yamamoto J, Yokoyama M.: A facile preparation

- method of a PFC-containing nano-sized emulsion for theranostics of solid tumors. *Int J Pharm*, 421: 379–387 (2011)
11. Negishi Y, Endo-Takahashi Y, Ishii K, Suzuki R, Oguri Y, Murakami T, Maruyama K, Aramaki Y.: Development of novel nucleic acid-loaded Bubble liposomes using cholesterol-conjugated siRNA. *J Drug Target*, 19: 830–836 (2011)
 12. Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S.: Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth, *Cancer Biol Ther*, 12: 270–277 (2011)
 13. Un K, Kawakami S, Yoshida M, Higuchi Y, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M.: The elucidation of gene transferring mechanism by ultrasound-responsive unmodified and mannose-modified lipoplexes, *Biomaterials*, 32: 4659–4669 (2011)
 14. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Suppression of Melanoma Growth and Metastasis by DNA Vaccination Using an Ultrasound-Responsive and Mannose-Modified Gene Carrier. *Mol Pharm*. 8: 543–554 (2011)
 15. Negishi Y, Matsuo K, Endo-Takahashi Y, Suzuki K, Matsuki Y, Takagi N, Suzuki R, Maruyama K, Aramaki Y. Delivery of an Angiogenic Gene into Ischemic Muscle by Novel Bubble Liposomes Followed by Ultrasound Exposure. *Pharm Res*. 28: 712–719 (2011)
 16. Hagiwara K, Nishioka T, Suzuki R, Takizawa T, Maruyama K, Takase B, Ishihara M, Kurita A, Yoshimoto N, Ohsuzu F, Kikuchi M. Enhancement of ultrasonic thrombus imaging using novel liposomal bubbles targeting activated platelet glycoprotein IIb/IIIa complex-in vitro and in vivo study. *Int J Cardiol.*, 152: 202–206 (2011)
 17. Suzuki R, Oda Y, Utoguchi N, Maruyama K. Progress in the development of ultrasound-mediated gene delivery systems utilizing nano- and microbubbles. *J Control Release*. 149:36–41 (2011)
 18. Ikeda-Dantsuji Y, Feril LB Jr, Tachibana K, Ogawa K, Endo H, Harada Y, Suzuki R, Maruyama K. Synergistic effect of ultrasound and antibiotics against *Chlamydia trachomatis*-infected human epithelial cells in vitro. *Ultrason Sonochem*. 18:425–430 (2011)
 19. 鈴木 亮、小田雄介、宇都口直樹、丸山一雄 Development of ultrasonic cancer therapy using ultrasound sensitive liposome. *薬学雑誌*、130:1665–1670(2010)
 20. 根岸洋一、高橋葉子、鈴木 亮、丸山一雄、新禎幸彦、Development of gene delivery system into skeletal muscles by bubble liposomes and ultrasound. *薬学雑誌*. 130:1489–1496 (2010)
 21. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Development of an ultrasound-responsive and mannose-modified gene carrier for DNA vaccine therapy. *Biomaterials*. 31:7813–7826 (2010)
 22. Okazaki F, Matsunaga N, Okazaki H, Utoguchi N, Suzuki R, Maruyama K, Koyanagi S, Ohdo S. Circadian rhythm of transferrin receptor 1 gene expression controlled by c-Myc in colon cancer-bearing mice. *Cancer Res*. 70:6238–6246 (2010)
 23. 山下琢也、宇都口直樹、鈴木 亮、長野一也、角田慎一、堤 康央、丸山一雄、Development of anti-tumor blood vessel antibodies by phage display method. *薬学雑誌*. 130:479–485 (2010)
 24. T, Tomita N, Horie S, Sax N, Iwasaki H, Suzuki R, Maruyama K, Mori S, Manabu F. Morphological study of acoustic liposomes using transmission electron microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 59: 187–196 (2010)
 25. Negishi Y, Omata D, Iijima H, Takabayashi Y, Suzuki K, Endo Y, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu

- M, Aramaki Y. Enhanced laminin-derived peptide AG73-mediated liposomal gene transfer by bubble liposomes and ultrasound. *Mol Pharm.* 7(1): 217-226 (2010)
26. Suzuki R, Namai E, Oda Y, Nishiie N, Otake S, Koshima R, Hirata K, Taira Y, Utoguchi N, Negishi Y, Nakagawa S, Maruyama K. Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J Control Release.* 142(2): 245-250 (2010)
27. Un K, Kawakami S, Suzuki R, Maruyama K, Yamashita F, Hashida M. Enhanced transfection efficiency into macrophages and dendritic cells by a combination method using mannosylated lipoplexes and bubble liposomes with ultrasound exposure. *Hum Gene Ther.*; 21(1): 65-74. (2010)

G-2 学会発表

1. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Risa Koshima, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、The Combination Therapy of Therapeutic Ultrasound and Dendritic Cell-Based Immunotherapy、WFUMB2011、オーストリア、2011年8月26-30日
2. 鈴木 亮、丸山一雄、超音波造影・治療技術の新展開、日本バイオイメージング学会、北海道、2011年9月1-2日
3. 佐藤紗也佳、真柴拓哉、本田亜紀、Citterio Daniel、小田雄介、鈴木 亮、丸山一雄、鈴木孝治、静岡DDSカンファランス、静岡、2011年9月16日
4. Ryo Suzuki, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Induction of anti-tumor immunity in the combination of therapeutic ultrasound and dendritic cell-based immunotherapy、日本癌学会、名古屋、2011年10月3-5日
5. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Tetsuya Nomura, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Development of an effective gene delivery system with sonoporation in cancer gene therapy、AAPS2011、米国、2011年10月22-27日
6. 鈴木 亮、小田雄介、平田圭一、野村鉄也、宇都口直樹、丸山一雄、リポソーム型微小気泡を利用した超音波がん温熱療法と樹状細胞免疫療法の併用によるがん治療効果の増強に関する研究、東京、2011年11月26日
7. 鈴木 亮、小田雄介、丸山一雄、バブルリポソームと超音波の併用による遺伝子導入特性の評価、マイクバブルと超音波の相互作用に関するシンポジウム、名古屋、2012年1月20日
8. 鈴木 亮、根岸洋一、必ずうまくいくソノポレーション法:実験の実際とコツ、第4回超音波分子診断治療研究会、福岡、2012年3月3日、招待講演
9. 平田圭一、澤村香織、鈴木 亮、小田雄介、大城英明、宇都口直樹、丸山一雄、超音波応答性リポソームを利用した経皮送達システムの開発、日本薬剤学会、徳島、2010年5月12-14日
10. Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Analysis of anti-tumor mechanism by the combination of therapeutic ultrasound and immunotherapy、International Symposium of Therapeutic Ultrasound (ISTU2010)、東京、2010年6月10-12日
11. 小田雄介、鈴木 亮、平田圭一、光嶋里茶、宇都口直樹、岡田直貴、丸山一雄、樹状細胞免疫療法におけるバブルリポソームと超音波を利用した抗原送達法の特性評価日本 DDS 学会、大阪、2010年6月16-18日
12. Risa Koshima, Ryo Suzuki, Yusuke Oda, Keiichi Hirata, Yoichi Negishi, Naoki Utoguchi, Kazuo Maruyama、Development of liver specific gene delivery by the combination of liposomal bubbles and ultrasound exposure、International Symposium of Therapeutic Ultrasound 2010 (ISTU2010)、東京、2010年6月10-12日
13. Yusuke Oda, Ryo Suzuki, Naoki Utoguchi, Keichi