

201209010A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

次世代インテリジェント型ナノカプセルによる
診断・治療システム 

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋爪 誠

平成25（2013）年 3月

目 次

I. 総括研究報告	
次世代インテリジェント型ナノカプセルによる診断・治療システムに関する研究	1
九州大学 先端医療イノベーションセンター センター長 橋爪 誠	
II. 分担研究報告	
1. 酸性オルガネラにおけるナノカプセルからの薬物放出法の検討	11
九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点 准教授 村田正治	
2. がん治療用ナノカプセル型遺伝子キャリアーの機能化	17
九州大学大学院工学研究院 教授 片山佳樹	
3. ナノカプセル型 MRI 造影剤の設計と感度向上に関する研究	22
九州大学病院先端医工学診療部 准教授 富川盛雅	
4. 癌特異的分子に基づく癌個別化治療の開発	33
九州大学大学院医学研究院 講師 大内田研宙	
5. 機能性核酸複合体を利用した細胞内核酸の高感度イメージングに関する基礎研究	38
熊本大学大学院自然科学研究科 教授 井原敏博	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	43
IV. 研究成果の刊行物・別刷	45

I. 総括研究報告

次世代インテリジェント型ナノカプセルによる 診断・治療システムに関する研究

研究代表者 橋爪 誠 九州大学 先端医療イノベーションセンター・センター長

研究要旨

天然のタンパク質ナノカプセルをプラットフォームとして、薬物送達システム（DDS）や分子イメージングへの応用に向けた要素技術を開発した。DDSキャリアとして鍵となる標的化については、遺伝子組み換え技術および化学的なコンジュゲート技術によって特定の臓器や癌細胞の標的化を実施した。また薬物の内包についても抗癌剤や造影剤などの封入法について検討した。

分担研究者

村田正治(九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点)
片山佳樹（九州大学大学院工学研究院）
富川盛雅（九州大学病院先端医工学診療部）
大内田研宙（九州大学大学院医学研究院）
井原敏博（熊本大学大学院自然科学研究科）

構造でありながら極めて効果的な感染機構を有する。この感染機序の重要な鍵となっているのが、天然のナノ構造体であるウイルスカプシドである。本研究ではこのカプシドを模したタンパク質ナノカプセルを構築し、これを細胞内シグナルによって崩壊させるシステムを創製する。

我々は既にタンパク質ナノカプセル（ヒト由来または古細菌由来）の遺伝子クローニングと大腸菌を使った大量発現に成功している。この直径12nmのナノ構造体は非常に安定であり、しかもその内側に抗癌剤やsiRNAを含む多くの薬物を内包することが可能である。本研究では、このナノカプセルを分子生物学あるいは有機合成化学を用いて様々に機能化し、①分子標的による組織・細胞への侵入、②能動的なカプセル崩壊、さらに③内包薬物の放出を実現する。

本年度は実施計画書にしたがって、ナノカプセルからの抗癌剤の放出実験、ナノカプセル型MRI造影剤の開発、さらに遺伝子ナノキャリアの開発、の三つのテーマに重点をおいて研究を実施した。

A. 研究目的

腫瘍化に伴う遺伝子レベル、あるいは分子レベルでの変化が解き明かされることによって新しい治療戦略と治療薬が開発されてきた。しかしながら、これら新規薬物の治療効果を最大限に引き出すためには、同時に病変部位への薬物輸送システム（DDS）の開発が必要不可欠である。これまでに水溶性高分子やリポソームなどを用いた様々なDDSキャリアが開発されてきたが、その標的細胞、病変組織特異性については依然問題が残されている。本研究では、これら従来のドラッグキャリアとは一線を画するナノ DDS の構築を目指す。

この新しいドラッグキャリアのモデルとするのがウイルスである。ウイルスは非常にシンプルな

B. 研究方法

本研究で使用したナノカプセルは図 1 のような球状構造体であり、その内部には空間を有している。

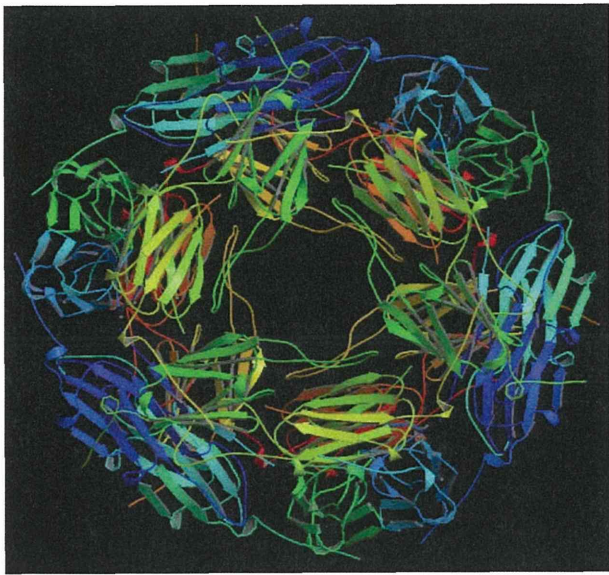


図1 タンパク質ナノカプセルの構造

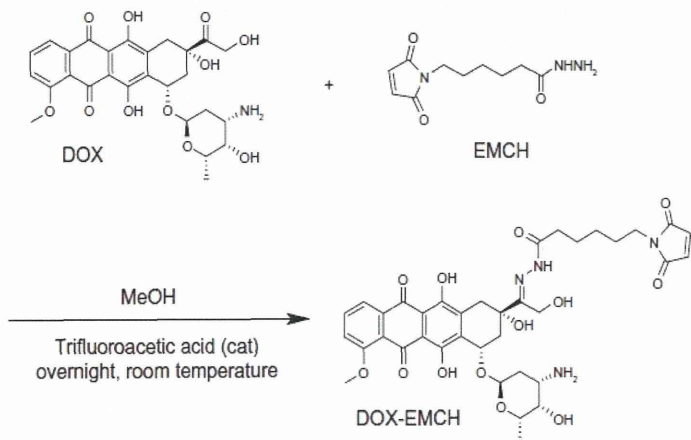


図2 pH 応答性リンカーを有するドキシソルビシンの合成スキーム

この内孔は疎水性であるため、これまでの研究の結果、疎水性の薬剤を取り込むことが可能である。例えば膀胱癌の標準治療薬であるジェムザールを内包したナノカプセルは、カプセル1個あたり十数分子のジェムザールを内包することが可能である。今回、我々はナノカプセル内孔に点変異をとってシステイン残基を導入した変異体を作成し、そのチオール基と特異的に反応するマレイミド基を介して部位特異的に薬剤を導入した。さらにマレイミド基と薬剤の間に pH 応答性の解離基であるヒドラゾンリンカーを導入し(図 2)、酸性オルガネラでの薬剤放出について検討した。

また、N 末端ヘリックスをリピートした変異型ナノカプセルを設計し、それらの内孔に MRI 造影剤を内包したナノカプセル型造影剤を開発した。変異型ナノカプセルは HSP16.5-G41C をコードするベクタ

ーをテンプレートとして次のプライマーを使って PCR を行った。 Fw primer ; 5-GAAGGAGATATACATATGTTCGGAAGA-3、Rv-primer ; 5-GGCGGATTAATGGTGTGAGCTTTGAATCATTGTGGTTC-3。得られた DNA フラグメントをアガロースゲル電気泳動によって分離し、約 200bp の PCR 産物をゲルから回収した。これを制限酵素 NdeI および AseI で消化し、さらにプロメガ製 PCR Clean-Up キットを使って精製した。この DNA をあらかじめ NdeI で消化し、さらに脱リン酸化処理をしておいた pET21-HSP16.5-G41C ヘライゲーションした。この組み換えベクターを大腸菌株 XL10 に形質転換し、LB アガープレートに播種した。37°Cで一晩培養した後、生じたコロニーをダイレクト PCR および DNA シークエンスによってチェックし、N 末端ヘリックスが 2~4 回リピートしたクローンをピックアップした。DNA シークエンシングで遺伝子配列を確認した後、組み換えベクター pET-HSPG41C-preS1 を大腸菌株 BL21gold(DE3)へ形質転換した。この菌株を使って、定法によりタンパク質発現を誘導し、発現したタンパク質をイオン交換クロマトグラフィーおよびサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

(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。また動物実験は九州大学動物実験施設の定めた実験指針、倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

抗癌剤内包ナノカプセルによるpH応答的な薬物リリース

タンパク質ナノカプセルは何らかのレセプターを介したエンドサイトーシスであることが分かっている。そこで細胞内へ取り込まれる機序を、各種阻害剤を使ってさらに検討した。実験には、CPZ(クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤)、Amiloride (マクロピノサイトーシス阻害剤)、Filipin III (カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤) の三種の薬剤を使用した。この結果、ナノカプセルの投与前に細胞を Amiloride (500uM)、あるいは Filipin III (15uM) で処理することにより、その後のナノカプセルの取り込みはそれぞれ 8%および 19%減少した。一方、CPZ (28uM) の添加では、ナノカプセルの取り込みは 42%もの大幅な減少が観察され、さらに三種

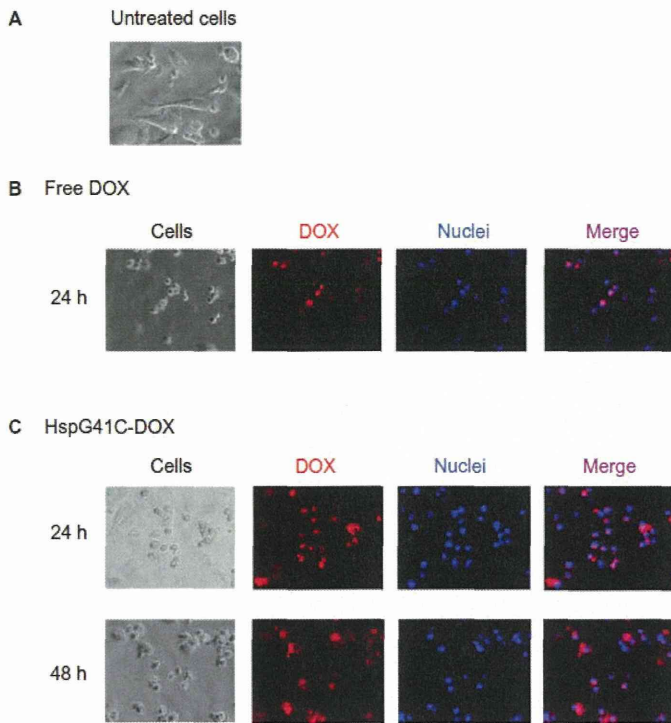


図3 DOXおよびDOX-EMCH内包ナノカプセルで処理したSuit-2細胞の顕微鏡観察

細胞核はHoechst33342で染色。所定の時間毎に蛍光顕微鏡により観察。

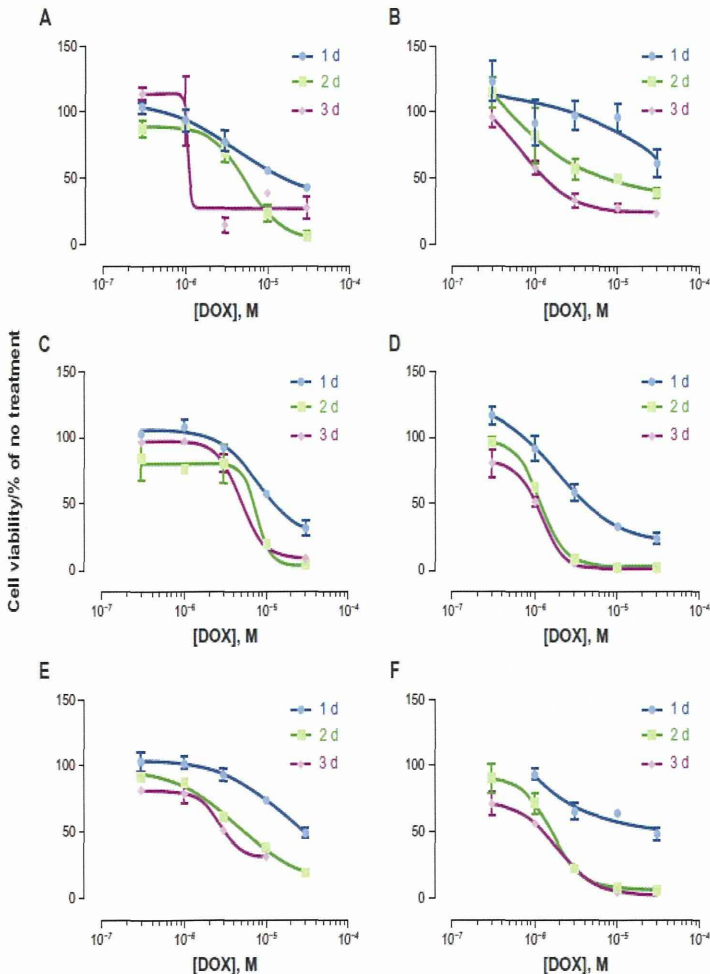


図4 ドキソルビシン内包ナノカプセルの抗癌活性

の阻害剤を同時に添加した際には52%の阻害効果が示された。これらの結果は、ナノカプセルの細胞への形質転換がクラスリン依存型エンドサイトーシスによるものであることを示唆している。さらに、ナノカプセルの局在を蛍光顕微鏡によって観察したところ、その大部分は酸性オルガネラに存在していることが明らかとなった。

次に、抗癌剤ドキソルビシンをpH応答性リンカーであるヒドラゾン基を介してマレイミド化したDOX-EMCHを合成し、ナノカプセル内孔に固定化した。この抗癌剤内包ナノカプセルを膀胱癌細胞株 Suit-2に投与したところ、ナノカプセル単独の場合と同様に、細胞内の酸性オルガネラに局在することが分かった。また内包したドキソルビシン由来の蛍光もカプセルの位置と一致していることから、ドキソルビシンもカプセルと共に細胞内に取り込まれたことが示唆された。さらに細胞形態を観察したところ、未処理のSuit-2が紡錘形であるのに対し、フリーのドキソルビシン、あるいはドキソルビシン内包ナノカプセルを投与した Suit-2 はアポトーシスを示唆する球状・凝集構造に変化した(図3)。予備実験においてナノカプセルに内包されたドキソルビシンはpH5の酸性条件下においてヒドラゾン基が解裂し、カプセルから放出されることが示されている。おそらくエンドサイトーシス経路で細胞内に取り込まれたドキソルビシン内包ナノカプセルが酸性オルガネラに集積し、その低pH環境に反応してドキソルビシンが放出されたものと考えられる。またドキソルビシン内包ナノカプセルの細胞毒性をフリーのドキソルビシンと比較したところ、細胞株の種類によるものの、フリーのドキソルビシンと同程度もしくは若干弱いことが示された(図4)。

N末端ヘリックスリピート変異体の物性とMRI造影剤への応用

N末端ヘリックスリピート変異体(図5、NHelix 1~NHelix 3)は、いずれも大腸菌から大量発現が可能であったが、リピート数が増えるにしたがって発現量が減少した(図6)。精製後のタンパク質を動的光散乱法で測定した結果、これらの粒径は13.5~32.7nmであり、いずれもナノ粒子であった(図2)。これらの結果は、カプセル内孔に配向する疎水性ヘリックスをリピートさせても分子集合体として機能し、かつ、そのリピート数の増加と共に粒径が有意に大きくなることを示している。各ナノカプセルをリン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、マレイミド化Gd-DTPA溶液を加えて50°Cで1時間攪拌して反応させた。限外濾過によって精製した後、この溶液をSDS-PAGEで分析した

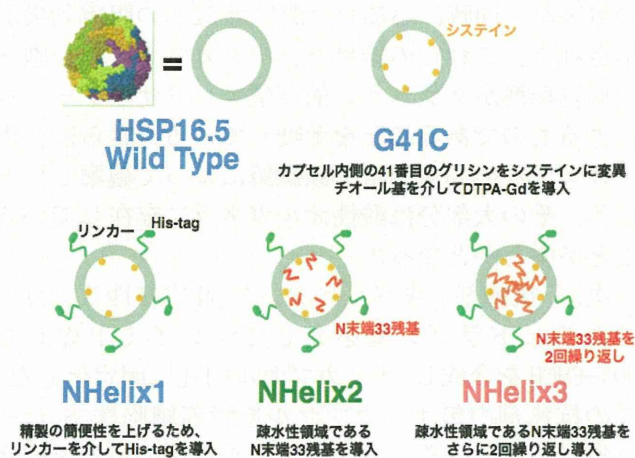


図5 N末端ヘリックスリピート変異体の模式図

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。また ICP-MS によりサンプル中の Gd を定量し、Gd-DTPA の修飾率を算出した。さらに、これらの Gd-DTPA 内包ナノカプセルの粒径を DLS で分析したところ、そのサイズに有意の変化は観察されなかった。そこでこれらのナノカプセルの内孔に MRI 造影機能を有するマレイミド化 Gd-DTPA を固定化した。これらの所定の濃度に調整した後、1.5T の MRI を用いて、標準的なインバージョンリカバリ法により T_1 緩和度を測定した。この結果、臨床において使われているフリーの Gd-DTPA の緩和度が $5.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ であったのに対し、Gd-DTPA 内包 NHelix 1 では $63.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、同 NHelix 2 では $78.3 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、さらに同 NHelix 3 では $190.8 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ に上昇した。正確な評価には引き続き今後の実験が必要であるが、その緩和度が NHelix 1 < NHelix 2 < NHelix 3 の順に増大する傾向が確認された。単純に比較すると、Gd-DTPA 内包 NHelix 3 は、フリーの Gd-DTPA よりも 36 倍高感度に MRI 撮像可能であることを示している。

D. 考 察

Methanococcus jannaschii に由来する天然のナノカプセル (HSP16.5) を様々な手法により改変し、それをプラットフォームとして抗癌剤および造影剤の内包試験を行った。我々の用いたナノカプセルは 6.5nm の内孔を有し、ここに様々な薬剤を封入することができる。特に、内孔側にシステイン残基を変異導入することで、マレイミド基とのマイケル付加反応を利用した特異的な薬物の固定化ができることが分かった。

ナノカプセルはレセプターとの結合に始まるエンドサイトーシス経路によって細胞内に取り込まれる

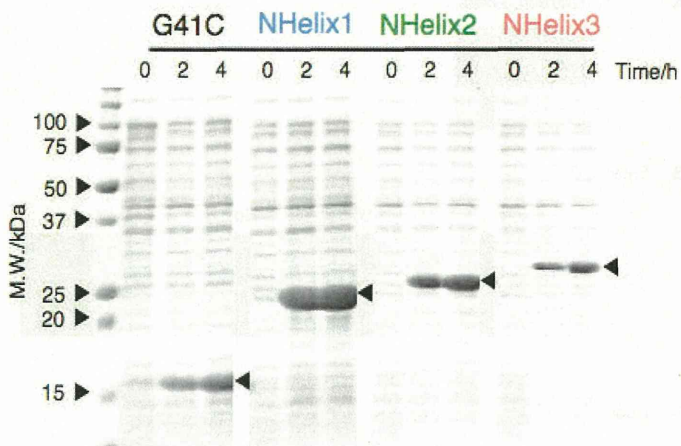


図6 N末端ヘリックスリピート変異体の発現

ことが明らかとなった。したがって細胞内に取り込まれたナノカプセルは酸性オルガネラへ輸送されることになる。そこで、抗癌剤を酸性 pH で解裂するヒドラゾン基を介してナノカプセルへ固定化すると、抗癌剤はカプセルに内包されたまま細胞内へ形質転換され、酸性オルガネラまで細胞内輸送された上で放出されていることが示唆された。一方、造影剤の方も内孔のシステイン残基をつかってカプセル内部に固定化することが可能であった。MRI 造影剤の感度の指標となる緩和度を測定したところ、カプセルに固定化することにより緩和度が最大で 36 倍と大きく向上することが示された。MRI 造影剤を高分子量の担体とコンジュゲートさせることにより、緩和度が向上することはよく知られているが、これほど大幅に上昇することは単なる高分子量効果とは考えにくい。特に、N 末端ヘリックスリピート変異体において、より安定度の高い NHelix 3 を用いたナノカプセル型造影剤の緩和度が高いことから、カプセル構造の剛直性や内部の疎水性の向上が大きく寄与しているものと推察される。

E. 結 論

本年度はナノカプセルへの薬物内包を中心に実験を行った結果、カプセルの内孔側にシステイン残基を変異導入することで、部位特異的に薬剤を固定化することに成功した。また固定化に用いるマレイミド基と薬剤との間に pH 応答性のリンカーを導入することにより、細胞内の酸性オルガネラのみで薬剤放出することが可能である。また同様な手法で MRI 造影剤を導入したカプセル型造影剤は、未修飾の造影剤と比較して遙かに高感度であり、カプセルの剛直性と内孔の疎水場が感度向上に寄与していることが示

唆された。今後はカプセル自体の標的能を向上させ、実験動物での機能評価を実施する計画である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi Y, Suzuki M, Kato A, Hatano M, Konishi K, Hashizume M, Fujie M.G: Enhanced Targeting in Breast Tissue Using a Robotic Tissue Preloading-Based Needle Insertion System. IEEE TRANSACTIONS ON ROBOTICS: 710-722, 2012
2. Matsumoto N, Oka M, Cho B, Hong J, Jinnouchi M, Ouchida R, Hashizume M, Komune S: Cochlear Implantation Assisted by Noninvasive Image Guidance. Otology & Neurotology 33: 1333-1338, 2012
3. Murai Y, Ohfuji S, Fukushima W, Tamakoshi A, Yamaguchi S, Hashizume M, Moriyasu F, Hirota H: Prognostic factors in patients with idiopathic portal hypertension: Two Japanese nationwide epidemiological surveys in 1999 and 2005. Hepatology Research 42: 1211-1220, 2012
4. Murata M, Narahara S, Umezaki K, Toita R, Tabata S, Piao J, Abe K, Kang J, Ohuchida K, Cui L, Hashizume M: Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages. International Journal of Nanomedicine 7:4353-62, 2012
5. Ohuchida K, Mizumoto, Cui L, Jun Y, Yamaguchi H, Takahata S, Ohtsuka T, Sato N, Toma H, Nakamura M, Nagai E, Hashizume M, Tanaka M: MicroRNA-10a is Overexpressed in Human Pancreatic Cancer and Involved in its Invasiveness possibly via Suppression of the HOXA1 gene. Annals of Surgical Oncology 19: 2394-402, 2012
6. Sugimori H, Kanna T, Yamashita K, Kuwashiro T, Yoshiura T, Zaitzu A, Hashizume M: Early findings on brain computed tomography and the prognosis of post-cardiac arrest syndrome: Application of the score for stroke patients. Resuscitation 83: 848-854, 2012
7. Tsutsumi N, Tomikawa M, Uemura M, Akahoshi T, Nagao Y, Konishi K, Ieiri S, Hong J, Maehara Y, Hashizume M: Image-guided laparoscopic surgery in an open MRI operating theater. Surg Endosc , in press
8. Xu H, Ohdaira T, Nagao Y, Tsutsumi N, Mori M, Uemura M, Toyoda K, Ieiri S, Hashizume M: New detachable occlusion balloon unit for transrectal natural orifice transluminal endoscopic surgery. Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies, in press
9. 家入 里志, 柳 佑典, 松浦 俊治, 宗崎 良太, 永田 公二, 林田 真, 木下 義晶, 橋爪 誠, 田口 智章: 【急性虫垂炎の治療方針の変遷と現状】 Interval appendectomy の適応と至適手術時期についての検討. 日本腹部救急医学会雑誌 32 巻 4 号: 771-774, 2012
10. 村守 克己, 宗崎 良太, 家入 里志, 松浦 俊治, 永田 公二, 林田 真, 木下 義晶, 富川 盛雅, 橋爪 誠, 田口 智章: 小児における腹腔鏡下虫垂切除の有用性および Interval appendectomy の必要性について. 臨牀と研究 89 巻 4 号: 528-532, 2012
11. 白水和宏, 杉森 宏, 藤吉哲宏, 坂口嘉郎, 橋爪 誠: 急性腎不全患者に対する持続的血液濾過透析におけるポリスルホン膜とポリメチルメタクリレート膜との有効性の比較. 日本集中治療医学会雑誌 19(3): 419-420, 2012
12. 橋爪 誠: 先端医療イノベーションセンター パネルディスカッション臨床薬理学教室の歩み. 臨床評価39(3): 466-470, 2012
13. 橋爪 誠: ロボット手術がもたらす利益とは医療経済効果、臨床的意義を中心に. 月刊新医療39(6): 158-161, 2012
14. 橋爪 誠: 手術支援ロボットの開発. 日本外科学会雑誌第113巻 臨時増刊号(3): 38-39, 2012
15. 赤星朋比古, 橋爪 誠: 肝硬変症における肝脾相関-脾臓摘出術, 部分的脾動脈寒栓術の視点から-. 肝臓 53(6): 310-315, 2012
16. 大内田研宙, 橋爪 誠: Robotic surgeryのこれまでの開発と現状. 外科 74(8): 799-803, 2012
17. 豊田和孝, 橋爪 誠: 手術支援ロボットの研究開発の現状と課題. Biophilia 電子版2: 66-73, 2012
18. 大内田研宙, 橋爪 誠: 特集 ロボット手術の現在と未来 癌領域. Pharma Medica Vol.30 No.10: 33-36, 2012
19. Ohuchida K, Hashizume M: Biomedical robotics

for healthcare, "Biomedical Engineering and Cognitive Neuroscience for Healthcare: Interdisciplinary Applications" .IGI Global 2012

20. Ohuchida K, Hashizume M: Robotic Surgery and Cancer. The Cancer Journal, in press
21. Ohuchida K, Hashizume M: Overview of Robotic Surgery, Robotic surgery, in press

2. 学会発表

1. Hashizume M: Development of Robotic Surgery in Japan.Korea Robot Conference 2012(KRC 2012), 2012年10月25-26日,韓国
2. Hashizume M: Recent Advance in Computer-Aided Surgery. The 8th Asian Conference on Computer Aided Surgery 2012(ACCAS 2012), May 27, 2012, Beijing, China
3. Hashizume M: Recent Advance of Computer-Assisted Minimally Invasive Surgery.GMSI-GSISH Winter School2012, 2012年3月8日, 東京
4. Hashizume M: Recent advances in robotic surgery.The Korean Journal of Endourology, June 9, 2012, Korea
5. 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: Progress OverView FY2011.
6. The 3st International symposium on the Project "Computational Anatomy",funded by MEXT Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas, March 3-4, 2012, Fukuoka
7. 橋爪 誠: 医療用ロボット開発における産学連携の現状. 第100回日本泌尿器科学会総会、教育講座「最新の医療工学」, 2012年4月23日, 横浜
8. 橋爪 誠: 先端ロボット手術の現状. 第3回先進医療フォーラム, 2012年1月21日, 大阪
9. 橋爪 誠: 手術支援ロボットの開発.第112回日本外科学会定期学術集会, 2012年4月14日, 千葉 (第9回臨床研究セミナー)
10. Akahoshi T, Hahizume M, Yoshihiko M: The Impact of Balloon-occluded Retrograde Transvenous Obliteration on Management of Gastric Variceal Bleeding. 日本内視鏡学会総会 国際シンポジウム: Endoscopic management of esophago-gastric variceal bleeding, 2012年5月12日, 東京
11. Arata J, Kenmotsu H, Takagi M, Hori T, Miyagi T, Fujimoto H, Kajita Y, Hayashi Y, Chinzei K, Hashizume M: Surgical bedside master console for neurosurgical robotic system. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy
12. Cho B, Oka M, Matsumoto N, Ouchida R, Hong J, Hashizume M: Warning navigation system using real-time safe region monitoring for otologysurgery. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition, (CARS 2012) June 27-30, 2012, Pisa, Italy
13. Morooka K, Taguchi T, Chen X, Kurazume R, Hashizume M: An efficient construction of real-time FEM-based simulator for soft tissue deformation with large dataset. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy
14. Nakamura S, Matsumoto T, Yanai S, Ikegami K, Asano K, Moriyama T, Esaki M, Hirahashi M, Kitazono T, Hashizume M: Treatment and prognosis of intestinal follicular lymphoma. The 20th United European Gastroenterology Week, October 2012, Amsterdam, The Netherlands.
15. Noguchi T, Kobayashi Y, Kawamura K, Toyoda K, Hashizume M, Fujie M.G.: Construction of the master manipulator with six active degrees of freedom for robotic system for single port endoscopic surgery. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy
16. Ohdaira T, Hashizume M: Development of Metallic Reusable Port for Single Port Surgery: Possibility of Enhancement of Operability and Operation Cost Reduction. SAGES 2012, March 6-10, 2012, San Diego, US
17. Souzaki R, Tajiri T, Teshiba R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, Oda Y, Hashizume M, Taguchi T: The correlation between the number of segmental chromosome aberrations and the age at diagnosis of neuroblastomas with or without MYCN amplification. ANR2012, June 18- 21, 2012, Toronto, Canada
18. Tashiro Y, Okazaki K, Uemura M, Toyoda K, Iwamoto Y, Hashizume M: Simulation and evaluation using 3D CT and MRI knee models for drilling femoral bone tunnels in anterior cruciate ligament reconstruction. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy

19. Toyoda K, Murata M, Ichikawa K, Hyodo F, Hashizume M: Robotic area-imaging with ESR local coil for redox imaging. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition,(CARS 2012)June 27-30, 2012, Pisa, Italy
20. 井上大輔, 植村宗則, 吉本幸司, 吉田正樹, 森恩, 剣持 一, 佐々木富男, 橋爪 誠: 神経内視鏡における 3D と 2D の比較: 基礎的検討と臨床応用. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 11 日, 福岡
21. 永田 高志, 姫野 信吉, 剣持 一, 橋爪 誠: 大規模災害のためのクラウド型 医療情報システムの開発と普及. 第 40 回日本救急医学会総会学術集会, 2012 年 11 月 13 日, 京都
22. 永田 高志, 姫野 信吉, 剣持 一, 橋爪 誠: 大規模災害のための通信衛星技術を用いた SaaS/クラウド型医療情報システムの開発と運用. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 2 日, 徳島
23. 永田 高志, 姫野 信吉, 剣持 一, 橋爪 誠: 大規模災害のための通信衛星技術を用いた SaaS/クラウド型医療情報システムの開発と運用. 第 27 回日本国際保健医療学会, 2012 年 11 月 3 日, 岡山
24. 永田 高志, 姫野 信吉, 剣持 一, 橋爪 誠: 大規模災害支援のためのクラウド型医療情報システムの開発と普及. 第 54 回全日本病院学会, 2012 年 9 月 22 日, 横浜
25. 永田高志, 橋爪誠, 安部猛, 萩原明人: 信号検出分析法を用いた 80 歳以上の高齢者心肺停止に対するウツタイン研究報告. 第 40 回日本救急医学会総会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, 京都
26. 永田高志, 橋爪誠, 石井正三: 2011 年世界医師会モンテビデオ宣言 を踏まえた 日本医師会の目指す災害医療教育. 第 40 回日本救急医学会総会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, 京都
27. 永田高志, 橋爪誠, 姫野信吉: 災害支援用 SaaS/Cloud 型電子カルテシステムの開発と普及. 第 15 回日本臨床救急医学会, 2012 年 6 月 16 日, 熊本
28. 永田高志, 橋爪誠: ダーディボム (Dirty Bomb) に備える イスラエルの災害訓練から学ぶ. 第 15 回日本臨床救急医学会, 2012 年 6 月 16 日, 熊本
29. 永田高志, 剣持一, 藤田尚, 坂本哲也, 橋爪誠: 高齢者交通外傷患者の救急隊到着時意識レベルと生命予後に関する調査. 第 40 回日本救急医学会総会学術集会, 2012 年 11 月 14 日, 京都
30. 永田高志, 赤星朋比古, 橋爪誠: 大規模災害において外傷外科医に求められる technical skill と nontechnical skill. 第 37 回日本外科系連合学会, 2012 年 6 月 29 日, 福岡
31. 岡 正倫, 曹 柄炫, 松本 希, 洪 在成, 小宗静男, 橋爪 誠: 困難症例に対する画像ナビゲーションを用いた術後検討. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 11 日, 福岡
32. 賀来典之, 桑城貴弘, 馬場晴久, 李 守永, 野田英一郎, 赤星朋比古, 藤村直幸, 杉森 宏, 橋爪 誠: 小児院外心肺停止患者の予後因子の検討. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会, 2012 年 3 月 1 日, 千葉
33. 桑城貴弘, 賀来典之, 杉森 宏, 馬場晴久, 李 守永, 野田英一郎, 赤星朋比古, 漢那朝雄, 藤村直幸, 橋爪 誠: 自己心拍再開後に ICU 入室となった院外心肺停止症例の検討. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会, 2012 年 3 月 1 日, 千葉
34. 江里口芳裕, 李 守永, 藤村直幸, 杉森 宏, 橋爪 誠, 矢幡秀昭, 和氣徳夫: 妊娠中期に激的な経過をとった A 群溶連菌(GAS)感染症の 1 剖検例. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会, 2012 年 2 月 29 日, 千葉
35. 宗崎良太, 永田公二, 林田 真, 家入里志, 木下義晶, 賀来典之, 李 守永, 馬場晴久, 橋爪 誠, 田口智章: ICU へ入室した小児外傷患者における小児外科医のかかわり. 第 49 回日本小児外科学会, 2012 年 5 月 14-16 日, 横浜
36. 宗崎良太, 家入 里志, 近藤 琢也, 橋爪 誠, 田口 智章: 胃および小腸内の毛髪胃石に対し, x- Gate を用いた単孔式胃内手術と腹腔鏡補助下手術にて摘出した 1 例. 第 32 回小児内視鏡外科・手術手技研究会, 平成 24 年 11 月 1-2 日, 静岡
37. 宗崎良太, 高橋良彰, 林田真, 永田公二, 橋爪 誠, 田口智章: 当科における腸重積症例の検討. 第 26 回小児救急医学会, 2012 年 6 月 1-2 日, 東京
38. 宗崎良太, 木下義晶, 古賀友紀, 住江愛子, 原寿郎, 孝橋賢一, 小田義直, 橋爪 誠, 田口智章: 治療終了後も MIBG シンチ positive, 尿中 VMA/HVA 上昇が継続する症例. JNBSG 研究会, 2012 年 1 月 28 日, 東京
39. 宗崎良太, 家入里志, 木下義晶, 古賀友紀, 住江愛子, 孝橋賢一, 小田義直, 橋爪 誠, 原 寿郎, 田口智章: 小児固形悪性腫瘍に対する術中リアルタイムナビゲーションの有用性. 九州地区小児固形悪性腫瘍研究会, 2012 年 3 月 3 日, 福岡
40. 宗崎良太, 家入里志, 木下義晶, 植村宗則, 古賀友紀, 住江愛子, 孝橋賢一, 小田義直, 原 寿郎, 橋爪 誠, 田口智章: 小児固形悪性腫瘍に対するリアルタイムナビゲーション内視鏡外科手術の試み. 第 25 回日本内視鏡外科学会, 2012 年 12 月 6-8 日, 横浜

41. 宗崎良太、家入里志、木下義晶、植村宗則、古賀友紀、住江愛子、孝橋賢一、小田義直、原寿郎、橋爪 誠、田口智章: 小児固形悪性腫瘍に対するリアルタイムナビゲーション内視鏡外科手術の導入. 第 54 回日本小児血液・がん学会, 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 横浜
42. 小林 洋, 濱野竜太郎, 山崎 望, 渡辺広樹, 豊田和孝, 植村宗則, 家入里志, 富川盛雅, 大平 猛, 洪 在成, 橋爪 誠, 藤江正克: 静脈穿刺支援ロボットの開発と実用化に向けた取り組み. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 3 日, 徳島
43. 杉森 宏, 坂口嘉郎, 白水和宏, 桑城貴弘, 漢那朝雄, 野田英一郎, 橋爪 誠: 大学病院院内 ICU における院内緊急入室患者の検討. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会, 2012 年 2 月 29 日, 千葉
44. 西尾祐也, 野口建彦, 小林 洋, 川村和也, 豊田和孝, 家入里志, 橋爪 誠, 藤江正克: 内視鏡 2 台を用いた術具による遮蔽領域の画像補完手法. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 3 日, 徳島
45. 赤星朋比古, 杉森宏, 藤村直幸, 永田高志, 橋爪 誠, 前原喜彦: 消化管術後敗血症性 DIC に対するリコモジュリン投与の現状と治療成績. 第 40 回日本救急医学会総会, 2012 年 11 月 13 日, 京都
46. 川村和也, 瀬能洗冬, 小林 洋, 豊田和孝, 家入里志, 橋爪 誠, 藤江正克: 狭小な仮想手術環境における井市の捜査情報を利用した手術支援ロボット鉗子機能設計に関する検討. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 2 日, 徳島
47. 大内田研宙, 永井英司, 仲田興平, 前山 良, 清水周次, 橋爪 誠, 田中雅夫: 鏡視下胃切術における患者右側からのこだわり-6 番郭清を中心に-. 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日, 富山
48. 大平 猛, 橋爪 誠: Multi piercing surgery(MPS)による超低侵襲癌局所免疫療法と再生療法: 3mm 細径電子制御鉗子併用の有用性. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 10 日, 福岡
49. 大平 猛, 橋爪 誠: ϕ 3mm 電子制御ロボット使用 Multi piercing surgery (MPS)による超低侵襲膵局所再生療法の確立. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 4 日, 徳島
50. 大平 猛, 橋爪 誠: 内視鏡外科機器開発の諸問題. 第 25 回日本内視鏡外科学会総会, 2012 年 12 月 7 日, 横浜
51. 大平 猛, 長尾吉泰, 徐 号, 森 恩, 橋爪 誠: 電子制御 Needle 型デバイスによる実質臓器癌に対する超低侵襲外科治療法の確立: 直径 3mm 皮切による局所免疫療法・幹細胞再生療法の検討. 第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日, 千葉
52. 池田大作, 落合 真, 鶴島英介, 高木基樹, 荒田純平, 剣持 一, 鎮西清行, 橋爪 誠, 梶田泰一: 内視鏡的脳腫瘍除去システム用微細術具の開発. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 3 日, 徳島
53. 築根まり子, 小林 洋, 宮下朋之, 白石泰之, 山家智之, 橋爪 誠, 藤江正克: 非線形弾性に基づく乳がん診断支援システムの開発〜ロボットマニピュレータによる触診時の乳房変形解析. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 2 日, 徳島
54. 長尾吉泰, 赤星朋比古, 永田高志, 橋爪 誠: 外傷初期診療における消化器外科医の関わりにおける諸問題と対策. 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 20 日, 富山
55. 田代泰隆, 岡崎 賢, 植村宗則, 豊田和孝, 岩本幸英, 橋爪 誠: 三次元 CT/MRI 骨モデルを用いた前十字靭帯二重束再建術の大腿骨孔シミュレーションと術後設置位置の評価. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 11 日, 福岡
56. 唐 衛平, 大平 猛, 徐 号, 長尾吉泰, 橋爪 誠: 径直腸的 NOTES 手術用消化管穿孔用デバイスの開発. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 11 日, 福岡
57. 波多野麻耶, 古林 洋, 鈴木麻記子, 白石泰之, 山家智之, 家入里志, 橋爪 誠, 藤江正克: 乳がんの Preloading 穿刺手法における幾何学的影響の検討. 第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 3 日, 徳島
58. 馬場晴久, 李 守永, 賀来典之, 桑城貴弘, 漢那朝雄, 藤村直幸, 杉森 宏, 橋爪 誠: NO 吸入療法にて酸素化が改善した ARDS の乳児 2 症例. 第 39 回日本集中治療医学会学術集会, 2012 年 2 月 28 日, 千葉
59. 保坂征司, 梅本覚司, 川元俊二, 橋爪 誠, 大平 猛: re-usable single port surgery device の有用性. 第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 19 日, 富山
60. 豊田和孝, 村田正治, 橋爪 誠: OMRI 装置を利用した広範囲レドックスイメージングを実現する ESR 局所コイルロボット. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 10 日, 福岡
61. 曹 柄炫, 岡 正倫, 松本 希, 洪 在成, 橋爪 誠: 画像誘導下耳科手術における高精度レジストレーションを目的とした改良型 STAMP 法の評価. 第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 10 日, 福岡

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 発明の名称: 歯科インプラント手術支援装置
発明者: 橋爪誠、大内田理一、豊田和孝、曹柄炫
出願番号: 特願 2012-111647
出願日 2012/5/15

2) 発明の名称: 骨温度計測装置及び骨加工支援装置
発明者: 橋爪誠、大内田理一、豊田和孝
出願番号: 特願 2012-111646
出願日 2012/5/15

3) 発明の名称: 画像処理装置、撮像システム、およびプログラム
発明者: 橋爪誠、大内田理一、豊田和孝
出願番号: 特願 2012-111648
出願日: 2012/5/15

4) 発明の名称: 開口器
代表発明者 橋爪誠、大内田理一、豊田和孝、曹柄炫
出願番号: 特願 2012-127057
出願日: 2012/6/4

5) 発明の名称: 画像内遮蔽領域の画像補完システム、画像処理装置及び
発明者: 橋爪誠、家入里志、豊田和孝
出願番号: 特願 2012-061285
出願日: 2012/3/15

6) 発明の名称: 下顎管抽出装置、下顎管抽出方法、及びプログラム
発明者: 橋爪誠、大内田理一、豊田和孝
出願番号: 特願 2012-170146
出願日: 2012/7/31

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

II. 分担研究報告

酸性オルガネラにおけるナノカプセルからの薬物放出法の検討

研究分担者 村田正治（九州大学 先端融合医療レドックスナビ研究拠点准教授）

研究要旨

本研究ではウイルスをモデルとするのが新しいドラッグキャリアを開発している。我々が着目したのは、病原性の観点からウイルスそのものではなく、それと非常によく似た構造体を形成する small heat shock protein(Mj285)である。このタンパク質は分子量 16.5KDa のタンパク質 24 個が自己組織化することにより、内孔を有する球状構造体を形成している。厳格な立体構造と、隣接するタンパク質との強固な疎水性相互作用のために、このナノ構造体は非常に安定である。また構造体の内孔は疎水性のアミノ酸残基が配向しており、抗癌剤を含む多くの疎水性薬物を内包することが可能である。

そこで本研究では、このナノ構造体をドラッグキャリアとして利用し、その内孔にpH応答性のリンカーを介して抗癌剤を固定化した新しい薬物送達システムを開発する。今回は上記のナノカプセルの細胞への軽質転換の機序と酸性オルガネラでの薬物放出挙動について報告する。

共同研究者

河野喬仁(九州大学先端融合医療レドックスナビ研究拠点)

橋爪 誠 (九州大学大学院医学研究院)

基づく薬物放出システムを付加する。つまり細胞選択性を細胞内に薬物や遺伝子が入った後で、その活性の発揮を標的細胞シグナルで行うものであり、独自の薬物送達概念である。この二重の選択性によってDDSキャリアとしての特異性は格段に向上することが期待される。

また一方で、カプセルに内包した薬物を如何にして放出するか、についても十分な検討が必要である。タンパク質ナノカプセルは生体温度付近では極めてリジットな構造を有するため、内部に固定化した薬物をリリースするための何らかの工夫が必要である。特に副作用の低減を目指すためには、投与後、血中で漏れ出すことなく、標的細胞の中のみで放出される機序を構築する必要が有る。

この新しい概念を実現するためのキャリアが、古細菌Mj285が構築するタンパク質ナノカプセルである。我々はこれまで高分子ミセルを基材としたDDSキャリアの開発を続けてきた。しかしながらより応答性の高いキャリア開発のためには、極めて洗練された感染機構をもつウイルスの様に、分子量分布のない、厳密に制御された立体構造を有する物質が望ましい。本研究で開発するタンパク質ナノ粒子はこの条件を十分に満たしており、これまででないDDSキャリアと成り得る。興味深いことに、Mj285ナノカプセルの形成は外相に露出したC末端の数残基に依存しており、この領域を制御することによって粒子を崩壊させることができる。また一方で、そのN

A. 研究目的

DDSにおける薬物キャリアとしてこれまでに様々な材料が試されてきた。理想的には薬剤を安定に封じ込める空間を有し、それを標的細胞まで輸送した後に、内包した薬物を有効濃度において放出する特性が望まれる。リポソームや高分子ミセルあるいはゲルなど、いくつかのキャリアにおいては薬剤の効果的な封じ込めと徐放に成功している。しかしながら一方で、in vivoにおける標的細胞特異性や局所での薬物放出能には依然課題が残されている。

従来の細胞ターゲティングは標的細胞表面に存在するマーカー分子を狙ったものである。この戦略は臓器選択性等の発現には効果的である反面、疾患細胞特異的な表面マーカー分子が容易に存在しないため、特に組織内に疾患細胞と正常細胞が混在する病巣においては、その特異性が期待通りには発揮されない。そこで本研究では異常細胞表面に発現する特異的なアンテナ分子を標的とする従来のターゲティングに加えて、さらに細胞シグナルの異常に

末端に配向する疎水性ヘリックスは、構造形成の重要な駆動力となっている。前年度までに、そのC末端にHBVの肝細胞への感染時に使われるタンパク質PreS1を遺伝子レベルで付与することでin vitroにおける肝臓特異性を大幅に向上させることに成功している。そこで本年度は、カプセル内孔のN末端領域にポイントミューテーションを導入し、そこに抗癌剤をバイオコンジュゲートさせる方法を検討する。さらにその抗癌剤には酸性条件下で解裂するリンカーを導入することで、細胞内の酸性オルガネラでのみ抗癌剤をリリースする機構を構築する。このユニークな材料と新しいコンセプトに基づくターゲティングと薬物リリースにより、我々は薬物治療効果の向上と患者のQOL改善を目指している。

B. 研究方法

ナノカプセルの発現と精製

ナノカプセルHspG41Cの遺伝子を定法にしたがって発現ベクターpET21aに挿入した。DNAシーケンシングで遺伝子配列を確認した後、組み換えベクターpET-HSPG41Cを大腸菌株BL21gold (DE3)へ形質転換した。この菌株を100 mg/mLのアンピシリンを含む2×YT培地に接種し、37°Cで振とう培養した。OD600値が0.5に達した際に、終濃度1mMのIPTGを加えて組み換えタンパクの発現を誘導し、そのまま4時間培養を続けた。

培養終了後、培地を遠心分離し、得られたペレットにリン酸緩衝液 (pH7.0) を加えて十分に懸濁させた。これをプローブ型超音波照射装置でソニケーション (200 W, 45 s) し、終濃度がそれぞれ5 および 1 mg/mLのDNase I、RNase Aを加えた。4°Cで遠心分離 (20 000g, 20 min) した後、不溶性分画を除去した。

組み換えタンパク質の精製は HiLoad 26/10 Q Sepharose HP™ アニオン交換カラムでイオン交換クロマトグラフィーを行った。塩濃度グラジエントによってタンパク質を溶離し、分取した各フラクションを SDS-PAGE で分析した。目的のタンパク質を含むフラクションは、TSKgel G3000SW カラムを用いてゲル濾過精製した。得られたタンパク質は MALDI-TOF 質量分析計によって確認した。

ドキシソルビシン-マレイミド ヒドラゾン誘導体 (DOX-EMCH) の合成

ドキシソルビシン塩酸塩 DOX (25 mg, 43 μmol) と EMCH (44 mg, 129 μmol) を 12ml のメタノールに溶解した。これにパスツールピペットを使って、二滴のトリフルオロ酢酸を加えた。遮光下において、そ

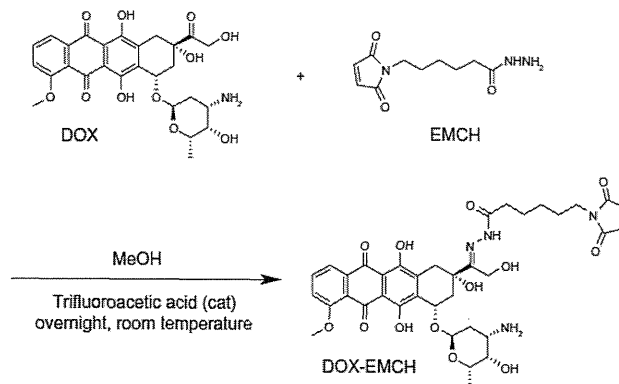


図1 DOX-EMCHの合成スキーム

のまま室温で一昼夜攪拌した。エバポレーションによって反応溶液を 1ml に濃縮し、酢酸エチルから三回再結晶させた。結晶物を回収し、真空乾燥した。生成物は 1H-NMR によって同定した。

DOX-EMCH のナノカプセルへの内包

HspG41C ナノカプセル (3.2mg) 各ナノカプセルをリン酸緩衝液 (pH 7.2) に溶解し、これの DOX-EMCH (0.6mg) を加え室温で 2 時間攪拌した。さらに 4°C で 22 時間放置した後、未反応の DOX-EMCH を限外濾過によって精製した。DOX-EMCH 内包ナノカプセルの粒径を動的光散乱 (DLS) で分析したところ、内包の前後でそのサイズ (約 12nm) に大きな変化は観察されなかった。

(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

ナノカプセルの細胞毒性と細胞への形質転換

細胞実験に先立って、ナノカプセルの細胞毒性を調べたところ、0~100 ug/ml までの濃度領域においては細胞毒性が観察されなかった (図 2)。

また Alexa488 でラベル化したナノカプセルを各種細胞に投与したところ (1μM)、24 時間をと長時間を要するものの、様々な細胞株に形質転換されることが示された (図 3) 恐らくナノカプセルはエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込みまれ田ものと推察される。一般的にエンドサイトーシスの経路は、クラスリン依存性、カベオラ依存性、マクロピノサイトーシス、そしてクラスリン-カベオラ非依存性の四つに分類される。ナノカプセルの取り込み機序を

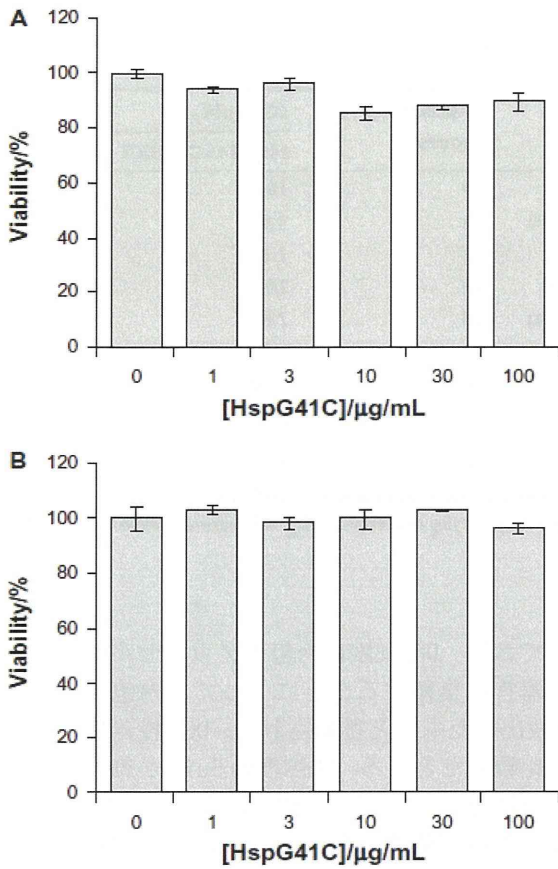


図2 ナノカプセルの細胞毒性

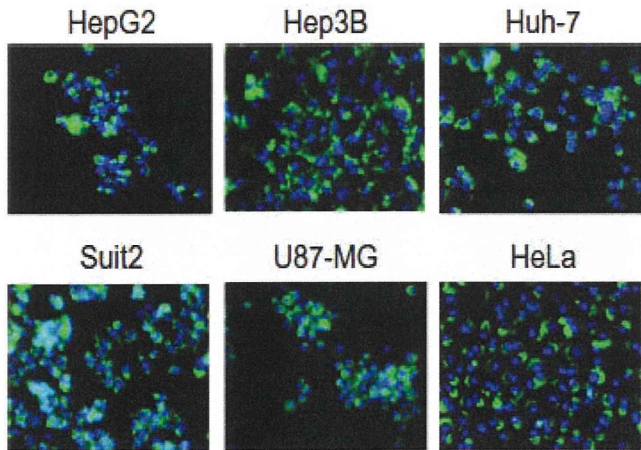


図3 各種細胞によるナノカプセルの取り込み

明らかにするために、各種のエンドサイトーシス阻害剤を用いた阻害実験を行った。実験には、CPZ(クラスリン依存型エンドサイトーシス阻害剤)、Amiloride (マクロピノサイトーシス阻害剤)、Filipin III (カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤) の三種の薬剤を使用した。この結果、ナノカプセルの投与前に細胞を Amiloride (500uM)、あるいは Filipin III (15uM) で処理することにより、その後のナノカプセルの取り込みはそれぞれ8%お

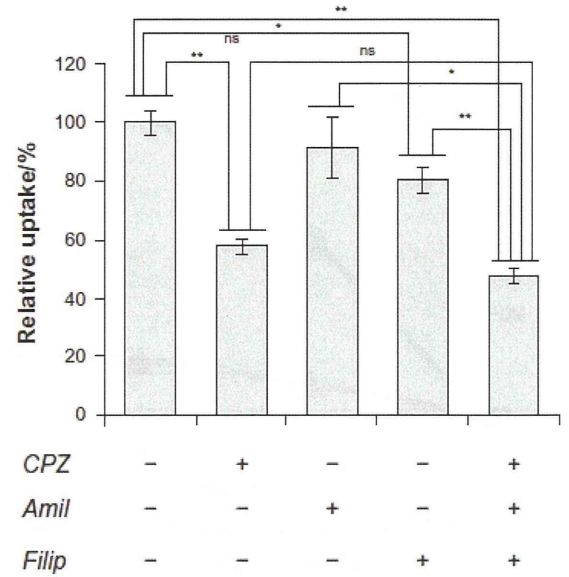


図4 ナノカプセルの取り込み阻害実験

*P < 0.05; **P < 0.01; data represents mean ± standard error of the mean (n = 3).

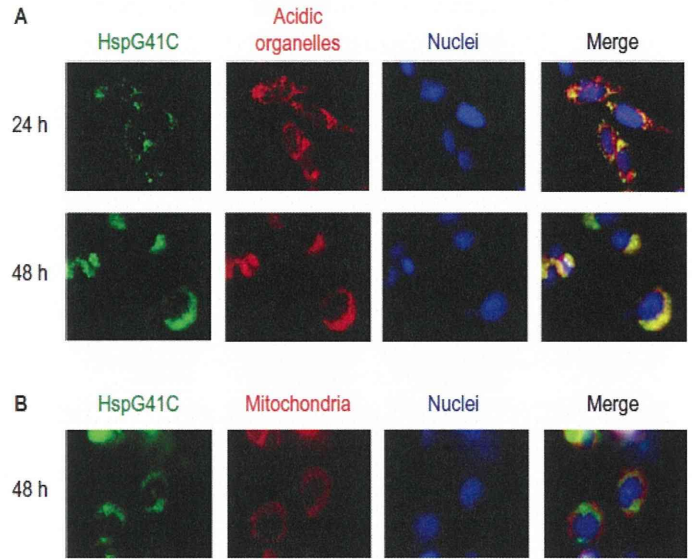


図5 細胞内でのナノカプセルの局在化

酸性オルガネラ (A)、ミトコンドリア (B) をそれぞれ LysoTracker® Red あるいは MitoTracker® Red でそれぞれ染色。HspG41C は Alexa488 でラベル化し、細胞核は Hoechst33342 で染色。所定の時間毎に蛍光顕微鏡により観察。

よび 19%減少した。一方、CPZ (28uM) の添加では、ナノカプセルの取り込みは42%もの大幅な減少が観察され、さらに三種の阻害剤を同時に添加した際には52%の阻害効果が示された。これらの結果は、ナノカプセルの細胞への形質転換がクラスリン依存型エンドサイトーシスによるものであることを示唆している。

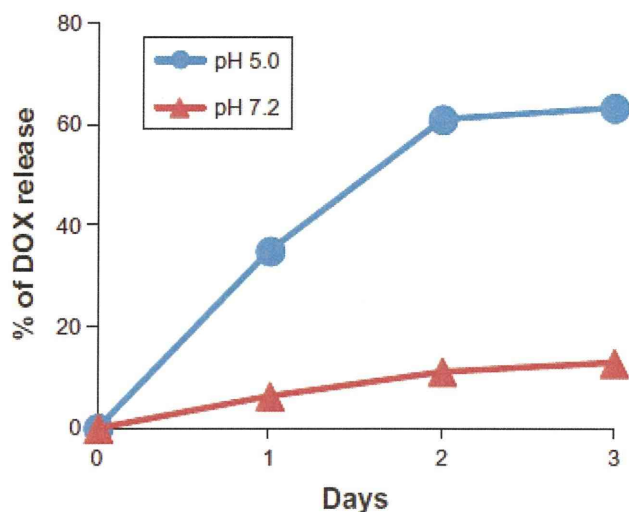


図6 DOX-EMCH内包ナノカプセルからのpH依存的なDOX放出

細胞内におけるナノカプセルの局在

エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれたナノカプセルの局在を共焦点顕微鏡によって観察した(図5)。この結果、Alexa488でラベル化したナノカプセル HspG41C は、培地に投与して24時間後にエンドソームあるいはライソソームに集積しはじめることが分かった。さらに培養を継続し48時間後には、ほとんどのナノカプセルがエンドソームあるいはライソソームに局在した。またナノカプセルのごく一部はミトコンドリアにも観察された。恐らくエンドソームからの離脱にはミトコンドリアへの集積が必要であるためであろう。

DOX-EMCH 内包ナノカプセルからの環境応答型薬剤放出

前述のプロトールにしたがって作成したDOX-EMCH内包ナノカプセルを0.2Mクエン酸緩衝液(pH5.0)あるいは0.2Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、終濃度を52 μ Mとした。これらの溶液を37°Cで所定の時間放置し、カプセルから放出されたDOXを限外濾過(MWCO 100,000)によって精製し、溶液中に含まれるDOXを紫外可視分光光度計により定量した。

この結果、その放出挙動は溶液のpHに依存し、pH5.0においては約60%のDOXがナノカプセルから放出されることが分かった(図6)。一方、pH7.2ではその放出量は10%以下にとどまった。これはDOXとナノカプセルをコンジュゲートしているヒドラゾン結合が酸性条件下で解裂したためであると推察される。

このDOX-EMCH内包ナノカプセルを培養細胞に投与した、その細胞毒性を測定した(表1)。DOX-EMCH内包ナノカプセルの IC_{50} 値は、フリーのDOXと比較すると同程度あるいは若干上昇したが、測定した全ての培養細胞において細胞障害性を有することが分かった。ナノカプセルが細胞内で局在する酸性オルガネラもpH4~6

表1 DOX-EMCH内包ナノカプセルによる各培養細胞に対する IC_{50} 値

Cells	Exposure time (hours)	IC_{50} (μ M)	
		HspG41C-DOX	Free DOX
Huh-7 (hepatoma)	24	16	>30
	48	5.5	10
	72	1.1	1.9
HepG2 (hepatoma)	24	20	4.5
	48	7.8	1.2
	72	4.8	1.2
Suit-2 (pancreatic cancer)	24	>30	>30
	48	4.5	1.6
	72	2.7	1.4

Abbreviations: DOX, doxorubicin; HspG41C-DOX, mutant heat shock protein cage (HspG41C) carrying doxorubicin; IC_{50} , half maximal inhibitory concentration.

とされており、DOX-EMCH内包ナノカプセルはこれらの細胞小器官に集積することによって、内包する抗癌剤DOXを放出したものと推察される。DOX投与前後の細胞形態を比較したところ、未処理のSuit-2細胞が進展しているのに対し、フリーのDOXあるいはDOX-EMCH内包ナノカプセルで処理したSuit-2細胞は球状に変化していた。

D. 考察

DOX-EMCH内包ナノカプセルの細胞障害性がフリーのDOXと比較して低下した理由は、細胞内における両者の局在性の違いによる影響と、内包したDOXの放出率の低さによるものと考えられる。また図6で示したようにDOX-EMCH内包ナノカプセルからのDOX放出速度の遅さも今後の課題である。今後はより酸性条件下で効率的に解裂するリンカー(たとえばcis-aconitylリンカー)等の検討も必要であろう。さらに、今後の動物実験においては標的細胞への選択性を付与し、副作用の低減を一層考慮することが不可欠である。タンパク質ナノカプセルの利点は特定の細胞に対するアンテナ分子となるペプチドリガンドを化学的あるいは遺伝子工学的により簡単にその表面に呈示できることにある。我々はすでに肝癌細胞や肝実質細胞に対する特異性を持ったナノカプセルの設計に成功しており、今後、これらの細胞選択性ナノカプセルへのDOX-EMCHの内包、あるいは同様なシステムをもちいた他の薬剤の内包について検討する予定である。

E. 結 論

pH応答性のリンカーを介して、抗癌剤ドキソルビシンをナノカプセルに内包することに成功した。このDOX-EMCH内包ナノカプセルは、細胞内の酸性オルガネラに局在し、期待通りにDOXを放出することが確認された。放出されたDOXはフリーのDOXと同程度あるいは若干低い細胞障害性を有し、タンパク質ナノカプセルをキャリアとする新しいドラッグデリバリーシステムの構築に有効であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Riki Toita, Masaharu Murata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida and Makoto Hashizume, "Biological Evaluation of Protein Nanocapsules Containing Doxorubicin", *International Journal of Nanomedicine*, in press.
2. Kensuke Kubota, Toshio Doi, Masaharu Murata, Kazu Kobayakawa, Katsumi Harimaya, Keiichiro Shiba, Makoto Hashizume, Yukihide Iwamoto, Seiji Okada, "Disturbance of ribcage development causes progressive thoracic scoliosis: The creation of a nonsurgical structural scoliosis model in mice", *Journal of Bone and Joint Surgery*, 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", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **99**, 7- 11 (2012)
4. Yuki Kawai, Masaharu Murata, Masahiko Hashimoto, Kazuhiko Tsukagoshi, "Tube Radial Distribution of Solvents Observed in an Aqueous Ionic Liquid Mixed Solution Delivered into a Capillary Tube", *Analytical Sciences*, **28**, 1029-1031(2012).
5. Byunghyun Cho, Hee-Ho Lee, Jang-Kyoo Shin, Masaharu Murata, Kenoki Ohuchida and Makoto Hashizume, "DETECTION OF PANCREATIC CANCER CELLS (SUIT-2) USING AN FET-BASED BIOSENSOR WITH AN EXTENDED

Au GATE", *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*, **24**(2), 131-137 (2012)

6. Riki Toita, Masaharu Murata, Shigekazu Tabata, Kana Abe, Sayoko Narahara, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, and Makoto Hashizume, "Development of Human Hepatocellular Carcinoma Cell-Targeted Protein Cages", *Bioconjugate Chemistry*, **23**, 1494-1501(2012)
7. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Kaori Umezaki, Riki Toita, Shigekazu Tabata, Jing Shu Piao, Kana Abe, Jeong-Hun Kang, Kenoki Oouchida, Lin Cui, Makoto Hashizume, "Liver cell specific targeting by the preS1 domain of hepatitis B virus surface antigen displayed on protein nanocages", *International Journal of Nanomedicine*, **7**, 4353-4362(2012)
8. 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", *Journal of Biomedical Materials Research A*, **100A**, 1136-1141(2012)

2. 学会発表

1. 村田正治、"先端医療におけるナノ診断とナノ治療"、第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場
2. 村田正治、榎原 佐由子、朴 晶淑、戸井田 力、河野 喬仁、崔 林、大内田 研宙、橋爪 誠、"タンパク質ナノカプセルの機能化とドラッグデリバリーへの応用"、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学高等教育推進機構
3. 河野 喬仁、村田 正治、朴 晶淑、榎原 佐由子、大内田 研宙、橋爪 誠、"ガドリニウム錯体内包タンパク質ナノカプセルを用いたMRI造影剤の開発"、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学高等教育推進機構
4. 榎原 佐由子、村田 正治、朴 晶淑、戸井田 力、河野 喬仁、崔 林、大内田 研宙、橋爪 誠、"腫瘍標的化タンパク質ナノカプセルの設計と機能評価"、第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年9月7日、北海道大学高等教育推進機構
5. 村田正治、榎原 佐由子、朴 晶淑、河野 喬仁、戸井田 力、崔 林、大内田 研宙、橋爪 誠、"プロテインナノケージの機能化とターゲティングデリバリー"、2012年11月26日、仙台国際センター

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

○出願状況 (計 2 件)

名称：ナノカプセル、組成物、ポリヌクレオチド、
組換えベクター及び形質転換体

発明者：村田 正治 、橋爪 誠

権利者：九州大学

番号：特願 2013-065627

出願年月日：2013 年 3 月 27 日

国内外の別：国内

発明の名称： 共鳴信号増幅用プローブ及び内視鏡用
高周波処置具

代表発明者 橋爪 誠

出願番号： 特願 2012-021708

出願日：2012/2/3

○取得状況 (計 2 件)

発明の名称： 診断システム

代表発明者 橋爪 誠

出願番号： 特願 2010-227295

出願日：2010/10/7

公開日：2012/4/26

公開番号：特開 2012-080939

発明の名称： 診断システム

代表発明者 橋爪 誠

出願番号： PCT/JP2011/070216

出願日：2011-09-06

公開日：2012-04-12

公開番号：W02012/046530

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

がん治療用ナノカプセル型遺伝子キャリアーの機能化

研究分担者 片山佳樹（九州大学大学院 工学研究院 教授）

研究要旨

がん細胞で特異的に送達遺伝子を解放できる次世代ナノ遺伝子キャリアーとして、がん細胞特異的に亢進しているプロテインキナーゼC α に応答して内包遺伝子を放出できるナノ材料の開発を検討した。得られたキャリアーは、標的キナーゼに応答して数百倍の遺伝子発現の活性化を実現できた。また、このナノキャリアーの血中安定化を検討して、キャリアーにポリエチレングリコールを導入することで、安定化を達成した。

共同研究者

森 健(九州大学大学院工学研究院)

A. 研究目的

遺伝子医薬をがん治療に適用する際には、常に正常臓器に対する副作用が問題となる。これを解決するためには従来、がん部へいかに集積させるかに注力する技術開発が試みられてきた。しかしながら、本質的に非標的臓器への分布は避けられず、副作用の問題は未解決のままである。そこで本研究では、遺伝子の発現を高効率に抑制し、それをがん細胞でのみ解放できる新規なナノキャリアーを開発し、がん細胞に高度に特異的な治療システムを開発することを目的とした。その方法として、多くのがんで悪性度や予後の悪さに直接関係があり、正常細胞では活性を有さないプロテインキナーゼC α (PKC α)に着目し、この酵素によってリン酸化されることで遺伝子を解放する新しいシステムの開発を目指した。また、最終的に本システムを血中投与することを考え、血中を安定に循環できるように安定化する方策としてポリエチレングリコール(PEG)コーティングの検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

PKC α に応答する遺伝子ナノキャリアーとしては、カチオン性で、PKC α により特異的にリン酸化される基質ペプチドを高分子主鎖にグラフトしたタイプの分子を考案した。PKC α 特異基質としては、これまでに我々が独自に開発したFKKQGSFAKKKを用いた。まず、直鎖型ポリエチレンイミンに5-chloropentynineを反応してアセチレン基を導入し、PKC α 特異基質のアミノ末端に2-Azido-propionic acidを導入したもののクリック反応により直鎖型ポリエチレンイミンに基質ペプチドをグラフトした。また、PKC α によりリン酸化されないネガティブコントロールとして、リン酸化部位のセリン残基をアラニン残基に置換したペプチドFKKQGAFKKKをグラフトしたキャリアーも同調の方法によって合成した。以後、リン酸化されるキャリアーをLPEI(S)、ネガティブコントロールキャリアーをLPEI(A)と表記する。

プラスミドの内包は、キャリアーとプラスミドを種々の荷電比で混合後、その粒径を生理食塩水及び血清存在下にて動的光散乱方により評価した。また、LPEI(S)とLPEI(A)を用いてそれぞれルシフェラーゼをコードしたプラスミドを内包して、B16、N2A、HepG2、U87の4種のがん細胞株とインキュベートすることでトランスフェクションを行い、シグナル応答性(PKC α による遺伝子発現活性化能)を評価した。その際、従来型のポリアクリルアミド型(PPC(S)およ