

びPPC(A) についても同様に評価して比較した。

また、HepG2を用いて作成した担ガンマウスにおいて、がん部への局注により、LKPEI型と従来のPPC型でその性能を比較した。

さらに、プラスミドを内包したキャリアの血中安定性を向上させるため、PEGの効果を検討した。すなわち、N-Isopropylacrylamide と Succinimidyl-oxo-acrylateを共重合し、活性エステル部に片末端アミノ化PEGを反応し、更に残った活性エステルに保護基を残した基質ペプチドをアミノ末端でペプチド結合により導入、最後に残った活性エステルをイソプロピルアミンと反応してNPAK-PEGを合成した。得られたNPAK-PEGとプラスミドを種々の荷電比で混合して内包し、その安定性を150 mM NaCl、50 ug/mLアルブミン(BSA)存在下にて、粒径の経時変化を動的光散乱法で評価した。さらに、血清耐性についても、種々のPEG導入率において、崩壊により放出されるプラスミドをゲル電気泳動により検出することで評価した。

また、遺伝子発現抑制能も、無細胞発現系（ウサギ網状赤血球ライセート由来）で評価した。

C. 研究結果

得られたLPEI(S)及びLPEI(A)の基質ペプチド導入率と分子量は、それぞれ6.1 mol%・82,000、および7.2 mol%・90,000であった。図1に細胞内のモデルとしての細胞破碎液中でのLPEI(S)とプラスミドの複合体の粒径変化を、従来型のPPC(S)のそれと比較した。PPC(S)/プラスミド複合体では、粒径が時間と共に増大し、凝集していくことが分かるが、LPEI(S)では粒径は一定であり、細胞内環境でも安定であることが分かる。

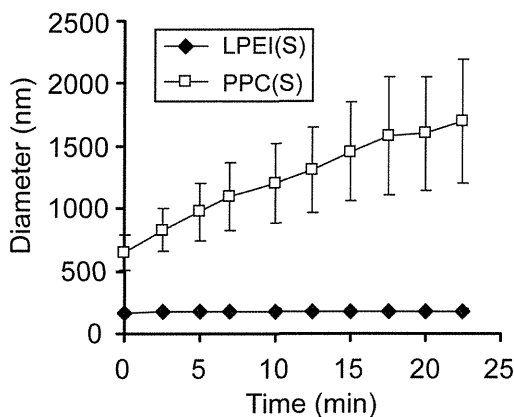


図1 LPEI(S)及びPPC(S)の遺伝子内包複合体の細胞破碎液中における粒径の経時変化

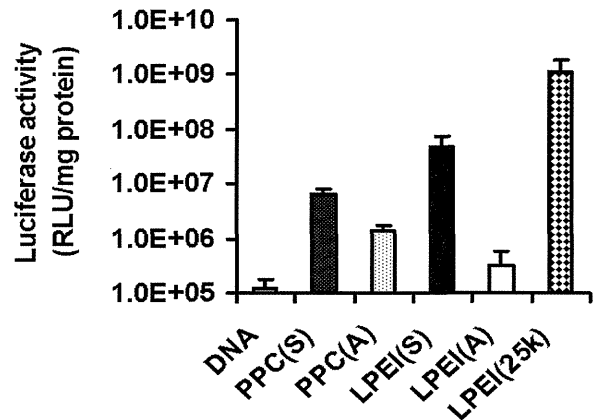
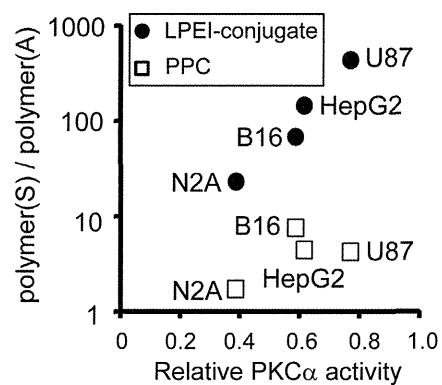


図2 U87細胞におけるLPEI(S)とPPC(S)の遺伝子発現制御能

また、図2にU87グリオーマにおけるLPEI(S)とLPEI(A)、PPC(S)とPPC(A)におけるルシフェラーゼ遺伝子導入時の発現を比較した。従来型のPPCでは、S体とA体の比較、すなわち、PKC α でのリン酸化された場合の発現量の増加は、10倍であるのに対し、LPEI型では400倍と大きく改善できていた。また、発現量そのものも、PPC型に比べ20倍であり、非常に優れた標的キナーゼ応答性を有した遺伝子制御型キャリアであった。

図3には、様々な細胞におけるシグナル応答性をLPEI型とPPC型で比較した。発現量はその細胞のPKC α レベルに依存しており、全ての細胞においてLPEI型の方がシグナル応答性は格段に優れている。本概念



$$\text{Responsiveness to PKC}\alpha = \text{polymer(S)} / \text{polymer(A)}$$

図3 種々の細胞におけるPPC(S)とLPEI(S)のPKC α 応答性の比較

においては、標的シグナルの亢進していない細胞においては、遺伝子を解放せず発現を抑制でき、標的キナーゼが亢進したがん細胞でのみ遺伝子を、正常

細胞に対して出来るだけ大きなコントラストで発現させることが重要である。今回のLPEI型キャリアーは、シグナルに応答しない場合の発現量は、PPC型に比べ高効率に抑制している。これは、主鎖のポリエチレンイミンが静電相互作用によりより強くDNA鎖に結合するためである。一方、標的キナーゼが亢進していると非常に大きく遺伝子発現を活性化できるが、これは、複合体が細胞にエンドサイトーシスで取り込まれた際、高効率にエンドソームから脱出する能力による。主鎖のイミン窒素が弱塩基性であるため、エンドソーム内でpH低下に伴い、これがプロトン化していくpH緩衝作用を発揮してpH低下を抑え、エンドソーム膜のプロトンポンプから次々にプロトンが組み入れられるのに伴い対アニオンである塩素イオンもエンドソームに蓄積して浸透圧が上昇して、ついにはエンドソーム膜を破壊して複合体を細胞質に脱出させる（プロトンスポンジ効果）。図4aは、プラスミドDNAに蛍光標識して、複合体の細胞内導入量を比較した結果、図4bは、エンドソーム上のプロトンポンプの阻害剤でプロトンスポンジ効果をとめた際の遺伝子発現変化率（減少率）である。LPEI型もPPC型も、複合体の細胞内への取り込み量は変わらないが、エンドソーム脱出を抑制すると、PPC型では発現量に大きな変化がない一方、LPEI型では発現量が大きく低下した。これは、LPEI型キャリアーがエンドソーム脱出能に大きく依存していることを示している。

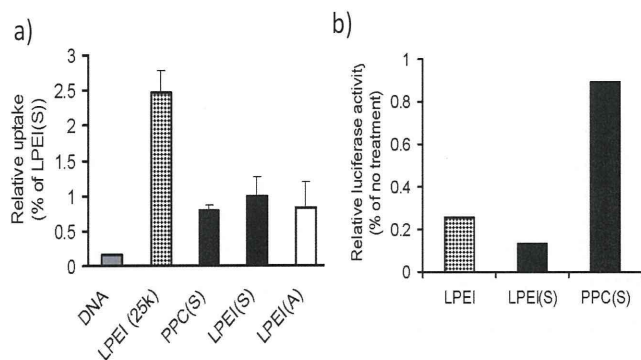


図4 LPEI(S)とPPC(S)の遺伝子内包名の複合体における(a)遺伝子の細胞取り込み量比較と(b)細胞をNigericine処理した際の発現量変化率

さらに、LPEI(S)の担ガンマウスにおける遺伝子の発現制御を検討した。がん細胞と敷いては、血管が多いために、複合体が不安定化してPPC型のシステムでは遺伝子制御が不可能であったHepG2を用いた。図5に結果を示した。がん部と正常しか組織に投与した場合、応答性のないポリエチレンイミンでは、い

ずれの組織においても遺伝子は発現し、PPC型では、複合体が不活化してしまうため、いずれの組織でも発現が見られなかったのに対し、LPEI(S)ではがん部でのみ遺伝子の発現が見られた。

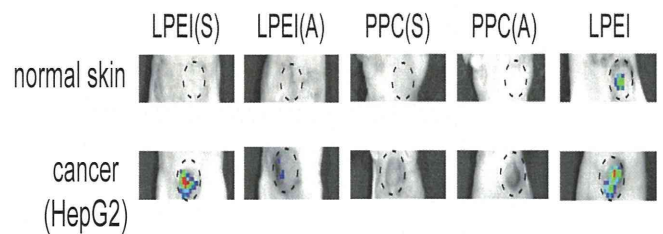


図5 HepG2担ガンマウスにおけるLPEI(S)/(A)とPPC(S)/(A)におけるがん部と正常皮下での発現状況

上記のようにLPEI(S)型は優れた性能を示したが、未だ、血中での安定性が充分ではなく、静注によっては十分な性能が発揮できなかった。そこで、複合体のさらなる血中での安定化を目指して、キャリアーに対してPEG鎖の導入を試みた。PEG導入量としては、0.6 mol%、3.3 mol%、6.8 mol%の3種類を合成した。ペプチドの導入率はいずれにおいても3.5 mol%である。これらを、それぞれ、NPAK-PEG(0.6)、NPAK-PEG(3.3)、NPAK-PEG(6.8)と標記する。水中におけるこれら3種のキャリアーのプラスミドDNA内包ナノ粒子の粒径は、いずれも100-120 nmで大きな差はなかった。と電位は、PEG導入率に依存して、10 mVから5 mVまで減少した。これらを用いてプラスミドDNAと種々の荷電比を用いて検討したところ、荷電比(N/P)が2以上で安定な複合体が形成できることが分かったため、いかの実験では荷電比4を用いた。この複合体の安定性を評価したところ、150 mMの塩化ナトリウムおよび血清アルブミンの存在下においても粒径は全く変化しなかった(図6)。また、血清存在下でも同様に複合体の崩壊は見られなかった。以上のように、PEG鎖の導入によって事実上、血中での複合体の凝集や解離は抑制できることを見出した。ただ、遺伝子を内包した複合体における発現の抑制能を評価したところ、図7のようにPEG導入率の高いNPAK-PEG(7.8)においては、全く抑制できないという結果となった。これは、PEG鎖の立体反発により、DNA鎖が効率よく凝縮出来なくなったためであると考えられた。従って、PEG鎖の導入率は、本システムの場合には3.3 mol%が最適値であることが分かった。

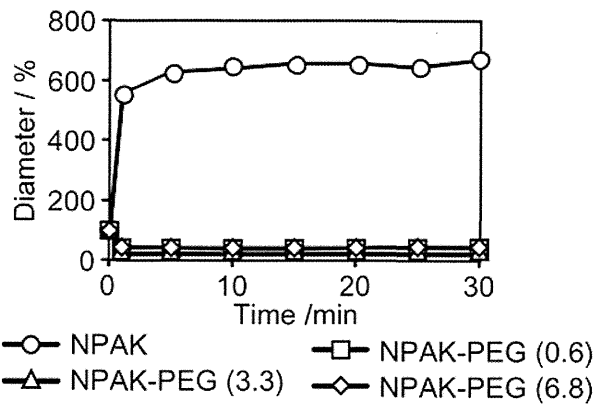


図6 NPAK-PEGにおける150 mM NaCl, 50 uM BSA存在下における遺伝子内包ナノ複合体の粒径経時変化

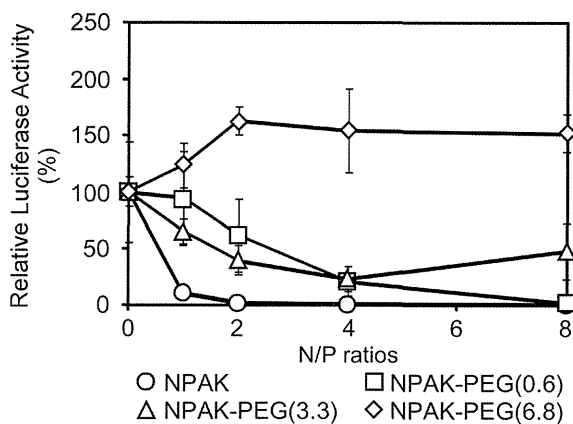


図7 NPAK-PEGの遺伝子抑制能比較

D. 考 察

今回開発したLPEI(S)は、従来開発していたPPC(S)に比較して格段の遺伝子制御能 (PKC α シグナル応答能) を示した。これは、キャリアの主鎖高分子として従来の中性のポリアクリルアミドではなく、カチオン性のポリエチレンイミンを用いたことにより、遺伝子をより強く凝縮させ、発現を抑制できたことと、ポリエチレンイミンのものが有する高いエンドソーム脱出能に基づいていると考えられる。実用的には、正常組織ではたとえ、複合体が細胞に取り込まれても、発現を完全に抑制できれば副作用を抑えることが可能と考えられる。その意味で、LPEI(S)の高い遺伝子抑制能と、PKC α シグナルに応答する大きな発現活性化能は非常に有望な性能である。

一方、さらに複合体の血中安定性を高めるためには、キャリアと遺伝子の相互作用を強めるだけでなく、その外側を血清成分と相互作用しない性質の分子で被覆する方が効果的である。ここでは、生

体成分にステルス性があるPEG鎖を導入することで安定化を図ったが、確かに非常に大きな安定効果が得られた。これは、PEGの有する大きなサイズ排除効果によるものであると考えられるが、一方でこの効果は、遺伝子の効率よい凝縮も妨げるので、キャリアの持つ遺伝子の抑制能自体も低下させる結果となった。したがって、この戦略を用いるためにはキャリアごとに導入するPEGの量を最適化する必要があると考えられる。

E. 結 論

多くのがん細胞でその悪性度や予後の悪さに直接関連するPKC α シグナルに応答して遺伝子発現を活性化できる新規なナノキャリアの開発に成功した。本キャリアは正常組織において発現がほとんど無視できるレベルに抑制した条件で、がん細胞に大きな発現を引き起こせるもので、がん細胞に高度に特異的な遺伝子治療システムとして期待できる。さらに、このタイプのキャリアにPEG鎖を導入すると、さらに血中安定性が大きく向上することを見出した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsuchiya A, Asai D, Kang J-H, Mori T, Niidome T, Katayama Y, "Correlation between phosphorylation ratios by MALDI-TOF MS analysis and radioactivities by radioactive assay", *Anal. Biochem.*, **421**, 773-775 (2012)
- 2) Toita R, Kang J-H, Tomiyama T, Kim C-W, Shiosaki S, Niidome T, Mori T, Katayama Y, "Gene carrier showing all-or-none response to cancer cell signaling", *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 15410-15417 (2012)
- 3) Tahara Y, Kaneko T, Toita R, Yoshiyama C, Kitaoka T, Niidome T, Katayama Y, Kamiya N, Goto M, "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*, **161**, 713–721 (2012)

4) Toita R, Mori T, Naritomi Y, Kang J-H, Shiosaki S, Niidome T, Katayama Y, “Fluorometric detection of protein kinase Calpha activity based on phosphorylation-induced dissociation of a polyion complex”, *Anal. Biochem.*, **424**, 130–136 (2012)

5) Tsuchiya A, Naritomi Y, Kushio S, Kang J-H, Murata M, Hashizume M, Mori T, Niidome T, Katayama Y, “Improvement in the colloidal stability of protein kinase-responsive polyplexes by PEG modification”, *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **100**, 1136–1141 (2012)

6) Tanaka H, Mori T, Niidome T, Katayama Y, “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

1) 片山佳樹: ペプチド／高分子材料を用いる疾患特異的医療システムの創製. 日本学術振興会・分子ナノテクノロジー第 174 委員会 研究会, 2012 年 12 月 14 日, 東京

2) 片山佳樹: 創薬及び診断のためのキノーム解析用ペプチド・プロテインアレイ. 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11–13 日, 福岡

3) 片山佳樹: 創薬・診断・リスク評価のための細胞機能評価用バイオチップ. 福岡新テクノロジー創成シンポジウム, 2012 年 11 月 27 日, 福岡

4) Yoshiki Katayama: Novel Cell Signal-responsive Polyplexes for Improved Colloidal Stability and Cell Specificity in Gene Delivery. The 1st International Symposium on Application of Biomolecular Devices for Sustainable Functional Materials, 2012 年 10 月 19 日, 仙台市

5) Takeshi Mori, Kyohei Tobinaga, Masayoshi Matsuda, Masafumi Takeo, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama: Co-endocytosis and Co-receptor: Controlling cell functions via modification of cell surface. The 2nd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, 2012 年 08 月 29–31 日, Taiwan

6) Yoshiki Katayama: Intracellular signal-responding materials for new strategy of cell-specific gene delivery and in vivo imaging of disease functions. The 2nd International Symposium of Materials on Regenerative Medicine, 2012 年 08 月 29–31 日, Taiwan

7) Yoshiki Katayama: Intracellular signal-responding materials for new strategy of cell-specific gene delivery and in vivo imaging of disease functions. The 1st International Symposium on Polymer Ecomaterials, 2012 年 08 月 19–22 日, Changchun, China

8) 金燦宇、森健、新留琢郎、片山佳樹: Enhanced stability of cancer signal-responsive nanocarrier to improve the specificity of gene therapy. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 2012 年 7 月 4–5 日, 札幌市

9) 土谷享、森健、新留琢郎、片山佳樹: プロテインキナーゼ応答型ポリマーの分子修飾とポリマー／DNA 複合体の安定性. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 2012 年 7 月 4–5 日, 札幌市

10) 串尾聡之、土谷享、森健、新留琢郎、片山佳樹: 腫瘍の低 pH 及び細胞内シグナル異常に応答する二重ターゲット遺伝子キャリアの開発. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 2012 年 7 月 4–5 日, 札幌市

11) Shujuro Shisaki, Masanori Kuramoto, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama: Protease imaging system by using polyion-complex and its application to prostate cancer. 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2012 年 07 月 15–19 日, Quebec, Canada

12) 中村雄大、土谷享、森健、新留琢郎、片山佳樹: 細胞内シグナルに応答する分岐状ポリエチレンイミンによる遺伝子デリバリー. 第 49 回化学関連支部合同九州大会, 2012 年 06 月 30 日, 北九州市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

分担研究報告書

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

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

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ている。なかでも MRI 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。MRI 造影剤の利用は病変部位の明瞭な描画のために必要不可欠の手段となりつつある。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。そこで本研究では、癌部ターゲティングが可能なキャリアと MRI 造影剤の複合化を目的とした。

本年度はタンパク質ナノカプセルの内孔に配向しているヘリックスの改変によるカプセル構造の改良、ならびに造影機能の改善を目指した。具体的には、遺伝子組み換えによってN末端の疎水性ヘリックスをリピートさせた変異体（リピート数1~4）を作成し、大腸菌から大量発現した。これらの組み換えタンパク質をクロマトグラフィーによって精製し、その物性を動的光散乱法（DLS）によって評価したところいずれも数十nmの粒径をもつナノ構造体であった。またサーマルシフトアッセイにより、各変異体の熱的安定性を測定したところリピート数の増加と共に安定化することが示された。これらの結果は、N末端のヘリックスがナノ構造の安定化に大きく寄与していることが示唆された。

共同研究者

神代竜一（九州大学大学院医学研究院）

河野喬仁（九州大学大学院医学研究院）

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。最近では Open 型 MRI 装置の登場により、単なる検査機器ではなく、治療も含めた有用性の高い手技として大きく発展している。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る。また撮像には患者をガントリ内に入れる必要があり、術中リアルタイムに摘出部位の位置を確認するには適していない。そこで本研究では診断の精度と感度を向上させ、疾患の治療効果を上げるために、これまでの造影剤とは一線を

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

画する新しいマルチモーダル型イメージング造影剤の開発を目指す。

そこで本研究では、生体の機能を生体内外の物質や細胞機能等を利用して分子レベルで可視化する、いわゆる分子イメージング技術を導入した新しい MRI 機能化造影剤を開発する。この機能化造影剤のプラットフォームとして、タンパク質ベースのナノカプセルを用いる (図 1)。このバイオナノカプセルは内孔 (内径 10nm) を有する球状構造体 (24 量体、外径 15nm) を形成するため、その内部にガドリニウム錯体を内包することが可能である。我々はすでにこのバイオナノカプセルの遺伝子クローニングに成功し、大腸菌を使った大量発現系と精製法を確立している。

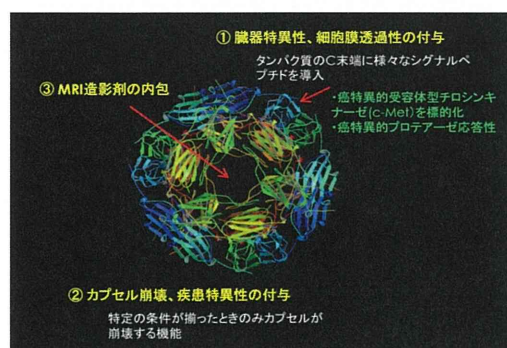


図 1 バイオナノカプセルの機能化

B. 研究方法

N 末端疎水性ヘリックスリピート変異体のクローニング

HSP16.5-G41C をコードするベクター (pET21-HSP16.5-G41C-iRGD) 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- GAAGGAGATATACATATGTTCCGGAAGA-3、Rv-primer ; 5- GGCGGATTAATGGTGTGAGCTTGAATCATTGTGGTTC-3。反応生成物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。

NA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 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。

C. 研究結果

まず最初に、発現した 4 種類の N 末端ヘリックスリピート変異体 (NHelix 1~NHelix 4) の内、

疎水性ヘリックスの4回リピート体 NHelix 4 だけはインクルージョンボディとして発現したため、その後の精製は断念した。この他のナノカプセルの粒径を動的光散乱法(DLS)によって測定したところ、NHelix 1 は 13.5nm、NHelix 2 は 21.0nm、NHelix 3 は 32.7nm 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。

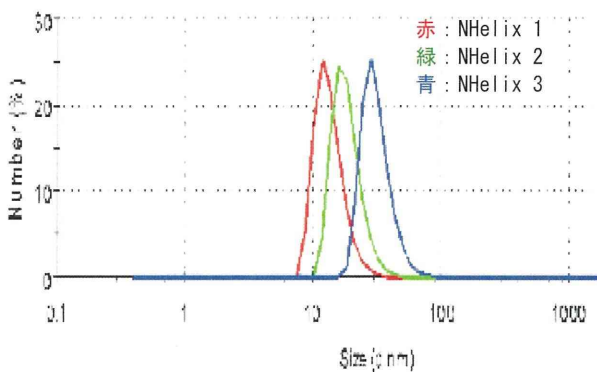


図2 ナノカプセルの粒径測定

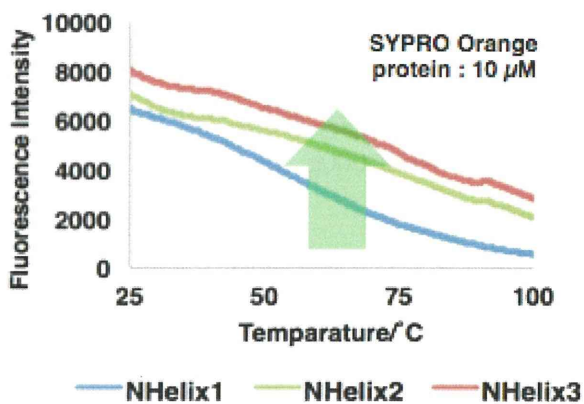


図3 ナノカプセルの熱安定性

次に、これらのナノカプセルの熱的安定性を Thermal shift Assay により測定した (図3)。蛍光試薬として SYPRO Orange を共存させ、一定速度で 25°C から 100°C に昇温した際の蛍光強度変化を測定した。この結果、全てのナノカプセルは温度の上昇と共に蛍光強度が低下する傾向が観察された。SYPRO Orange はタンパク質の疎水場に集

積して強い蛍光を示すことが知られており、この結果は温度の上昇と共にナノカプセルの疎水場が減少していることを示唆している。おそらく温度上昇に伴う分子運動の向上により、球状構造が融解し、カプセル内部の疎水場が減少したためであると推察される。興味深いことに、蛍光強度の絶対値は、NHelix 1 < NHelix 2 < NHelix 3 の順に大きくなった。これはN末端ヘリックスリピート変異体において、疎水性ヘリックスのリピート数が多いほど、熱的に安定であることを示唆している。

ナノカプセル内孔への MRI 造影剤の固定化

各ナノカプセルを リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、10 当量のマレイミド化 Gd-DTPA 溶液 (図4) 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5)。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。

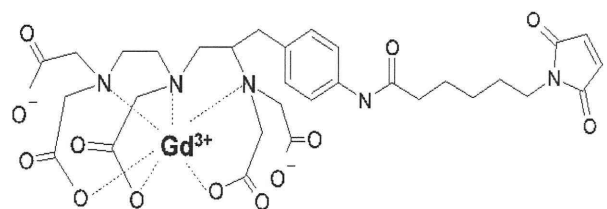


図4 Gd-DTPA-maleimideの化学構造

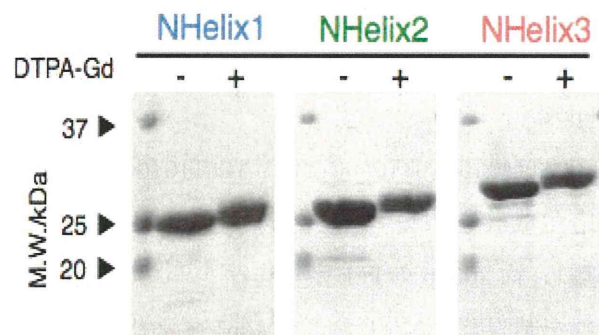


図5 Gd-DTPA内包ナノカプセルのSDS-PAGE

ナノカプセル型 MRI 造影剤の性能評価

各 Gd-DTPA 内包ナノカプセルを 100mM リン酸緩衝液(pH7.4)で希釈し、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ー法により T_1 緩和度を得た(図 5)。

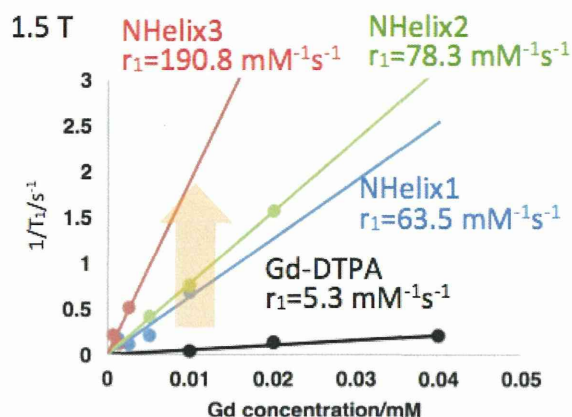


図6 Gd-DTPA内包ナノカプセルの緩和度 (1.5T)

D. 考 察

造影剤の緩和度測定の結果、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 NHelix3 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。

カプセルへの内包、そして N 末端ヘリックスリピート数の増加と共に、内包した Gd-DTPA の緩和度が向上した理由は今後の検討が必要である。しかし、おそらくカプセルの剛直性 (安定性) や内孔の疎水性の向上が、Gd-DTPA の緩和度を決定するパラメータに影響を与えたものと推察される。この点については今後、引き続き検討する予定で

ある。また高磁場 MRI での緩和度測定や病態モデル動物を使った in vivo イメージングについても今後検討する必要がある。

E. 結 論

ナノカプセルの N 末端ヘリックスをリピートした変異体を設計・発現することに成功した。これらの変異体はヘリックスのリピート数が増加すると共にその構造が剛直化し、内部の疎水性も高まることが分かった。さらにそれらの内孔に MRI 造影剤 Gd-DTPA を化学的に固定化したところ、最大で 36 倍に高感度化することが分かった。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) Tomikawa M, Akahoshi T, Kinjo N, Uehara H, Hashimoto N, Nagao Y, Kamori M, Kumashiro R, Maehara Y, Hashizume M:

Rigid and flexible endoscopic rendezvous in spatium peritonealis may be an effective tactic for laparoscopic megasplenectomy: significant implications for pure natural orifice transluminal endoscopic surgery.

Surg Endosc Dec;26(12):3573-9, 2012

- 2) Tomikawa M, Korenaga D, Akahoshi T, Konishi K, Sugimachi K, Nagao Y, Tsutsumi M, Takenaka K, Kakeji Y, Hashizume M, Maehara Y:
Quality of life after laparoscopy-assisted pylorus-preserving gastrectomy: an evaluation using a questionnaire mailed to the patients.
Surgery Today 42: 625-632, 2012
- 3) Bartolomeo L, Zecca M, Sessa S, Lin Z, Ishii H, Xu H, Uemura M, Nagao Y, Tomikawa M, Hashizume M, Takanishi A:
Biomechanical Analysis of Induced Mental Stress in Laparoscopy Surgical Training by surface Electromyography.
IEEE, 1031-3, 2012
- 4) Ieiri S, Uemura M, Konishi K, Souzaki R, Nagao Y, Tsutsumi N, Akahoshi T, Ohuchida K, Ohdaira T, Tomikawa M, Tanoue K, Hashizume M, Taguchi T:
Augmented reality navigation system for laparoscopic splenectomy in children based on preoperative CT image using optical tracking device.
Pediatr Surg Int 28(4): 341-346, 2012
- 5) 富川盛雅, 大内田研宙, 家入里志, 橋爪 誠:
肝・胆・膵・脾のrobotic surgery.
外科 74(8): 834-837, 2012
- 6) 富川盛雅, 大内田研宙, 家入里志, 橋爪誠
【Robotic surgery の今】肝・胆・膵・脾の robotic surgery
外科(0016-593X)74 巻 8 号: 834-837, 2012
- 7) 大内田研宙, 家入里志, 劍持 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
- 8) 長尾吉泰, 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠:
特集: 手術前に必読 局所解剖
V. 肝・胆・膵・脾の手術 12.胃・食道静脈瘤の手術に必要な局所解剖.
臨床雑誌「外科」 74(12): 1419-1424, 2012
- 9) 赤星朋比古, 神代竜一, 富川盛雅, 橋爪 誠:
S-Bチューブ挿入.
消化器外科 35(10) 通巻 440 号: 1533-1536, 2012
- 10) 植村宗則, 田代泰隆, 神代竜一, 長尾吉泰, 富川盛雅, 橋爪誠:
【先端技術新潮流～画像ガイド下治療】 一般外科・整形外科領域における Augmented Reality 技術を用いた病変可視化システムの現状
映像情報Medical(1346-1354)44 巻 6 号: 524-528, 2012

2. 学会発表

- 1) Tomikawa M, Akahoshi T, Nagao Y, Hashizume M:
Rigid and flexible endoscopic rendezvous in spatium peritonealis may be an effective tactic for laparoscopic megasplenectomy: significant implications for pure NOTES.
SAGES, March 6-10, 2012, SanDiego, USA
- 2) Ishii H, Uemura M, Takanishi A, Tomikawa M, Hashizume M:
Development of intelligent laparoscopic

training system: design of parallel manipulator to mimic motion of organ in abdominal cavity. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy

3) Nagao Y, Uemura M, Akahoshi T, Tomikawa M, Hashizume M:
Novel portal vein pressure monitoring method for patient with portal hypertension using computation fluid dynamics. Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy

4) Souzaki R, Ieiri S, Uemura M, Tomikawa M, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, Oda Y, Hara T, Hashizume M, Taguchi T:
Augmented reality navigation system for laparoscopic surgery for small recurrence tumor based on preoperative CT image. SIOP asia 2012, April 20th~25th , Yogyakarta, Indonesia, 2012

5) Uemura M, Tashiro Y, Kumashiro R, Tomikawa M, Hashizume M:
Validity of newly-developed augmented reality navigation system for arthroscopic surgery. The 34th Annual International IEEE EMBS Conference, August 28-September 1, 2012, San Diego, California, USA

6) Uemura M, Tomikawa M, Nagao Y, Ieiri S, Hashizume M:
A new laparoscopic surgical skill assessment system for bi-hand coordination using magnetic

tracking systems.

Computer Assisted Radiology and Surgery 25th International Congress and Exhibition (CARS 2012), June 27-30, 2012, Pisa, Italy

7) 富川 盛雅, 赤星 朋比古, 橋本 直隆, 長尾 吉泰, 前原 喜彦, 橋爪 誠:
門脈圧亢進症 肝性脳症に対するバルーン閉塞下逆行性経静脈的塞栓術とその治療成績の向上を目指した新たな工夫.
第 48 回日本肝臓学会総会, 平成 24 年 6 月 7-8 日, 金沢

8) 富川 盛雅, 植村 宗則, 神代 竜一, 大内田 研宙, 家入 里志, 石井 裕之, 大平 猛, 橋爪 誠:
内視鏡外科手術の効果的トレーニング法の開発と評点システムを導入したヘルニア修復術トレーニング.
第 74 回日本臨床外科学会総会, 2012 年 11 月 29 日-12 月 1 日, 東京

9) 富川 盛雅, 植村 宗則, 長尾 吉泰, 神代 竜一, 宗崎 良太, 赤星 朋比古, 大内田 研宙, 家入 里志, 田上 和夫, 大平 猛, 橋爪 誠:
術者あるいは指導的助手として内視鏡外科手術を経験していることの客観的評価とトレーニング指針.
第 25 回 日本内視鏡外科学会総会, 2012 年 12 月 6-8 日, 横浜

10) 富川 盛雅, 赤星 朋比古, 堤 敬文, 長尾 吉泰, 家守 雅大, 神代 竜一, 橋本 直隆, 大内田 研宙, 家入 里志, 大平 猛, 前原 喜彦, 橋爪 誠:
Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery を想定した脾摘術の意義と新しい先端医療機器開発への取り組み.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 平成 24 年 4 月 12-14 日, 千葉

11) 富川盛雅, 小田昌宏, 神代竜一, 赤星朋比古, 橋本直隆, 長尾吉泰, 掛地吉弘, 森 健策, 前原喜彦, 橋爪 誠:

コンピューター診断支援システム NewVES を応用した消化器外科領域の治療シミュレーション.

第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日, 富山

12) 富川盛雅, 植村宗則, 神代竜一, 豊田和孝, 岡 正倫, 井上大輔, 森 恩, 宗崎良太, 大内田研宙, 家入里志, 大平 猛, 橋爪 誠:

内視鏡外科手術トレーニングセミナーにおける技術評価タスクの成績の解析.

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

13) 富川盛雅, 赤星朋比古, 橋本直隆, 長尾吉泰, 前原喜彦, 橋爪 誠:

脳性脳症に対するバルーン閉塞下逆行性経静脈的寒栓術とその治療成績の向上を目指した新たな工夫.

第 48 回日本肝臓学会総会, 2012 年 6 月 7 日, 石川

14) 富川盛雅, 赤星朋比古, 堤 敬文, 長尾吉泰, 家守雅大, 神代竜一, 橋本直隆, 大内田研宙, 家入里志, 大平 猛, 前原喜彦, 橋爪 誠:

Natural Orifice Translumenal Endoscopic Surgery を想定した脾摘術の意義と新しい先端医療機器開発への取り組み.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日, 千葉

15) 富川盛雅, 長尾吉泰, 赤星朋比古, 橋爪 誠:

流体力学的解析を応用した門脈圧推定の試み.

第 19 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2012 年 9 月 7 日, 東京

16) 富川盛雅, 木口量夫, 家入里志, 大内田研宙, 服部麻木, 鈴木直樹, 橋爪 誠:

計算解剖モデルの診断・治療の融合的支援応用.

第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 10 日, 福岡

17) 富川盛雅, 長尾吉泰, 植村宗則, 吉田正樹, 堀 淳一, 石井裕之, 大内田研宙, 赤星朋比古, 家入里志, 大平 猛, 橋爪 誠:

単孔式鼠径ヘルニア修復術に対するドーム型立体映像表示システムの有用性.

第 10 回日本ヘルニア学会学術集会, 2012 年 4 月 27-28 日, 名古屋

18) 富川盛雅, 長尾吉泰, 植村宗則, 吉田正樹, 堀 淳一, 石井裕之, 大内田研宙, 赤星朋比古, 家入里志, 大平 猛, 橋爪 誠:

単孔式鼠径ヘルニア修復術に対するドーム型立体映像表示システムの有用性.

第 6 回単孔式内視鏡手術研究会, 2012 年 8 月 24-25 日, 札幌

19) 家入里志, 宗崎良太, 大内田研宙, 植村宗則, 富川盛雅, 木下義晶, 古賀友紀, 住江愛子, 孝橋賢一, 小田義直, 原寿郎, 田口智章, 橋爪 誠:

小児内視鏡外科手術における画像支援手術 (Augmented Reality ナビゲーション・3D) のもたらす未来.

第 25 回日本内視鏡外科学会総会, 2012 年 12 月 7 日, 横浜

20) 家入里志, 宗崎良太, 長尾吉泰, 大内田研宙, 赤

星朋比古, 大平 猛, 富川盛雅, 田口智章, 橋爪 誠:
九州大学病院におけるロボット手術の普及へ向けた取り組み・ロボット外科医の教育と新規国産手術支援ロボットの研究開発.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日, 千葉

21) 家入里志, 石井裕之, 宗崎良太, 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(第 2 報) ~噴門形成中における呼吸性移動モデル~.

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

22) 家入里志, 石井裕之, 宗崎良太, 富川盛雅, 松岡紀之, 高西淳夫, 田口智章, 橋爪 誠:

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.

第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 11 日, 福岡

23) 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.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日, 千葉

24) 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.

第 112 回日本外科学会, 2012 年 4 月 12-14 日, 千葉

25) 徐 号, 富川盛雅, 植村宗則, 家入里志, 橋爪 誠:
MRI ガイド腹腔内臓器手術に対応する生体内用蒟蒻コンプレックスマーカートの開発.

第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 10 日, 福岡

26) 小林 洋, 関口雄太, 野口建彦, 高橋 悠, 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:

単孔式手術の支援を目的とした術具マニピュレータの開発.

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

27) 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

28) 植村 宗則, 大平 猛, 富川 盛雅, 田上 和夫, 橋爪 誠:

簡便かつ汎用性の高い単孔式内視鏡手術トレーニングアタッチメントデバイスの開発.

Reduced port surgery Forum, 2012 年 8 月 24-25 日, 札幌

29) 植村 宗則, 富川 盛雅, 神代 竜一, 家入 里志, 橋爪 誠:

内視鏡外科手術における両手協調運動評価システムの有用性,

第 25 回日本内視鏡外科学会総会, 2012 年 12 月 6-8 日, 横浜

30) 植村宗則, 神代竜一, 家入里志, 大内田研宙, 布施健一, 富川盛雅, 橋爪 誠:

内視鏡外科手術における客観的消化管縫合技術評価シミュレータの開発.

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

31) 植村宗則, 富川盛雅, 長尾吉泰, 家入里志, 橋爪 誠:

A Skill Assessment System for Bi-Hand Coordination in Endoscopic Surgery Training.

第 51 回日本生体医工学会大会 JSMBE, 2012 年 5 月 10-12 日, 福岡

32) 植村宗則, 富川盛雅, 長尾吉泰, 家入里志, 橋爪 誠:

内視鏡外科手術における Bi-Hand Coordination 技術評価系に関する研究.

第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 10 日, 福岡

33) 植村宗則, 神代竜一, 家入里志, 大内田研宙, 布施健一, 富川盛雅, 橋爪誠:

内視鏡外科手術における客観的消化管縫合技術評価シミュレータの開発.

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

34) 森 恩, 千葉 亨, 神代竜一, 村田正治, 富川盛雅, 井上大輔, 吉川雄一郎, 天野敏之, 村上伸哉, 中溝 玲, 吉本幸司, 溝口昌弘, 佐々木富男, 橋爪 誠:
脳外科疾患に対するハイパースペクトルカメラを用いた分光解析手法.

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

35) 森 恩, 千葉 亨, 村田正治, 富川盛雅, 井上大輔, 佐々木富男, 橋爪 誠:

ハイパースペクトルカメラ技術の脳神経外科疾患への応用.

第 51 回 日本生体医工学会大会, 2012 年 5 月 11 日, 福岡

36) 森恩、千葉亨、井上大輔、村田正治、富川盛雅、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男、橋爪誠:

ハイパースペクトルカメラ技術の脳外科手術への応用検討.

第 35 回日本脳神経 CI 学会, 2012 年 3 月 2-3 日, 横浜

37) 森恩、千葉亨、吉川雄一郎、中溝玲、村田正治、富川盛雅、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男、橋爪誠:

ハイパースペクトルカメラを用いた脳表血流評価手法の検討.

第 37 回日本脳卒中学会総会, 2012 年 4 月 26-28 日, 福岡

38) 森恩、千葉亨、神代竜一、井上大輔、村田正治、富川盛雅、天野敏之、村上信哉、中溝玲、吉本幸司、溝口昌弘、佐々木富男、橋爪誠:

ハイパースペクトルカメラを用いた脳神経外科疾患の分光解析手法.

第 71 回脳神経外科学会学術総会, 2012 年 10 月 17-19 日, 大阪

39) 神代竜一, 赤星朋比古, 長尾吉泰, 安藤幸滋, 佐伯浩司, 沖 英次, 大賀丈史, 富川盛雅, 掛地吉弘, 前原喜彦, 橋爪 誠:

ハイパースペクトル内視鏡を用いた大腸腫瘍性病変における酸素飽和度の可視化.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 14 日, 千葉

40) 神代竜一, 赤星朋比古, 長尾吉泰, 佐伯浩司, 沖英次, 大賀丈史, 富川盛雅, 掛地吉弘, 前原喜彦, 橋爪 誠:

ハイパースペクトルカメラを用いた大腸病変における酸化ヘモグロビンの濃度変化に関する検討.

第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日, 富山

41) 神代竜一, 赤星朋比古, 武谷憲二, 安藤幸滋, 佐伯浩司, 沖英次, 富川盛雅, 森田 勝, 掛地吉弘, 前原喜彦, 橋爪 誠:

ハイパースペクトルカメラを用いた大腸病変における酸化/還元型ヘモグロビンの濃度変化に関する検討.

第 84 回日本消化器内視鏡学会総会, 2012 年 10 月 13 日, 神戸

42) 石井裕之, 植村宗則, 長尾吉泰, 赤星朋比古, 神代竜一, 富川盛雅, 橋爪 誠, 高西淳夫:

大腸内視鏡トレーニングシミュレータでの手技評価に関する研究.

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) 石井裕之, 木下新一, 家入里志, 植村宗則, 富川盛雅, 橋爪 誠, 高西淳夫:

インテリジェント腹腔鏡手術トレーニングシステムの開発 (第 2 報) ~臓器モデルの動作がタスクの難易度に及ぼす影響の検討~.

第 21 回日本コンピュータ外科学会大会, 2012 年 11 月 2 日, 徳島

44) 赤星朋比古, 長尾吉泰, 富川盛雅, 前原喜彦, 橋爪 誠:

門脈圧亢進症および肝硬変患者における脾臓摘出術後の長期合併症に関する検討.

第 19 回日本門脈圧亢進症学会総会, 2012 年 9 月 7 日, 東京

45) 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋爪 誠, 前原喜彦:

胃静脈瘤出血例に対する Balloon-occluded retrograde transvenous obliteration の意義. 第 48 回日本腹部救急医学会総会, 2012 年 3 月 14 日, 石川

46) 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:

脾機能亢進症を伴う門脈圧亢進症、肝硬変症における腹腔鏡下脾臓摘出術の意義.

第 67 回日本消化器外科学会総会, 2012 年 7 月 18 日, 富山

47) 赤星朋比古, 富川盛雅, 橋本直隆, 家守雅大, 長尾吉泰, 調 憲, 橋爪 誠, 前原喜彦: 腹腔鏡脾臓摘出術の Latest modern technique.

第 66 回 日本手術手技研究会, 2012 年 5 月 25 日, 福岡

48) 赤星朋比古, 富川盛雅, 長尾吉泰, 橋爪 誠, 前原喜彦:

門脈圧亢進症および肝硬変患者における脾臓摘出術後の長期合併症に関する検討.

第 19 回日本門脈圧亢進症学会, 2012 年 9 月 7 日 -8 日, 東京

49) 大内田研宙, 家入里志, 永井英司, 剣持 一, 長尾吉泰, 井上大輔, 川原周平, 江内田 寛, 富川盛雅, 田中雅夫, 橋爪 誠:

外科領域における 3D 立体映像システムの開発と臨床応用.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 13 日, 千葉

50) 大内田研宙, 神代竜一, 永井英司, 家入里志, 井上大輔, 剣持一, 恒松良祐, 梅崎俊郎, 猪口淳一, 田代泰隆, 江内田寛, 瀧内秀和, 富川盛雅, 田中雅夫, 橋爪 誠:

九州大学病院における新興光器製 3D 内視鏡の使用経験.

第 25 回日本内視鏡外科学会総会, 2012 年 12 月 7 日, 横浜

51) 中楯龍, 高西淳夫, 菅原基晃, 仁木清美, 岡田孝, 富川盛雅, 橋爪 誠:

超音波プロープ保持ロボットによる頸部血流計測の自動化アルゴリズムの改良と評価.

平成 24 年度 日本生体医工学会九州支部学術講演会, 2012 年 12 月 15 日, 鹿児島

52) 長尾吉泰, 植村宗則, 石井裕之, 吉田正樹, 堀 淳一, 堤 敬文, 家入里志, 大内田研宙, 富川盛雅, 前原喜彦, 橋爪 誠:

3D モニターの効果および加圧センサーの結果から見た単孔式手術の修練法.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 12 日, 千葉

53) 田上和夫, 大内田研宙, 長尾吉泰, 家入里志, 大平 猛, 富川盛雅, 橋爪 誠:

内視鏡外科手術における教育システムの確立を目指した取り組み.

第 112 回日本外科学会定期学術集会, 2012 年 4 月 14 日, 千葉

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

癌特異的分子に基づく癌個別化治療の開発

研究分担者 大内田研宙（九州大学 先端医療イノベーションセンター 講師）

研究要旨

最近の解析技術の進歩により、腫瘍内の特定の微小細胞集団ががん患者の予後を規定することが明らかとなった。今後は細胞レベルの個別性を評価してその中でも特に悪性度が高い細胞集団を標的とした真の癌個別治療の開発が必要である。本研究ではウイルス治療と従来のドラッグデリバリーシステム（DDS）を融合した新規人工ウイルスを診断、治療選択に用いて、細胞レベルの個別診断の画像化とそれに基づく真の癌個別治療を実現することを目的とした。標的細胞・分子の同定/機能解析；膀胱癌と大腸癌に関して、基盤となる解析は終了し、胃癌、食道癌などの分子標的マーカーの絞り込みのため発現解析をおこなった。人工ウイルス改変MRI造影剤の作成に関して人工ウイルスの基盤技術は確立し、特定の細胞集団を選択的に検出するMRI造影剤を作成し、その機能解析をおこなった。その結果、新規の標的分子候補の同定と肝細胞特異的造影剤の作成に成功した。

共同研究者

井上 重隆 (INOUE SHIGETAKA)
九州大学・医学研究院・共同研究員

難波江 俊永 (NABAE TOSHINAGA)
九州大学・医学研究院・共同研究員

白羽根 健吾 (SHIRAHANE KENGO)
九州大学・医学研究院・共同研究員

森山 大樹 (MORIYAMA TAIKI)
九州大学・医学研究院・共同研究員

(DDS) を融合した新規人工ウイルスを診断、治療選択に用いて、細胞レベルの個別診断の画像化とそれに基づく真の癌個別治療を実現することを目的とする。

本研究では、まず①癌根治に関わる標的細胞に特異的に輸送する人工ウイルスを作成する。②作成した人工ウイルスにMRI造影剤を内包し、標的癌細胞評価のためのMRI分子イメージングによる画像診断システムを構築する。③作成した人工ウイルスに標的細胞特異的な治療薬剤を封入し、個別癌細胞治療システムを構築する。

A. 研究目的

膀胱癌など早期診断が困難な癌や進行消化管癌の予後は不良である。最近の解析技術の進歩により、腫瘍内の特定の微小細胞集団ががん患者の予後を規定することが明らかとなった。今後は細胞レベルの個別性を評価してその中でも特に悪性度が高い細胞集団を標的とした真の癌個別治療の開発が必要である。本研究ではウイルス治療と従来のドラッグデリバリーシステム

B. 研究方法

- ① 標的細胞・分子の同定/機能解析
膀胱癌と大腸癌に関しては、基盤となる解析は終了し、胃癌、食道癌などの分子標的マーカーの絞り込みのため発現解析をすすめた。
- ② 人工ウイルス改変MRI造影剤の作成既にNEDOおよび厚労科研の支援により人工ウイルスの基盤は確立しており、また改変手法も遺伝子組み

換え等、複数の方法を確立している。これまでの成果に基づき、特定の細胞集団を選択的に検出するMRI造影剤を作成し、その機能解析をin vitroレベルで検証した。

③人工ウイルス改変MRI造影剤の機能評価

9.4のMRIを用いて、新規に作成した人工ウイルス改変MRI造影剤の評価をおこなう。用いるマウスは、初期は細胞株由来の同所マウスモデルを用いる。In vitro, in vivoの機能解析により、分子イメージングの精度と特異性を検証した。

B. 研究結果

膵癌、大腸癌、胃癌、食道がんにおける培養細胞株、手術切除標本を用いた発現解析において、新規の治療標的候補として複数の分子を同定した。その中でもCD146, CD166, Nodal, MAL2に関してさらなる詳細な発現解析をFACSやセルソーター、免疫組織化学染色にて進め、その特異的な発現パターンを明らかにした。さらに機能解析も平行して施行し、invasion assayやmigration assayによってそのCD146やCD166の発現状況によって癌細胞の悪性度が異なる可能性を見いだした。さらに癌の微小環境を形成している間質細胞における発現パターンも同時に解析をすすめNodalが膵癌細胞にも周囲の間質細胞にも同様に発現していて、臨床病理学的な因子との相関関係を認めた。また、MAL2は膵癌の転移形成と関連していることが高転移株の解析から同定され、またin vitroの実験でもその浸潤能や遊走能への関与が示された。

これまでは主として標的細胞として膵癌細胞を主体に解析をすすめてきたが、今回は、さらに癌の微小環境に含まれる癌間質の主体である間葉系の細胞も標的細胞として解析対象とした。特に膵癌間質に含まれる膵星細胞は膵癌の浸潤や転移に深く関わっている。この細胞の制御に抗線維薬であるピルフェニドンが有効かを検討した。その結果、ピルフェニドンは著明に間質細胞の活性を低下させ、癌間質の形成を抑制し、ひいては膵癌の腫瘍形成性を低下させることが明らかになった。

以上の成果により、現在進めている人工ウイルスの標的化および内封する薬剤の候補として既存のマーカ―や薬剤に並んで新規の分子や薬剤を追加できた。

人工ウイルスの改変は、まずpreS1を用いた肝細胞特異的なMRI造影剤の開発を優先的に進めた。これまでに我々は、厚生労働省科学研究費の支援のもと古細菌が作るsmall heat shock protein(Mj285)を用いて容易に改変可能な被殻をもち、細胞内プロテアーゼによる脱殻機能を備えた細胞選択性の高い薬剤輸送に適した独自の人工ウイルス粒子作成に成功しており、本研究においてはこれを基盤技術として用いて人工ウイルスの改変をおこなった。改変した人工ウイルスが肝細胞特異性を備えていることをまずin vitroの解析により明らかにした。さらに動物用MRIによりin vivoにおいても肝細胞特異的であることを明らかにした。

C. 考察

今後、今回開発した改変人工ウイルスに新たに同定した標的用マーカ―に特異的な抗体、ペプチドを用いて更なる特異性を向上させ、本研究成果である治療薬の一つを内封した新規のDDSを開発していく予定である

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

〔学会発表〕（計 19 件）

- ① Ikenaga N, Ouchida K, Mizumoto K, Akagawa S, Fujiwara K, Eguchi D, Kozono S, Otsuka T, Takahata S, Tanaka M Pancreatic cancer Cells Enhance the Ability of Collagen Internalization During Epithelial-Mesenchymal Transition. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2

- ② Kozono S, Ohuchida K, Eguchi D, Fujiwara K, Zhao M, Cui L, Mizumoto K, Tanaka M Antifibrotic Agent, Pirfenidone, Inhibits Pancreatic Stellate Cells and Tumor-Stromal Interaction in Pancreatic Cancer. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ③ Akagawa S, Ohuchida K, Otsuka T, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Aishima S, Mizumoto K, Tanaka M Role of Peritoneal Fibroblasts at Disseminated Sites of Pancreatic Cancer American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ④ Eguchi D, Ohuchida K, Kozono S, Cui L, Zhao M, Fujiwara K, Akagawa S, Otsuka T, Takahata S, Mizumoto K, Tanaka M Pancreatic Cancer Cells in Hypoxia Enhance the Motility of Pancreatic Stellate Cells Via Increased Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ⑤ Shindo K, Aishima S, Ikenaga N, Ohuchida K, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y Fibroblasts Expression podoplanin Enhance the Tumor Progression of Invasive Ductal Carcinoma of Pancreas. American Pancreatic Association/ International Association of Pancreatology 2012 Joint Meeting United States of America 2012/10/30-11/2
- ⑥ 小菌真吾、大内田研宙、水元一博、大塚隆生、赤川進、江口大樹、藤原謙次、Ana Ines Cases、趙茗、崔林、池永直樹、田中雅夫 Prifenidone による膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした膵癌治療の可能 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
- ⑦ 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、高畑俊一、藤原謙次、小菌真吾、池永直樹、水元一博、田中雅夫 腹膜線維芽細胞が膵癌の腹膜播種を促進する 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
- ⑧ 藤原謙次、大内田研宙、江口大樹、小菌真吾、池永直樹、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 CD105 陽性膵癌細胞は膵星細胞から影響を受けて強い遊走能を獲得する 第 43 回日本膵臓学会大会 2012/6/28-29
- ⑨ 小菌真吾、大内田研宙、大塚隆生、赤川進、Prawej Mahawithitwong、高浪英樹、江口大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫膵癌における膵星細胞およびその癌間質相互作用を標的とした新しい膵癌治療の可能性 第 22 回日本消化器癌発生学会総会 2012/11/25-26
- ⑩ 進藤幸治、相島慎一、池永直樹、大内田研宙、水元一博、田中雅夫、小田義直 Fibroblasts expressing Podoplanin enhance the tumor progression of invasive ductal carcinoma of pancreas 膵腺癌の間質に存在するポドプラニンを発現している繊維芽細胞は腫瘍進行を促進する The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association -Towards a new era and liaison of cancer research and life science- 第 71 回日本癌学会学術総会 -がん研究とライフサイエンスの更なるリエゾン- 2011/9/19-21
- ⑪ 赤川進、大内田研宙、大塚隆生、寅田信博、江口大樹、藤原謙次、小菌真吾、崔林、池永直樹、水元一博、田中雅夫 腹膜繊維芽細胞の作用に着目した膵癌腹膜播種メカニズムの解明 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑫ 崔林、大内田研宙、鄭彪、趙茗、小菌真吾、寅田信博、植木隆、水元一博、田中雅夫 大腸癌および組織由来繊維芽細胞のがん関連遺伝子の発現解析 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13

- ⑬ 江口大樹、大内田研宙、小菌真吾、崔林、藤原謙次、趙茗、赤川進、寅田信博、Cases Ana Ines、大塚隆生、上田純二、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 膵癌の遠隔転移に關与する新規遺伝子 MAL2(myelin and lymphocyte protein2)の同定 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑭ 小菌真吾、大内田研宙、進藤幸治、江口大樹、藤原謙次、趙茗、崔林、高畑俊一、水元一博、田中雅夫 膵癌における Nodal 発現の特徴とその臨床的意義 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑮ 藤原謙次、大内田研宙、進藤幸治、赤川進、江口大樹、小菌真吾、崔林、大塚隆生、高畑俊一、相島慎一、水元一博、田中雅夫 CD166 陰性膵癌細胞は強い浸潤能・遊走能を有する 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑯ 趙茗、大内田研宙、鄭彪、崔林、小菌真吾、江口大樹、水元一博、田中雅夫 The investigation of CD146 in pancreatic cancer associated fibroblast 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑰ 佐田政史、大内田研宙、藤原謙次、赤川進、江口大樹、小菌真吾、趙茗、崔林、大塚隆生、水元一博、田中雅夫 膵癌間質における CD90 と α -SMA 発現の意義第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑱ 田中友晴、小菌真吾、佐田政史、堀岡宏平、赤川進、江口大樹、藤原謙次、大内田研宙、水元一博、田中雅夫 膵癌細胞株における Histon deacetylase1 の放射線耐性に関する評価 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13
- ⑲ 寅田信博、赤川進、崔林、大内田研宙、小菌真吾、水元一博、相島慎一、小田義直、田中雅夫高品質かつ簡便な凍結組織アレイ作製法-

手術切除組織を効率よく保存する保存組織タレット法を活用して- 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013/4/11-13

雑誌/論文発表(計 10 件)

1. Daiki Eguchi, **Kenoki Ohuchida***, Shingo Kozono, Naoki Ikenaga, Koji Shindo, Lin Cui, Kenji Fujiwara, Shin Akagawa, Takao Ohtsuka, Shunichi Takahata, Shoji Tokunaga, Kazuhiro Mizumoto, Masao Tanaka MAL2 expression predicts distant metastasis and short survival in pancreatic cancer, Surgery, in press
2. Kenji Fujiwara, **Kenoki Ohuchida***, Takao Ohtsuka, Kazuhiro Mizumoto, Koji Shindo, Naoki Ikenaga, Lin Cui, Shunichi Takahata, Shinichi Aishima, and Masao Tanaka Migratory activity of CD105+ pancreatic cancer cells is strongly enhanced by pancreatic stellate cells, Pancreas, in press
3. Shingo Kozono, **Kenoki Ohuchida***, Daiki Eguchi, Naoki Ikenaga, Kenji Fujiwara, Ming Zhao, Lin Cui, Koji Shindo, Kazuhiro Mizumoto, and Masao Tanaka Pirfenidone inhibits desmoplasia of pancreatic cancer by regulating stellate cells, Cancer Research, in press
4. Noboru Ideno, Takao Ohtsuka, Hiroshi Kono, Kenji Fujiwara, Teppei Aso, Yosuke Nagayoshi, Yasuhisa Mori, Yasuhisa Oda, Shinichi Aishima, Shoji Tokunaga, **Kenoki Ohuchida**, Shunichi Takahata, Masafumi Nakamura, Kazuhiro Mizumoto, and Masao Tanaka, Intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas co-occurring with distinct pancreatic ductal adenocarcinomas are frequently of gastric subtype, Annals of Surgery, in press
5. 大内田研宙 大塚隆生 水元一博 田中雅夫 腫瘍内heterogeneityに着目した膵癌個別化治療の可能性 - 腫瘍個別化から細胞個別化へ- 胆と膵 Vol.30(2), 165-9, 2013
6. **Kenoki Ohuchida**, Makoto Hashizume, Robotic Surgery and Cancer, The Cancer Journal, in press

7. 大内田研宙 橋爪誠 7. 癌領域特集 ロボット手術の現在と未来 Pharma Medica Vol.30, No.10, 33-36, 2012
8. 池永直樹、大内田研宙、小菌真吾、水元一博、田中雅夫 膝がんの間質と星細胞 2012 in press
9. 大内田研宙、橋爪誠 Robotic surgeryのこれまでの開発と現状 特集/Robotic surgeryの今 外科 74巻8号 799-803 2012
10. 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 第39巻第1号1-7 2012

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし