

201407009A

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 XXXXXXXXXX

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋爪 誠

平成27(2015)年3月

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・治療システムに関する研究

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 橋爪 誠

平成27（2015）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. Neuropilin-1 を分子標的とするナノカプセルの設計と肺癌へのターゲティング	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	19
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	24
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
九州大学先端医療イノベーションセンター 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	45
IV. 研究成果の刊行物・別刷	47

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。難治性の転移性がんの治療法に向けた新しい分子標的法について検討した。また分担研究では、膵がんの標的化に成功するとともに、MRI造影剤の高感度化や遺伝子デリバリーへの展開に関しても大きな進歩があった。

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)

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

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

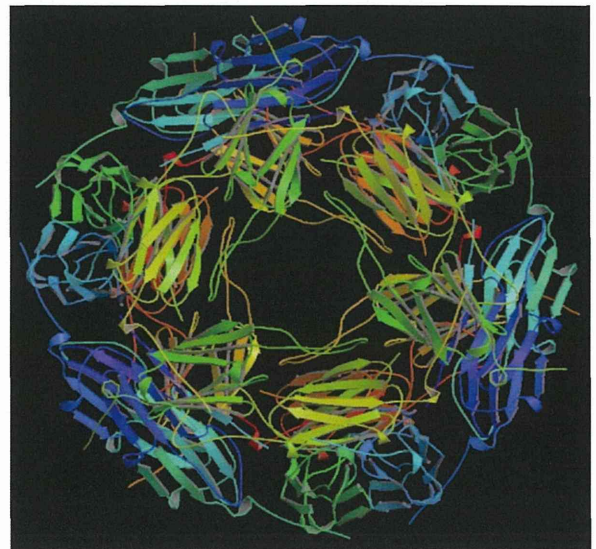
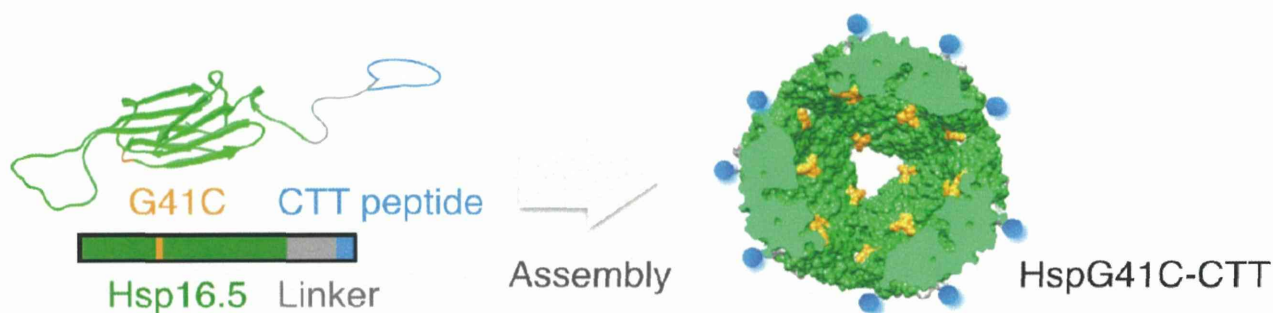


図1 タンパク質ナノカプセルの構造



Sequence of HSPG41C-CTT

MFGRDPFDSL FERMFKFFA TPMTGTTMIQ SSTGIQISGK CFMPISIIEG DQHIKVIAWL
 PGNKEDIIL NAVGDTLEIR AKRSPLMITE SERIIYSEIP EEEEEYRTIK LPATVKEENA SAKFENGVLG
 VILPKAESSI KKGINIETSG GSGGESEGES EGEGESESEI EGRPSGCTTH WGFTLCG

図2 転移性がんを標的化したナノカプセルの分子設計

Blue and gray regions indicate the CTT peptide and hydrophilic linker, respectively. The orange region indicates the Gly residue at position 41, which was mutated to a Cys residue for conjugation to the near-infrared (NIR) fluorophore maleimide.

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内包薬物の放出による薬理効果の発現を目指している。

本年度も実施計画書にしたがって、ナノカプセルからのがん標的化、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ーの開発、の三つのテーマに重点をおいて研究を実施した。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。本研究ではこのタンパク質ベースのナノカプセルを様々に機能化し、DDSキャリアや分子イメージング材料として応用することを目的としている。本年度は転移性がんを標的としたナノカプセルをクローニングし、その性能を評価した。

B. 研究方法

ナノカプセルの発現と精製

図2に示したアミノ酸配列を有するナノカプセルを設計し、PCRを駆使して遺伝子クローニングした。この組み換えベクターを大腸菌株BL21CodonPlus(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。これを密閉型超音波照射装置を用いて氷温下でソニケーション(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。

ナノカプセルの物性および機能評価

得られたナノカプセルの粒径は動的光散乱法 (DLS) と透過型電子顕微鏡 (TEM) によって確認した。ヒト繊維肉腫由来細胞株である HT1080 およびヒト大腸がん由来細胞株 HT29 を定法にしたがって培養した。これらの細胞を 6well の m-Slides に 1×10^4 cells/well となるよう播種した。これを 10vol% FBS、抗生物質(100 U/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 0.25 μ g/mL アムホテリシン-B)を添加した DMEM 培地 (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM) を用い、37°C、5%CO₂ 雰囲気にて設定した CO₂ インキュベーター内にて培養した。一昼夜培養した後、培地交換し、終濃度 1 μ M (蛍光色素基準) の Alexa488 ラベル化 CTT ナノカプセルを添加し、そのまま 6 時間培養を続けた。ナノカプセルの細胞への取り込みはフローサイトメトリー (SONY EC800) を用いて評価した。

(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

ナノカプセルの物性評価

精製したナノカプセルを質量分析装置で評価したところ、アミノ酸配列から算出される計算値とほぼ同じ値が得られた (図 3)。DNA シーケンスも設計どおりであることから、ナノカプセルの C 末端に CTT ペプチドが組み込まれたクーロンの作製に成功したものと判断した。

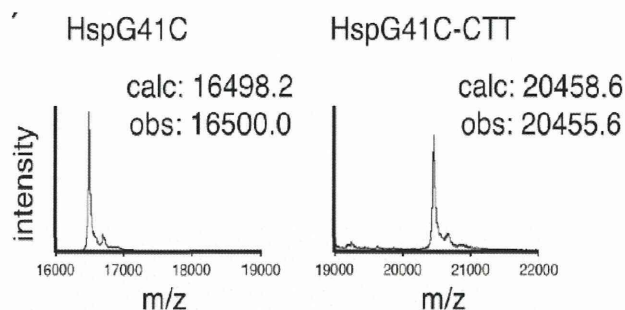


図 3 精製ナノカプセルの質量分析結果

次に、ナノカプセルの形状を透過型電子顕微鏡によって観察した (図 4a)。この結果、CTT ナノカプセル、G41C ナノカプセルともに球状粒子であることが確認された。動的光散乱法から得られたそれぞれの平均粒径はそれぞれ 15.5、14.1nm であり、TEM 観察の結果とほぼ一致した (図 4b)。

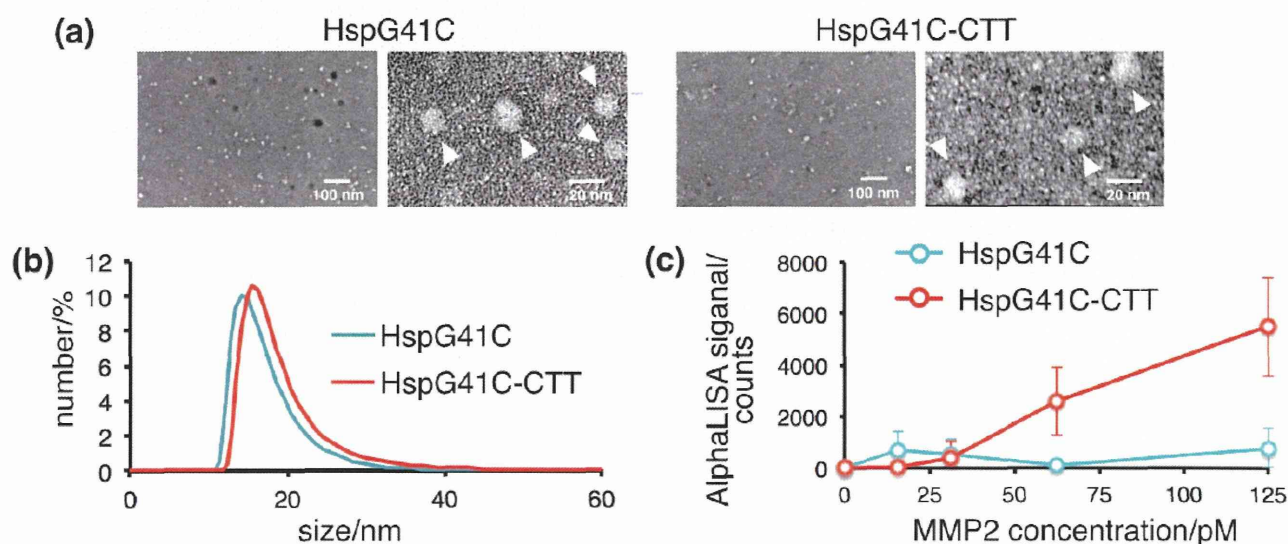


図 4 CTT ナノカプセルの物性評価

(a) Transmission electron microscopy images of the nanocages. White arrows show the nanocages; (b) Dynamic light scattering profiles of the nanocages in phosphate-buffered saline; (c) AlphaScreen binding assay of the nanocages with MMP-2.

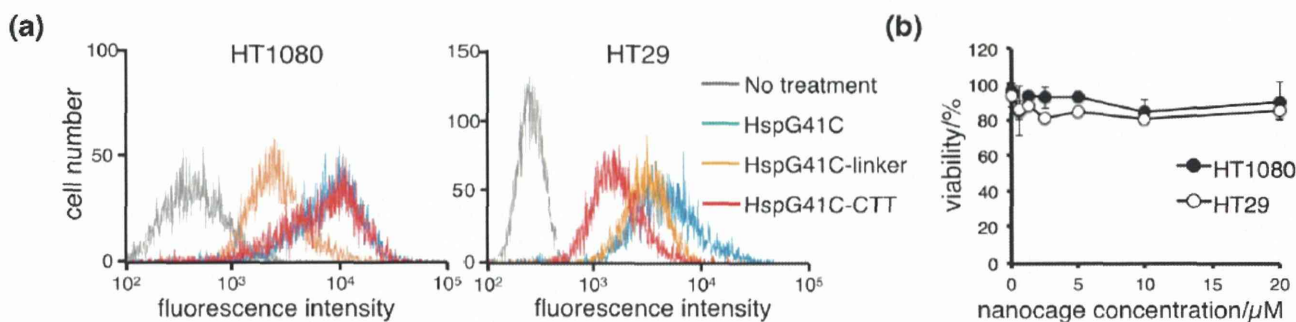


図 5 CTT ナノカプセルの転移性癌細胞に対する特異性 (*in vitro*)

(a) Representative histograms of the fluorescence intensities of HT1080 and HT29 cells incubated with fluorophore-labeled nanocages in the presence of 10% fetal bovine serum for 3 h; (b) Cytotoxicity of HspG41C-CTT in HT1080 and HT29 cells. Data are presented as the mean \pm standard error of the mean of three independent experiments.

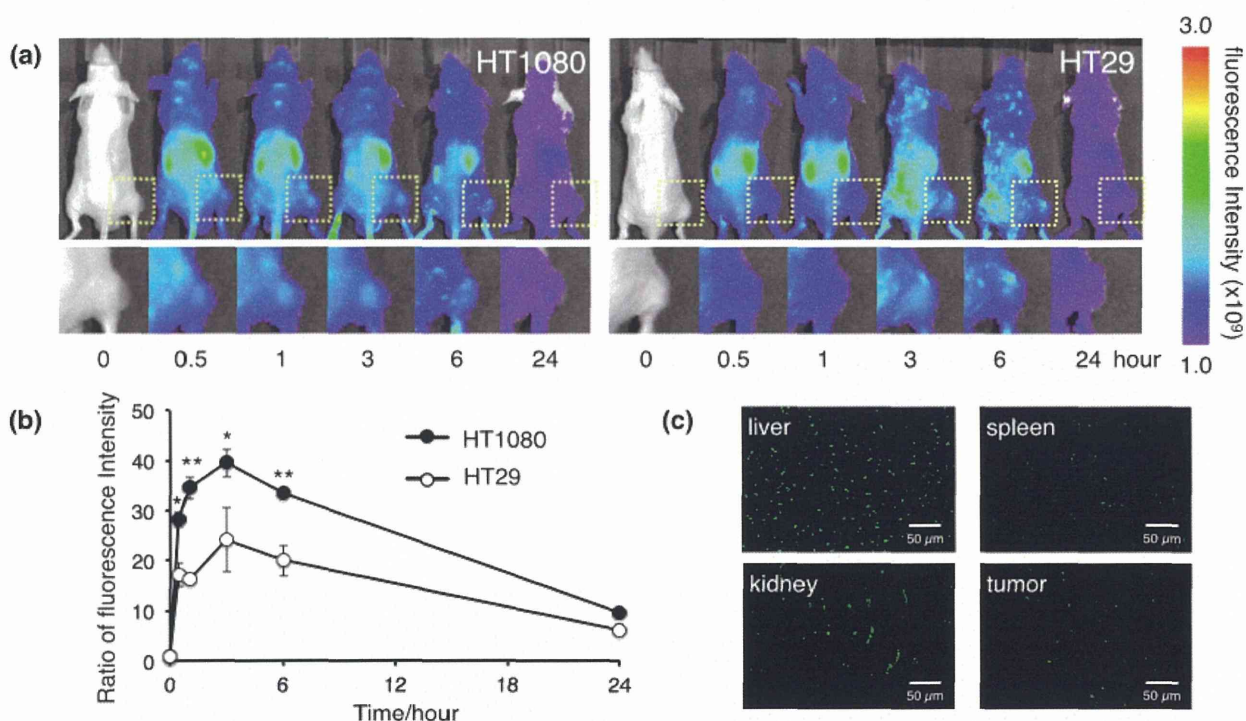


図 6 CTT ナノカプセルの転移性癌細胞に対する特異性 (*in vivo*)

Biodistribution of the protein nanocages *in vivo*. (a) *In vivo* real-time NIR fluorescence imaging of intravenously injected Alexa Fluor 750-labeled HspG41C-CTT in HT1080 and HT29 tumor-bearing mice. Time-dependent, tumor-targeting specificities of the nanocages were monitored by the IVIS system. Square regions indicate solid tumor growths of subcutaneously injected cancer cells; (b) Fluorescence signal intensity ratio of the tumor/background obtained from *in vivo* images. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; (c) Organ sections of tumor-bearing mice injected intravenously with Alexa Fluor 488-labeled

さらに、C 末端に導入した CTT ペプチドの生理活性を調べるため、転移性ががん部で高発現していることが明らかとなっているマトリックスメタロプロテアーゼ 2 (MMP2) と CTT ナノカプセルとの相互作用を AlphaScreen 法によって評価した。この結果、期待どおり CTT ナノカプセルは MMP2 と濃度依存的に相互作用していることが明らかと

なった。対照的に CTT ペプチドをもたない G41C ナノカプセルは MMP2 と相互作用しなかった (図 4c)。

ナノカプセルの転移性がん特異性の評価

CCT ナノカプセルの転移性がん特異性をフローサイトメトリで測定した。対象として、MMP2 高

発現株であるヒト繊維肉腫由来細胞株である HT1080、そして低発現株であるヒト大腸がん由来細胞株 HT29 を用いた。これらの細胞を 6-well プレートで培養し (2×10^5 cell/well)、これに Alexa488 で蛍光ラベル化した CCT ナノカプセルを終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように加えた。なおコントロールとして、CCT を持たないナノカプセルを使用した。そのまま 3 時間培養を続けた後、培地を捨てさらに PBS で 2 回洗浄し、フローサイトメーターを使って各細胞に取り込まれたナノカプセルの量を定量的に評価した (図 5a)。この結果、CCT ナノカプセルも G41C ナノカプセルも MMP2 高発現株の HT1080 に効果的に取り込まれた。対照的に、MMP2 低発現株の HT-29 に対しては、CCT ナノカプセルの取り込み量は G41C ナノカプセルに比較して有意に低かった。これらの結果は、CCT ナノカプセルが MMP2 発現細胞に対してある程度の特異性を有していることを示唆している。またこれらの細胞株に対して、CTT ナノカプセルは有意の毒性を示さないことも明らかとなった (図 5b)

さらに免疫不全マウスの皮下に、HT1080 あるいは HT-29 を移植した担癌マウスを作製し、尾静脈から投与した Alexa750 標識ナノカプセルの動態を *in vivo* イメージャーで経時的に追跡した。この結果、CTT ナノカプセルは HT1080 を移植したがん部に有意に集積していることが確認された (図 6a,b)。CTT ナノカプセルは 1 時間以内のがん部に集積し、その後少なくとも 6 時間はそこに留まった。

D. 考察

本研究では低毒性かつ内部に空間を有するユニークな構造を有するスモールヒートショックプロテイン (sHSP) に着目し、その DDS・分子イメージングへの応用を検討している。本年度はがん治療のもっとも困難な課題である転移性がんの標的化をめざして、その鍵となる分子 MMP2 の標的化を行った。CTT ペプチドはこの MMP2 と特異的に結合することが明らかとなっており、今回、サブユニットの C 末端に組み込むことによってナノカプセル外表面に提示することが可能となった。CTT ペプチドは疎水性が高いため、ナノカプセルへの導入には適切なリンカーが必要であった。AlphaScreen 法により、CTT ペプチドがアクセス可

能な外表面に存在することは確認されたが、その後の培養細胞あるいは動物を用いた評価では、今後の改良が期待される結果となった。

E. 結論

sHSP ベースのナノカプセルは生体毒性が低く、DDS あるいは分子イメージング材料として有効である。本年度は比較的疎水性の高い CCT ペプチドをナノカプセルの外表面に提示させることに成功した。現状では CCT による MMP2 の分子標的化に関しては十分な効果は得られなかったが、リンカー部の重要性については有益な知見が得られた。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 (計 29 件)

1. Yoshinori Fujimura, Naoki Ikenaga, Kenoki Ohuchida, Daiki Setoyama, Miho Irie, Daisuke Miura, Hiroyuki Wariishi, Masaharu Murata, Kazuhiro Mizumoto, Makoto Hashizume, Masao Tanaka, “Mass Spectrometry-Based Metabolic Profiling of Gemcitabine-Sensitive and Gemcitabine-Resistant Pancreatic Cancer Cells”, *Pancreas*, **43**, 311-318(2014).
2. Masaharu Murata, Jing Shu Piao, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Ryo Ugawa, Makoto Hashizume, “Expression and characterization of myristoylated preS1-conjugated nanocages for targeted cell delivery”, *Protein Expression and Purification*, **110**, 52-56(2015).
3. Masaharu Murata, Sayoko Narahara, Takahito Kawano, Nobuhito Hamano, Jing Shu Piao, Jeong-Hun Kang, Kenoki Ohuchida, Takashi

- Murakami, Makoto Hashizume, “Design and function of engineered protein nanocages as a drug delivery system for targeting pancreatic cancer cells via neuropilin-1”, *Molecular Pharmaceutics*, **12**, 1422-1430(2015).
4. Takahito Kawano, Masaharu Murata, Jing Shun Piao, Sayoko Narahara, Nobuhito Hamano, Jeong-Hun Kang, Makoto Hashizume, “Systemic Delivery of Protein Nanocages Bearing CTT Peptides for Enhanced Imaging of MMP-2 Expression in Metastatic Tumor Models”, *International Journal of Molecular Sciences*, **16**, 148-158(2015).
 5. Uemura M, Tomikawa M, Kumashiro R, Miao T, Souzaki R, Ieiri S, Ohuchida K, Lefor AT, and Hashizume M: Analysis of hand motion differentiates expert and novice surgeons. *J Surg Res*. May 1;188(1):8-13,2014
 6. Cho B, Matsumoto N, Mori M, Komune S, Hashizume M: Image-guided placement of the Bonebridge™ without surgical navigation equipment. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. Sep;9(5):845-855,2014"
 7. Oka M, Cho B M, Nozomu M, Hong J, Jinnouchi M, Ouchida R, Komune S, Hashizume M: A preregistered STAMP method for image-guided temporal bone surgery. *Int J Comput Assist Radiol Surg*. Jan;9(1):119-126,2014"
 8. Munenori Uemura, M.Med.Sci, Makoto Yamashita, Morimasa Tomikawa,MD PhD, Satoshi Ieiri,MD PhD, Noriyuki Mastuioka, Tamotsu Katayama, and Makoto Hashizume, MD PhD, A New Objective Assessment System of the Suture Ligation Method of the Intestinal Anastomosis Model for Laparoscopic Surgery, 14th International Meeting on Simulation in Healthcare (IMSH 2014), Technology Innovation 2nd Place Overall
 9. Akahoshi T, Tomikawa M, Tsutsumi N, Hashizume M, Maehara Y: Merits of prophylactic sclerotherapy for esophageal varices concomitant unresectable hepatocellular carcinoma:Prospective randomized study. *Dig Endosc*. Mar;26(2):172-177,2014
 10. Tashiro Y, Okazaki K, Uemura M, Toyoda K, Osaki K, Matsubara H, Hashizume M, Iwamoto Y: Comparison of transtibial and transportal techniques in drilling femoral tunnels during anterior cruciate ligament reconstruction using 3D-CAD models. *Open Access J Sports Med*. Apr 4;5:65-72,2014
 11. Kobayashi Y, Sekiguchi Y, Noguchi T, Takahashi Y, Liu Q, Oguri S, Toyoda K, Uemura M, Ieiri S, Tomikawa M, Ohdaira T, Hashizume M, Fujie MG: Development of a robotic system with six-degrees-of-freedom robotic tool manipulators for single-port surgery. *The international journal of Medical Robotics and Computer Assisted Surgery*. *Int J Med Robot*. Jun 26,2014
 12. Yo Kobayashi,Maya Hatano,Makiko Suzuki,Yasuyuki Shiraishi, Tomoyuki Yambe, Makoto Hashizume and Masakatsu G Fujie, Preloading based needle insertion with a concave probe to enhance targeting in breast tissue. *Robomech Journal* 1:17,2014
 13. Yo Kobayashi, Ryutarō Hamano, Hiroki Watanabe, Takuma Koike, Jaesung Hong, Kazutaka Toyoda, Munenori Uemura, Satoshi Ieiri, Morimasa Tomikawa, Takeshi Ohdaira, Makoto Hashizume, Masakatsu G. Fujie. Preliminary in vivo evaluation of a needle insertion manipulator for central venous catheterization. *Robomech Journal*, in press
 14. Mori M, Chiba T, Nakamizo A, Kumashiro R, Murata M, Akahoshi T, Tomikawa M, Kikkawa Y, Yoshimoto K, Mizoguchi M, Sasaki T, Hashizume M, Intraoperative visualization of cerebral oxygenation using hyperspectral image data: a two-dimensional mapping method. *Int J CARS* 9:(6) 1059-1072, 2014.
 15. Tang W, Aakahoshi T, Piao J, Narahara S, Murata M, Kawano T, Hamano N, Ikeda T, Hashizume M, Basic FGF-treated adipose tissue-derived mesenchymal stem cell infusion ameliorate liver cirrhosis via paracrine HGF. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, in press
 16. Matsumoto N, Takumi Y, Cho B, Mori K, Usami S, Yamashita M, Hashizume M, Komune S, Template-guided implantation of the Bonebridge: clinical experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, in press
 17. 荒田 純平、服部 将士、市川 翔平、坂口 正道、橋爪 誠: 手術支援用マスタ・スレーブにおける身体所有感移転に基づく操作性向上に関する基礎研究. *日本コンピュータ外科学会誌* 2013: 15(2): 174-175"

18. 植村 宗則、富川 盛雅、苗鉄軍、家入 里志、宗崎 良太、大内田 研宙、橋爪 誠: カオス解析を用いた内視鏡外科手術における鉗子先端動作解析～熟練者と初心者の潜在的な動きのちがいを～, 日本コンピュータ外科学会誌 2013: 15(2): 218-219"
 19. 築根まり子、小池卓慎、山崎 望、張 博、小林 洋、橋爪 誠、藤江正克: 中心静脈穿刺支援ロボットシステムにおける静脈の逃げと潰れを抑制する穿刺速度の解析. 看護理工学会誌 2014: 1 (1) :21-30"
 20. 赤星朋比古、川中博文、池田哲夫、橋爪 誠: b) 腹空鏡下摘除術のピットフォールと対策. 「外科」76 (12) 1447-1455,2014
 21. Ohuchida K, Hashizume M : Robotic surgery for hepato-biliary-pancreatic(HBP)surgery. J Hepatobiliary Pancreat Sci.Jan;21(1):1-2,2014
 22. 赤星朋比古, 橋爪 誠: 門脈圧亢進症. medicina 51(1) 82-86 2014
 23. 家入里志, 橋爪 誠 : ロボット手術のトレーニング. 消化器外科 37(1): 15-22, 2014"
 24. 永田 高志, 赤星 朋比古, 橋爪 誠, アラン・レフォー: ATOM. 救急医学 胸部外傷診療 38(4): 435-438, 2014
 25. 家入里志, 橋爪 誠: 本邦におけるロボット手術の導入と今後の展望. 日本コンピュータ外科学会誌 15(4): 319-322, 2014
 26. 橋爪 誠, 富川盛雅 : 2.計算解剖モデルの診断・治療の融合的支援応用, INNERVISION (29・11)33-35, 2014
 27. 大内田研宙, 橋爪 誠: 多元計算解剖学への新展開. INNERVISION (29・11)63-65, 2014
 28. Kenoki Ohuchida and Makoto Hashizume: Overview of Robotic Surgery. Robotic Surgery Go Watanabe Editor, Springer Japan 1-7,2014 "
 29. 赤星朋比古、橋爪 誠 : 食道バルーンタンポナーデによる止血 VI 治療 1. 処置および治療, 消化器病治療 第2版 医学書院 321-323, 2014
2. 学会発表 (計 43 件)
 1. 赤星朋比古, 川中博文, 森田勝, 調憲, 前原喜彦 橋爪 誠: 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50回日本腹部救急医学会, 2013年3月7日, 東京
 2. 池田哲夫, 赤星朋比古, 井口友宏, 二宮瑞樹, 橋爪 誠: 胆道ドレナージ方法の選択: 胆管完全閉塞、末梢胆管末拡張および胆汁漏合併例に対する Rendezvous Technique の手技と有用性の検討, 第50回日本腹部救急医学会, 2013年3月6日, 東京
 3. 橋爪 誠: バッド・キアリ症候群の血行力学, 第34回日本静脈学会総会「静脈とQOL—QOL向上の検証—」, 2014年4月17-18日, 沖縄
 4. 富川盛雅, 植村宗則, 赤星朋比古, 内山秀昭, 遠藤和也, 大内田研宙, 家入里志, 田上和夫, 大平 猛, 是永大輔, 竹中賢治, 橋爪 誠: 内視鏡外科手術経験量を反映する客観的評価法に基づくトレーニング指針の提案, 第114回日本外科学会定期学術集会「外科学の最前線—地域医療と高度医療の連携—」, 2014年4月4日, 京都
 5. 池田哲夫, 今井大祐, 王 歆林, 別城悠樹, 木村光一, 松本佳大, 中川原英和, 吉屋匠平, 井口友宏, 二宮瑞樹, 山下洋市, 池上 徹, 岡野慎士, 吉住朋晴, 川中博文, 赤星朋比古, 内山秀昭, 副島雄二, 調 憲, 橋爪 誠, 前原喜彦: 完全腹腔鏡下系統的肝切除のための流入血流遮断と術中ナビゲーション方法の検討, 第114回日本外科学会定期学術集会「外科学の最前線—地域医療と高度医療の連携—」, 2014年4月3日, 京都
 6. 大内田研宙, 永井英司, 仲田興平, 山田大輔, 中村勝也, 清水周次, 橋爪 誠, 田中雅夫: 胃がんに対する3D手術とロボット支援手術の経験, 第114回日本外科学会定期学術集会「外科学の最前線—地域医療と高度医療の連携—」, 2014年4月5日, 京都
 7. 橋爪 誠: 手術支援ナビゲーションシステムの開発と臨床応用における課題, 第102回日本泌尿器科学会総会「‘今日’を見つめ‘明日’を創る」, 2014年4月24-27日, 神戸

8. Ryu Nakadate, Susumu Oguri, Masaharu Murata, Jumpei Arata, Makoto Hashizume: A robotic needle insertion system for the ReMI guided therapy, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRRRI 2014), March 25,2014, Kyoto"
9. 池田哲夫, 橋爪 誠: 内視鏡用電気手術機器に自動還流を可能にした Silicone Irrigator と循環式気腹装置を用いた系統的肝切除術, 第 69 回日本消化器外科学会総会,2014 年 7 月 18 日, 郡山
10. 大内田研宙, 橋爪 誠: 腹空鏡下胃切除術における 3D ロボット手術、ロボット手術の経験と 4K 内視鏡システム開発の現状, 第 69 回日本消化器外科学会総会,2014 年 7 月 17 日, 郡山
11. 富川雅盛, 橋爪 誠: 内視鏡把持ロボット・循環式気腹装置の支援により強化された 3D 内視鏡映像下スリーブ状胃切除術, 第 69 回日本消化器外科学会総会,2014 年 7 月 18 日, 郡山
12. 赤星朋比古, 橋爪 誠: 当院救命救急センターにおける汎発性腹膜炎に対する治療戦略と成績, 第 69 回日本消化器外科学会総会,2014 年 7 月 18 日, 郡山
13. 赤星朋比古、川中博文、松本佳大、富川盛雅、橋爪 誠、前原喜彦: 脾硬度の門脈圧亢進症における意義に関する臨床および実験的検討, 第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会,2014 年 9 月 13 日,東京
14. 赤星朋比古、川中博文、富川盛雅、橋爪 誠: 門脈圧亢進症における腹空鏡下脾臓摘出術および胃上部血行遮断術, 第 21 回日本門脈圧亢進症学会総会,2014 年 9 月 12 日,東京
15. 赤星朋比古、川中博文、安田光広、橋爪 誠、前原喜彦: 腹空鏡下脾臓摘出術の latest modern technique と Acute are surgery への展望, 第 6 回日本 Acute Care Surgery 学会学術集会,2014 年 9 月 21 日,青森
16. 赤星 朋比古、池田 哲夫、富川 盛雅、橋爪 誠: 病的肥満症に対する腹空鏡下スリーブ状胃切除術の治療の工夫と成績, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 3 日,岩手
17. 赤星 朋比古、富川 盛雅、池田 哲夫、橋爪 誠: 画像誘導装置の現状と今後の展望, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 2 日,岩手
18. 池田 哲夫、堤 亮介、中楯 龍、荒田 純平、小栗 晋、赤星 朋比古、山下 実、村田 正治, 橋爪 誠: 体温で変態し体腔内で超弾力性を発揮する形状記憶合金 (SMA) 製内視鏡外科手術器具の開発, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 4 日,岩手
19. 池田 哲夫、山下 洋市、播本 憲史、伊藤心二、赤星朋比古、池上 徹、岡野 慎士、吉住 朋晴、調 憲、橋爪 誠、前原 喜彦: 肝葉切除術に対する完全腹空鏡下切除の利点と課題, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 3 日,岩手
20. 池田 哲夫、山下 洋市、播本 憲史、岡野 慎士、伊藤 心二、赤星朋比古、池上 徹、今井 大祐、別城 悠樹、木村 光一、松本佳大、中川原英和、王 歆林、橋爪 誠、前原 喜彦: 伝えたい進化した電気メスの Basic and Super Technique, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 4 日,岩手
21. 池田 哲夫、山下 洋市、播本 憲史、岡野 慎士、伊藤 心二、赤星朋比古、池上 徹、吉住 朋晴、栗原 健、富野 高弘、吉田 佳弘、橋爪 誠、前原 喜彦: 完全腹空鏡下肝切除を安全に行うための解剖学的知識と外科的戦略, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 3 日,岩手
22. 池田 哲夫、岡野 慎士、山下 洋市、赤星朋比古、調 憲、橋爪 誠、前原 喜彦: Ultra High Definition(4K)腹空鏡と免疫組織染色、3D 組織再構築がもたらす現代の外科解剖, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 3 日,岩手
23. 富川 盛雅、赤星朋比古、川中 博文、遠藤和也、内山 秀昭、是永 大輔、竹中 賢治、橋爪 誠: 硬性腹空鏡と軟性内視鏡を併用したハイブリッド脾臓摘出術, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 3 日,岩手

24. 富川 盛雅、植村 宗則、赤星朋比古、大内田研宙、家入 里志、田上 和夫、池田 哲夫、大平 猛、橋爪 誠：内視鏡外科手術短期集中トレーニングの意義—九州大学内視鏡外科手術トレーニングセンターにおける解析—, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 4 日,岩手
25. 富川 盛雅、植村 宗則、赤星朋比古、遠藤和也、内山 秀昭、是永 大輔、竹中 賢治、橋爪 誠：内視鏡外科手術の技術レベルに応じた基本技術トレーニング指針の提案, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 2 日,岩手
26. 家入 里志、小幡 聡、小林 洋、宗崎 良太、神保 教広、植村 宗則、松岡 紀之、片山 保、藤江 正克、橋爪 誠、田口 智章：安全な新生児内視鏡外科手術普及のためのトレーニングモデルと画像誘導技術の開発, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 4 日,岩手
27. 大内田研宙、永井 英司、藤原 謙次、仲田興平、中村 勝也、清水 周次、橋爪 誠、田中 雅夫：郭清組織の可動性確保に基づく Tension & Direction control を重視した術野展開, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 2 日,岩手
28. 宗崎 良太、家入 里志、和田 桃子、神保教広、小幡 聡、木下 義晶、橋爪 誠、田口 智章：アプローチの工夫による根治性・整容性の向上を目指した小児腫瘍性病変に対する内視鏡外科手術, 第 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 3 日,岩手
29. 植村 宗則、富川 盛雅、赤星朋比古、松岡紀之、片山 保、宗崎 良太、家入 里志、小幡 聡、山下 実、大内田研宙、池田 哲夫、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 27 回日本内視鏡外科学会総会,2014 年 10 月 2 日,岩手
30. 永田高志、安倍 猛、萩原明人、橋爪 誠：信号検出分析法を用いた 80 歳以上の超高齢者心原性心肺停止に対するウツタイン研究報告, 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会,2014 年 10 月 29 日,福岡
31. 永田高志、橋爪 誠、石井正三：信号検出分析法を用いた 80 歳以上の超高齢者心原性心肺停止に対するウツタイン研究報告, 第 42 回日本救急医学会総会・学術集会,2014 年 10 月 29 日,福岡
32. 家入里志、小幡 聡、神保教広、宗崎良太、植村宗則、橋爪 誠、田口智章：小児外科に対するコンピュータ支援医療の未来予測, ~少子化時代の希少疾患に対する C A S の未来~, 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会, 2014 年 11 月 8 日,大阪
33. 植村宗則、富川盛雅、山下 実、松岡紀之、赤星朋比古、池田哲夫、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ジュミレータの開発, 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会, 2014 年 11 月 8 日,大阪
34. 植村宗則、富川盛雅、山下 実、苗 鉄軍、赤星朋比古、大内田研宙、池田哲夫、橋爪 誠：カオス解析を用いた内視鏡外科手術における鉗子先端動作解析 第 2 報, ~自動技術評価システムの開発~, 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会, 2014 年 11 月 8 日,大阪
35. 富川盛雅、植村宗則、赤星朋比古、大内田研宙、家入里志、是永大輔、竹中賢治、池田哲夫、大平 猛、橋爪 誠：内視鏡外科手術経験量を反映する客観的評価法に基づくトレーニング指針の提案
36. 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会, 2014 年 11 月 8 日,大阪
37. 小幡 聡、家入里志、植村宗則、神保教広、宗崎良太、松岡紀之、片山 保、田口智章、橋爪 誠：小児外科疾患モデルを用いた内視鏡外科手術手技の客観的評価システムの構築と検証, ~新生児横隔膜ヘルニアに対する胸腔鏡下修復術モデル~, 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会, 2014 年 11 月 8 日,大阪
38. 曹 暘、三浦 智、是枝祐太、西尾祐也、小林 洋、川村和也、家入里志、橋爪 誠、菅野重樹、藤江正克：医師の瞳孔位置による内視鏡マニピュレータ操作を目的とした瞳孔径変化の検証, 第 23 回日本コンピュータ外科学会大会, 2014 年 11 月 8 日,大阪

39. 築根まり子、張 博、小林 洋、赤星朋比古、池田哲夫、橋爪 誠、藤江正克： 中心静脈穿刺支援マニピュレータの in vivo 試験による評価，第 23 回日本コンピュータ外科学会大会，2014 年 11 月 8 日，大阪
40. 荒田純平、服部将士、坂口正道、中楯 龍、小栗 晋、橋爪 誠： 身体所有感転移に基づく直観的操作性を目指すマイクロサージェリ用ロボットシステム，第 23 回日本コンピュータ外科学会大会，2014 年 11 月 8 日，大阪
41. 池田哲夫、赤星朋比古、山下 実、植村宗則、小栗 晋、中楯 龍、荒田純平、橋爪 誠： ニーズなくしてシーズ無し：シリコンジャケットイリゲーターの開発，～臨床医にとって困難をニーズと考えシーズに変える可能性を見出す～，第 23 回日本コンピュータ外科学会大会，2014 年 11 月 9 日，大阪
42. 橋爪 誠： インテリジェント手術支援ロボットシステムの開発，第 28 回日本泌尿器内視鏡学会総会，2014 年 11 月 27 日，福岡
43. 橋爪 誠： 最新の 3D システムと手術支援ロボットシステムの動向，～内視鏡外科を事例国内外の別：国内

として超精密加工技術に期待するもの～，将来加工技術 第 136 委員会 創設 50 周年記念シンポジウム，2014 年 11 月 28 日，京都

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

○出願状況（計 1 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：PCT/JP2014/057776

出願年月日：2014 年 3 月 20 日

国内外の別：海外

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

Neuropilin-1を分子標的とするナノカプセルの設計と 膵がんのターゲティング

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。

しかしこのナノカプセル自体には特定の組織や細胞に対する特異性はない。そこで本研究では、このナノ構造体の表面にアンテナ分子を導入し、ドラッグキャリアあるいは分子イメージング材料としてとして利用する。本年度も昨年度に引き続いて膵癌等多くの癌細胞で高発現していることが知られているNeuropilin-1を分子標的化したナノカプセルの機能化を実施した。本年度はiRGDナノカプセルが膵がん細胞に取り込まれる機序とドラッグデリバリーへの応用について評価した。

共同研究者

濱野展人(九州大学先端医療イノベーションセンター)

橋爪 誠（九州大学大学院医学研究院）

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ある。

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、これまでにない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。そのC末端領域に親水性リンカーを介してiRGDペプチド（GCRGDKGPDC）を導入した。昨年度は特異性に対するリンカー長の影響や細胞毒性等について評価したが、本年度は膵がん細胞によるiRGDナノカプセルの取り込みの機序と薬物の内包、がん細胞での薬物放出などについて評価した。

B. 研究方法

iRGD ナノカプセルの分子設計と発現

ナノカプセルHspG41Cの遺伝子をテンプレートとして、そのC末端に3~30残基のフレキシブルリンカー(-(GGS)_n-)を介してiRGDモチーフを組み込んだ(図1)。昨年同様、これらの組み換えナノカプセルを含むベクターを大腸菌株BL21CodonPlus(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。

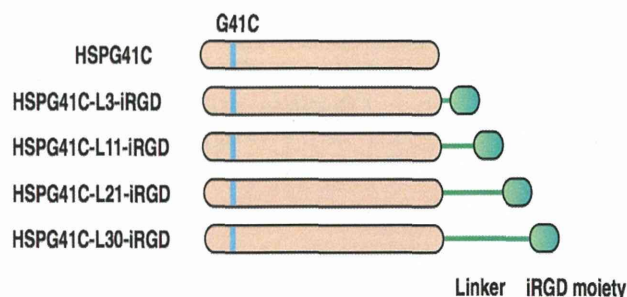


図1 種々のリンカーを有するiRGDナノカプセルのドメイン構造

iRGD ナノカプセルの膵がん特異性と取り込み機序の解明

ヒト膵癌由来細胞株である AsPC-1/CMV-Luc、MIA-Paca2 そして Suit-2、さらにヒト乳癌細胞株 MCF-7 とヒト大腸がん細胞株 HT-29 を 6well の μ -Slides に 1×10^4 cells/well となるよう播種した。これを 10vol% FBS、抗生物質(100 U/mL ペニシリン, 100 μ g/mL ストレプトマイシン, 0.25 μ g/mL アムホテリシン-B)を添加した DMEM 培地 (DULBECCO'S MODIFIED EAGLE'S MEDIUM) を用い、37°C、5%CO₂ 雰囲気にて設定した CO₂ インキュベーター内にて培養した。一昼夜培養した後、培地交換し、終濃度 1 μ M (蛍光色素基準) の Alexa488 ラベル化 iRGD ナノカプセルを添加し、そのまま 6 時間培養を続けた。ナノカプセルの細胞への取り込みはフローサイトメトリー (SONY EC800) を用いて評価した。

(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

*i*RGD ナノカプセルの膵癌に対する特異性

昨年度までに *i*RGD 分子とカプセルをつなぐリンカー部分の長さが細胞への取り込みに影響することを明らかにした。本年度はもっとも効率の高かった L30-*i*RGD ナノカプセルを用いて、その取り込みの機序と特異性を評価した。6-well プレートに様々な組織に由来する 5 種類の細胞株を培養し (2×10^5 cell/well)、これに Alexa488 で蛍光ラベル化した L30-*i*RGD ナノカプセルを終濃度 $1 \mu\text{M}$ となるように加えた。なおコントロールとして、*i*RGD を持たないナノカプセルを使用した。そのまま 3 時間培養を続けた後、培地を捨てさらに PBS で 2 回洗浄し、フローサイトメーターを使って各細胞に取り込まれたナノカプセルの量

を定量的に評価した。この結果、L30-*i*RGD ナノカプセルは二つのヒト膵がん由来細胞株 (AsPC-1、Suit-2) に効率的に取り込まれていることが示された (図 2)。これとは対照的に、おなじ膵がん由来細胞株である MIA-Paca2 やヒト乳がん由来細胞株 (MCF-7)、そしてヒト大腸がん由来細胞株 (HT-29) に対しては、L30-*i*RGD ナノカプセルの取り込み量は、コントロールナノカプセルのそれとほぼ同じであった。これらの結果は、L30-*i*RGD ナノカプセルが、一部の膵がんに対して高い特異性を有することを示唆している。

次にこの特定の細胞に対する *i*RGD ナノカプセルの特異性の原因を評価するために、各細胞株における Neuropilin-1 の発現解析を行った。実験は 6-well プレートに 5 種類の細胞株を培養し (2×10^5 cell/well)、これに sheep polyclonal anti-human neuropilin-1 抗体を加え、二次抗体として Alexa488 で蛍光ラベル化した Donkey anti-sheep IgG H&L を加えた。またコントロールとして Sheep IgG をアイソタイプとして使用した。これらの細胞はフローサイトメーターを使って定量的に解析し

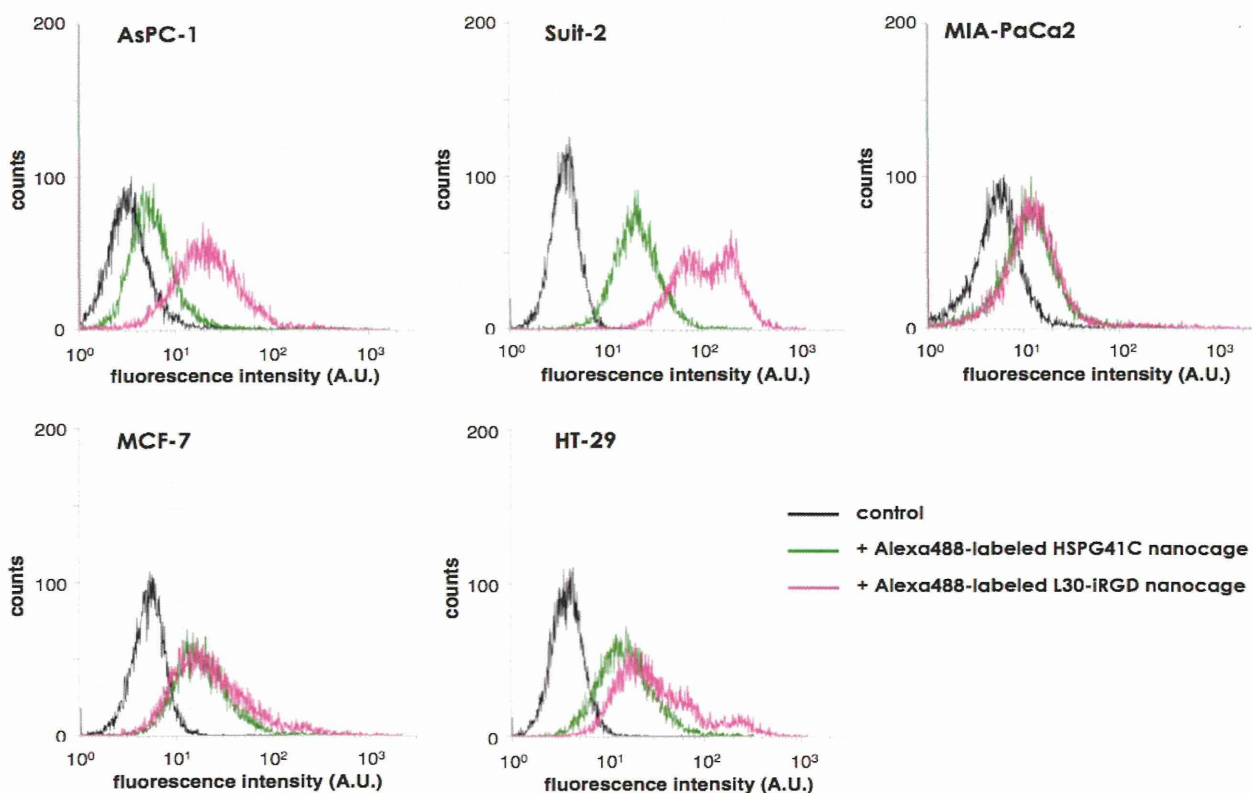


図 2 様々な細胞による *i*RGD ナノカプセルの取り込み

Representative histograms of the fluorescence intensities of various cells incubated with fluorophore-labeled nanocages in the presence of 10% fetal bovine serum. Cells were treated with $0.5 \mu\text{M}$ of Alexa Fluor 488-labeled L30-*i*RGD- nanocages (magenta line) or Alexa Fluor 488-labeled HSPG41 control nanocages (green line) in the presence of 10% fetal bovine serum. Untreated control cells are displayed by a black line.

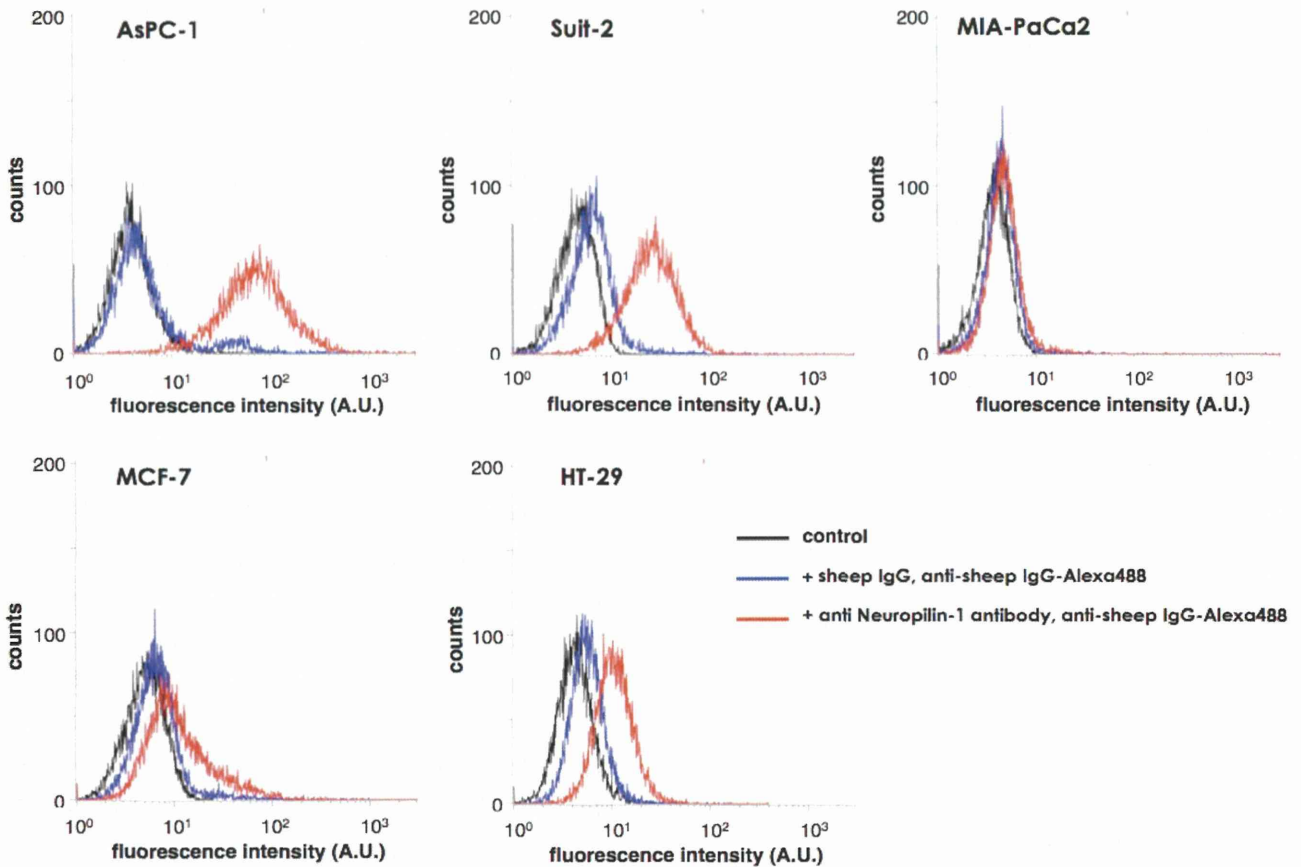


図3 様々な細胞による Neuropilin-1 の発現解析

Representative histograms of neuropilin-1 expression amounts in several human tumor cell lines. Overall, 2×10^5 cells were incubated with sheep polyclonal anti-human neuropilin-1 antibody (0.5 μg , red line; AF3870, R&D Systems, USA) for 1 hour on ice, and then washed twice with 500 μl of PBS. The secondary antibody Alexa Fluor. 488 conjugated Donkey anti-sheep IgG H&L (blue line; ab150177, Abcam, Cambridge, UK) (diluted 1:2000) was added on ice. After 1 hour, cells were washed twice and resuspended in 300 μl of PBS. Sheep IgG (5-001-A, R&D Systems, Minneapolis, USA) was used as an isotype-matched negative control under the same conditions. Unlabeled sample was also used as a control. The resulting single cell preparations were suspended in ice-cold PBS and were analyzed using an EC800 flow cytometer (Sony, Tokyo, Japan). Cells incorporated with the dye-labeled antibody were excited at 488 nm; emission spectra were collected using a 525/50 band-pass filter. Data were collected for 10 000 gated events and were analyzed using EC800 Software version 1.3.5. Untreated control cells are displayed by a black line.

た。この結果、各細胞株におけるNeuropilin-1の発現量は、二つのヒト膵がん由来細胞株 (AsPC-1、Suit-2) で非常に高いことが分かった (図3)。対照的におなじ膵がんでもMIA-Paca2のそれは有意に低かった。またMCF-7やHT-29でも若干のNeuropilin-1の発現が確認されたが、AsPC-1やSuit-2には及ばなかった。

次に、iRGDナノカプセルの細胞への取り込みに際して、ナノカプセル表面のiRGDモチーフが関係しているかを調べるため合成ペプチドによる阻害実験を実施した。使用したペプチドはiRGDナノカプセルに組み込んだ同じ配列を有する合成iRGDペプチド (GCRGDKGPDC) と一残基変異させた合成iRGEペプチド (GCRG**E**KGPDC) の二つであ

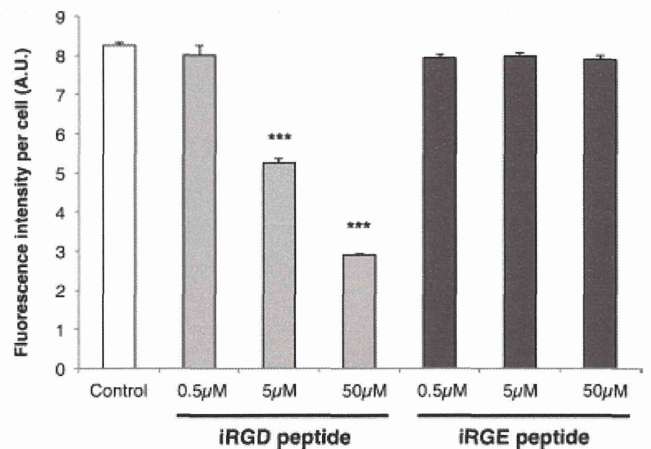


図4 合成ペプチドによる阻害実験

Inhibitory effects of the synthetic peptide following transfection of L30-iRGD-nanocages into AsPC-1 cells. Data are representative of three independent experiments per group. *** $p < 0.001$ vs the control group (Student's t test).

る。先に述べたAsPC-1によるiRGDナノカプセルの取り込みと同じ実験条件下において、上記の合成ペプチドを共存させた際の細胞あたりの蛍光量をプロットした結果を図4に示した。この結果、AsPC-1によるiRGDナノカプセルの取り込み量は、合成iRGDペプチドの添加により濃度依存的に減少した。これとは対照的に、配列の異なる合成iRGEペプチドの影響は全く受けなかった。

iRGD ナノカプセルへの抗癌剤の内包とがん細胞に対する細胞毒性試験

ナノカプセルはその内孔に配向する N 末端は疎水性ヘリックス等の寄与により、疎水性相互作用によって会合している。その疎水性はほぼジメチルスルホキシド (DMSO) と同程度と言われており、多くの疎水性薬物を内包することが期待される。そこで本年度は、様々な癌細胞にアポトーシスを誘導することが知られている 2-amino-N-[4-[5-(2-phenanthrenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]phenyl]-acetamide (OSU03012) を L30-iRGD ナノカプセルに内包させた。一つのナノカプセルに対して 100 倍等量の OSU03012 を添加し、55°C で 30 分間加熱振とうした。その後、残余の OSU03012 を限外濾過によって除去し、吸光度法により定量した。この結果、ナノカプセル 1 つあたりに 40~50 分子の OSU03012 が内包されていることが明らかとなった。

次に、OSU03012 内包 L30-iRGD ナノカプセルのヒト膀胱癌由来細胞株 AsPC-1 に対する細胞毒性を調べた (図 5)。この結果、5 μ M の OSU03012 を内包した L30-iRGD ナノカプセルは、AsPC-1 をもっとも効率的に細胞死を誘導した。対照的に、コントロールカプセル G41C に内包した OSU03012 はこのような効果は示さなかった。同条件下における OSU03012 の IC₅₀ 値は 10.5 μ M であり、膀胱癌特異性のある L30-iRGD ナノカプセルに内包することにより、単剤投与よりもより効果的であることが示唆された。さらに細胞死を誘導するメカニズムを解明するため、OSU03012 濃度を 5 μ M に揃えた状態でカスパーゼの発現を調べた。この結果、OSU03012 内包 L30-iRGD ナノカプセルだけが 72 時間後にカスパーゼ 3、7 を発現していることが分かった (図 6)。

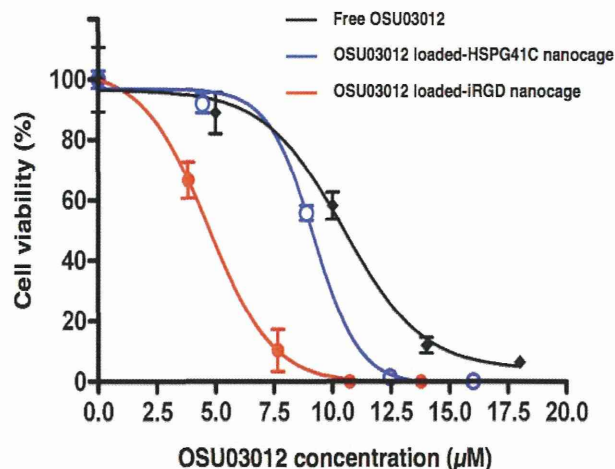


図5 OSU03012内包 iRGDナノカプセルによるAsPC-1細胞に対する細胞毒性試験

AsPC-1 cells were seeded at 0.5×10^4 cells/well in 96-well microtiter plates in complete growth medium in the presence of nanocages containing various concentrations of OSU03012 or free OSU03012. After incubation for 72 h, the number of viable cells was determined using the CellTiter-Glo luminescent cell viability assay according to the manufacturer's instructions. Data are representative of five independent experiments per group. The inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was calculated from a nonlinear regression curve using Prism4 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

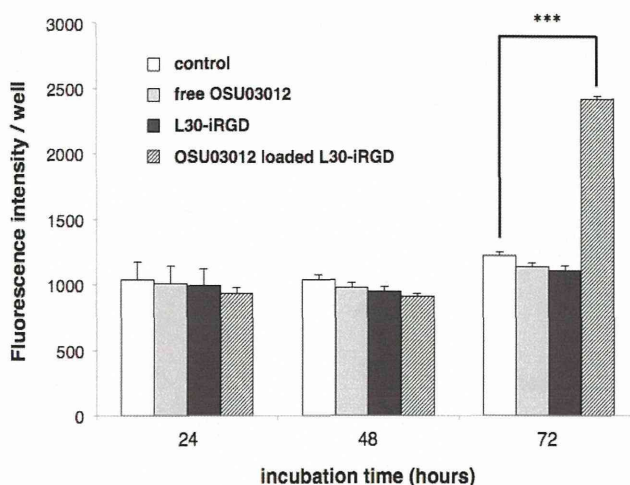


図6 OSU03012内包 iRGDナノカプセルによるAsPC-1細胞に対する細胞毒性試験

AsPC-1 cells were seeded at 0.5×10^4 cells/well in 96-well microtiter plates in complete growth medium in the presence of nanocages loaded with 5 μ M of OSU03012 or with 5 μ M of free OSU03012. Caspase-3/-7 activation was measured using Cellplayer kinetic caspase-3/-7 reagent at each time point. Data are representative of three independent experiments per group. ***p < 0.001 vs the control group (Student's t test).