

ように投与 6 時間後に 20% dose という非常に高い血中滞留性が達成された。

ユニット PIC が長期血中滞留性を示すメカニズムに関して、ユニット PIC と PEGasus-PLys の間の動的平衡関係を FRET を利用して検討した(図 3)。非標識の PEGasus-PLys を投与しない条件においては、FRET 効率は変化しなかったが、非標識の PEGasus-PLys を投与した場合には、FRET 効率の顕著な低下が認められた(図 4、5)。これらの結果より、ユニット PIC とフリーの PEGasus-PLys の間には動的平衡状態が存在するものと考えられ、フリーの PEGasus-PLys がユニット PIC の長期血中滞留性に寄与しているものと思われる。すなわち、ユニット PIC は、血中でタンパク質等の様々な生体分子との相互作用によって不安定化を受けても、フリーの PEGasus-PLys が速やかにユニット PIC を形成し、siRNA を保護する機能が働いているものと考えられる。

図 6 においては、ユニット PIC は、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果によって固形がん効果的に集積することも確認された。ここで、ユニット PIC 型 siRNA キャリアは、これまでに報告されているリポソームやミセル等のナノ粒子型 siRNA キャリアを比べて非常に小さいサイズ (FCS 解析により 16.8nm と算出) を有していることが大きな特徴であり、腫瘍深部への高い浸透性が期待できる。そこで、治療用 siRNA (siVEGF および siPRDM14) を用いて固形がんに対する治療効果を検証したところ、それぞれ膵臓がんおよび乳がんに対して優れた治療効果を示すことが確認された(図 7, 9)。これまでに開発してきた CaP ミセルとの比較においてもユニット PIC 型 siRNA キャリアは同等の制がん活性を示すことが確認された(図 9)。

最後に、ユニット PIC 型 siRNA キャリアの安全性に関して、制がん活性試験で著効が確認された投与スケジュールにおけるマウスの体重変化および血球数、生理学的パラメーターの変化を評価した。その結果、それらのすべての数値においてコントロール群との有意な差は認められず、ユニット PIC は、高い安全性を有することが

示唆された。

以上のように、ユニット PIC は、明確な構造を有し、製造も容易であることから製剤面で大きな利点を有するだけでなく、血中のフリーのポリマーがユニット PIC の安定化に寄与することで優れた血中滞留性を示し、固形がん効果的に集積することが確認された。さらに、ユニット PIC は、膵臓がんおよび乳がんの固形腫瘍モデルに対して、siRNA のデリバリーに基づく優れた治療効果を示すことも確認された。これらの結果より、ユニット PIC は、従来のリポソームやミセルとは異なる革新的な siRNA キャリアとして期待され、今後は、研究代表者の谷口らと連携することによって、非臨床・臨床試験へと進めていきたいと考えている。

E. 結論

本研究では、従来には無い新しい siRNA デリバリーシステムとして、1 分子の siRNA と PEGasus-PLys の自己組織化により形成されるユニット PIC を構築し、その in vitro および in vivo における有用性を明らかにしてきた。ユニット PIC は、明確な構造を有し、製造も容易であることから製剤面でも大きな利点を有しており、実用化が可能なキャリアシステムとして今後の更なる発展が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Gao, H. Takemoto, Q. Chen, M. Naito, H. Uchida, X. Liu, K. Miyata, K. Kataoka, Regulated protonation of polyaspartamide derivatives bearing repeated aminoethylene side chains for efficient intracellular siRNA delivery with minimal cytotoxicity. *Chem. Commun.* in press
- 2) M. Baba, K. Itaka, K. Kondo, T. Yamasoba, K. Kataoka, Treatment of neurological disorders by introducing mRNA in vivo using polyplex nanomicelles. *J. Control. Release* 201 41-48 (2015)
- 3) J. -Y. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated

- polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* 39 23-30 (2015)
- 4) L. Nuhn, S. Tomcin, K. Miyata, V. Mailander, K. Landfester, K. Kataoka, R. Zentel, Size-dependent knockdown potential of siRNA-loaded cationic nanohydrogel particles. *Biomacromolecules* 15 (11) 4111-4121 (2014)
 - 5) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8 (9) 8979-8991 (2014)
 - 6) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (35) 12396-12405 (2014)
 - 7) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014)
 - 8) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014)
 - 9) A. Dirisala, K. Osada, Q. Chen, T. A. Tockary, K. Machitani, S. Osawa, X. Liu, T. Ishii, K. Miyata, M. Oba, S. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka, Optimized rod length of polyplex micelles for maximizing transfection efficiency and their performance in systemic gene therapy against stroma-rich pancreatic tumors. *Biomaterials* 35 (20) 5359-5368 (2014)
 - 10) K. Nagata, K. Itaka, M. Baba, S. Uchida, T. Ishii, K. Kataoka, Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *J. Control. Release* 183 27-34 (2014)
 - 11) S. Murayama, P. Kos, K. Miyata, K. Kataoka, E. Wagner, M. Kato, Gene regulation by intracellular delivery and photodegradation of nanoparticles containing small interfering RNA. *Macromol. Biosci.* 14 (5) 626-631 (2014)
 - 12) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
 - 13) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014)
 - 14) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
 - 15) H. -J. Kim, T. Ishii, M. Zheng, S. Watanabe, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* 4 (1) 50-60 (2014)
 - 16) Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through

- the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 7 (10) 8583-8592 (2013)
- 17) S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (41) 15501-15507 (2013)
 - 18) H. Cabral, M. Murakami, H. Hojo, Y. Terada, M. R. Kano, U. -I. Chung, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted therapy of spontaneous murine pancreatic tumors by polymeric micelles prolongs survival and prevents peritoneal metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 (28) 11397-11402 (2013)
 - 19) H. Takemoto, K. Miyata, S. Hattori, T. Ishii, T. Suma, S. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka, Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN α -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (24) 6218-6221 (2013)
 - 20) N. Gouda, K. Miyata, R.J. Christie, T. Suma, A. Kishimura, S. Fukushima, T. Nomoto, X. Liu, N. Nishiyama, K. Kataoka, Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA. *Biomaterials*, 34 (2) 562-570 (2013)
 - 21) T. Suma, K. Miyata, Y. Anraku, S. Watanabe, R. J. Christie, H. Takemoto, M. Shioyama, N. Gouda, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 6 (8) 6693-6705 (2012)
 - 22) H. Takemoto, K. Miyata, T. Ishii, S. Hattori, S. Osawa, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accelerated polymer-polymer click conjugation by freeze-thaw treatment. *Bioconjugate. Chem.* 23 (8) 1503-1506 (2012)
 - 23) F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012)
 - 24) R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012)
 - 25) T. Suma, K. Miyata, T. Ishii, S. Uchida, H. Uchida, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 33 (9) 2770-2779 (2012)
- ## 2. 学会発表
- 1) K. Kataoka, Spromolecular Structures Self-assembled from Engineered Block Copolymers for Theranostics Nanodevice 2012, MRS Spring Meeting 2012.04.11, Marriott Marquis Hotel, San Francisco, California, USA, 招待講演
 - 2) 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, BIOTech 2012, 2012.04.27, 東京ビッグサイト, 東京都, 特別講演
 - 3) 片岡一則, 超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー, 第 51 回日本生体医工学会大会, 2012.05.10, 福岡国際会議場, 福岡県, 特別講演
 - 4) 片岡一則, 薬物・遺伝子ターゲティングのための超分子ナノキャリア設計, 高分子学会 12-1 超分子研究会「超分子／高分子新材料設計」, 2012.05.15, 東京工業大学蔵前会館, 東京都, 招待講演
 - 5) 片岡一則, 高分子の機能と材料開発: ナノバイオテクノロジー分野への展開を中心に, 東レ第 2 回先端材料研究フォーラム, 2012.05.21, 東レ株式会社 滋賀事業所, 滋賀県, 招待講演
 - 6) 片岡一則, 核酸医薬品デリバリーの

- ための超分子ナノキャリア設計, 情報機構セミナー「核酸医薬の開発戦略と今後の展望」, 2012.05.24, きゅりあん, 大井町, 東京都, 招待講演
- 7) K. Kataoka, Smart Supramolecular Nanostructures from Block Copolymers for Gene and Drug Delivery Seminar at West China School of Pharmacy, Sichuan University, 2012.06.02, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, China, 招待講演
 - 8) K. Kataoka, Smart Supramolecular Nanostructures from Block Copolymers for Gene and Drug Delivery, 9th World Biomaterials Congress, 2012.06.04, New International Convention & Exposition Center Chengdu Century City, Chengdu, China, 基調講演
 - 9) K. Kataoka, Supramolecular Nanodevices from Functionalized Block Copolymers for Molecular Therapy, CIMTEC 2012 (4th International Conference on Smart Materials, Structures and Systems), 2012.06.14, Palazzo dei Congressi, Montecatini Terme, Italy, 招待講演
 - 10) K. Kataoka, Medical Innovation through Polymer Chemistry: Supramolecular Structures of Block Copolymers as Smart Nanodevices for Gene and Drug Delivery, IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), 2012.06.24, Virginia Tech Campus, Blacksburg, Virginia, USA, 基調講演
 - 11) K. Kataoka, Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, IUPAC World Polymer Congress 2012 (IUPAC MACRO 2012), 2012.06.25, Virginia Tech Campus, Blacksburg, Virginia, USA, 招待講演
 - 12) 片岡一則, 薬物・遺伝子ターゲティングのための超分子ナノデバイス設計, 第 28 回日本 DDS 学会学術集会, 2012.07.04, 札幌コンベンションセンター, 北海道, 招待講演
 - 13) 片岡一則, 高分子ミセルによるドラッグデリバリー ～その現状と将来展望～, 第 28 回創薬セミナー, 2012.07.26, 八ヶ岳ロイヤルホテル, 山梨県, 招待講演
 - 14) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 第 19 回愛媛オンコロジーフォーラム, 2012.08.10, ホテル JAL シティ松山, 愛媛県松山市, 招待講演
 - 15) K. Kataoka, Supramolecular Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, The University of Texas MD Anderson Cancer Center & The University of Tokyo 1st Joint Symposium 2012 “Bridging Cancer Nanotechnology”, 2012.08.13, The University of Texas MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, 招待講演
 - 16) 片岡一則, 医療イノベーションを先導するバイオマテリアル～高分子ナノキャリアによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 日本技術士会化学部会 2012 年 8 月度例会, 2012.08.23, 日本技術士会会議室, 東京, 招待講演
 - 17) 片岡一則, 最先端ナノ DDS が拓く医療イノベーション～超分子なデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 東海メディカルプロダクツ創立 30 周年記念シンポジウム, 2012.09.01, ウェスティンナゴヤキャッスルホテル, 名古屋市, 招待講演
 - 18) K. Kataoka, Smart Supramolecular Nanotheranostic to Overcome Resistances to The Treatment of Severe Diseases 10th France-Japan DDS Symposium In Memory of Gérard Déleris, 2012.10.11, Place de la Comédie, Bordeaux, France, 招待講演
 - 19) 片岡一則, 高分子ミセルによる薬物・遺伝子デリバリー/ミセル製剤によるピンポイントデリバリーを中心に、がんや難病治療における DDS 製剤の現状およびバイオ医薬品の有効性・安全性を高める DDS 製剤への期待を含む内容, 第 7 回品質/科学技術特別研修 ナノメディシン (ナノ医薬品) による DDS の現状と展望" 2012.11.14, 日本薬学会 長井記念ホール, 東京都, 招待講演
 - 20) K. Kataoka, Supramolecular

- Nanomedicines for Targeted Cancer Therapy, From Nanotechnology Platform to Clinical Nanomedicine, 2012.11.22, GyeongJu Hilton Hotel, Korea, 招待講演
- 21) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」: がんの標的医療への挑戦, 東京大学 2012 第 63 回駒場祭, 2012.11.25, 21KOMCEE レクチャーホール 東京大学駒場キャンパス, 東京都, 招待講演
- 22) K. Kataoka, Self-assembled Nanostructures of Block Copolymers as Smart Vehicles for Gene and Drug Delivery, 2012 USA-Japan Seminar on Polymer Synthesis – From Monomers to Polymers to Materials to Applications, 2012.12.03, The Santa Barbara Hyatt, Santa Barbara, LA, 招待講演
- 23) K. Kataoka, Successful developments of phospholipid polymer biomaterials designed with bioinspiration NIPAM-80 New Innovations in Polymers And (bio)Materials, A Symposium on the Future of Biomaterials to Celebrate Allan S. Hoffman's 80th Birthday, 2012.12.16, Hyatt Regency Hotel, Ka'anapali, Maui, Hawaii, USA, 招待講演
- 24) 片岡一則, 難治がんの標的治療を実現する最先端ナノ DDS 技術, NanoTech2013 第 12 回国際ナノテクノロジー総合展・技術会議, 2013.01.30, 東京ビッグサイト東 4～6 ホール内メインシアター, 基調講演
- 25) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, AKUA 学術集会特別講演, 2013.03.01, グランドプリンスホテル高輪, 東京, 特別講演
- 26) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices, FZI-Seminar, Research Center of Immunology at the University Medical Center in Mainz, 2013.04.03, Mainz, Mainz, Germany, 招待講演
- 27) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices, SFB (Center-of-Excellence), Seminar, University of Bayreuth, 2013.04.07, University of Bayreuth, Bayreuth, Bayern, Germany, 招待講演
- 28) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices, Seminar at Free University of Berlin 2013.04.12, Free University of Berlin, Berlin, Germany, 招待講演
- 29) 片岡一則, 核酸医薬品デリバリーのための超分子ナノキャリア設計, 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けたストラテジーセミナー, 2013.04.26, コクヨホール 東京都, 基調講演
- 30) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～スマートヘルスケアの実現を目指して～, BIOtech 2013 セミナー「国際戦略拠点キングスカイフロント発のライフイノベーション」, 2013.05.08, 東京ビッグサイト東京都, 招待講演
- 31) 片岡一則, 核酸医薬デリバリーのための超分子ナノデバイス～その現状と将来展望～, 第 13 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2013.05.11, 帝京大学薬学部板橋キャンパス, 東京都, 招待講演
- 32) K. Kataoka, Polymeric micellar nanocarriers for gene and oligonucleotide delivery, 16th Annual Meeting of American Society of Gene & Cell Therapy (ASGCT), 2013.05.15, Salt Palace Convention Center, Salt Lake City Utah, USA, 招待講演
- 33) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices, Joint Symposium of the 5th Utah-Inha DDS & Advanced Therapeutics Research Center Symposium and the 7th International Symposium on Intelligent DDS (Dedicated to Prof. You Han Bae's 60th Birthday), 2013.05.23, Incheon, Korea, 招待講演
- 34) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」～がんの標的治療への挑戦～, 日産化学工業 生物科学研究所講演会, 2013.06.04, 日産化学工業

- 生物科学研究所, 埼玉県, 招待講演
- 35) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが先導する診断・治療イノベーション～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 第20回クロマトグラフィーシンポジウム, 2013.06.06, 神戸大学百年記念館, 神戸市, 別講演
- 36) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る魔法の弾丸～がんの標的治療への挑戦～, ナノ学会第11回大会, 2013.06.07, 東京工業大学百年記念館, 東京都, 基調講演
- 37) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices, FRONTIERS2013 - Joint EPFL/University of Tokyo Symposium on "Frontiers in Nanomedicine and Imaging", 2013.06.21, Swiss Federal Institute of Technology, Lausanne, Switzerland, 基調講演
- 38) K. Kataoka, Supramolecular nanodevices to treat cancers intractable by current chemotherapy Gordon Research Conferences in 2013, 2013.07.15, Mount Snow Resort West Dover, Vermont, USA, 招待講演
- 39) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」:がんの標的治療への挑戦, 第2回国際先端生物学・医学・工学会議, 2013.07.27, 愛知県がんセンター 国際交流センター, 名古屋市, 基調講演
- 40) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanocarriers for gene and drug delivery, The 5th Asian Arden Conference, Pharmaceutical Materials Science and Engineering - Characterization and Applications -, 2013.08.06, Aichi gakuin University Kusumoto campus, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi, 基調講演
- 41) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」:がんの標的治療への挑戦, イノベーションフォーラム in つくば【第一部】第13回開催 日経エデュケーションチャレンジ, 2013.08.20, つくば国際会議場, つくば市, 茨城県, 教育講演
- 42) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る「魔法の弾丸」がんのイメージング・標的治療への挑戦, In vivo イメージングフォーラム 2013, 2013.09.06, コクヨホール, 品川区, 東京都, 特別講演
- 43) 片岡一則, ナノバイオテクノロジーが拓く未来医療～超分子ナノデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー～, 第10回日本中性子捕捉療法学会学術集会, 2013.09.07, 岡山大学創立五十周年記念館, 岡山市, 特別講演
- 44) K. Kataoka, Targeted chemo- and moleculartherapy by self-assembled supramolecular nanodevices from functionalized block copolymer, 12th International Conference "Polymers for Advanced Technologies" PAT 2013, 2013.10.01, Free University of Berlin, Berlin, Germany, 招待講演
- 45) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanodevices from functionalized block copolymers, International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013(NMMS2013), 2013.10.08, Sanjyo Conference Hall, Bunkyo-ku, Tokyo, 基調講演
- 46) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, UCLA-USC-Caltech Nanotechnology & Nanomedicine Symposium, Nanotechnology Innovations in Cancer, Infectious Diseases, and Regenerative Medicine, 2013.10.17, California NanoSystems Institute Auditorium at UCLA, California, USA, 招待講演
- 47) 片岡一則, ナノ・バイオによる診断・治療, TUS フォーラム 2013 基礎科学と医療 -科学は技術を招き、技術は科学を深める-, 2013.11.06, ホテルメトロポリタンエドモンド, 千代田区, 招待講演
- 48) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, Nanosystems Initiative Munich - Advisory Board Meeting and Workshop,

- 2013.11.17, Hanns-Seidel-Stiftung, München, Germany, 招待講演
- 49) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, CEMS International Symposium on Supramolecular Chemistry and Functional Materials 2013, 2013.12.15, Takeda Hall, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, 招待講演
- 50) K. Kataoka, Smart supramolecular nanostructures from block copolymers for gene and drug delivery, The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 2013.12.16, The 12th US-Japan Symposium on Drug Delivery Systems, 招待講演
- 51) 片岡一則, 超分子ナノマシンによるがんの標的治療への挑戦, JAPAN NANO 2014 第12回ナノテクノロジー総合シンポジウム, 2014.01.31, 東京ビッグサイト, 江東区, 特別講演
- 52) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nano carriers for targeted drug delivery, 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014 (PSWC), 2014.04.16, Melbourne, Australia, 基調講演
- 53) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanocarriers for targeted drug delivery, CACO-PBSS Cancer Nanotherapeutics Workshop, 2014.04.23, Crowne Plaza Hotel, Foster City, California, USA, 招待講演
- 54) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanocarriers for targeted drug delivery, Seminar at Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina, 2014.04.25, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA, 招待講演
- 55) 片岡一則, 未来の医療を変えるナノDDS～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 2014年度グレーター東大塾 超高齢社会日本を支える医療技術と社会システム, 2014.05.14, 東京大学伊藤国際研究センター 中教室 文京区 東京都, 招待講演
- 56) 片岡一則, 高分子ナノテクノロジーによる標的指向型創薬, 第55回日本神経学会学術大会, 2014.05.21, 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター 福岡市 福岡県, 招待講演
- 57) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanosystems from functionalized block copolymers, NanoBio Australia 2014 5th International NanoBio Conference & 3rd International Conference on BioNano Innovation (ICBNI), 2014.07.08, The University of Queensland, Brisbane, Australia, 招待講演
- 58) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanosystems from functionalized block copolymers, ISACS15 Challenges in Nanoscience, 2014.08.18, University of California, San Diego Price Center, San Diego, California, USA, 総会講演
- 59) 片岡一則, 未来の医療を変えるナノDDS～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 東大柏ベンチャープラザ 10周年記念, 2014.09.04, 東京大学柏の葉キャンパス駅前サテライト 柏市 千葉県, 招待講演
- 60) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanosystems for targeted drug delivery, MGH-UTokyo Symposium 2014 "Frontiers in Biomedical Engineering", 2014.09.24, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA, 招待講演
- 61) 片岡一則, スマートライフケア社会への変革を先導するナノバイオテクノロジー～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 三井薬最研究所 第16回最先端材料技術調査研究委員会, 2014.09.30, 川崎生命科学・環境研究センター 川崎市 神奈川県, 招待講演
- 62) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanosystems for targeted drug delivery, 11th France-Japan DDS Symposium "Recent Achievements and Further Challenges in Drug Delivery Research", 2014.10.08, Awaji

- Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, 招待講演
- 63) K. Kataoka, Smart targeted therapy by self-assembled supramolecular nanosystems, JSPS A3 Foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine, 2014.10.09, Tokyo Women's Medical University, Shinjuku, Tokyo, 招待講演
- 64) 片岡一則, 超分子ナノマシンによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第 79 回日本泌尿器科学会東部総会, 2014.10.14, パシフィコ横浜 横浜市 神奈川県, 教育講演
- 65) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る魔法の弾丸～がんの標的治療への挑戦～, 第 42 回日本潰瘍学会, 2014.11.01, 慶応義塾大学芝共立キャンパス 港区 東京都, 特別講演
- 66) K. Kataoka, Nanotechnology to develop “the magic bullet” for targeted cancer therapy, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2014), 2014.11.05, Hilton Fukuoka Sea Hawk, Fukuoka, Fukuoka, 招待講演
- 67) 片岡一則, Smart targeted therapy by self-assembled supramolecular nanosystems, 第 30 回(2014)京都賞記念ワークショップ先端技術部門「バイオマテリアル研究の最前線」/The 2014 Kyoto Prize Workshop in Advanced Technology, 2014.11.12, 国立京都国際会館 京都市 京都府 /Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, 招待講演
- 68) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, The 10th International Polymer Conference IPC2014, 2014.12.04, International Congress Center, Tsukuba, Ibaraki, 招待講演
- 69) 片岡一則, 高分子ミセル医薬：その特徴と将来展望, 日本 DDS 学会創立 30 周年シンポジウム, 2014.12.15, 東京ガーデンパレス 文京区 東京都, 招待講演
- 70) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanosystems for drug targeting, The 1st International Symposium on Translational Nanomedicine, 2015.01.09, Sun Yat-Sen University (SYSU), Guangzhou, China, 基調講演
- 71) 片岡一則, ナノ DDS 技術による均質・高付加価値な難病治療・再生医療の実現, 第 3 回 国際先端生物学・医学・工学会議 (ICIBME 2015), 2015.01.15, 名古屋大学 豊田講堂シンポジオン 名古屋市、愛知県, 基調講演
- 72) 片岡一則, 未来の医療を変えるナノ DDS ～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 新春特別講演会「未踏科学技術 2015」, 2015.01.20, 公益財団法人日本化学会化学会館 千代田区 東京都, 招待講演

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

核酸医薬のデリバリーシステムの構築、および非臨床試験

研究分担者 西山伸宏 東京工業大学 資源化学研究所 教授

研究要旨

本研究では、研究分担者の片岡と連携して、in vivo 応用が可能な siRNA デリバリーシステムの開発を行っている。研究期間前半においては、リン酸カルシウム(CaP)を主成分とする高分子ミセルの開発を行った。ここでは、CaP ミセルを構成するブロック共重合体の pH 応答性の最適化を行い、新たに開発した CaP ミセルの in vitro および in vivo における有用性を明らかにした。一方、研究期間後半においては、1 分子の siRNA が PEG-poly(L-Lysine)ブロック共重合体により安定化されたユニット PIC のがん集積性を高めることを目的として、ユニット PIC を表面に導入したコア-シェル型の金ナノ粒子を構築した。構築したナノ粒子については、in vitro および in vivo 機能評価を実施し、ナノ粒子の優れた血中滞留性、固形がん集積性、遺伝子ノックダウン活性を明らかにした。

A. 研究目的

核酸医薬の実用化に向けた最大の課題は、安全かつ効率的に核酸分子を標的細胞まで送達することのできるキャリアシステムの開発である。現在、カチオン性脂質やカチオン性高分子から形成される siRNA キャリアの開発が世界中で活発に行われており、一部に肝臓に対する高いデリバリー効率が認められているものの、固形がん等のその他の臓器・組織に対して全身投与で siRNA を送達できるキャリアシステムは未だ開発されていない。

本研究では、分担研究者の片岡と連携して、研究期間の前半においては、siRNA を搭載したリン酸カルシウム(CaP)粒子の表面が PEG-ポリアニオンブロック共重合体によって安定化された CaP ミセルを開発した。本システムは、CaP が低 pH 環境で溶解するために低 pH 環境応答性を示すが、標的細胞に取り込まれた後のエンドソームから細胞質への脱出（エンドソーム脱出）が問題であった。そこで、エンドソーム脱出の効率を改善するために、チャージコンバージョンポリマー(CCP)を利用した系の開発を行ってきた。具体的には、エンドソーム膜に選択的な膜傷害を惹起する PEG-PAsp(DET)(*J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008))の側鎖に低 pH 環境下で選択的に脱離する脱離基を反応させることにより、細胞外 pH においては PEG-ポリアニオンとして CaP の表面に安定に結合するが、エンドソーム内の低 pH 環境においては PEG-PAsp(DET)となるために効率的なエンドソーム脱出を示すシステ

ムの開発を行ってきた (*Biomaterials* 32 (11) 3106-3114 (2011); *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012))。そこで本研究では、CaP ミセルを構成するブロック共重合体の pH 応答性の最適化を行い、新たに開発した CaP ミセルの in vitro および in vivo における有用性を明らかにした。

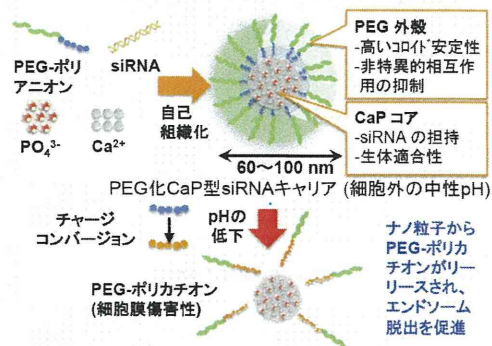


図 1. siRNA 内包リン酸カルシウム (CaP) 型高分子ミセル

一方、研究期間後半においては、1 分子の siRNA と 1 分子ないし 2 分子の PEG-poly(L-Lysine)ブロック共重合体が安定なポリイオンコンプレックス(PIC)を形成することを見出し、この PIC(ユニット PIC と名付ける)のがん集積性を高めることを目的として、ブロック共重合体の末端に導入したチオール基を介して、ユニット PIC を金ナノ粒子の表面に導入した。このようにして調製したコア-シェル型のミセル様金ナノ粒子の siRNA デリバリーシステムとしての機能を in vitro および in vivo 実験により実証した。

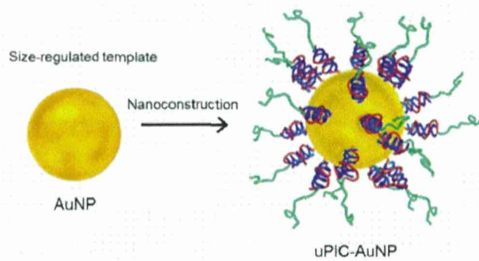


図 2. ユニット PIC/金ナノ粒子 (AuNP) 複合体 (AuNP: 金ナノ粒子、青: siRNA、赤: poly(L-Lysine)、緑: PEG)

B. 研究方法

1) 低 pH 環境応答性 PEG-ポリアニオンブロック共重合体の合成と機能評価

PEG-PAsp(DET)に、低 pH 環境下で選択的に脱離する官能基として、アコチン酸 (Aco) 無水物およびカルボキシジメチル無水マレイン酸(PMM)を導入することによって、低 pH 環境応答性 PEG-ポリアニオンブロック共重合体を合成した(図 3)。

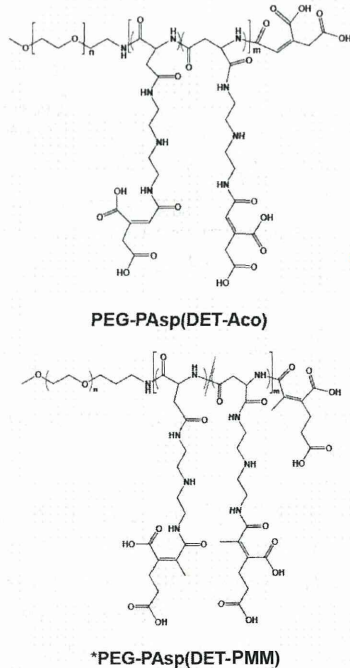


図 3. PEG-PAsp (DET-Aco) および PEG-PAsp (DET-PMM) の化学構造

次に合成した PEG-PAsp(DET-Aco) および PEG-PAsp(DET-PMM) に関して、酸性環境 (pH 5.0) における Aco および PMM の脱離

速度を脱離に伴い生成する DET の一級アミノ基を 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)法により経時的に定量することにより評価した。

2) siRNA 搭載リン酸カルシウム(CaP)ミセルの in vitro および in vivo 機能評価

in vitro 機能評価に関しては、ルシフェラーゼを発現するヒト卵巣がん(SKOV-3-Luc)細胞に対して siLuc(GL3)を内包した CaP ミセルを 48 時間作用させ、Luc の発光量の減少をルミノメーターにより評価した。また、CaP ミセルのエンドソーム脱出能に関して、Alexa647 で標識された siRNA(200nM)を内包した CaP ミセルを SKOV-3-Luc 細胞と 3 時間培養し、培地交換を行った後の siRNA とエンドソーム/リソソームの共局在率を経時的に評価した。

in vivo 機能評価に関しては、乳がん由来 HCC1937wt 細胞を皮下に移植した 14 日後から PEG-PAsp(DET-PMM) から形成された siPRDM14 内包 CaP ミセル(一匹あたり 25 μ g siRNA/回)を週 3 回投与し、腫瘍サイズを評価した。ここでは、ドセタキセル単独と CaP ミセルとの併用効果についても検証した。

3) ユニット PIC/金ナノ粒子複合体の調製

末端にチオール基を導入した PEG-poly(L-Lysine)を合成し、siRNA と 10mM PBS(pH 7.2)中で混合することによりユニット PIC を調製した。調製したユニット PIC は、金ナノ粒子(AuNP)と混合することにより、AuNP の表面に導入した。

4) ユニット PIC/金ナノ粒子(AuNP)複合体の in vitro および in vivo 機能評価

in vitro 機能評価に関しては、ルシフェラーゼ(Luc)を安定発現させた HeLa 細胞とユニット PIC/AuNP 複合体を一定時間培養した後に、Alexa 標識 siRNA の細胞内取り込み量、Luc に対する遺伝子ノックダウン活性を評価した。

in vivo 機能評価に関しては、BALB/c マウス(♀)に AuNP およびユニット PIC/AuNP 複合体を投与し、投与 4 時間後の Alexa-siRNA の固形がん(HeLa-Luc)への集積性を評価した。in vivo における遺伝子ノックダウン活性に関しては、HeLa-Luc 移植 17、18 日目に 5.8 μ g の siRNA(siLuc お

および siCont)を投与し、19 日目の Luc 発光量を IVIS を用いて測定することにより評価した。

(倫理面への配慮)

本研究成果における動物実験に関しては、事前に動物実験計画書を提出し、東京工業大学の動物実験委員会による承認を得た上で実施した。動物実験を行うすべての者は、大学主催の動物実験教育訓練を受講し、認定を受けた上で、「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分に配慮した上で実験を行っている。

C. 研究結果

1) 低 pH 環境応答性 PEG-ポリアニオンブロック共重合体の合成と機能評価

PEG-PAsp(DET-Aco) および PEG-PAsp(DET-PMM)の pH5.0 の酸性環境における Aco および PMM の脱離に伴う DET の一級アミノ基の生成を TNBS 法により評価した結果を図 4 に示す。その結果、Aco と比較して、新たに開発した PMM は酸性環境で速やかに脱離することが確認された。

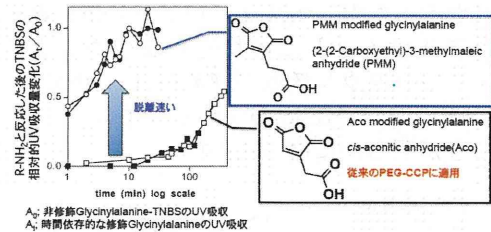


図 4. PEG-PAsp(DET-Aco) および PEG-PAsp(DET-PMM)のチャージコンバージョン速度の評価

2) siRNA 搭載リン酸カルシウム(CaP)ミセルの in vitro および in vivo 機能評価

ヒト卵巣がん SKOV-3-Luc 細胞に対して siLuc 内包 CaP ミセルの遺伝子発現抑制効率を評価した(図 5)。その結果、50nM siRNA における Luc 発光量の差異から分かるように、PEG-PAsp(DET-PMM)から形成された CaP ミセルは、PEG-PAsp(DET-Aco)から形成されたそれよりも効率的な遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかになった。

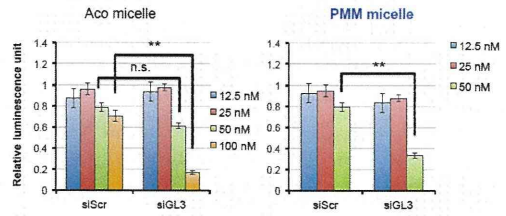


図 5. PEG-PAsp(DET-Aco) および PEG-PAsp(DET-PMM)から形成された siLuc 内包 CaP ミセルの SKOV-3-Luc 細胞に対する遺伝子発現抑制効果

CaP ミセルのエンドソーム脱出能に関しては、SKOV-3-Luc 細胞における Alexa647 標識 siRNA と後期エンドソーム/リソソームの共局在を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM)により観察した(図 6 左)。ここで、黄色のピクセルは、Alexa647 標識 siRNA(赤)と後期エンドソーム/リソソーム(緑)の共局在を示しており、赤は後期エンドソーム/リソソームから脱出して細胞質に移行した Alexa647 標識 siRNA を示しているものと考えられる。従って、共局在率= (黄色の pixel) / [(黄色の pixel) + (赤色の pixel)]で算出することが可能であり、共局在率を経時的に評価した結果を図 6 右に示した。その結果、PEG-PAsp(DET-PMM)から形成された CaP ミセルは、PEG-PAsp(DET-Aco)から形成されたそれよりも速やかな共局在率の減少を示すことが明らかになり、PEG-PAsp(DET-PMM)から形成された CaP ミセルはより効率的なエンドソーム脱出を示すことが示唆された。

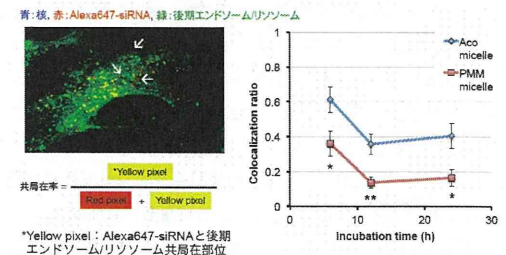


図 6. SKOV-3-Luc 細胞における siRNA 内包 CaP ミセル作用後の Alexa647 標識 siRNA と後期エンドソーム/リソソーム(緑)の共局在の評価

in vivo 機能評価に関しては、ヒト乳がん

HCC1937wt 細胞を皮下に移植したマウスに対して、siPRDM14 内包 CaP ミセル、ドセタキセル、および両者の併用による治療効果を検証した(図 7)。その結果、siPRDM14 内包 CaP ミセルとドセタキセルはそれぞれ有意な制がん活性を示し、さらに両者を併用することによって抗腫瘍効果が増強されることが明らかになった。

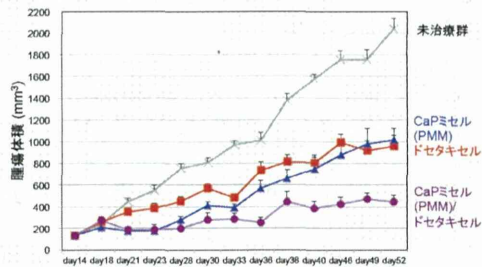


図 7. ヒト乳がん HCC1937wt 細胞の皮下移植モデルに対する siPRDM14 内包 CaP ミセル、ドセタキセル、および両者の併用の治療効果

3) ユニット PIC/金ナノ粒子複合体の調製

PEG-poly(L-Lysine)-SH (PEG-PLL-SH) (Lys 重合度 40) と siRNA による会合体形成を蛍光相関分光(FCS)法により評価したところ、PEG-PLL-SH と siRNA のモル比が 1:1 の時に 1 分子のポリマーと siRNA から形成される会合体(ユニット PIC)が形成されることが確認された。次に、ユニット PIC と金ナノ粒子(AuNP)を混合することによって複合体を調製した。ユニット PIC/AuNP 複合体の動的光散乱(DLS)測定を行ったところ、AuNP の流体力学直径が 20nm からユニット PIC の導入により 38nm に増大することが確認された。また、AuNP のゼータ電位は、ユニット PIC の導入により -31.3mV から -24.7mV に増大することも確認された。さらに、AuNP の粒子 1 個あたりに導入されたユニット PIC 量を評価したところ、約 20 分子の siRNA が AuNP の表面に導入されていることが確認された。

形成されたユニット PIC/AuNP 複合体のアニオン性多糖であるヘパリンによる置き換わりに対する安定性を評価した(図 8)。その結果、ユニット PIC を AuNP に導入することによりヘパリンに対する安定性が増大することが確認された。さらに、10mM のグルタチオン(GSH)を添加することによ

り、AuNP からの siRNA 放出が促進されることが確認された(10mM の GSH は細胞質内と同程度の濃度)。これは、AuNP 表面でユニット PIC と GSH が置き換わることによるものであると考えられ、この結果より、ユニット PIC/AuNP 複合体は、細胞質内の還元環境に反応してユニット PIC を放出する特性を有することが示唆された。

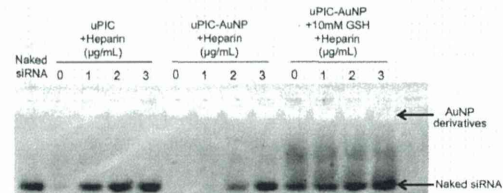


図 8. ユニット PIC およびユニット PIC/AuNP 複合体のヘパリン、GSH に対する安定性評価 (アガロースゲル電気泳動による siRNA のリリースの評価)

4) ユニット PIC/金ナノ粒子(AuNP)複合体の in vitro および in vivo 機能評価

in vitro 機能評価に関しては、Luc を安定発現させた HeLa 細胞に対して、siLuc を 48 時間作用させたところ、ユニット PIC 単独では 100nM および 200nM の siRNA 濃度で有意な遺伝子ノックダウン活性が見られなかったが、ユニット PIC を AuNP 表面に導入することにより配列依存的な遺伝子ノックダウン活性が認められ、50%以上の標的遺伝子(Luc)がノックダウンされることが明らかになった(図 9)。

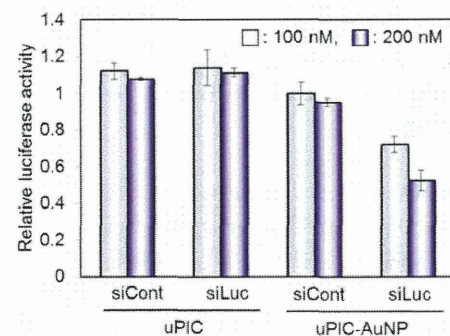


図 9. ユニット PIC およびユニット PIC/AuNP 複合体の遺伝子ノックダウン活性 (HeLa-Luc 細胞に対して siLuc を使用)

ユニット PIC/AuNP 複合体による遺伝子ノックダウン効率向上のメカニズムに関

して、ユニット PIC およびユニット PIC/AuNP 複合体の細胞内取り込み量を Alexa-siRNA を用いてフローサイトメトリーにより解析したところ(図 10)、ユニット PIC を AuNP に導入することにより siRNA の細胞内取り込み量が顕著に増大することが確認された。

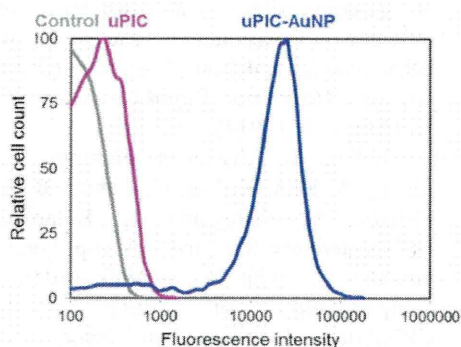


図 10. Alexa 標識 siRNA の HeLa-Luc 細胞による取り込み量 (フローサイトメトリーによる評価)

in vivo 機能評価に関しては、AuNP およびユニット PIC/AuNP 複合体を i.v. 投与し、Alexa-siRNA のがん組織への集積性を評価したところ、ユニット PIC/AuNP 複合体は、naked siRNA およびユニット PIC 単独と比べて顕著に高いがん集積性を示すことが明らかになった。そこで、HeLa-Luc 細胞の固形がんモデルに対して siLuc を投与し、がん組織の Luc 発光量の変化を評価した(図 11)。その結果、ユニット PIC/AuNP 複合体は、in vivo においても有意な遺伝子ノックダウン活性を示すことが示された。

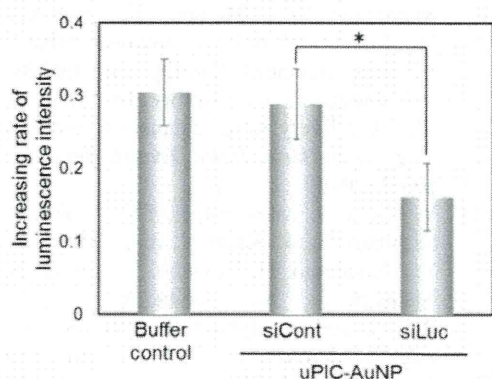


図 11. ユニット PIC/AuNP 複合体の in vivo 遺伝子ノックダウン活性

D. 考察

siRNA 搭載 CaP ミセルに関しては、新規チャージコンバージョンポリマー PEG-PAsp(DET-PMM)を合成し、このポリマーを利用して形成された siRNA 内包 CaP ミセルの in vitro および in vivo における機能検証を行った。図 4 に示したように、PEG-PAsp(DET-PMM)は、エンドソーム/リソソーム内の低 pH 環境下で速やかに PMM が脱離してエンドソーム/リソソーム膜を傷害する PEG-PAsp(DET)となることが示された。カチオン性の PEG-PAsp(DET)は、エンドソーム内で CaP から解離してエンドソーム膜と相互作用するものと考えられ、実際に、図 6 において Alexa647 標識 siRNA からエンドソーム/リソソームから細胞質内に効率的に移行することが示唆された。その結果、PEG-PAsp(DET-PMM) から形成された siRNA 内包 CaP ミセルは培養がん細胞に対して効率的な RNA 干渉効果を示し(図 5)、ヒト乳がん細胞の固形がんモデルに対して siPRDM14 をデリバリーすることによる有意な制がん活性が確認された(図 7)。また、siPRDM14 内包 CaP ミセルとドセタキセルを併用することによる抗腫瘍効果の増強作用も確認することができた(図 7)。

一方、ブロック共重合体と 1 分子の siRNA から形成されるユニット PIC に関しては、がん集積性を高めることを目的として、AuNP の表面にユニット PIC を導入したユニット PIC/AuNP 複合体を開発した。本研究では、AuNP 表面への導入によって、ユニット PIC の細胞取り込み量や in vitro での遺伝子ノックダウン活性が大幅に向上することを確認され(図 9、図 10)、ユニット PIC/AuNP 複合体は、siRNA 単独およびユニット PIC と比べて優れたがん集積性を示すことが明らかになった。最後に、HeLa-Luc 細胞の固形がんモデルに対して、ユニット PIC/AuNP 複合体を用いて siLuc をデリバリーしたところ、約 50%の標的遺伝子のノックダウン効果が確認された(図 11)。以上のように、ユニット PIC/AuNP 複合体は、上記の CaP ミセルと遜色ない有用な siRNA キャリアであることが示された。

E. 結論

本研究では、革新的な siRNA のデリバリーシステムとして、CaP ミセルとユニット PIC/金ナノ粒子複合体の2種類のキャリアを開発した。それぞれのシステムに関して、さまざまな観点から機能評価を行い、in vivo 実験での有用性を明らかにした。今後は、研究代表者との連携による非臨床・臨床試験に向けて、デリバリーシステムの絞り込みと構造最適化を進めていく予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) J. -Y. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* 39 23-30 (2015)
- 2) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8 (9) 8979-8991 (2014)
- 3) H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.-C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M. R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation. *J. Control. Release* 189 1-10 (2014)
- 4) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. Ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (35) 12396-12405 (2014)
- 5) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014)
- 6) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014)
- 7) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
- 8) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014)
- 9) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
- 10) H. -J. Kim, T. Ishii, M. Zheng, S. Watanabe, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Multifunctional polyion complex micelle featuring enhanced stability, targetability, and endosome escapability for systemic siRNA delivery to subcutaneous model of lung cancer. *Drug Deliv. Transl. Res.* 4 (1) 50-60 (2014)
- 11) Y. Miura, T. Takenaka, K. Toh, S. Wu, H. Nishihara, M. R. Kano, Y. Ino, T. Nomoto, Y. Matsumoto, H. Koyama, H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *ACS Nano* 7 (10) 8583-8592 (2013)

- 12) S. Deshayes, H. Cabral, T. Ishii, Y. Miura, S. Kobayashi, T. Yamashita, A. Matsumoto, Y. Miyahara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors. *J. Am. Chem. Soc.* 135 (41) 15501-15507 (2013)
- 13) H. Cabral, M. Murakami, H. Hojo, Y. Terada, M. R. Kano, U. -I. Chung, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted therapy of spontaneous murine pancreatic tumors by polymeric micelles prolongs survival and prevents peritoneal metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 110 (28) 11397-11402 (2013)
- 14) H. Takemoto, K. Miyata, S. Hattori, T. Ishii, T. Suma, S. Uchida, N. Nishiyama, K. Kataoka, Acidic pH-responsive siRNA conjugate for reversible carrier stability and accelerated endosomal escape with reduced IFN α -associated immune response. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (24) 6218-6221 (2013)
- 15) S. Wu, V. Kasim, M. R Kano, S. Tanaka, S. Ohba, Y. Miura, K. Miyata, X. Liu, A. Matsushashi, U.-I Chung, K. Kataoka, N. Nishiyama, M. Miyagishi, Transcription factor YY1 contributes to tumor growth by stabilizing hypoxia factor HIF-1 α in a p53-independent manner. *Cancer Res.* 73 (6) 1787-1799 (2013)
- 16) N. Gouda, K. Miyata, R.J. Christie, T. Suma, A. Kishimura, S. Fukushima, T. Nomoto, X. Liu, N. Nishiyama, K. Kataoka, Silica nanogelling of environment-responsive PEGylated polyplexes for enhanced stability and intracellular delivery of siRNA. *Biomaterials*, 34 (2) 562-570 (2013)
- 17) T. Suma, K. Miyata, Y. Anraku, S. Watanabe, R. J. Christie, H. Takemoto, M. Shioyama, N. Gouda, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Kataoka, Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG. *ACS Nano* 6 (8) 6693-6705 (2012)
- 18) H. Takemoto, K. Miyata, T. Ishii, S. Hattori, S. Osawa, N. Nishiyama, K. Kataoka, Accelerated polymer-polymer click conjugation by freeze-thaw treatment. *Bioconjugate. Chem.* 23 (8) 1503-1506 (2012)
- 19) F. Pittella, K. Miyata, Y. Maeda, T. Suma, S. Watanabe, Q. Chen, R. J. Christie, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles. *J. Control. Release* 161 (3) 868-874 (2012)
- 20) R. J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection. *ACS Nano* 6 (6) 5174-5189 (2012)
- 21) T. Suma, K. Miyata, T. Ishii, S. Uchida, H. Uchida, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced stability and gene silencing ability of siRNA-loaded polyion complexes formulated from polyaspartamide derivatives with a repetitive array of amino groups in the side chain. *Biomaterials* 33 (9) 2770-2779 (2012)

2. 学会発表

- 1) 西山伸宏, "生体イメージングを活用したナノ DDS 設計", 3S05a 疾患克服を目指したケミカルバイオフォトニクス技術第 87 回日本生化学会大会, 京都国際会館, 京都 2014 年 10 月 17 日(シンポジスト)
- 2) 西山伸宏, "高分子ミセル型ナノ医薬品の研究開発", 新製剤技術とエンジニアリングを考える会 第 12 回技術講演会, 京都国際会館, 京都 2014 年 7 月 16 日(招待講演)
- 3) N. Nishiyama, "Biological functionalities of polymeric micelle systems for targeting cancer", The European Summit for Clinical Nanomedicine 2014 (6th CLINAM 2014) (23-25 June), Congress Center Basel, Basel, Switzerland, June 23, 2014 (Invited Lecture)
- 4) 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーを基盤とするナノ医薬品の開発", 第 10 回つくばがん遺伝子治療研究会, ステーションコンファレンス東京, 東京 2014 年 6 月 20 日(招待講演)
- 5) 西山伸宏, "がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 日本病院薬剤師会東北ブロック第 4 回学術大会, 仙台国際センター, 仙台 2014

- 年 5 月 31 日(シンポジスト)
- 6) N. Nishiyama, “Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy”, Emerging Biomaterials 2014 (23 May), KAIST Institute, Korea, May 23, 2014 (Invited Lecture)
 - 7) 西山伸宏, "がんの診断・治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 製剤機械技術学会 第 23 回大会、ニッショーホール, 2013 年 10 月 10 日(特別講演)
 - 8) 西山伸宏, "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", BioJapan 2013、パシフィコ横浜, 2013 年 10 月 9 日(招待講演)
 - 9) 西山伸宏, "高分子ナノテクノロジーによるがんの診断・治療システムの創製", 東京工業大学 バイオマテリアルシンポジウム, 東京工業大学すずかけホール, 2013 年 9 月 19 日(招待講演)
 - 10) 西山伸宏, "生体イメージングを活用したナノ DDS 設計", 第 22 回 日本バイオイメージング学会学術集会, 東京大学大学院薬学系総合研究棟, 文京区 2013 年 9 月 16 日(招待講演)
 - 11) 西山伸宏, "核酸医薬のデリバリーのための高分子ナノキャリアの設計", 第 29 回日本 DDS 学会学術集会, シンポジウム 3 核酸医薬の基礎と臨床における新展, 京都テルサ, 京都 2013 年 7 月 5 日(招待講演)
 - 12) N. Nishiyama, “Development of polymeric micellar nanocarriers for cancer diagnosis and therapy”, The 4th Asian Biomaterials Congress, The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, June 29, 2013 (Invited Lecture)
 - 13) N. Nishiyama, “Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy”, 2013 International Advanced Drug Delivery Symposium, ITRI, Taiwan, May 2, 2013 (Invited Lecture)
 - 14) N. Nishiyama, K. Kataoka, “Development of polymeric micellar nanocarriers for cancer diagnosis and therapy”, RSC Publishing-iCeMS Joint International Symposium Cell-Material Integration and Biomaterials Science, Shiran Kaikan, Kyoto University, Kyoto, March 18, 2013(招待講演)
 - 15) 西山伸宏, "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", ナノメディシンフォーラム, 東京慈恵会医科大学, 港区 2012 年 10 月 19 日(招待講演)
 - 16) 西山伸宏, "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", 創剤フォーラム第 18 回シンポジウム, タワーホール船堀, 江戸川区 2012 年 9 月 28 日(招待講演)
 - 17) N. Nishiyama, K. Kataoka, “Design of polymeric micelles for targeting intractable cancers”, 第 71 回日本癌学会学術総会ロイトン札幌, 札幌 2012 年 9 月 20 日(一般講演)
 - 18) 西山伸宏, 片岡一則 "がんの革新的診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", 日本薬剤学会 第 27 年会, 神戸国際会議場, 神戸 2012 年 5 月 26 日(招待講演)
 - 19) 西山伸宏, "がんの診断・治療のためのスマート機能型高分子ミセルの開発", 第 7 回日本分子イメージング学会総会・学術集会, アクトシティ浜松, 浜松市 2012 年 5 月 24 日(招待講演)
 - 20) 西山伸宏, "光線力学治療のための高分子ミセル型 DDS の開発", 第 51 回生体医工学会 オーガナイズドセッション「物理的作用を活用した高機能ドラッグデリバリーシステム」, 福岡国際会議場, 福岡市 2012 年 5 月 11 日(依頼講演)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発

研究分担者 平田 公一 札幌医科大学外科学第一講座 教授

研究要旨

難治性膵がんや乳がん幹細胞に対する新規分子標的治療薬開発の候補として有望な PRDM14 遺伝子について、マイクロアレイや qRT-PCR などの遺伝子発現情報と臨床病理学的因子との関連解析を行った。Estrogen receptor, Progesteron receptor, Her-2 receptor と PRDM14 の発現状況の間には関連を示す傾向にあった。これらの受容体発現状況を検討したうえで、PRDM14 に対する核酸治療薬による治療を行うことで、より有効な乳がん個別化治療につながるものと考えられた。

A. 研究目的：

女性最多の悪性腫瘍かつ患者数が増加し撲滅が急務である「乳がん」を対象に、がん幹細胞において強い発現量を認める PRDM14 を標的とした核酸治療薬が開発されつつある。PRDM14 は膵がんにおいても高い発現を認めることが知られており、本研究では、難治性乳がん、膵がんの治療成績向上のため、PRDM14 標的治療薬の開発を促進すると同時に、PRDM14 の発現量と ER, PgR, Her-2 などの受容体発現状況との関連を検討し、より有効性の高い乳がん・膵がん薬物療法を開発することを目的とする。

B. 研究方法：

組織検体を用いて以下の研究を遂行した。具体的な研究方法としては、以下のとおりである。

① ステージ別に分類された病情報のある凍結膵がん組織より RNA 抽出を行ったのち cDNA を合成し、quantitative RT-PCR 法にて PRDM14 の mRNA 発現レベルを検討した。

② 病期別に分類された病情報のある凍結乳がん組織より cDNA を合成し、quantitative RT-PCR 法にて PRDM14 の mRNA 発現レベルを検討した。

③ 基本データとして提供される、年齢、性別、病理診断による組織型、分化度、TNM 分類、病期と①の結果を統合し、PRDM14 遺伝子発現と病理組織学的因子との相関を検討した。

④ Triple marker (ER, PgR, Her2) と PRDM14 発現状況の関係を検討し、より効果的な乳がん治療法の開発を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、札幌医科大学臨床研究審査委員会の承認を得て実施し、臨床検体の取り扱いについては同委員会の指針に従って行った。(承認番号 24-159)

C. 研究結果：

本研究計画に従い、随時膵がん患者の手術摘出標本（凍結標本）10 症例より Total RNA を単離し、逆転写反応により cDNA 合成をおこなった。8 症例から Total RNA が抽出され、8 症例について PRDM14 の発現解析が行われた。その結果、8 例中 6 例において、正常膵に比べ膵がん組織において PRDM14 の高発現を認めた。PRDM14 の発現と病理組織型との関係は明らかではなかった。

また、先行研究と合わせると、これまでに乳がん臨床検体 112 例を用いた PRDM14 の発現解析が終了した。さらにこの 112 例中 79 例については独立した 2 サンプルセット（先行研究では乳がん臨床検体 29 例。本研究は 50 例）にてマイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析が行われた。用いられたサンプルは、閉経前：後 = 24.7% : 75.3%、cStage 1:2:3:4 = 30.8%:53.8%:14%:1.3%、ER, PgR, Her2 陽性はそれぞれ、70.9%, 43.8%, 16.3% であった。マイクロアレイ解析結果より PRDM14 遺伝子の発現量をがん組織と正常組織の間で比較したところ、90% 以上の乳がん組織において、正常よりも高い発現を認めた。この結果は、上記 2 セットの発現解析結果において再現性が確認された。

ER 発現状況と PRDM14 の関連を検討したところ、生検組織・手術摘出組織いずれにおいても ER+ 症例で PRDM14 の発現が高い傾向を認めた（両組織とも $P = 0.03$ ）。また Her2 発現状況との関係については、Her2 陰性症例で PRDM14 の発現が高い傾向を認めた（生検 $P = 0.02$, 摘出組織 $P = 0.05$ ）。triple negative 乳がんとそれ以外の乳がんの間で、PRDM14 発現量に有意な差を認めなかった。

D. 考察：

mRNA レベルでの遺伝子発現解析を行う際にはRNAが分解されていないfreshな状態で凍結保存された組織検体から良質なRNAを抽出することが重要である。本研究では研究計画に従い、発現解析を行う前に、より正確な発現情報取得のため、Total RNAを抽出した段階で、吸光度計による260/280nmの測定や電気泳動によるRibosomal bandの確認を行い、良質なRNAの抽出に細心の注意を払った。

本研究により、膵がん臨床検体を用いた解析の結果、PRDM14は膵がん組織においても正常膵に比べ特異的に高発現している可能性が示唆された。乳がん幹細胞および膵がんにおいて高い発現量を認める転写因子PRDM14遺伝子は転写制御を受ける遺伝子がいくつか報告されているものの、PRDM14による転写制御を受けることが知られていない、未知の遺伝子が多数存在し得ることが推測されている。

先行研究において、PRDM14の発現は乳がん幹細胞や、triple negative乳がんにおいて高い発現を認めているという報告がなされていたが、本研究ではホルモンレセプター陽性症例でむしろ発現が高い傾向を認めた。いずれにせよ、Her2陰性症例ではPRDM14の発現が高いことから、全乳がんの70%程度を占めるHer2陰性乳がんの治療薬として、PRDM14核酸治療薬が期待できるものと考えられる。

E. 結論：

マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現情報やqRT-PCRによる発現情報と詳細な臨床病理学的情報からPRDM14は乳がんおよび膵がん組織において正常組織より高い発現を示し、PRDM14標的治療薬は難治性膵がんや乳がんの中でも特にHer2陰性乳がんに対する新たな効果的治療薬として開発が期待されるものと考えられた。

F. 研究発表：

1. 論文発表

1: Keira Y, Takasawa A, Murata M, Nojima M, Takasawa K, Ogino J, Higashiura Y, Sasaki A, Kimura Y, Mizuguchi T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N, Hasegawa T. An immunohistochemical marker panel including claudin-18, maspin, and p53 improves diagnostic accuracy of bile duct neoplasms in surgical and presurgical biopsy specimens. *Virchows Arch*. 2015 Mar;466(3):265-77.

2: Mizuguchi T, Torigoe T, Satomi F, Shima H, Kutomi G, Ota S, Ishii M, Hayashi H, Asakura S, Hirohashi Y, Meguro M, Kimura Y, Nishidate T, Okita K, Ishino M, Miyamoto A, Hatakenaka M, Sato N, Hirata K. Tr

ials of vaccines for pancreatic ductal adenocarcinoma: Is there any hope of an improved prognosis? *Surg Today*. 2015 Feb 5.

3: Tanaka T, Okuya K, Kutomi G, Takaya A, Kajiwara T, Kanaseki T, Tsukahara T, Hirohashi Y, Torigoe T, Hirata K, Okamoto Y, Sato N, Tamura Y. Heat shock protein 90 targets a chaperoned peptide to the static early endosome for efficient cross-presentation by human dendritic cells. *Cancer Sci*. 2015 Jan;106(1):18-24.

4: Ota D, Kanayama M, Matsui Y, Ito K, Maeda N, Kutomi G, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Takaoka A, Chambers AF, Morimoto J, Uede T. Tumor- α 9B1 integrin-mediated signaling induces breast cancer growth and lymphatic metastasis via the recruitment of cancer-associated fibroblasts. *J Mol Med (Berl)*. 2014 Dec;92(12):1271-81

5: Furuhashi T, Hirata K, Wakao F, Okita K, Imamura M, Maehara Y, Nishiyama M. Questionnaire survey for the development and publication of cancer clinical practice guidelines in Japan. *Int J Clin Oncol*. 2014 Oct;19(5):771-8

6: Iyama S, Sato T, Tatsumi H, Hashimoto A, Tatekoshi A, Kamihara Y, Horiguchi H, Ibata S, Ono K, Murase K, Takada K, Sato Y, Hayashi T, Miyanishi K, Akizuki E, Nobuoka T, Mizuguchi T, Takimoto R, Kobune M, Hirata K, Kato J. Efficacy of Enteral Supplementation Enriched with Glutamine, Fiber, and Oligosaccharide on Mucosal Injury following Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Case Rep Oncol*. 2014 Oct 22;7(3):692-9

7: Kyuno D, Yamaguchi H, Ito T, Kono T, Kimura Y, Imamura M, Konno T, Hirata K, Sawada N, Kojima T. Targeting tight junctions during epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014 Aug 21;20(31):10813-24.

8: Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Takamaru T, Shima H, Suzuki Y, Otokozawa S, Zembutsu H, Mori M, Hirata K. Lymph node shape in computed tomography imaging as a predictor for axillary lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):681-685

- 9: Kutomi G, Ohmura T, Satomi F, Maeda H, Shima H, Kameshima H, Okazaki M, Masuoka H, Sasaki K, Hirata K. A phase I study of combination therapy with nanoparticle albumin-bound paclitaxel and cyclophosphamide in patients with metastatic or recurrent breast cancer. *Int J Clin Oncol*. 2014 Jul 30.
- 10: Noshō K, Igarashi H, Nojima M, Ito M, Maruyama R, Yoshii S, Naito T, Sukawa Y, Mikami M, Sumioka W, Yamamoto E, Kurokawa S, Adachi Y, Takahashi H, Okuda H, Kusumi T, Hosokawa M, Fujita M, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Suzuki H, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of microRNA-31 with BRAF mutation, colorectal cancer survival and serrated pathway. *Carcinogenesis*. 2013 Dec 10.
- 11: Tanimizu N, Nakamura Y, Ichinohe N, Mizuguchi T, Hirata K, Mitaka T. Hepatic biliary epithelial cells acquire epithelial integrity but lose plasticity to differentiate into hepatocytes in vitro during development. *J Cell Sci*. 2013 Nov 15;126(Pt 22):5239-46.
- 12: Hashimoto K, Masumori N, Tanaka T, Maeda T, Kobayashi K, Kitamura H, Hirata K, Tsukamoto T. Zoledronic acid but not somatostatin analogs exerts anti-tumor effects in a model of murine prostatic neuroendocrine carcinoma of the development of castration-resistant prostate cancer. *Prostate*. 2013 Apr;73(5):500-11.
- 13: Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H, Nakamura Y, Mizuguchi T, Kon J, Hirata K, Mitaka T. Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. *Hepatology*. 2013 Mar;57(3):1192-202.
- 14: Prognosis and Predictors of Surgical Complications in Hepatocellular Carcinoma Patients With or Without Cirrhosis after Hepatectomy. Mizuguchi T, Kawamoto M, Meguro M, Nakamura Y, Ota S, Hui TT, Hirata K. *World J Surg*. 2013 Mar 12.
- 15: A phase II study of neoadjuvant combination chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and S-1 for locally advanced resectable gastric cancer: nucleotide excision repair (NER) as potential chemoresistance marker. Hirakawa M, Sato Y, Ohnuma H, Takayama T, Sagawa T, Nobuoka T, Harada K, Miyamoto H, Sato Y, Takahashi Y, Katsuki S, Hirayama M, Takahashi M, Ono M, Maeda M, Takada K, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Hirata K, Kato J. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 Mar;71(3):789-97.
16. Expression and function of FERMT genes in colon carcinoma cells. Kiriyaama K, Hirohashi Y, Torigoe T, Kubo T, Tamura Y, Kanaseki T, Takahashi A, Nakazawa E, Saka E, Ragnarsson C, Nakatsugawa M, Inoda S, Asanuma H, Takasu H, Hasegawa T, Yasoshima T, Hirata K, Sato N. *Anticancer Res*. 2013 Jan;33(1):167-73.
17. Alterations in the human epidermal growth factor receptor 2-phosphatidylinositol 3-kinase-v-Akt pathway in gastric cancer. Sukawa Y, Yamamoto H, Noshō K, Kunimoto H, Suzuki H, Adachi Y, Nakazawa M, Nobuoka T, Kawayama M, Mikami M, Matsuno T, Hasegawa T, Hirata K, Imai K, Shinomura Y. *World J Gastroenterol*. 2012 Dec 7;18(45):6577-86.
18. Treatment of pancreatic fibrosis with siRNA against a collagen-specific chaperone in vitamin A-coupled liposomes. Ishiwatari H, Sato Y, Murase K, Yoneda A, Fujita R, Nishita H, Birukawa NK, Hayashi T, Sato T, Miyanishi K, Takimoto R, Kobune M, Ota S, Kimura Y, Hirata K, Kato J, Niitsu Y. *Gut*. 2012 Nov 20
19. Immunotherapeutic benefit of α -interferon (IFN α) in survivin2B-derived peptide vaccination for advanced pancreatic cancer patients. Kameshima H, Tsuruma T, Kutomi G, Shima H, Iwayama Y, Kimura Y, Imamura M, Torigoe T, Takahashi A, Hirohashi Y, Tamura Y, Tsukahara T, Kanaseki T, Sato N, Hirata K. *Cancer Sci*. 2013 Jan;104(1):124-9.
20. Zoledronic acid but not somatostatin analogs exerts anti-tumor effects in a model of murine prostatic neuroendocrine carcinoma of the development of castration-resistant prostate cancer. Hashimoto K, Masumori N, Tanaka T, Maeda T, Kobayashi K, Kitamura H, Hirata K, Tsukamoto T. *Prostate*. 2012 Sep 19.
21. Differentiation capacity of hepatic stem/progenitor cells isolated from D-galactosamine-treated rat livers. Ichinohe N, Tanimizu N, Ooe H, Nakamura Y, Mizuguchi T, Kon J, Hirata K, Mitaka T. *Hepatology*. 2013 Mar;57(3):1192-202.

22. Heat-shock proteins as endogenous ligands building a bridge between innate and adaptive immunity. Tamura Y, Torigoe T, Kukita K, Saito K, Okuya K, Kutomi G, Hirata K, Sato N. *Immunotherapy*. 2012 Aug;4(8):841-52.
23. Heat shock enhances the expression of cytotoxic granule proteins and augments the activities of tumor-associated antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. Takahashi A, Torigoe T, Tamura Y, Kanaseki T, Tsukahara T, Sasaki Y, Kameshima H, Tsuruma T, Hirata K, Tokino T, Hirohashi Y, Sato N. *Cell Stress Chaperones*. 2012 Nov;17(6):757-63.
24. Genome-wide analysis of DNA methylation identifies novel cancer-related genes in hepatocellular carcinoma. Shitani M, Sasaki S, Akutsu N, Takagi H, Suzuki H, Nojima M, Yamamoto H, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. *Tumour Biol*. 2012 Oct;33(5):1307-17.
25. ゲノムワイド関連解析によるジェムシタビン副作用関連遺伝子の同定, 前佛 均, 清谷 一馬, 宇野 智子, 木村 康利, 荻田 泰誠, 光畑 直喜, 伊奈 志乃美, 鬼原 史, 山上 裕機, 平田 公一, 中村 祐輔 胆と膝(0388-9408)34 巻 2 号 143-148(2013.02)
26. 進行乳癌に対する術前化学療法後の局所再発例の検討, 鈴木 やすよ, 岡崎 稔, 岡崎 亮, 岡崎 裕, 増岡 秀次, 浅石 和昭, 里見 露乃, 高丸 智子, 九富 五郎, 島 宏彰, 大村 東生, 渡部 芳樹, 佐藤 文彦, 平田 公一
日本癌治療学会誌(0021-4671)47 巻 3 号
Page2449(2012.10)
27. StageIV 乳癌に対する原発巣切除に対する意義を考える, 高丸 智子, 鈴木 やすよ, 里見 露乃, 島 宏彰, 九富 五郎, 亀嶋 秀和, 大村 東生, 平田 公一
日本癌治療学会誌(0021-4671)47 巻 3 号
Page1673(2012.10)
28. 若年女性に対する「乳がん講義」の教育効果, 大村 東生, 九富 五郎, 亀嶋 秀和, 島 宏彰, 増岡 秀次, 平田 公一, 浅石 和昭, 石谷 邦彦
日本乳癌検診学会誌(0918-0729)21 巻 3 号
Page478(2012.10)
29. 当院医師が関与している施設乳癌検診の成績, 亀嶋 秀和, 大村 東生, 九富 五郎, 鈴木 やすよ, 高丸 智子, 里見 露乃, 平田 公一
日本乳癌検診学会誌(0918-0729)21 巻 3 号
Page461(2012.10)
30. 乳癌の治療戦略 化学療法 術前化学療法の治療効果予測, 大村 東生, 九富 五郎, 平田 公一, 日本臨床(0047-1852)70 巻増刊 7 乳癌
Page566-570(2012.09)
31. 乳癌の検査・診断 センチネルリンパ節生検色素法単独によるセンチネルリンパ節生検 九富 五郎, 大村 東生, 鈴木 やすよ, 平田 公一
日本臨床(0047-1852)70 巻増刊 7 乳癌
Page365-368(2012.09)
32. 乳癌の診断・治療の変遷と展望 外科治療の変遷と展望, 九富 五郎, 大村 東生, 鈴木 やすよ, 平田 公一, 日本臨床(0047-1852)70 巻増刊 7 乳癌
Page13-17(2012.09)
33. 転移性乳癌に対する GT(ゲムシタビン+パクリタキセル)療法の有効性の検討 亀嶋 秀和, 田山 誠, 染谷 哲史, 秋山 守文, 大村 東生, 平田 公一
日本乳癌学会総会プログラム抄録集 20 回
Page477(2012.05)
34. 術前に非浸潤性乳管癌と診断された症例においてセンチネルリンパ節生検の省略は可能か?, 里見 露乃, 大村 東生, 高丸 智子, 島 宏彰, 九富 五郎, 亀嶋 秀和, 鈴木 やすよ, 長谷川 匡, 平田 公一
日本乳癌学会総会プログラム抄録集 20 回
Page376(2012.05)
35. Luminal タイプの抗癌剤感受性と長期予後, 鈴木 やすよ, 水口 徹, 岡崎 稔, 高丸 智子, 大村 東生, 島 宏彰, 九富 五郎, 里見 露乃, 平田 公一
日本乳癌学会総会プログラム抄録集 20 回
Page301(2012.05)
36. 転移・再発乳癌症例に対する nab-paclitaxel と Cyclophosphamide の併用第 I 相試験 九富 五郎, 大村 東生, 里見 露乃, 高丸 智子, 島 宏彰, 鈴木 やすよ, 増岡 秀次, 平田 公一
日本乳癌学会総会プログラム抄録集 20 回
Page266(2012.05)
37. 乳腺専門医に求められる資質 日本外科学会外科専門医制度と乳腺専門医, 平田 公一, 九富 五郎, 鈴木 やすよ, 島 宏彰, 高丸 智子, 里見 露乃, 大村 東生, 岩瀬 弘敬
日本乳癌学会総会プログラム抄録集 20 回
Page210(2012.05)
38. 術前に非浸潤性乳管癌と診断された症例においてセンチネルリンパ節生検の省略は可能か?, 里見 露乃, 大村 東生, 高丸 智子, 島 宏彰, 九富 五郎, 鈴木 やすよ, 平田 公一, 亀嶋 秀和, 長谷川 匡
北海道外科雑誌(0288-7509)57 巻 1 号
Page83(2012.06)
39. 当科におけるステレオガイド下マンモトーム生検の検討, 高丸 智子, 大村 東生, 里見 露乃, 島 宏彰, 九富 五郎, 鈴木 やすよ, 亀嶋 秀和, 長谷川 匡,