

(2014).

III グループ

- 45) Shimo, T., Tachibana, K., Saito, K., Yoshida, T., Tomita, E., Waki, R., Yamamoto, T., Doi, T., Inoue, T., Kawakami, J., Obika, S.: Design and evaluation of locked nucleic acid-based splice-switching oligonucleotides *in vitro.*, *Nucleic Acids Res.*, **42**(12), 8174-8187 (2014).
- 46) 井上貴雄: 核酸医薬品開発の動向, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, **45**(4), 288-298 (2014).
- 47) 井上貴雄: 核酸医薬品開発の現状, PHARMSTAGE, **14**(3), 1-3 (2014).
- 48) 井上貴雄, 吉田徳幸: 核酸医薬品の実用化促進に向けた取り組み, 国立医薬品食品衛生研究所報告, **132**, 13-15 (2014).

IV グループ

- 49) Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T. and Goda, Y.: Characterization of phenolic constituents from ephedra herb extract, *Polyphenols Communications* **2014**, 605-606 (2014).
- 50) Fukahori, M., Kobayashi, S., Naraki, Y., Sasaki, T., Oka, H., Seki, M., Masada-Atsumi, S., Hakamatsuka, T. and Goda, Y.: Quality evaluation of medicinal products and health foods containing Chaste Berry (*Vitex agnus-castus*) in Japanese, European and American markets. *Chem. Pharm. Bull.*, **62**: 379-385 (2014).
- 51) He, J. Y., Zhu, S., Goda, Y., Cai, S. Q. and Komatsu, K.: Quality evaluation of medicinally-used *Codonopsis* species and *Codonopsis Radix* based on the contents of pyrrolidine alkaloids, phenylpropanoids and polyacetylenes. *J. Nat. Med.*, **68**:

326-339 (2014).

2. 学会発表等

I グループ

- 1) 楠原洋之, 前田和哉: 肝臓のトランスポーターについて. 第31回日本TDM学会・学術大会東京(2014.5).
- 2) 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(2014.5).
- 3) Nishiyama, N., Development of supramolecular nanocarriers for cancer diagnosis and therapy, *Emerging Biomaterials*, Korea (2014.5).
- 4) 植田廣, 佐久間聡, 井田泰夫, 村主教行, 阿曾 幸男: 物理化学的評価に基づいた drug-drug co-amorphous の構造安定性に関する研究, 日本薬剤学会第29年会, さいたま(2014.5).
- 5) 吉田寛幸, 伊豆津健一, 四方田千佳子, 柴田寛子, 合田幸広, GastroPlus を用いた吸入剤薬物動態予測に関する検討, 日本薬剤学会第29年会, さいたま(2014.5).
- 6) 吉田寛幸, 経肺吸収剤の評価法, 日本薬剤学会第29年会, さいたま(2014.5).
- 7) 柴田寛子, 四方田千佳子, 吉田寛幸, 伊豆津健一, 川西徹, 奥田晴宏, 合田幸広, リポソームと相互作用する生体分子の探索とその評価, 日本薬剤学会第29年会, さいたま(2014.5).
- 8) 天野陽平, 吉田拓史, 金光智行, リポ化剤の血中薬物放出挙動の *in vitro* 評価, 日本薬剤学会第29年会, さいたま(2014.5).
- 9) 大島大樹, 長田裕臣, 山田裕之: 難溶性原薬の脱塩・フリー化に関する研究. 日本薬剤学会第29回年会, さいたま(2014.5).

- 10) 天野陽平：リポ化製剤の血中薬物放出挙動の in vitro 評価-。第 29 回日本薬剤学会，さいたま(2014.5).
- 11) Nishiyama, N., Biological functionalities of polymeric micelle systems for targeting cancer, The European Summit for Clinical Nanomedicine 2014 (6th CLINAM 2014), Basel Switzerland, (2014.6).
- 12) 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, 東京 (2014.6).
- 13) 加藤くみ子, リポソーム製剤の評価について. 第 32 回物性物理化学研究会, 京都(2014.6).
- 14) 末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 三浦亨, 山田裕子, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩昭, 菊地祐一, 山下忠俊, 合田幸広, NMR による定量分析技術 “AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance)” の日本薬局方試薬への応用, プロセス化学会 2014 サマーシンポジウム, 東京 (2014.7).
- 15) Izutsu, K., Shibata, H., Yoshida, H., Goda, Y., Amorphous/amorphous phase separation of solutes in frozen solutions: implication for pharmaceutical lyophilization. Amorph 2014 Symposium, Cambridge (2014.7)
- 16) Andang Miatmoko, 川野久美, 服部喜之, 米持悦生:Lipid-Polymer Hybrid Nano- particles for Delivery of Cisplatin. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会, 東京(2014.7).
- 17) 加藤くみ子, 運敬太, 合田幸広, カチオン性リポソーム構成成分の細胞内動態に関する研究 第 29 回日本 DDS 学会, 東京(2014.7).
- 18) 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 (2014.7).
- 19) Suematsu, T., Hosoe, J., Sugimoto, N., Yamada, Y., Miura, T., Hayakawa, M., Suzuki H., Katsuhara, T., Nishimura, H., Kikuchi, Y., Yamashita, T., Goda, Y. Application of AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance) to the reagents in the crude drug section of the Japanese Pharmacopoeia, The 8th JSP-CCTCN-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, Fukuoka (2014.9).
- 20) 高橋克巳, 山村隼志, 斉藤麻紀子, 伊澤淳, 濱野靖徳, オゾン促進酸化殺菌における気相中の OH ラジカルの測定法, 日本防菌防黴学会第 41 回年次大会, 東京(2014.9).
- 21) Miatmoko, A., Kawano, K., Hattori, Y., Yonemochi, E.: The preparation of Hybrid Nanoparticles Composed of Polyethylene Oxide-b-Polymethacrylic Acid (PEO-b-PMAA) for Loading Anticancer Drugs. 第 58 回日本薬学会関東支部大会, 東京(2014.10).
- 22) 末松孝子, 細江潤子, 杉本直樹, 山田裕子, 三浦亨, 早川昌子, 鈴木裕樹, 勝原孝雄, 西村浩昭, 菊池祐一, 山下忠俊, 合田幸広, AQARI (Accurate Quantitative NMR with Internal Reference Substance) による天然由来成分の純度評価のための基礎研究, 天然有機化合物討論会, 高知(2014.10).
- 23) Yoshida, H., Shibata, H., Izutsu, K, Goda, Y., Evaluation of fluid flow profile in flow-through dissolution cells using particle image velocimetry, FIP BABE symposium, Seoul (2014.10).
- 24) 大塚直哉, 植田圭祐, 清水梢, 片川和明, 熊

- 本卓哉, 東頭二郎, 山本恵司, 森部久仁一: HPMC 及び PVP の薬物結晶化抑制機構の違いが膜透過性に及ぼす影響. 製剤機械技術学会第 24 回大会, 名古屋 (2014.10).
- 25) 江上貴一, 東頭二郎, 山本恵司, 森部久仁一: AFM を用いた懸濁液中における 3 成分ナノ粒子凝集過程の評価. 第 31 回製剤と粒子設計シンポジウム, 福岡 (2014.10).
- 26) 植田圭祐, 東頭二郎, 森部久仁一: 過飽和溶液からの結晶化挙動に及ぼす Naringenin 光学純度の影響. 第 31 回製剤と粒子設計シンポジウム, 福岡 (2014.10).
- 27) 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ンクス技術第 87 回日本生化学会大会, 京都 (2014.10).
- 28) Miyazaki, T., Aso, Y., Goda, Y., Physical properties and stability of co-amorphous nifedipine-nicotinamide, 2014 AAPS Annual Meeting, San Diego, USA (2014.11).
- 29) Izutsu, K., Component Miscibility and Protein Stability in Freeze-Dried Formulations, AAPS Annual Meeting San Diego (2014.11) .
- 30) Goda, Y., Introduction of qNMR to the Japanese Pharmacopoeia (JP) for specification of marker compounds used for standardization of herbal medicines, 2014 International Summit on Innovative Drug Discovery, Charting the Course of Standardization of Chinese Materia Medica, Hong Kong (2014.11).
- 31) 上田 廣: 物理化学的パラメータに基づいた Co-amorphous の安定性評価, PhysChem Forum Japan 2nd Symposium, 三島 (2014.12).
- 32) 楠原洋之, 肝異物排泄におけるトランスポーターの個人間変動と PET を用いた in vivo 輸送能力の評価, 第 35 回日本臨床薬理学会学術集会, 松山 (2014.12).
- 33) Higashi, K., Hayashi, H., Yamamoto, K., Moribe, K., Effect of phenytoin/EUDRAGIT® S 100 miscibility in solid dispersion on drug and polymer dissolution rates, Pharm Tech2014, Bangkok, Thailand (2014.12).
- 34) 阿曾幸男, 宮崎玉樹, 合田幸広: コアモルファスニフェジピン-アセトアミノフェンの結晶化速度と分子運動性の関連, 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3).
- 35) 植田圭祐, 東頭二郎, 片岡誠, 山下伸二, 山本恵司, 森部久仁一: HPMC-AS の薬物結晶化抑制作用に及ぼす胆汁酸及び脂質の影響, 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3)
- 36) 宮崎玉樹, 阿曾幸男, 合田幸広: co-amorphous ニフェジピン-ニコチン酸アミドの物理化学的特性. 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3).

II グループ

- 37) Ishi-Watabe, A., Suzuki, T., Nishimura, K., Mori, K., Yamaguchi, H., Torikai, M., Yanagihara, S., Koga, J., Watanabe, T., Hamaji, Y., Ishida, M., Miyamoto, T., Kawasaki, N. , Design and the validity test suitable for a therapeutic antibody potency assay using ELISA, USP 6th Bioassay Workshop, Rockville, USA (2014.6).
- 38) 西岡宗一郎, 小林功, 辻大輔, 原園景, 久保勇樹, 真板宣夫, 池戸 駿介, 東哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井 明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: トランスジェニックカイコ由来ヒトリソソーム酵素の分子特性解析と化学酵素法に基づく人工糖鎖修飾. 第 55 回日本生化学会 中国・四国支部例会, 松山 (2014.6).

- 39) Krayukhina, E., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K.: Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins. 第14回蛋白質科学学会年会, 横浜 (2014.6).
- 40) Krayukhina, E., Tsumoto, K., Uchiyama, S., Fukui, K.: Effects of syringe material and silicone coating on the stability of pharmaceutical proteins. 2014 Workshop on Protein aggregation and immunogenicity, Breckenridge (2014.7).
- 41) Uchiyama, S.: Biophysical factors governing antibody aggregation. 2014 Workshop on Protein aggregation and immunogenicity, Breckenridge (2014.7).
- 42) Totoki, S., Yamamoto, G., Uchiyama, S., Fukui, K.: Size and Quantity Measurement of Subvisible Particles by Laser Diffraction Method. 2014 Workshop on Protein aggregation and immunogenicity, Breckenridge (2014.7).
- 43) 西岡宗一郎, 小林功, 辻大輔, 原園景, 久保勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: 組み換えカイコ絹糸腺由来ヒトカテプシン A の分子特性とエンドグリコシダーゼによる糖鎖改変. 第33回日本糖質学会年会, 名古屋 (2014.8).
- 44) 橋井則貴: 高分子 LC/MS バイオアナリシスの現状と課題について. 第27回バイオメディカル分析科学シンポジウム, 板橋 (2014.8).
- 45) 平山奈保子, 小林哲, 石井明子, 川崎ナナ, 豊島聡: 各種の抗体関連バイオ医薬品の投与症例における有害事象初回発現時期の解析. 第4回レギュラトリーサイエンス学会学術大会, 東京 (2014.9).
- 46) 石井明子: バイオ医薬品の品質評価に関する最新動向. JASIS 2014 日本薬局方セミナー, 東京 (2014.9).
- 47) 小林哲, 石井明子, 太田悠葵, 村山一茂, 高久明美, 豊島聡, 川崎ナナ: 抗体医薬品による infusion reaction の初回発現時期の比較. 日本薬剤疫学会第20回学術総会, 愛媛 (2014.10).
- 48) 瀬筒秀樹: 新しい昆虫産業を創る!—カイコにおける次世代ゲノム改変技術の開発と異分野融合—. H26年度日本農学会シンポジウム「ここまで進んだ! 飛躍する農学」, 東京 (2014.10).
- 49) 西岡宗一郎, 小林功, 辻大輔, 原園景, 久保勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: トランスジェニックカイコ由来ヒトリソーム酵素の分子特性解析とグライコシターゼによる糖鎖修飾, 京都 (2014.10).
- 50) 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させたガン抗原の解析. 工学フォーラム 2014, 東京 (2014.10).
- 51) 内山 進: Biophysical studies on antibody aggregation. JAACT International Symposium, Kitakyushu (2014.11).
- 52) 黒岩聡志, 小久保倫文, 元川揺子, 桑原伸夫, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. 第37回日本分子生物学会, 横浜 (2014.11).
- 53) 西岡宗一郎, 小林功, 辻大輔, 原園景, 久保勇樹, 真板 宣夫, 池戸 駿介, 東 哲也, 辻大輔, 瀬筒秀樹, 町井博明, 石井明子, 川崎ナナ, 伊藤孝司: 組換えカイコ由来ヒトリソーム酵素の分子特性とグライコシターゼによる *in vitro* 糖鎖修飾. 第5回グライコバイオロジクス研究会, 兵庫 (2014.11).
- 54) 武田茂樹: トランスジェニックカイコで発現させた組換えタンパク質の解析. 第37回分子生物学会年会, 横浜 (2014.11).

- 55) Takeda, S., Kuroiwa, S., Kokubo, M., Motokawa, Y., Kuwabara, N., Futahashi, M., Suzuki, T., Tatematsu, K. I., Sezutsu, H., Chikamatsu, K., Expression of the recombinant tumor antigen in transgenic silkworm, 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering, Maehashi, Japan (2014.12).
- 56) 石井明子:抗体医薬品 さらなる発展への課題:規制の観点から. 第 39 回日本薬学会関東支部学術講演会東京 (2014.12) .
- 57) 瀬筒秀樹:“新蚕業” 創出に向けた基盤技術の開発と今後の展開方向. 第 7 回公開シンポジウム「カイコ産業の未来」, 東京(2015.1).
- 58) 立松謙一郎, 笠嶋めぐみ, 坪田拓也, 二橋美瑞子, 鈴木誉保, 小林功, 内野恵郎, 飯塚哲也, 米村真之, 高須陽子, 田村俊樹, 瀬筒秀樹:医薬品の開発・生産を目指した遺伝子組換えカイコの作製と高度化. 第 135 回日本薬学会年会シンポジウム, 神戸(2015.3).
- 59) 伊藤孝司, 西岡宗一郎, 小林功, 久保勇樹, 原園景, 石井明子, 川崎ナナ, 瀬筒秀樹:組換えカイコを用いるネオグライコバイオロジクスの創製. 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3).
- 60) 石井明子, 原園景, 多田稔, 立松謙一郎, 瀬筒秀樹, 川崎ナナ:カイコが創る次世代抗体医薬品. 第 135 回日本薬学会年会シンポジウム, 神戸 (2015.3).
- Ⅲ グループ**
- 61) 井上貴雄:核酸医薬開発の動向と課題, 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けた Strategy2014, 東京 (2014.7) .
- 62) 井上貴雄:核酸医薬品の規制, 第 41 回日本毒性学会学術年会, 兵庫 (2014.7) .
- 63) 佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 佐藤陽治, 井上貴雄: siRNA の細胞内取り込み機構の解析, 第 6 回日本 RNAi 研究会, 広島 (2014.8) .
- 64) 井上貴雄:核酸医薬品開発の動向と課題, 第 27 回大阪大学医工情報連携シンポジウム ～創薬と医療から日本の未来を考える～, 大阪 (2014.9) .
- 65) 井上貴雄:核酸医薬品の実用化に向けたレギュラトリーサイエンス研究への取り組み, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, 東京 (2014.9) .
- 66) 萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄:オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2014, 東京 (2014.9) .
- 67) Yoshida, T., Sasaki, K., Obika, S., Sato, Y., Inoue, T. : Evaluation of Off-target Effects of Antisense Oligonucleotides, 10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, San Diego (2014.10) .
- 68) 井上貴雄:核酸医薬品の開発動向とレギュラトリーサイエンス研究への取り組み, 第 19 回分子複合医薬研究会, 大阪 (2014.11) .
- 69) 井上貴雄:日本発核酸医薬の創出に向けて, 抗体医薬・核酸医薬開発コンソーシアムシンポジウム, 東京 (2015.1) .
- 70) 井上貴雄:核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発, 創薬基盤推進研究事業 研究成果発表会「医薬品・医療機器の実用化促進のための官民共同研究の進捗と展望」, 東京 (2015.2) .
- 71) 井上貴雄:核酸医薬の実用化に向けたレギュラトリーサイエンス研究への取り組み, 日本化学会第 95 春期年会, 千葉 (2015.3) .

- 72) 吉田徳幸, 内藤雄樹, 佐々木澄美, 内田恵理子, 小比賀聡, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 井上貴雄: アンチセンス医薬品のオフターゲット効果の安全性評価に関する研究, 日本薬学会第 135 年会, 兵庫 (2015.3) .
- 73) 佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 井上貴雄: 核酸医薬品の細胞内取り込み機構に関する解析, 日本薬学会第 135 年会, 兵庫 (2015.3) .
- 74) 萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄「修飾型オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究, 日本薬学会第 135 年会, 兵庫 (2015.3) .
- 75) 井上貴雄: 核酸医薬品開発のポイント - 開発の現状・市場動向・課題・レギュラトリーサイエンス-, R & D 支援センターセミナー, 東京 (2015.3) .
- 76) 井上貴雄: 核酸医薬開発とレギュラトリーサイエンス研究, 第 18 回バイオメディカル研究会, 大阪 (2015.3) .
- constituents from ephedra herba extract, 第 27 回国際ポリフェノール会議, 愛知 (2014.9) .
- 80) 日向須美子, 日向昌司, 大嶋直浩, 丸山卓郎, 袴塚高志, 天倉吉章, 合田幸広, 花輪壽彦: エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFM) の薬理作用. 日本薬学会第 135 年, 神戸 (2015.3) .
- 81) 大嶋直浩, 山下忠俊, 日向須美子, 日向昌司, 鎌倉浩之, 丸山卓郎, 袴塚高志, 天倉吉章, 花輪壽彦, 合田幸広: エフェドリンアルカロイド除去麻黄エキス (EFM) の製造法及びその成分組成について. 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3) .
- 82) 高橋純, 中森俊輔, 小林義典, 香川聡子, 神野透人, 日向昌司, 袴塚高志, 合田幸広, 日向須美子, 花輪壽彦: 麻黄の capsaicin 誘発性疼痛に関する鎮痛効果. 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3) .
- 83) 樽木洋子, 小林正治郎, 佐々木隆宏, 関雅晴, 岡秀樹, 横田和義, 政田さやか, 袴塚高志, 合田幸広: チェストベリーを配合する医薬品及び健康食品における品質評価 . 日本薬学会第 135 年会, 神戸 (2015.3) .

IV グループ

- 77) 日向須美子, 日向昌司, 天倉吉章, 合田幸広, 花輪壽彦: Herbacetin の TrkA リン酸化阻害を介した神経突起伸張抑制作用及び疼痛抑制効果. 第 131 和漢医薬学会学術大会, 千葉 (2014.8) .
- 78) 呉曉婷, 朱姝, 合田幸広, 小松かつ子: *Gentiana* 属生薬の基原と品質に関する研究 (3) —*Gentiana* 属 8 種及び秦艽の ITS 配列について. 日本生薬学会第 61 回年会, 福岡 (2014.9) .
- 79) Amakura, Y., Yoshimura, M., Yamakami, S., Yoshida, T., Hyuga, M., Hyuga, S., Hanawa, T., Goda, Y.: Characterization of phenolic constituents from ephedra herba extract, 第 27 回国際ポリフェノール会議, 愛知 (2014.9) .
3. その他
- 1) 第 17 改正日本薬局方原案, 核磁気共鳴 (NMR) 法を利用した定量技術と日本薬局方試薬への応用 (改訂), 定量 NMR に使用する機器の性能の管理, 日本薬局方フォーラム, 23 (4), 727-728 (2014) .
- 2) 「単味生薬のエキス製剤の開発に関するガイドライン」平成 26 年度に厚生労働省医薬食品局審査管理課長通知として発出予定.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 特許

- 1) 発明の名称：エフェドリン除去麻黄エキス
と、その製法及び用途，出願番号：PCT/JP/
2014/80605，出願日：2014年11月19日（基
礎出願：2013年11月21日），出願人：株式
会社常磐植物化学研究所 立崎仁・学校法人
北里研究所・国立医薬品食品衛生研究所長，
発明者：花輪壽彦，日向須美子，合田幸広，
日向昌司，天倉吉章，好村守生，山下忠俊
- 2) 発明の名称：除染装置および除染方法，出
願番号：特願 2015-031595，出願日：2015年
2月20日，出願人：株式会社 IHI・国立医薬
品食品衛生研究所長，発明者：高橋克巳，山
村隼志，坂本和之，黒松久，松尾健一，菊池
裕，寺嶋淳，齧島由二，福井千恵，新見伸吾，

成果発表会開催等の成果の活用

研究分担者 公益財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団理事長 高柳 輝夫

研究要旨：医薬品等の品質・安全性の確保は、医薬品のライフサイクルを見据え、官民共同での迅速な取り組みが一層求められている領域である。官民の研究者の英知を集めた共同研究による評価技術の戦略的開発とその普及が求められている。多数の共同研究者により実施された研究の成果のうち、特に広く情報を発信し、普及を図るべき課題について成果発表会を開催し、官民共同研究の促進に努めた。

A. 研究目的

平成26年度（2014年度）の「医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発」における分担研究課題「成果発表会開催等の成果の活用」では、研究の進捗状況と今後の展望について、成果発表会の開催を通じ、創薬の可能性と課題等について情報提供し、創薬基盤推進研究の一層の推進を目的として実施する。

B. 研究方法

研究代表者他関係者により、多くの研究課題の中から、本年度は実用化に際して評価に活用される研究成果を選定し、成果を発信する発表会を開催する。発表会の開催については研究分担者の所属する公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団（以下、「財団」という。）のホームページで広く国民向けに広報するとともに、製薬企業が多数参画する財団の賛助会員に対して広報することにより、共同研究を実施する企業研究者の成果発表会への参加を促進する。

C. 研究結果

平成27年2月26日（木）に全日通労働組合会議室にて、創薬基盤推進研究事業 研究成果発表会を「医薬品・医療機器の実用化促進のための官民共同研究の進捗と展望」のテーマで開催した。プログラムを以下に記す。

医薬品等の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

国立医薬品食品衛生研究所 薬品部
部長 合田 幸広

医薬品品質管理手法の高度化に対応した医薬品製
剤の評価技術の開発
薬品部 部長 合田 幸広

先端的バイオ医薬品の品質・安全性確保のための評価法の開発

生物薬品部 部長 川崎ナナ

核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発

遺伝子細胞医薬品部 室長 井上 貴雄

天然物医薬品の品質・安全性確保のための評価法の戦略的開発

生薬部 部長 袴塚 高志

まとめ

国立医薬品食品衛生研究所 所長 川西 徹

D. 考察

医薬品等のライフサイクルマネジメントが普及する中で、その管理手法もより高度化しており、官民共同研究により企業と規制当局の連携を図ることにより、効率的に普及させることが可能となる。また、先端的バイオ医薬品や核酸医薬品といった新たな領域の医薬品も品質確保・安全性確保の点からより有効かつ汎用性のある分析手法の開発と普及が求められている。新規に開発される医薬品は多くがバイオ技術や化学合成技術で製造されるものの、漢方薬や生薬製剤については、天然資源に頼らざるを得ない状況があり、多くを海外の市場に依存している我が国では有効成分のばらつきなどは、製品の品質と安全性に直結する場合も多く、それらの評価法の開発には継続的な努力が必要と考える。

医薬品の承認や安全対策等の規制に直結する品質・安全確保のために、規制当局と企業の研究者による官民共同研究が果たす役割は今後も重要である。

E. 結論

医薬品の製造は、世界各国の企業が関与してなされることから、品質・安全性確保に関する評価法は合理的・効率的であることとともに国際的観点から日本が発信していくことが求められている。評価技術の普及には、規制当局と企業の研究者の共同研究が効率的であり、研究成果の普及に向けた取り組みが必須である。今後も継続した成果普及活動は望まれる。

おわりに

成果発表会といった情報発信を通じて、開発された医薬品・医療機器の評価法が実用化に取り組む民間企業に活用されるとともに、この研究領域での官民での取り組みの拡大が期待される。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

なし。

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。

医薬品品質管理手法の高度化に対応した医薬品製剤の評価技術の開発
(I グループ)

分担研究者報告書

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

分担研究課題 リポソーム製剤の薬効・安全性に関わる品質特性評価研究

研究分担者 加藤くみ子 国立医薬品食品衛生研究所 薬品部 室長

要旨 製剤学的に複雑なリポソーム製剤の品質特性と、薬効・安全性に影響する製剤機能に関する評価手法を確立し、品質特性と製剤機能との関連性を明らかにすることが、品質・有効性・安全性確保に重要である。本年度は、リポソームを構成する脂質組成がドキシソルビシン内包率に及ぼす影響を調べ、脂質のアシル鎖長とコレステロールの有無が内包率に大きく影響することを明らかとした。

A.目的

リポソームは、両親媒性の脂質二重膜から成る小胞で、その内水相や脂質膜中に有効成分を搭載することにより、循環血中に入った後の血中滞留性、放出性、標的性等を制御するように製剤が設計されている。従って、有効成分単独で投与された場合とは体内分布、代謝、排泄ともに大きく変化する。さらに、リポソームを構成する脂質原料およびその組成は、リポソームの形状や粒子径等の高次構造、表面電荷、剛性 (rigidity)、二重膜の流動性などの物理的・化学的特性に影響を与える。さらに製法が複雑な製品もあり、物理的・化学的特性や *in vitro* 漏出性等に差を生じる可能性がある。

リポソーム製剤の物理的・化学的な特性は、血中滞留性、組織浸透性、標的組織での有効成分の放出性等の薬効を左右する製品の機能に直接リンクしているとともに、補体活性等の免疫学的な安全性にも関係しているため[1]、品質特性のわずかな差が有効性

や安全性に影響を及ぼす可能性がある。従って、製剤学的に複雑なリポソーム製剤の品質特性と、薬効・安全性に影響する製剤機能に関する評価手法を確立し、両者の関連性を明らかにすることが、品質・有効性・安全性確保に重要である。

本研究では、リポソーム製剤の薬効・安全性評価のため、リポソーム製剤の薬効・安全性に関わる品質特性評価研究を行う。本年度は、様々なアルキル鎖長を有するリン脂質やカチオン性脂質、PEG脂質等を用いて、粒子径 100nm 程度のリポソームを調製し、各リポソームにドキシソルビシンを封入後、薬効に関わる薬物内包率を評価した。

B.研究方法

表1に示す脂質を用いバンガム法によりリポソームを作製した [2]。サイズを約 100nm にそろえるためポアサイズ 100nm のポリカーボネート膜(Avestin, Ottawa, ON, Canada) にリポソームを通した。ドキシソルビシンはリ

モートローディング法を用いて内包された (ドキシソルビシン:脂質=1:8 wt/wt%) [3]. 内包率を求めるために, 一部のリポソーム溶液を TritonX で処理した. TritonX 処理前及び処理後のドキシソルビシンをそれぞれ限外濾過(10,000 M.W. cut-off)で分離し, 蛍光強度を測定し(ex.470nm, em.590nm), free 及び total のドキシソルビシン量とした. 以下の計算式により内包率を算出した.

Loading efficacy (%) = (total doxorubicin- free doxorubicin)/total doxorubicin × 100

粒子径とゼータ電位は, Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument, Worcestershire, UK)を用いて測定した.

<倫理面への配慮>

本研究で使用するヒト由来培養細胞は, 研究用の市販品, 領布品であるため, 倫理的に問題となるような事項はないと考えられる. 安全性に関しては, どのような培養細胞であっても未知のウイルスが存在する等の危険があることを認識し, 適切な設備・保護具の使用, 試料廃棄の際の滅菌処理などに留意して実験を行った.

C.結果及び考察

各リポソームへのドキシソルビシンの封入効率を評価した. 本実験において, ドキシソルビシン封入は硫酸アンモニウム勾配を用いたリモートローディング法に基づいて行った. リポソームを構成する脂質を表2に示す. 飽和・不飽和, アシル鎖長, 電荷, PEG 修飾の異なる 11 種類の脂質を用い, 表2に示す 18 種類のリポソームを作製した.

作製したリポソームの平均粒子径はいずれも約 100nm, PDI は 0.123 以下であった. ゼータ

電位は各リポソームを構成する脂質組成に大きく依存し, 中性脂質を用いた場合は約 0 mV, またカチオン性の脂質である DOTAP と DC-コレステロールを用いた場合は, 44mV 以上であった.

表2には, 各リポソームにドキシソルビシンを内包した際の内包率を記した. いずれのリポソームでも内包率は 90%以上であった. しかし, DLPC:chol (50:50 mol%, no. 2), DMPC:chol (50:50 mol%, no. 3), DPPC:chol (50:50 mol%, no. 4) からなるリポソームでは, アシル鎖長 18 の脂質から成るリポソームよりもドキシソルビシンの内包率が低かった. さらに, アシル鎖長が長くなるほど, 内包率も大きくなることが分かった. リポソームの脂質組成は, イオン透過に影響することが報告されている[4]. また, リン脂質の炭素鎖が長くなるほど, 相転移温度も著しく上昇することも報告されている[5]. 従ってアシル鎖長増加によるリポソーム構造の剛性(rigidity)向上が, ドキシソルビシン内包率増加の一因であると考えられる.

一方, コレステロールがリポソームに含まれていない場合は, ドキシソルビシンの内包率が低いことが分かった. コレステロールは, 脂質二重膜の安定性や血中滞留性の向上に関与している. また, リポソーム内の薬物の保持に影響するとの報告もある[6]. 今回, 我々が得た結果は, これらの報告と合致するものである. 一方, 脂質の飽和・不飽和, PEG 修飾の有無, リポソームのゼータ電位は, 内包率との関連性は見いだされなかった.

D.まとめ

本年度は, リポソームを構成する脂質組

成がドキシソルビシン内包率に及ぼす影響を調べ、脂質のアシル鎖長とコレステロールの有無が内包率に大きく影響することを明らかとした。このようなりポソームの薬効に関わる品質特性とその評価法に関する研究・知見の蓄積がりポソームの品質確保に重要であると考えられる。

[参考文献]

- [1] Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev.* 63(12), 1020-1030 (2011).
- [2] Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238-252 (1965).
- [3] Fritze A, Hens F, Kimpfler A, Schubert R, Peschka-Süss R. Remote loading of doxorubicin into liposomes driven by a transmembrane phosphate gradient. *Biochim. Biophys. Acta.* 1758, 1633-1640 (2006).
- [4] Papahadjopoulos D, Watkins JC. Papahadjopoulos D, Watkins JC. Phospholipid model membranes. II. Permeability properties of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes.* 135(4), 639-652 (1967).
- [5] Yuping Li, Ashim KM. *Pharmaceutical researches.* 13, 76-79 (1996),
- [6] Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev. Dec.* 51(4), 691-743 (1999).

E.健康危機情報

なし

F.研究発表等

論文発表等

- (1) Sakai-Kato, K., Un, K., Nanjo, K., Nishiyama, N., Kusuhara, H., Kataoka, K., Kawanishi, T., Goda H., Okuda, H.: Elucidating the molecular mechanism for the intracellular trafficking and fate of block copolymer micelles and their components. *Biomaterials* 35, 1347-1358, 2014.
- (2) Sakai-Kato, K., Nanjo, K., Kawanishi, T., Okuda, H., Goda, H.: Sensitive method for measuring the concentration of doxorubicin and its metabolites in biological samples. *Chromatogr.*, 35(suppl2):81 (2014).

学会発表等

- (1) 加藤くみ子, 運敬太, 合田幸広, カチオン性リポソーム構成成分の細胞内動態に関する研究 第29回日本DDS学会, 東京(2014.7)
- (2) 加藤くみ子, リポソーム製剤の評価について. 第32回物性物理化学研究会, 京都 (2014.6)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 本研究で用いた脂質類

Chol: Cholesterol

DOPC: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (不飽和脂肪酸、アルキル鎖18、ホスファチジルコリン)

DOPE: 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (不飽和脂肪酸、アルキル鎖18、ホスファチジルエタノールアミン)

DLPC: 1,2-Dilauroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (飽和脂肪酸、アルキル鎖12、ホスファチジルコリン)

DMPC: 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (飽和脂肪酸、アルキル鎖14、ホスファチジルコリン)

DPPC: 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (飽和脂肪酸、アルキル鎖16、ホスファチジルコリン)

DSPC: 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (飽和脂肪酸、アルキル鎖18、ホスファチジルコリン)

DOTAP: 1,2-Dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (不飽和脂肪酸、アルキル鎖18、カチオン性リン脂質)

DC-chol: 3β-[N-(N',N'-dimethylaminoethane)-carbamoyl]cholesterol (カチオン性コレステロール)

PEG2000-DSPE: 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-
N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (PEG鎖2000結合リン脂質)

PEG5000-DSPE: 1,2-Distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-
N-[methoxy(polyethylene glycol)-5000] (PEG鎖5000結合リン脂質)

表2 各リポソームを構成する脂質の特性とリポソームへのドキシソルビシン内包率

Liposome No.	Liposome compositions	Acyl chain length	Cholesterol	Charge (ζ-potential)	Loading efficiency (%)
1	DOPC:chol (50:50 mol %)	18	+	neutral	96.2
2	DLPC:chol (50:50 mol %)	12	+	neutral	90.5
3	DMPC:chol (50:50 mol %)	14	+	neutral	92.5
4	DPPC:chol (50:50 mol %)	16	+	cationic	94.5
5	DSPC:chol (50:50 mol %)	18	+	cationic	96.2
6	DOPE:chol (50:50 mol %)	18	+	neutral	96.0
7	DOTAP:chol (50:50 mol %)	18	+	neutral	95.9
8	DOTAP:chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	neutral	96.4
9	DOPC:chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	neutral	96.4
10	DSPC:chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	neutral	96.5
11	DOPC:chol:PEG5000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	neutral	96.4
12	DSPC:chol:PEG5000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	neutral	96.1
13	DOPC:DC-chol (50:50 mol %)	18	+	cationic	95.3
14	DSPC:DC-chol (50:50 mol %)	18	+	cationic	95.6
15	DOTAP:DOPC (50:50 mol %)	18	-	cationic	90.4
16	DOTAP:DOPC:PEG2000-DSPE (50:45:5 mol %)	18	-	Cationic	91.0
17	DOPC:DC-chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	Cationic	95.9
18	DSPC:DC-chol:PEG2000-DSPE (45:50:5 mol %)	18	+	cationic	95.7

分担研究課題 医薬品・製剤添加物の体内動態支配要因の解析

研究分担者 楠原洋之 東京大学大学院薬学系研究科 教授

研究要旨 肝細胞へのアニオン性薬物の肝取り込みに関わる有機アニオントランスポーター OATP1B1 に関して、HepG2 細胞を宿主細胞として用いて安定発現系ならびに一過性発現系を構築し、高い輸送活性を得ることが出来た。B 型肝炎ウイルス由来である pre-S1 ドメインペプチドによる OATP1B1 阻害が認められ、本ペプチドと OATP とが相互作用することが示唆された。

研究協力者

国立感染症研究所 渡士幸一

A. 研究目的

医薬品をはじめとする低分子化合物の生体膜透過は単純拡散のほか、トランスポーターによる担体輸送により行われることは広く知られている。一部のトランスポーターは構造的に多様な化合物群を基質として、生体内の異物解毒機構として重要な働きを行う。

薬物もトランスポーターによる担体介在性輸送により、消化管吸収特性ならびに排泄経路の特異性、中枢神経系への移行性は、各薬物の物理化学的特性のほか、トランスポーターの基質認識特性やその輸送能力も体内動態の規定要因となる。

肝臓は生体内における主要な異物解毒臓器であり、特に肝臓容積の 8 割を占める肝細胞には代謝酵素やトランスポーターなど種々異物解毒蛋白が発現している。

胆汁酸やビリルビン、その抱合代謝物のほか、スタチン（HMG-CoA 還元酵素阻害剤）やサルタン（アンギオテンシン II 受容体拮抗薬）など、

カルボン酸を分子内に有し、生理的 pH で負の電荷を帯びるアニオン性薬物は、生体内で肝臓に比較的選択的に分布する。その分子メカニズムとして、肝細胞類洞側細胞膜に発現する有機アニオントランスポーター Organic anion transporting polypeptide; OATP1B1, OATP1B3, OATP2B1 によるものである。このうち OATP1B1 ならびに OATP1B3 は、我々も含めて複数のグループの in vitro 試験ならびに臨床研究により、アニオン性薬物の肝取り込み機構として重要であることが解明されている。

近年、B 型肝炎ウイルスの肝細胞への感染に必要な受容体として、肝特異的胆汁酸トランスポーター NTCP が同定された。B 型肝炎ウイルスの外殻蛋白の構成因子 L 型の pre-S1 ドメインが、NTCP との相互作用に重要であることが明らかにされている。特に、NTCP 基質で、この相互作用が阻害されることから、基質認識ドメイン近辺で、本ペプチドが相互作用しているものと考えられている。

胆汁酸やステロイド抱合体だけではなく、スタチンなど、NTCP と OATP1B1 との間には共通の基質が複数認められていることから、基質

結合部位ドメインの類似性が期待される。そこで、合成ペプチドを用いて、OATP1B1 に対する阻害試験を行った。あわせて、B型肝炎ウイルス感染における OATP1B1 の関与を評価するための試験系構築を行った。

B. 研究方法

HEK239 細胞を宿主細胞とした安定発現系を *in vitro* 試験に用いた。In vitro 輸送実験ならびに阻害試験は、常法に従って実施した。NTCP ならびに OATP1B1 の機能評価に関しては、それぞれの典型基質である^[3H]taurocholate ならびに^[3H]estradiol 17b glucuronide (以下、^[3H]E2178G)を用いた。感染試験に用いられる HepG2 細胞における解析を進めるため、リポフェクション法により OATP1B1 cDNA をサブクローニングした pcDNA3.1 を導入し、抗生物質によるセレクションを行った。また、一過性に発現させるため、東京大学医学部附属病院薬剤部教授 鈴木洋史先生よりアデノウイルスをご供与いただいた。安定発現系・一過性発現系での輸送活性評価には、^[3H]estrone-3-sulfate (E3S)を用いた。アデノウイルスは常法に従い調製した。阻害試験に対して用いた pre-S1 ドメインペプチドは、研究協力者である渡士先生よりご供与いただいた。

<倫理面への配慮>

本研究に関する *in vitro* 試験は、東京大学の規則に従って実施した。

C. 研究結果

C.1. pre-S1 ドメインによるトランスポーター機能阻害

OATP1B1 の安定発現細胞への典型基質取り込みに対して、典型的阻害剤 rifampicin を用いた

阻害試験をおこない、IC₅₀ 値が過去の値を再現することを確認した。本条件において、pre-S1 ドメインペプチドによる阻害効果が認められた。NTCP との相互作用をしないことが確認されている変異型ペプチド (Ala11-15) では阻害効果は消失していた。有機カチオントランスポーター (OCT1) をネガティブコントロールとして阻害試験を行ったところ、OCT1 に対する阻害効果は認められなかった。

C.2. HepG2 細胞を宿主細胞とした発現系の構築

リポフェクション法により OATP1B1 遺伝子を HepG2 細胞に導入し、安定発現系を構築した。10 クローンを得ることができ、そのうちの 1 クローンは、HEK293 細胞を宿主細胞とした安定発現系と同程度の輸送活性を得ることが出来た。

B型肝炎ウイルスが感染する NTCP-HepG2 に、OATP1B1 をさらに強制発現させるため、アデノウイルスを調製した。2~10MOI で感染させた結果、MOI 依存的な輸送活性の増加が認められた。対象群では、MOI に依存した輸送活性の変動は認められなかった。10MOI で感染させた場合、安定発現系の 5 倍高い輸送活性を得た。

NTCP を選択的に阻害するため、阻害剤の検証も進めた。文献情報に基づいて、pioglitazone が NTCP に対する選択的阻害剤と期待された。Pioglitazone については、NTCP を阻害する濃度で、OATP 阻害が認められなかった。

C.3. HepG2 細胞を宿主細胞とした OATP1B1

発現細胞での、pre-S1 ペプチドの結合評価
HepG2 にアデノウイルス感染細胞において、蛍光標識された pre-S1 ペプチドの結合試験をおこなった。NTCP 発現細胞では、細胞膜上に

ペプチド由来の蛍光が認められたのに対して、OATP1B1 発現細胞では、蛍光が認められなかった。

D. 考察

アデノウイルスを用いることで高い OATP1B1 発現量を得ることが出来た。輸送活性の低い基質を探索する際にも有用な実験系となるものと期待される。

NTCP 同様に、pre-S1 ドメインペプチドによる OATP1B1 に対する阻害作用が認められた。変異型ペプチドでは阻害作用が消失していることから、類似の機構で OATP1B1 と相互作用し、B 型肝炎ウイルスの受容体となることが期待された。しかし、NTCP と異なり、ペプチドとの相互作用を評価した際には、結合が認められなかった。OATP1B1 の機能阻害は間接的な作用であることも否定できない。

E. 結論

HepG2 細胞を宿主細胞とした OATP1B1 発現系を最適化することができた。pre-S1 ドメインペプチドによる OATP1B1 阻害は認められたものの、NTCP と異なり B 型肝炎ウイルスの感染における OATP1B1 の役割は限定的であると考えられる。

F. 健康危機情報

ありません

G. 研究発表等

論文発表等

ありません。

学会発表等

1) 楠原洋之、前田和哉：肝臓のトランスポー

ターについて. 第 31 回日本 TDM 学会・学術大会 (2014.5 東京)

2) 楠原洋之：肝異物排泄におけるトランスポーターの個人間変動と PET を用いた in vivo 輸送能力の評価. 第 35 回日本臨床薬理学会学術集会 (2014.12, 松山).

H. 知的財産権の出願・登録状況

ありません

厚生労働科学研究委託費（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

ポリマー精密設計に基づくナノ医薬品の機能最適化

研究分担者 西山 伸宏 東京工業大学 資源化学研究所 教授

近年、リガンド分子を利用することによって、標的組織に能動的に集積し、細胞内に取り込まれる第二世代のナノ医薬品に対する期待が高まっている。本研究では、ポリアミノ酸の側鎖や dendrimer の末梢に任意のリガンド分子を導入することにより、汎用性に優れ、安価での大量製造が可能な合成リガンドプラットフォームを構築する。さらに、合成リガンドプラットフォームの培養細胞および疾患モデル動物を用いた評価法を構築し、リガンド密度や spacer 鎖長等の最適化を行うことにより、第二世代のナノ医薬品のためのリガンド分子の設計理論を確立することを目指している。本年度は、合成リガンドプラットフォームの合成スキームを検討した。

A. 目的

近年、高分子やナノ粒子等のプラットフォームに薬剤やその機能を高める分子を集積化ことによって構築されるナノ医薬品（ナノメディシン）が大きな注目を集めている。なかでも、高分子ミセルは、抗がん剤を搭載した5種類の製剤が臨床試験へと進み、うち2種類が第3相試験中である。これらの第一世代のナノ医薬品は、がん組織における腫瘍血管の透過性亢進と未発達なリンパ系構築に基づく Enhanced and Retention (EPR) 効果により受動的に固形がんを選択的に集積するものと考えられている。一方、標的分子に結合するリガンド分子を搭載することによって、能動的に標的組織に集積し、標的細胞を選択的に取り込まれる第二世代のナノ医薬品に対する期待が高まっている。例えば、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、T-DM1が進行性乳がんに対する治療薬として承認され、目下30品目が臨床試験中である。第二世

代のナノ医薬品におけるリガンド分子としては、抗体が最も広く利用されているが、抗体は(i)生物合成による製造が必要であるために大量製造が困難であり、製造コストが高くなることや(ii)投与関連反応等の副作用があることが問題であり、安価での大量製造が可能な合成リガンドとして、ペプチド、アプタマーおよび低分子リガンドは大きな可能性を秘めている。これらの合成リガンドは、抗体と比較して、標的分子に対する結合定数は高くないが、高分子やナノ粒子等のプラットフォームに集積させ多価効果を利用することによって結合定数を飛躍的に高めることも可能である。そこで本研究では、ナノテクノロジーを利用した合成リガンドの設計理論を確立し、リガンド分子搭載ナノ医薬品の評価法を確立することを目指している。

初年度となる本年度は、ポリアミノ酸の側鎖および dendrimer の末梢にペプチド等の任意の分子を結合させることにより、多価結合が

可能な合成リガンドのプラットフォームの合成を行った。

B. 研究方法

B.1. ポリアミノ酸を基本骨格とする合成リガンドプラットフォームの構築

日油より購入した Acetal-PEG-NH₂ を開始剤として Lys(TFA) の N-カルボン酸無水物 (Lys(TFA)-NCA) を開環重合し、側鎖の TFA をアルカリ加水分解することによって、Acetal-PEG-poly(L-lysine) (Acetal-PEG-PLys) を合成した。次に、Acetal-PEG-PLys の側鎖に TFA-NH-PEG-COOH を反応させ、側鎖に PEG スペーサーを介して 1 級アミノ基を有するプラットフォームポリマーを合成した (図 1)。

B.2. デンドリマーを基本骨格とする合成リガンドプラットフォームの構築

Fmoc-MAP (8)-Cys(Acm)-β Ala-Wang Resin (図 2) に日油より購入した Boc-PEG-NHS を反応させ、ヨウ素による Acm 基の脱保護、トリフルオロ酢酸による Boc 基の脱保護と樹脂からの切り出しを行うことにより、デンドリマーを基本骨格とする合成リガンドプラットフォームを合成した。

<倫理面への配慮>

該当なし

C. 結果と考察

C.1. ポリアミノ酸を基本骨格とする合成リガンドプラットフォームの構築

Acetal-PEG-NH₂ (Mw: 10,000) を開始剤として Lys(TFA)-NCA を開環重合し、1N NaOH で TFA 基を脱保護することによって、Acetal-PEG-PLys (Lys 重合度: 40 および 80) を

合成した。次に、COOH-PEG-NH₂ (Mw: 2,000) の 1 級アミノ基を TFA 基で保護し、縮合剤 DMT-MM を用いて、Acetal-PEG-PLys の側鎖に PEG を導入した。GPC 測定において、PEG の導入による高分子側へのピークのシフトが見られ、PEG の導入が確実に行われていることが確認されたが、¹H-NMR により正確な PEG の導入量を見積もる予定である。また今後は、イオン交換カラムを使用したコンジュゲートの精製、未反応アミノ基のアセチル化による封止、TFA 基の脱保護後のモデルアミノ酸およびペプチドの導入を行う予定である。さらに、アセタール基の脱保護後に蛍光色素等のプローブ分子の導入を行い、培養細胞を用いた合成リガンドの機能評価を実施する。

C.2. デンドリマーを基本骨格とする合成リガンドプラットフォームの構築

Fmoc-MAP (8)-Cys(Acm)-β Ala-Wang Resin への PEG の導入は、DMF 中で 1 日反応させることにより、8 分岐の Lys 末端の 100% に導入できることが確認された。樹脂からの切り出し反応に関しては、溶媒と回収方法を検討したところ、0.5N HCl による抽出を行うことにより最も高い収率が得られ、42%であった。次にリガンド分子としてモデルアミノ酸の導入反応を行ったところ、PEG 末端の 100% にモデルアミノ酸を導入することができ、収率は 65%であった。以上のように本項目では、デンドリマーを基本骨格とする合成リガンドプラットフォームの合成法を確立し、モデルアミノ酸を定量的に導入することに成功した。今後は、ペプチド等の標的特異性を有するリガンド分子を導入し、MaP コア部の Cys 残基の SH 基に蛍光色素等のプローブ分子を導入することによって、培養細胞を用いた合成リガンドの機能評価を実施する。

D. まとめ

本年度は、PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体と MAP の 8 分岐型 Lys デンドリマーを基本骨格とする 2 種類の合成リガンドプラットフォームを構築した。どちらの合成リガンドプラットフォームにおいても順調に合成が進捗しており、Lys デンドリマーに関しては既にモデルアミノ酸の導入にも成功している。実際に導入するリガンド分子としては、ここではがんの標的化に広く利用されている環状 RGD ペプチド等を検討しており、多価効果による標的への結合能や体内動態の観点から合成リガンドプラットフォームの化学構造の最適化を図っていきたいと考えている。一方、合成リガンドプラットフォームには、アセタール基やチオール基を導入しており、これらの官能基を利用して蛍光色素等のプローブ分子の導入を行う予定である。今後は、プローブを導入した合成リガンドプラットフォームの培養細胞による取り込み実験に加えて、がん細胞の皮下移植モデルを用いてがん集積量、特異性の評価を行っていく予定である。

E. 健康危機情報

該当なし

F. 研究発表等

論文発表等（総説も含みます）

- 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.-C. Yen, H. Cabral, P. Mi, K. Toh, Y. Matsumoto, X. Liu, H. Koori, A. Kim, K. Miyazaki, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled in vivo chemotherapy. *ACS Nano* 8 (11) 11591-11602 (2014)
- 3) 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)
- 4) 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)
- 5) 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)
- 6) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka,