

201438018A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森 正樹

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人大阪大学が実施した平成26年度「固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 森 正樹

平成27(2015)年 3月

目次

I. 委託業務成果報告(総括)

アンメットニーズの高い難治療消化器癌の革新的な医療の 創出リプログラミング(代謝・エピゲノム)の基盤技術と臨床応用 _____	1
森 正樹(大阪大学大学院医学系研究科)	

II. 委託業務成果報告(業務項目)

1. 固形癌幹細胞の代謝特性に関わる CD44 経路等を 標的とした高分子ミセル型 DDS の開発 _____	10
片岡 一則(東京大学大学院工学系研究科)	
2. 固形癌幹細胞の代謝特性に関わる CD44 経路等を 標的とした高分子ミセル型 DDS の開発 _____	17
西山 伸宏(東京工業大学資源化学研究所)	
3. iPS 細胞技術を利用した難治性消化器癌のリプログラミング免疫再生療法の開発 _____	22
中内 啓光(東京大学医科学研究所)	
4. 難治性消化器癌幹細胞の CD44v 経路等を標的とした治療戦略の開発 _____	25
佐谷 秀行(慶應義塾大学医学部先端医科学研究所)	
5. 癌幹細胞のリプログラミング(CD44v 等)経路を標的とした microRNA 制御とエクソソーム DDS による治療応用 _____	28
落谷 孝広(国立がん研究センター研究所)	
6. 細胞初期化技術を用いたリプログラミング分化転換および 分化誘導方法の開発と、その癌治療への応用 _____	31
山田 泰広(京都大学 iPS 細胞研究所)	
7. 難治性消化器癌幹細胞のリプログラミング(代謝・エピゲノム)に 関わる経路を標的とした安全で有効な新規治療法の開発と臨床応用 _____	33
石井 秀始(大阪大学大学院医学系研究科)	

III. 学会等発表実績 _____	39
--------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 _____	45
-----------------------	----

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究
（アンメットニースの高い難治療消化器癌の革新的な
医療の創出リプログラミング（代謝・エピゲノム）の基盤技術と臨床応用）

業務主任者 森正樹 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

癌は我が国の死亡原因の第1位である。消化器癌はその大半を占め、その根治は国民的喫緊の課題である。癌医療改善の加速施策に資するために、固形癌幹細胞を標的とする革新的な治療技術の研究開発を実施してきた。固形癌幹細胞は周囲の微小環境（ニッチ）の中に半休眠状態で存在し、そこから治療抵抗性の娘癌細胞が発生する。現行の治療法では娘癌細胞のみを標的としているために副作用が強く、残存する微量癌幹細胞からの再発、転移をきたすことが問題である。政府のアクションプランに従い、平成23年度からの3カ年計画を前期、平成26年度からの3カ年を中期、平成29年度以降を後期と位置づけて、速攻性のある創薬の出口戦略を具現化し、トランスレーショナル研究の成果を臨床に展開するために事業を展開した。平成26年度はこれまでのシーズ開発の成果を踏まえながら最適化を進め、前臨床試験から医師主導治験への基盤を構築した。癌幹細胞マーカーに対する阻害剤のリポジショニング創薬、革新的な核酸医薬品の開発、T-iPS技術による免疫療法、さらには高精度の標的化を実現するための最先端技術によるドラッグデリバリーシステム（DDS）開発において革新技術を新構築した。安全で有効な新医療技術を実現するために、倫理面では行政及び施設内規則を定めるところを順守し、円滑かつ効果的な厚生行政の推進に貢献した。

A. 研究背景、目的

政府が策定した中長期的視野に立った戦略に基づくアクション計画に沿って、平成23年度から開始された10年計画の前期（平成23～25年度）から継続的に新たな知見を創出・医療応用展開し、アンメットメディカルニースが高い難治性の消化器（膵癌、転移性大腸癌を含む）を対象にした癌幹細胞を標的とした革新的な治療法を開発する。わが国を代表する研究者の多施設共同研究で基盤整備を展開する。本計画は単年度の研究計画であるが、その内容の継続性は必要に応じて将来に発展可能なものとして立案し、アンメットメディカルニースが高い難治癌の克服に向けた整備事業として革新シーズの実用化に道筋を付け、癌幹細胞の創薬の加速化を促進する。各領域の最先端に携わるわが国研究者に力を結集した事業内容は、癌幹細胞とリプログラミング（最先端研究の融合）およびアカデミア創薬において内外で卓越した

成果を上げつつあり、目標に向けて焦点を絞り更に発展的に事業を展開する。平成26年度の単年度の計画として、研究計画の骨子は、革新的な医療技術の創出により集学的に癌幹細胞を根絶する技術の新構築である。個々の研究は互いに密な連携体制で臨み、治療抵抗性の癌幹細胞の分子論的究明と新たな標的分子と阻害剤の同定および創薬展開、CD44v-xCT分子機構解析および特異的阻害剤サルファサラジンによる代謝リプログラミング、その臨床応用展開、最先端DDS開発、核酸創薬の医療応用展開、新たな酸化ストレス応答の新規標的化、CD13特異的阻害剤による代謝リプログラミング、癌リプログラミングの分子基盤、免疫担当細胞のリプログラミングによる癌幹細胞の標的化である。倫理等に関わる法令を遵守し承認を経て研究を実施する。

B. 研究方法

基礎研究から臨床応用までシームレス

な開発研究を構築し、創薬を加速化するためにオールジャパン体制で事業を展開した。前臨床試験から医師主導治験までのマイルストーンと達成度は別途報告した。以下に各事業の進捗をまとめる。

①アンメットニーズの高い難治療消化器癌の革新的な医療の創出リプログラミング(代謝・エピゲノム)の基盤技術と臨床応用

前期(平成23~25年度)に引き続いて、強いリーダーシップを発揮して班全体を統轄する。また個々研究として癌リプログラミングを核酸創薬で実現する研究を推進し、前臨床試験、治験まで進める。マイクロRNAエクソゾームの早期癌への応用、更に癌幹細胞の創薬展開として、すでに同定したCD13を標的化するベスタチン等のDDS最適化、広く癌幹細胞創薬展開での統合的な把握を進める。倫理手続きおよび法令規則遵守の下に新鮮手術材料を積極的に用いて創薬過程の早期の段階からヒトを対象とした評価系を取り込む。

②固形癌幹細胞の代謝特性に関わるCD44経路等を標的とした高分子ミセル型DDSの開発

ナノテクノロジーを利用した薬剤送達システム(DDS)の研究開発をこれまで推進してきており、開発した5種類の抗癌剤内包高分子ミセルが国内外の臨床治験において治療効果の増強ならびに副作用の軽減が認められ、うち2種類が第3相治験に進むなど、日本発の画期的なナノDDSとして大きな注目を集めている。さらに最近では、難治がんとして知られる膵臓癌の自然発生モデルにおいて転移を抑制し、マウスの生存期間を大幅に延長させることが確認されている。また、片岡らは、リガンド分子を搭載した高分子ミセルの開発に積極的に取り組み、 $\alpha v \beta 3$ インテグリンに結合する環状RGDペプチド、転移がんに過剰に発現するシアル酸に結合するボロン酸、抗体フラグメントを搭載した高分

子ミセルの動物実験における有効性を明らかにしてきた。さらに、最近の成果では、これらのリガンド分子が癌幹細胞の標的化においても有用であることが明らかになりつつあり、既に動物実験での有効性が確認されている。そこで本研究では、リガンド搭載高分子ミセルの癌幹細胞をはじめとする難治がんモデルに対する薬効メカニズムを解明する一方で、癌幹細胞に高い薬理作用を示す候補薬剤をリガンド搭載高分子ミセルに搭載することによって、それらの薬剤の副作用の抑制と治療効果の最適化を目指して研究した。また、厚生労働省、PMDA、国立衛研と連携して、ナノ医薬品の審査ガイドラインの策定にも取り組んでおり、ミセル化技術と規制科学の両面から癌幹細胞治療に有効な新規薬剤内包ミセルの実用化に向けた研究を展開した。

③iPS細胞技術を利用した難治性消化器癌のリプログラミング免疫再生療法の開発

我々はこれまでにiPS細胞技術を利用して抗原特異的キラーT細胞を若返らせ、大量に産生する手法を開発し報告した。このようにして産生したT細胞はテロメアが伸長しており、抗原特異性とキラー活性を保持していることがin vitroの系では確認されたが、in vivoにおける活性については不明であった。そこで実際にin vivoにおいてどの程度の抗腫瘍活性を示すかを明らかにするため、EB virus特異的なT細胞クローンをiPS細胞技術を利用して若返らせ、そのキラー活性をEBウイルス感染腫瘍を対象にin vivoにおいて検証することを試みる。Latent membrane 2 EBウイルス抗原は殆どのEBV関連腫瘍に発現されていて、この抗原に対するキラーT細胞を用いた頭頸部腫瘍や骨髄移植後のリンパ系増殖疾患に対する臨床治験も進捗中である。そこでこれらのキラーT細胞クローンから抗原エピトープが判っている代表的なものを選び、それぞれからT-iPS細胞を樹立

した。得られた T-iPS 細胞から再びキラー T 細胞を誘導し、その抗原特異性を peptide-HLA pentamer や EB ウイルス感染腫瘍を用いて in vitro で確認する。さらに EB ウイルス感染腫瘍を NOD-SCID マウスに移植し、腫瘍のサイズと血中ウイルス量を定量的に解析し in vivo における抗腫瘍活性を明らかにした。

④難治性消化器癌幹細胞の CD44v 経路等を標的とした治療戦略の開発

慢性炎症を背景として発生するがんにおいては、癌幹細胞は酸化ストレスを抑制する機構を多面的・段階的に装備し、それが炎症に打ち勝って腫瘍を成長させ、更に腫瘍組織を維持するために働いていると考えられる。特にグルタチオンを合成するメカニズムが癌幹細胞では発達していることがこれまでの研究で明らかになっている。本研究は、癌幹細胞のグルタチオン代謝を詳細に解析することにより、治療抵抗性のメカニズムを解明し、それを標的とした治療法を開発することが目的である。①癌幹細胞におけるグルタチオン代謝状態をメタボローム解析によって詳細に解析。特に、シスチントランスポーター阻害剤であるスルファサラジンで癌幹細胞を処理した際に、どのような代謝変化が生じるかを解析。また、細胞の xCT 発現を調べ、スルファサラジンに対する感受性を調べ、CD44v 以外の機構で xCT が安定化していないかについて解析。更に、酸化ストレスを上昇させる薬剤とスルファサラジンの併用によって、より効果的かつ選択的に癌幹細胞を破壊することができるかについても検討。②片岡・西山グループが開発した高分子ミセル化薬剤ががん幹細胞に効果を発揮するかを観察した。

⑤癌幹細胞のリプログラミング(CD44v 等)経路を標的とした microRNA 制御とエクソソーム DDS による治療応用

本研究では、miR-27b のデリバリーシステムの構築にその主眼を於く。既に多くの

DDS が開発されているので、最も臨床で成功する確率の高いナノミセルや、最新のエクソソーム DDS 等を検討し、最適な DDS を決定した上で、動物モデルでの有効性評価と安全性評価を実施することで、前臨床試験への過程を明確にした。

⑥細胞初期化技術を用いたリプログラミング分化転換および分化誘導方法の開発と、その癌治療への応用

細胞初期化技術を用いて難治性癌の革新的治療法を開発することが目的である。細胞初期化技術により、正常細胞の運命制御が可能となった。この技術を膀胱癌肺癌など難治性がんに応用することで、癌細胞の運命制御を試みる。さらに細胞初期化技術を発展させたダイレクト・リプログラミング法による細胞分化転換技術を癌細胞に応用し、難治性癌細胞の運命制御の可能性を明らかにする。細胞初期化およびダイレクト・リプログラミング技術を癌治療に応用しようとする試みは独創的であり、大きなブレークスルーをもたらす可能性を秘めている。まずは膀胱癌肺癌のマウスモデルを作製する。変異型 K-ras 遺伝子を薬剤で誘導可能なマウスモデルを作製した。作製したマウスに発生した肺腫瘍、膀胱腫瘍から K-ras 遺伝子発現を制御可能な癌細胞株を樹立する。樹立した難治性癌細胞株の初期化、分化転換を試み、癌遺伝子発現と癌細胞の初期化、分化転換との関連を明らかにするとともに、癌細胞の性質変化を検討した。

⑦難治性消化器癌幹細胞のリプログラミング(代謝・エピゲノム)に関わる経路を標的とした安全で有効な新規治療法の開発と臨床応用

前期(平成 23~25 年度)に引き続いて、細胞リプログラミング(代謝・エピゲノム)の分子機構を癌細胞の悪性度制御の観点から、終末分化、酸化的リン酸化、エピゲノムプロファイリングを具体的な切り口として応用可能なレベルにまで掘り下

げて開発研究。可塑性が高いとされる細胞群を用いて多分化能に関わるゲノム領域を集中的に検索してエピゲノム動態をプロファイリングした。将来の創薬展開を見据えてマイクロ RNA に焦点を当てて、その翻訳制御系を高感度のプロテオミクスで解析、下流を探索、生物学的な重要性を決定するためにモデル動物を用いて機能を検討する。前期までに得られた先駆け的成果として酸化リン酸化制御の重要性が指摘され、細胞周期静止期にある難治性消化器癌幹細胞が悪性度を発揮する機構の究明に向けて展開中である。酸化リン酸化からエピゲノムに関わる分子機構は細胞リプログラミングの要をなすものであり、癌細胞で欠損している終末分化の能力を再付与することができる等、新しいコンセプトの創薬に展開中である。

(倫理面への配慮)

●実験動物使用を含む研究計画：

動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）、大阪大学動物実験規則を遵守する。

●ヒトゲノム・遺伝子解析研究を含む研究計画：

平成16年度に改正された文部科学省、厚生労働省、経済産業省によるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき研究を遂行する。ヘルシンキ条約に則りインフォームドコンセントを行い、同意の得られた検体のみを使用し、個人情報の匿名化と守秘は厚生労働省および大阪大学の既定に則って実施した。

●遺伝子組換え実験を含む研究計画：

遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律（「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づく

カルタヘナ法）」の定める細則と、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則、ならびに施設内の組み換え DNA 実験指針の基準に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従って DNA 組み換え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に実施した。

●臨床研究に関する倫理指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従った。

●疫学研究に関する倫理指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従った。

●ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従った。

●被験者の安全性の確保

被験者の安全性を確保するために、責任者及び分担者は、以下の基本的事項を遵守した。

1)責任者又は分担者は、被験者の選択基準及び除外基準を遵守する。

2)被験者が本研究の責任者と分担者以外の医師の治療を受ける場合には、本研究に参加していること及び本研究の内容を文書にて当該医師に通知。

3)本研究終了後も出来る限り長期にわたって診察を行い、有害事象の発現の有無について注意を払う。

4)被験者が健康状態の異常を感じた場合には直ちに責任者又は分担者に連絡するよう指導する。

5)責任者又は分担者は、被験者に有害事象が生

じ、治療が必要であると認めるときは、その旨を当該患者に伝え、適切な医療を提供する。

●有害事象発現時の対応

有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、被験者の安全の確保に留意し、必要に応じて専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。被験者の臨床研究参加中及びその後を通じて、臨床上問題となる有害事象に対して十分な医療措置を講じる。

責任者は症例報告書に種類、発現日、程度、重篤か否か、経過及び臨床研究との因果関係等を記載する。また、発生した有害事象、特に本研究との因果関係が否定できない事象については、可能な限り追跡調査を実施した。

C. 研究結果

①アンメットニーズの高い難治療消化器癌の革新的な医療の創出リプログラミング(代謝・エピゲノム)の基盤技術と臨床応用

マイクロ RNA エクソゾームを用いた早期癌及び癌幹細胞への創薬展開を実施し、CD13を標的化するベスタチン等のDDS最適化に着手した。倫理手続き及び法令順守の基に研究を進める体制を整えた。

②固形癌幹細胞の代謝特性に関わる CD44 経路等を標的とした高分子ミセル型 DDS の開発

癌幹細胞マーカーに対する阻害剤のリポジショニングを進め知財を整備し前臨床試験、さらには医師主導治験への耐性を整備した。癌幹細胞に対する薬効メカニズムを解明するとともに候補薬剤をリガント搭載高分子ミセルに装着することによって薬剤の副作用の軽減と治療効果の最大化を目指して POC を取得した。

③iPS 細胞技術を利用した難治性消化器癌のリプログラミング免疫再生療法の開発

癌組織において疲弊化した免疫担当細胞を T-iPS 技術によって再活性化し若返らせて大量に生産する技術の実現に向けて

基盤を構築した。

④難治性消化器癌幹細胞の CD44v 経路等を標的とした治療戦略の開発

放射線及び化学療法の後には局所で残存する癌幹細胞の酸化ストレス応答の異常を明らかにし創薬に向けた POC を取得した。特にシスチントランスポータ阻害剤であるサルファサラジンの癌幹細胞に対する薬効を応用可能なレベルにまで掘り下げて研究した。高分子化薬剤の POC 取得にむけて着手した。

⑤癌幹細胞のリプログラミング(CD44v 等)経路を標的とした microRNA 制御とエクソソーム DDS による治療応用

miR-27b のデリバリーシステムを最適化し、前臨床試験から医師主導治験に向けて薬効評価と安全性評価を実施した。

⑥細胞初期化技術を用いたリプログラミング分化転換および分化誘導方法の開発と、その癌治療への応用

臨床応用を前提とした癌のエピゲノム研究として、薬剤で山中因子等を誘導可能なモデル動物を作製し解析した。本研究の治験は班内及び国内において癌の本態解明からシームレスな開発研究に向けて基盤を構築した。

⑦難治性消化器癌幹細胞のリプログラミング(代謝・エピゲノム)に関わる経路を標的とした安全で有効な新規治療法の開発と臨床応用

癌幹細胞を特徴づける代謝及びエピゲノムのリプログラミング機構を応用可能なレベルにまで掘り下げて研究した。酸化的リン酸からエピゲノムに関わる分子機構におけるマイクロ RNA の POC を取得し、知財整備中である。

D. 考察

アンメットメディカルニーズが高い難治性の消化器（膵癌、転移性大腸癌を含む）を対象にして、癌幹細胞を標的とした革新的な治療技術を新構築する。政府の中

長期的視野に立った戦略に基づくアクション計画に沿って、わが国を代表する研究者の多施設共同研究で基盤整備を実施した。平成 26 年度から 3 年間の計画では、既に平成 23 年度から開始された 3 年間の成果に立脚した研究の継続により新たな知見を創出し医療応用展開した。

①アンメットメディカルニーズが高い難治癌

わが国の高齢化社会の深化に伴い、国民の 3 人に一人が癌に罹患し 2 人に一人が癌でなくなる時代を迎えようとしている（国立がん研究センターHP）。その過半数は消化器癌であり、早期段階では手術のみで完治するが、進行期では抗癌剤療法・放射線療法に抵抗性であり、「難治」である。難治癌の開発研究は多彩な疾患の特徴を反映して臨床に軸足を置きつつ基盤研究まで裾野広くフレキシブルに展開できるオールジャパンの研究体制は必須である。一定期間内に出口戦略を達成するためには、わが国を代表する専門家から組織することが求められる。特に、アンメットメディカルニーズが高い難治癌では開発リスクが伴う為に製薬・ベンチャー企業の投資が必ずしも積極的ではなく、この点でアカデミアが中心となる創薬が求められている。

②革新シーズの実用化に道筋

京都大学山中伸弥教授（2012 年ノーベル生理学医学賞）の iPS 細胞はわが国発の画期的な発明である。リプログラミング技術を難治癌に応用するためには 2 つのハードルが存在する。第一に、リプログラミングにより癌細胞の悪性度を改変する医療技術として、人為的に制御可能な革新技術として成熟させること。第二に、医療応用可能なセッティングとして、煩雑な遺伝子治療に依存するのではなく、核酸創薬を高精度薬剤到達システムと融合させる最先端技術を応用可能なレベルにまで育成すること、さらには免疫担当細胞のリプログラミングによる画期的な細胞治療の開発な

どが求められる。本事業計画では、既に平成 23 年度から開始された 3 年間の成果で統合的にこの課題に取り組んでおり、研究の継続に着実な具現化を目指した。

③癌幹細胞の創薬の加速化

難治癌では特に治療抵抗性の過程に癌幹細胞の深い関与が示された（厚生労働科 研費 森班平成 23～25 年度他）。その中で、癌幹細胞表面マーカー CD44v-xCT の分子機構を解析し、特異的阻害剤サルファサラジンによる代謝リプログラミングを作用点として治療抵抗性癌幹細胞を駆逐する革新技術を整備した。サルファサラジンは癌幹細胞を標的化した最新技術ナノ粒子（ミセル）に搭載することで高精度に標的化することができる技術基盤を構築し、前臨床試験として動物実験で有効性を確認したので、今後倫理委員会の承認を経て治療を実施する予定である（佐谷・片岡・西山ら）。この CD44v-xCT-サルファサラジンの成功例は周辺癌幹細胞創薬の皮切りとなった。特に、CD44v 等の代謝リプログラミングを作用点とする核酸創薬（落谷・森・石井ら）、癌幹細胞のエピゲノムリプログラミングの分子機構の究明による創薬展開の基盤構築（山田・森・石井ら）、核酸創薬のミセル搭載技術（片岡・西山・森・石井ら）、免疫担当細胞のリプログラミングによる癌幹細胞の標的化（中内ら）である。さらには、癌幹細胞の根絶のために酸化ストレス応答の新規標的化（佐谷ら）、CD13 等の新規分子標的化とミセル化（森・石井・片岡・西山ら）、エピゲノムリプログラミングに向けた創薬展開の基盤構築（山田ら）、治療抵抗性である細胞周期静止期の癌幹細胞から造腫瘍活性を発揮する酸化的リン酸化維持機構の分子基盤（佐谷・森・石井ら）、画期的な核酸創薬の前臨床試験（落谷・森・石井ら）、iPS 細胞技術を利用して若返らせた T 細胞を用いた抗腫瘍治療の効果を示す前臨床試験（中内ら）まで展開が加速している。

全てのアームは癌幹細胞の根絶に統合している。

E. 結論

政府が策定した中長期的視野に立った戦略に基づくアクション計画に沿って、平成23年度から開始された10年計画の前期(平成23~25年度)から継続的に新たな知見を創出・医療応用展開し、アンメットメディカルニーズが高い難治性の消化器(膵癌、転移性大腸癌を含む)を対象にした癌幹細胞を標的とした革新的な治療法を開発した。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Koseki, J., Colvin, S. H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associates with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 46(3):1181-1191, 2015.
- 2) Yoshioka, Y., Kosaka, N., Konishi, Y., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Nonaka, R., Yamamoto, H., Ishii, H., Mori, M., Furuta, K., Nakajima, T., Hayashi, H., Sugisaki, H., Higashimoto, H., Kato, T., Takeshita, F., Ochiya, T. Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat. Commun.*, 7;5:3591, 2014.
- 3) Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Tamari, K., Hayashi, K., Fukusumi, T., Satoh, T., Tanaka, S., Ogawa, K., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Novel drug discovery system for cancer stem cells in human squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol. Rep.*, 31(3):1133-1138, 2014.
- 4) Kano, Y., Ishii, H., Konno, M., Yamasaki, M., Miyata, H., Nishikawa, S., Hamabe, A., Ogawa, H., Takahashi, H., Ohta, K., Hasegawa, S., Tanaka, K., Fukusumi, T., Otsuka, M., Kawamoto, K., Haraguchi, N., Fujimoto, R., Isobe, M., Tomita, Y., Matsuura, N., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. Cells of origin of squamous epithelium, dysplasia and cancer in the head and neck region after bone marrow transplantation. *Int. J. Oncol.*, 44(2):443-450, 2014.
- 5) Takeyama, H., Yamamoto, H., Yamashita, S., Wu, X., Takahashi, H., Nishimura, J., Haraguchi, N., Miyake, Y., Suzuki, R., Murata, K., Ohue, M., Kato, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Ishii, H., Mimori, K., Doki, Y., Mori, M. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer. *Mol. Cancer Ther.*, 13(4):976-985, 2014.
- 6) Okano, M., Konno, M., Kano, Y., Kim, H., Kawamoto, K., Ohkuma, M., Haraguchi, N., Yokobori, T., Mimori, K., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Human colorectal CD24+ cancer stem cells are susceptible to epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Oncol.*, 45(2):575-580, 2014.
- 7) Koga, C., Kobayashi, S., Nagano, H., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Ishii, H., Umeshita, K., Doki, Y., Mori, M. Reprogramming Using microRNA-302 Improves Drug Sensitivity in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Ann. Surg. Oncol.*, Suppl 4:S591-600, 2014.
- 8) Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., Hasegawa, S., Hamabe, A., Haraguchi, N., Doki, Y., Mori, M., Inohara, H. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br. J. Cancer*, 111(3):506-514, 2014.
- 9) Hara, J., Miyata, H., Yamasaki, M., Sugimura, K., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Nakajima, K., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. Mesenchymal phenotype after chemotherapy is associated with chemoresistance and poor clinical outcome in esophageal cancer. *Oncol. Rep.*,

- 31(2):589-596. 2014.
- 10) Takata, A., Nakajima, K., Kurokawa, Y., Takahashi, T., Yamasaki, M., Miyata, H., Takiguchi, S., Mori, M., Doki, Y. Single-incision laparoscopic partial gastrectomy for gastric submucosal tumors without compromising transumbilical stapling. *Asian. J. Endosc. Surg.*, 7(1):25-30, 2014.
 - 11) Wada, N., Kurokawa, Y., Takiguchi, S., Takahashi, T., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Mori, M., Doki, Y. Feasibility of laparoscopy-assisted total gastrectomy in patients with clinical stage I gastric cancer. *Gastric, Cancer.* 17(1):137-140. 2014.
 - 12) Wada, N., Kurokawa, Y., Nishida, T., Takahashi, T., Toyokawa, T., Kusanagi, H., Hirota, S., Tsujinaka, T., Mori, M., Doki, Y. Subgroups of patients with very large gastrointestinal stromal tumors with distinct prognoses: a multicenter study. *J. Surg. Oncol.*, 109(2):67-70. 2014.
 - 13) Takata, A., Takiguchi, S., Okada, K., Takahashi, T., Kurokawa, Y., Yamasaki, M., Miyata, H., Nakajima, K., Mori, M., Doki, Y. Clinicopathological and prognostic significance of FOXM1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Anticancer, Res.*, 34(5):2427-2432. 2014.
 - 14) Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *B.r J. Cancer*, 111(8):1572-1580, 2014.
 - 15) Hamabe, A., Hirofumi, Y., Konno, M., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Combined evaluation of hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 α in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. *Cancer Sci.*, 105(9):1100-1108, 2014.
 - 16) Tamari, K., Hayashi, K., Ishii, H., Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2349-2354, 2014.
 - 17) Hayashi, K., Tamari, K., Ishii, H., Konno, M., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Kano, Y., Nishikawa, S., Miyo, M., Noguchi, K., Ogawa, H., Hamabe, A., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 45(6):2468-2474, 2014.
 - 18) Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotho, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 111(43):15526-15531, 2014.
 - 19) Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Cancer Stem Cells of the Digestive System. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 44(12):1141-1149, 2014.
 - 20) Kawamoto, K., Yabe, S., Konno, M., Ishii, H., Nishida, N., Koseki, J., Fukuda, S., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Kobayashi, S., Eguchi, H., Tanemura, M., Ito, T., Lee, EY., Mukai, E., Miki, T., Doki, Y., Mori, M., Hamazaki, TS., Nagano, H., Okochi, H. NeuroD1 with conditioned medium efficiently induce ASC to insulin-producing cells both in vitro and in vivo. *J. Stem Cell Res. Ther.*, 2014. (in press)
 - 21) Nishikawa, S., Konno, M., Hamabe, A., Hasegawa, S., Kano, Y., Fukusumi, T., Sato, T., Takiguchi, S. Mori, M. Doki, Y. Ishii, H. Surgically Resected Human Tumors Reveal

the Biological Significance of the Gastric Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD26. *Int. J. Oncol.* 2014. (in press)

- 22) Miyazaki, S., Yamamoto, H., Miyoshi, N., Wu, Xin., Ogawa, H., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Konno, M., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. A Cancer Reprogramming Method Using MicroRNAs as a Novel Therapeutic Approach against Colon Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* 2014. (in press)
- 23) Ogawa, H., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Colvin, S. H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Hama, N., Wada, H., Marubashi, S., Kobayashi, S., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. The combination of the expression of hexokinase 2 and pyruvate kinase M2 is a prognostic marker in patients with pancreatic cancer. *Mol. Clin. Oncol.* 2014. (in press)

2. 学会発表

- 1) 森正樹：肝胆膵領域癌におけるマイクロ RNA 研究の意義、第 26 回日本肝胆膵外科学会学術集会、2014 年 6 月 11 日～6 月 13 日、和歌山
- 2) 森正樹：骨転移の病態と最新治療、第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月 10 日～7 月 11 日、石川
- 3) 森正樹：癌幹細胞研究の現状と展望、第 52 回日本癌治療学会学術集会、2014 年 8 月 28 日～8 月 30 日、神奈川

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

- 1) 発明の名称：マイクロ RNA におけるメチル化修飾部位を計測する方法
発明者：石井秀始、森正樹、土岐祐一郎、西田尚弘、今野雅允、小関準、川本弘一、大房健、近藤礎、中村眞
出願人：いであ株式会社、株式会社エバンス、国立大学法人大阪大学
出願番号：特願 2014-266607

- 出願日：平成 26 年(2014 年)12 月 26 日
- 2) 発明の名称：多能性幹細胞の品質診断方法及び診断キット、抗がん剤並びに疾患モデル動物
発明者：石井秀始、森正樹、土岐祐一郎、今野雅允、川本弘一、西田尚弘、小関準、新井貴博、佐藤暢彦、近藤礎、中村眞
出願人：ユニテック株式会社、株式会社エバンス、国立大学法人大阪大学
出願番号：特願 2014-266696
出願日：平成 26 年(2014 年)12 月 26 日
- 3) 発明の名称：膵癌治療感受性の診断方法及び膵癌治療感受性の増強剤
発明者：石井秀始、永野浩昭、森正樹、土岐祐一郎、今野雅允、江口英利、川本弘一、西田尚弘、小関準、長谷川慎一郎、野口幸蔵、近藤礎、中村眞
出願人：株式会社エバンス、国立大学法人大阪大学
出願番号：特願 2014-266697
出願日：平成 26 年(2014 年)12 月 26 日

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし。

固形癌幹細胞の代謝特性に関わる CD44 経路等を標的とした高分子ミセル型 DDS の開発

担当責任者 片岡一則 東京大学大学院工学系研究科／医学系研究科 教授

研究要旨

本分担研究では、CD44v 陽性の癌幹細胞に対して有効な高分子ミセル型 DDS の開発を目指している。これまでの研究により、シスプラチン (CDDP) 内包ミセル (CDDP/m) は、CV44v 陽性のヒト扁平上皮癌 OSC-19 腫瘍に対する有効性が確認されていた。そこで本年度は、この作用メカニズムを検証することを目的として、未分化で dormant 状態の CD44v 陽性癌幹細胞と増殖性のインボルクリン陽性娘癌細胞の 2 つのポピュレーションに分かれた明確な組織学特徴を示す HSC-2 腫瘍を用いて CDDP/m の有効性を検証した。その結果、CDDP/m は、CDDP 抵抗性の HSC-2 腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果を示すことが確認された。このメカニズムに関して、種々の検討を行ったところ、CDDP/m は細胞質内のグルタチオン (GSH) による CDDP の失活を回避し、インボルクリン陽性の娘癌細胞のみならず CD44v 陽性の癌幹細胞に対しても殺細胞効果を示していることが示唆された。

A. 研究背景、目的

これまでに悪性腫瘍に対する治療法は飛躍的な進歩を遂げてきたが、未だに根治することが困難な理由として、癌幹細胞の存在が示唆されている。癌幹細胞 (Cancer Stem Cell, CSC) とは、腫瘍組織中に存在する自己複製能、多分化能を有する未分化な細胞分画であり、再発や転移の起点となるために CSC を治療することががんの根治につながるものと考えられている。一方、CSC は、抗癌剤などの薬剤や放射線に対して抵抗性を持つことが知られている。この理由として、CSC が存在する微小環境 (ニッチ) が血管から離れた低酸素領域 (Hypoxia) に存在することや CSC 自身が薬剤排出タンパク質や細胞内グルタチオン濃度の上昇により治療抵抗性を有することなどが挙げられている。

一方、研究分担者である片岡は、これまでに精密設計されたブロック共重合の自己会合により形成される高分子ミセル型 DDS (図 1) に関する研究を行ってきた。高分子ミセルは、内核に制がん剤などの疎水性薬剤を内包させることができ、表面が生体適合性の PEG で覆われているために生体内で異物として認識されず血中を長期滞留することができる。さらに、高分子ミセルは、Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果 (腫瘍では血管壁の透過性の亢進と未発達なリンパ系の構築によって高分子物質が集積しやすい環境が形成されて

いる効果)によって固形がんを選択的に集積し、優れた制癌活性を示すことが実証されている。現在までに、このような高分子ミセル型 DDS は、パクリタキセル、シスプラチン、SN-38、オキサリプラチン、エピルピシンを内包したシステムの臨床治療が国内外で実施されている。

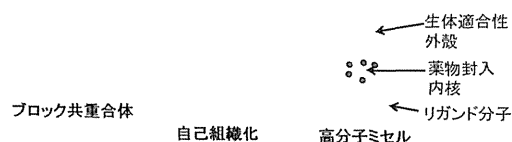


図1.高分子ミセル型DDSの模式図

本分担研究では、癌幹細胞マーカー CD44v 陽性の癌細胞に対して優れた効果を示す高分子ミセルの開発を目指して研究を実施した。片岡らは、高分子ミセルがナノスケールのトロイの木馬としてがん細胞に作用し、GSH等による白金抗癌剤の失活を回避できることを明らかにしており (Science Transl. Med. 3: 64ra2(2011))、前年度までに同様のメカニズムによって CV44v 陽性のヒト扁平上皮癌 OSC-19 に対する白金抗癌剤 (シスプラチンおよびダハプラチン) 内包高分子ミセルの有効性を明らかにした。そこで、本研究では、シスプラチン内包ミセルの癌幹細胞に対する作用メカニズムを明らかにすることを目的として、ヒト扁平上皮癌 HSC-2 細胞の皮下移植モデルを使用する。佐谷らの報告 (Cancer Res. 73:1855(2013)) により、HSC-2 腫瘍では

幹細胞性を示す幹細胞性を示すCD44v陽性の部分とCD44v陰性で娘細胞として増殖する部分(角化上皮細胞マーカーのインボルクリン陽性)が明確に分離した構造を示し、白金抗がん剤はインボルクリン陽性の娘細胞に選択的に作用する。我々は、HSC-2腫瘍に対するシスプラチン内包ミセルの作用を検討し、シスプラチンの効果と対比することによって、ミセルの作用メカニズムが推測できるものと考えた。

(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。

B. 研究方法

1)HSC-2 腫瘍に対する制癌活性評価

3.75×10^4 個のヒト扁平上皮癌由来 HSC-2 細胞を BALB/c nu/nu マウス(n=6~8)の皮下に移植し、3日後を day0 として day0, 2, 4 にシスプラチン(CDDP)(0.5, 1.0 mg/kg) および CDDP 内包ミセル(0.5, 1.0 mg/kg)を i.v.投与した。その後、経時的に腫瘍サイズを計測することにより、抗腫瘍効果を評価した。

2)HSC-2 腫瘍への白金集積量の評価

2×10^5 個の HSC-2 細胞を BALB/c nu/nu マウス(n=4)の皮下に移植し、27 日後に CDDP(5.0 mg/kg)および CDDP 内包ミセル(5.0 mg/kg)を i.v.投与した。1 および 24 時間後に腫瘍を摘出し、1%硝酸による処理を行った後、ICP-MS により白金(Pt)量を定量した。

3)CD44v、インボルクリンの免疫染色

実験 1)の抗腫瘍効果を評価した後の腫瘍組織の凍結切片を作成し、4%パラホルムアルデヒドで固定後に、加熱、Triton-X 等による処理を行い、CV44v およびインボルクリンの免疫染色を行った。CV44v およびインボルクリンは、それぞれ AlexaFluor594

および AlexaFluor488 で標識した 2 次抗体で染色し、細胞核を Hoechst により染色した。染色した組織切片は蛍光顕微鏡を用いて解析した。

C. 研究結果

1)HSC-2 腫瘍に対する制癌活性評価

HSC-2 腫瘍に対するシスプラチン(CDDP)および CDDP 内包ミセル(CDDP/m)の抗腫瘍効果を行った(図 2)。その結果、CDDP/m は、CDDP よりも有意に高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。CDDP 1mg/kg 投与群は顕著な 30%以上の顕著な体重減少を示したが、CDDP/m 投与群では有意な体重減少は認められなかった。以上の結果より、CDDP/m は、CDDP の有効性が乏しい HSC-2 腫瘍に対して優れた治療効果を示すことが明らかとなった。

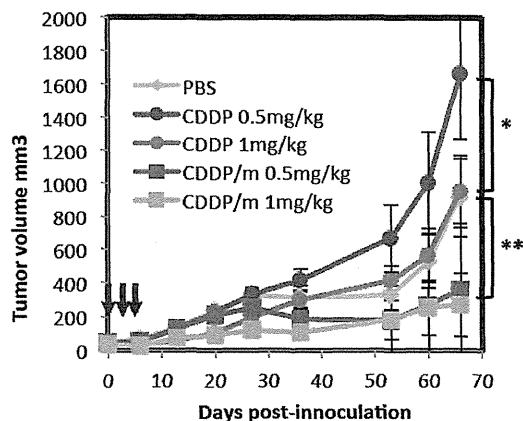


図 2. ヒト扁平上皮癌由来 HSC-2 腫瘍に対するシスプラチン(CDDP)および CDDP 内包ミセル(CDDP/m)の抗腫瘍効果(*<0.09, **<0.05)

2)HSC-2 腫瘍への白金集積量の評価

HSC-2 腫瘍への Pt 集積量の評価を行った(図 3)。

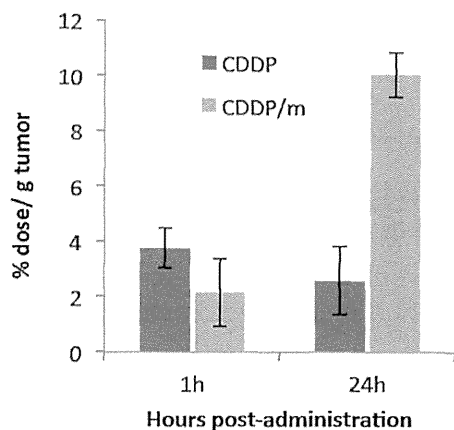


図 3.HSC-2 腫瘍への Pt 集積量の評価

その結果、CDDP/m は投与 24 時間後に CDDP の約 5 倍の集積を示すことが確認された。CDDP/m の固形癌への集積は、腫瘍血管の透過性の亢進と未発達なリンパ系の構築に基づく Enhanced Permeability and Retention(EPR)効果によるものであると考えられる。

3)CD44v、インボルクリンの免疫染色

CDDP/m の作用メカニズムを検討するために、治療後の腫瘍組織における CV44v およびインボルクリンの発現を免疫染色により評価した(図 4)。また、それぞれの蛍光強度を測定し、CV44v/インボルクリン比を算出した(図 5)。

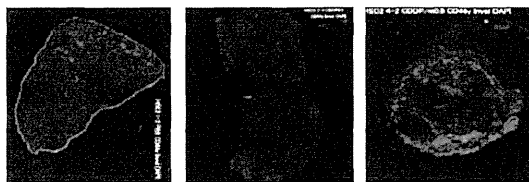


図 4. PBS (左)、CDDP (真ん中) および CDDP/m (右) による治療後の HSC-2 腫瘍の免疫染色 (赤: CD44v; 緑: インボルクリン、青: 細胞核)

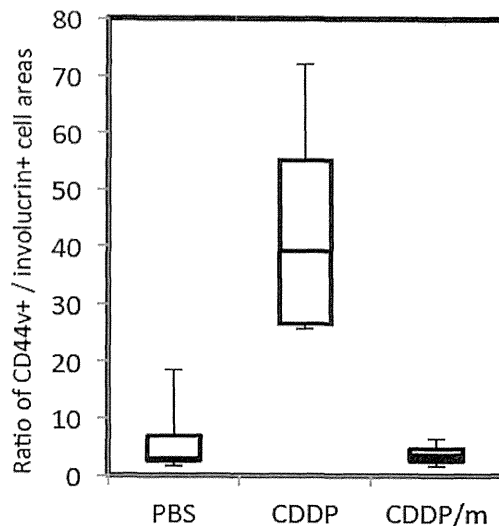


図 5. PBS (左)、CDDP (真ん中) および CDDP/m (右) による治療後の HSC-2 腫瘍における CD44v/インボルクリン比

その結果、CDDP 治療群では、インボルクリン陽性の娘癌細胞(緑)はほぼ消失したが、CD44v 陽性の癌幹細胞(赤)が残存することが確認された。一方、CDDP/m 治療群では、CD44v 陽性の癌幹細胞(赤)の量が減少していることが示唆され、CV44v/インボルクリン比は PBS 治療群とほぼ同等であった。

D. 考察

HSC-2 腫瘍は、未分化で dormant 状態の癌幹細胞と増殖性の娘癌細胞の 2 つのポピュレーションに分かれた明確な構造を有するのが特徴であり、それぞれを CD44v およびインボルクリンに対する抗体を利用して染色することが可能である。このモデルに対して CDDP を投与した場合には、インボルクリン陽性の娘癌細胞はほぼ根絶されるが、CD44v 陽性の癌幹細胞は残存してしまうため(図 4,5)、有意な治療効果は得られなかった(図 2)(CD44v は、シスチントランスポーターである xCT を安定化し、細胞内グルタチオン(GSH)量を増大させることによって、癌細胞にシスプラチン耐性を賦与することが佐谷らによって示されている(Cancer Cell 19: 387 (2011))。一方、CDDP/m は、EPR 効果によって固形癌に集積し(図 3)、CDDP と比較して有意に高い抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった(図

2)。興味深いことに、HSC-2 腫瘍の免疫染色において、CDDP/m 治療群では、CD44v 陽性の癌幹細胞の量が減少し(図 4)、CV44v /インボルクリン比は PBS 治療群とほぼ同等であった(図 5)。この結果より、CDDP/m は、インボルクリン陽性の癌細胞のみならず CD44v 陽性の癌幹細胞に対しても殺細胞効果を示すものと考えられる。この CDDP/m の癌幹細胞に対する効果に関しては、研究背景・目的にも記載したように、細胞質内の GSH による CDDP の失活が CDDP/m により回避されるためであると考えられる。この仮説を実証するために、現在、CDDP/m による核内 Pt 集積量や CD44v の発現量に対する影響を検討中である。

E. 結論

本年度の研究により、CDDP 内包ミセル(CDDP/m)は、シスプラチン(CDDP)に抵抗性の HSC-2 腫瘍に対して優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。このメカニズムに関して、種々の検討を行ったところ、CDDP/m は細胞質内の GSH による CDDP の失活を回避し、インボルクリン陽性の癌細胞のみならず CD44v 陽性の癌幹細胞に対しても殺細胞効果を示していることが示唆された。

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) 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)
- 5) 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)
- 6) 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)
- 7) 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)
- 8) 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)
- 9) 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)
- 10) S. Quader, H. Cabral, Y. Mochida, T. Ishii, X. Liu, K. Toh, H. Kinoh, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release* 188 67-77 (2014)
 - 11) Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* 8 (7) 6724-6738 (2014)
 - 12) S. Chuanoi, Y. Anraku, M. Hori, A. Kishimura, K. Kataoka, Fabrication of polyion complex vesicles with enhanced salt and temperature resistance and their potential applications as enzymatic nanoreactors. *Biomacromolecules* 15 (7) 2389-2397 (2014)
 - 13) K. Furugaki, L. Cui, Y. Kunisawa, K. Osada, K. Shinkai, M. Tanaka, K. Kataoka, K. Nakano, Intraperitoneal administration of a tumor-associated antigen SART3, CD40L, and GM-CSF gene-loaded polyplex micelle elicits a vaccine effect in mouse tumor models. *PLOS ONE* 9 7 e101854 (2014)
 - 14) 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)
 - 15) 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)
 - 16) L. Nuhn, S. Gietzen, K. Mohr, K. Fischer, K. Toh, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Kataoka, M. Schmidt, R. Zentel, Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum. *Biomacromolecules* 15 (4) 1526-1533 (2014)
 - 17) T. Ueno, K. Endo, K. Hori, N. Ozaki, A. Tsuji, S. Kondo, N. Wakisaka, S. Murono, K. Kataoka, Y. Kato, T. Yoshizaki, Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016). *Int. J. Nanomedicine* 9 (1) 3005-3012 (2014)
 - 18) 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)
 - 19) 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)
 - 20) 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)
 - 21) Wibowo, K. Osada, H. Matsuda, Y. Anraku, H. Hirose, A. Kishimura, K. Kataoka, Morphology control in water of polyion complex nanoarchitectures of double-hydrophilic charged block copolymers through composition tuning and thermal treatment. *Macromolecules* 47 (9) 3086-3092 (2014)
 - 22) 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)
 - 23) 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)

2. 学会発表

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 片岡一則, ナノマテリアルから拡がる医療イノベーション- 高分子ミセルによるがんの標的治療 - 第 41 回日本毒性学会学術年会, 2014.07.02, 神戸コンベンションセンター 神戸市 兵庫県, 特別講演
- 4) K. Kataoka, Nanomaterials as 'the magic bullet' to eradicate cancer, The 15th Anniversary Symposium of Science and Technology of Advanced Materials, 2014.07.03, Sanjo Conference Hall, Bunkyo, Tokyo, 招待講演
- 5) 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
- 6) 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~, 実験動物中央研究所平成 26 年度(第 33 回)学術懇話会, 2014.07.24, 学士会館 千代田区 東京都, 招待講演
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 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
- 10) 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~, 三井物産研究所 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
- 11) 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
- 12) 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
- 13) 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
- 14) 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
- 15) 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
- 16) 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
- 17) 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
- 18) 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
- 19) 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
- 20) 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
- 21) 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。