

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成13年度採択研究代表者

片岡 一則

(東京大学大学院工学系研究科 教授)

「遺伝子ベクターとして機能するナノ構造デバイスの創製」

1. 研究実施の概要

本研究構想のコンセプトは、ウイルスの機能と構造に学びつつ、合成高分子や脂質分子の的確な自己組織化を通じて、ウイルスの宿主細胞への感染機能を模したナノ構造デバイスを構築し、さらには、磁場や熱などの外場応答機能や天然の核酸医薬を越える機能性人工核酸の搭載、遺伝子以外の薬物やセンサー物質を標的細胞に送達するといった、いわば天然のウイルス機能を超越するインテリジェント・ナノ構造デバイスを創製する事である。この様な「インテリジェント・ナノ構造デバイス」は、ウイルスベクターに代わる安全でかつ高機能の合成ベクターとして遺伝子治療分野において広範な応用が期待出来るとともに、数々の知的資産の形成を通じて新産業の育成にも貢献する事が確信される。本プロジェクトの第三年目に相当する平成15年度においては、昨年度に引き続いて戦略目標達成のための基本コンセプトの検証を行うとともに、デバイスへのインテリジェント機能の創り込みを一層加速させ、非分裂細胞系も含めた培養細胞系における優れたベクター機能の実現に成功した。すなわち、①ウイルスベクターに匹敵する遺伝子導入効率を有するリガンド結合型ナノ構造デバイスの構築、②スムーズな細胞内移行能と細胞内環境に応答したDNA放出能を有するインテリジェント型ナノ構造デバイスの構築と機能の実証、③優れたエフェクター機能を有する機能性核酸のデバイスへの搭載と細胞内における遺伝子サイレンシング機能の確認、④ナノ構造デバイス表面への各種リガンド装着方法の確立、⑤臨床研究機関との連携によるin vivoにおけるデバイス機能の確認、という主要5項目に関してグループ内の緊密な連携の元、系統的な研究を実施した。

2. 研究実施内容

片岡グループ

片岡グループでは、昨年度までに細胞内還元環境下において効率良く内包DNAを放出するナノ構造デバイスの設計指針を明確にして来たが、本年度はさらに、その構造の最適化を行うとともにその製剤学的優位性の検討並びにin vivoにおけるレポーター遺伝子発現能評価を行った。さらに、この様なインテリジェントナノ構造デバイスの有する機能を最大限に引き出すために、細胞内動態制御を目的としたブロック共重合体設計並びに光エネ

ルギーの活用による遺伝子発現効率の増強に的を絞った研究を展開した。さらに、デバイスに搭載する薬物の範囲を広げ、遺伝子DNAのみならず、近年、新しい核酸医薬として急速に関心が高まっているsiRNAのデバイス内への効率的内包と培養細胞系における高い遺伝子ノックダウン効果の発現を確認した。一方、デバイスに内包されたDNAの凝縮構造の詳細に関しても、原子間力顕微鏡などを用いて検討を行い、規則的な折れ畳み構造を示唆する実験データを得つつある。また、還元環境応答型デバイスについては、計画を前倒しする形で動物実験を展開し、肝臓や血管壁におけるレポーター遺伝子の発現を確認した。

1) 細胞内還元環境応答型ナノ構造デバイスの構造最適化と機能検証

昨年度までに、細胞内におけるグルタチオン濃度上昇に呼応する形でデバイス内のジスルフィド架橋が開裂し、内包DNAを細胞内に効率的に放出することによって、高い遺伝子発現に導くシステムの設計指針を確立したので、本年度は、さらに、デバイスを構成するブロック共重合体の連鎖長ならびにジスルフィド架橋の導入率とデバイスの安定性並びに遺伝子発現能力との間の構造-機能相関を明らかにするための系統的な研究を行った。その結果、デバイス内における有効なDNA凝縮を惹起するための臨界鎖長が存在することを明らかとし、さらに、DNA凝縮構造の形成と遺伝子発現活性との間に良好な相関があることも見出された。また、ジスルフィド架橋効率についても最適値が存在し、かつその値が細胞種によっても異なることが明らかとなった。これは、細胞内におけるグルタチオン濃度の差などに帰因するものとも考えられるが、これより、ジスルフィド架橋率を精密に制御することによって、特定の細胞集団に特異的に遺伝子発現を誘導出来る可能性が示された。一方、この様なデバイスを実際の応用に展開していくためには、保存安定性や投与量の幅広い選択性などの製剤学的要件を満足することが必要であり、その点で、凍結乾燥製剤化が必須の課題である。本ジスルフィド架橋型デバイスは凍結乾燥に伴う粒径変化や遺伝子発現活性の減弱が全く認められず、将来の臨床展開においても極めて有利な形態であることが明らかとなった。

2) 細胞内移行促進機能を有するナノ構造デバイスの構築と機能評価

生体内の狙った細胞内で特定の遺伝子を効率良く発現させるナノ構造デバイスを構築するためには、上記の様な細胞内環境に応答した内包DNAの放出能とともにデバイスの細胞内への侵入経路であるエンドソーム小胞から細胞質への移行効率を高めることが重要な課題である。本プロジェクトでは、(1) ブロック共重合体鎖中への移行促進セグメントの導入、(2) 光エネルギーを利用した移行効率の促進という2つの方法でこの問題にアプローチしている。前者の系に関しては、昨年度までにPEG-ポリ(β -ベンジルアスパルテート) ブロック共重合体側鎖ベンジル基の定量的アミノリシスによってpKaや疎水性などの異なる各種アミノ基を導入する方法論を確立しているため、本年度は、この手法で合成した種々のブロック共重合体からDNA内包ナノ構造デバイスを調製し、培養細胞系を用いた機能評価を展開した。その結果、側鎖構造単位に高pKa (~7) と低pKa (~9) の2種類のアミノ基を組み合わせる系がスムーズな細胞質移行を示し、良好な遺伝子発現を導くことを見出した。すなわち、構造の異なるアミノ基を一

つのカチオン性ユニットに導入することによって、DNAとのコンプレックス形成とエンドソーム内pH低下を防ぐバッファー効果を両立させる「機能の分担」型の分子設計が合目的性を有することが明らかとなった。一方、光エネルギーを活用する系に関しては、昨年度末にデンドリマー型光増感剤を内包するナノ構造デバイスをDNA内包デバイスと共存させることによって2桁もの遺伝子発現効率の上昇を達成可能であることを見出したが、本年度は、光照射時間などの実験条件の詳細な検討とともに、光増感作用を有するユニットを従来までのポルフィリンに変えて、より長波長での励起が可能なフタロシアニン・デンドリマー型光増感剤の合成経路を確立し、これを用いることによって、臨床展開が可能な650nm励起に基づくphotochemical transfectionプロセスの構築に成功した。

3) 機能性核酸搭載のためのナノ構造デバイスの構築と機能検証

機能性オリゴ核酸搭載用に開発を行っているブロック共重合体／リン酸カルシウム系の無機－有機ハイブリッド型ナノ構造デバイスについては特に、新しい核酸医薬として最近、急速に関心が高まっているsiRNAを中心に検討を行い、培養細胞系において顕著なRNA干渉作用を引き起こす系の確立に成功した。とりわけ、ブロック共重合体のポリアニオンセグメントとして、ポリメタクリル酸を用いることによって、エンドソームから細胞質へのスムーズな移行を実現し、結果的に効率的な遺伝子サイレンシングを達成した。これは、細胞内エンドソームに対応するpH5付近でポリメタクリル酸が非解離型となることによって、エンドソーム膜との相互作用を介して膜の脆弱化を引き起こし、デバイスの細胞質移行を促進したためと考えられる。一方、ポリイオンコンプレックス型のナノ構造デバイスについても、内包物質として遺伝子DNAからsiRNAへの展開を図り、内包条件を確立した。各種培養細胞系を用いた遺伝子サイレンシング効果の検定にも着手しており、既に、幾つかのブロック共重合体系について顕著な遺伝子サイレンシング効果を確認している。例えば、上記2)で開発したpKaの異なるアミノ基を側鎖に有するブロック共重合体を用いたデバイスにsiRNAを内包することによって、ルシフェラーゼ遺伝子のノックダウンというモデル系のみならず、細胞内に豊富に存在する蛋白質であるLamin産生に関わる内在性遺伝子ノックダウンにも成功した。このことは内在性の疾患関連遺伝子をターゲットとする実際の治療用siRNA系への展開を考える上で特筆すべき進展といえる。また、ジスルフィド架橋系についてもsiRNAへの応用が可能であることも明らかとなった。これらのナノ構造デバイス系の特徴は、血清存在下においても何ら影響を受けずにRNA干渉作用を示すことであり、in vivoにおける優れた機能が強く期待される。一方、プラスミドDNA (pDNA) 内包系における構造－機能相関を明らかとする研究の一環として、ナノ構造デバイス内におけるpDNA凝縮構造解明をS1 nucleaseによるDNA鎖切断を指標として行っているが、本年度は、S1 nucleaseによる規則的DNAフラグメント化がpDNA中に存在するパリンδροーム配列部分で選択的に引き起こされること、さらには、この様なパリンδροーム配列があらかじめpDNA中に規則的に用意されており、その部分でpDNAが折れ畳まれていることを示唆するデータを詳細な原子間力顕微

鏡観察より得ることに成功した。

4) 表層にリガンド分子を結合した高分子ミセル型ナノ構造デバイスの構築

上記の様に遺伝子DNAならびにオリゴ核酸を効率良く搭載し、かつ高い生理機能を発現可能なナノ構造デバイスの構造設計が確立しつつあるので、これと平行して、本格的にデバイス表層へのリガンド分子装着のための分子設計に着手した。まず、 α -末端に各種のパイロット分子を結合可能なブロック共重合体の新規合成ルートの確立を行った。ブロック共重合体の合成は数種類の化学反応による修飾を段階毎に重ねていかなければならず、この制約によりリガンドを担持したブロック共重合体の合成は一般には困難を伴うものであったが、本年度は既に確立していた合成経路を抜本的に見直し、各々の反応操作が互いに干渉しない新しい経路を探索することにより、リガンド分子が導入されたブロック共重合体を調製することに成功した。具体的には、ベンジルアセタール基とアミノ基を反応性官能基として有するヘテロ二官能性PEGを合成し、このアミノ基末端をポリカチオン連鎖の重合開始点としてブロック共重合体が調製され得る。その後、ベンジルアセタール基を酸性条件下でリガンドとの結合が可能な官能基であるアルデヒド基に置換し、リガンド分子であるラクトースを導入した。その後は、アルカリ条件下でポリカチオン連鎖の脱保護を行い、リガンド導入型ブロック共重合体を調製した。この手法は異なる構造のブロック共重合体ならびに様々なリガンド分子の結合への展開が可能であるため、今後、標的指向性のナノ構造デバイスを構築して行く上で重要な基盤技術となることが期待される。

5) ナノ構造デバイスのin vivo機能評価とそのための体制構築

本年度は、当初の計画を前倒しする形でナノ構造デバイスのin vivo機能評価に着手した。その結果、培養細胞系において良好な遺伝子発現を示した細胞内還元環境応答型ナノ構造デバイスに関して、マウスの尾静脈投与によって、肝臓実質細胞に様にレポーター遺伝子を発現させ得ることに成功した。また、血管壁への遺伝子導入においては、内皮細胞への遺伝子導入が可能であることを実証した。さらに、in vivoとin vitroでの機能相関を定量的に評価する目的で、アレイ状に構築した初代肝実質細胞スフェロイドへの遺伝子導入を試み、時間依存的に遺伝子導入が可能であることを見出した。これは、非分裂期にある細胞への遺伝子導入がナノ構造デバイスを用いて行えるという点でも特筆に値するものであり、デバイスの細胞内核移行についても新しい知見を与えることが期待される。また、複数の臨床研究機関との間での共同研究体制の構築を昨年度に引き続いて行っており、特に東京大学医学部とは「東大医工連携部」、「東大Tissue Engineerig部」、「東大疾患生命工学センター」の全面的協力体制を構築して、デバイスのin vivo機能評価に備えている。

原島グループ

1) 多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス (multifunctional envelope-type nano device:MEND) の構築と機能評価：前年度報告したデタージェントダイアリシス法 (DD

法)に加え、新たに脂質膜水和法を用いてDNA/ポリカチオン複合体(DPC)を脂質膜でコートすることにより多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)の構築に成功した。さらに、核への高効率遺伝子送達ツールであるステアリル化オクタアルギニン(STR-R8)を機能性素子として用い、MENDの表面を修飾することによってMEND(STR-R8)を構築した。プラスミドDNAの遺伝子発現活性は、DPC化することによって約100倍上昇し、DPCを脂質膜でコートしたMENDは10倍高い活性を示した。さらに、MENDをSTR-R8修飾することにより、MENDの遺伝子発現活性を100倍向上させることに成功した。MEND(STR-R8)の遺伝子発現活性を、最強のウイルスベクターであるアデノウイルスと比較したところ、驚くべきことに同等であった。さらに、アデノウイルスでは細胞に対する強い毒性が観察されたが、MEND(STR-R8)は毒性を示さなかった。次年度は、特異的標的リガンドなど種々の機能性素子を付与することによるMENDの機能性向上と、*in vivo*を想定した*in vitro*、さらには*in vivo*におけるMENDの遺伝子発現能力の評価を行う。

2) 遺伝子の細胞内動態の定量的評価方法の確立：平成14年度において我々は、(i)エンドソーム・ライソゾーム系、(ii)細胞質、(iii)核の3種のコンパートメントを蛍光標識後、ローダミンラベル化DNAの細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡により明らかとし、その遺伝子のクラスター面積を遺伝子量の指標とする事により、細胞内動態の定量的評価を行う技術基盤を構築した。平成15年度は、本実験系の定量性と信頼性の向上を目指した検討を行った。LipofectAMINE PLUSとRhodaminラベルプラスミドの複合体を作製する際に非標識のものも混ぜ、ディッシュに固定して観察を行うと、希釈倍率の上昇とともに、平均クラスター面積の減少が認められた事から、面積が遺伝子量を反映する事を実証した。また、解析可能な細胞数に限りがある事から、いくつの細胞を解析すれば、母集団全体の傾向を反映しうるのかについて検討を行った結果、変動計数は30個の細胞以上で、すべてのパラメーターについて一定値を示す事が明らかとなり、30個で十分全体の母集団を反映しうる事を証明した。我々の方法は平均化された値を議論する従来のPCR法と異なり、個々の細胞内動態を定量的に評価する事を可能とし、今後遺伝子発現のheterogeneityの原因を明らかとするとともに、非ウイルスベクターとアデノウイルス間の細胞内動態の相違を解明することを目標とする。

3) 核内動態制御に関する検討：核内における遺伝子転写量と遺伝子量の関係は必ずしもparallelでは無いことを*in vivo*で見出した。また、培養細胞の核内において1コピーのルシフェラーゼ遺伝子から、少なくとも1000分子のルシフェラーゼ蛋白質が産生されていることを明らかにした。次年度は、*in vivo*において核内動態の挙動を観察し、転写回数や発現量低下の原因を検討する。発現量低下の一因はDNAの分解・排出が想定される。この問題を克服するために核内に安定に保持されるための配列を探索する。また、センス一本鎖をSmall Fragment Homologous Replacement (SFHR)法において用いることにより、修復効率が約10倍に上昇した。次年度は新規修復用DNA断片によるフレームシフト変異の修復の検討、修復効率の向上のために、鎖長や末端の保護に関する検討を行う。

長崎グループ

ナノ構造デバイスの構築にとって不可欠なマルチ機能性高分子の分子設計を本グループでは展開している。特に、自己組織化に際して、異なる機能を空間的に制御された形で構造体内部にポジショニングし、かつ時間依存的に制御された形での構造変化を実現していくために、高分子間の相互作用と相分離性を最大限に引き出す分子設計として、ブロック共重合体に着目した。センシング→プロセッシング→エフェクター活性という一連の動作を的確に行うインテリジェント・ナノ構造デバイスの創製においては、デバイスを構築する素材に生体適合能や環境応答能を創り込む事が極めて重要である。すなわち、各連鎖の末端ならびに連鎖間の連結部位にリガンド結合機能や環境応答性結合を導入したマルチ機能性高分子を創製し、佐々木グループの創製する機能性核酸とのハイブリッド化および半導体微粒子（量子ドット）などのプローブの遺伝子への連結を検討し、生体環境下で高い能力を示すナノ構造デバイスの創製を目指し検討も行ってきた。その結果、標的指向型遺伝子ナノ構造デバイス（ラクトース-PEG/アンチセンスDNAコンジュゲートとポリカチオンからなるPICミセル）の *in vitro* での高いアンチセンス効果を達成した。また、プラスミドDNAの配列特異的ラベル化可能なPEG化量子ドットの水中への分散安定化を達成した。今後は、佐々木らの創製するPEG-機能性核酸（エフェクター機能を有する核酸）コンジュゲートの機能評価および、PEG化量子ドットを用いた細胞内動態の新規定量法の確立を原島らとの共同研究により目指す。

佐々木グループ

佐々木グループでは、高分子ミセル型ナノ構造デバイスに搭載する機能性核酸の設計と機能発現の検討を行っている。平成15年度は、クロスリンク核酸のアンチセンス効果の評価および特異的かつ効率的な塩基変換を達成するための機能性核酸の分子設計を行い、その機能評価を行った。具体的には次の3項目を検討した。

1) クロスリンク核酸の非細胞系アンチセンス効果の確認

クロスリンク核酸のアンチセンス機能を、非細胞系ルシフェラーゼ遺伝子発現系を用いて評価した。ルシフェラーゼ遺伝子発現は、生産される蛋白質を蛍光標識することによって定量できる市販のキットを用いて行い、アンチセンス核酸により生産される蛋白質質量の変化を測定した。まず、コントロールおよびスクランブル配列ではアンチセンス効果がまったく観測できない条件で、天然型アンチセンスで有効なアンチセンス阻害活性効果が得られる条件を確立した。この条件で機能性核酸のアンチセンス阻害活性を調べたところ、天然アンチセンスが蛋白質質量を17%に阻害する条件下（10 μ M）、1.7%にまで阻害し、ほぼ完全な阻害活性を示すことが確認された。また、この機能性核酸は、化学的評価では、クロスリンクには2段階の *in situ* 活性化を必要とするものであることから、生理的条件下でも機能性核酸の活性化メカニズムが作用しているものと考えられる。次年度以降は、長崎らとの共同研究により、さらに阻害効果の高い機能性核酸を開発する。

2) クロスリンク核酸-PEGコンジュゲート体の合成と細胞内アンチセンス効果の評価

機能性核酸の合成には酸化およびアルカリ性中脱離反応が必要であったため、PEGとのコンジュゲート体の合成が困難であった。そこで平成15年度は、スルフィド基をもつ機能性核酸とPEGとのコンジュゲート体の合成を検討した。その結果、まず3'末端にアミノ基をふくむ機能性核酸を合成し、酸化、脱離、および反応基の付加を行い、反応基の部分をもつ構造（フェニルスルフィドなど）に変換した。引き続きアミノ基に活性化チオールグリコール酸誘導体を反応させ、機能性核酸3'末端にチオール基を導入した。このものを末端にアクリル酸エステルを含むPEGと反応させ、高収率で機能性核酸-PEGコンジュゲートを合成することができた。この機能性核酸-PEGコンジュゲートのアンチセンス効果を長崎グループとの連携のもと、ルシフェラーゼ (Firefly/Renillaルシフェラーゼ) 発現細胞を用いて調べた。その結果 (i) 機能性および天然型アンチセンス核酸-PEGコンジュゲート単独では、有効なアンチセンス効果は得られなかった。(ii) アンチセンス核酸-PEGコンジュゲートとポリリジンとのポリイオンコンプレックス (PIC) ミセル型デバイスでは、機能性および天然型アンチセンス核酸とも有効な細胞内アンチセンス効果を示した。(iii) PIC化した天然型アンチセンスが28%の阻害効果を示す条件下 (5 μ M)、PIC化した機能性核酸は45%阻害効果を示し、天然型に比した機能性核酸の有効性が確認された。次年度以降は、長崎らとの共同研究により、細胞内移行性の向上と機能性核酸の反応性向上によりさらに高いアンチセンス阻害効果を実現する。

3) 塩基変換機能をもつ機能性核酸の開発

人工機能性核酸のオリジナルな機能として、配列および塩基特異的に塩基構造を変換できる機能の開発を試みた。化学的に塩基分子認識構造を変化させるため、一酸化窒素 (NO) 転移反応を設計した。平成14年度までにS-ニトロシル化チオグアノシンを含むODNを合成し、これを用いてシトシンに対するNOの転移反応を実現した。平成15年度にはさらに配列選択性を調べ、相補的な位置にあるシトシンだけに特異的にNO転移反応が起こることを確認した。さらにNO転移ODNを酸処理し、酵素加水分解したところウリジンおよびシトシンジアゾエートが生成していることが確認された。とくに、5-メチルシトシンに対するNO転移では、50%以上の高収率でチミンおよびジアゾエート体が生成していることが確認され、配列および塩基特異的に塩基構造を変化させることに世界で始めて成功した (国際特許申請中)。

3. 研究実施体制

(1) 片岡グループ (リーダー: 片岡一則)

①研究者名: 片岡一則 (東京大学大学院工学系研究科・教授)

②研究項目: 「高分子ミセル型ナノ構造デバイスの創製と研究の統括」

- 1) 細胞内還元環境応答型ナノ構造デバイスの構造最適化と機能検証
- 2) 細胞内移行促進機能を有するナノ構造デバイスの構築と機能評価
- 3) 機能性核酸搭載のためのナノ構造デバイスの構築と機能検証

- 4) 表層にリガンド分子を結合した高分子ミセル型ナノ構造デバイスの構築
- 5) ナノ構造デバイスのin vivo機能評価とそのための体制構築

(2) 原島グループ (リーダー: 原島秀吉)

- ①研究者名: 原島秀吉 (北海道大学大学院薬学研究科・教授)
- ②研究項目: 「エンベロープ型ナノ構造デバイスの創製」
 - 1) 多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス (multifunctional envelope-type nano device:MEND) の構築と機能評価
 - 2) 遺伝子の細胞内動態の定量的評価方法の確立
 - 3) 核内動態制御に関する検討

(3) 長崎グループ (リーダー: 長崎幸夫)

- ①研究者名: 長崎幸夫 (東京理科大学基礎工学部・教授)
- ②研究項目: 「ナノ構造デバイス構築のための高分子精密設計」
 - 1) 機能性核酸搭載のための標的指向性ナノ構造デバイスの構築と機能評価
 - 2) PEG化量子ドットを用いた細胞内動態の新規定量法の確立

(4) 佐々木グループ (リーダー: 佐々木茂貴)

- ①研究者名: 佐々木茂貴 (九州大学大学院薬学研究院・教授)
- ②研究項目: 「機能性核酸の設計と機能発現評価」
 - 1) クロスリンク核酸の非細胞系アンチセンス効果の確認
 - 2) クロスリンク核酸-PEGコンジュゲート体の合成と細胞内アンチセンス効果の評価
 - 3) 塩基変換機能をもつ機能性核酸の開発

4. 主な研究成果の発表 (論文発表および特許出願)

(1) 論文発表

- H. Katakura, A. Harada, K. Kataoka, M. Furusho, F. Tanaka, H. Wada, K. Ikenaka; Improvement of retroviral vectors by coating with poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer (PEG-PLL); J. Gene Medicine 6(4), 471-477 (2004).
- D. Wakebayashi, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Kanayama, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka; Lactose-installed polyion complex micelles incorporating plasmid DNA as a targetable gene vector system: Their preparation and gene transfecting efficiency against cultured HepG2 cells; J. Controlled Release 95(3), 653-664 (2004).
- Y. Akiyama, Y. Nagasaki, K. Kataoka; Synthesis of heterotelechelic

poly(ethylene glycol) derivatives having α -benzaldehyde and ω -pyridyl disulfide groups by ring opening polymerization of ethylene oxide using 4-(diethoxymethyl)benzyl alkoxide as a novel initiator; *Bioconjugate Chemistry* 15(2), 424-427 (2004).

- M. Jaturanpinyo, A. Harada, X. Yuan, K. Kataoka; Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde; *Bioconjugate Chemistry* 15(2), 344-348 (2004).
- K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, A. Harada, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka; Block Cationic Polyplexes with Regulated Densities of Charge and Disulfide Cross-Linking Directed To Enhance Gene Expression; *J. Amer. Chem. Soc.*, 126(8), 2355-2361 (2004).
- M. Tabuchi, M. Ueda, N. Kaji, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Yshikawa, K. Kataoka, Y. Baba; Nanospheres for DNA separation chips; *Nature Biotechnology* 22(3), 337-340 (2004).
- R. Ideta, Y. Yanagi, Y. Tamaki, F. Tasaka, A. Harada, K. Kataoka, Effective accumulation of polyion complex micelle to experimental choroidal neovascularization in rats; *FEBS Letters* 557(1-3), 21-25 (2004).
- K. Itaka, A. Harada, Y. Yamasaki, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka; In situ single cell observation by fluorescence resonance energy transfer reveals fast intra-cytoplasmic delivery and easy release of plasmid DNA complexed with linear polyethylenimine; *J. Gene Medicine* 6(1), 76-84 (2004).
- C. Diab, Y. Akiyama, K. Kataoka, F. M. Winnik; Microcalorimetric Study of the Temperature-Induced Phase Separation in Aqueous Solutions of Poly(2-isopropyl-2-oxazolines); *Macromolecules* 37(7), 2556-2562 (2004).
- A. Harada, K. Kataoka; Switching by pulse electric field of the elevated enzymatic reaction in the core of polyion complex micelles; *J. Amer. Chem. Soc.*, 125(50), 15306-15307 (2003).
- N. Nishiyama, S. Okazaki, H. Cabral, M. Miyamoto, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Nishio, Y. Matsumura, K. Kataoka; Novel Cisplatin-Incorporated Polymeric Micelles Can Eradicate Solid Tumors in Mice; *Cancer Research* 63(24), 8977-8983 (2003).
- T. Matsuya, S. Tashiro, N. Hoshino, N. Shibata, Y. Nagasaki, K. Kataoka; A core-shell-type fluorescent nanosphere possessing reactive poly(ethylene glycol) tethered chains on the surface for zeptomole detection of protein in time-resolved fluorometric immunoassay; *Analytical Chemistry* 75(22), 6124-6132 (2003).

- K. Itaka, K. Yamauchi, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka; Polyion complex micelles from plasmid DNA and poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) block copolymer as serum-tolerable polyplex system: Physicochemical properties of micelles relevant to gene transfection efficiency; *Biomaterials* 24(24), 4495-4506 (2003).
- Y. S. Bae, S. Fukushima, A. Harada, K. Kataoka; Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: Polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change; *Angew. Chem., Int. Ed.*, 42(38), 4640-4643 (2003).
- Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka, K. Yoshikawa; PEG-PLL block copolymers induce reversible large discrete coil-globule transition in a single DNA molecule through cooperative complex formation; *Macromolecules* 36(16), 6276-6279 (2003).
- A. Harada, K. Kataoka; Effect of charged segment length on physicochemical properties of core-shell type polyion complex micelles from block ionomers; *Macromolecules* 36(13), 4995-5001 (2003).
- T. Uwatoku, H. Shimokawa, K. Abe, Y. Matsumoto, T. Hattori, K. Oi, T. Matsuda, K. Kataoka, A. Takeshita; Application of nanoparticle technology for the prevention of restenosis after balloon injury in rats; *Circulation Research (UltraRapid Communication)*, 92(7), e62-e69 (2003).
- H. Akita, R. Ito, I. A. Khalil, S. Futaki, H. Harashima; Quantitative three-dimensional analysis of the intracellular trafficking of plasmid DNA transfected by non-viral gene delivery system using confocal laser scanning microscopy; *Mol. Ther.* 9, 443-51 (2004).
- I. A. Khalil, S. Futaki, M. Niwa, Y. Baba, N. Kaji, H. Kamiya, H. Harashima; Mechanism of improved gene transfer by the N-terminal stearylation of octaarginine: Enhanced cellular association by hydrophobic core formation; *Gene Therapy* 11, 636-644 (2004).
- M. Tanimoto, H. Kamiya, N. Minakawa, A. Matsuda, H. Harashima; No enhancement of nuclear entry by direct conjugation of a nuclear localization signal peptide to linearized DNA; *Bioconjugate Chem.*, 14, 1197-1202 (2003).
- I. Umezu, R. Koizumi, A. Sugimoto, M. Inada, T. Makino, A. Sugimura, Y. Sunaga, T. Ishii, Y. Nagasaki; Recombination process of CdS quantum dot covered by novel polymer chains; *Physica E* 21(2-4), 1102-1105 (2004).
- T. Ishii, H. Otsuka, K. Kataoka, Y. Nagasaki; Preparation of Functionally PEGylated Gold Nanoparticles with Narrow Distribution through Autoreduction

of Auric Cation by γ -Biotinyl-PEG-block-[poly(2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate)]; *Langmuir* 20(3), 561-564 (2004).

- M. Oishi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka; pH-Responsive Oligodeoxynucleotide (ODN)-Poly(Ethylene Glycol) Conjugate through Acid-Labile β -Thiopropionate Linkage: Preparation and Polyion Complex Micelle Formation; *Biomacromolecules* 4(5), 1426-1432 (2003).
- 中村 亨, 濱道佳子, 上原啓嗣, 石井武彦, 林寿人, 長崎幸夫, 片岡一則; ポリエチレングリコール化ポリアミングラフトおよびブロックポリマーの合成と抗コレステロール作用; *高分子論文集* 60(5), 238-240 (2003).
- I. Umezu, R. Koizumi, K. Mandai, T. Aoki-Matsumoto, K. Mizuno, M. Inada, A. Sugimura, Y. Sunaga, T. Ishii, Y. Nagasaki; Optical properties of CdS nanocrystal covered by polymer chains on the surface; *Microelectr. Engin.*, 66(1-4), 53-58 (2003).
- H. Otsuka, Y. Nagasaki, K. Kataoka; PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications; *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 55(3), 403-419 (2003).
- F. Nagatsugi, S. Sasaki; Chemical tools for targeted mutagenesis of DNA based on triple helix formation; *Biol. Pharm. Bull.*, 27(4), 463-467 (2004).
- S. Sasaki, F. Kurosaki, T. Haradahira, F. Yamamoto, J. Maeda, T. Okauchi, K. Suzuki, T. Suhara, M. Maeda; Synthesis of C-11-labelled bis(phenylalkyl)amines and their in vitro and in vivo binding properties in rodent and monkey brains; *Biol. Pharm. Bull.*, 27(4), 531-537 (2004).
- S. Sasaki, Y. Taniguchi, R. Takahashi, Y. Senko, K. Kodama, F. Nagatsugi, M. Maeda; Selective formation of stable triplexes including a TA or a CG interrupting site with new bicyclic nucleoside analogues (WNA); *J. Am. Chem. Soc.*, 126(2), 516-528 (2004).
- M. Tanada, Y. Shibata, M. Maeda, S. Sasaki; Bipyrrrole derivatives as new DNA-minor groove binders; *Heterocycles* 63(1), 29-+ (2004).
- T. Fuchigami, T. Haradahira, T. Arai, T. Okauchi, J. Maeda, K. Suzuki, F. Yamamoto, T. Suhara, S. Sasaki, M. Maeda; Synthesis and brain regional distribution of [C-11]NPS 1506 in mice and rat: an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist; *Biol. Pharm. Bull.*, 26(11), 1570-1573 (2003).
- F. Yamamoto, E. Kuwano, T. Kaneshiro, S. Sasaki, M. Maeda; I-125-labeled 2-O- and 3-O-m-iodobenzyl, and 6-O-m-iodophenyl derivatives of L-ascorbic acid: synthesis and preliminary tissue distribution; *J Labeled Compd. Radiopharm.*, 46(8), 737-750 (2003).
- F. Nagatsugi, S. Sasaki, P. S. Miller, M. M. Seidman; Site-specific

mutagenesis by triple helix-forming oligonucleotides containing a reactive nucleoside analog, *Nucleic Acid Res.* 31(6), e31 (2003).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：9件（CREST研究期間累積件数：11件）