

「ナノ科学を基盤とした革新的製造技術の創成」
平成18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・医学系研究科・教授

遺伝子治療実用化のための超分子ナノデバイス製造技術の創成

§ 1. 研究実施の概要

本研究では、遺伝子・核酸医薬の実用化を目指して、高度なベクター機能の創り込みを行った超分子ナノデバイスを構築する。具体的には、生体内の異物認識機構を巧みに回避するステルス機能、体内を移動して組織に浸透する組織浸透機能、標的細胞を認識してその表面に結合する標的認識機能、さらには、細胞内においてエンドソームから細胞質に移行するエンドソーム脱出機能、細胞質中を移動して核などのオルガネラに到達するオルガネラ・ターゲティング機能、細胞内で位置・時間特異的に効率的な遺伝子発現や薬理効果を発現させるエフェクター機能を搭載した超分子ナノデバイスを創製し、核酸化合物の全身さらには細胞レベルでの空間的ターゲティングを実現する。このように、繊細で高度な機能を有し、かつ、時間的・空間的に制約の多い環境である人間の体に優しく作用し、検出(センサー機能)→診断(プロセッサー機能)→治療(エフェクター機能)を一体として成し遂げる超分子ナノデバイスの創製とその高信頼性・高効率製造技術確立によって、安全で効果に優れた遺伝子・核酸医薬治療の実用化が可能となる。

遺伝子・核酸医薬を搭載した超分子ナノデバイスとしては、マルチ機能を創り込んだブロック共重合体の自己組織化により形成される高分子ミセル型と脂質二分子膜を主体とするエンベロープ型の二つのナノデバイスに関して、基盤技術構築グループと実用的製造技術開発グループが連携し、超分子ナノデバイスの創製とその高効率・高再現性製造技術の構築を行う一方で、臨床展開研究グループとの連携により医療分野での本格的実用化を目指した効率的なトランスレーショナル研究を遂行する体制を構築している。初年度にあたる平成 18 年度は、各研究機関の独自の研究項目を推進すると共に、基盤技術構築グループと臨床展開研究グループとの間で、基盤技術構築グループが提供する超分子ナノデバイスに搭載可能な機能と、臨床展開研究グループが標的とする対象疾患や投与法からの要請を検討し、対象疾患毎のナノデバイス機能の最適化の方向性を見出した。このような連携を重視した検討により、基盤技術構築グループでは超分子ナノデバイスを構成するエレメント設計へのフィードバックを得ることができ、臨床展開研究グループでは疾患モデル

動物の構築や超分子ナノデバイス投与方法などを規定するなどの進捗を得た。平成 19 年度には、in vivo で治療効果を発現するために超分子ナノデバイスに担持させることが有効と考えられる様々な機能として、標的指向性を高めるリガンドやナノデバイス安定性向上に寄与する架橋導入、エンドソーム脱出や核移行性を促進するデバイス設計などの検討を行った。同時に初年度に確立した疾患モデル動物を用いて、超分子ナノデバイスの機能を評価する in vivo 評価系も確立した。平成 20 年度には、これらの超分子ナノデバイスの基本設計を確立させ、平成 21 年度には、より高い効果(遺伝子発現)をもたらす詳細な構造最適化に取り組むと共に、一部の技術を実用的製造技術開発グループへと移転した。平成 22 年度は、各標的疾患に対し、治療用遺伝子(核酸医薬)までを含めたナノデバイス最適化作業の徹底化を進め、それらの成果を実用的製造技術開発グループへ本格的に技術移転することを計画している。最終年度となる平成 23 年度には臨床試験における使用法を念頭においた非臨床評価用動物実験モデルによる治療実験を行い、研究終了時において前臨床開発に進む基盤を整備できるよう研究を進捗させる方針である。

§ 2. 研究実施体制

A 片岡・鄭グループ

- ① 研究分担グループ長:片岡 一則(東京大学、教授)
- ② 研究項目 高分子ミセル型超分子ナノデバイスの開発とその革新的製造技術の確立

(B-1)原島グループ

- ① 研究分担グループ長:原島 秀吉(北海道大学、教授)
- ② 研究項目
多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)の開発と高機能高信頼性製造技術の開発

(B-2)小暮グループ

- ① 研究分担グループ長:小暮 健太郎(京都薬科大学、教授)
- ② 研究項目
多機能性エンベロープ型超分子ナノデバイス(MEND)の開発とその革新的製造技術の確立

(C)長崎グループ

- ① 研究分担グループ長:長崎 幸夫(筑波大学、教授)
- ② 研究項目
マルチ機能性高分子の精密合成と革新的製造技術の確立

(D-1)佐々木グループ

- ① 研究分担グループ長:佐々木 茂貴(九州大学、教授)
- ② 研究項目
インテリジェント機能性核酸の開発とナノ医療デバイスへの展開

(D-2) 永次グループ

① 研究分担グループ長:永次 史(東北大学、教授)

② 研究項目

インテリジェント機能性核酸の開発とナノ医療デバイスへの展開

(E) 松村グループ

① 研究分担グループ長:松村 保広(国立がんセンター東病院、部長)

② 研究項目

超分子ナノデバイスを利用した難治がんの標的治療法の確立

(F) 斯波グループ

① 研究分担グループ長:斯波 真理子(国立循環器病センター、室長)

② 研究項目

超分子ナノデバイスを利用した循環器疾患の低侵襲的治療法の確立

(G) 岡本グループ

① 研究分担グループ長:岡本 浩一(名城大学大学、教授)

② 研究項目

吸入用超分子ナノデバイスドライパウダーの開発

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

A 片岡・鄭グループ

1) 分子ターゲティングのための生体適合型高分子ミセル型ナノデバイスの創製

高分子ミセル型ナノデバイスの体内動態を精密に制御するには、ステルス機能による血中滞留性向上が不可欠であり、この実現にはデバイス表面を親水性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)で効果的に被覆し、デバイス内核と血漿タンパク質との相互作用を抑制することが有効と考えられる。これまでに高分子ミセル型ナノデバイス表層のPEG密度向上を図る手段として、分岐状PEG(PEGasus)のブロック共重合体の利用を検討してきた。PEGasus ブロック共重合体を用いて形成される高分子ミセル型ナノデバイスは、平成20年度までにPEG密度向上効果によりプラスミドDNA(pDNA)の凝縮形態を制御できる可能性が見出されたが、一方でミセル型ナノデバイスとしての血中安定性が不十分であることが危惧されたことから、平成21年度は分岐状PEGとポリカチオンのリンカー部位に後述する疎水性アルキル鎖を有するブロック共重合体の合成法確立に取り組んだ。分岐したPEG鎖をつなぎ止める部位に存在する水酸基末端は、2本のPEG鎖の立体障害効果のため定量的な末端変換が困難であったが、詳細な反応条件の検討により定量的にアルキル鎖を導入することに成功し、続く末端アミノ化およびそこからNCA化合物の重合が進行することを確認した。またPEG密度向上は、血中滞留性の改善へ寄与すると期待できるが、一方で、非特異的な細胞取り込み量の低下を招くことも予測されるため、分岐状PEG型ナノデバイス表層へのリガンド導入も視野に入れ、分岐状PEGの両末端官能基化に関して日油株式会社において検

討を開始した。今後、ミセル型デバイスの表層へ導入するリガンド分子の構造と関連して具体的な導入官能基の絞り込みを行う予定である。

PEG-ポリカチオンと pDNA からなる高分子ミセル型ナノデバイスの形成駆動力は静電相互作用であるが、高イオン強度とせん断応力のかかる血流中での安定性は必ずしも十分とは言えず、実際に既に臨床開発に至っている制がん剤内包高分子ミセルに比べると、未だ血流中からの消失が速いという問題点を有している。平成 20 年度までに PEG-ポリカチオンブロック共重合体において、PEG とポリカチオンのリンカー部位に疎水性アルキル鎖を導入することにより、疎水性アルキル鎖の疎水性凝集力によるものと考えられる高分子ミセル型ナノデバイスの顕著な血中滞留性向上、および in vitro 系では血清存在下での遺伝子導入効率の向上が認められたが、同時に細胞毒性や膜傷害活性も上昇するという問題点も確認されたことから、平成 21 年度には毒性や細胞膜への傷害活性の低減を目的としたブロック共重合体合成手法の検討を行った。合成行程においてアルキルリンカーを導入した PEG 末端ニトリル基を還元することにより NCA 化合物の重合が可能となるアミノ基に変換することができる。しかしながらこれまで行ってきた水素化リチウムによる還元反応では、PEG のエーテル酸素や末端アミノ基に配位したアルミニウムなどの不純物がブロック共重合体の合成を困難にし、かつ細胞毒性にも影響することが明らかになった。そこで末端アミノ化 PEG を商用化している日油株式会社にニトリル基還元を委託したところ、これまで困難を伴った NCA 化合物の重合が容易に制御出来るようになり、ブロック共重合体の安定的な製造方法が確立しただけでなく、そこから得られた PEG-アルキル-ポリカチオンブロック共重合体は、以前のものに比べて大幅に細胞毒性が低下し安全性を向上させることができた。

ナノデバイスの血中滞留性向上のための他の方法論として、内核に SS 架橋を施した高分子ミセル型ナノデバイスに分子量 5000 の PEG-NHS を反応させ、表面 PEG 密度を増大させた。その結果、従来型のナノデバイスと比較して 16 倍の血中滞留性を示す一方で、PEG の導入による遺伝子発現の低下は示さないことを確認した。また、同様の手法を用いて環状 RGD 搭載 SS 架橋ミセルへの PEG 重層化を試みたナノデバイスにおいても血中滞留性の改善が確認された。

2) 治療効果の空間的フォーカシングのための高分子ミセル型ナノデバイス創製

これまでにパッケージング形態と PEG-ポリ(L-リシン) (PEG-PLys) の PLys 鎖長及び pDNA との電荷比について検討し、これらパラメータにより、球状の凝縮型ナノデバイスまたはロッド型ナノデバイスを造り分けられることを明らかにしてきた。特にロッド型ナノデバイスにおいては、pDNA の規則化された折り畳みにより、ロッドの長さが pDNA 長の $1/2$, $1/3$, $1/4$ …と量子化されることを見出している。平成 21 年度はロッド構造と DNA 二重鎖解離との相関を検討するとともに、pDNA の折り畳み機序を検討した。pDNA の折り畳みの量子化について、棒状構造(分子内において一軸方向に環を閉じることで形成される棒状構造)を折り畳みの初期構造とし、棒状構造デバイスへの圧縮変形モードとしてオイラーの座屈を適用することで折り畳みの量子化を説明できることを示した。パッケージングと遺伝子発現に関しては、平成 20 年度までの検討により、ロッド状に凝縮した高分子ミセル型ナノデバイスは無細胞転写・翻訳システム(cell-free システム)のみならず、マイクロインジェク

ションによる細胞質への直接投与においても、凝縮型構造のナノデバイスやpDNA単体より遺伝子発現効率が著しく高く、この特性は骨格筋を標的とし、近位駆血下、大伏静脈経路で投与した場合にも再現されることを確認した。平成21年度は本投与法を有効化する対象疾患を選定し、治療用遺伝子をロッド状デバイスに搭載し、実際の治療効果を導くことを検討した。具体的な疾患治療への応用として、膵がんBxPC3細胞の皮下移植マウスモデルに対し、可溶性VEGF受容体(sFlt-1)を発現するpDNAの骨格筋への異所性発現による治療を試みた。計2度のナノデバイスによる遺伝子投与により、1ヶ月に渡る血管新生阻害によるがんの増殖抑制効果を確認した^(A-19)。平成22年度は遺伝子の持続発現を必要とする慢性疾患、組織再生など、本投与法を最大限に有効化する対象疾患を選定し、治療用遺伝子をロッド型デバイスに搭載し、実際の治療効果を導くことを予定している。一方、ロッド型デバイスはコンプレックスに関与するPEG本数が多くなるため、血中タンパクとの非特異吸着が抑制され、長期血中滞留性が期待される。一方でロッド型ナノデバイスはPLys鎖長が短く、比較的低い電荷比で得られるため、in vivoへの展開を考える際、デバイスの構造安定性は十分とは言えない。この問題に対し、これまでにSH基を導入したPEG-PLysブロック共重合体をプラットフォームとしたSS架橋高分子ミセル型ナノデバイスを調製し、パッケイジング形態、及び血中滞留性を検討してきた。平成21年度は、架橋導入法、架橋導入率ならびにPLys鎖長依存性を、パッケイジング形態、血中滞留性に加え、物理的安定性評価、in vitro遺伝子発現効率を検討し、SS架橋ナノデバイスの最適化を進めた。架橋導入ロッド型ナノデバイスは架橋導入凝縮型SS架橋ナノデバイスよりもin vitroにおいて高い遺伝子発現を得ることが確認された。また、血中滞留性においてもロッド型ナノデバイスがより長期間血中滞留する傾向を認めた。これはおそらく、ロッド型ナノデバイスを構成するPEGの本数が凝縮型ナノデバイスに比べて多いことによるためと推察される。さらに、実際の治療遺伝子として可溶性VEGF受容体-1(sFlt-1)発現pDNAを搭載したSS架橋ロッド型ナノデバイスを調製し、ヒト膵がん皮下移植モデルに対する血管新生阻害治療を行ったところ、優れた制がん活性を示すことが明らかになった。

表面に環状RGDペプチドを搭載したSS架橋ミセルについては、BxPC3を皮下に移植したマウスを用いた動物実験において未修飾のSS架橋ミセルと比べて有意に高いがん集積性を示し、がんの増殖についても一定の抑制効果が見られた^(A-22)。また共焦点顕微鏡を用いたミセル細胞内動態のlive imaging評価では、低用量においてはRGDの効果は見られなかったものの、高用量では明白に早い核周辺への集積性が確認された。すなわち、RGD未修飾ミセルの細胞内取り込みルートは容易に飽和してしまうのに対して、RGDミセルは認識するインテグリンレセプターの素早いリサイクルにより効率よく細胞内に移行し、核周辺へ集積することが明らかになった。

ペプチドリガンドだけでなく、アプタマーや抗体などのリガンド分子をデバイス表層に導入する際、それらの生理活性を損なわないよう水中における高効率かつ高選択的な結合反応が必要であり、さらにナノデバイス中のどの機能団からも影響を受けない官能基が求められる。これらの条件を満たす手法として、アジド基と末端アルキンによる双極付加反応(Click Chemistry)の利用を検討してきた。平成18-21年度にはClick Chemistryに必要な両官能基(アジド基およびアルキン構造)を末端に導入したヘテロ二官能性PEGの合成法を確立^(A-18)、平成21年度には日油株式会社と連

携し、この合成法をベースにした製造法開発を推し進めた。その結果、日油株式会社からの高精度のサンプル供給体制を構築することが出来た。また、アジド末端のブロック共重合体である N_3 -PEG-PLys の合成、さらに N_3 -PEG-PLys を用いた pDNA 内包高分子ミセル型ナノデバイス調製も成功している。さらに、“Click”コンジュゲーション法を適用したデバイス表層への蛍光プローブの導入も展開し、予備的検討において良好な結果が得られている。一方で、アジド基と末端アルキンによる“Click”コンジュゲーション法には少量ではあるが触媒として銅イオンを必要としており、ナノデバイス製造において銅の毒性問題を招く恐れがあるため、平成 21 年度にはマレイミド基とフラン環による無触媒の環化付加反応 (Diels-Alder 反応) が適用できるデバイス設計にも着手した。末端にフラン環およびアミノ基を有するヘテロ二官能性 PEG、そして NCA 重合法を用いたフラン末端 PEG-PLys 合成にも成功した。一方、デバイス表面へのリガンド分子導入を穏和な条件、かつ高効率に可能と期待されているチオール基の利用についても検討した。これまでナノデバイス表面の保護されたチオール基が、デバイス内部に潜り込んだり、内部に取り込まれた分子と相互作用し、不活性化することが懸念されていた。しかし、平成 21 年度には鎖末端のチオール基をニトロベンジル基で保護した PEG を用い、thio-ene カップリング反応を利用することで、マレイミド基を有する基質の導入を確認した。本反応は水中、室温下、瞬時に進行するため、ミセル表面へのリガンド導入法として大いに有効であると期待できる。また、ニトロベンジル基を持つブロック共重合体を用いた場合も、単分散な高分子ミセルが調製できることを確認している。

3) 細胞内環境応答型高分子ミセル型ナノデバイスの創製

高分子ナノデバイスが細胞内で有効に機能発現するには、ナノデバイスがエンドソームから細胞質内へ効率的に移行する必要がある。このエンドソーム脱出過程においてポリカチオンの化学構造は極めて重要であり、我々は平成 20 年までにポリ(β -ベンジル-L-アスパルテート)(PBLA)とジエチレントリアミン(DET)とのアミノリシス反応で合成された、側鎖にエチレンジアミン構造を有する PAsp(DET) が低毒性で効率的な遺伝子発現を示すことを明らかにしてきた。また PAsp(DET)の安定供給が可能な製造法を確立すると共に、PAsp(DET)が生理環境下で自己触媒的に断片化し低分子量化していることを見出した。平成21年度は PAsp(DET)の分解挙動とその機構の解明に取り組む、分解がポリアスパラギン酸骨格と特定の構造を有するアミン化合物の組み合わせのときのみ起こる、極めて特異的な分解メカニズムを有していることを明らかにした^(A-21)。PAsp(DET)は生理条件において速やかに分解し、その分解産物は培地中に高濃度に加えても培養細胞に対して毒性をほとんど示さないことから、持続的に遺伝子を発現させるために反復トランスフェクションを行っても他のポリカチオン型遺伝子導入試薬に比べて細胞機能に及ぼす影響が極めて小さいことを明らかにした。また、ポリマー溶液をマウス腹腔内に投与した後の炎症性サイトカインの産生を定量したところ、PAsp(DET)は生理食塩水と同レベルであった。これらの結果は細胞内に残り残されるカチオン性高分子がもたらす蓄積毒性を軽減し、安全かつ継続的な遺伝子導入を行ううえで極めて重要な知見である。

上述のように、PAsp(DET)は高効率かつ低毒性の遺伝子導入を可能にするが、pDNA と安定なコ

ンプレックスを形成することが困難であり、高効率な遺伝子導入を可能にする PEG-PAsp(DET) からなるミセルにおいて、大過剰の遊離の PEG-PAsp(DET) を必要とすることが明らかになった。従って、PAsp(DET) を全身投与型の高分子ミセルへと展開するためには、ミセルの安定性を高める必要がある。そこで本研究では、(i) PEG-PAsp(DET) の N 末端へコレステリル基(Chole)を導入した PEG-PAsp(DET)-Chole、(ii) 生体適合性の PEG、エンドソーム脱出を担う PAsp(DET)、pDNA との凝縮力が強い PLys を直列に連結した PEG-PAsp(DET)-PLys、(iii) PEG と PAsp(DET) の連結部への短鎖アルキル基(C₆H₁₂)を導入した PEG-C6-PAsp(DET) の 3 つのアプローチによって高分子ミセルの安定性の向上を図った。その結果、培養細胞に対する遺伝子発現評価において、N/P 比(ポリカチオン中のアミノ基と pDNA 中のリン酸残基のモル比)が 10 以下の条件で(i) (ii) のアプローチによって 1000 倍、(iii) のアプローチによって 10000 倍の遺伝子発現の向上が達成された。また、in vivo 評価に関しては、治療遺伝子として可溶性 VEGF 受容体-1 (sFlt-1) 発現 pDNA を搭載した高分子ミセルを調製し、ヒト膵がん皮下移植モデルに対する血管新生阻害治療を行ったところ、(iii) から形成された高分子ミセルが最も優れた制がん活性を示すことが明らかになった。

PAsp(DET) の機能発現機構解明の研究より、エンドソーム内での PAsp(DET) とエンドソーム膜との相互作用が導入遺伝子のエンドソーム脱出に重要であることが示唆された。これまでの研究成果からも、PAsp(DET) の低 pH 環境に応答したエンドソーム膜傷害活性発現や PEG-SS-PAsp(DET) による PEG 脱離型ミセルにおけるエンドソーム脱出の加速と遺伝子発現上昇が明らかになった。すなわち、PAsp(DET) を基盤とする遺伝子発現効率に優れたナノデバイス構築には、エンドソーム内の低 pH 環境下で PAsp(DET) がデバイス表面に露出される材料設計が有効である。そこで高分子ミセル型ナノデバイスに低 pH 環境下で PEG 鎖が脱離する機能を組み込むため、酸加水分解性を有するアセタール構造を連結部に導入した PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体の合成を検討してきた。平成 21 年度は、PEG へのアセタール導入条件およびアセタール結合の pH 応答挙動に関して経時的に検討し、PEG 末端の構造と加水分解挙動との相関関係について具体的な情報を得ることができた。また、アセタールを含め、酸加水分解可能な種々のリンカーを導入した PEG 誘導体の開発に関して日油株式会社と協議を始めている。一方、PAsp(DET) をリガンド分子として利用すれば、ナノデバイスの効率的なエンドソーム脱出が期待できるが、ポリカチオンである PAsp(DET) は生体成分との相互作用やマクロファージ上のスカベンジャーレセプターに認識される可能性があり、そのままでは全身投与に展開できない。平成 20 年度までに、PAsp(DET) に cis-aconitic anhydride を反応させてアニオン性ポリマー PAsp(DET-Aco) へと変換した後、PAsp(DET) と pDNA からなるカチオン性複合体へ作用させたアニオン性三元系ナノデバイスの構築に成功した。この三元系ナノデバイスの PAsp(DET-Aco) の cis-aconitic 基は、エンドソーム内の低 pH 環境に応答して脱離するが、その結果生じる構造はカチオン性の PAsp(DET) であるため、エンドソーム膜障害活性が発現し効率的なエンドソーム脱出を可能にするという設計である。平成 21 年度は、PLys と pDNA より形成されるカチオン性複合体に PAsp(DET-Aco) を添加した三元系ナノデバイスについても in vitro 評価を行った。PLys は PAsp(DET) と比べて pDNA に対する凝集力が強く、ナノデバイスの安定性向上を狙い使用した。PLys/pDNA カチオン性複合体に

PAsp(DET-Aco)を添加することにより、共焦点レーザー顕微鏡を用いた評価から効果的にエンドソーム脱出していることが観察され、遺伝子導入効率を10倍上昇させることに成功した。リアルタイムに遺伝子発現活性を追跡したところ、PAsp(DET-Aco)の添加により、発現の時間軸を制御できることが明らかとなった。加えて、PAsp(DET-Aco)添加の有無に依らず、デバイスの細胞内取り込み量はほとんど変化しなかった結果からも、PAsp(DET-Aco)を機能性リガンドとして高分子ミセル型デバイスの表層に導入する設計に対する合理性が示唆された。実際にPAsp(DET-Aco)を高分子ミセル型デバイスへ組み込むための手法としては、“Click”コンジュゲーション法を採用することとした。これまでに、N₃-PEG-PLys からなる表層にアジド基を配置した高分子ミセルに対し、銅触媒の存在下でアルキン末端を有するPAsp(DET-Aco)を添加して蛍光相関分光法(FCS)により評価したところ、“Click”コンジュゲーションの進行を示唆する結果が得られている。

4) 分子診断機能を具備したシングルプラットフォーム型超分子ナノデバイスの創製

平成21年度は、シングルプラットフォーム型超分子ナノデバイスの創製に向け、機能性核酸やsiRNAを含むオリゴ核酸デリバリーのための高分子ミセルに対して *in vivo* までを含めた性能評価に取り組んだ。オリゴ核酸デリバリー用に設計した高分子ミセル型ナノデバイスは、以下の二つである。(1)一つは、既にpDNAデリバリーで顕著な実績をあげているSS架橋を利用した高分子ミセルである。PEG-PLysの側鎖にSH基を導入したポリマーとオリゴ核酸(例えばsiRNA)の間でSS架橋ミセルを調製することで、SS架橋導入率の増加とともに、生理環境でのデバイス安定性が向上し、培養細胞に対するデリバリー効率が飛躍的に高まることを確認した^(A-1)。さらに、RGDリガンドを導入したSS架橋ミセルは、RGDに対する受容体を高発現するHela細胞に対し、架橋なしのSS架橋ミセルと比べ、siRNAを速やかに細胞質まで運び込むことを共焦点顕微鏡観察により確認した。そして、マウスメラノーマ(B16F10)の肺転移モデルに対し、RGDリガンド+SS架橋ミセルを静脈投与したところ、RGDリガンドと高密度のSS架橋(95%)を共に有するナノデバイスは、転移がんでの有意なRNAiを達成した。(2)もう一つの系は、側鎖にステアロイル(ST)基が導入されたカチオン性ポリアスパラギン酸誘導体PAsp(DET-ST)である。このPAsp(DET-ST)は、市販のポリカチオン系核酸導入試薬や未修飾のPAsp(DET)と比べ、培養細胞に高効率でオリゴ核酸を導入できることを確認した。特にsiRNAを用いた場合、19%のST基を導入したPAsp(DET-ST)は、最も効率よいRNAiを惹起することを確認した。そのメカニズムは、核酸複合体の安定化により高効率でsiRNAが細胞内に導入されるためであることを、蛍光相関分光法を用いた安定性試験とフローサイトメーターを用いた細胞内取り込み量測定より明らかにした。そして、PAsp(DET-ST)とsiRNAの複合体は赤血球への傷害性が高かったが、PEG化したPAsp(DET-ST)を用いることで、その血球傷害性が大幅に抑制されることを確認した。反面、PEG-PAsp(DET-ST)は、培養細胞系へのオリゴ核酸デリバリー効率を低下させたものの、細胞内還元環境でPEGが脱離するPEG-SS-PAsp(DET)に対してST基を導入することで、血球傷害性の低減と培養細胞への高効率オリゴ核酸デリバリーを共に達成した。さらに、このPEG-SS-PAsp(DET-ST)を全身投与することで、上述の肺転移がんへの有意なオリゴ核酸集積と結果的な高効率RNAi効果を得ることに成功した。今後は、上記二つのシステムの *in vivo*

機能性核酸デリバリーに向けた構造最適化(核酸構造・配列を含めて)を図るとともに、適用疾患の拡大(例えば腹膜播種など)に取り組む予定である。

5) 超分子ナノデバイスを利用した難治がんの標的治療法の確立

平成 20 年度までに、ヒト膵がんのマウス皮下移植モデルに対して sFlt-1 発現 pDNA を搭載した SS 架橋ミセルの全身投与により、膵がんの標準治療薬であるゲムシタビン、臨床で使用されているヒト VEGF モノクローナル抗体アバスタチンよりも高い制がん活性を示すことを明らかにしている^(A-25)。平成 21 年度は、SS 架橋ミセルにがん周辺の増殖が昂進している血管内皮細胞を特異的に認識する環状型 RGD ペプチドリガンドを付与し、前述のヒト膵がん皮下移植モデルに対して評価を行った^(A-22)。全身投与された RGD ミセルは従来型の SS 架橋ミセルと比べて高い腫瘍組織集積性を示し、がんの増殖抑制についても一定のリガンドの導入効果が見られた。

また平成 21 年度には、これまでに報告してきた全身投与型の 3 種類の高分子ミセル、(i) PEG-PAsp(DET)-Chole ミセル、(ii) PEG-C6-PAsp(DET)ミセル、(iii) PEG-PAsp(DET)-PLys ミセル、をヒト膵がんマウス皮下移植モデルに対してがんの増殖抑制効果を同時に評価することで、ミセル間での比較検討を行った。その中で、sFlt-1 発現 pDNA を内包した PEG-C6-PAsp(DET)ミセルが最も高い制がん活性効果を示し、その効果は前述の SS 架橋ミセルと比べて優れていることを確認した。ただし、(ii) PEG-C6-PAsp(DET)ミセルに関してはその後の検討でホモポリマーの混合も懸念されるので、詳細な検討が必要である。

6) 超分子ナノデバイスを利用した運動器疾患の機能再建治療法の確立

前年度に引き続きコンドロイチン硫酸添加系の詳細な解析を進めた。PEG-PAsp(DET)からなるナノデバイスにコンドロイチン硫酸を添加することによって、PEG-PAsp(DET)/pDNA/コンドロイチン硫酸の三元系コンプレックスを形成することを物理化学的解析により確認した。コンドロイチン硫酸の添加は、内包された pDNA の凝縮、安定性には影響せず、PAsp(DET)の自己触媒型生分解性を抑制することにより、遺伝子発現の長期持続化を得られることが確認された。さらに治療応用に向けて重要な点として、コンドロイチン硫酸添加による膜傷害性の軽減、抗炎症作用を明らかとした。In vitro 実験によるコンドロイチン硫酸添加による遺伝子発現増加および膜傷害性の定量的解析により、条件の最適化を行った。In vivo 投与に適用し、ハイドロダイナミクス法による経静脈的骨格筋投与、肝投与、および経気道肺投与における遺伝子発現の持続化、炎症反応の軽減効果を確認した。特に肺投与において、コンドロイチン硫酸添加による抗炎症作用が顕著に見られ、治療応用に向けた重要なポイントのひとつと考えられた。

さらに、機能再建への応用として、Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) のプロテアソーム分解を掌る Prolyl hydroxylase domain-2 (PHD2) に対する shRNA 発現 pDNA を骨格筋に導入し、HIF-1 α の安定化に基づく血管新生因子群発現誘導を利用することによって、マウス下肢虚血モデルの血管再生治療を行った。その結果、ナノデバイスによる PHD2-shRNA 発現 pDNA の投与によって、HIF-1 α および血管新生因子群の発現上昇に伴い血管新生が効率よく誘導され、自然経過では

末梢が壊死に陥る下肢を、本治療で回復させることに成功した。特にコンドロイチン硫酸添加したナノデバイスで顕著な治療効果が得られ、投与による炎症反応の抑制、発現の持続化が組織再生に重要な要素となることが確認された。

また、組織再生治療への応用を展望したES細胞など幹細胞へのナノデバイスによる遺伝子導入を行った。この目的のため、PAsp(DET)の自己触媒型生分解性を生かしたナノデバイスの反復投与条件を確立した。非分解性カチオン性ポリマーと異なり、PAsp(DET)による遺伝子投与では、細胞内の内在性恒常発現遺伝子の発現変動はわずかで、細胞の生理的機能に影響しない遺伝子導入が可能であることを確認した。マウスES細胞に対するナノデバイスによる遺伝子反復投与で、アデノウイルスなどと比べて、低い毒性で効率的な骨芽細胞分化誘導が得られた。さらにナノデバイス遺伝子導入によるiPS細胞作成への試みを開始している。

平成20年度に施行したマサチューセッツ総合病院(ボストン)との共同研究を踏まえ、日本でも独自にin vivo共焦点イメージングシステムの構築に取り組んだ。平成20年度末にJST追加予算によりNikon A1R高速共焦点顕微鏡を導入した。平成21年度はこれに改良を加え、また麻酔器や手術器具などの周辺機器を揃え、小動物を生きのまま直接観察できるin vivo共焦点顕微鏡システムを構築した。同一個体、同一部位、同一視野で、投与する前から観察を開始し、リアルタイムでナノデバイスの生体内評価が可能なシステムである。これまでに脳、肝、腎、脾、皮下腫瘍、筋肉、内耳などの組織・器官の観察に成功しており、引き続いてナノデバイスの血中安定性、組織移行性、細胞内取り込み、核移行について評価を行っている。

(B-1)原島グループ

1)ナノデバイスの製剤化および安定性の評価

多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)の製剤化の基盤技術の確立を目的として、凍結乾燥法の検討を行った。凍結乾燥前後の粒子径・表面電位などの物性を測定し、ナノデバイスの安定性を評価した。その結果、静脈内投与型のPPD-MEND(PEG-peptide-DOPE-MEND)、一遺伝子パッケージング可能なMCD-MEND(Mono Cationic Detergent-MEND)、多段階的に膜融合可能なT-MEND(Tetra lamellar-MEND)など、それぞれのナノデバイスに最適な糖を添加することで各種MENDの凍結乾燥法を確立し、凍結乾燥しても遺伝子発現活性を維持している事を確認している。また、短鎖PEG脂質誘導体をエンベロープ構成脂質として加えることにより、均一性が高く、かつ膜枚数の制御された粒子形成が可能であることが明らかとなった。これに伴い細胞への取り込みが促進し、細胞内における遺伝子のキャリアからの脱離効率が上昇し、遺伝子導入効率が100倍程度上昇することが明らかとなった^(B-2)。

2) In vivoで組織選択的に遺伝子を送達するシステムの開発

MENDを尾静脈内より投与すると、投与量の70%以上が肝臓に集積した。しかしながら、遺伝子発現に関しては、非常に効率は低く、細胞内動態が律速となっていることがわかった。そこで、エンドソーム脱出素子として、インフルエンザHA蛋白由来のペプチドであるINF7のステアリン酸誘導

体を合成し、MEND のエンベロープ表面を修飾した。その結果、INF7 修飾により、遺伝子発現は 10～100 倍程度上昇した。本 INF 修飾 MEND を静脈内投与することにより、肝臓において顕著な遺伝子発現が示された^(B-3)。また、本素子は、表面に PEG を表面修飾した際にも効果を示すことが明らかとなるとともに、血中滞留性にも悪影響を及ぼさないことから、がんへの遺伝子や機能性核酸送達にも有用であることが示唆された。

一方、MEND に GALA(エンドソーム脱出素子)を修飾することで肝臓における遺伝子発現量が 1000 倍以上上昇することが明らかとなった。pH-感受性膜融合型ペプチドの GALA とステアリル化した R8 を修飾した MEND では、肺や脾臓での遺伝子発現量が肝臓に比べて 10 倍以上減少しており、一方で、GALA と DOTAP(カチオン性脂質)から構成される MEND では肝臓、肺、脾臓での遺伝子発現量に大きな違いはなかったことから、STR-R8 は肝臓への選択性を有する素子である可能性が明らかとなった。

3) MEND のがん治療への応用

機能性核酸のがん送達デバイスとして、固形がん局所で過剰発現する matrix metalloprotease (MMP)の基質セグメントを介した PEG 脂質 (PPD)を修飾した PPD-MEND の開発を行った。機能性核酸のモデルとして siRNA を封入した PPD-MEND にエンドソーム脱出促進を目的に GALA を導入することで(GALA/PPD-MEND)、従来よりも高い標的遺伝子のノックダウンが可能となった。固形がんへ局所投与すると、in vitro で最も活性の高い PEG を修飾しない MEND と比較して GALA/PPD-MEND は有意に高いノックダウン活性を示した^(B-1)。

さらに、R8/GALA-MEND の最適化と in vivo がんへの適応を考慮し PEG 修飾の検討を行った。R8/GALA-MEND は、PEG 存在下でも従来の PPD-MEND より高いノックダウン効率を示した。しかしながら、その効果は不十分であったので PPD を導入したところ、十分なノックダウンを得ることに成功した^(B-9)。これは PPD の切断と R8 による細胞取り込みの増加、さらに GALA によるエンドソーム脱出の促進による結果と考えられた。

全身投与型 MEND の最適化については、エンベロープ脂質のスクリーニングに着手した。

4) 組織選択性・細胞内動態・核内動態の改善による新規デリバリーシステムの構築

組織選択的送達用リガンドとして、7つのアミノ酸からなる IRQ ペプチド(IRQRRRR)を異なる長さの PEG の先端に結合し、リポソーム表面に修飾した。静脈内投与後の肺への移行性を検討したところ、PEG を介さずにリガンドをリポソームへ修飾したものと比較して、PEG を介したほうが肺への移行性が高くなること、また、PEG の鎖長が長くなるに従い、移行性が高まることが明らかとなった。

細胞内動態の観点からは、リポソーム表面へ核移行性シグナル(NLS)を修飾し、そのトポロジーを変化させ、単離核との親和性に及ぼす影響を検討した。その結果、リポソーム表面へ直接 NLS を修飾するよりも、PEG を介して修飾するほうが高い親和性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、リガンド分子のリポソーム表面におけるフレキシビリティの重要性を示すものである^(B-4)。

また、血管透過型システムの構築に関しては、ナノ粒子の血管透過を評価可能なシステムの構

築を行った。従来の低分子用トランスウェルではリポソーム透過が極めて低く、一方で、孔サイズを大きくすると細胞の単層培養が困難であるというジレンマに直面した。本問題を解決するために、新規素材を用いたトランスウェルチャンバーを設計し、単層培養とリポソーム透過を両立できる評価系の構築に成功した(特許出願)。

また、R8 リポソームの極性細胞における細胞内動態を評価した結果、非極性細胞とは異なり、エンドソーム脱出が悪いことが示された。さらなる細胞内動態の解析結果より、一般のカチオン性脂質からなるリポソームはリソソームにて分解されるのに対し、R8 リポソームは、その一部がゴルジ体に移行することが明らかとなった^(B-10)。

また、核内動態制御を可能とするために、「ヒストンとの結合制御」を考慮した pDNA の開発を行った。ヒストン高親和性配列をプロモーター上流に導入してプロモーターを露出させ、外来遺伝子発現を数倍上昇させた。また、逆にヒストン低親和性配列をプロモーター中に導入しプロモーターを露出させることにより、外来遺伝子発現を数倍上昇させた^(B-5)。

MEND の核移行能を改良する新たな戦略として、遺伝子を異なる脂質膜で段階的にコーティングした T-MEND の構築法を確立した。その結果、T-MEND は、核移行のみならず核内の脱凝縮にも優れた特性を発揮した^(B-8)。また、遺伝子の核内動態の観点から、凝縮剤のスクリーニングを行った。その結果、ソルビトールアナログを用いることで高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった^(B-7)。同様に、種々のポリロタキサンをポリカチオンとして用いることで、MEND あるいは T-MEND の遺伝子発現を促進することが可能となり、天然の素材であるプロタミンを用いた場合よりも高い遺伝子発現を示すことに成功した。さらに、永続的な治療効果が期待される遺伝子修復法においても核内動態制御は重要な課題である。核内動態を改善させた遺伝子修復用核酸である tailed DNA 断片をマウス肝臓に導入し、in vivo で遺伝子修復が可能であることを示した^(B-10)。

(B-2) 小暮グループ

1) 機能性核酸の経皮及び毛孔内送達システムの確立

ナノ粒子である siRNA 封入 MEND を、臨床で用いられるジェットインジェクション(JI)法を用いて GFP を安定発現している悪性黒色腫瘍移植マウスに投与し、腫瘍組織における RNAi 効果を検討したところ、siRNA が存在する腫瘍部位において GFP の蛍光の減少が観察された。しかし、その効果は強力なものではないため、今後の最適化による効果増強を行う必要がある。また、siRNA 封入 MEND をイオントフォレシスによって毛孔内への送達を試みたが、リポソームの場合と異なり MEND は柔軟性に乏しい構造特性を有するためか、毛孔内奥まで送達することはできなかった。しかし、これまでの塗布に比べて、有意に大量の MEND が毛孔内(上中部)に観察されたことから、イオントフォレシスは MEND の毛孔内送達のための有効な手段であることが明らかになった。おそらく、粒子径および脂質蘇生の最適化によって、毛孔内奥まで送達可能なイオントフォレシス用 MEND の作成が可能であると考えている。一方、JI法を用いて凍結乾燥したルシフェラーゼプラスミド DNA 封入 MEND を皮下(皮内および筋肉組織)に投与したところ、プラスミド DNA のみでは投与後14日で発現量が減少したのに対して、MEND 投与群では14日に発現量が增大した。このことから、

MEND が in vivo において持続的な遺伝子発現能を有することが示唆された。さらに、インスリンプラスミド DNA 封入 MEND を糖尿病モデルマウスの皮下に投与することにより、14日後において皮下組織における有意なインスリン mRNA の発現および血漿中におけるインスリン量の増大を確認した。また、ルシフェラーゼ発現メラノーマ移植マウスに抗ルシフェラーゼ siRNA 封入 MEND を JI 法により投与したところ、90%以上の発現抑制活性を得ることに成功した。さらに、microphthalmia-associated transcription factor (MITF)、vascular endothelial growth factor (VEGF)、osteopontin (OPN)に対する3種の siRNA を混合封入した凍結乾燥 MEND を JI 法でヒトメラノーマ移植マウスに投与することにより、ほぼ完全な腫瘍成長抑制効果を得ることに成功した。

2) MEND の in vivo 使用スケールでの凍結乾燥技術の確立

平成 20 年に確立した MEND の凍結乾燥技術を in vivo 使用スケールにまで拡大するため、大量(これまでの 10 倍以上)の MEND の凍結乾燥を検討した。これまでの小スケールと同様に行っただけでは、凍結乾燥は不可能であったが、凍結段階における熱交換効率が問題であることを見出し、凍結容器を工夫することにより、一度に大量の凍結乾燥 MEND を調製することに成功した。得られた凍結乾燥 MEND (GFP プラスミド DNA を封入)をマウスの皮下および筋肉内に投与することによって、in vivo 正常組織における顕著な遺伝子発現を誘導することに成功した。さらに、vascular endothelial growth factor (VEGF) プラスミド DNA を封入した MEND を凍結乾燥し、下肢大腿動脈を切除したマウス下肢に直接注射したところ、MEND 投与群においてのみ投与7日後に有意な VEGF mRNA 発現を確認することに成功した。さらに、上記で示したように様々な in vivo 実験に適用し遺伝子発現に成功している。また、凍結乾燥後100日において凍結乾燥 MEND の活性および物性を評価したところ、全く損なわれておらず、本凍結乾燥 MEND は長期保存にも耐えるものであることが確認された。また、名古屋市立大学の尾関哲也教授と東京薬科大学の岡田弘晃教授との共同研究によって、MEND のドライパウダー化も検討し、2流体ノズル法を用いることで大量(DNA の重量としてグラム単位)の MEND をドライパウダー化することに成功した。

(C) 長崎グループ

1) PEG 化機能性核酸・脂質のさらなる機能化と PEG 化機能性核酸の新規キャリアシステムの構築

本研究項目では、佐々木グループおよび原島グループとの共同研究により、PEG 化機能性核酸が細胞内で効果的に機能すること、および PEG 化脂質が in vivo において高い遺伝子発現を示すことをそれぞれ見出し、in vivo に向けた構造の最適化(PEG 鎖の鎖長、リガンド分子の導入)を検討してきた。平成 20 年度は、PEG 化機能性核酸の新規ナノデバイスとして、架橋構造を有するナノサイズの三級アミンゲルと PEG 層から成るコアシェル型 PEG 化ナノゲル粒子の調製および評価を行った。この PEG 化ナノゲル粒子の特徴は、架橋ポリアミン構造をコアに有していることで、全身投与後の希釈条件、高塩濃度条件でも解離、分解することのない点である。PEG 化ナノゲル粒子の有用性を評価したところ、適切な架橋密度(1 mol%)の PEG 化ナノゲル粒子は、PEG-ポリアミンブロック共重合体よりも優れた安定性、遺伝子発現抑制効果を示すことを確認している^(C-5)。平成

21年度は、このPEG化ナノゲル粒子のコア構造の最適化を行い、より効率的なナノデバイスの構築を行った。具体的には、 pK_a の低い三級アミノ基は負電荷のsiRNAをin vivo環境下でも安定に担持するには十分な結合力を示さないため、コアの三級アミノ基の一部を四級アンモニウム基へと変換することでsiRNAとの結合力向上、複合体の安定性向上、細胞毒性の低減、細胞内siRNA導入量の飛躍的向上を同時に達成した。特に、コアのアミノ基の四級化率が10%程度の部分四級化ナノゲル粒子は、四級アンモニウム基による安定性の向上効果と、三級アミノ基によるエンドソーム脱出効果の相乗的效果により、抗アポトーシスタンパク質survivinに対して著しいサイレンシング効果を示すことを確認した(論文投稿中)。また、当初の計画を前倒し、部分四級化ナノゲル粒子と ^{32}P 標識siRNAの短期的な血中滞留性を評価した結果、siRNA単独、ポリエチレンジアミン、三級アミノナノゲル粒子よりも優れた血中滞留性を示すことを確認した。このように、架橋(網目構造)を有するPEG化ナノゲル粒子と機能性核酸(siRNA)複合体は、体内での血中安定性の向上が見込まれ、in vivoにおいても有用であると期待される。

部分四級化ナノゲルのsiRNA錯合体において高い安定性と発現能力が確認されたため、PEG-b-ポリアミンブロック共重合体の部分四級化の検討を行った。四級化反応はスムーズに進行し、siRNAとの複合化も確認された。安定性は3級アミン型ブロック共重合体に比べて極めて向上することが確認された。しかしながらin vitroにおける検討では発現が全く観測されず、四級化PEG-b-ポリアミンブロックの効果は限定的であることが確認された。

遺伝子キャリアとしてのナノ粒子はしばしばそれ自身の毒性や炎症が問題になりつつある。そこで我々は平成21年度から活性酸素消去能を有するPEG-b-ポリアミンブロック共重合体及びPEG-g-ポリアミン共重合体を合成し、遺伝子キャリアとしての評価を始めた。合成した材料はPEG鎖を有するポリクロロメチルスチレンに4-アミノTEMPO(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン1-オキシド)を高分子反応にて導入した。反応はほぼ定量的に進み、疎水性鎖の側鎖に安定ニトロキシラジカルとアミノ基を同時に導入することに成功した。PEG-b-PCTEMPO及びPEG-g-PCTEMPOを利用し、プラスミドDNA及びsiRNAの複合化を行った。ニトロキシラジカルと遺伝子に導入した蛍光ラベルが効率的にエネルギー移動して消光することから効果的な錯体を形成していることが確認された。モデル反応によりこれら粒子は効率的に活性酸素を消去することが確認された。ニトロキシラジカルは特にSOD様のスーパーオキシドだけでなく、ヒドロキシラジカルも消去することが可能であることから、高い抗炎症効果効果が期待される。予備的検討では細胞実験で効果的な遺伝子発現及びsiRNAによる遺伝子発現抑制も確認され、新たな遺伝子キャリアとして期待できる。

さらに、PEG化機能性核酸の実用的製造(大量生産)技術の開発として、固相合成法の検討を行った。新規に合成した機能性リンカーを用いて、ガラスビーズ(CPG)にあらかじめPEGを結合させることで、効率よくPEG化機能性核酸を製造できることを見出した。また、PEGの代わりに糖鎖を固相合成法で核酸に結合させる手法も確立した。今後はPEG化機能性核酸と共に、糖鎖で機能化させた核酸を用いて遺伝子治療への展開を図る予定である。

また化学療法における副作用を低減させるため、腫瘍等の組織特異的なドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。平成21年度は腫瘍選択性を有する新しいリガンド分子の開発を試

みた。現在脳腫瘍の術中診断に用いられているアミノ酸である 5-アミノレブリン酸に着目し、腫瘍選択性リガンドとしての機能評価を行った。その結果、正常細胞と比較し、腫瘍細胞に効率よく取り込まれていることが確認された。今後はこの分子をリガンドとして用い、ナノ粒子の腫瘍選択的なデリバリーを試みる予定である。

2) インテリジェント界面を創り込んだ新規ナノデバイスの創出

本研究項目では、様々な疾患への適用が期待される siRNA を中心に核酸/PEG ハイブリッド界面を創製することを目的としている。平成 20 年度は、siRNA/PEG インテリジェント界面をナノデバイスに創り込むためのプラットフォームとして、新たに金ナノ粒子を内包した PEG 化ナノゲル粒子の調製および評価を行った。平成 21 年度は、金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子と siRNA のインテリジェント界面のモデルとして、金基盤表面上の核酸/PEG ハイブリッド界面の構造解析を行った。XPS (X 線光電子分光器) による測定から、深さ方向にナノレベルで相分離構造を有するポリマーブラシ層が形成されていることを見出し^(C-4)、同構造が固定化核酸の配向性制御に大きく寄与していることが推察された。また、同表面に固定化した核酸の標的分子認識能が固定核酸末端のスペーサー長 (金基板からの距離) に大きく依存することが明らかとなり、現在のところチミンを 20 個程度導入したスペーサー長において最大の分子認識選択性を発現することが明らかとなっている。今後、siRNA などの核酸分子の共固定化 (インテリジェント界面の創り込み) を金ナノ粒子内包型 PEG 化ナノゲル粒子に施すことを計画している。

これまでの検討でポリアミンゲルをコア、シェルに PEG ブラシを有するポリアミンナノゲル内で金コロイド粒子を効率的に形成させることに成功している。この金コロイド含有ナノゲル (GNG) に末端にメルカプト基を有する siRNA を固定したところ、静電相互作用とメルカプト基の金コロイド表面への結合という相乗効果で効果的に固定された。今回サバイビン発現抑制 siRNA を用い、GNG に担持させた。サバイビンは放射線治療などで高度に発現し、アポトーシスを抑制することが知られているため、今後サバイビン siRNA 担持 GNG を放射線治療と併用する効果を確認する。現在、サバイビン発現細胞を利用した予備的観測での抑制が確認され、今後の検討が期待される。

(D-1) 佐々木グループ

1) PEG 化 DNA 合成の大量合成法の検討

固相上での DNA の PEG 化は大量合成には必要な技術であることから検討を続けてきたが、これまで実現に至っていなかった。平成 21 年度は自動合成装置を用いて、求核性の強いアミノリンカー (ssH-linker, SAFCProligo) を用いて 5' 末端にアミノ基を導入した。引き続き固相上 PEG 化反応剤 p-nitrophenyl-PEG (日油株式会社から供与) と反応させたところ効率よく PEG 化 DNA を合成することに成功した。PEG 化 DNA は RNase H 活性を誘起し、非細胞系アッセイにおいて天然型より弱いもののアンチセンス阻害活性を示すことを確認した。

2) 高感度センシングのための機能性分子開発

本研究項目では、遺伝子の標的塩基を特異的に標識する機能性核酸分子の開発を目指している。これまで2-メチリデン-1,3-ジケトン構造のユニットを標的 DNA あるいは RNA に対して標的シトシン特異的な修飾反応に成功し、転移可能な官能基群の構築を確立した。引き続き溶液の pH をアルカリ性にするにより転移反応選択性をグアニンに変化させることに成功した。この転移反応により蛍光分子を標的 RNA に転移させることにも成功している。平成 21 年度は、グアニン 7 位窒素と遷移金属イオンとの結合による 1 位 NH の pKa の変化を期待し、活性化を検討したところ、Ni²⁺、Co²⁺の共存により反応が著しく活性化し、pH7.4 でも転移反応が進行することを見出した。一方、高感度センシングを目的とする研究項目では、過酸化酸素を必要とせず、溶存酸素を利用してルミノールの発光反応を触媒する新規2核銅錯体触媒の開発に成功している。平成 21 年度はこの2核銅錯体のオリゴヌクレオチドへの導入を検討した。その結果、銅に対する配位子構造を 5'-末端に導入したもの、および 3'-末端に導入したものの、2種類の DNA プローブ合成に成功した。最適な構造を決定するため、リンカーの長さの異なるものも合成した。これらのプローブを用いて標的 DNA 配列の認識を検討したところ、配列特異的に発光触媒活性が誘起されることを明らかにした。この2種類のプローブが標的 DNA 上に集積して2核銅錯体が生成するが、配位子構造をプローブに連結したリンカー構造によって最適な標的構造があることが明らかとなった。

3) RNA 編集機能の非細胞系機能評価

人工核酸による RNA 編集機能の実現を目指して、非細胞系ルシフェラーゼ発現系を用いて検討を行っている。クロスリンク分子に関しては RNA 選択的分子の開発に成功し、アンチセンス核酸を用いた配列特異的な翻訳停止に成功している。平成 21 年度は生体内での利用を念頭に、クロスリンク核酸を構成する成分として 2'-メキシ RNA を合成してクロスリンク塩基選択性およびアンチセンス効果を検討した。その結果、新規クロスリンク分子のクロスリンク能は維持されたものの選択性は配列によって変化し、一部配列ではシトシンではなくウラシルとの反応が示された。非細胞系におけるアンチセンス効果は、RNase H 機構による天然型よりも弱いものの、対照とするクロスリンク能を持たないアンチセンスよりも非常に強い阻害活性を示した。このことはアンチセンス阻害がクロスリンク形成による立体効果によることを強く示唆しているものであり、細胞内でのアンチセンス阻害および編集反応の検討に移った。また、NO 転移核酸により標的シトシンの脱アミノ化を目的とする研究では、脱アミノ化により形成される停止コドンによる短い蛋白質の生成を検討している。これまでのところ、短い蛋白質の生成は認められるものの、その生成機構は RNase H による mRNA 切断が示唆されている。そこで 2'-メキシ RNA を成分とする NO 転移核酸を用いた検討に移行した。短い修飾 RNA を鋳型として用いた逆転写反応では部位特異的に転写が阻害されたことから、転移核酸を用いて mRNA を部位特異的に化学修飾する手法により編集効果が期待された。平成 21 年度は mRNA の部位特異的な化学修飾を検討したが、反応の進行を検出することができなかった。そこで、反応の進行を確実に検出するためビオチン基転移核酸を検討した。短い RNA では成功したものの、RNA に結合したビオチンがアビジンと結合しなかったため、立体障害を回避する目的で長いリンカーを持つビオチン分子の合成を始めた。

4) 機能性核酸を搭載したナノデバイスの機能検証

本項目ではW字型人工塩基による3本鎖形成配列の拡張について検討しており、すでにこれまで形成できなかった配列での3本鎖形成を可能にする人工塩基を開発し、認識配列の一部拡張に成功した。平成21年度はc-myc, bcl-2, survivin がん遺伝子を標的的人工核酸の遺伝子阻害効果を調べるため、片岡グループのPAsp(DET)および市販のoligofectamineを用いて殺細胞効果を調べた。3本鎖形成核酸は比較的高濃度にする必要があり、この濃度ではPAsp(DET)による細胞毒性が観測されたため、アンチジェン評価にはoligofectamineを用いることとした。その結果、bcl-2, survivin を標的とした3本鎖形成核酸が増殖阻害能を有していることが示された。しかしW字型人工塩基の優位性を示す結果ではなかったため、更なる検討を継続している。また、家族性高コレステロール血症治療を目的とした機能性核酸を含むオリゴヌクレオチドの合成を行い、細胞内でのapoB100の編集反応を検討したが、編集反応を確認することはできなかった。本項目は平成22年度も検討を継続する。(斯波グループと共同)。

(D-2) 永次グループ

1) 機能性核酸を組み込んだPNA(ペプチド核酸)の合成及び機能評価

PNAは2本鎖DNAに対してインベージョンすることが知られている。これまで開発してきた架橋形成ならびに塩基構造変換機能を持つ人工機能核酸をPNAに組み込むことで2本鎖DNAを標的化できると考えられる。平成20年度までにPNAオリゴマーを合成し、標的モデルDNA及びRNAに対する反応性を検討したところ、DNAよりもRNAに対して効率的に反応することを明らかにした。平成21年度にはこのPNAを用いて細胞内でのアンチセンス効果などを評価するために、ルシフェラーゼを標的とした配列に機能性核酸を組み込んだPNAの合成を行った。さらにこれらの反応性を試験管内で評価したところ、期待したほど反応性は高くなく、また従来のDNAタイプとは異なり、2本鎖内での活性化も進行しないことがわかった。

2) 新規機能性核酸の分子設計

既に我々はシトシンを標的とする機能性核酸を開発した。この構造に基づきあらたにグアニンを標的に反応する機能性核酸の開発を検討した。平成20年度までに反応性塩基と糖部分にスペーサーを有するDNA型モノマーの合成に成功していた。平成21年度はこの新規機能性核酸を組み込んだオリゴヌクレオチドを合成し、その反応性を検討した。その結果、設計とは異なり、相補的な位置にあるチミジンに対して非常に選択的かつ効率的に反応することを発見した。さらに得られた付加体の構造決定を行ったところ、チミジンの2位の酸素に反応した構造を示唆するデータが得られた。この結果は今回合成した機能性核酸が標的のチミジンに対して水素結合を形成し、反応点どうしが近接し反応が進行したことを示すものであると考えている^(D-2-1)。

3) RNA型インテリジェント核酸の合成

従来用いていたインテリジェント核酸は RNA に対する反応性が低いことがわかっていて、そこで RNA に対する反応性向上を目指し、RNA 型インテリジェント核酸の合成を検討することにした。平成 20 年度は、2'-OMe 型インテリジェント核酸を含むオリゴヌクレオチドの合成に成功し予備的な検討により RNA に反応することがわかっていて、平成 21 年度はさらに詳細にこの反応を検討したところ、中性条件下、DNA 中のチミジンに対して選択的に反応することがわかった。また RNA に対しても酸性条件下ではあるが、ウリジンに対して選択的に反応することもわかった。従来の DNA 型インテリジェント核酸では、シトシンに対して反応していたが、2'-OMe 型にすることで反応選択性が変化したのは非常に興味深い。

(E) 松村グループ

疾患ターゲットとなる脳腫瘍モデルとナノデバイスの生体内でのデリバリー及び抗腫瘍効果を判定するために必要なイメージング技術を確立する。本研究開始時において新規高分子ミセル型ナノデバイス自体が片岡グループで開発中であったことと、当初遺伝子・核酸の全身デリバリー療法は血中安定性や腫瘍への送達能の評価が定まっておらず探索的要素も強かったことから、効果の期待できる腫瘍の支配動脈による局所投与療法の基礎・開発研究を先行して行った。新規高分子ミセル型ナノデバイス完成後は、局所投与法で遺伝子・核酸療法の脳腫瘍での有効性を確認できたこともあり、全身投与法の基礎・開発研究に移行した。

(1) 脳腫瘍同所移植モデルの構築とその増殖抑制評価のためのイメージング技術の確立

in vivo 評価において、通常用いられている皮下腫瘍では、実際のヒト脳腫瘍における腫瘍血管の特性を反映しているとは言い難い。すなわち、脳には血液脳関門 (BBB) が存在するために、薬物あるいはナノ粒子は血管から漏出しないといわれている。そこで、ヌードマウス大脳半球へヒトグリオーマ細胞株 LN229 の同所移植モデルを作成し、(抗がん剤 SN-38 を内包する) 高分子ミセル型ナノデバイスを静注したところ、正常脳への分布はまったく見られなかったが、腫瘍部へは選択的にナノデバイスが集積していた。すなわち、高分子ミセル型ナノデバイスは BBB を通過しないが、血液脳腫瘍関門 (BBTB) は容易に通過することを明らかにした。この結果より、高分子ミセル型ナノデバイスは脳腫瘍への核酸のデリバリーを可能とするキャリアであることが示唆された。同時に、高分子ミセル型ナノデバイスの生体内でのデリバリー及び抗腫瘍効果を判定するために有用なモデル系の構築に成功した。

(2) 動原体構成タンパク KNTC2 に対する siRNA による局所投与型脳腫瘍治療の試み

KNTC2 は細胞分裂に関わるタンパクであり、未分化がんを高発現している。ヒトでは精巣にのみ高発現している。KNTC2 高発現脳グリオーマ株 LN229 に対し、KNTC2siRNA はアポトーシスを惹起し、顕著な殺細胞効果を発揮することを証明した。また、LN229 局所移植ラットに KNTC2siRNA 搭載カチオニックリポソームを動注したところ、非特異的 siRNA 搭載カチオニックリポソームに比較し、有意に高い抗腫瘍効果をもたらすことを、1) で開発したイメージング測定法で明らかにした (図 1)。

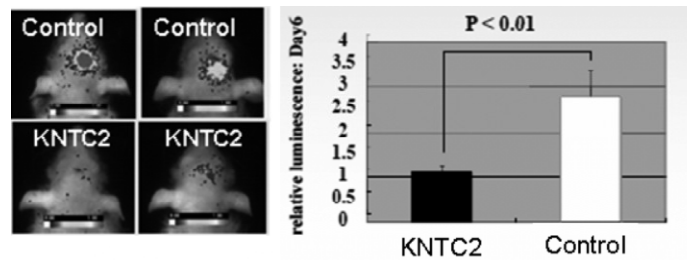


図1. LN229 に対する KNTC2 核酸療法による抗腫瘍効果の検討

(3)PEG-PAsp(DET)を用いた sFlt-1 遺伝子デリバリーによる全身投与型脳腫瘍治療の試み
 新たに片岡グループで開発された高分子ミセル型ナノデバイスである
 poly{N-[N-(2-aminoethyl)-2-aminoethyl]-2-aminoethyl}(PAsp(DET))は低毒性かつ効率的に遺伝子発現を行える核酸送達用高分子ミセル型ナノデバイスである。VEGF は腫瘍血管新生作用があり、Bevacizumabはこの作用を阻害することで抗腫瘍効果を示す。sFlt-1は可溶性 VEGF 受容体であり、腫瘍局所で発現させることにより、内皮細胞に存在する膜型 VEGF 受容体に VEGF が結合すのを競争阻害することで、Bevacizumab 同様の抗腫瘍効果を示すものと期待されて新規に開発された遺伝子核酸製剤である。加えて本治療法は少ない投与量で持続的な効果が期待できるため、繰り返し投与を必要としないので、副作用の軽減が可能と目されている。まず、VEGF を強く発現し腫瘍血管の豊富なグリオーマ細胞株 U87MG を用いて、脳腫瘍における抗 VEGF 療法が成立するかどうかを Bevacizumab による治療実験で判定した。皮下移植と同所移植の両モデルにおいて血管新生の抑制と有意な腫瘍増殖抑制と延命効果を認めたため、脳腫瘍で抗 VEGF 療法が確かに成立することを確認することができた。引き続き、皮下腫瘍モデルで sFlt-1 遺伝子核酸療法を行い、本療法が Bevacizumab と同様に腫瘍血管新生の抑制と抗腫瘍効果を確認することを確認した(図2)。現在、同所移植モデルで効果判定中である。

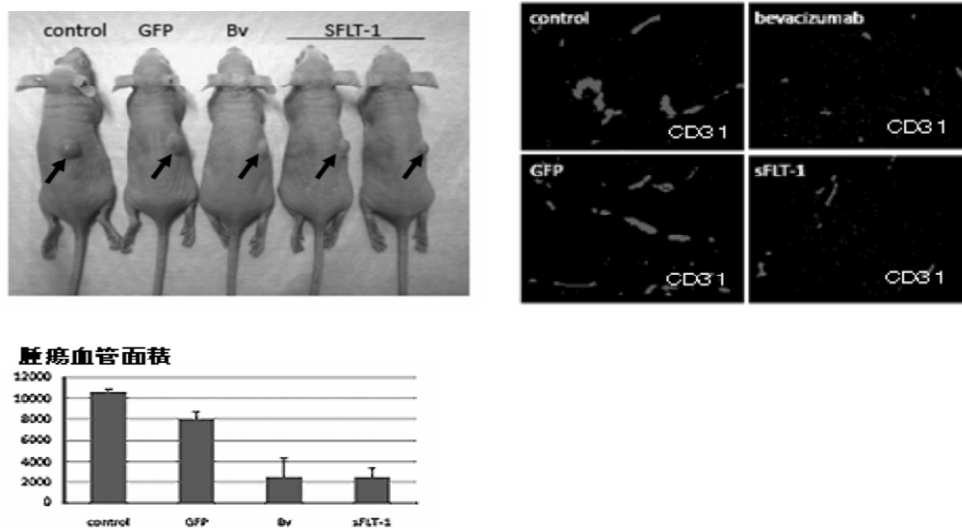


図2 グリオーマ皮下腫瘍での sFlt-1 ミセルの抗腫瘍効果と血管新生抑制作用

(F) 斯波グループ

1) 高分子ミセル型ナノデバイスを用いた経肺投与による遺伝子導入法の確立

循環器疾患の中でも難病である肺動脈性肺高血圧症に対して、高分子ミセル型ナノデバイスを用いた経肺投与による遺伝子治療法を確立するため、片岡グループとの共同研究で、in vivo での遺伝子導入効率が良く、安全性の高い高分子ナノデバイスの開発を行っている。平成 21 年度では、将来の肺動脈性肺高血圧症患者に対する臨床応用を念頭に置いて、PEG-PAsp(DET)による遺伝子の複数回導入による遺伝子発現量の変化の検討を行った。ルシフェラーゼ遺伝子を含む pGL3-Control(Promega)を用いて、7 日間の間隔で 2 回投与してルシフェラーゼ活性を測定したところ、活性は半分に低下を認めた。一方、ルシフェラーゼ遺伝子部分の CpG を取り除いたプラスミドである(pORF-LucSh-ΔCpG)を7日間の間隔をあけて投与したところ、2回目投与後でもルシフェラーゼ活性の低下は認められなかった。一方、炎症性サイトカインの mRNA は、pORF-LucSh-ΔCpG 投与後のほうが、pGL3-Control 投与後よりも高値であった。

2) 高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による嚢胞性線維症(CF)治療への基礎実験

平成 20 年度までの成果で、高分子ミセル型ナノデバイスを用いた経肺遺伝子導入による肺動脈性肺高血圧症の治療実験に成功している^(F-1)。これらの経験を生かして平成 21 年度は、欧米で特に頻度が高く、予後が悪い重篤な疾患である CF 治療への応用にむけた基礎実験を行った。CF の気管上皮細胞に対して PEG-PAsp(DET)を用いて遺伝子導入を行い、健常人の気管上皮細胞の約 10 倍もの遺伝子導入効率を認めること、N/P 比は 40-60 で遺伝子発現量が最大になること、N/P 比が 60 以下であれば、細胞傷害性を認めないことがわかった。PEG-PAsp(DET)を用いて CF 細胞に CFTR 発現プラスミドを導入して、塩化物イオンチャンネルの機能を Forskolin 刺激による

MQAE assay で評価したところ、細胞内から細胞外への塩化物イオンの移動の改善を認めた。現在、CF モデルマウスを購入して SPF 化を行ない、治療実験に備えている。

3) 高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による急性の毒性軽減に向けての試み

平成 20 年度の急性および慢性の毒性評価から、高分子ミセル型ナノデバイス投与後 1 日目には、肺での炎症性サイトカインの発現が認められ、7 日目には低下していたことがわかった^(F-1)。将来の臨床応用を考えると、1 日目の一過性炎症反応の抑制を検討する必要があると考えられた。平成 21 年度では、高分子ミセル型ナノデバイス投与後の炎症反応を低下させる取り組みとして、導入遺伝子に存在する CpG の急性炎症惹起への影響について検討した。PEG-PAsp(DET)を用いてルシフェラーゼ遺伝子部分の CpG を除去したプラスミドである(pORF-LucSh-ΔCpG)を経肺投与したところ、1 日目から 14 日目まで、遺伝子発現量は、通常のルシフェラーゼ発現 pDNA に比べて高値を示した。しかしながら、投与 1 日後の炎症性サイトカイン mRNA 発現量は、依然として高値を示しており、さらなる改善が必要であると考えられる。

4) アポリポrotein B 遺伝子発現修飾機能性核酸の PEG-PAsp(DET)を用いた in vitro 遺伝子導入条件の検討

家族性高コレステロール血症に対するアポリポrotein B 遺伝子発現修飾機能性核酸による遺伝子治療法の開発のため、平成 20 年度までに in vitro におけるアポリポrotein B 遺伝子 editing の mRNA レベルおよびタンパク質レベルの評価系を確立しており、平成 21 年度では、これらの評価系を用いて、佐々木グループで作製された機能性核酸についての機能評価を行なった。機能性核酸[X=NO-thioG]のアンチセンス効果による ApoB 産生低下を認めたが、ApoB mRNA 編集が起こっているデータは得られなかった。検討に用いた機能性核酸の ApoB mRNA への affinity や、酵素分解に対する耐性に改善点があることがわかり、現在、耐分解性能を持つ機能性核酸の開発が進められている。

5) 機能性核酸の PEG-PAsp(DET)を用いた in vivo 遺伝子導入条件の基礎的検討

In vivo での CF 遺伝子導入による治療実験を行うため、アメリカより Apobec-1 ノックアウトマウスを入手し、SPF 化作業を行なった。現在、繁殖を行ない、in vivo の治療実験に備えている。

(G) 岡本グループ

1) 高分子ミセル型ナノデバイスを基盤とした吸入用ドライパウダー調製法の確立

マンニトール(Man)を賦形剤とした吸入用ドライパウダーを噴霧急速凍結乾燥(SFD)法で調製したところ、多孔質な球状粒子が得られるものの粒子どうしが凝集しやすい傾向にあり、粒子の吸入特性をカスケードインパクターで測定した結果、Fine Particle Fraction (FPF:微粒子肺深部到達率の指標)が約 18%であった。さらなる吸入特性の改善に向けて、微粒子の表面エネルギーを低下させ付着凝集性を改善するとの報告がある L-ロイシンを添加し、吸入用ドライパウダーを調製した。

その結果、L-ロイシン5%添加時にFPF値が約36%に増加し、吸入特性を大きく改善することに成功した。また調製条件の最適化を行い、噴霧空気圧を150 kPaにすることで回収率が高くかつ吸入特性に優れたドライパウダーを調製できることが明らかとなった。最適化された組成・条件に基づきレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼをコードしたプラスミドDNA(pCMV-Luc)、ベクターとしてPEG-PAsp(DET)を組み込んだ高分子ミセル型ナノデバイスドライパウダーをSFD法により調製したところ、高分子ミセル型ナノデバイス封入による粒子形状への大きな影響は認められず、吸入剤に適した粒子形状を維持していた。また、ゼータサイザーの測定結果から、調製前後でpCMV-LucとPEG-PAsp(DET)から形成される複合体の平均粒子径に大きな違いは確認されず、ドライパウダー製剤化後も高分子ミセル型ナノデバイスによる遺伝子導入効果が十分に保持されているものと推察された。現在、さらなる調製条件の最適化について検討を進めている。一方、これまでに当研究室で進めてきた超臨界二酸化炭素晶析(SCF)法についても、SFD製剤調製時と同じ組成の高分子ミセル型ナノデバイス溶液からドライパウダーが得られている。得られた粒子の形状はマンニトールのみで調製したものと大きく変化しておらず、微細な針状粒子であった。現在、SCF製剤についても、SFD製剤同様の物理化学的特性評価を進めている。

2) 高分子ミセル型ナノデバイスドライパウダーによる遺伝子肺送達

In vivoでのドライパウダーの肺内送達を評価するためにインドシアニングリーン(ICG)を組み込んだ高分子ミセル型ナノデバイスドライパウダーをSFD法で調製し、マウス肺内投与後の製剤肺内送達と遺伝子発現パターンについてin vivoイメージングシステムを用いて解析した。その結果、肺内でICGの蛍光が確認されたマウスについてルシフェラーゼ発現に由来する発光が認められ、投与後6 hr~9 hrに最大発光値を示すことが明らかとなった。現在、さらなる遺伝子導入効果に向けたN/P比の最適化、同組成の溶液製剤や他の遺伝子ベクターを用いたドライパウダー製剤との遺伝子発現パターンの比較について検討を進めている。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表 A

● 論文詳細情報

- A-1. S. Matsumoto, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Miyata, A. Ishii, M. Oba, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Environment-responsive block copolymer micelles with a disulfide cross-linked core for enhanced siRNA delivery. *Biomacromolecules* **10** (1) 119-127 (2009), DOI: 10.1021/bm800985e
- A-2. W. Wang, K. Itaka, S. Ohba, N. Nishiyama, U. Chung, Y. Yamasaki, K. Kataoka, 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* **30** (14) 2705-2715 (2009), DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.030

- A-3. W. -F. Dong, A. Kishimura, Y. Anraku, C. Sayan, K. Kataoka, Monodispersed polymeric nanocapsules: Spontaneous evolution and morphology transition from reducible hetero-PEG PICmicelles by controlled degradation. *J. Am. Chem. Soc.* **131** (11) 3804–3805 (2009), DOI: 10.1021/ja808419b
- A-4. Y. Matsumoto, K. Itaka, T. Yamasoba, K. Kataoka, Intranuclear fluorescence resonance energy transfer analysis of plasmid DNA decondensation from nonviral gene carriers. *J. Gene. Med.* **11** (7) 615–623 (2009), DOI: 10.1002/jgm.1338
- A-5. M. Han, M. Oba, N. Nishiyama, M.R. Kano, S. Kizaka-Kondoh, K. Kataoka, Enhanced percolation and gene expression in tumor hypoxia by PEGylated polyplex micelles. *Mol. Ther.* **17** (8) 1404–1410 (2009), DOI: 10.1038/mt.2009.119
- A-6. M. Nakanishi, K. Kataoka, Synthesis of heterotelechelic poly(ethylene glycol)-block-poly(succinimide) possessing both acetal and tert-butoxycarbonyl-amino terminals with narrow molecular weight distribution. *Macromol. Symp.* **279** (1) 14–20 (2009), DOI: 10.1002/masy.200950503
- A-7. H. Oana, A. Kishimura, K. Yonehara, Y. Yamasaki, M. Washizu, K. Kataoka, Spontaneous formation of giant unilamellar vesicles from microdroplets of a polyion complex by thermally induced phase separation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (25) 4613–4616 (2009), DOI: 10.1002/anie.200900721
- A-8. Y. Lee, T. Ishii, H. Cabral, H. -J. Kim, J. -H. Seo, N. Nishiyama, H. Oshima, K. Osada, K. Kataoka, Charge-conversional polyionic complex micelles-efficient nanocarriers for protein delivery into cytoplasm. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48** (29) 5309–5312 (2009), DOI: 10.1002/anie.200900064
- A-9. M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y. Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol Ther.* **17** (7) 1180–1186 (2009), DOI: 10.1038/mt.2009.63
- A-10. A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, K. Kataoka, Y. Miyahara, Glucose-sensitive field effect transistor using totally synthetic compounds. *J. Solid State Electrochem.* **13** (1) 165–170 (2009), DOI: 10.1007/s10008-008-0610-7
- A-11. A. Matsumoto, N. Sato, K. Kataoka, Y. Miyahara, Noninvasive sialic acid detection at cell membrane by using phenylboronic acid modified self-assembled monolayer gold electrode. *J. Am. Chem. Soc.* **131** (34) 12022–12023 (2009), DOI: 10.1021/ja902964m
- A-12. N. Yagi, I. Manabe, T. Tottori, A. Ishihara, F. Ogata, J. -H. Kim, S. Nishimura, K. Fujii, Y. Oishi, K. Itaka, Y. Kato, M. Yamauchi, R. Nagai, A nanoparticle system specifically designed to deliver short interfering RNA inhibits tumor growth in vivo.

- Cancer Res.* **69** (16) 6531–6538 (2009), DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3945
- A-13. M. Zhang, A. Ishii, N. Nishiyama, S. Matsumoto, T. Ishii, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated calcium phosphate nanocomposites as smart environment-sensitive carriers for siRNA delivery. *Adv. Mater.* **21** (34) 3520–3525 (2009), DOI: 10.1002/adma.200800448
- A-14. A. Matsumoto, N. Sato, T. Sakata, R. Yoshida, K. Kataoka, Y. Miyahara, Chemical-to-electrical-signal transduction synchronized with smart gel volume phase transition. *Adv. Mater.* **21** (43) 4372–4378 (2009), DOI: 10.1002/adma.200900693
- A-15. M. Kumagai, M. R. Kano, Y. Morishita, M. Ota, Y. Imai, N. Nishiyama, M. Sekino, S. Ueno, K. Miyazono, K. Kataoka, Enhanced magnetic resonance imaging of experimental pancreatic tumor in vivo by block-copolymer-coated magnetite nanoparticles with TGF-beta inhibitor. *J. Control. Release* **140** (3) 306–311 (2009), DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.06.002
- A-16. 三宅裕、立石昇一朗、脇田晃光、村原中、宮崎幸造、村岡未帆、西山伸宏、片岡一則：生体投与された蛍光標識物質の血中・臓器内濃度の高感度測定システムの開発 *生体医工学* **47** (6) 610–617 (2009)
- A-17. Y. Anraku, A. Kishimura, M. Oba, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Spontaneous formation of nanosized unilamellar polyion complex vesicles with tunable size and properties. *J. Am. Chem. Soc.* **132** (5) 1631–1636 (2010), DOI: 10.1021/ja908350e
- A-18. S. Hiki, K. Kataoka, Versatile and selective synthesis of “Click Chemistry” compatible heterobifunctional poly(ethylene glycol)s possessing azide and alkyne functionalities. *Bioconjugate. Chem.* **21** (2) 248–254 (2010), DOI: 10.1021/bc900253p
- A-19. K. Itaka, K. Osada, K. Morii, P. Kim, S. -H. Yun, K. Kataoka, Polyplex nanomicelle promotes hydrodynamic gene introduction to skeletal muscle. *J. Control. Release* **143** (1) 112–119 (2010), DOI:10.1016/j.jconrel.2009.12.014
- A-20. A. Matsumoto, K. Yamamoto, R. Yoshida, K. Kataoka, T. Aoyagi, Y. Miyahara, A totally synthetic glucose responsive gel operating in physiological aqueous conditions. *Chem. Commun.* **46** (13) 2203–2205 (2010), DOI: 10.1039/b920319b
- A-21. K. Itaka, T. Ishii, Y. Hasegawa, K. Kataoka, Biodegradable polyamino acid-based polycations as safe and effective gene carrier minimizing cumulative toxicity. *Biomaterials* **31** (13) 3707–3714 (2010), DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.11.072
- A-22. K. Miyata, N. Gouda, H. Takemoto, M. Oba, Y. Lee, H. Koyama, Y. Yamasaki, K. Itaka, N. Nishiyama, K. Kataoka, Enhanced transfection with silica-coated polyplexes loading plasmid DNA. *Biomaterials* **31** (17) 4764–4770 (2010), DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.033
- A-23. Y. Lee, T. Ishii, H. -J. Kim, N. Nishiyama, Y. Hayakawa, K. Itaka, K. Kataoka,

- Efficient delivery of bioactive antibodies into the cytoplasm of living cells by charge-conversional polyion complex micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (14) 2552–2555 (2010), DOI:10.1002/ange.200905264
- A-24. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles. *J. Control. Release* in press, DOI:10.1016/j.jconrel.2010.02.002
- A-25. M. Oba, Y. Vachutinsky, K. Miyata, M. R. Kano, S. Ikeda, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Miyazono, H. Koyama, K. Kataoka, Antiangiogenic gene therapy of solid tumor by systemic injection of polyplex micelles loading plasmid DNA encoding soluble Flt-1. *Mol. Pharm.* in press, DOI: 10.1021/mp9002317
- A-26. T. Matsunaga, T. Sakai, Y. Akagi, U. Chung, M. Shibayama, SANS and SLS Studies on Tetra-Arm PEG Gels in As-Prepared and Swollen States. *Macromolecules* **42** 6245–6252 (2009), DOI: 10.1021/ma901013q
- A-27. G.B. Adams, I. R. Alley, U. Chung, K. T. Chabner, E. S. Marsters, M. Chen, L.S. Weinstein, H. M. Kronenberg, D.T. Scadden, Haematopoietic stem cells depend on G α s-mediated signalling to engraft bone marrow. *Nature* **459** 103–U111 (2009), DOI:10.1038/nature07859
- A-28. T. Kan, T. Ikeda, T. Saito, F. Yano, N. Ogata, K. Nakamura, U. Chung, H. Kawaguchi, Screening of Chondrogenic Factors by a Real-Time Fluorescence Monitoring Cell Line ATDC5-C2ER: Identification of Sorting Nexin 19 as a Novel Factor. *Arthritis Rheum* **60** 3314–3323 (2009), DOI: 10.1002/art.24878
- A-29. M. Ushita, T. Saito, T. Ikeda, F. Yano, A. Higashikawa, N. Ogata, U. Chung, K. Nakamura, H. Kawaguchi, Transcriptional induction of SOX9 by NF- κ B family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthritis Cartilage* **17** 1065–1075 (2009), DOI:10.1016/j.joca.2009.02.003
- A-30. K. Yamamoto, K. Igawa, H. Ueno, F. Yano, U. Chung, I. Koshima, Temporal and spatial changes in element distribution in bone and cartilage. *J. Orthop. Sci.* **14** 190–203 (2009)., DOI: 10.1007/s00776-008-1315-6
- A-31. J. Zhao, M. Shinkai, T. Takezawa, S. Ohba, U. Chung, T. Nagamune, Bone Regeneration Using Collagen Type I Vitrigel with Bone Morphogenetic Protein-2. *J. Biosci. Bioeng.* **107** 318–323 (2009), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2008.10.007
- A-32. A. Higashikawa, T. Saito, T. Ikeda, S. Kamekura, N. Kawamura, A. Kan, Y. Oshima, S. Ohba, N. Ogata, K. Nakamura, U. Chung, H. Kawaguchi, Identification of the core element responsive to Runx2 in the promoter of human type X collagen gene. *Arthritis. Rheum.* **60** 166–178 (2009), DOI: 10.1002/art.24243

- A-33. M. Hirata, F. Kugimiya, S. Ohba, N. Kawamura, T. Ogasawara, Y. Kawasaki, A. Fukai, T. Ikeda, K. Nakamura, U. Chung, H. Kawaguchi, C/EBP β promotes transition from proliferation to hypertrophic differentiation of chondrocytes through transactivation of p57Kip2. *PLoS. ONE* **4** e4543 (2009).
- A-34. Y. Akagi, T. Matsunaga, M. Shibayama, U. Chung, T. Sakai, Evaluation of topological defects in Tetra-PEG gels. *Macromolecules*, in press, DOI: 10.1021/ma9019009
- A-35. M. Wada, S. Watanabe, U. Chung, N. Higo, T. Taniguchi, S. Kitazawa, Noninvasive bioluminescence imaging of c-fos expression in the mouse barrel cortex. *Behavioural Brain Research*, in press, DOI: 10.1016/j.bbr.2009.11.024
- A-36. Y. Shinoda, H. Kawaguchi, A. Higashikawa, K. Nakamura, U. Chung, N. Ogata, Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J. Cell. Biochem.* in press, DOI: 10.1002/jcb.22454
- A-37. A. Fukai, N. Kawamura, T. Saito, Y. Oshima, T. Ikeda, F. Kugimiya, H. Higashikawa, F. Yano, N. Ogata, K. Nakamura, U. Chung, H. Kawaguchi, Akt1 in chondrocytes controls cartilage calcification during endochondral ossification under physiological and pathological conditions. *Arthritis. Rheum.* in press, DOI: 10.1002/art.27296
- A-38. J. Zhao, S. Ohba, Y. Komiyama, M. Shinkai, U. Chung, T. Nagamune, Icariin: A potential osteoconductive compound for bone tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. in press, DOI:10.1089/ten.tea.2009.0165.
- A-39. T. Ogasawara, S. Ohba, Y. Fujihara, T. Takahashi, G. Liu, D. Chikazu, H. Suenaga, U. Chung, T. Yoda, Y. Mori, T. Susami, T. Takato, K. Hoshi, Effects of transforming growth factor (TGF)- β 1 in combination with fibroblast growth factor (FGF)-2 and insulin-like growth factor (IGF)-I on chondrocytes proliferation culture for the cartilage regenerative medicine. *Asian. J. Oral. Maxillofac. Surg.* in press.
- A-40. G. Liu, T. Ogasawara, J. Watanabe, K. Ishihara, K. Asawa, U. Chung, T. Moro, T. Takatori, T. Takato, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Hoshi, Selection of highly osteogenic and chondrogenic cells from bone marrow stromal cells in biocompatible polymer-coated plates. *J. Biomed. Mater. Res. A*. in press, DOI: 10.1002/jbm.a.32460
- A-41. M. Sanjoh, S. Hiki, Y. Lee, M. Oba, K. Miyata, T. Ishii, K. Kataoka, pDNA/poly(L-lysine) polyplexes functionalized with a pH-sensitive charge-conversional poly(aspartamide) derivatives for controlled gene delivery to human umbilical vein endothelial cells, *Macromol. Rapid Commun.* in press.
- A-42. H. Shimizu, Y. Hori, S. Kaname, K. Yamada, N. Nishiyama, S. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, A. Yamada, K. Kataoka, T. Fujita, siRNA-based therapy ameliorates glomerulonephritis, *J. Am. Soc. Nephrol.* in press, DOI: 10.1681/ASN.2009030295

- B-1-1. H. Hatakeyama, E. Ito, H. Akita, M. Oishi, Y. Nagasaki, S. Futaki, H. Harashima, pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles *in vitro* and in vivo. *J. Control. Release*, **139** (2) 127–132 (2009), DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.06.008
- B-1-2. T. Masuda, H. Akita, K. Niikura, T. Nishio, M. Ukawa, K. Enoto, R. Danev, K. Nagayama, K. Ijro, H. Harashima, Envelope-type lipid nanoparticles incorporating a short PEG-lipid conjugate for improved control of intracellular trafficking and transgene transcription. *Biomaterials* **30** (27) 4806–14 (2009), DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.05.036
- B-1-3. A. El-Sayed, T. Masuda, I. Khalil, H. Akita, H. Harashima, Enhanced gene expression by a novel stearylated INF7 peptide derivative through fusion independent endosomal escape. *J Control Release*. **138** (2) 160–7 (2009), DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.05.018
- B-1-4. D. Kurihara, H. Akita, A. Kudo, T. Masuda, S. Futaki, H. Harashima, Effect of polyethyleneglycol spacer on the binding properties of nuclear localization signal-modified liposomes to isolated nucleus. *Biol Pharm Bull.* **32** (7) 1303–6 (2009), DOI: 10.1248/bpb.32.1303
- B-1-5. H. Kamiya, S. Fukunaga, T. Ohyama, H. Harashima, Effects of carriers on transgene expression from plasmids containing a DNA sequence with high histone affinity. *Int. J. Pharm.* **376** (1–2) 99–103 (2009), DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.04.032
- B-1-6. H. Kamiya, H. Goto, H. Harashima, Effects of non-B DNA sequences on transgene expression. *J. Biosci. Bioengng* **108** (1) 20–23 (2009), DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.02.013
- B-1-7. T. Higashi, I. A. Khalil, K. K. Maiti, W. S. Lee, H. Akita, H. Harashima, S. K. Chung, Novel lipidated sorbitol-based molecular transporters for non-viral gene delivery. *J Control Release* **136** (2) 140–7 (2009), DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.01.024
- B-1-8. H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguti, I. A. Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure, H. Harashima, Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* **30** (15) 2940–9 (2009), DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.009
- B-1-9. Y. Sakurai, H. Hatakeyama, H. Akita, M. Oishi, Y. Nagasaki, S. Futaki, H. Harashima, Efficient siRNA delivery to tumor cells using the combination of octaarginine, GALA and tumor-specific, cleavable PEG system. *Biol. Pharm. Bull.* **32** (5) 928–932 (2009), DOI: 10.1248/bpb.32.928
- B-1-10. H. Kamiya, M. Uchiyama, J. Piao, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Harashima, Targeted sequence alteration of a chromosomal locus in mouse liver. *Int. J. Pharm.*, **387** (1–2),

- 180–183 (2010), DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.020
- B-1-11. T. Fujiwara, H. Akita, H. Harashima, Intracellular fate of octaarginine-modified liposomes in polarized MDCK cells. *Int J Pharm.* in press, DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.11.005
- B-2-1. Homhuan, K. Kogure, T. Nakamura, N. Shastri, H. Harashima, Enhanced antigen presentation and CTL activity by transduction of mature rather than immature dendritic cells with octaarginine-modified liposomes. *J. Control. Release* **136** 79–85 (2009), DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.01.004
- B-2-2. H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguchi, I.A. Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure, H. Harashima, Multi-layered nano particles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* **30** 2940–2949 (2009), DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.02.009
- B-2-3. K. Kigasawa, K. Kajimoto, M. Watanabe, K. Kanamura, A. Saito, K. Kogure, In vivo transdermal delivery of diclofenac by ion-exchange iontophoresis with geraniol. *Biol. Pharm. Bull.* **32** 684–687 (2009), DOI:10.1248/bpb.32.684
- B-2-4. Joraku, A. Homhuan, K. Kawai, T. Yamamoto, J. Miyazaki, K. Kogure, I. Yano, H. Harashima, H. Akaza, Immunoprotection against murine bladder carcinoma by octaarginine-modified liposomes incorporating cell wall of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* **103** 686–693 (2009), DOI: 10.1111/j.1464-410X.2008.08235.x
- B-2-5. K. Kigasawa, K. Kajimoto, S. Hama, A. Saito, K. Kanamura, K. Kogure, Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. *Int. J. Pharm.* **383** 157–160 (2010), DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.08.036
- C-1. X. Yuan, D. Fabregat, K. Yoshimoto, Y. Nagasaki, Efficient inhibition of interfacial nonspecific interaction to create practically utilizable high ferritin-response immunolatex. *Anal. Chem.* **81** (24) 10097–10105 (2009), DOI: 10.1021/ac902055w.
- C-2. H. Hatakeyama, E. Ito, H. Akita, M. Oishi, Y. Nagasaki, S. Futaki, H. Harashima, A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **139** 127–132 (2009), DOI: 10.1016/j.jconrel.2009.06.008.
- C-3. T. Yoshitomi, R. Suzuki, T. Mamiya, H. Matsui, A. Hirayama Y. Nagasaki, pH-Sensitive radical-containing-nanoparticle (RNP) for the L-band-EPR imaging of low pH circumstances. *Bioconjugate Chem.* **20** (9) 1792–1798 (2009), DOI: 10.1021/bc900214f.

- C-4. M. Oishi, T. Nakamura, Y. Jinji, K. Matsuishi, Y. Nagasaki, Multi-stimuli-triggered release of charged dye from smart PEGylated nanogels containing gold nanoparticles to regulate fluorescence signals. *J. Mater. Chem.* **19** (33) 5909–5912 (2009), DOI: 10.1039/b910060a.
- C-5. K. Yoshimoto, M. Nozawa, S. Matsumoto, T. Echigo, S. Nemoto, T. Hatta, Y. Nagasaki, Studies on the adsorption property and structure of polyamine-ended poly(ethylene glycol) derivatives on a gold surface by surface plasmon resonance and angle-resolved X-ray photoelectron spectroscopy. *Langmuir* **25** (20) 12243–12249 (2009). DOI: 10.1021/la901143h
- C-6. A. Tamura, M. Oishi, Y. Nagasaki, Enhanced cytoplasmic delivery of siRNA using a stabilized polyion complex based on the PEGylated nanogels with a cross-linked polyamine structure. *Biomacromolecules* **10** (7) 1818–1827 (2009), DOI: 10.1021/bm900252d
- C-7. H. Furusho, K. Kitano, S. Hamaguchi, Y. Nagasaki, Preparation of stable water-dispersible PEGylated gold nanoparticles assisted by nonequilibrium atmospheric-pressure plasma jets. *Chem. Mater.* **21** (15) 3526–3535 (2009), DOI: 10.1021/cm803290b.
- C-8. Y. Sakurai, H. Hatakeyama, H. Akita, M. Oishi, Y. Nagasaki, S. Futaki, H. Harashima, Efficient short interference RNA delivery to tumor cells using a combination of octaarginine, GALA and tumor-specific cleavable polyethylene glycol system. *Bio. Pharm. Bull.* **32** (5) 928–932 (2009), DOI: 10.1248/bpb.32.928.
- C-9. R. Kojima, K. Yoshimoto, H. Miyoshi, Y. Nagasaki, Spheroid array of fetal mouse liver cells constructed on a PEG-gel micropatterned surface: Upregulation of hepatic functions by co-culture with nonparenchymal liver cells. *Lab on a Chip* **9** (14) 1991–1993 (2009), DOI: 10.1039/b903388b.
- C-10. K. Yoshimoto, M. Ichino, Y. Nagasaki, Inverted pattern formation of cell microarrays on poly(ethylene glycol) (PEG) gel patterned surface and construction of hepatocyte spheroids on unmodified PEG gel microdomains. *Lab on a Chip* **9** (9) 1286–1289 (2009), DOI: 10.1039/b818610n.
- C-11. S. Ganguli, K. Yoshimoto, S. Tomita, H. Sakuma, T. Matsuoka, K. Shiraki, Y. Nagasaki, Regulation of lysozyme activity based on thermotolerant protein/smart polymer complex formation. *J. Am. Chem. Soc.* **131** (18) 6549–6553 (2009), DOI: 10.1021/ja900786z.
- C-12. T. Yoshitomi, D. Miyamoto, Y. Nagasaki, Design of core-shell-type nanoparticles carrying stable radicals in the core. *Biomacromolecules* **10** (3) 596–601 (2009), DOI: 10.1021/bm801278n.

- C-13. H. Atsumi, K. Yoshimoto, S. Saito, M. Ohkuma, M. Maeda, Y. Nagasaki, Luminescence-based colorimetric discrimination of single-nucleotide transversions by the combined use of the derivatives of DOTA-conjugated naphthyridine and its terbium complex. *Tetra. Lett.* **50** (19) 2177–2180 (2009), DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.02.152.
- C-14. X. Yuan, K. Yoshimoto, Y. Nagasaki, High-performance immunolates possessing a mixed-PEG/antibody Co-immobilized surface: High sensitive ferritin immunodiagnostics. *Anal. Chem.* **81** (4) 1549–1556 (2009), DOI: 10.1021/ac802282c.
- C-15. H. Furusho, M. Oishi, T. Kishi, A. Yasumori, Y. Nagasaki, Preparation and molecular recognition of SERS probe based on gold nanoparticles constructed from PEG-oligoamine copolymer possessing a coumarin Group between PEG and oligoamine. *Chem. Lett.* **39** (1) 52–53 (2009), DOI: 10.1246/cl.2010.52.
- C-16. K. Yoshimoto, T. Hirase, J. Madsen, S. P. Armes, Y. Nagasaki, Non-fouling character of poly[2-(methacryloyloxy)ethyl phosphorylcholine] modified gold surfaces fabricated by the “grafting to” method: Comparison of its protein resistance with poly(ethylene glycol) modified gold surfaces. *Macromol. Rapid Comm.* **30** (24) 2136–2140 (2009), DOI: 10.1002/marc.200900484.
- C-17. S. Ganguli, K. Yoshimoto, S. Tomita, H. Sakuma, T. Matsuoka, K. Shiraki, Y. Nagasaki, Improving the Heat Resistance of Ribonuclease A by the Addition of poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate)-graft-poly(ethylene glycol) (PEAMA-g-PEG). *Macromolecular Bioscience*. in press, DOI: 10.1002/mabi.200900432
- C-18. M. Oishi, Y. Nagasaki, Stimuli-Responsive Smart Nanogels for Cancer Diagnostics and Therapy. *Nanomedicine* in press.
- C-19. T. Nakamura, A. Tamura, H. Murotani, M. Oishi, Y. Jinji, K. Matsuishi, Y. Nagasaki, Large Payloads of Gold Nanoparticles into the Polyamine Network Core of Stimuli-Responsive PEGylated Nanogels for Selective and Noninvasive Cancer Photothermal Therapy. *Nanoscale* in press.
- D-1-1. T. Nasr, Z. Li, O. Nakagawa, Y. Taniguchi, S. Ono, S. Sasaki, Selective Fluorescence Quenching of the 8-OxoG-clamp by 8-Oxodeoxyguanosine in ODN, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19** (3) 727–730 (2009), DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.12.036
- D-1-2. M. M. Ali, S. Imoto, Y. Li, i S. Sasak F. Nagatsugi, Incorporation of inducible nucleotide analog into DNA by DNA polymerases, *Bioorg. Med. Chem.* **17** (7) 859–2863 (2009), DOI: 10.1016/j.bmc.2009.02.024
- D-1-3. K Onizuka, Taniguchi Y., Sasaki S., Site-specific covalent modification of nucleic acids guided by functionality-transfer oligodeoxynucleotides *Bioconjugate Chem.* **20** (4) 799–803 (2009), DOI: 10.1021/bc900009p

- D-1-4. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, A New Odorless Procedure for the synthesis of 2'-deoxy-6-thioguanosine and Its Incorporation Into Oligonucleotides, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*. **28** 752-760 (2009), DOI: 10.1080/15257770903155576
- D-1-5. Y. Taniguchi, Y. Uchida, T. Takaki, E. Aoki, S. Sasaki, Recognition of CG interrupting site by W-shaped nucleoside analogs (WNA) having the pyrazole ring in an anti-parallel triplex DNA, *Bioorg. Med. Chem.* **17** 6803-6810 (2009), DOI: 10.1016/j.bmc.2009.08.040
- D-1-6. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, A New Usage of Functionalized Oligodeoxynucleotide Probe for Site-Specific Modification of a Guanine Base within RNA, *Nucleic Acids Res.* **38** 1760-1766 (2010)., DOI:10.1093/nar/gkp930. Nucl. Acids Res. **38**: 1760-1766.
- D-1-7. Y. Taniguchi, Y. Kurose, T. Nishioka, F. Nagatsugi, S. Sasaki, The Alkyl-Connected 2-Amino-6-Vinylprine (AVP) Crosslinking Agent for Improved Selectivity to the Cytosine Base in RNA. *Bioorg. Med. Chem.* Accepted (2009).
- D-2-1. K. Hattori, T. Hirohama, S. Imoto, S. Kusano, F. Nagatsugi, Formation of highly selective and efficient interstrand cross-linking to thymine without photo-irradiation, *Chem. Comm.*, **42**, 6463-6465 (2009), DOI: 10.1039/b915381k
- D-2-2. M. M. Ali, S. Imoto, Y. Li, S. Sasaki, F. Nagatsugi, Incorporation of an inducible nucleotide analog into DNA by DNA polymerases, *Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 2859-2863 (2009), DOI: 10.1016/j.bmc.2009.02.024
- E-1. J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, Y. Matsumura. Potent antitumor effect of SN-38-incorporating polymeric micelle, NK012, against malignant glioma. *Int J Cancer*. **124** 2505-2511 (2009), DOI: 10.1002/ijc.24171
- E-2. Y. Matsumura, K. Kataoka. Preclinical and clinical studies of anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci*. **100** 572-579 (2009), DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01103.x
- E-3. T. Nagano, M. Yasunaga, K. Goto, H. Kenmotsu, Y. Koga, J. Kuroda, Y. Nishimura, T. Sugino, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura. Antitumor activity of NK012 combined with cisplatin against small-cell lung cancer and intestinal mucosal changes in tumor-bearing mouse after treatment. *Clin Cancer Res*. **15** (13): 4348-4355 (2009), DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-3334
- E-4. Y. Matsumura. NK012. *Drugs of the Future*. (Thomson Reuters) **34**(4): 276-281 (2009).
- E-5. J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, T. Sugino, Y. Matsumura. Antitumor Effect of NK012, a 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin-Incorporating Polymeric Micelle, on

- U87MG Orthotopic Glioblastoma in Mice Compared with Irinotecan Hydrochloride in Combination with Bevacizumab *Clin Cancer Res.* in press, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2393
- E-6. Y Saito, M Yasunaga, J Kuroda, Y Koga, Y Matsumura. Antitumour activity of NK012, SN-38-Incorporating Polymeric Micelles, in Hypovascular Orthotopic Pancreatic Tumour. *Euro J Cancer*, in press, DOI: 10.1016/j.ejca.2009.11.014
- E-7. H Kenmotsu, M Yasunaga, J Kuroda, Y Koga, A Takahashi, T Nagano, K Goto, Y Nishiwaki, Y Matsumura. The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts. *Cancer*, in press.
- F-1. M. Harada-Shiba, I. Takamisawa, K. Miyata, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, K. Kangawa, F. Yoshihara, Y. Asada, K. Hatakeyama, N. Nagaya, K. Kataoka, Intratracheal gene transfer of adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Mol. Ther.* **17** 1180-1186 (2009)., DOI: 10.1038/mt.2009.63
- F-2. K. Watanabe, M. Harada-Shiba, A. Suzuki, R. Gokuden, R. Kurihara, Y. Sugao, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, In vivo siRNA delivery with dendritic poly(L-lysine) for the treatment of hypercholesterolemia. *Mol. Biosyst.* **5** 1306-1310 (2009)., DOI: 10.1039/b900880b
- F-3. M. Harada-Shiba, T. Sugisawa, H. Makino, M. Abe, M. Tsushima, Y. Yoshimasa, T. Yamashita, Y. Miyamoto, A. Yamamoto, H. Tomoike, S. Yokoyama, Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Atheroscler Thromb.* in press
- F-4. K. Harada, Y. Miyamoto, H. Morisaki, Y. Kokubo, N. Ohta, I. Yamanaka, M. Harada-Shiba, H. Makino, A. Okayama, H. Tomoike, Y. Saito, Y. Yoshimasa, T. Morisaki, A novel Thr56Met mutation of the autosomal recessive hypercholesterolemia gene associated with hypercholesterolemia. *J. Atheroscler. Thromb.* **17** 131-140 (2010)
- F-5. Y. Fujita A. Kakino, M. Harada-Shiba, Y. Sato, K. Otsui, R. Yoshimoto, T. Sawamura, C-reactive protein uptake by macrophage via class-A scavenger receptor. *Clin. Chem.* **56** 478-481 (2010)
- G-1. 川口泰永、奥田知将、伴竜典、檀上和美、岡本浩一、イメージングシステムを利用した低分子量キトサン-siRNA 複合体の結合能と RNA 干渉評価. *薬学雑誌* **129** 475-484 (2009)
- G-2. K. Mohri, T. Okuda, A. Mori, K.i Danjo, H. Okamoto, Optimized pulmonary gene

transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation. *J. Controlled Release*, in press DOI:10.1016/j.jconrel.2010.02.018

(4-2) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願件数(国内 15件)

- ② CREST 研究期間累積件数(国内 42件)