

「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ことである。このような「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ことが確信される。

本プロジェクトの5年目に相当する平成17年度においては、昨年度までにナノ構造デバイスの基本設計を確立し、インテリジェント機能の賦与とともに、in vivo における治療効果の確認に成功するという当初目標を大幅に上回る進捗を示した。また新規人工ベクター探索のためのカチオンライブラリーの構築にも成功し、その中から極めて遺伝子発現効率の高いカチオン構造の特定にも成功した。本年度はこれらの構造機能相関を進めるとともに、さらなる高効率遺伝子発現効果や機能性核酸効果を導く機構解明についても本格的な取り組みを行った。すなわち、①マルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの全身投与や局所・経肺経路を目指した構造機能最適化と in vivo 機能評価および構造機能相関、②物理エネルギーの活用によるナノ構造デバイス機能の制御、③細胞内の膜障壁を効率良く突破する機能を有する多重量多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)構築、④機能性核酸および siRNA 搭載のためのインテリジェント型ナノ構造デバイスの機能評価、⑤クロスリンク核酸やアンチセンス核酸の細胞内機能評価および特異的塩基変換を高効率で達成する機能性核酸の機能評価、という主要5項目に関して、以下に述べるように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、効率的な遺伝子発現を示し、局所投与において治療効果が確認されてきている PAsp(DET)系ナノ構造デバイスの最適化を行い、作用機序の解明を試みた。その目的において、in vivo の結果を反映する新しい in vitro アッセイ系を構築することにも成功した。全身投与による遺伝子デリバリーを目的としたナノ構造デバイスに関しては、血清タンパク質との相互作用を中心とした生体内環境下での安定化という機能に絞って新しいナノ構造デバイスの設計を行った。これらのシステムについては、今後、動物実験により効果を検証することとなる。光エネルギーに応答するナノ構造デバイスに関しては、ラットへの局所投与において光照射部位選択的な遺伝子発現を認めることに成功したため、本年度は、全身投与による光選択的遺伝子デリバリーが可能なナノ構造デバイスの構築を行った。一方、デバイスに内包されたプラスミド DNA (pDNA) の凝縮構造と遺伝子発現能については、無細胞発現系で詳細な検討を行い、特異な凝縮度を示すデバイス組成において、naked pDNA よりもむしろ転写活性が亢進するという興味深い結果を見出した。以下、項目ごとに成果を詳細に説明する。

(1) in vivo 遺伝子デリバリーを目指したマルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの最適化

① in vivo 遺伝子導入のためのナノ構造デバイスの最適化

昨年度までの研究において、アスパラギン酸の側鎖にエチレンジアミン構造を導入したポリアミン[PAsp(DET)](図 1)は、既存の遺伝子ベクター(ExGen500 等)よりもきわめて低毒性でありながら高い遺伝子導入効率を示し、結果として初代細胞系および in vivo において効率的な遺伝子導入を行えることが明らかとなっている。そこで本年度は、ポリマーの化学構造の観点から、PAsp(DET)の遺伝子発現機構を明らかとし、in vivo 応用に向けてその最適化を行った。PAsp(DET)(図 1)と、側鎖のメチレン基が一つ多い構造の PAsp(DPT)を 150mM NaCl 下でそれぞれ滴定したところ、大きく異なる結果が得られた。すなわち、PAsp(DET)は、pH7.4 では側鎖のアミノ基のうち 50%、pH5.5 では 85%近くがプロトン化しているのに対し、PAsp(DPT)は、pH7.4 で 85%近いアミノ基がプロトン化しているという結果であった。PAsp(DET)の側鎖は、一段階目のプロトン化状態がゴーシュ型構造となり安定化さ

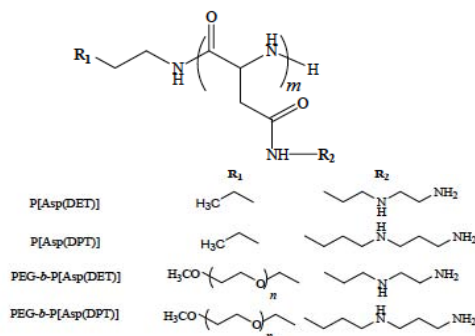


図 1. ポリカチオンの化学構造

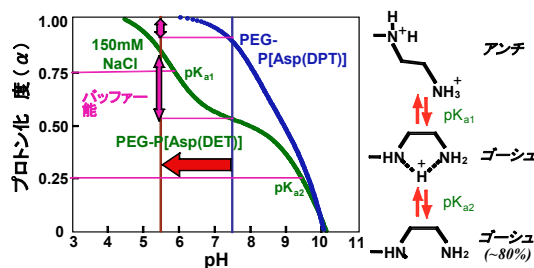


図 2. ポリカチオンの滴定曲線 (150 mM NaCl 中)

れるために、このように明確な 2 段階のプロトン化挙動を示すものと考えられる。その結果、PAsp(DET)は、細胞外 pH(=7.2)環境からエンドソーム内 pH(=5.5)環境に移行するに伴い、強力なバッファー能を示し、そのために高い遺伝子発現を示すものと考えられる。

一方、pH を 7.2、5.5 と変化させて、各ポリカチオンの膜障害性を評価したところ(LDH 活性評価)、PAsp(DPT)は pH に関わらず高い膜障害性を示したのに対し、PAsp(DET)は、pH 7.2 では非常に膜障害性が低いにも関わらず、pH5.5 では PAsp(DPT)と同レベルの高い膜障害性を示した。これらの結果から、PAsp(DET)の遺伝子導入メカニズムに関して、細胞内に取り込まれるまで(pH7.2)は、ナノ構造デバイスは、ゴーシュ型構造により低毒性であるが、細胞に取り込まれエンドソーム(pH5.5)に送り込まれると、高いバッファー効果を示しつつ、プロトン化の進行とともにアンチ型構造に変化し、エンドソーム膜を破壊し、細胞質へ脱出するものと考えられた。

さらに、PAsp(DET)から成るナノ構造デバイスは、その調製条件(濃度)により、遺伝子導入効率が大きく変化することが見出された。これは、調製時の濃度によってナノ構造デバイスの会合数が異なるという解釈により説明される。すなわち、高い濃度で調製した系にはより多くの PAsp(DET)が会合しているため、結果として、DNA とともに多くの PAsp(DET)分子が取り込まれ、効果的なエンドソーム脱出に繋がったものと考えられる。これらの結果は、PAsp(DET)を in vivo 遺伝子導入に展開する上で極めて重要な知見である。

②全身投与による遺伝子デリバリーを目指したナノ構造デバイスの設計

全身投与に適した高分子ミセル型ナノ構造デバイスの実現を目指して、いくつかの新たな系の設計を行った。一つは、血清中での高い安定性とエンドソームから細胞質へと脱出する機能を併せ持つデバイスである。具体的には、DNA と高い親和性を有するリシン(Lys)ユニットと効果的なエンドソームからの脱出を促進するエチレンジアミンユニットという二つの機能分化したユニットを一つのポリマー鎖に併せ持つ PEG-*b*-polyaspartamide 誘導体を合成した。このブロック共重合体の合成は、PEG の一級アミン末端を開始剤とした(ω -benzyl N-aspartate) NCA/ ω -benzyloxycarbonyl L-lysine) NCA の開環共重合とそれに引き続いてのエステル-アミド交換反応によるポリアスパラギン酸側鎖へのエチレンジアミンユニットの導入により行った。引き続いて、エチレンジアミンユニットと Lys ユニットの導入率を系統的に変化させたブロック共重合体を用いて pDNA を内包したナノ構造デバイスを構築し、培養細胞に対して遺伝子発現効率の評価を行ったところ、いずれの系(エチレンジアミン側鎖含率:25~75%)においても、Lys ユニットのみを有する系(PEG-block-Poly(lysine))と比べ、10 倍以上の高い遺伝子発現効率を示した。また、血清中に一定時間侵漬した後に同様の遺伝子導入実験を行ったところ、エチレンジアミンユニットのみを有する系に比較して、Lys を共重合させた系では、発現効率の低下が軽微であった。これは、Lys ユニットのアンカーとして DNA と強く相互作用するために、血清タンパク質によるポリマーの交換反応が抑制されるためであると考えられる。これより、高いバッファー機能を示すエチレンジアミンユニットを側鎖に有するブロック共重合体に、適切な割合で Lys ユニットの導入することによって、血清中での

高い安定性と効率的な遺伝子発現という2つの効果を併せ持つナノ構造デバイスの設計指針を明らかにすることが出来た。

二つ目のアプローチとして、血流中で高い安定性が期待出来るナノ構造デバイスの設計を行った。具体的には、PEG-ポリアスパラギン酸(PAsp)-PLys 三元ブロック共重合体を用いることにより、生体適合性のPEG 外殻とDNA/PLys 複合体内核の中間層として、負電荷を帯びた PAsp 中間層を有するナノ構造デバイスを構築した。負電荷を持った中間層が形成されることにより、血液中における(負電荷を持った)血清タンパク質や血管内皮細胞との非特異的な相互作用が抑制されることが期待できる。実際に、合成した三元ブロック共重合と pDNA から調製したナノ構造デバイスは溶液中で僅かに負のゼータ電位値を示し、血清タンパク質であるアルブミン存在下においても粒径変化を示さず安定であった。これは、同条件下で明らかな粒径増大を示す PEG-PLys の系に比べて対照的な結果である。一方で、負電荷を持った中間層の導入による遺伝子発現効率の低下は認められなかった。以上の結果から、PEG-PAsp-PLys の三元ブロック共重合体から形成されるナノ構造デバイスは、血清タンパク質との相互作用を回避し、血液中での長期循環を実現する系として有望であることが示された。

③標的指向性リガンド導入ナノ構造デバイスの創製と in vivo への展開

ナノ構造デバイスの全身投与では、血流による移動や拡散の影響が大きく作用し、デバイスを標的細胞に取り込ませるためには困難を伴うことが予想される。従って、標的細胞を認識する機能をデバイス表面に装着させ、標的指向性を向上させることが有効な解決策となり得る。前年度は、血管新生部位、内膜肥厚、悪性腫瘍の増殖・転移に関与する $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを認識する環状 RGD ペプチドリガンドをデバイスに装着させ、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンを過剰発現する HeLa 細胞において、リガンドの導入により遺伝子発現が 5 倍に増加することが確認された。本年度は、この効果がリガンドとレセプターの特異的結合を介したデバイスの取り込みによることを確認するために、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現レベルが低い 293T 細胞に対する遺伝子導入実験を試みた(HeLa 細胞と 293T 細胞の $\alpha_v\beta_3$ インテグリンの発現レベルは蛍光抗体を用いてフローサイトメトリーによる検出により確認した)。その結果、環状 RGD ペプチド導入ナノ構造デバイスは、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン陽性の HeLa 細胞に対してのみ、受容体を介して効率的に取り込まれ、高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。

さらに本年度は、汎用性の高いリガンド導入ポリマー合成法の確立を目指して、末端にアジド構造を有する新規なヘテロ二官能性 PEG の合成経路の開拓を行った。このようなアジド末端を有する PEG にはアルキンとの環化付加反応(click chemistry)を利用して様々なリガンドを導入することが可能であり、今後、標的細胞の種類に応じて異なるリガンドを装着したデバイスの設計が容易になるものと期待される。

(2)マルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの局所・経肺経路による in vivo 機能評価

本年度は、項目(1)で効率的な遺伝子発現と低毒性が確認された PEG-*b*-PAsp(DET)から

なるナノ構造デバイス(図 1 参照)による in vivo 遺伝子導入実験と治療遺伝子を用いた治療効果の検証を行った。まず、経肺投与では、蛍光タンパク質 YFP を遺伝子導入したところ、肺全体に明らかな YFP の発現が認められた。そのような遺伝子導入効果は、市販の強力な遺伝子導入試薬である ExGen500 では確認されなかった。このような成果に基づいて、さらに、肺高圧症の遺伝子治療への展開を目指して、肺高圧モデルラットに血管拡張作用を有するアドレノメデュリン発現プラスミドを PEG-*b*-PAsp(DET)を用いて経肺投与により導入した。アドレノメデュリンの発現量を定量 PCR により評価したところ、遺伝子導入により有意にアドレノメデュリンの発現量が上昇することが確認された。その結果、ナノ構造デバイスによるアドレノメデュリンの遺伝子導入により疾患モデルラットの右心室圧の有意な改善が認められた。前年度に報告した高脂血症モデルマウスへのアポ E 遺伝子内包ナノ構造デバイスの経肺投与による血中コレステロール濃度の低下の結果と合わせて、PEG-*b*-PAsp(DET)からなるナノ構造デバイスの経肺投与は、循環器疾患をはじめとする種々の疾患に対する遺伝子治療に非常に有望であると考えられる。

次に、骨再生への応用を目指して、PEG-*b*-PAsp(DET)からなるナノ構造デバイスに骨芽細胞への分化誘導に働く転写因子遺伝子(Runx2)を内包させ、ヒドロキシアパタイトを主成分とするマトリックス中に包含し、マウス頭頂骨骨欠損モデルに対し適用した。その結果、投与後 4 週で担体周囲に新生骨形成が観察された。同一の条件で GFP 遺伝子を in vivo 導入し、GFP に対する蛍光抗体にて観察すると、担体周囲に明瞭な GFP 発現が観察され、確かに本デバイスによって遺伝子導入が達成されていることが確認された。さらに、本デバイスからの遺伝子の徐放性を評価する目的で、マウス由来骨芽細胞培養ディッシュ上にルシフェラーゼ遺伝子内包デバイスを含むマトリックスを留置し、ルシフェラーゼ遺伝子発現を経時的にルシフェラーゼイメージングシステム (IVIS) で観察した。すると、担体周囲を中心にルシフェラーゼの発現が約 3 週に渡って確認され、担体からの長期にわたる遺伝子の徐放が示唆された。このような機能は高い生体親和性、生体内環境での安定性、および低毒性といった性質が相まって達成されているものと考えられ、細胞機能の制御を目的とする in vivo 遺伝子導入として重要な特性であると考えられる。

(3) マルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの機能発現メカニズムの解明

昨年度に引き続き、細胞内移行促進機能を有するナノ構造デバイス(PEG-*b*-PAsp(DET)系)[図 1 参照]の機能評価を重点的に行った。In vitro 遺伝子導入として、初代培養株細胞であるマウス由来の未分化骨芽細胞、皮膚線維芽細胞、ヒト滑膜由来線維芽細胞に遺伝子導入を行った。いずれの細胞に対しても、ルシフェラーゼ遺伝子による評価で、ポリマーのカチオン電荷対 DNA の電荷比を 80 (N/P=80) にて調製したナノ構造デバイスにおいて、既存のポリエチレンイミン (Exgen500) 等の遺伝子導入試薬を大きく上回る遺伝子発現が得られることが確認された。YFP 遺伝子発現の蛍光顕微鏡による観察では、導入後 6 日でマウス未分化骨芽細胞で約 50%、皮膚線維芽細胞で約 20%、ヒト滑膜由来線維芽細胞で約

50%を上回る細胞に遺伝子発現を認めた。また、何れの細胞においても細胞は遺伝子導入を行っていないコントロール細胞とくらべ形態的にほとんど影響は見られず、MTT アッセイによる生細胞数計測にても、コントロールとの有意差を認めなかった。一方 Exgen500 では、強い毒性が生じており、対照的な結果となった。

この効率よい遺伝子導入のメカニズムを検討すべく、フルオレセインおよび Cy3 の二つの蛍光分子で標識した DNA を用いた遺伝子導入後、24 時間後にレーザー共焦点顕微鏡にて観察した。その結果、PEG-*b*-PAsp(DET)/DNA デバイスでは、24 時間後明らかに細胞質内での DNA の効率よい放出が観察され、本デバイスにより効率よい DNA の細胞内デリバリーが達成されていることが確認された。これは同様の効率的細胞内遺伝子デリバリーが可能なポリエチレンイミンの結果と関連するものであり、本デバイスによっても、細胞内に取り込まれた後、効率よいエンドソーム脱出が起こっていることが示唆された。

この細胞へ取り込まれた DNA 量をルシフェラーゼ遺伝子に対するプライマーを用いた定量 PCR 法で定量すると、同デバイスを用いた DNA の細胞内取込みはポリエチレンイミンよりも高い値を示し、その差は時間依存的に大きくなった。これは mRNA レベル、タンパクレベルでそれぞれ定量した遺伝子発現量と非常に良く相関した。この経時的な取り込み増加、発現の持続は、本デバイスの毒性の低さ、特に細胞の活性、ホメオスタシスへの影響の少なさを反映したものと推測し、これを遺伝子導入後の内在性遺伝子発現の変動で評価した。細胞のハウスキーピング遺伝子の発現レベルを定量 PCR にて計測すると、ポリエチレンイミンでは発現がコントロールと比べ著明に減少するのに対し、本デバイスではほとんど影響が見られなかった。即ち、本デバイスは細胞の恒常的機能に対する影響が極めて少ないシステムであることが示唆され、特に初代培養株細胞に対する遺伝子導入において重要な機能となることが確認された。

一方、in vivo で有用な遺伝子ベクターを開発するためには、ベクターの開発に加えて、in vivo を反映する評価系の構築が極めて重要であると考えられる。そのような遺伝子ベクターの評価系としては、(i)毒性に対して高い感受性を有すること、(ii)長期培養における遺伝子発現評価が可能であること、が重要であろう。そこで、本研究では、それらの要件を満たす評価系として、培養ガン細胞(ヒト肝ガン Huh-7 細胞)スフェロイドに対する遺伝子導入実験を行った。本年度は、まず項目(1)①で検討を行った PAsp(DET)と PAsp(DPT)[図 1 参照]の比較検討を行ったところ、単層培養実験では、PAsp(DET)、PAsp(DPT)および市販の遺伝子導入試薬であるポリエチレンイミン(PEI)の間に遺伝子発現効率の大きな差異は認められなかったが、スフェロイド培養実験においては、PAsp(DET)のみが高い遺伝子導入効率を示す一方、PAsp(DPT)および PEI は顕著な毒性を示し、スフェロイドが崩壊することが明らかとなった。また、PAsp(DET)の遺伝子発現効率は、培養後 4-8 日にかけて最大となることも示された。このように、スフェロイド培養を用いることで、従来の単層培養では困難であった長期における遺伝子発現と感度に優れた毒性評価が可能となるものと思われる。さらに、本研究では、ブロック共重合体の PEG の効果を検証するために、PEG-*b*-PAsp(DET)[図 1 参照]からなるナノ構

造デバイスを用いて、ガン細胞スフェロイドへの遺伝子導入実験を行ったところ、PAsp(DET)で毒性が認められた高い荷電混合比(N/P 比)においても全く毒性が認められず、長期にわたり遺伝子発現を示すことが明らかとなった。この結果は、PEG-*b*-PAsp(DET)からなるナノ構造デバイスが、極めて低毒性であり、かつ長期にわたる遺伝子発現を可能にする遺伝子ベクターであることを示唆するものと言えよう。実際に、PEG-*b*-PAsp(DET)からなるナノ構造デバイスを用いた場合のみに、マウス頭頂骨の骨欠損モデルにおいて分化誘導因子の遺伝子導入により、新生骨の形成が認められており、スフェロイド培養実験は、in vivo での効果を強く反映するものであると言える。したがって、スフェロイド培養は、in vivo 遺伝子治療のためのベクタースクリーニング法として非常に有用であるものと考察された。

(4) 物理エネルギーの活用によるナノ構造デバイス機能の制御

光エネルギーを利用したナノ構造デバイスに関しては、前年度までにデンドリマー型光増感剤(DP)を表面に有する三元系ナノ構造デバイスを開発し、ラット結膜下投与において、光照射部位のみに遺伝子導入した蛍光タンパク質の発現を認めることができた。この結果は、動物実験で外部からの光照射による遺伝子発現部位の制御に成功した世界で初めての研究例であった。この研究成果に基づいて、本年度は、前年度までに項目(1)で開発した DNA を内包した内核と生体適合性 PEG 外殻の間にポリカチオンの中間層を有する 3 層型ナノ構造デバイスに DP を静電的に導入した新しい三元系 3 層型ナノ構造デバイスを開発した。DP に表面が覆われた三元系ナノ構造デバイスは、局所投与のみに使用できるが、PEG 層で覆われた三元系 3 層型ナノ構造デバイスは全身投与による光選択的遺伝子デリバリーに使用することができるものと考えられる。本研究では、三元系 3 層型ナノ構造デバイスの形成を電気泳動、光散乱、電気泳動光散乱、原子間力顕微鏡による評価を通じて確認することができた。さらに、三元系 3 層型ナノ構造デバイスに関して、項目(1)②と同様に、アルブミン存在下における粒子の安定性を評価したところ、DP の添加によりアニオン性の中間層が形成されるために、アルブミンと相互作用せず、粒子として安定化されることが明らかとなった。また、この様な三元系 3 層型ナノ構造デバイスを細胞に作用させたところ、光照射により遺伝子発現効率が 100 倍以上に増加し、得られた最大遺伝子発現効率は、本プロジェクト開始時に使用していた PEG-*b*-ポリリシン(PEG-*b*-PLys)からなるナノ構造デバイスの発現効率と比較して実に 1,000 倍以上であった。現在、本システムは、その全身投与による光選択的遺伝子導入の可能性について、疾患モデル動物を用いて検討を行っている。

(5) ナノ構造デバイス内包 DNA における凝縮状態の解明と遺伝子発現の相関性評価

遺伝子発現効率を高めるためには、ナノ構造デバイスの高機能化とともに内包されている DNA の凝縮状態も重要な要素となることが考えられる。そこで、ナノ構造デバイスによる DNA 凝縮過程を詳細に検討するために、等温熱滴定測定から熱力学的検討を行った。ブロック共重合体とホモポリマーによる比較を通して二次凝集抑制を熱力学的に評価するとともに、

凝縮が塩濃度依存的に安定になること、PEG-*b*-PAsp(DET)による凝縮は PEG-*b*-PLL、PEG-*b*-PAsp(DPT)と比較して緩いことを見出した。つづいて折れ畳み状態と遺伝子発現との関係を実細胞タンパク質合成系を用いて調べることによって、デバイス中への DNA 格納状態が実際の機能に及ぼす効果を検討した。二重らせん構造をとることで持続長およそ 50nm にも及ぶ剛直棒状高分子となる DNA が、スーパーコイルからロッド、トロイド、球状にどのように折りたたみ、凝縮していくのかと言う問題に対して、二重らせん構造の保存という観点で検討を行い、球状の凝縮体(高い N/P 比)では二重らせんが非特異的に解離(過度の凝縮)しているのに対し、ロッド、トロイド状の凝縮体(化学量論比付近)では規則的な位置で解離が誘起されていることを明らかにした。規則的位置での二重らせん解離は DNA 凝縮に特定のメカニズムがあることを示唆している。凝縮度に対する生物学的活性を評価したところ、規則的解離が誘起される凝縮体は裸の pDNA と同等の発現が起こるのに対し、過度の凝縮体からは全く発現が起こらないことがわかった。さらに、特異な凝縮度(PEG-*b*-PLL12-17、N/P 比 0.5 付近)において元々の裸の pDNA よりも発現が活性化されることを見出した。この評価により内包される DNA の凝縮度が遺伝子発現活性において非常に重要なファクターであることが明らかとなり、凝縮度の制御がトータルのデバイス設計において重要な指針を与えることが示された。

原島グループ

原島グループでは、多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス(MEND)構築のための基本計画として、機能性素子のエンベロープへの組み込み技術の確立、コア構造の制御と最適化、基本アセンブリー技術の確立、の3段階で研究を進めている。本年度は特に、細胞内の膜障壁を効率良く突破する機能を有する多重型 MEND の構築を行うとともに、これまでに確立した方法論を駆使して、細胞内動態の詳細な解析とその制御を行った。以下にその詳細を報告する。

(1) 多重型 MEND の構築

細胞内遺伝子送達においては、細胞膜／エンドソーム膜および2枚の核膜など多くの膜障壁を突破しなければならない。これらの膜障壁を人工遺伝子デリバリーシステムで突破する方法として、複数の脂質膜による膜融合は有効な方法であると思われる。そこで、異なる脂質膜からなる多重型 MEND の構築方法の開発を行った。構築の基本原理は、荷電を有するコア表面を、反対荷電の小さいリポソーム(SUV)の静電的結合によって覆った後、人為的に SUV 同士の膜融合を誘起し生じる二枚膜で被覆するものである。異なる脂質からなる SUV を用い、この操作を繰り返すことにより、異なる脂質膜を計画的に重層した四枚膜 MEND(TMEND)を構築することに成功した。得られた TMEND は、電子顕微鏡観察および蛍光ラベルを用いたショ糖密度勾配分画によって、多重膜構造を有することが示唆された。さらに、得られた DMEND および TMEND を培養細胞にトランスフェクションしたところ、脂質膜の組成

と配置順に依存した遺伝子発現活性を示したことから、これらの MEND が遺伝子送達能力を有することと、目的とする多重構造を保持していることが示唆された。

(2)細胞内動態制御

① R8-MEND の細胞内取り込み機構

これまでにオクタアルギニン(R8) ペプチドで表面修飾した MEND (R8-MEND) によってアデノウイルスに匹敵する遺伝子発現活性が得られることを報告している。本年度はこの高い遺伝子発現活性が R8 によって誘起されるマクロピノサイトーシスによるものであることを明らかにした。さらに、MEND 表面に修飾する R8 ペプチドの密度を変化させると、細胞への取り込み経路が変化することを見出した。すなわち、低密度 R8 修飾では、クラスリン介在性エンドサイトーシスが誘導され、エンドソームはリソソームと融合し分解されるために遺伝子送達効率が低い、高密度 R8 修飾では、マクロピノサイトーシスが誘導され、マクロピノソームはリソソームと融合せず分解を回避可能なため、高い遺伝子送達効率が得られることが明らかとなった。

② 遺伝子の細胞内動態の定量的評価系の構築とその応用

優れた遺伝子発現を導く細胞内動態を実現するナノ構造体を調製するためには、現段階における人工ベクターの細胞内律速段階を定量的に把握する必要がある。そのため、天然型ウイルスベクターであるアデノウイルスと Lipoplex 型人工ベクターについて細胞内動態の比較検討を行った。その結果、人工ベクター系においてアデノウイルスと同程度の発現を示すために必要な投与量は、遺伝子コピー数として数千倍多く必要であることが明らかとなった。さらに核移行量を測定した結果、同程度の遺伝子発現を示すのに必要な核内 DNA は人工ベクター系で数千倍高いことが、判明した。この結果は、優れた遺伝子発現を誘導するためには細胞内動態のみならず核内動態についても制御が必要であることを示唆する新しい知見である。

一方、上記の定量結果は分裂細胞における評価であるが、非分裂細胞においては依然として核移行制御は重要な課題となる。核移行性素子としてのプロタミンと遺伝子のコンプレックスの核移行効率を定量的に評価するために、マイクロインジェクションによる評価を行った。この結果、pDNA に対してプロタミンの量を増やすにつれ、遺伝子発現が上昇することが明らかとなり、核移行性の促進が認められた。同様の結果は、共焦点レーザー顕微鏡画像からも確認された。

(3)核内動態制御

①ウイルスベクターと非ウイルスベクターの核内動態の定量的評価

遺伝子の転写効率を考える上で、遺伝子のポリカチオンからの decondensation 効率の上昇は重要である。そこで、各種ポリカチオンと pDNA から形成される凝縮構造体を核内にマイクロインジェクションし、遺伝子発現活性を評価した。その結果、アデノウイルス由来 μ タン

パク質は、高い核移行性を有するものの、核内転写効率が悪い点が問題であったが、リシンに富んだ核移行性シグナルを融合させる事で、効率的な核内転写効率の促進が発揮されることが明らかとなった。

②非ウイルスベクターの核内動態の非線形性

非ウイルスベクターによる遺伝子送達に関して、投与量と遺伝子発現が必ずしも線形の相関を示さないことは、経験的に認識されていたが、その詳細に関する研究はこれまで行われていなかった。しかし、ウイルスベクターに比べて低い非ウイルスベクターの遺伝子発現能力を向上させるためには、この現象を解明することは必須であると思われる。そこで本年度は、代表的な遺伝子導入試薬である LipofectAMINE-PLUS (LA) と R8-MEND を用いて、投与量と遺伝子発現活性の相関を検討した。その結果、両者ともに非常に大きな正の非線形性が観察された。従来、遺伝子発現活性に影響を及ぼす過程は、遺伝子ベクターの細胞内動態 (Intracellular pharmacokinetics: IntPK) であるだろうと考えられていた。しかし、細胞内遺伝子量および核内遺伝子量を real time-PCR を用いた改良型定量法によって定量した結果、投与量とそれらパラメータとの間に非線形性はほとんど認められなかった。ところが、核内遺伝子量あたりの遺伝子発現活性を算出すると、大きな非線形性が認められた。これらのことから、非ウイルスベクターの投与量と発現量における非線形性の大きな要因は、IntPK ではなく、核内動態 (Pharmacodynamics: PD) にあることが示唆された。

③速度論モデルの構築

培養細胞における外来 DNA 導入 (トランスフェクション) によるタンパク質産生と、直接タンパク質を導入する方法の kinetics を解析し、(i) 細胞に添加した DNA 分子数の 200 倍以上、核へ送達した DNA 分子数の 4000 倍以上の分子数のタンパク質が産生されること、(ii) 核内の「active DNA」の減少が、外来タンパク質減少の主要因であることを明らかとした。また *in vivo* における外来 DNA の核内動態を詳細に解析した結果、遺伝子発現効率減少の原因が (i) DNA 量の減少と (ii) DNA 1 分子当たりの発現量の低下 (silencing) という 2 つに (特に後者に) あることを明らかとした。さらに、(iii) DNA 1 分子当たりの発現量の低下には、DNA のメチル化は関与していないことも同時に明らかとした。この様なことから、おそらく、外来 DNA に結合するヒストンタンパク質の修飾が鍵を握るものと推測された。

長崎グループ

本グループでは、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目的とし、本年度は下記に示す 3 項目を重点的に検討した。

(1) 機能性核酸および siRNA 搭載のためのインテリジェント型ナノ構造デバイスの機能評価

これまで PEG-アンチセンス DNA コンジュゲート、PEG-siRNA コンジュゲートおよび佐々木らが創製した PEG-機能性核酸コンジュゲートをデバイス中に組み込むことにより、*in vitro*

(単層株化培養細胞)において特定の内在性遺伝子の発現を効果的に抑制することに成功した。特に、PEG-siRNA コンジュゲート型デバイスにおいては、疾病由来の遺伝子(RecQ1, PLK-1)に対しても同様に効果が確認されており、より in vivo に近い条件でのがんスフェロイド(三次元的多層培養細胞)を用いた評価においても著しいがん増殖抑制効果(薬効)を示すことが明らかとなり、当初計画を上回る進捗を達成することが出来た。

(2)新規 pH 応答性 PEG 化ブロック共重合体からなるインテリジェント型ナノ構造デバイスの in vitro における機能評価

これまでの研究から、遺伝子導入においてエンドソーム・ライソゾームから細胞質への移行過程(エンドソームエスケープ)が大きな障害であることが明らかとなってきた。したがって、新たに細胞内エンドソーム pH に応答してダイナミックな構造変化(コンホメーション転移)を誘起し、エンドソームエスケープをスムーズに行わせるための新規 pH 応答性ポリマーであるポリサイラミン(PSAO)および DNA を効率よく保持できるポリメタクリル酸 2-*N,N*-ジメチルアミノエチル(PAMA)の両セグメントを有する PEG 化ブロック共重合体を合成し、その PEG 末端にリガンド分子(ラクトース)を有する新規インテリジェント・ナノ構造デバイスを構築した。また、培養細胞系(HuH-7 細胞)においてインテリジェント・ナノ構造デバイスを評価したところ、PSAO 鎖のコンホメーション転移に基づくと考えられるエンドソームエスケープにより、高い遺伝子発現効率を達成可能であることを確認した。

(3)PEG 化量子ドットを用いた pDNA 及び siRNA の体内動態の解析

本グループですでに合成法を確立した、ヘテロ二官能性 PEG および末端官能基を有する PEG/PAMA ブロック共重合体を用い、粒径制御可能な PEG 化半導体量子ドット(CdSe および CdS)の簡便な調製法を確立した。これら PEG 化半導体量子ドットは、生理条件下においても高い分散安定性と強い発光を維持し、かつ粒径により発光色を制御できることを確認した。さらに、PEG 化量子ドットの水中での耐久性を著しく向上させる方法を確立し、バイオイメージングに展開する基盤を構築した。

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17年度は、クロスリンク核酸の細胞内アンチセンス効果の評価、アンチジーン核酸を用いた細胞内アンチジーン評価および特異的かつ効率的な塩基変換を達成する機能性核酸を用いた機能評価を行った。具体的には次の3項目を検討した。

(1)クロスリンク核酸-PEG コンジュゲート体を用いた細胞内アンチセンス効果の評価

昨年度、クロスリンク核酸-PEG コンジュゲートを用いて、長崎グループとの連携の元、ルシ

フェラーゼ(Firefly/Renilla ルシフェラーゼ)発現細胞を用いてそのアンチセンス効果を調べた。その結果 クロスリンク核酸-PEG コンジュゲートとポリリシンからなるポリイオンコンプレックス (PIC)ミセル型ナノ構造デバイスでは、 $10\ \mu\text{M}$ で約 80%の阻害効果を示し、天然型アンチセンス核酸 (PIC 化したもので約 50%の阻害効果)に比べクロスリンク核酸の有効性が確認された。本年度はこれらの阻害効果の向上がクロスリンク反応によるものであることを、*in vitro* の翻訳系を用いて検討した。その結果まず *in vitro* において、クロスリンク核酸-PEG コンジュゲート体は細胞内における濃度よりさらに低い濃度 ($0.1\ \mu\text{M}$) でも天然型に比べて高い阻害効果が得られることが明らかとなった。さらに PCR を用いた実験により、モデル細胞系において、クロスリンク反応が進行していることも証明された。

(2) アンチジーン核酸を用いた細胞内アンチジーン評価

本研究グループでは遺伝子センシングのこれまでの限界を拡張する可能性のある人工塩基として WNA を設計している。これらの分子は従来アンチジーン法ではセンシングできなかった遺伝子領域をも標的化することを可能にするものであり、遺伝子そのものを標的とする技術を大きく発展させることが可能である。本年度は、従来開発していた WNA では標的にできなかった配列に対して、安定な3本鎖を形成できる新規誘導体の開発に成功した。すでに昨年度、末端にアミノ基を有する従来型の WNA を含むオリゴ DNA をブロック共重合体からなるナノ構造デバイスに搭載し、細胞内内在性遺伝子である c-myc を標的としたアンチジーン効果の評価を行ったところ、 $1\ \mu\text{M}$ で非常に高い阻害効果が観測された。本年度に新たに開発に成功した新規 WNA 誘導体を用いることで、さらに標的の拡充を行えるものと期待される。

(3) 塩基変換を達成する機能性核酸を用いた機能評価

昨年度、6-チオグアノシンを含むオリゴ DNA の PEG コンジュゲート体を用いて、テロメラーゼの鋳型 RNA を標的にして細胞内における効果を調べた。細胞内では NO が高濃度存在すると考えられ、6-チオグアノシンが細胞内で S-ニトロシル化チオグアノシンに変換され NO 転移反応が進行するものと期待したが、細胞増殖の阻害は観測されなかった。本年度はまずインビトロのモデル細胞系を用いて、S-ニトロシル化チオグアノシンを含むオリゴ DNA の効果を検討した。その結果、S-ニトロシル化チオグアノシンを含むオリゴ DNA は、*in vitro* において天然型に比べ高いアンチセンス効果を示すことが明らかとなった。この阻害増強効果が何によるものであるか、現在のところ詳細は明らかではないが、この配列を持つ PEG-オリゴ DNA コンジュゲートを合成し、細胞内における効果を検討する予定である。

3. 研究実施体制

「東大」グループ (高分子ミセル型ナノ構造デバイスによる人工遺伝子ベクター開発)

①研究分担グループ長：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による人工遺伝子ベクター開発

- 1) in vivo 遺伝子デリバリーを目指したマルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの最適化
- 2) 全身投与による遺伝子デリバリーを目指したナノ構造デバイスの設計
- 3) マルチ機能搭載型ナノ構造デバイスの機能発現メカニズムの解明
- 4) 物理エネルギーの活用によるナノ構造デバイス機能の制御
- 5) ナノ構造デバイス内包 DNA における凝縮状態の解明と遺伝子発現の相関性評価

「原島」グループ（多機能性エンベロープ型ナノ構造デバイス（MEND）による人工遺伝子ベクター開発）

- ①研究分担グループ長：原島 秀吉（北海道大学大学院薬学系研究科、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による人工遺伝子ベクター開発
 - 1) 多機能性エンベロープ型ナノ構造体の構築
 - ・多重型 MEND の構築
 - 2) 細胞内動態制御
 - ・R8-MEND の細胞内取り込み機構
 - ・遺伝子の細胞内動態の定量的評価系の構築とその応用
 - 3) 核内動態制御
 - ・ウイルスベクターと非ウイルスベクターの核内動態の定量的評価
 - ・非ウイルスベクターの核内動態の非線形性
 - ・速度論モデルの構築

「長崎」グループ

- ①研究分担グループ長：長崎 幸夫（筑波大学大学院数理物質科学研究科、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

佐々木グループ（リーダー：佐々木茂貴）

- ①研究分担グループ長：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—PEGコンジュゲート体の細胞内アンチセンス効果の評価
 - 2) 機能性核酸によるゲノム塩基の特異的変換
 - 3) アンチジーン核酸を用いた細胞内アンチジーン効果

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

- (1) 論文（原著論文）発表
 - 佐々木茂貴、インテリジェント人工核酸の開発、化学工業、**57**, 235-240 (2006)
 - 佐々木茂貴、DNA/RNA 修飾機能を目指したインテリジェント人工核酸、Pharma Vision News, **5**, 10-14 (2005)

- 永次 史、佐々木茂貴、ゲノム標的化学で目指す新しい生物機能の創成、化学と教育、53, 8-11 (2005)
- 中川 治、佐々木茂貴、核酸をトリガーとする増幅反応, *化学*, 化学同人, **60**, 70-71 (2005).
- R. Ideta, F. Tasaka, W. -D. Jang, N. Nishiyama, G. -D. Zhang, A. Harada, Y. Yanagi, Y. Tamaki, T. Aida, K. Kataoka, Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer. *Nano Lett.* **5**(12), 2426-2431 (2005)
- K. Miyata, Y. Kakizawa, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, T. Watanabe, M. Kohara, K. Kataoka, Freeze-dried formulations for in vivo gene delivery of PEGylated polyplex micelles with disulfide crosslinked cores to the liver. *J. Control. Release* **109**(1-3), 15-23 (2005)
- N. Nishiyama, A. Iriyama, W. -D. Jang, K. Miyata, K. Itaka, Y. Inoue, H. Takahashi, Y. Yanagi, Y. Tamaki, H. Koyama, K. Kataoka, Light-induced gene transfer from packaged DNA enveloped in a dendrimeric photosensitizer. *Nat. Mater.* **4**(12), 934-941 (2005)
- T. Takahashi, Y. Yamada, K. Kataoka, Y. Nagasaki, Preparation of a novel PEG-clay hybrid as a DDS material: dispersion stability and sustained release profiles. *J. Control. Release* **107**(3), 408-416 (2005)
- T. Sakura, T. Takahashi, K. Kataoka, Y. Nagasaki, One-pot preparation of mono-dispersed and physiologically stabilized gold colloid. *Colloid. Polym. Sci.* **284**(1), 97-101 (2005)
- H. Uchino, Y. Matsumura, T. Negishi, F. Koizumi, T. Hayashi, T. Honda, N. Nishiyama, K. Kataoka, S. Naito, T. Kakizoe, Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br. J. Cancer* **93**(6), 678-687 (2005)
- M. Oishi, T. Hayama, Y. Akiyama, S. Takae, A. Harada, Y. Yamasaki, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Supramolecular assemblies for the cytoplasmic delivery of antisense oligodeoxynucleotide: polyion complex (PIC) micelles based on poly(ethylene glycol)-SS-oligodeoxynucleotide conjugate. *Biomacromolecules* **6**(5), 2449-2454 (2005)
- Y. Nagasaki, M. Nakamae, T. Takahashi, K. Kataoka, Design of stable bionanoparticles by PEG based surface modifications. *J. Photopolym. Sci. Technol.* **18**(4), 513-514 (2005)
- X. Yuan, Y. Yamasaki, A. Harada, K. Kataoka, Characterization of stable lysozyme-entrapped polyion complex (PIC) micelles with crosslinked core by

- glutaraldehyde. *Polymer* **46**(18), 7749–7758 (2005)
- Y. Bae, W. -D. Jang, N. Nishiyama, S. Fukushima, K. Kataoka, Multifunctional polymeric micelles with folate-mediated cancer cell targeting and pH-triggered drug releasing properties for active intracellular drug delivery. *Molecular BioSystems* **1**(3), 242–250 (2005)
 - K. Osada, Y. Yamasaki, S. Katayose, K. Kataoka, A synthetic block copolymer regulates S1 nuclease fragmentation of supercoiled plasmid DNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* **44**(23), 3544–3548 (2005)
 - S. Fukushima, K. Miyata, N. Nishiyama, N. Kanayama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEGylated polyplex micelles from triblock cationomers with spatially ordered layering of condensed pDNA and buffering units for enhanced intracellular gene delivery. *J. Am. Chem. Soc.* **127**(9), 2810–2811 (2005)
 - Matsuda, H. Kobayashi, S. Itoh, K. Kataoka, J. Tanaka, Immobilization of laminin peptide in molecularly aligned chitosan by covalent bonding. *Biomaterials* **26**(15), 2273–2279 (2005)
 - T. Hamaguchi, Y. Matsumura, M. Suzuki, K. Shimizu, R. Goda, I. Nakamura, I. Nakatomi, M. Yokoyama, K. Kataoka, T. Kakizoe, NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br. J. Cancer* **92**(7), 1240–1246 (2005)
 - M. Oishi, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Smart polyion complex micelles for targeted intracellular delivery of PEGylated antisense oligonucleotides containing acid-labile linkages. *ChemBioChem* **6**(4), 718–725 (2005)
 - T. Taguchi, L. Xu, H. Kobayashi, A. Taniguchi, K. Kataoka, J. Tanaka, Encapsulation of chondrocytes in injectable alkali-treated collagen gels prepared using poly(ethylene glycol)-based 4-armed star polymer. *Biomaterials* **26**(11), 1247–1252 (2005)
 - H. Tsuchiya, H. Harashima and H. Kamiya. Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA. *J. Gen. Med.* **7**(4), 486–493 (2005).
 - H. Tsuchiya, T. Matsuda, H. Harashima, and H. Kamiya: Cytokine induction by a bacterial DNA-specific modified base. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **326**(4), 777–781 (2005)
 - T. Masuda, H. Akita and H. Harashima. Evaluation of nuclear translocation and transcription of plasmid DNA condensed with protamine by microinjection: introduction of Nuclear Translocation score. *FEBS Lett.* **579**(10), 2143–2148

- (2005).
- K. Sasaki, K. Kogure, S. Chaki, Y. Kihira, M. Ueno and H. Harashima. Construction of multifunctional envelope-type nano device by a SUV*-fusion method. *Int. J. Pharm.* **296**(1-2), 142-150 (2005)
 - Y. Yamada, H. Kamiya and H. Harashima. Kinetic analysys of protein production after DNA transfection. *Int. J. Pharm.* **299**, 34-40 (2005).
 - S. Futaki, Y. Masui, I. Nakase, K. Kogure, Y. Sugiura and H. Harashima. Unique features of a pH-sensitive fusogenic peptide improving transfection efficiency of cationic liposomes. *J. Gen. Med.* **7**(11),1450-1458 (2005).
 - R. Moriguchi, K. Kogure H. Akita, S. Futaki, M. Miyagishi, K. Taira, and H. Harashima A multifunctional envelope-type nano device for novel gene delivery of siRNA plasmids. *Int. J. Pharm.* **301**, 277-285 (2005)
 - Y. Yamada, Y. Shinohara, T. Kakudo, S. Chaki, S. Futaki, H. Kamiya and H. Harashima Mitochondrial delivery of mastoparan with transferrin liposomes equipped with a pH-sensitive fusogenic peptide for selective cancer therapy. *Int. J. Pharm.* **303**, 1-7 (2005).
 - D. Mudhakhir, H. Akita, I. A. Khalil, S. Futaki and H. Harashima. Biodistribution of octaarginine modified lisposomes in mice. *Drug metabolism and Pharmacokinetics* **20**(4), 275-281 (2005).
 - Y. Yamada, K. Kogure, Y. Nakamura, K. Inoue, H. Akita, F. Ngatsugi, S. Sasaki, T. Suhara and H. Harashima. Development of an efficient method for packaging oligodeoxynucleotides in a condensed nano particle with a lipid-envelope structure. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(10), 1939-1942 (2005).
 - H. Ochiai, H. Harashima and H. Kamiya. Effect of methylated adenine in plasmid DNA on transgene expression in mice. *Biol. Pharm. Bull.* **8**(10), 2019-2022 (2005).
 - H. Tsuchiya, T. Sawamura, H. Harashima and H. Kamiya. Correction of frameshift mutations with single-stranded and double-stranded DNA fragments prepared from phagemid/plasmid DNAs. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(10), 1958-1962 (2005).
 - H. Akita, M. Tanimoto, T. Masuda, K. Kogure, S. Futaki and H. Harashima. Evaluation of the nuclear delivery and intra-nuclear transcription of the plasmid DNA condensed with m (mu) and NLS- m by cytoplasmic and nuclear microinjection: comparative study with poly L-lysine. *J. Gen.Med.* **8**(2),198-206 (2006)
 - H. Tsuchiya, H. Harashima and H. Kamiya. Factors affecting SFHR gene correction efficiency with single-stranded DNA. *Biophys. Res. Comm.* **336**(4), 1194-1200 (2005).

- R. Moriguchi, K. Kogure, H. Harashima. Non-linear pharmacodynamics in non-viral gene delivery system: Synergistic relationship between dose and nuclear transcription efficiency. *J. Cont. Re.I.* **110**(3), 605–609 (2006)
- I. A Khalil, K. Kogure, S. Futaki, and H. Harashima. High density of octaarginine stimulates macropinocytosis leading to an efficient intracellular trafficking for gene expression. *J. Biol. Chem.* **281**(6), 3544–3551 (2006)
- H. Ochiai, H. Harashima, H. Kamiya. Intranuclear disposition of exogenous DNA in vivo: silencing, methylation and fragmentation. *FEBS Lett.* **580**(3), 918–922 (2006)
- S. Hama, H. Akita, R. Ito, H. Mizuguchi and H. Harashima. Quantitative comparison of the intracellular trafficking and nuclear expression between the Ad and non-viral vector. *Molecular Therapy, in press.*
- Y. Nakamura, K. Kogure, Y. Yamada, H. Harashima. Significant and prolonged antisense effect of multifunctional envelope-type nano device encapsulating antisense oligodeoxynucleotide. *J. Pharm. Pharmacol. in press.*
- T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, A. Minoura, T. Masuda, H. AKita, K. Kato, H. Hamada, M. Ueno, S. Futaki, H. Harashima. Delivery of condensed DNA by liposomal non-viral gene delivery system into nucleus of dendritic cells. *Biol. Pharm. Bull. in press.*
- H. Kamiya, M. Ito, H. Ochiai, A. Matsuda, and H. Harashima. Transient expression of Drosophila melanogaster deoxynucleoside kinase gene enhances cytotoxicity of nucleoside analogs. *Ncleosides, Nucleotides, Nucleic Acids, in press.*
- I. A. Khalil, K. Kogure, H. Akita, H. Harashima. Cellular uptake pathways in non-viral gene delivery. *Pharm. Rev. in press.*
- H. Tsuchiya, H. Harashima and H. Kamiya. Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA. *J. Gen. Med.* **7**(4): 486–493 (2005).
- Ali M. M., Oishi M., Nagatsugi F., Mori K., Nagasaki Y., Kataoka K., Sasaki S., Intracellular Ability of an Inducible Alkylation System to Exhibit Antisense Effects with Greater Potency and Selectivity, *Angew. Chem. Int. Ed., in press*
- Taniguchi Y., Nakamura A., Senko Y., Nagatsugi F., Sasaki S., M. Tanada, S. Tsujita, S. Sasaki, Design of New Bidentate Ligands Constructed of Two Hoechst 33258 Units for Discrimination of the Length of Two A3T3 Binding Motifs, *J. Org. Chem., in press.*
- Md. Monsur Ali, Ryusuke Nakahara, Fumi Nagatsugi, Minoru Maeda, Shigeki Sasaki, Application of 2-Amino-6-Vinylpurine as an Efficient Agent for

- Conjugation of Oligonucleotides, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **25**, 159–169 (2006).
- T. Kawasaki, F. Nagatsugi, Md. Monsur Ali, M. Maeda, K. Sugiyama, K. Hori and S. Sasaki Hybridization-Promoted and Cytidine-Selective Activation for Cross-Linking with the Use of 2-Amino-6-Vinylpurine Derivatives, *J. Org. Chem.* **70**, 14–23 (2005)
 - Ali Md. Monsur, F. Nagatsugi, S. Nakayama, Md. Rowshon Alam, T. Kawasaki, S. Sasaki Design of highly efficient and selective transfer reaction of nitrosyl group to dC and d^mC resulting in specific deamination., *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **24**, 721–724 (2005)
 - Y. Taniguchi, A. Nakamura, Y. Senko, K. Kodama, F. Nagatsugi, S. Sasaki, Expansion of triplex recognition codes by the use of novel bicyclic nucleoside derivatives (WNA). *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **24**, 823–827 (2005)
 - Y. Yamada, K. Kogure, Y. Nakamura, K. Inoue, H. Akita, F. Nagatsugi, S. Sasaki, T. Suhara, H. Harashima, Development of efficient packaging method of oligodeoxynucleotides by a condensed nano particle in lipid envelope structure. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 1939–42 (2005)
 - M. Tanada and S. Sasaki, Discrimination of the Length of Two Remote Binding Sites by the Spacer-Linked DNA Minor Groove Binders, *Nucleic Acids, Symp. Ser.*, **49**, 1–2 (2005)
 - F. Nagatsugi, S. Mori, Md. Monsur Ali, Y. Ogata, S. Sasaki, Substituent Effects on the In situ Activation of the Double Activated Cross-linking Reaction, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **49**, 175–176 (2005)
 - Y. Taniguchi, A. Nakamura, E. Aoki, S. Sasaki, Modification of the aromatic ring of the WNA analogues for expansion of the triplex recognition codes, *Nucleic Acids Symposium Series*, **49**, 173–174 (2005)

(2) 特許出願

H17 年度出願件数 : 14 件 (CREST 研究期間累積件数 : 23 件)