

「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

国立大学法人東京大学大学院 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方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。今後、超分子ナノデバイスの基本設計については第 3 年次から第 4 年次にかけての確立を目指し、並行してその成果を実用的製造技術開発グループへ技術移転することを計画している。第 5 年次と最終年度となる第 6 年次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. 研究実施内容

(文中にある参照番号は 4. (1)に対応する)

本研究では、遺伝子・核酸医薬を搭載した超分子ナノデバイスとして、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(下記①-④)、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(下記⑤-⑦)。以下に、平成 19 年度の研究実施内容の概要を記述する。

①分子ターゲティングのための生体適合型超分子ナノデバイスの創製と高信頼性製造技術の構築

ナノデバイスの血中滞留性延長のため、ステルス機能向上を図り、デバイス表面を覆う親水性高分子(ポリエチレングリコール(PEG))の密度を増大させる検討を行った。分岐状 PEG(PEGasus)のブロック共重合体化として、PEGasus 分岐点に導入された一級アミノ基から、 β -ベンジル L-アスパルテートの NCA(BLA-NCA)や ϵ -トリフルオロアセチル L-リシンの NCA(Lys(TFA)-NCA)が重合することを見出した。分岐点にマレイミド基を持つ PEGasus とチオール化ポリリシン(PLL)との高分子-高分子カップリングでも、水中で効率よくブロック共重合体(PEGasus-PLL)を調製でき、プラスミド DNA(pDNA)を作用させると粒径約 100nm のナノデバイスが得られた。汎用的なりガンド導入には、チオールとの選択的反応を利用できるマレイミド基を高分子ミセル表層に導入するのが効果的である

ため、水中でのアジド基と末端アルキンによる環化付加反応（Click Chemistry）に着目している。平成 19 年度は、Click Chemistry に必要なアジド基とプロパルギル基を末端に導入したヘテロ二官能性 PEG の合成法を最適化するとともに(5)、Azide-PEG-NH₂ から Lys(TFA)-NCA を重合し、分子量と組成の制御されたブロック共重合体を合成した。さらに、標的細胞内の弱酸性条件下で PEG 鎖が選択的に脱離する高分子ミセル型ナノデバイスの構築を目指し、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を設計し、pH5.5 での効果的な加水分解を確認した。一方、多機能性エンベロープ型ナノデバイス（MEND）についても実用的な製造並びに *in vivo* での適用を目指し、凝縮遺伝子一分子をナノデバイスに内包する新手法として、高分子ミセル型ナノデバイスに核移行性素子(NLS)を付与した NLS-PIC ミセルを調製し、脂質膜でコートした MEND を作成した。また、モノカチオン性ダイタージェントを用いた一遺伝子パッケージング法開発に着手し、粒径制御などに成功した。

②治療効果の空間的フォーカシングのための超分子ナノデバイスの創製

In vivo 遺伝子デリバリーでは、標的細胞に到達するまで遺伝子を安定に保持し、標的細胞内では機能発現のため遺伝子の速やかな放出が必要となる。平成 19 年度は、細胞内還元環境に応答して開裂するジスルフィド(SS)架橋によって内核が安定化された高分子ミセル型ナノデバイスを開発し、還元環境に応答した内包遺伝子の放出を確認した。固形がんに対しては、GFP 発現 pDNA を搭載した SS 架橋ミセルを全身投与し、がん組織周辺で GFP の発現を確認した。一方、無細胞転写・翻訳(*cell-free*)システムでの評価系ではあるが、高分子ミセル内核での pDNA のパッケージング状態を制御すると遺伝子発現効率を変調できるとの知見を得た。高分子ミセルの構造安定化のための設計として、PEG-ポリカチオンブロック共重合体への疎水性分子（コレステロール）の導入にも着手し、デバイスの構造安定性、希釈条件下での高効率遺伝子発現、血中滞留性などの機能向上を確認した。また、連結部に疎水性分子を導入したブロック共重合体（PEG-アルキル鎖-NH₂）の合成経路も新たに開発した。リガンド装着型ナノデバイスに関しては、新生血管内皮細胞やがん細胞で過剰発現している $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを認識する環状 RGD ペプチドを SS 架橋高分子ミセル表層に装着し、一桁以上高い遺伝子発現を得た(13)。この要因を精査した結果、RGD ミセルはカベオラ介在型エンドサイトーシスを介してカベオソームに局在し、効率的に核近傍に輸送される可能性が示唆された。MEND においても、固形がん局所で過剰発現が認められる matrix metalloproteinase(MMP)により切断を受ける PEG 脂質誘導体(PPD)を MEND 表面に装着することで、効果的に内包遺伝子のがん細胞内で発現させることに成功した(28)。PPD-MEND では細胞内取り込みとともにエンドソーム脱出も向上しており、細胞内動態の改善を確認した。また、PEG/PPD-MEND に siRNA を搭載し、担がんマウスに静脈内投与したところ、腫瘍組織で標的遺伝子の高いノックダウンを認めた。

新しいナノデバイス創製戦略として、細胞内輸送系の積極的利用を目指し、トランスサ

イトーシスを促進する DNA アプタマーを表層に結合したナノデバイスに取り組んでいる。平成 19 年度は、平成 18 年度に確立した金基板上での DNA/PEG ハイブリッド界面構築技術(38)を金ナノ粒子上へ技術展開するとともに、PEG-*b*-PAMA により表面修飾した PEG 化金ナノ粒子の血中滞留性向上のための検討を行い、PAMA 鎖長の短い PEG-*b*-PAMA を用いることにより金ナノ粒子に高い分散安定性を付与させた(37)。

③細胞内環境応答型超分子ナノデバイスの構築とその高効率製造技術の確立

遺伝子ベクターが細胞内で機能発現するためには、ベクターがエンドソームから細胞質へと効率的に移行する必要がある、この過程でもベクターの化学構造は極めて重要となる(12)。ポリ(β -ベンジル-L-アスパルテート)(PBLA)のジエチレントリアミン(DET)とのアミノシス反応によって得られる側鎖にエチレンジアミン構造を有する PAsp(DET)は、低毒性で効率的な遺伝子発現を示す。この PAsp(DET)では、pH 変化に伴いモノプロトン状態からジプロトン状態へ変化する際、細胞膜との親和性が増大し、遺伝子導入に寄与することが示唆された。PAsp(DET)は側鎖構造に特異的な分子内求核反応により、スクシンイミド環形成を介して主鎖の自己分解が惹起され(9)、4°Cの酸性条件では安定であるものの、37°Cの生理的条件下では徐々に分解することが判った。平成 19 年度は製剤的観点から検討を行い、エステルアミド反応時、停止反応時、精製工程における溶液温度を適正に管理すると、再現性よく安定に PAsp(DET)や PEG とのブロック共重合体を供給できることが判った。細胞内で発現すべき種々の機能を脂質膜の多層構造に組み込んだ多段階膜融合型 MEND (T-MEND)では、IRQ ペプチドを修飾した T-MEND の細胞内取り込み経路を解析することにより、クラスリン経路やカベオラ経路を標的化可能なペプチドを見出した(36)。MEND 表面を糖修飾した核移行性 MEND では、遺伝子発現が 10 倍以上上昇しており、多機能化によりさらなる遺伝子発現効率増大が期待される。

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

本研究項目では、1 塩基の違いを識別してクロスリンク反応などを誘起する機能性核酸をナノデバイスに搭載し、対象疾患の治療へ展開するとともに、標的分子の認識により触媒活性が誘起される機構の創り込みによる新規遺伝子発現イメージング法の創出を目指している。平成 19 年度は、イメージング発光素子となる銅錯体を開発し(56)、さらに機能性核酸への組み込みを検討した。また、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を目的に、*c-myc* がん遺伝子標的人工核酸および *bcl-2* がん遺伝子標的人工核酸の遺伝子阻害効果の検証を行うための修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。予備的知見ではあるが、*bcl-2* を標的とした 3 本鎖 DNA 形成人工核酸を用いた細胞増殖阻害実験では、機能性核酸を含むオリゴヌクレオチドは非常に強い増殖阻害能を発現した。臨床展開研究グループとの連携により、家族性高コレステロール血症に対するアポリポタンパク質 B (Apo B) 遺伝子修飾機能性核酸による遺伝子治療法の開発のため、新しく官能基転移核酸を開発し(54)、これらの機能性核酸の編集機能を評価するための非細胞系評価系を確立した。また、デバイスに

搭載する PEG-機能性核酸コンジュゲートの大量合成のため、末端にビニル基を含むリンカーを導入した DNA の合成に成功し、オレフィンメタセシス反応の条件を検討した。平成 18 年度にグアニン標的機能性核酸の反応性塩基を設計し、合成法の確立とともに、この新規誘導体の反応性を確認したが、平成 19 年度は反応性塩基の効率的な合成法を見出した。また、2 本鎖 DNA を標的とするための設計として、平成 19 年度は機能性核酸を組み込んだ PNA(ペプチド核酸)を合成し、機能性核酸の PNA モノマーを用いて、PNA オリゴマーの合成にも成功した。これを用いて標的モデル DNA に対する反応性を検討したところ、末端にインタージェント核酸を組み込んだ PNA オリゴマーが標的に対してクロスリンク反応を生起することを確認した。

PEG 化機能性核酸・脂質の最適化や更なる機能付与（複数医薬同時送達機能など）として、新たにナノゲルへの診断機能付与を検討した。生体内に存在しない（バックグラウンドノイズがない） ^{19}F 核を用いる核磁気共鳴イメージング（ ^{19}F MRI）技術により、内核にフッ素化合物とアミン化合物を共重合した PEG 化ナノゲル粒子をがん特異的 ^{19}F MRI プローブとし、pH に依存した ^{19}F NMR シグナルを確認した(40)。このナノゲル粒子は EPR 効果による固形がんへの集積が期待され、固形がん周辺における低 pH 条件でのシグナル増大と併せ、 ^{19}F MRI 測定用プローブへの応用が有望である。

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

本研究項目では、脳腫瘍や肝細胞がんなどの局所進展型の腫瘍を標的として、ナノデバイスの動脈投与によるがん治療を目指している。遺伝子・核酸治療を臨床へ導入するためには、前臨床における実験モデル構築が重要となるが、ヒト脳腫瘍に対する *in vivo* 評価は、通常行われている皮下腫瘍では、脳における腫瘍血管の特性を反映しているとは言い難い(69)。そのため臨床展開研究グループでは平成 18 年度に、ルシフェラーゼ発現グリオーマ細胞を同所移植したラット脳腫瘍モデルを構築した。平成 19 年度はこの疾患モデル動物を用いて、カチオニックリポソームなど全身投与が不可能なキャリアを評価するため、脳の栄養動脈からの動注方法を確立した。さらには、生体イメージングによる脳腫瘍の縮小効果評価方法を確立した。また、基盤技術構築グループでは *in vivo* での組織選択的遺伝子送達システム構築のため、非分裂性の初代培養肝細胞を用いた遺伝子発現実験について検討を行い、MEND により高い遺伝子発現を示す結果を得た。

一方、転移性がんを標的とする場合は、①-③で開発する全身投与型超分子ナノデバイスが有効であり、平成 18 年度に得られた予備検討結果に基づき、平成 19 年度は②で述べた環状 RGD ペプチドをリガンドに持つ高分子ミセル型ナノデバイスについて細胞内過程の機能解析を進めた他、MMP-MEND においても siRNA のマウスへの静脈投与により腫瘍組織で特定遺伝子のノックダウン効果を認めた。全身投与型デバイスについては、基盤技術構築グループと臨床展開研究グループとの連携により、次年度以降も体内動態評価とレポーター遺伝子を用いた *in vivo* 機能評価を精力的に推進する予定である。

⑥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

本研究項目では、致死性の循環器疾患である肺動脈性肺高血圧症および家族性高コレステロール血症治療を対象として、その遺伝子・核酸医薬搭載ナノデバイスによる低侵襲治療法の確立を目指している。平成 19 年度は、基盤技術構築グループが提供するブロック共重合体 PEG-SS-PA_{sp}(DET)を用いた高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与において、系統的な条件検討を行い、遺伝子導入効率の改善に成功した。この実験系では炎症性サイトカイン遺伝子の発現も軽減し臨床応用が期待される。また、家族性高コレステロール血症に対するアポリポプロテイン B (Apo B) 遺伝子修飾用機能性核酸による遺伝子治療法の開発のため、平成 19 年度は、*in vitro*における Apo B 遺伝子 editing の評価系を確立した。

⑦超分子ナノデバイスを配置した骨形成誘導型インテリジェント・インプラントの開発

平成 18 年度に引き続き、インクジェット式積層装置の各機能の向上に注力するとともに、生理活性物質の立体的配置法として、新たに DDS と組み合わせた遺伝子、核酸、薬剤等のナノデバイスのプリントを検討した。さらに超分子ナノデバイスを用いた運動器の総合的な機能再建治療を見据え、平成 19 年度より運動器を構成する骨格筋へのアプローチを開始した(19,26)。

3. 研究実施体制

(1)片岡・鄭グループ(東京大学)

① 研究分担グループ長:片岡 一則(東京大学、教授)

鄭 雄一(東京大学、教授)

② 研究項目

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の精密制御達成にはステルス機能向上によるナノデバイスの血中滞留性延長が不可欠であり、これを実現する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、ポリイオンコンプレック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。平成 19 年度は、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、前年度に引き続き分岐状 PEG(PEG_{asus})のブロック共重合体化の検討を行い、PEG_{asus} 分岐点に導入された一級アミノ基から、β-ベンジル L-アスパルテートの NCA(BLA-NCA)または ε-トリフルオロアセチル L-リシンの NCA (Lys(TFA)-NCA)の重合が可能であることを見出した。また分岐点にマレイミド基を導入した PEG_{asus} と末端に SH 基を有するポリリシン (PLL) との高分子-高分子カップリング法においても、水中で効率よくブロック共重合体を得られることを見出した。さらにこのようにして得られた PEG_{asus}-PLL ブロック共重合体を用いてバッファー中でプラスミド DNA(pDNA)を混合することにより、

100nm 程度の粒子径を有するナノデバイスを調製できるとの予備的知見を得た。

一方、汎用的に抗体やアプタマーなどのリガンド分子をミセル表層に導入する際、抗体自身が有しており、核酸への導入が容易なチオール基と穏和な条件で高効率にカップリング可能なマレイミド基は非常に有用であると思われる。しかしながら、マレイミド基は反応性の高さゆえ、ブロック共重合体合成時や高分子ミセル調製時に、ポリマー構造中に存在させることはできない。そこで高分子ミセル調製後のミセル表層にマレイミド基を導入する方法として、水中でのアジド基と末端アルキンによる環化付加反応に着目した。この反応は **Click Chemistry** として知られ、ナノデバイス中のどの官能基とも反応せず高分子ミセル表層にのみ選択的にマレイミド基の導入が可能になるものと考えられる。平成 19 年度は、**Click Chemistry** に必要な両官能基(アジド基、プロパルギル基)を末端に導入したヘテロ二官能性 PEG の合成法の最適化を行った。さらにアジド末端を有するヘテロ PEG (Azide-PEG-NH₂)から Lys(TFA)-NCA の重合を行い、分子量や組成の制御されたブロック共重合体の合成に成功した。

また、平成 19 年度には、標的細胞内の弱酸性条件下で選択的に PEG 鎖が脱離する高分子ミセル型ナノデバイスの構築を目指し、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を設計した。ベースとなるアセタールを介して一級アミノ基が末端に導入された PEG の合成法を最適化し、その弱酸性条件 (pH5.5) における加水分解性に関しても予備的ではあるが良好な結果が得られた。

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

in vivo 遺伝子デリバリーにおいては、標的となる細胞に到達するまで遺伝子を安定に保持する一方で、標的細胞に到達した後は、機能を発揮するために速やかに保持していた遺伝子を放出する必要がある。平成 19 年度には、細胞内還元環境に応答して開裂するジスルフィド(SS)架橋によってポリプレックス内核が安定化された高分子ミセル型ナノデバイスとして、PEG-poly(L-lysine) (PEG-PLL) 共重合体の PLL 側鎖に SPDP (*N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate)を反応させて架橋導入率が異なるミセルを調製し、適切な SS 架橋導入率のミセルにおいて、還元環境に応答して内包遺伝子を放出することが確認できた。また全身投与におけるミセルの血中滞留性評価では、架橋導入率の上昇に伴い血中滞留性も向上するという知見が得られた。さらに固形ガンに対する遺伝子デリバリーでは、GFP 発現 pDNA を搭載した SS 架橋ミセルを全身投与することで、ガン組織周辺の間質細胞や血管内皮細胞で GFP の発現が確認された。一方、我々は、これまでに高分子ミセルの内核における pDNA のパッケージング状態の制御を目的として、PEG-PLL の PLL 鎖長および pDNA との電荷比について検討し、PLL 重合度が 20 量体の PEG-PLL(12-20)によって、pDNA が規則的に折り畳まれたロッド状の高分子ミセルを調製することが可能であることを明らかにした。本システムは PLL 鎖長が短いため、ベクターが高密度 PEG に覆われる。これによりベクター間の凝集が完全に抑制さ

れ、一分子 pDNA からなるベクターが形成される。さらにロッド状ベクターは無細胞転写・翻訳システム(cell-free システム)において、従来の球状構造のベクターに比し遺伝子発現効率が著しく高く、また高分子ミセル化していない pDNA そのものよりも遺伝子発現効率が上昇するなどの極めてユニークな特性を確認している。しかしながらロッド状構造は PLL 鎖長が短く、また比較的低い電荷比で得られ、このときコンプレックスの安定性は *in vivo* への展開を考える際、十分ではないものと考えられる。そこで平成 20 年度においては、SH 基を導入した PEG-PLL(12-20)を用いることによって、ロッドの形態を SS 架橋によって安定化した高分子ミセルを調製する予定である。

高分子ミセル型ナノデバイスの構造安定化のためのキャリア設計としては、上述の SS 架橋ミセルに加えて、疎水性分子を PEG-ポリカチオンブロック共重合体に導入し、疎水性相互作用によってミセル構造を安定化する方法が考えられる。平成 19 年度には、ブロック共重合体のポリカチオンブロックの末端に疎水性分子として一つのコレステロールを導入することにより、培地中や血清蛋白存在下でのミセルの安定性向上、希釈条件下における高効率での遺伝子発現、全身投与における血中滞留性の上昇などの機能向上が確認できた。また本研究では、PEG とポリカチオン鎖の間に疎水性セグメントを導入したブロック共重合体を合成し、pDNA を内包したポリイオンコンプレックス内核が疎水性セグメントで構成された中間層で覆われることにより安定化された高分子ミセル型ナノデバイスを構築する。本システムについては、平成 19 年度までに PEG の片末端水酸基をメタンスルホニルクロライドで活性化し、別途合成した任意の炭素数を有する直鎖アルキルアジドアルコールを反応させることにより、PEG の片末端に疎水性アルキル鎖を定量的に導入できることを見出した。さらに延長したアルキル鎖末端のアジド基を還元することにより末端を定量的に一級アミノ基に変換し、PEG-アルキル鎖-NH₂ の合成法を確立することができた。

表面にリガンド分子を装着した高分子ミセル型ナノデバイスに関しては、平成 19 年度までに、新生血管内皮細胞やガン細胞で過剰発現している $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを特異的に認識する環状型 RGD ペプチドを SS 架橋ミセル表層に装着したところ、レセプター発現細胞に対して一桁以上遺伝子発現を上昇させることに成功した。また上昇の要因について詳細な評価を行ったところ、単純な取り込み効率の上昇に起因するのではなく、ミセルの細胞内動態の変化に起因することが分かった。すなわち、RGD ミセルは速やかに細胞核周辺に集積し、RGD ペプチドを装着していないミセルの多くがクラスリン介在型のエンドサイトーシスを介して最終的に細胞内消化器官であるリソソームに局在しているのに対して、RGD ミセルの多くはカベオラ介在型エンドサイトーシスを介してカベオソームに局在しているという知見が得られた。カベオソームは、中性であり、高分子ミセル型ナノデバイスは加水分解および酵素分解を受けないものと考えられる。さらに、カベオソームは、微小管を介して小胞体に輸送されることが報告されており、高分子ミセル型ナノデバイスは核近傍に効率的に送達される可能性がある。これらの効

果が、RGD ミセルの遺伝子発現に寄与しているものと思われる。

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

遺伝子ベクターが細胞内で有効に機能発現するためには、ベクターがエンドソームから細胞質内へと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、我々はポリ(β -ベンジル-L-アスパルテート)(PBLA)のジエチレントリアミン(DET)とのアミノリシス反応を利用して合成した、側鎖にエチレンジアミン構造を有する PAsp(DET) が、低毒性でかつ効率的な遺伝子発現を示すことを明らかにした。そこで、この PAsp(DET)の遺伝子導入メカニズムを解明するため、PAsp(DET)と生体膜との相互作用に着目して評価を行ってきた。PAsp(DET)をローダミン B でラベルし、生理条件 pH 7.4 とエンドソーム内に対応する pH 5.5 で、PAsp(DET)と細胞膜との相互作用を蛍光顕微鏡により観察したところ、pH 7.4 では蛍光標識 PAsp(DET)の細胞膜への吸着はほとんど観察されなかったが、pH 5.5 では細胞膜への吸着が明らかに観察された。これは、pH 7.4 から pH 5.5 への変化に伴い、PAsp(DET)のプロトン化状態がモノプロトン状態からジプロトン状態へと促進され、PAsp(DET)と細胞膜との相互作用が大幅に増加したためと考察された。このような結果から、PAsp(DET)の pH に依存した生体膜との親和性変化は、その遺伝子導入過程において極めて重要であることが示唆された。そこで平成 20 年度は、PAsp(DET)と細胞膜との相互作用によってもたらされるエンドソーム脱出に関してさらに詳細に検討するために、ポリカチオン存在下での赤血球を用いた溶血試験やリポソーム内蛍光物質のリリース評価により、PAsp(DET)の生体膜に対する障害性を定量的に評価する予定である。

一方、平成 19 年度の検討によって、PAsp(DET)はその側鎖構造に特異的な分子内求核反応により、スクシンイミド環形成が促進され、主鎖が自己分解することが明らかとなった。すなわち、PAsp(DET)は 4°C の酸性条件では安定であるが、37°C の生理的条件下においてはゆっくりと分解する。この特性は、残留ポリカチオン鎖によって惹起されることが懸念される生体反応を回避出来るという点で従来型ポリカチオンに比べて大きな利点であり、本研究が指向する生体内安全性を高めた遺伝子ベクター設計の観点からも好ましいといえる。一方、製剤的な観点からは PAsp(DET)の保存時や反応時における分解反応の併発を抑制するための工夫も必要となってくる。この点について種々の検討を重ねた結果、エステルアミド反応時、停止反応時、精製行程における溶液温度を適正に管理することにより、再現性よく安定的に PAsp(DET)、または PEG とのブロック共重合体を供給する行程が可能となった。またこれに関連して、PAsp(DET)と pDNA より形成されるポリプレックスにコンドロイチン硫酸を添加することによって、培養細胞に対する遺伝子導入効率の向上ならびに毒性の低下が観察された。詳細なメカニズムについては今後の詳細な検討を必要とするが、コンドロイチン硫酸がポリプレックスの安定性向上に寄与していることが示唆されている。コンドロイチン硫酸は骨セメントの主要成分でもあるため、骨再生などの運動器疾患へ向けた遺伝子治療を考える上で、この知見

は極めて有用であると言える。

上述の効率的なエンドソーム脱出を示すポリカチオンである PAsp(DET)のナノデバイスへの搭載に関しては、平成 19 年度に、PAsp(DET)に cis-aconitic anhydride を反応させたアニオン性の PAsp(DET-Aco)を合成し、PAsp(DET)と pDNA より形成されるカチオン性のポリプレックスの表面を PAsp(DET-Aco)でコーティングしたアニオン性の新規三元系ナノデバイスを構築した。本デバイスは、PAsp(DET-Aco)の cis-aconitic group がエンドソーム内の酸性環境下において脱離し、カチオン性の PAsp(DET)に変換されるために、効率的なエンドソーム脱出を発現することが期待される。実際に、*in vitro*における遺伝子導入実験において、三元系ナノデバイスは、PAsp(DET)と pDNA より形成されるカチオン性のポリプレックスよりも優れた遺伝子発現を示し、表面がアニオン性のポリマーで覆われているためにカチオン性のポリプレックスと比較して著しく低い細胞毒性を示すことが確認された。

4) 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

超分子ナノデバイスを配置した骨形成誘導型インテリジェント・インプラントの開発では、平成 18 年度に引き続き、タンク及び流路の微小化、オートクレーブ可能なシステムの開発、ピエゾ法によるインクヘッドの開発を継続して行った。また、生理活性物質の立体的配置法としては、平成 18 年度に成功した FGF2 に加えて、インクジェットプリンタの装置改良により、DDS と組み合わせた遺伝子、核酸、薬剤等のナノデバイスのプリントを検討した。リン酸カルシウム担体はプリントした生理活性物質を過剰に吸着して、Bioavailability を低下させる可能性があるが、これを解決するために各生理活性物質に対して放出を促進するブロッキング剤の検討を行った。

さらに超分子ナノデバイスを用いた運動器の総合的な機能再建治療を見据え、平成 19 年度より運動器を構成する骨格筋へのアプローチを開始した。ナノデバイスの経静脈的投与に四肢近位での一時的駆血を併用したハイドロダイナミクス法を応用した手法により、従来報告されていた naked pDNA を用いた手法とくらべ、低侵襲かつ効率よい遺伝子導入が可能であることを見いだした。さらにナノデバイスを用いることにより、数週から 1 ヶ月を超える長期に渡って、高い遺伝子発現が持続し、機能再建治療への応用に向けた有力な遺伝子投与方法となる可能性が示唆された。また本手法では、ナノデバイス内の pDNA 凝縮形態コントロールにより、遺伝子発現量およびその持続が変動し、その結果は無細胞転写・翻訳システムや培養細胞へのマイクロインジェクションによる遺伝子導入効率とも密接に相関することが明らかとなった。すなわち、適切なナノデバイス設計による細胞内動態制御を *in vivo* 投与系で実現する可能性が示唆された。

(2) 原島グループ(北海道大学)

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

1) 凝縮遺伝子一分子をナノデバイスに内包するための新たな構築法の開発

多機能性エンベロープ型ナノデバイス(MEND)の実用的な製造並びに *in vivo* での適用を目的とし、粒子径の微小化、均一化を中心に研究を進めた。微小かつ均一であることが確認されている片岡らの高分子ミセル型ナノデバイス(PIC)に核移行性素子(NLS ミセル)を付加させた NLS-PIC ミセルを調製し、脂質膜でコートした MEND を作成した。現在、本 MEND の核移行能を評価している。また、新たなパッケージング戦略としてモノカチオンニックディタージェント(MCD)を用いた一遺伝子パッケージング法に着手した。スクリーニングの結果、微小かつ均一なナノ粒子(1 遺伝子粒子)を形成することが可能な MCD を特定することに成功した。今後は、一ナノ粒子のみをパッケージングし(一遺伝子パッケージング)、さらに脂質膜枚数を制御することを目標とする。

2) *in vivo* で組織選択的に遺伝子を送達するシステムの構築

肝臓における遺伝子デリバリーを成功させるためには、肝臓への移行性や実質細胞へのターゲティング、細胞内動態など多くのバリアを克服する必要がある。本年度は、初代培養肝細胞を用いた遺伝子発現実験について検討を行った。本細胞は非分裂細胞であるが、種々の MEND を用いてトランスフェクションした結果、高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。また、ファージディスプレイ法を用いて同定した IRQ ペプチドを修飾したリボソームは、肺に高い効率で蓄積することが明らかとなった。

3) 血管内皮細胞層の透過を目指した多段階膜融合型 MEND (T-MEND)の構築

ファージディスプレイ法を用いて同定した IRQ ペプチドを修飾した MEND の細胞内取り込み経路をマウス肺あるいはマウス脳由来毛細血管内皮細胞を用いて解析した。その結果、クラスリン経路やカベオラ経路を標的化可能なペプチドを見出すことに成功した。経細胞輸送に関しては、現在トランスウェルなどを用いた方法を用いながら検討を加えている。また、MEND 表面に糖を修飾することにより、核移行性のある MEND の構築に成功し、遺伝子発現を 10 倍以上上昇させることに成功した。本 MEND の多重化などを行い、カベオラ標的化リガンドを修飾することにより、今後実質細胞における遺伝子発現上昇を目指す。

4) PPD-MEND の最適化

固形がん局所で過剰発現が認められる matrix metalloproteinase(MMP)により切断を受ける PEG 脂質誘導体(PPD)を MEND 表面に装着することで、効果的に内包遺伝子をがん細胞内で選択的に発現させることに成功している。PPD-MEND は通常の切れない PEG を修飾した MEND(PEG-MEND)と比べ細胞内取り込み量が増加した。また CIDIQ 法による解析の結果、エンドソーム脱出が有意に上昇しており、細胞内動態が改善されることを明らかとした。

in vivo における血中滞留性の改善を検討した結果、PPD と組み合わせる PEG の分子量を

従来の 2000 から 5000 にすることで、PPD を多く含みかつ高い滞留性とがん移行性を示す組成(PEG/PPD-MEND)を見出すことに成功した。

これらの PEG/PPD-MEND は静脈内に投与後、2、6、24 時間後の血清中に炎症性サイトカインの産生は認められず、ALT・AST も正常値を示したことから、PEG/PPD-MEND は安全性の高いベクターであることが示唆された。また、PEG/PPD-MEND に siRNA を搭載し、担癌マウスに静脈内投与したところ、腫瘍組織で高いルシフェラーゼのノックダウンが認められた。

5) その他(核内動態の解析とその制御)

マウス肝臓に hydrodynamics 法で導入した外来 DNA の核内動態を追跡した結果、DNA メチル化やヒストン修飾とは無関係に silencing が生じる事が明らかになった。驚くべき事に、生理食塩水の hydrodynamics 法による投与で外来遺伝子発現が 10-100 倍上昇した。また、ヒストン高親和性配列の導入により外来遺伝子発現が上昇した。この結果は、核内動態制御の実現可能性を示している。

(3)長崎グループ(筑波大学)

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

1) 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リガンドである DNA アプタマーを中心に DNA アプタマー/PEG ハイブリッド界面を創製することを目的としている。これまでに生体適合性の高いポリエチレングルコール (PEG) と金ナノ粒子と相互作用を示すポリアミン (ポリジメチルアミノエチルメタクリレート:PAMA) のブロック共重合体 PEG-*b*-PAMA と末端にメルカプト基を有する siRNA を金ナノ粒子に共固定し、siRNA/PEG 化金ナノ粒子複合体 (ナノデバイス) を作製し、この複合体がガン細胞に取り込まれた後、細胞質内に大量に存在するグルタチオンと siRNA の交換反応により、siRNA を効率的に放出することで高い RNAi 効果を示すことを培養細胞で確認した。平成 19 年度は、この PEG 化金ナノ粒子の血中滞留性を向上させることを目的とし、PEG-*b*-PAMA の精密合成および PEG 化金ナノ粒子の詳細な特性評価を行なった。具体的な内容を以下に示す。PEG 末端に開始剤を導入し、原子移動ラジカル重合 (ATRP) 法により精密に分子量・分子量分布が制御された PEG-*b*-PAMA を合成した。様々な PAMA 鎖長の PEG-*b*-PAMA を用いて金ナノ粒子の PEG 化を行なった結果、この PEG 化金ナノ粒子は PEG により効果的に表面電荷が遮蔽されることが確認された。特に、PAMA 鎖長の短いもの(3~6)で PEG 化された金ナノ粒子は a)幅広い pH 範囲(2~12)、b)アルブミン溶液中、c)95%血清溶液中の様々な条件下で非常に高い分散安定性を示すことが確認されており、新規遺伝子キャリアとしての応用が期待される。

2) PEG 化機能性核酸・脂質の実用的製造技術への展開

これまで、佐々木らと共同により PEG 化機能性核酸が細胞内で効果的に機能すること、および原島らと共同により 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ている。本研究項目では、これら PEG 化機能性核酸・脂質の最適化や更なる機能の付与を目的としている。これまでに、PEG 化機能性核酸の新規キャリアシステムとしての pH 応答性 PEG 化ナノゲルと PEG-ポリアニオンブロック共重合体 (PEG 化機能性核酸のモデル) の複合化を検討した。平成 19 年度は、pH 応答性ナノゲルへの診断機能の付与を検討した。具体的な内容を以下に示す。フッ素核を用いる核磁気共鳴イメージング (^{19}F MRI) 技術は、生体内に内在性 ^{19}F が存在しないため検出時のバックグラウンドノイズが存在しない。 ^{19}F は天然に同位体が存在しないため、 ^{19}F を核種として利用する NMR の感度は ^1H に次いで高い。そこで、コア部にフッ素化合物とアミン化合物を共重合した PEG 化ナノゲル粒子を作製し、がん特異的な ^{19}F MRI プローブとしての機能評価を行なった。その結果、コアのフッ素モノマー組成比が 50 %未満であるナノゲルが溶液の pH に依存した ^{19}F NMR シグナルを示すことを見出した。すなわち、生理条件下 pH 7.4 では ^{19}F NMR ピークは観測されないが、固形がん周辺と同じ pH 6.5 においては ^{19}F NMR の強いピークが観測された。また、このナノゲル粒子は EPR (Enhanced permeability and retention) 効果により固形がんを集積することが期待されることから、フッ素/アミン混合コアナノゲル粒子が ^{19}F MRI 測定におけるプローブとして有用であることが期待できる。

(4-1) 佐々木グループ (九州大学)

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

1) PEG 化 DNA の大量合成法の検討

平成 19 年度は、機能性核酸を含むオリゴヌクレオチドと PEG とのコンジュゲート体の合成を固相上にてオレフィンメタセシス反応により行うため、末端にビニル基を含むリンカーを導入した DNA の合成に成功した。しかしながら、オレフィンメタセシス反応は条件検討のみで終わった。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、さらにクリックケミストリーによる PEG-機能性核酸の検討に着手している。

2) 高次構造 DNA 結合分子の開発

DNA の高次構造を認識する分子の開発を目指し、ポルフィリン誘導体の 2 量化反応における DNA の鋳型効果の利用を目的にリンカーを有するポルフィリン誘導体の設計、合成に成功した。このポルフィリン誘導体は 2 本鎖 DNA を用いたクリックケミストリーによる鋳型効果は観測されなかったが、DNA 非存在下によるリンカーの異なる 2 量化ポルフィリンの合成に成功した。また、左巻き Z 型 DNA の特異的リガンドの開発に成功した。

3) 高感度センシングのための新規機能性分子の開発

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、標的DNAあるいはRNAに対して標的塩基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。さらに修飾されたDNAは位置選択的に複製阻害、RNAは位置選択的に逆転写阻害を引き起こす事を明らかにした。また、高感度センシングを目的として、過酸化酸素を必要とせずに、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金属錯体触媒の開発に成功した。引き続き、標的配列の高感度センシング法への展開を開始している。

4) 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予備的検討を行った。その結果、配列特異的に翻訳が途中で停止したと考えられるたんぱく質の生成を確認した。さらに、機能性核酸を用いた編集機能の評価を開始している。

5) 機能性核酸搭載ナノデバイスの機能評価

平成19年度は、c-mycがん遺伝子標的的人工核酸およびbcl-2がん遺伝子標的的人工核酸の遺伝子阻害効果の検証を行うための修飾オリゴヌクレオチドの合成を行った。bcl-2を標的とした細胞増殖阻害実験では、予備的な検討結果ではあるが、機能性核酸を含むオリゴヌクレオチドは非常に強い増殖阻害能を有していることが示唆された(片岡・長崎グループと共同)。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、精製を行った(斯波らと共同)。

(4-2) 永次グループ(東北大学)

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

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19年度は機能性核酸を組み込んだPNA(ペプチド核酸)の合成を目指し、機能性核酸のPNAモノマーを合成しこれを用いて、PNAオリゴマーの合成に成功した。さらに合成したPNAオリゴマーを用いて、標的モデルDNAに対する反応性を検討したところ、末端にインテリジェント核酸を組み込んだPNAオリゴマーが標的に対してクロスリンク反応することを明らかにした。

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19年度はこの合成につい

て検討し、反応性塩基部分の効率的な合成を達成した。さらに塩基部と糖部分とをカップリングする方法にて、RNA 型、DNA 型、PNA 型のモノマーについて合成を検討した。その結果、PNA 型モノマー及び DNA 型モノマーの合成に成功した。

(5) 松村グループ (国立がんセンター)

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

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

ヒト脳腫瘍に対する *in vivo* 評価は、通常行われている皮下腫瘍では、脳における腫瘍血管の特性を反映しているとは言い難い。かくして、大脳半球への同所移植モデルを作成した。カチオニックリポソームなど全身投与が不可能なキャリアを使用するため、またそのキャリアによる治療効果を評価するため、脳の栄養動脈からの動注方法を確立した。さらには、生体イメージングによる脳腫瘍の縮小効果評価方法を確立した。

(6) 斯波グループ (国立循環器病センター)

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研究所、室長)

② 研究項目

1) 高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による効率の良い遺伝子導入条件の確立

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* での導入効率の良いベクターの開発を行っている。平成 19 年度は、*in vivo* での遺伝子発現効率を上昇させるため、細胞内において pDNA を放出しやすい構造として設計された、PEG-PAsp(DET) の連結部にジスルフィド(SS)結合が導入されたブロック共重合体 PEG-SS-PAsp(DET) を用いて、経肺投与による *in vivo* 遺伝子導入実験を行い、PEG-PAsp(DET) との比較、条件検討などを行って、遺伝子導入効率の改善に成功した。*In vivo* での良好な遺伝子発現効率を得るために、PEG-PAsp(DET) では N/P 比を 60~80 まで上昇させなければならなかったが、PEG-SS-PAsp(DET) を用いることにより、N/P 比は 20 で最大の遺伝子導入効率を得られた。

2) 高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による急性および慢性の毒性評価

循環器疾患に対する、副作用のない安全で非侵襲的な治療法確立のためには、発現効率の良い遺伝子導入ベクターを開発するとともに、毒性検査をする必要がある。昨年の成果で、PEG-PAsp(DET) を用いた遺伝子の経肺投与により、1 週間後の肺において炎症性サイトカイン遺伝子の発現は、亢進していなかったが、1 日後の肺においては著明に亢進していた。一方、PEG-SS-PAsp(DET) を用いた遺伝子の経肺投与により、1 日後の肺におけるサイトカイン遺伝子の発現を軽減することができた。また、PEG-SS-PAsp(DET)

を用いることにより、遺伝子導入後の生存率を改善することができた。

3) アポリポプロテイン B 遺伝子発現修飾機能性核酸による遺伝子治療の基礎実験

家族性高コレステロール血症に対するアポリポプロテイン 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 19 年度は、*in vitro* におけるアポリポプロテイン B 遺伝子 editing の評価系を確立した。まず、RNA レベルでの editing 評価のため、細胞の mRNA を精製し、cDNA に逆転写後、プライマーエクステンション法を用いて、アポリポプロテイン B100 と B48 の mRNA を定量する系を確立した。蛋白レベルでは、細胞培養液を用いたウェスタンブロッティングを行うことにより、B100 と B48 の蛋白量を定量する系も確立し、平成 20 年度に佐々木グループが完成させたアポリポプロテイン B 遺伝子発現修飾機能性核酸の評価を行う準備を整えた。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

1. K. Sugisaki, T. Usui, N. Nishiyama, W-D Jang, Y. Yanagi, S. Yamagami, S. Amano, K. Kataoka, Photodynamic therapy for corneal neovascularization using polymeric micelles encapsulating dendrimer porphyrins. *Invest. Ophthalm. Vis. Sci* 49 (3) 894-899 (2008)
2. S. Wu, S. Murai, K. Kataoka, M. Miyagishi, Yin Yang 1 induces Transcriptional Activity of p73 through Cooperation with E2F1. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 365 (1) 75-81 (2008)
3. A. Harada, K. Kataoka, Selection between block- and homo-polyelectrolytes through polyion complex formation in aqueous medium. *Soft Matter* 4 (1) 162-167 (2008)
4. Y. Imai, E. Kaneko, T. Asano, M. Kumagai, M. Ai, A. Kawakami, K. Kataoka, K. Shimokado, A novel contrast medium detects increased permeability of rat injured carotid arteries in magnetic resonance T2 mapping imaging. *J Athero. Throm.* 14 (2) 65-71 (2007)
5. S. Hiki, K. Kataoka, A Facile Synthesis of Azido-Terminated Heterobifunctional Poly(ethylene glycol)s for "Click" Conjugation. *Bioconjugate. Chem.* 18 (6) 2191-2196 (2007)
6. Y. Li, W. -D. Jang, N. Nishiyama, A. Kishimura, S. Kawauchi, Y. Morimoto, S. Miake, T. Yamashita, M. Kikuchi, T. Aida, K. Kataoka, Dendrimer Generation Effects on Photodynamic Efficacy of Dendrimer Porphyrins and Dendrimer-Loaded Supramolecular Nanocarriers. *Chem. Mater.* 19 (23) 5557-5562 (2007)

7. K. Masago, K. Itaka, N. Nishiyama, U. Chung, K. Kataoka, Gene delivery with biocompatible cationic polymer: Pharmacogenomic analysis on cell bioactivity. *Biomaterials* 28 (34) 5169-5175 (2007)
8. A. Kawamura, A. Harada, K. Kono, K. Kataoka, Self-Assembled Nano-Bioreactor from Block Ionomers with Elevated and Stabilized Enzymatic Function. *Bioconjugate Chem.* 18 (5) 1555-1559 (2007)
9. M. Nakanishi, J. -S. Park, W. -D. Jang, M. Oba, K. Kataoka, Study of the quantitative aminolysis reaction of poly(beta-benzyl L-aspartate) (PBLA) as a platform polymer for functionality materials. *React. Funct. Polym.* 67 (11) 1361-1372 (2007)
10. M. P. Xiong, Y. Bae, S. Fukushima, M. L. Forrest, N. Nishiyama, K. Kataoka, G. S. Kwon, pH-Responsive Multi-PEGylated Dual Cationic Nanoparticles Enable Charge Modulations for Safe Gene Delivery. *ChemMedChem* 2 (9) 1321-1327 (2007)
11. M. Oishi, Y. Nagasaki, N. Nishiyama, K. Itaka, M. Takagi, A. Shimamoto, Y. Furuichi, K. Kataoka, Enhanced Growth Inhibition of Hepatic Multicellular Tumor Spheroids by Lactosylated Poly(ethylene glycol)-siRNA Conjugate Formulated in PEGylated Polyplexes. *ChemMedChem* 2 (9) 1290-1297 (2007)
12. K. Miyata, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, PEG-based block cationomers possessing DNA anchoring and endosomal escaping functions to form polyplex micelles with improved stability and high transfection efficacy. *J. Control. Release* 122 (3) 252-260 (2007)
13. M. Oba, S. Fukushima, N. Kanayama, K. Aoyagi, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, Cyclic RGD peptide-conjugated polyplex micelles as a targetable gene delivery system directed to cells possessing alphavbeta3 and alphavbeta5 integrins. *Bioconjugate Chem.* 18 (5) 1415-1423 (2007)
14. H. Cabral, N. Nishiyama, K. Kataoka, Optimization of (1,2-diamino-cyclohexane)platinum(II)-loaded polymeric micelles directed to improved tumor targeting and enhanced antitumor activity. *J. Control. Release* 121 (3) 146-155 (2007)
15. M. Han, Y. Bae, N. Nishiyama, K. Miyata, M. Oba, K. Kataoka, Transfection Study Using Multicellular Tumor Spheroids for Screening Non-viral Polymeric Gene Vectors with Low Cytotoxicity and High Transfection Efficiencies. *J. Control. Release* 121 (1-2) 38-48 (2007)
16. S. Takae, Y. Akiyama, Y. Yamasaki, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Colloidal Au Replacement Assay for Highly Sensitive Quantification of Low Molecular Weight Analytes by Surface Plasmon Resonance. *Bioconjugate Chem.* 18(4) 1241-1245

(2007)

17. Y. Bae, N. Nishiyama, K. Kataoka, In Vivo Antitumor Activity of the Folate-
-Conjugated pH-Sensitive Polymeric Micelle Selectively Releasing Adriamycin in
the Intracellular Acidic Compartments. *Bioconjugate Chem.* 18(4) 1131-1139 (2007)
18. A. Kishimura, A. Koide, K. Osada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Encapsulation of
myoglobin in PEGylated polyion complex vesicles made from a pair of oppositely
charged block ionomers: a physiologically available oxygen carrier. *Angew. Chem.*
Int. Ed. 46(32) 6085-6088 (2007)
19. K. Itaka, S. Ohba, K. Miyata, H. Kawaguchi, K. Nakamura, T. Takato, U. -I. Chung,
K. Kataoka, Bone regeneration by regulated in vivo gene transfer using
biocompatible polyplex nanomicelles. *Mol Ther.* 15 (9) 1655-1662 (2007)
20. T. Satomi, Y. Nagasaki, H. Kobayashi, H. Otuka, K. Kataoka, Density Control of
Poly(ethylene glycol) Layer To Regulate Cellular Attachment. *Langmuir* 23(12)
6698-6703 (2007)
21. M. Oishi, H. Hayashi, K. Itaka, K. Kataoka, Y. Nagasaki, pH-Responsive
PEGylated nanogels as targetable and low invasive endosomolytic agents to induce
the enhanced transfection efficiency of nonviral gene vectors. *Colloid. Polym. Sci.*
285 1055-1060 (2007)
22. D. Akagi, M. Oba, H. Koyama, N. Nishiyama, S. Fukushima, T. Miyata, H. Nagawa,
K. Kataoka, Biocompatible micellar nanovectors achieve efficient gene transfer to
vascular lesions without cytotoxicity and thrombus formation. *Gene Ther.* 14 (13)
1029-1038 (2007)
23. J. K. Oh, D. J. Siegwart, H. -I Lee, G. Sherwood, L. Peteanu, J. O. Hollinger, K.
Kataoka, K. Matyjaszewski, Biodegradable Nanogels Prepared by Atom Transfer
Radical Polymerization as Potential Drug Delivery Carriers: Synthesis,
Biodegradation, in Vitro Release, and Bioconjugation. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (18)
5939-5945 (2007)
24. J. -S. Park, K. Kataoka, Comprehensive and accurate control of thermosensitivity of
poly(2-alkyl-2-oxazoline)s via well-defined gradient or random copolymerization.
Macromolecules 40 (10) 3599-3609 (2007)
25. Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae, S. Hiki, T. Ishii, K. Kataoka, A Protein Nanocarrier
from Charge-Conversion Polymer in Response to Endosomal pH. *J. Am. Chem. Soc.*
129 (17) 5362-5363 (2007)
26. Ohba S, Ikeda T, Kugimiya F, Yano F, Lichtler AC, Nakamura K, Takato T,
Kawaguchi H, Chung U. Identification of a potent combination of osteogenic genes
for bone regeneration using embryonic stem (ES) cell-based sensor. *FASEB J* 21:

1777-1787, 2007.

27. I. A. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, S. Hama, H. Akita, M. Ueno, H. Kishida, M. Kudoh, Y. Mishina, K. Kataoka, M. Yamada, H. Harashima, Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nanoparticles for gene delivery. *Gene Ther.* 14 (8) 682-689 (2007)
28. H. Hatakeyama, H. Akita, K. Kogure, M. Oishi, Y. Nagasaki, Y. Kihira, M. Ueno, H. Kobayashi, H. Kikuchi and H. Harashima. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Therapy* 14(1), 68-77, (2007).
29. S. Hama, H. Akita, S. Iida, H. Mizuguchi, and H. Harashima. Quantitative and mechanism-based investigation of differences in post nuclear delivery events between viral and non-viral vectors. *Nucleic Acid Res.* 35(5): 1533-43 (2007).
30. R. Suzuki, Y. Yamada, and H. Harashima. Efficient cytoplasmic protein delivery by multifunctional envelope-type nano device. *Biol. Pharm. Bull.* 30(4): 758-62 (2007).
31. H. Akita, R. Ito, H. Kamiya, K. Kogure and H. Harashima. Cell cycle-dependent transcription as a determinant of heterogeneity in transfection by a non-viral vector. *J. Gene Med.* 9(3): 197-207 (2007).
32. H. Kamiya, S. Fukunaga, T. Ohyama, and H. Harashima. The location of a the left-handedly curved DNA sequence affects exogenous DNA expression in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 461: 7-12 (2007).
33. Y. Nakamura, K. Kogure, S. Futaki and H. Harashima. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA. *J. Cont. Rel.* 119(3): 360-7 (2007).
34. H. Ochiai, M. Fujimuro, H. Yokosawa, H. Harashima and H. Kamiya. Transient activation of transgene expression by hydrodynamics-based injection and its reversal: Major cause of rapid decrease in expression from plasmid DNA. *Gene Ther.* 14(15): 1152-9 (2007)
35. T. Masuda, H. Akita, T. Nishio, K. Niikura, K. Kogure, K. Ijro, H. Harashima. Development of lipid particles targeted via sugar-lipid conjugates as novel nuclear gene delivery system. *Biomaterials.* 29: 709-723 (2007)
36. D. Mudhakar, H. Akita, E. Tan, H. Harashima. A novel IRQ ligand-modified nano-carrier targeted to a unique pathway of caveolar endocytic pathway. *J Control Release.* 125(2):164-173 (2008)
37. D. Miyamoto, M. Oishi, K. Kojima, K. Yoshimoto, Y. Nagasaki Completely dispersible PEGylated gold nanoparticles under physiological conditions: modification of gold nanoparticles with precisely controlled PEG-b-polyamine

Langmuir (in press) (2008)

38. K. Yoshimoto, S. Matsumoto, R. Asakawa, K. Uchida, T. Ishii, Y. Nagasaki, Immobilization and hybridization behavior of DNA on poly(ethylene glycol)-block-poly[2-(N,N-dimethyl amino)ethyl methacrylate]-modified gold surfaces *Chemistry Letter* 36, 1444-1445 (2007)
39. K. Uchida, Y. Hoshino, A. Tamura, K. Yoshimoto, S. Kojima, K. Yamashita, I. Yamanaka, H. Otsuka, K. Kataoka, Y. Nagasaki, Creation of a mixed poly(ethylene glycol) tethered chain surface for preventing the non-specific adsorption of proteins and peptides *Biointerphase* 2, 12-130 (2007)
40. M. Oishi, S. Sumitani, Y. Nagasaki On-off regulation of ¹⁹F magnetic resonance signals based on pH-sensitive PEGylated nanogels for potential tumor-specific smart ¹⁹F MRI probes *Bioconjugate Chemistry* 18, 1379-1382 (2007)
41. M. Oishi Y. Nagasaki Synthesis, characterization, and biomedical applications of core-shell-type stimuli-responsive nanogels –Nanogel composed of poly[2-(N,N-diethylamino)ethyl metha crylate] core and PEG tethered chains- *Reactive and Functional Polymers* 67, 1311-1329 (2007)
42. T. Sakura Y. Nagasaki Preparation of gold colloid using pyrrole- 2-carboxylic acid and characterization of its particle growth *Colloid and Polymer Science* 285, 1407-1410 (2007)
43. M. Oishi, H. Hayashi, M. Iijima, Y. Nagasaki Endosomal release and intracellular delivery of anticancer drugs using pH-sensitive PEGylated nanogels *Journal of Materials Chemistry* 17, 3720-3725 (2007)
44. T. Satomi, Y. Nagasaki, H. Kobayashi, T. Tateishi, K. Kataoka, H. Otsuka “Physicochemical characterization of densely packed poly(ethylene glycol) layer for minimizing nonspecific protein adsorption *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 7, 2394-2399 (2007)
45. M. Oishi, N. Miyagawa, T. Sakura, Y. Nagasaki pH-responsive PEGylated nanogel containing platinum nanoparticles: Application to on-off regulation of catalytic activity for reactive oxygen species *Reactive and Functional Polymers* 67, 662-668 (2007)
46. M. Oishi, H. Hayashi, T. Uno, T. Ishii, M. Iijima, Y. Nagasaki One-pot synthesis of pH-responsive PEGylated nanogels containing gold nanoparticles by autoreduction of chloroaurate ions within nanoreactors *Macromolecular Chemistry and Physics* 208, 1176-1182 (2007)
47. M. Oishi, S. Ikee Y. Nagasaki Lipase-catalyzed selective synthesis and micellization of poly(ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone) copolymer possessing a

- carboxylic acid group at the PEG chain end *Polymer Journal* 39, 239-244 (2007)
48. Y. Nagasaki, H. Kobayashi, Y. Katsuyama, T. Jomura, T. Sakura, Enhanced immuno-response of antibody/mixed-PEG co-immobilized surface, -construction of high-performance Immuno-magnetic ELISA system- *Journal of Colloid and Interface Science* 309, 524-530 (2007)
 49. Y. Nagasaki, K. Yoshinaga, K. Kurosawa, M. Iijima, Thermal and dispersion stable lipase-installed gold colloid, -PEGylation of enzyme-installed gold colloid- *Colloid and Polymer Science* 285, 563-567 (2007)
 50. Nakagawa O., Ono S., Tsujimoto A., Li Z., Sasaki S., Selective Fluorescence Detection of 8-Oxoguanosine with 8-oxoG-clamp, *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*, 26, 645-649 (2007).
 51. Nasr T., Taniguchi Y., Sasaki S., Synthesis of 1'-Phenyl Substituted Nucleoside Analogs, *Heterocycles*, Vol.71, No.12, 2659-2668 (2007)
 52. Alam Md., Majumdar A., Thazhathveetil A., Liu S.-T., Liu J.-Lan., Puri N., Cuenoud B., Sasaki S., Miller P., Seidman M., Extensive sugar modification improves triple helix forming oligonucleotide activity in vitro but reduces activity in vivo, *Biochemistry*, 46, 10222-10233 (2007)
 53. Onizuka K., Taniguchi Y., Sasaki S., Development of novel thioguanosine analogs with the ability to specifically modify cytidine, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 5-6 (2007).
 54. Aoki E., Taniguchi Y., Sasaki S., Effective strand invasion ODN incorporating a new bicyclic nucleoside analogue (WNA), *Nucleic Acids Symp. Ser.* , 51, 255-256 (2007).
 55. Ono S., Li Z., Koga Y., Tsujimoto A., Nakagawa O., Sasaki S., Development of a Specific Fluorescent Probe for 8-Oxoguanosine, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 51, 315-316 (2007).
 56. Uzu T., Sasaki S., A New Copper(II) Complex as an Efficient Catalyst of Luminol Chemiluminescence, *Organic Letters*, Vol. 9, No. 21, 4383-4386 (2007)
 57. Nakagawa O., Ono S., Li Z., Tsujimoto A., Sasaki S., Specific Fluorescent Probe for 8-Oxoguanosine, *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 46, No. 24, 4500-4503 (2007)
 58. Tsujita S., Tanada M., Kataoka T., Sasaki S., Equilibrium shift by target DNA substrates for determination of DNA binding ligands, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17, 68-72 (2007)
 59. Nagatsugi, F.; Nakayama, S.; Sasaki, S., Development of the Novel Drug Releasing System Triggered by Hybridization with Target Sequence, *Nucleosides, Nucleotides*

- Nucleic Acids, 26, 799-803 (2007)
60. Nagatsugi F.; Ogata, Y; Imoto, S.; Sasaki, S., Efficient Synthesis of 6-Substituted Purine Derivatives Using Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reactions with 2'-Deoxyguanosine O⁶-Tosylate, *Heterocycles*, 73, 493-501 (2007)
 61. T, Hamaguchi., K, Kato., Y, Matsumura., et al., A Phase I and Pharmacokinetic Study of NK105, a Paclitaxel-incorporating Micellar Nanoparticle Formulation. *Brit J Cancer.*, 97 : 170-176, 2007 .
 62. K, Maekawa., Y, Matsumura., et al., Genetic variations and haplotype structures of the DPYD gene encoding dihydropyrimidine dehydrogenase in Japanese and their ethnic differences. *J Hum Genet.*, 52 : 804-819, 2007.
 63. S, Yajima., Y Matsumura. et al., Expression profiling of fecal colonocytes for RNA-based screening of colorectal cancer. *Int J Oncol.* Nov;31(5):1029-37, 2007.
 64. T, Nakajima., Y, Matsumura., et al., Syneragistic antitumor activity of the novel SN-38 incorporating polymeric micelles, NK012, combined with 5-fluorouracil in a mouse model of colorectal cancer, as compared with that of irinotecan plus 5-fluorouracil. *Int J Cancer.* 122 : 2148-2153 ,2008.
 65. Y, Saito., Y, Matsumura., et al., Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor. *Can Science.*, 2008 (in press).
 66. M, Sumitomo., Y, Matsumura., et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppresses renal cancer progression. *Cancer Res.*, 122 : 2148-2153, 2008.
 67. Ichi I, Takashima Y, Adachi N, Nakahara K, Kamikawa C, Harada-Shiba M, Kojo S, Effects of Dietary Cholesterol on Tissue Ceramides and Oxidation Products of Apolipoprotein B-100 in ApoE-Deficient Mice. *Lipids.* 2007;42(10): 893-900
 68. Jo J, Nagaya N, Miyahata Y, Kataoka M, Harada-shiba M, Kangawa K, Tabata Y, Transplantation of genetically engineered mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction: benefit of a novel nonviral vector, cationized dextran. *Tissue Engineering*, 2007;13(2):313-322
 69. Y, Matsumura., Preclinical and clinical studies of anticancer drug-incorporated polymeric micelles. *J Drug Targeting.*, 15(7-8) : 507-517, 2007 .

(2) 特許出願

平成 19 年度国内特許出願件数： 5 件 (CREST 研究期間累積件数： 13 件)