

「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。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 年度より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 20 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、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ステルス機能向上の検討では、平成 19 年度までに分岐状 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の 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)の重合や、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によって、ブロック共重合体(PEGasus-PLL)を調製できることを確認した。そこで平成 20 年度には、分岐状 PEG を用いた高分子ミセル型ナノデバイスでの pDNA の凝縮形態と遺伝子発現能の相関について検討を行った結果、分岐状 PEG 型ナノデバイスは一本鎖 PEG に比べ粒子サイズが大きく、原子間力顕微鏡観察では凝縮度の低い形態をとることを確認した。遺伝子発現効率については一本鎖の場合と遜色なく、凝縮度が低いため細胞質中における pDNA のリリースが効率的に行われたと推測される。

汎用的なリガンド導入には、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)に着目しており、平成 19 年度までにアジド基とプロパルギル基を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、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。平成 20 年度には、Alkyne-PEG-NH₂ の合成法も最適化し、NCA 重合法にてブロック共重合体を合成するとともに、pDNA 内包高分子ミセル型ナノデバイスの調製へと展開し、サイズ制御されたナノデバイス形成を確認した。ナノデバイス表層にリガンド分子をカップリングさせる反応として、チオール基(SH 基)とマレイミド基の利用も検討

しており、平成 20 年度は、表層に遊離の SH 基を持つナノデバイス創製のための材料設計を行い、アリル-PEG-ポリグルタミン酸または脱保護前のアリル-PEG-ポリ(γ -ベンジルグルタメート)(PBLG)へのチオール基の導入について合成条件を確立した。

平成 19 年度の研究成果で、PAsp(DET)が低 pH 環境に応答した細胞膜傷害活性を示すことや、PEG-SS-PAsp(DET)からなるナノデバイスで PEG の脱離によりエンドソーム脱出が加速され、それに伴い遺伝子発現が上昇することが明らかになったが(19)、この実験事実はエンドソーム内での PAsp(DET)と細胞膜との相互作用が高分子ミセル型ナノデバイスのエンドソーム脱出において重要であることを示唆する。PAsp(DET)を利用した遺伝子発現効率に優れたナノデバイスを構築するためには、エンドソーム内の低 pH 環境下で PAsp(DET)がナノ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 環境下での PEG 鎖脱離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検討を低分子量 PEG のモデル系にて行ってきた。平成 20 年度には、より高分子量の PEG にも対応できるよう合成法を最適化し、高分子同士のカップリング反応および NCA 重合法の両方からブロック共重合体へ展開できるよう改良した。

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、平成 19 年度に引き続き、一遺伝子パッケージング法の研究を進めた。平成 19 年度までに、微小かつ均一であることが確認されている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 を作成していたが、平成 20 年度は高分子ミセル型ナノデバイスを内包する多重化 MEND の調製に成功した。本 MEND は、非分裂細胞において非常に高い遺伝子発現活性を示した。同時に、新たに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の開発にも成功した。

高信頼性製造技術としては、高分子ミセル型ナノデバイスと MEND の保存安定性を向上させるため凍結乾燥技術の開発に取り組み、両者ともに一部の系について、賦形剤添加によって満足できる粒子系や機能発現の結果を得ている。今後は、凍結乾燥条件の最適化を図るとともに、他の系への展開やドライパウダー化などを予定している。

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。リガンド装着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 架橋高分子ミセル型ナノデバイス表層に装着し、一桁以上高い遺伝子発現を得たと同時に、その遺伝子発現活性並びに作用機構を検証した(13)。平成 20 年度は、この要因を精査するため共焦点顕微鏡を用いて細胞内動態の観察を行ったところ、環状 RGD ペプチドを装着した SS 架橋型ナノデバイスが一般的な遺伝子ベクターと比べて速やかに細胞内に取り込まれることが解明され、さらに初期の取り込みはカベオラ、クラスリン経路とは異なる経路により取り込まれることが示唆された。

SS 架橋高分子ミセル型ナノデバイスについては、血中滞留期間延長のためのアプローチとして、デバイス表層へのさらなる PEG の導入(PEG 重層化)も試み、末端に活性エステル基(NHS)を有する PEG-NHS(分子量 2000、5000、20000、日油の提供)を用い、PEG 分子量 12000、PLys 重合度 70 の SS 架橋高分子ミセル型ナノデバイスに対して PEG 重層化を施した。その結果、分子量 5000 の PEG により重層化された SS 架橋ナノデバイスは、未処理のものとは比べ、投与 1 時間後において 10 倍近く高い血中濃度(20~30%)を示した。2000 や 20000 の PEG を用いた系でも 3-5 倍ほどの血中濃度の増加が見られた。

本項目では、標的細胞内における高分子ミセル型ナノデバイスの効率的な機能発現のため、デバイス内核でのプラスミド DNA(pDNA)のパッケージング制御についても検討しているが、平成 19 年度までに、無細胞転写・翻訳(cell-free)システムでの評価系で、pDNA の凝縮構造の制御により遺伝子発現効率を変調できるとの知見を得ていた。平成 20 年度は、パッケージング制御の確立のため、PLys 鎖長依存性を詳細に検討した結果、PLys 鎖が 40 以下では規則的に折り畳まれたロッド状の凝縮構造をとり、この構造の高分子ミセル型ナノデバイスは、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、従来の球状構造のナノデバイスや、デバイス化していない単独の pDNA よりも遺伝子発現効率が上昇するなどの特性を確認した。この特性は骨格筋を標的とし、近位駆血下、大伏静脈経由で投与したときにも再現されることを確認した。さらに平成 20 年度は、SH 基導入 PEG-PLys (12-39)を用い、SS 架橋によって安定化したロッド状ナノデバイスを調製し、血中滞留性を検討した結果、球状ナノデバイスより高い血中滞留性を確認した。

pDNA を内包する高分子ミセル型ナノデバイスは制がん剤内包高分子ミセルに比べ速やかに血流中から消失することが判っている。そこでナノデバイスの構造安定化のため、PEG-ポリカチオンブロック共重合体への疎水性分子の導入も検討しており、平成 19 年度までにコレステロールを ω 末端に導入した系で、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。平成 19-20 年度には、PEG-ポリカチオンブロック共重合体の連結部に疎水性基を導入し、ポリカチオン/pDNA 間の静電相互作用に加え、疎水性相互作用を利用したナノデバイスの安定化を目指した。平成 19 年度には疎水基部位がメチレン基3つのものを新規に合成したが、平成 20 年度にはメチレン基数を6つに伸長した結果、より安定な高分子ミセル型ナノデバイスが形成され、血中滞留性の予備的検討でもその有効性が示唆された。

疎水性基導入の効果は MEND の均一化の検討にも有効であり、脂質組成にテトラエチレングリコール(TEG)-コレステロール誘導体を加えるだけで均一かつ小さな粒子設計が可能であることを明らかとした(論文投稿中)。また、MEND の *in vivo* 応用には血清耐性が必須の条件となるが、MEND 脂質膜の組成や膜融合性ペプチド GALA などを用いることで、血清耐性型 MEND の構築にも成功した(論文投稿準備中)。さらに MEND の核移行性を促進するために、糖を核移行デバイスとして用いることで、遺伝子発現活性を増大させることに成功した(24)。MEND においては平成 19 年度までに、固形がん局所での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ていた。平成 20 年度は PPD-MEND の活性向上の目的で膜融合性ペプチド GALA を組み合わせた結果、PPD と GALA が協調的に機能し、*in vitro* および *in vivo* 癌局所投与において、従来よりも高いノックダウン効果を示すことに成功した(論文投稿中)。siRNA 搭載 R8/GALA-MEND は高い遺伝子発現抑制能を発揮し、そのメカニズムを解明し

たところ、pH に依存したエンドソーム脱出機構が重要であることが明らかとなった(28)。さらに、R8-MEND は効率的に細胞質中へ脱出し、MHC class-I を介して抗原提示できることも明らかとなった(29)。*In vivo*における血中滞留性を改善する目的で、PPD と組み合わせる PEG 脂質の分子量について検討した結果、従来の 2K に加えて、5K を用いることでより高い血中滞留性を得ることに成功した。

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、トランスサイトシスを促進するDNAアプタマーを中心に核酸/PEGハイブリッド界面を創製することを目指している。平成19年度までに、金ナノ粒子と相互作用を示すポリアミン(ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル:PAMA)とPEGとのブロック共重合体(PEG-*b*-PAMA)を精密合成し、末端にメルカプト基を有するsiRNAを金ナノ粒子に共固定化したsiRNA/PEG化金ナノ粒子複合体(ナノデバイス)を創製した(52)。平成20年度は、この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、新たに金ナノ粒子を内包するPEG化ナノゲル粒子の調製および評価を行った。金ナノ粒子内包PEG化ナノゲル粒子は、ポリアミンゲルコアに平均粒径8nmの金ナノ粒子を25個程度有するため、ナノゲル粒子溶液にレーザーを間照射したところ、8度近い温度上昇があり、効率的に光を熱に変換していることが判った。また、培養細胞を用いた金ナノ粒子内包PEG化ナノゲル粒子の光温熱療法の検討では、金ナノ粒子内包PEG化ナノゲル粒子を取り込ませた細胞のみで、レーザー照射による顕著な細胞死が観察された(論文準備中)。

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り、この過程でもベクターの化学構造は極めて重要となる。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(14)。平成 19 年度までに、PAsp(DET)の安定供給可能な製造方法を確立するとともに、その遺伝子導入機構を検討し、PAsp(DET)が生理環境において自己触媒的に分解することを明らかにした。平成 20 年度には分解機構について、側鎖構造依存的に活性化された側鎖アミドの主鎖カルボニル炭素への求核攻撃が主鎖切断の主要因であり、自己分解により PAsp(DET)が低分子量化する過程で毒性は速やかに低下し、分解物が炎症性サイトカインを惹起することもほとんど皆無となり、高い遺伝子導入効率のみならず、安全性も *in vivo* 実験において確認された。

PEG-PAsp(DET)については、N/P 比が高いほど遺伝子発現が高くなることが明らかになっている。これに関して、平成 20 年度にナノデバイスの複合体形成に関与せずに存在するフリーポリマーの影響を検討した。その結果、調製時に添加したポリマー量に関わらず、ナノデバイスの複合体は常に電荷比1であり、N/P 比4で調製したナノデバイスとフリーポリマーを別々に培地に添加した場合の遺伝子発現量は、N/P 比 10、20、40 で調製したナノデバイスの遺伝子発現量と同等であった。従って、PEG-PAsp(DET)を全身投与による遺伝子デリバリーに展開するためには、フリーポリマーを高分子ミセル型ナノデバイスに一体化させる必要があるが、PEG-PAsp(DET)の末端にコレステロール基を導入したところ、ポリマーの pDNA に対する会合力増大を確認し、希釈条件下での高い遺伝子導入効率や血中滞留性の向上も確認され、骨格筋への経静脈的投与におい

でも高い遺伝子導入効率を達成した。また、PAsp(DET)を全身投与による遺伝子デリバリーに展開するための異なる戦略として、PEG と PLys の間に PAsp(DET)を挿入した PEG-PAsp(DET)-PLys トリブロック共重合体を合成した(12)。その結果、PAsp(DET)の挿入により、PEG-PLys の遺伝子導入効率は 10 倍以上増加した。さらに、膵がん由来 BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対して in vivo での遺伝子導入効率を評価したところ、TGF- β 阻害剤と併用したところ、非常に効率よい腫瘍組織での GFP 発現が観察された(12)。

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、平成 19 年度までに 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し、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。一方、MEND 表面を糖修飾した核移行性 MEND では、遺伝子発現が 10 倍以上上昇した。平成 20 年度は、IRQ ペプチドを PEG の先端に修飾した場合と、直接 MEND 膜表面に修飾した場合の細胞内取り込み機構を解析した結果、PEG を介する方が高いカベオラ選択性が得られることを明らかにした(27)。

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。PEG 化 DNA の大量合成法の検討については、固相上での DNA の PEG 化が鍵であるが、平成 19 年度は固相上にてオレフィンメタセシス反応を検討したが、良好な収率で目的物は得ることはできなかった。平成 20 年度はクリックケミストリーによる PEG-機能性核酸を検討したが、コンジュゲート体を収率よく合成することはできなかった。そこで平成 21 年度は、固相上で末端にアミノ基を有する DNA を合成し、カルボキシル基を有する PEG とのアミド化によるコンジュゲート合成の検討を行う。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検討している 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については、平成 20 年度に c-myc を標的とした W 字型人工塩基による 3 本鎖 DNA 形成人工核酸を用いたアンチジーン法による細胞増殖阻害実験で、Raji 細胞に対する増殖阻害能が示唆されたため、阻害機構解明検討を始めた(57)

人工核酸による RNA 編集機能の実現を目指し、非細胞系ルシフェラーゼ発現系を用いた検討を行った。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(59)、さらに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た。種々検討によりこの翻訳停止のメカニズムが RNaseH による mRNA 切断であることが判明したので、mRNA 切断を引き起こさない機能性核酸による編集反応の検討を開始した。この他、高次構造 DNA 結合リガンドの開発として、枝分かれ構造 DNA を鋳型とする反応の検討および生成物の分析を開始した。また、高感度センシングのための機能性分子の開発として、平成 19 年度に確立した標的 DNA や RNA に対する塩基特異的修飾反応を、平成 20 年度は光照射により迅速に転移する反応に発展させるとともに、溶液の pH を塩基性にするによっても転移反応選択性の変化と高速化に成功した。

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。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すると共に、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。さらに平成 20 年度には、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 内包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血液脳関門 (BBB) は通過しないが、血液脳腫瘍関門 (BBTB) は容易に通過することが証明された (E-7)。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。

また、動原体構成タンパク KNTC2 に対する siRNA による脳腫瘍治療の試みとして、平成 20 年度には KNTC2 高発現脳グリオーマ株 LN299 に対し、KNTC2 siRNA はアポトーシスを惹起し、著明な殺細胞効果を発揮することを証明した。LN299 脳同所移植ラットに KNTC2 siRNA 搭載 MEND 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した。以上より、脳腫瘍非臨床評価系が確立し、今後種々の核酸およびそのキャリアの評価が行いうると考える。

基盤技術構築グループでは、平成 20 年度は、機能的核酸や siRNA のデリバリーのための材料設計を推進させ、高分子ミセル型ナノデバイスでは制がん剤の siRNA を内包した SS 架橋型ナノデバイス (A1-1) を用いて、A549 皮下肺がんモデルに対して、有意な制がん活性を確認した。さらなる改善のために、PEG 末端に環状 RGD ペプチド (cRGD) を導入し、がん細胞選択的な siRNA 導入を試みた結果、cRGD なしの SS 架橋ナノデバイスと比べ、ヒト子宮癌細胞 Hela に対して効率良い siRNA 導入を達成した。今後は、*in vivo* へと展開する予定である。MEND の系においては、PPD-MEND の活性向上の目的で膜融合性ペプチド GALA を組み合わせた結果、PPD と GALA が協調的に機能し、*in vitro* および *in vivo* 癌局所投与において、siRNA 搭載 MEND が従来よりも高いノックダウン効果を示すことに成功した (論文投稿中)。

難治性であることが知られている膵がんへの平成 20 年度の取り組みでは、平成 19 年度に構築した細胞内還元環境応答性 SS 架橋高分子ミセル型ナノデバイスについて、膵がん BxPC3 細胞の皮下移植マウスモデルに対する治療実験を行った。治療遺伝子としては、可溶性 VEGF 受容体 (sFlt-1) を発現する pDNA を使用し、血管新生阻害によるがんの増殖抑制効果を評価したところ、最適な架橋密度の SS 架橋ナノデバイスにおいて、膵がんの標準治療薬であるゲムシタビンや抗体医薬であるアバスタチンと比較して有意に高いがん増殖抑制効果が得られた。SS 架橋ナノデバイス全身投与後の sFlt-1 の発現は腫瘍組織特異的なものであり、腫瘍組織の血管密度が有意に低下していることが免疫染色により確認された。また従来の研究では PEG の分子量が 12,000、PLL の重合度が 70 のブロック共重合体 PEG-PLL (12-70) を用いてきたが、平成 20 年度はナノデバイス表面の PEG 密度向上のための設計として PEG の分子量が 17,000 の PEG-PLL (17-70) を使用して架橋ナノデバイスを調製したところ、血中滞留性の向上を確認した。さらに膵がん細胞

の皮下移植モデルマウスに対する sFlt-1 発現 pDNA を用いた治療評価では、従来の 12-70 と比べて高い制がん活性を確認した。

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-PAsp(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。平成 20 年度は、この高分子ミセル型ナノデバイスに対しマンニトールを添加して凍結乾燥を行ったところ、*in vitro* において遺伝子発現が 100 倍も増幅された。しかし、凍結乾燥後の PEG-SS-PAsp(DET)は、経肺投与による *in vivo* 遺伝子導入実験では遺伝子発現量は低下しており、炎症性サイトカインの発現は増加していた。また、平成 19 年度までに、モノクロタリン皮下注後の肺動脈性肺高血圧症モデルラットに対して PEG-PAsp(DET)を用いたアドレノメデュリン遺伝子の導入を行い、有意な右室圧の低下を認め有効性を証明したが、平成 20 年度は、このモデルラットにモノクロタリン投与と同時に PEG-PAsp(DET)を用いてアドレノメデュリン遺伝子を投与すると、生存曲線を著明に改善することが判った。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。平成 20 年度は、アポリポプロテイン B 遺伝子 editing の評価をより正確に、より簡便にするために、ウェスタンブロッティングにてアポリポプロテイン B 遺伝子の editing 機能を簡便に評価できるシステムを確立させた。また、この遺伝子を Cos-1 細胞にトランスフェクションして安定発現株の作成にも成功している。これらを用いて、基盤技術構築グループから供給される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っている。

⑦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

運動器疾患への高分子ミセル型ナノデバイスの応用に向けて、生体適合性高分子であるコンドロイチン硫酸の添加が有効であることを見出した。調製した PAsp(DET)または PEG-PAsp(DET)/pDNA にコンドロイチン硫酸を添加することで、*in vitro* ルシフェラーゼ遺伝子導入で 1 桁以上の発現増加が見られ、37°Cでの保存安定性向上も認められた。*In vivo* でもコンドロイチン添加した PEG-PAsp(DET)/pDNA の経肺投与で、サイトカイン発現が減少し、コンドロイチン硫酸が炎症反応を軽減させることを確認した。またナノデバイスの高い生体適合性が ES 細胞への遺伝子導入へも有効であることを確認した。ES 細胞への PAsp(DET)または PEG-PAsp(DET)/pDNA を用いた骨誘導因子遺伝子導入による分化誘導実験で、アデノウィルスを用いた導入と比べても、ナノデバイスでは高い効率で骨芽細胞分化が得られた。

運動器への *in vivo* 投与では、ナノデバイスが骨格筋をターゲットした遺伝子導入に有効であることを見出した。四肢近位で駆血後、末梢から経静脈的に遺伝子キャリアを注入するハイドロダイナミクス法による投与方法で、PEG-PLys またはコンドロイチン硫酸を添加した PEG-PAsp(DET)/pDNA のナノデバイスを用いると、単独の pDNA や他の市販の遺伝子キャリアと比べ、有意に高い遺伝子発現が観察され、*in vivo* においても pDNA 凝縮の形態制御の重要性が

強く示唆された。in vivo において最大限の投与効果、治療効果を得るための機能創り込み、評価のため、高速撮像可能な in vivo 共焦点画像システムを用いた観察を開始した。平成 20 年度は JST 戦略的創造研究推進事業・国際強化支援策によるマサチューセッツ総合病院(ボストン)との共同研究により、同病院で開発された in vivo 共焦点イメージングシステムを用いて、骨格筋、耳介皮下組織、がん組織の観察を行い、遺伝子発現の同一個体による細胞単位での経時的観察が可能であることを確認した。

インテリジェント型インプラントシステムの開発については、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た。生理活性物質の立体的配置法としては、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、リン酸カルシウム担体にデキストランやセリンなどを付与することにより、各生理活性物質の放出を促進できることが明らかになった。また、二液混合型により作成可能な四分岐状のマクロマーの組み合わせからなるポリエチレングリコール由来のハイドロゲルを作製し、このゲルに生体軟骨と同等の非常に高い力学特性を備わっていることを明らかにした。

3. 研究実施体制

(A) 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)

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

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ためには、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る。これを実現するためには、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、分岐状 PEG(PEGasus)のブロック共重合体化の検討を行い、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)または ϵ -トリフルオロアセチル-L-リシンの NCA(Lys(TFA)-NCA)の重合を成功させた。一方、一本鎖 PEG とポリリシンからなるブロック共重合体とプラスミド DNA (pDNA)との高分子ミセル型ナノデバイスを調製した時、極めて巧妙かつコンパクトに pDNA が凝縮され、その折りたたみ状態と遺伝子の発現効率に密接な関係が存在することが明らかになった。これに関連して、分岐状 PEG ブロック共重合体から調製される高分子ミセル型ナノデバイスでは分岐状 PEG によって増大する PEG の排除体積効果により pDNA の凝縮機構に制限がかかり凝縮形態に違いが出るのが予想されるため、分岐状 PEG を用いた場合の遺伝子発現効率の最適化を図る必要がある。そこで平成 20 年度は分岐状 PEG を用いた場合の凝縮形態と遺伝子発現能力の相関について検討を行った。その結果、分岐状 PEG を用いて形成される高分子ミセル型ナノデバイスは一本鎖 PEG の時に比べて pDNA の折りたたみが比較的ルーズであり、粒子サイズがやや大きく(>100nm)、原子間力顕微鏡での形態観

察では、一本鎖 PEG では完全な球体状に強く凝縮されてしまうようなポリカチオン鎖長、N/P 比 (DNA 中のリン酸基に対するポリカチオン中のカチオン性アミノ基のモル比)の条件においても完全な球状に高密度に凝縮されることはなく、コンパクトではあるがややゆるい凝縮形態をとることが明らかとなった。遺伝子発現効率については、PEG 密度の向上に伴う細胞への取り込み量の減少が予想されるものの、トータルの遺伝子発現量に関しては一本鎖の場合と遜色なく、凝縮形態がややゆるいことにより細胞質中における pDNA のリリースが効率的に行われたものと推測される。

PEG-ポリカチオンと pDNA の静電相互作用に基づいて形成された高分子ミセル型ナノデバイスでは、高イオン強度・シアストレスのかかる血流中での安定性が必ずしも十分とは言えず、実際に制がん剤内包高分子ミセルに比べ速やかに血流中から消失することが判っている。そこで平成 20 年度は、従来の PEG-ポリカチオンブロック共重合体のセグメント間に疎水性基を導入し、ポリカチオン/pDNA 間の静電相互作用に加え、疎水性相互作用を利用して高分子ミセル型ナノデバイスの安定化を目指した。PEG 片末端に疎水性基として種々のアルキル直鎖を導入し、そのアミノ基末端から BLA-NCA を重合して PEG-疎水基-PBLA を合成した後に、PBLA 部位をアミノリシス反応によってポリカチオンに変換した。従来の材料は疎水基部位がメチレン基3つであったが、メチレン基数を6つに伸長すると、より安定な高分子ミセル型ナノデバイスが形成され、血中滞留性に関する予備的検討でも、その有効性を示唆する結果が得られた。興味深いことにナノデバイスが安定化し pDNA が放出されにくくなっているにもかかわらず、*in vitro* 実験において従来よりも優れた遺伝子発現効率を示すことが明らかになった。

上記の分岐状 PEG の利用および PEG-アルキル鎖-ポリカチオンブロックの系に加えて、平成 20 年度は、高分子ミセル型ナノデバイスの血中滞留期間延長のためのアプローチとして、ジスルフィド(SS)架橋によって遺伝子を搭載したナノデバイス内核が安定化された SS 架橋ミセルに(i)さらなる PEG の導入 (PEG 重層化)と(ii) グルタルアルデヒド(GA)による二重架橋を行った。具体的には、(i)に関しては、日油から提供された末端に活性エステル基(NHS)を有する PEG-NHS(分子量 2000、5000、20000)を用い、PEG 分子量 12000、PLys 重合度 70 の SS 架橋高分子ミセル型ナノデバイスに対して PEG 重層化を施し、血中滞留性を評価した。その結果、分子量 5000 の PEG により PEG 重層化された SS 架橋ナノデバイスは、未処理のものとは比べ、投与 1 時間後において 10 倍近く高い血中濃度(20~30%)を示した。2000 や 20000 の PEG を用いた系においても 3~5 倍ほどの血中濃度の増加が見られた。これらの「PEG 重層化 SS 架橋ナノデバイス」の *in vivo* 活性については、SS 架橋ナノデバイスによって有意な制がん活性が確認されている膀胱がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルに対して評価していく予定である。一方、(ii)に関しては、「GA-SS 二重架橋ミセル」は、マウス投与 1 時間後において 100%近い非常に高い血中濃度を示した。

平成 20 年度は、高分子ミセル型ナノデバイス構築のための新たな材料設計に加えて、PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体の重合条件に関する検討も行った。従来の研究により、高分子ミセル型ナノデバイスの調製および機能発現においてポリアミノ酸の重合度が極めて重要であることが明らかにされてきており、本研究では、ポリアミノ酸の精密重合に適したアミノ酸無水物 (NCA 化合物) 重合法を採用している。しかし、アミノ酸の種類や PEG との鎖長比によっては、重合中に分子間相互作用の局所的な増大によってポリアミノ酸の伸長反応が途中で停止した

り、副反応により重合末端が失活して分子量分布が広がる(高分子鎖長のばらつき)などの問題があった。そのため従来より、重合末端の溶解度を向上させる重合温度や反応溶媒について検討してきた。平成 20 年度は、DMF 中にチオ尿素を適度に添加したところ、重合を妨げる要因となっていた分子間相互作用を抑制でき、重合温度も低下できたため、重合の副反応を抑制することができた。その結果、重合溶媒に拘らずともこれまでより分子量分布が狭く、より精密に高分子鎖長を制御した材料の合成が可能となった。この手法を用いて効果が確認されているのは BLG-NCA、BLA-NCA、Lys(TFA)-NCA などであり、これまで重合が難しかった PEG₄₀-NH₂末端からの NCA 重合にも効果的であった。今後は、チオ尿素を利用したブロック共重合体の高信頼性製造プロセスの構築に向けた重合条件の最適化を行う。

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

本項目では、標的細胞内における高分子ミセル型ナノデバイスの効率的な機能発現のため、デバイス内核でのプラスミド DNA (pDNA) のパッケージング制御を目的として、PEG-PLys の PLys 鎖長および pDNA との電荷比について検討し、PLys 重合度が 20 量体の PEG-PLys (12-20)により、pDNA が規則的に折り畳まれたロッド状のデバイスを調製できることを明らかにしてきた。平成 20 年度は、パッケージング制御の確立のため、PLys 鎖長依存性を詳細に検討した。その結果、PLys 鎖長 40 量体を境界とし、PLys 鎖が短いときは規則的に折り畳まれた凝縮経路をとるのに対し、40 以上では球状へ凝縮されることを確認した。また凝縮には DNA の二重らせん構造が密接に関連しており、ロッド状に折り畳まれるときは折り畳み箇所毎に二重鎖の解離が誘起されること、球状へ凝縮されるときは二重鎖はほぼ全領域にわたり解離することを見出した。さらにロッド状に制御され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、従来の球状構造のナノデバイスに比し遺伝子発現効率が著しく高く、またデバイス化していない単独の pDNA よりも遺伝子発現効率が上昇するなどの特性を確認した。この特性は骨格筋を標的とし、近位静脈下、大伏静脈経由で投与したときにも再現されることを確認した。ロッド状デバイスは比較的 PLys 鎖長が短いとき (40 以下)に得られるため、デバイスが高密度 PEG に覆われ、血中滞留性向上が期待される。一方でロッド状デバイスは 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、デバイス安定性は十分ではないものと予測される。そこで平成 20 年度は、SH 基を導入した PEG-PLys(12-39)を用い、ロッド状態を細胞内還元環境応答性の SS 架橋によって安定化した高分子ミセル型ナノデバイスを調製し、その血中滞留性を検討した。比較検討として、PLL の正電荷を維持しつつ SH 基を導入した系と、正電荷を潰しつつ SH 基を導入した系で、PLL 鎖長依存性を検討した。その結果、パッケージングは PLL 鎖長に関係なく電荷数により決定され、電荷が 40 以下のときにロッド状に折り畳まれること、さらにロッド状デバイスは球状のものより高い血中滞留性を示す傾向を確認した。

標的細胞内における高分子ミセル型ナノデバイスの効率的な機能発現は、デバイス表面へのリガンド分子の装着により達成可能である。平成 19 年度までに新生血管内皮細胞上での過剰発現が知られている $\alpha_v\beta_3$ インテグリンレセプターを特異的に認識する環状 RGD ペプチドを装着した SS 架橋型ナノデバイスを構築し、その遺伝子発現活性並びに作用機構を検証した (13)。平成 20 年度は、共焦点顕微鏡を用いて細胞内動態の live imaging を行ったところ、環状

RGD ペプチドを装着した SS 架橋型ナノデバイスが一般的なポリカチオンからなるナノデバイスと比べて非常に早く細胞内に取り込まれることが明らかになった。また早期エンドソームマーカである Rab5、後期エンドソームマーカである Rab9、カベソームマーカである caveolin 各種タンパク質に GFP を共発現させた培養細胞を使用して細胞内動態に関して詳細に評価したところ、初期の取り込みはカベオラ、クラスリン経路とは異なる経路により取り込まれることが示唆された。

上記のペプチドリガンドに加え汎用的に抗体やアプタマーなどのリガンド分子をナノデバイス表層に導入する場合、抗体や核酸の生理活性を損なわないよう、水中における高効率・高選択的な結合反応が必要となるが、その手法としてアジド基と末端アルキンによる環化付加反応 (Click Chemistry) の利用を検討している。この反応は、ナノデバイス中のどの官能基とも反応しないため、デバイス表層でのカップリング反応により種々のリガンド分子導入に適応できると考えられる。平成 20 年度は、Click Chemistry が適用できる新規ヘテロ PEG(Azide-PEG-NH₂、Alkyne-PEG-NH₂)の合成法の最適化、次いで NCA 重合法によるブロック共重合体合成の検討を踏まえ、得られるブロックを用いて pDNA 内包高分子ミセル型ナノデバイスの調製へと展開した。その結果、これまでと同様にサイズ制御されたナノデバイス形成が認められた。さらに、そのナノデバイス上での Click Chemistry の検討にも着手した。一方、高分子ミセル型ナノデバイスの表面にリガンド分子を穏和な条件で高効率にカップリングさせる反応性基としてはチオール基(SH 基)も有用である。例えば、数多く市販されているマレイミド化リガンドは、生理的 pH で選択的にチオール基と反応する。そこで平成 20 年度は、表層に遊離の SH 基を有するナノデバイス創製のための材料設計を行い、合成に着手した。具体的には、アリル-PEG-ポリ(γ-ベンジルグルタメート)(PBLG)へのチオール基の導入について検討を行い、合成条件を確立した。

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(14)。さらに、平成 19 年度までに、PAsp(DET)の安定供給可能な製造方法を確立するとともに、その遺伝子導入のメカニズムに関して詳細な検討を行い、PAsp(DET)が生理環境において自己触媒的に分解することを明らかにした。そこで、平成 20 年度はその分解挙動とその機構解明と、分解が毒性と遺伝子発現に及ぼす影響について検討を行った。分解機構については、構造の類似したグルタミン骨格では分解が確認されず、アスパラギン骨格のときのみ、さらにアスパラトアミド側鎖 β 位または γ 位に1級または2級アミンが存在するときに顕著な自己分解挙動が観察されることから、側鎖構造依存的に活性化された側鎖アミドの主鎖カルボニル炭素への求核攻撃が主鎖切断の主要因となっていることが明らかにされつつある。また自己分解により低分子量化した PAsp(DET)は、毒性に敏感な初代培養細胞に対しても分解に伴って速やかに毒性が低下することが確認された。分解後の PAsp(DET)は炎症性サイトカインを惹起することもほとんど

皆無となり、高い遺伝子導入効率のみならず、安全性もモデルマウスに対する *in vivo* 実験において確認された。

従来の検討によりPEG-PAsp(DET)については、N/P比が高いほど遺伝子発現が高くなることが明らかになっている。これに関して、平成20年度にナノデバイスの複合体形成に関与せずに存在するフリーポリマーを超速心分析法により定量した。その結果、ナノデバイス調製時に添加したポリマー量に関わらず、ナノデバイスの複合体は常に電荷比1であることを確認した。この結果から、高N/P比での高遺伝子発現にはフリーポリマーとして存在するPEG-PAsp(DET)が寄与することが示唆された。実際、N/P比4で調製したナノデバイスとフリーポリマーを別々に培地に添加した場合の遺伝子発現量は、N/P比10、20、40で調製したナノデバイスの遺伝子発現量と同等であった。従って、PEG-PAsp(DET)を全身投与による遺伝子デリバリーに展開するためには、フリーポリマーを高分子ミセル型ナノデバイスに一体化させる必要がある。そこで、PEG-PAsp(DET)の末端にコレステロール基を導入しデバイス調製を行った結果、ポリマーのpDNAに対する会合力増大を確認した。さらに、希釈条件下における高い遺伝子導入効率及び血中滞留性の向上を確認し、骨格筋への経静脈的投与においても高い遺伝子導入効率を達成した。また、PAsp(DET)を全身投与による遺伝子デリバリーに展開するための異なる戦略として、PEGとPLysの間にPAsp(DET)を挿入したPEG-PAsp(DET)-PLysトリブロック共重合体を合成した(12)。PEG-PAsp(DET)-PLysトリブロック共重合体は遺伝子との間で、生体適合性PEG外殻、エンドソーム脱出用PAsp(DET)中間層、PLys/DNAコアの三層ミセル型デバイスを構築すると予想される。結果として、PAsp(DET)の挿入により、PEG-PLysの遺伝子導入効率は10倍以上増加した。さらに、腫瘍由来BxPC3細胞の皮下移植モデルに対して、蛍光タンパク質(GFP)遺伝子内包ミセルを静注により投与し、*in vivo*での遺伝子導入効率を評価した。PEG-PAsp(DET)-PLysミセル単独投与では、BxPC3腫瘍における有意なGFP発現は確認されなかったものの、腫瘍組織選択的に高分子物質の血管透過性を向上させるTGF- β 阻害剤と併用したところ、非常に効率よい腫瘍組織でのGFP発現が観察された(12)。

従来の PAsp(DET)の機能発現機構の研究から、エンドソーム内での PAsp(DET)と細胞膜との相互作用が高分子ミセル型ナノデバイスのエンドソーム脱出において重要であることが示唆されている。実際に、平成19年度の研究成果において、PAsp(DET)が低pH環境に反応した細胞膜傷害活性を示すことやPEG-SS-PAsp(DET)から形成されたナノデバイスにおいてPEGの脱離によりエンドソーム脱出が加速され、それに伴い遺伝子発現が上昇することが明らかになっている(19)。すなわち、PAsp(DET)を利用してさらに遺伝子発現効率に優れたナノデバイスを構築するためには、エンドソーム内の低pH環境下でPAsp(DET)がナノデバイス表面に露出される材料設計が有効であると考えられる。そこで、高分子ミセル型ナノデバイスに低pH環境下でPEG鎖が脱離でき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検討を低分子量PEGのモデル系にて行ってきた。平成20年度には、より高分子量のPEGにも対応できるよう合成法を最適化し、高分子同士のカップリング反応およびNCA重合法の両方からブロック共重合体へと展開できるよう改良を加えた。得られるブロック共重合体のpH応答挙動に関しては、経時変化を追跡するなどの検討を継続している。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、PAsp(DET)はポリカチオンであるために様々な生

体成分と相互作用することが予想され、またマクロファージ上のスカベンジャーレセプターによって認識される可能性が高いために、PAsp(DET)を表面に導入したナノデバイスはそのままでは全身投与に展開することはできない。そこで我々は、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 より形成されるカチオン性のポリプレックスへ添加することによって、アニオン性の三元系ナノデバイスを構築した。この三元系ナノデバイスは、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)構造が復元されるため、優れたエンドソーム脱出効率を示す。平成 20 年度は、PEG-PLys ブロック共重合体を用いた pDNA 内包高分子ミセルに対する PAsp(DET-Aco)の適用を目指し、Click Chemistry を利用したカップリング反応との統合を設計した。具体的には、PAsp(DET-Aco)の末端に対し、Click Chemistry に必要な官能基であるアルキン構造を導入することに成功した。この末端アルキン化 PAsp(DET-Aco)を高分子ミセル表層へ搭載する前段階として、PLys ホモポリマーと pDNA より形成されるカチオン性のポリプレックスへ添加し、得られる三元系ナノデバイスの機能評価を行った。毒性に対して敏感な HUVEC (正常ヒト臍帯静脈内皮細胞)を用いた in vitro 遺伝子導入実験から、PAsp(DET-Aco)の添加により遺伝子発現の向上が認められた。さらに、共焦点レーザー顕微鏡観察からエンドソーム脱出が確認され、PAsp(DET-Aco)の機能発現が、PAsp(DET)だけでなく PLys を用いたポリプレックスにも適用できることが示された。

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 20 年度は、機能性核酸をはじめとするオリゴ核酸デリバリーのための高分子ミセル型ナノデバイスの材料設計を行った。ここでは、オリゴ核酸として効率的な配列依存的遺伝子ノックダウン効果を示す siRNA を使用した。第一のアプローチとして、遺伝子と同様に、SS 架橋高分子ミセル型ナノデバイスを展開してきた(9)。実際、制がん剤の siRNA を内包した SS 架橋ナノデバイスは、A549 皮下肺がんモデルに対して、有意な制がん活性を示すことが明らかとなった。このシステムのさらなる改善のために、PEG 末端に環状 RGD ペプチド(cRGD)を導入し、がん細胞選択的な siRNA 導入を試みた。その結果、cRGD-SS 架橋ナノデバイスは、cRGD なしの SS 架橋ナノデバイスと比べ、ヒト子宮癌細胞 Hela に対して効率良い siRNA 導入を達成した。今後は、in vivo へと展開する予定である。また、第二のアプローチとして、siRNA キャリア安定化を目的としてコアとなるポリカチオン構造を見直した。SS 架橋ミセルは安定化に優れるものの、積極的なエンドソーム脱出機能を有していない。よって、これまでに遺伝子デリバリーにおいて強力なエンドソーム脱出を達成しているカチオン性ポリアスパラギン誘導体 PAsp(DET)に対し、疎水基の導入を試みた。具体的には、PAsp(DET)側鎖の 1 級アミンにステアロイル基の導入を行った。数~数十%の導入率を有する PAsp(DET-ST)を合成し、in vitro 環境下で種々の培養細胞に対してルシフェラーゼ遺伝子ノックダウン(RNAi)実験を行ったところ、19%のステアロイル導入率を有する PAsp(DET-ST)は、市販のポリカチオン型遺伝子導入試薬 ExGen500 と比べ、はるかに効果的な RNAi を示した。さらに、内在性かつ制癌活性に繋がる遺伝子である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)とその受容体の一つである VEGF-R1 に対する siRNA を用いて in vitro RNAi 実験を行ったところ、特にヒト膵臓癌細胞である Panc-1 に顕著な RNAi 活性を示すことが明らかとなった。今後は PAsp(DET-ST)への PEG の導入を図ると共に、in vivo への展開を図る予定で

ある。

一方、オリゴ核酸搭載ナノデバイスの実用化に向けては、保存安定性などの見地も非常に重要である。そこで平成20年度は、上記の siRNA 搭載ナノデバイスの凍結乾燥処理を検討した。具体的には PAsp(DET)と siRNA からなる複合体溶液に対し、結晶性を有するマンニトールなどの賦形剤を添加した後、凍結乾燥処理を施した。結果として、凍結乾燥処理前は多分散であった(動的光散乱で多分散度が 0.5~1.0) PAsp(DET)/siRNA 複合体を、凍結乾燥処理により多分散度 0.1~0.2 かつ粒径 80nm ほどの安定なナノデバイスに転換できることを発見した。また、RNAi 活性については、ルシフェラーゼ安定発現メラノーマ(B16F10)に対してルシフェラーゼノックダウン実験を行った。凍結乾燥未処理の系は RNAi 活性を示さず、凍結乾燥処理を施した PAsp(DET)/siRNA ナノデバイスでのみ有意な RNAi 活性が確認された。今後は、凍結乾燥条件の最適化を図るとともに、PAsp(DET-ST)の系、PEG 化 PAsp(DET)系に向けて展開する予定である。

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

膵がんは血管密度が低く、厚い間質で覆われているため、薬剤到達性が低く、難治性であることが知られている。そこで平成20年度は、平成19年度に構築した細胞内還元環境にตอบสนองして開裂するジスルフィド(SS)架橋内核を有する高分子ミセル型ナノデバイスについて、膵がん BxPC3 細胞の皮下移植マウスモデルに対する治療実験を行った。治療遺伝子としては、可溶性 VEGF 受容体(sFlt-1)を発現する pDNA を使用し、血管新生阻害によるがんの増殖抑制効果を評価したところ、最適な架橋密度の SS 架橋ナノデバイスにおいて、膵がんの標準治療薬であるゲムシタビンや抗体医薬であるアバスタチンと比較して有意に高いがん増殖抑制効果が得られた。SS 架橋ナノデバイス全身投与後の sFlt-1 の発現は腫瘍組織特異的なものであり、腫瘍組織の血管密度が有意に低下していることが免疫染色により確認された。また従来の研究では PEG の分子量が 12,000、PLL の重合度が 70 のブロック共重合体 PEG-PLL (12-70)を用いてきたが、平成20年度はナノデバイス表面の PEG 密度向上のための設計として PEG の分子量が 17,000 の PEG-PLL (17-70)を使用して架橋ナノデバイスを調製したところ、血中滞留性の向上を確認した。さらに膵がん細胞の皮下移植モデルマウスに対する sFlt-1 発現 pDNA を用いた治療評価では、従来の 12-70 と比べて高い制がん活性を確認した。

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

運動器疾患への高分子ミセル型ナノデバイスの応用に向けて、生体適合性高分子であるコンドロイチン硫酸の添加が有効であることを見出した。コンドロイチン硫酸は骨軟骨系を中心とした細胞外マトリックスの主成分の一つで負電荷を持つが、調製した PAsp(DET)または PEG-PAsp(DET)/pDNA にコンドロイチン硫酸を添加することで、in vitro ルシフェラーゼ遺伝子導入で1桁以上の発現の増加が見られた。またこれらコンプレックスを調製後 37°C に一晩静置したのち遺伝子導入に用いても、発現はほとんど減少せず、安定性の向上が認められた。In vivo でもコンドロイチン添加した PEG-PAsp(DET)/pDNA の経肺投与で、サイトカイン発現が減少し、コンドロイチン硫酸が炎症反応を軽減させることが明らかとなった。

またナノデバイスの高い生体適合性が ES 細胞への遺伝子導入へも有効であることを確認し

た。ES 細胞への PAsp(DET)または PEG-PAsp(DET)/pDNA を用いた骨誘導因子遺伝子導入による分化誘導実験で、アデノウィルスを用いた導入と比べても、ナノデバイスでは高い効率で骨芽細胞分化が得られた。長期間の培養、遺伝子の反復投与の必要な実験系で、アデノウィルスでは顕著な細胞毒性が生ずるのに対して、これらナノデバイスでは毒性が非常に低いことが特徴的であった。

運動器への *in vivo* 投与では、ナノデバイスが骨格筋をターゲットした遺伝子導入に有効であることを見出した。四肢近位で駆血後、末梢から経静脈的に遺伝子キャリアを注入するハイドロダイナミクス法による投与方法で、PEG-PLys またはコンドロイチン硫酸を添加した PEG-PAsp(DET)/pDNA のナノデバイスを用いると、単独の pDNA や他の市販の遺伝子キャリアと比べ、有意に高い遺伝子発現が観察された。PEG-PLys/pDNA では、無細胞転写・翻訳システム(*cell-free* システム)やマイクロインジェクション遺伝子導入での結果と一致した骨格筋遺伝子発現が観察され、*in vivo* においても pDNA 凝縮の形態制御の重要性が強く示唆された。

in vivo において最大限の投与効果、治療効果を得るための機能創り込み、評価のため、高速撮像可能な *in vivo* 共焦点画像システムを用いた観察を開始した。平成 20 年度は JST 戦略的創造研究推進事業・国際強化支援策によるマサチューセッツ総合病院(ボストン)との共同研究により、同病院で開発されている *in vivo* 共焦点イメージングシステムを用いて、骨格筋、耳介皮下組織、がん組織の観察を行った。遺伝子発現の同一個体による細胞単位での経時的観察が可能であることを確認した。

インテリジェント型インプラントシステムの開発については、平成 20 年度は 18、19 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、18、19 年度に成功した FGF2 に加えて、インクジェットプリンターの装置改良により、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、デキストランやセリンなどをブロッキング剤として付与することにより、各生理活性物質の放出を促進できることが明らかになった。また、新たに二液混合型により作成可能なポリエチレングリコール由来のハイドロゲルを作製した。このゲルは、四分岐状のマクロマーの組み合わせからなり、マクロマー水溶液の二液混合により簡便に作成することができた。その網目構造は非常に均一な構造を有しており、そのために生体軟骨と同等の非常に高い力学特性を有していることが明らかになった。

(B-1)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

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

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)の実用的な製造ならびに *in vivo* での適用を目的とし、粒子の微小化、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を脂質膜で覆うことによって多重化した MEND の

調製に成功した。本 MEND は、非分裂細胞において非常に高い遺伝子発現活性を示した。同時に、新たに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の開発にも成功した。

MEND の凍結乾燥技術の開発に小暮ら(京都薬科大)と共同で行なった。その結果、凍結乾燥により MEND の物性と機能が大きく変化し、構造そのものが破壊され、MEND の活性も著しく低下することを見出した。様々な物質について MEND のエンベロープ保護効果を検討したところ、数種類の凍結保存安定化物質を見出すとともに(特許出願準備中)、R8-MEND および PPD-MEND の凍結乾燥法の基本技術の確立に成功した。

MEND に標的リガンドとしてトランスフェリンを PEG 先端に修飾し、エンドソーム脱出素子として GALA を搭載した Tf/GALA-MEND の構築法を確立した(22)。小暮、馬場(名古屋大)らと共同で、チップ上で MEND を構築する新たな方法(Nanopackaging)の確立に成功した(23)。

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

MEND の核移行性を促進するために、糖を核移行デバイスとして用いることで、遺伝子発現活性を増大させることに成功した(24)。さらに、MEND の均一化の検討にて、脂質組成にテトラエチレングリコール(TEG)-コレステロール誘導体を加えるだけで均一かつ小さな粒子設計が可能であることを明らかとした(論文投稿中)。また、MEND の *in vivo* 応用を行なう上で、血清耐性は必須の条件となるが、MEND 脂質膜の組成や GALA などを用いることで、血清耐性型 MEND の構築に成功した(論文投稿準備中)。本メカニズムを細胞内動態の観点から解析したところ、GALA 修飾はエンドソーム脱出過程を促進するとともに、細胞内転写過程などの核移行後の過程を促進することが明らかとなった。また、遺伝子の核送達量と発現の間には、正の非線形があることも明らかとなった(25)。さらに、核内遺伝子修復効率を促進するデバイスの改良にも成功した(26, 30)。

3) 血管内皮細胞層の透過を目指したキャリアの構築

ファージディスプレイ法を用いて同定した IRQ ペプチドは、カベオラ経路を標的化可能なペプチドであり、*in vivo* 応用を行なう上で PEG 化が重要と考えられる。IRQ を PEG の先端に修飾した場合と、直接 MEND 膜表面に修飾した場合の細胞内取り込み機構を解析した結果、PEG を介する方が高いカベオラ選択性が得られることが明らかとなった(27)。

経細胞輸送に関しては、既存のトランスウェルを用いると、キャリアの透過性を評価する際の種々の重要な問題が明らかとなり、新しい評価系の確立の重要性が認識された。基底膜として新たな素材を導入し、独自のトランスウェルを作成したところ、IRQ をはじめとする種々のペプチド修飾リポソームのトランスサイトーシスを評価できるようになった。

4) PPD-MEND の最適化

PPD-MEND の活性向上の目的で膜融合性ペプチド GALA を組み合わせた結果、PPD と GALA が協調的に機能し、*in vitro* および *in vivo* 癌局所投与において、従来よりも高いノックダウン効果を示すことに成功した(論文投稿中)。また、siRNA 搭載 R8/GALA-MEND は高い遺伝子発現抑制能を発揮し、そのメカニズムを解明したところ、pH に依存したエンドソーム脱出機構

が重要であることが明らかとなった(28)。さらに、R8-MEND は効率的に細胞質中へ脱出し、MHC class-I を介して抗原提示できることも明らかとなった(29)。

In vivo における血中滞留性を改善する目的で、PPD と組み合わせる PEG 脂質の分子量について検討した。その結果、従来の 2K に加えて、5K を用いることでより高い血中滞留性を得ることに成功した。これらの知見をもとに、新たに分子量 5K の PPD を長崎らとの共同で合成し、従来の PPD よりも血中滞留性が上昇することを見出した。これまでに、血清存在下でも高い活性を示す R8/GALA-MEND の構築に成功しているが、この R8/GALA-MEND に PPD を装着し最適化を検討したところ、*in vitro* において従来型の PPD-MEND と比較してより活性の高い MEND を構築することに成功した。

(B-2) 小暮グループ(京都薬科大学)

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

1) 経皮遺伝子送達システムの開発

ナノ粒子であるプラスミド DNA (pDNA) 封入 MEND を、臨床で用いられる無針注射器によって健常なマウスおよび悪性黒色腫瘍を背部に移植したマウスに投与し、皮膚切片中における MEND の動態を検討したところ、皮内および皮下移植した腫瘍組織への MEND の移行が確認され、これまで低分子に限られていた無針注射器によってはじめてナノサイズの粒子を皮内に送達することに成功した。また、機能性核酸である siRNA を様々なポリカチオンと複合体化させたナノ粒子をイオントフォレシスに供することによって、皮内に非常に効率よく siRNA を送達できることを見出した。さらに、送達された siRNA によって皮内に発現しているハウスキープ遺伝子 MAPK を有意に抑制することに成功した(論文投稿準備中)。さらに、長崎グループ(筑波大)と共同で、上記ポリカチオンよりも高い機能性を有している PEG 化ナノゲル粒子と siRNA による複合体粒子のイオントフォレシスを試みたところ、皮内への siRNA の効率的な送達に成功した。

2) 製剤化のためのナノデバイス MEND の凍結乾燥技術の開発

北大原島グループと共同で MEND の凍結乾燥技術の開発に着手した。その結果、凍結乾燥によって MEND の物性が大きく変化し、構造そのものが破壊されること、さらに凍結乾燥によって MEND の遺伝子発現活性が10万分の1にまで低下することを見出した。様々な物質について MEND のエンベロープ保護効果を検討したところ、数種類の凍結保存安定化物質を見出した(特許出願準備中)。この物質の添加により、凍結乾燥による物性変化および構造崩壊を防ぐことが可能となり、凍結乾燥前と完全に同じ遺伝子発現活性を保持させることに成功した。さらに、東京薬科大学尾関准教授(製剤設計学)の協力の下、MEND のドライパウダー化を確立するため、まずリポソーム(MEND のエンベロープ)について 4 流体ノズルスプレードライ装置を用いてドライパウダー化を行ったところ、粒度分布幅の狭いドライパウダー化リポソームの作成に成功した。

(C) 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

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

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、佐々木および原島らと共同により、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、分子の自己組織化に依存しないナノデバイスを構築することを目的とした。これまで、分子の自己組織化に依存しないナノデバイスとして、シェルに生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)ブラシと、コアにpH応答性ポリアミンゲルを有するコア-シェル構造のPEG化ナノゲル粒子(〜70 nm)を工業的に用いられている乳化重合法により合成してきた。このPEG化ナノゲル粒子は、生理条件下(正常組織)のpH 7.4では収縮状態であるが、細胞内エンドソームのpH 6〜5においてはコアのアミノ基がプロトン化することで膨潤するため、効率的なエンドソームエスケープが期待される。さらに、内核のポリアミンゲルは架橋された網目構造を有するため、見かけの分子量が高くアニオン性の核酸医薬と強く相互作用し、体内での安定性向上が期待される。PEG化ナノゲル粒子にsiRNAを種々のN/P比(ナノゲルのアミノ基の数/siRNAのリン酸基の数)で混合することで複合体を調製した。また、N/P=2で調製したsiRNA・PEG化ナノゲル粒子複合体に対し、ポリアスパラギン酸(ポリアニオン)の添加量を増加させることで、置き換わり耐性(安定性)を評価した。さらに、N/P=2で調製した非架橋型PEG/ポリアミン・siRNA複合体についても、置き換わり耐性(安定性)を同様に評価した。その結果、非架橋型PEG/ポリアミン・siRNA複合体は、0.5当量以上(ポリアスパラギン酸のカルボキシル基の数/siRNAのリン酸基の数)のポリアスパラギン酸を添加すると容易に置き換わることが判った。一方、siRNA・PEG化ナノゲル粒子複合体は、0.5当量のポリアスパラギン酸を添加しても置き換わりは全く起こらず、1.0当量以上のポリアスパラギン酸を添加するとようやく置き換わり、高い安定性を有することが判った。また、種々のN/P比で調製したsiRNA・PEG化ナノゲル粒子複合体と非架橋型PEG/ポリアミン・siRNA複合体のRNAi活性を培養細胞により評価した。その結果、非架橋型PEG/ポリアミン・siRNA複合体は、いずれのN/P比においても、全くRNAi活性が確認できなかった。これは、非架橋型PEG/ポリアミン・siRNA複合体は、血清培地中においてアニオン性のアルブミンとの置き換わりにより複合体が不安定化し、効率的にsiRNAを細胞内に導入できなかったためと考えられる。一方、siRNA・PEG化ナノゲル粒子複合体は、N/P比が1.5以上でRNAi活性を示し、N/P=3では70%ほどの高い遺伝子抑制効果(RNAi)を示した。この高いRNAi効果は、siRNA・PEG化ナノゲル粒子複合体が血清培地中においても安定にsiRNAを内包していること、そして内核のポリアミンゲルが細胞内エンドソームにおいてプロトン化することで効率的にエンドソームから脱出することが考えられる(論文準備中)。このように、架橋(網目構造)を有するsiRNA・PEG化ナノゲル粒子複合体は、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。

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。これまで、金ナノ粒子と相互作用を示すポリアミン(ポリメタクリル酸ジメチルアミノエチル:PAMA)と PEG とのブロック共重合体(PEG-*b*-PAMA)を精密合成し、末端にメルカプト基を有する siRNA を金ナノ粒子に共固定化した siRNA/PEG 化金ナノ粒子複合体(ナノデバイス)を創製した(52)。平成 20 年度は、この 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、新たに金ナノ粒子を内包する PEG 化ナノゲル粒子の調製および評価を行った。金ナノ粒子内包 PEG 化ナノゲル粒子は、PEG 化ナノゲル粒子に塩化金酸を混合し、還元剤非存在下、60°C で加熱することで合成した。本合成法において、PEG 化ナノゲル粒子のポリアミンゲルは還元剤として働くのと同時に、生成した金ナノ粒子を安定に担持するマトリックスとしても機能する。このように合成した金ナノ粒子内包 PEG 化ナノゲル粒子は、ポリアミンゲルコアに平均粒径 8nm の金ナノ粒子を 25 個程度有することが明らかとなった。さらに、この金ナノ粒子内包 PEG 化ナノゲル粒子の溶液にレーザー(514.5nm、6mW/cm²)を 6 分間照射したところ、溶液の温度が 8 度近く上昇したことから、効率的に光を熱に変換していることが判った。また、培養細胞を用いて金ナノ粒子内包 PEG 化ナノゲル粒子の光温熱療法を検討した。比較対照実験として、金ナノ粒子を内包しない PEG 化ナノゲル粒子を取り込ませた細胞において、レーザーを照射しても全く細胞死は確認されなかったが、一方、金ナノ粒子内包 PEG 化ナノゲル粒子を取り込ませた細胞では、レーザー照射による顕著な細胞死が観察された(論文準備中)。このように金ナノ粒子内包 PEG 化ナノゲル粒子は、外部刺激(光)によりガンの光温熱療法が可能であることから、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)により治療効果の増大などが期待される。

(D-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

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) 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、平成 19 年度は固相上にてオレフィンメタセシス反応を検討したが、良好な収率で目的物は得られなかった。引き続き、平成 20 年度はクリックケミストリーによる PEG-機能性核酸を検討したが、コンジュゲート体を収率よく合成することはできなかった。そこで平成 21 年度は、固相上で末端にアミノ基を有する DNA を合成し、カルボキシル基を有する PEG とのアミド化によるコンジュゲート合成の検討を行う。

2) 高次構造 DNA 結合リガンドの開発

種々のポルフィリン誘導体の 2 量化反応について HPLC を用いて詳細に検討した。通常の B 型 DNA 共存下では鋳型効果が観測されなかったため、枝分かれ構造 DNA を鋳型とする反応の検討および生成物の分析を開始した。また、繰り返し配列への協奏的結合を目的に金属結

合部分と DNA 結合部分を複数個有する低分子リガンドの合成に成功し(3)、金属イオンとの錯体形成、DNA との錯体形成能を確認した。引き続き、協奏的な結合特性についての検討に入った。平成 19 年度に成功した Z 型 DNA の特異的リガンドの結合特性を評価するため、さらに種々の誘導体を合成し、結合評価を行った。

3) 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。平成 19 年度には標的 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。平成 20 年度は、さらに光照射により迅速に転移する反応を開発するとともに、溶液の pH を塩基性にするにより転移反応選択性の変化と高速化に成功した。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、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オリゴヌクレオチドへの導入を検討し、モデル反応として、配列特異的に化学発光を誘起する触媒の開発に成功した。引き続き、検出の一般化のためのオリゴヌクレオチドの合成検討に入った。

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検討を行った。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た(59)。さらに、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た。種々検討によりこの翻訳停止のメカニズムが RNaseH による mRNA 切断であることが判明したので、mRNA 切断を引き起こさない機能性核酸による編集反応の検討を開始した。

5) 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、平成 20 年度は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、一部拡張に成功した(57)。また、c-myc 癌遺伝子標的的人工核酸および bcl-2 癌遺伝子標的的人工核酸の遺伝子阻害効果の検証を継続した。そのうち、c-myc を標的としたアンチジーン法による細胞増殖阻害実験では、Raji 細胞に対して増殖阻害能を有していることが示唆されたため、阻害機構解明検討を始めた。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った(斯波らと共同)。

(D-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ペプチド核酸(PNA)の合成及び機能評価

ペプチド核酸(PNA)は2本鎖DNAに対してインバ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 年度までに PNA オリゴマーを合成し、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。平成 20 年度は機能性核酸を組み込んだ PNA の合成の効率改善を目指し、N 末端を保護することで、より効率よく合成することに成功した。さらに合成した PNA オリゴマーを用いて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。また 2 本鎖 DNA を認識できる分子を検索する新しい方法論についても検討し、クリックケミストリーを応用した方法論を開発した(60)。

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。この構造に基づき新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 年度までに反応性塩基の合成に成功していたので、平成 20 年度は塩基部分と糖部分とをカップリングする方法にて検討した。その結果、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た。

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た。そこで平成 20 年度は、RNA 型インテリジェント核酸の合成を検討した。その結果、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た。さらに得られた反応性オリゴヌクレオチドを用いて反応性を検討したところ、RNA に選択的に反応することがわかった。またインテリジェント核酸の機能拡張として、酵素をコンジュゲートした機能性オリゴヌクレオチドの合成にも成功した(61)。

(E) 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。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。かくして、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 内包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が証明された(69)。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。

2) 動原体構成タンパク KNTC2 に対する siRNA による脳腫瘍治療の試み

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 LN299 に対し、KNTC2 siRNA はアポトーシスを惹起し、著明な殺細胞効果を発揮することを証明した。また、LN299 脳同所移植ラットに KNTC2 siRNA 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した。

以上より、脳腫瘍非臨床評価系が確立し、今後種々の核酸およびそのキャリアの評価が行うと考える。

(F) 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、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

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、導入効率が良く、安全性の高いベクターの開発を行っている。平成 20 年度では、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)が、マンニトール添加して凍結乾燥を行なうことにより、*in vitro*において遺伝子発現が 100 倍も増強されることがわかった。しかしながら、凍結乾燥後の PEG-SS-PAsp(DET)は、経肺投与による *in vivo* 遺伝子導入実験では遺伝子発現量は低下しており、炎症性サイトカインの発現は増加していた。

2) 高分子ミセル型ナノデバイスの経肺投与による肺動脈性肺高血圧症モデル動物の治療実験

平成 20 年度は、PEG-PAsp(DET)を用いて経肺投与による遺伝子導入に成功したこと、投与後の肺において炎症性サイトカイン遺伝子の発現が、LPEI 投与に比べて極めて低く、病理所見からも、安全性の高い遺伝子導入法が確立されたことを論文に報告した(76)。さらに、モノクロタリン皮下注後の肺動脈性肺高血圧症モデルラットに対して PEG-PAsp(DET)を用いてアドレノメデュリン遺伝子を投与し、右室圧の改善効果を認めたことも報告した(76)。さらに、モノクロタリン皮下注後の肺動脈性肺高血圧症モデルラットに、モノクロタリン投与と同時に PEG-PAsp(DET)を用いてアドレノメデュリン遺伝子を投与することにより、生存曲線を著明に改善することがわかった。

3) 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 19 年度までに *in vitro*におけるアポリポrotein B 遺伝子 editing の評価系を確立した。平成 20 年度では、アポリポrotein B 遺伝子 editing の評価

をより正確に、より簡便にするために、アポリポプロテイン B 遺伝子の editing 部位(6666)周辺の DNA を pcDNA4HisMax に組み込んだ。ウェスタンブロットングにてアポリポプロテイン B 遺伝子の editing 機能を簡便に評価できるシステムの作成に成功した。また、この遺伝子を Cos-1 細胞にトランスフェクションして、安定発現株の作成にも成功している。これらを用いて、佐々木グループから次々に供給される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っている。

4. 研究成果の発表等

(1) 論文発表 (原著論文)

1. K. Osada, R. J. Christie, K. Kataoka, Polymeric micelles from poly (ethylene glycol)-poly(amino acid) block copolymer for drug and gene delivery, *J. Royal Society Interface*, in press.
2. Y. Matsumoto, K. Itaka, T. Yamasoba, K. Kataoka. Intranuclear FRET analysis of plasmid DNA decondensation from non-viral gene carriers. *J Gene Med*, in press
3. 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.*, in press.
4. 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.* in press.
5. 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.* in press
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.* in press
7. W. 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)
8. 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)
9. 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)

10. Kishimura, S. Liamsuwan, H. Matsuda, W. Dong, K. Osada, Y. Yamasaki, K. Kataoka, pH-Dependent permeability change and reversible structural transition of PEGylated polyion complex vesicles (PICsomes) in aqueous media. *Soft Matter* 5 (3) 529–532 (2009)
11. N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine. *J. Control. Release* 133 (3) 245-251 (2009)
12. H. Cabral, M. Nakanishi, M. Kumagai, W.-D. Jang, N. Nishiyama, K. Kataoka, A photo-activated targeting chemotherapy using glutathione sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles. *Pharm. Res.* 26 (1) 82-92 (2009)
13. M. Oba, K. Aoyagi, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Itaka, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, Polyplex micelles with cyclic RGD peptide ligands and disulfide cross-links directing to the enhanced transfection via controlled intracellular trafficking. *Mol. Pharm.* 5 (6) 1080-1092 (2008)
14. K. Miyata, M. Oba, M. Nakanishi, S. Fukushima, Y. Yamasaki, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplexes from poly(aspartamide) bearing 1,2-diaminoethane side chains induce pH-selective, endosomal membrane destabilization with amplified transfection and negligible cytotoxicity. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (48) 16287-16294 (2008)
15. K. Miyata, M. Oba, M. R. Kano, S. Fukushima, Y. Vachutinsky, M. Han, H. Koyama, K. Miyazono, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polyplex micelles from triblock copolymers composed of tandemly aligned segments with biocompatible, endosomal escaping, and DNA-condensing functions for systemic gene delivery to pancreatic tumor. *Pharm. Res.* 25 (12) 2924-2936 (2008)
16. T. Tatsumi, M. Oishi, K. Kataoka, Y. Nagasaki, PEG-siRNA conjugate bearing 27 bp siRNA to form novel PEGylated polyplexes with improved stability. *Trans. Mater. Res. Soc. Jpn.* 33 (3) 807-810 (2008)
17. S. Wu, N. Nishiyama, M. R. Kano, K. Itaka, U. -I. Chung, K. Kataoka, Enhancement of Angiogenesis through Stabilization of Hypoxia Inducible Factor-1 by Silencing Prolyl Hydroxylase Domain 2 Gene. *Mol Ther.* 16 (7) 1227-1234 (2008)
18. Y. Lee, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, S. Fukushima, M. Han, H. Koyama, N. Nishiyama, K. Kataoka, Charge-conversion ternary polyplex with endosome disruption moiety: A technique for efficient and safe gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (28) 5163-5166 (2008)
19. S. Takae, K. Miyata, M. Oba, T. Ishii, N. Nishiyama, K. Itaka, Y. Yamasaki, H. Koyama, K. Kataoka, PEG-detachable polyplex micelles based on disulfide-linked block Cationomers as bioresponsive nonviral gene vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 130 (18)

6001-6009 (2008)

20. T. Sakai, T. Matsunaga, Y. Yamamoto, C. Ito, R. Yoshida, N. Sasaki, S. Suzuki, M. Shibayama, and U. Chung. Design and fabrication of a high-strength hydrogel with Ideally homogeneous network structure from tetrahedron-like macromonomers. *Macromolecules* 2008, 41, 5379-5384.
21. T. Matsunaga, T. Sakai, Y. Akagi, U. Chung, and M. Shibayama. Structure characterization of Tetra-PEG gel by small-angle neutron scattering. *Macromolecules* 2009,42, 1344-1351.
22. K. Sasaki, K. Kogure, S. Chaki, Y. Nakamura, H. Hamada, M. Ueno, S. Futaki and H. Harashima. An artificial virus-like nano carrier system: Enhanced endosomal escape of nano-particles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 391(8):2717-27 (2008).
23. H. Kuramoto, Y.S. Park, N. Kaji, M. Tokeshi, K. Kogure, Y. Shinohara, H. Harashima, Y. Baba. On-chip fabrication of multifunctional envelope-type nanodevices for gene delivery. *Anal Bioanal Chem.* 391(8): 2729-33 (2008).
24. 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 (2008).
25. R. Moriguchi, K. Kogure, H. Harashima. Non-linear pharmacodynamics in transfection efficiency of non-viral gene delivery system. *Int. J. Pharm.* 363(1-2):192-8 (2008).
26. H. Tsuchiya, M. Uchiyama, K. Hara, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki, H. Inoue, H. Harashima, and H. Kamiya. Improved gene correction efficiency with a tailed duplex DNA fragment. *Biochemistry* 47(33):8754-9 (2008).
27. M. Diky, H. Akita, E. Tan, H. Harashima. A novel IRQ ligand-modified nano-carrier targeted to a unique pathway of caveolar endocytic pathway. *J Controlled Rel.* 125(2): 164-173 (2008)
28. El-Sayed, IA. Khalil, K. Kogure, S. Futaki, H. Harashima. Octaarginine- and octalysine- modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem.* 283(34):23450-61 (2008).
29. T. Nakamura, R. Moriguchi, K. Kogure, N. Shastri, and H. Harashima. Efficient MHC class I Presentation by Controlled Intracellular Trafficking of Antigens in Octaarginine-modified Liposomes *Molecular Therapy*, 16(8):1507-14 (2008).
30. H. Akita, A. Kudo, A. Minoura, M. Yamaguchi, I. A Khalil, R. Moriguchi, T. Masuda, R. Danev, K. Nagayama, K. Kogure and H. Harashima. Multi-layered nano particles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* (in press)
31. Yamada Y., Akita H., Kamiya H., Kogure K., Yamamoto T., Shinohara Y., Yamashita K., Kobayashi H., Kikuchi H., Harashima H. MITO-Porter:

- a liposome-based carrier system for delivery of macromolecules into mitochondria via membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1778, 423-432(2008).
32. Masuda T, Akita H., Nishio T., Niikura K., Kogure K., Ijro K., Harashima H. Development of lipid particles targeted via sugar-lipid conjugates as novel nuclear gene delivery system. *Biomaterials* 29, 709-723(2008).
 33. Sasaki K., Kogure K., Chaki S., Nakamura Y., Moriguchi R., Hamada H., Danev R., Nagayama K., Futaki S., Harashima H. An artificial virus-like nano carrier system: Enhanced endosomal escape of nano-particles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 2717-2727 (2008).
 34. Kuramoto H, Park YS, Kaji N, Tokeshi M, Kogure K, Shinohara Y, Harashima H, Baba Y. On-chip fabrication of multifunctional envelope-type nanodevices for gene delivery. *Anal Bioanal Chem.* 391, 2729-2733 (2008).
 35. Nakamura T, Moriguchi R, Kogure K, Shastri N, Harashima H. Efficient MHC class I Presentation by Controlled Intracellular Trafficking of Antigens in Octaarginine-modified Liposomes. *Mol. Ther.* 16, 1507-1514 (2008).
 36. El-Sayed A, Khalil IA, Kogure K, Futaki S, Harashima H. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem.* 283, 23450-2361 (2008).
 37. Moriguchi R., Kogure K., Harashima H. Non-linear pharmacodynamics in the transfection efficiency of a non-viral gene delivery system. *Int. J. Pharm.* 363,192-198 (2008).
 38. Yamashita A, Kanda D, Katoono R, Yui N, Ooya T, Maruyama A, Akita H, Kogure K, Harashima H. Supramolecular control of polyplex dissociation and cell transfection: Efficacy of amino groups and threading cyclodextrins in biocleavable polyrotaxanes. *J. Control. Release* 131, 137-144 (2008).
 39. Niikura K, Sekiguchi S, Nishio T, Masuda T, Akita H, Matsuo Y, Kogure K, Harashima H, Ijro K. Oligosaccharide-Mediated Nuclear Transport of Nanoparticles. *Chembiochem.* 9, 2623-2627 (2008).
 40. Joraku A, Homhuan A, Kawai K, Yamamoto T, Miyazaki J, Kogure K, Yano I, Harashima H, Akaza H. Immunoprotection against murine bladder carcinoma by octaarginine-modified liposomes incorporating cell wall of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *BJU Int.* 103, 686-693 (2008).
 41. Akita H, Kudo A, Minoura A, Yamaguti M, Khalil IA, Moriguchi R, Masuda T, Danev R, Nagayama K, Kogure K, Harashima H. Multi-layered nanoparticles for penetrating the endosome and nuclear membrane via a step-wise membrane fusion process. *Biomaterials* 30, 2940-2949 (2009).
 42. Homhuan A, Kogure K, Nakamura T, Shastri N, Harashima H. Enhanced antigen presentation and CTL activity by transduction of mature rather than immature dendritic

- cells with octaarginine-modified liposomes. *J. Control. Release* in press.
43. K. Yoshimoto, M. Ichino, Y. Nagasaki “Inverted Pattern Formation of Cell Microarrays on Poly(ethylen glycol) (PEG) Gel Patterned Surface and Construction of Hepatocyte Spheroids on Unmodified PEG Gel Microdomains” *Lab on a Chip* (2009) In press.
 44. H. Atsumi, K. Yoshimoto, S. Saito, M. Ohkumura, 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” *Tetrahedron Letters* (2009) (50), 2177-2180.
 45. T. Yoshitomi, D. Miyamoto, Y. Nagasaki “Design of Core-shell-type Nanoparticles Carrying Stable Radicals in the Core” *Biomacromolecules* (2009) (10), 596-601.
 46. X. Yuan, K. Yoshimoto, Y. Nagasaki, “Novel Immunolates Possessing A Mixed-PEG/Antibody Co-immobilized Surface: High-Performance Latex Immunodiagnostics of Ferritin” *Analytical Chemistry* (2009) (81), 1549-1556.
 47. M. Oishi, S. Sumitani, T. K. Bronich, A. V. Kabanov, M. D. Boska, Y. Nagasaki “Novel ¹⁹F-MRS/I Nanoprobe based on pH-Responsive PEGylated Nanogel: pH-Dependent ¹⁹F-Magnetic Resonance Studies” *Chemistry Letters* (2009) (38), 128-129.
 48. M. Oishi, A. Tamura, T. Nakamura, Y. Nagasaki, “A Smart Nanoprobe Based on Fluorescence-Quenching PEGylated Nanogel Containing Gold Nanoparticles for Monitoring the Cancer Response to Therapy” *Advanced Functional. Materials* (2009) (19), 827-834.
 49. K. Yoshimoto, Y. Hoshino, T. Ishii, Y. Nagasaki, “Binding Enhancement of Antigen-Functionalized PEGylated Gold Nanoparticles onto Antibody-Immobilized Surface by Increasing the Functionalized Antigen Using -Sulfanyl- -Amino-PEG” *Chemical Communications* (2008) (42), 5369-5371.
 50. K. Yoshimoto, T. Hirase, S. Nemoto, T. Hatta, Y. Nagasaki, “Facile Construction of Sulfanyl-Terminated Poly(ethylene glycol)-Brushed Layer on a Gold Surface for Protein Immobilization by the Combined Use of Sulfanyl-Ended Telechelic and Semitelechelic Poly(ethylene glycol)s” *Langmuir* (2008) 24(17), 9623-9629.
 51. M. Kamimura, D. Miyamoto, Y. Saito, K. Soga, Y. Nagasaki, “Design of Poly(ethylene glycol)/Streptavidin Coimmobilized Upconversion Nanophosphors and Their Application to Fluorescence Biolabeling” *Langmuir* (2008) 24(16), 8864-8870.
 52. 長崎幸夫 「生体環境下で機能する PEG 化多孔質無機ナノ粒子の設計と評価」 *高分子論文集*(2008) 65, 409-415.
 53. Y. Nagasaki, “Polyethylene glycol-b-polyamine Stabilized Bionanoparticles for Nanodiagnostics and Nanotherapy” *Chemistry Letters* (2008) 37(6), 564-569.
 54. X. Yuan, M. Iijima, M. Oishi, Y. Nagasaki, “Structure and Activity Assay of Nanozymes Prepared by the Coimmobilization of Practically Useful Enzymes and Hydrophilic Block Copolymers on Gold Nanoparticles” *Langmuir* (2008) 24(13), 6903-6909.

55. 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* (2008) 24(9), 5010-5017.
56. Nagatsugi F., Nakahara R., Inoue K., Sasaki S., Synthesis and Evaluation of the Luciferase-Oligodeoxynucleotide for the Sequence-Selective Detection of Nucleic Acids, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 341, 562-567 (2008).
57. Taniguchi Y., Togo M., Aoki E., Uchida Y., Sasaki S., Synthesis of p-amino-WNA derivatives to enhance the stability of the anti-parallel triplex, *Tetrahedron*, 64,7164-7170 (2008).
58. Haruta Y., Onizuka K., Watanabe K., Kono K., Nohara A., Kubota K., Imoto S., Sasaki S., Stereoselective synthesis of (t)-2-deoxyolivin based on cycloaddition reaction between the homophthalic anhydride and the chiral cyclohexenone derivative, *Tetrahedron*, 64, 7211-7218 (2008).
59. Nasr T., Li Z., Nakagawa O., Taniguchi Y., Ono S., Sasaki S., Selective Fluorescence Quenching of the 8-OxoG-clamp by 8-Oxodeoxyguanosine in ODN, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 727-730 (2009).
60. Imoto S., Hirohama T., Nagatsugi F., DNA Templated Click Chemistry for Creation of Novel DNA Binding Molecules, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 5660-5663 (2008)
61. Nagatsugi F., Nakahara R., Inoue K., Sasaki S., Synthesis and Evaluation of the Luciferase-Oligodeoxynucleotide for the Sequence-Selective Detection of Nucleic Acids, *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 341, 562-567 (2008)
62. Ali Md. M., Imoto S., Li Y., Sasaki S., Nagatsugi F. Incorporation of an inducible nucleotide analog into DNA by DNA polymerases, *Bioorg. Med. Chem.*, in press (2009)
63. Nakajima, M Yasunaga, Y kano, F Koizumi, K Kato, T Hamaguchi, Y Yamada, K Shirao, Y Shimada, Y Matsumura. 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.
64. Y Saito, M Yasunaga, J Kuroda, Y Koga, Y Matsumura. Enhanced distribution of NK012 and prolonged sustained-release of SN-38 within tumors are the key strategic point for a hypovascular tumor. *Cancer Sci*, 99 (6): 1258-1264, 2008.
65. M Sumitomo, F Koizumi, T Asano, A Horiguchi, K Ito, T Asano, T Kakizoe, M Hayakawa, Y Matsumura. Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, strongly suppress renal cancer progression. *Cancer Res*. 68 (6): 1631-1635, 2008.
66. Y Matsumura. Poly (amino acid) micelle nanocarriers in preclinical and clinical studies. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (eds. VHL Lee, MK Forrest, and GS Kwon) Elsevier B.V. V.60/8 pp. 899-914, 2008

67. K Sai, Y Saito, M Itoda, H Fukushima-Uesaka, T Nishimaki-Mogami, S Ozawa, K Maekawa, K Kurose, N Kaniwa, M Kawamoto, N. Kamatani, K Shirao, T Hamaguchi, N Yamamoto, H Kunitoh, Y Ohe, Y Yamada, T Tamura, T Yoshida, H Minimai, Y Matsumura, A Ohtsu, N Saijo, J Sawada. Genetic Variations and Haplotypes of ABCC2 encoding MRP2 in a Japanese population. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 23 (2): 139-147, 2008.
68. Nakajima-Eguchi T, Yanagihara K, Takigahara M, Yasunaga M, Kato K, H. T, Yasuhide Yamada, Yasuhiro Shimada, Keichiro Mihara, Takahiro Ochiya, Yasuhiro Matsumura. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res.* 68 (22): 9318-9322, 2008.
69. 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.
70. Y Koga, M Yasunaga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, H Baba, Y Matsumura. Detection of the DNA point mutation of colorectal cancer cells isolated from feces stored under different conditions. *Jpn J Oncol.* (2008 in press)
71. Y Koga, M Yasunaga, S Katayose, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, H Baba, Y Matsumura. Improved recovery of exfoliated colonocytes from feces using newly developed immuno-magnetic beads. *Gastroenterology Res Practice.* (2008 in press)
72. Y Koga, M Yasunaga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, T Kozu, H Baba, Y Matsumura. Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis. *Can Sci.* 99 (10):1977-1983, 2008.
73. R Suzuki, T Takizawa, Y Negishi, N Utoguchi, K Sawamura, K Tanaka, E Namai, Y Oda, Y Matsumura, K Maruyama. Tumor specific ultrasound enhanced gene transfer in vivo with novel liposomal bubbles. *Journal of controlled release.* 125: 137-144, 2008.
74. Y Matsumura. Polymeric micellar delivery systems in Oncology. *Jpn J Clin Oncol.* 38 (12):793-802, 2008.
75. Y Watanabe, A Aoi, S Horie, N Tomita, S Mor, H Morikawa, Y Matsumura, G Vassaux, T Kodama. Low-intensity ultrasound and microbubbles enhance the antitumor effect of cisplatin. *Cancer Sci.* 99 (12): 2525-2531, 2008
76. Harada-Shiba M, Takamisawa I, Miyata K, Ishii T, Nishiyama N, Itaka K, Kanagawa K, Yoshioka F, Asada Y, Hatakeyama K, Nagaya N, Kataoka K, Intratracheal gene transfer of Adrenomedullin using polyplex nanomicelles attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Molecular Therapy* in press
77. Shimano H, Arai H, Harada-Shiba M, Ohta Y, Yamashita S, Gotoda T, Kiyohara Y, Hayashi T, Kobayashi J, Shimamoto K, Bujyo H, Ishibashi S, Shirai K, Oikawa S, SAito Y, Yamada N, Proposed guidelines for hypertriglyceridemia in Japan with non-HDL cholesterol as the second target. *J. Atheroscler. Thromb.* 2008 15 (3): 116-21.

78. Yamashita S, Bujyo H, Arai H, Harada-Shiba M, Matsui S, Fukushima M, Saito Y, Kita T, Matsuzawa Y, Longterm probucol treatment prevents secondary cardiovascular events: a cohort study of patients with heterozygous familial hypercholesterolemia in Japan, J. Atheroscler. Thromb 2008,15 (6): 292-303

(2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 14 件 (CREST 研究期間累積件数 : 31 件)