

「ナノ界面技術の基盤構築」
平成20年度採択研究代表者

櫻井 和朗

北九州市立大学 国際環境工学部 ・ 教授

DDS 粒子のナノ界面と鳥インフルエンザワクチン等への応用

§ 1. 研究実施の概要

次世代の医薬品開発の要となる DDS ナノ粒子の溶液中での構造とその薬理効果に関して、世界で最も輝度が高い放射光 X 線を用いた測定と動物試験や生物学的な評価を組み合わせることで俯瞰的に研究を進めている。H21 年は遺伝子導入に用いる DNA と脂質の複合体の構造を検討する上での最も単純化されたモデル系を見出した。この系では ASAX の測定が可能であり、放射光を用いた高精度の構造解析の可能性が見出された。また、インフルエンザのワクチンとして従来にない安全で高効率なアジュバントの効果に関して、分子生物学的な裏付けを取り、Science の姉妹誌である Science Translational Medicine に受理された。また、多糖核酸複合体や高分子ミセルに関しても、放射光を用いた溶液中での構造解析を進めている。高分子ミセルにおいては、疎水性の高い LE540 とやや疎水性の低い Am80 では内核への取り込まれ方が全く異なることが判明した。これはこの2種の薬剤の徐放性と良い相関がある。

§ 2. 研究実施体制

(1)「北九州市立大学」グループ

- ①研究分担グループ長： 櫻井 和朗（北九州市立大学、教授）
- ②研究項目 「生体条件下での DDS 構造の解明と多糖核酸複合体の界面構造」

(2)「東京大学大学院」グループ

- ①研究分担グループ長： 雨宮 慶幸（東京大学大学院、教授）
- ②研究項目 「X 線光子相関法を用いたゲル中でのナノ粒子ダイナミクスの解析」

(3)「(財)高輝度光科学研究センター」グループ

- ①研究分担グループ長：八木 直人（財団法人 高輝度光科学研究センター、主席研究員）
- ②研究項目 「高精度の散乱測定技術の確立」

(4)「(財)東京慈恵会医科大学」グループ

- ①研究分担グループ長： 榎山 昌幸（東京慈恵会医科大学、准教授）
- ②研究項目 「高分子ミセルの薬物・造影剤封入内核の構造解析」

(5)「大阪大学・微生物病研究所」グループ

- ①研究分担グループ長： 石井 健（大阪大学微生物研究所、准教授）
- ②研究項目 「ナノ DDS 粒子を用いた新規ワクチン開発研究」

§ 3. 研究実施内容 (文中、1)などの引用番号は(4-1)に対応する)

北九大 G

1) DNA 脂質複合体の単純モデル系の確立⁶⁾

DNA とカチオン性脂質の複合体では、ラメラ構造を有しているにもかかわらず遺伝子導入効率が高い場合と低い場合があり、いままで言われているようにシリンダーは遺伝子導入効率が高く、ラメラは低いとは限らないことが分かってきた。これより Sandwich モデルと Inclusion モデルの2種があると考えている。前者はイオン結合が優先するので発熱反応、後者は DNA の脱水がおきるので吸熱反応(エントロピー駆動)と推定される。

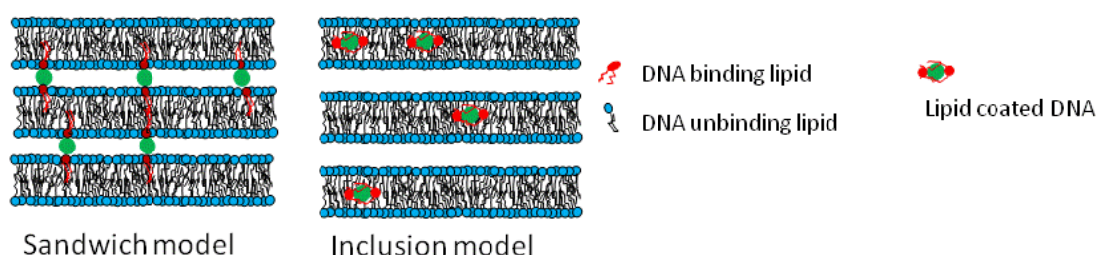


図1、Sandwich モデルと Inclusion モデル

熱量測定から、アルキル鎖の長さや中性脂質の存在によって、吸熱反応と発熱反応の2通りが観測でき、熱測定と遺伝子発現効率は割とよい相関があることも分かってきたが、X線構造を決定するには至っていない。この系のモデル系を探索してきたが、図2に示すように、dU(やや親水性)とdA(疎水性)では大きく散乱パターンが異なることを発見した(未発表)。極めて重要なことであるが、dUとBr-dUはほぼ同じ構造でピークの鋭さも同じであり、東大Gが確立しつつあるASAXS(異状X線小角散乱)を用いてBrをマーカーとしての構造解析が可能であると考えられる。dAは2重鎖プラスミドDNAと近く、dUではラメラの面間隔が大きく減少するとともに、構造の規則性が上がっている。

2) Dectin-1 モデル系の確立

多糖核酸複合体の DDS ターゲットである抗原提示細胞上の Dectin-1 を定常的に発現している細胞は、知られている中では RAW であった。しかし、Dectin-1 の発現量が少なく、またエンドサイトーシスに関与していると思われる Dectin-1A の発現が少ない。いままで、RAW をもちいて取り込みの基礎実験を行ってきたが、切れ味の良いデータが得られず苦戦を強いられてきた。今回、BL6 マウスの腹腔にチオエート培地をいれマクロファージを集めたあと、外部の培地中での培養時間とともに Dectin-1 の発現量が増加することを見出した(図2B)。これにより、培養0時間と24時間で、Dectin-1 がほとんど存在しない細胞と多量に存在する細胞を作り分けることが可能となった。この系でアンチセンスの効果を比較すると、極めて明瞭に Dectin-1 を介した多糖核酸の取り込みとそのあとの生物学的な応答が異なることが示された(図2C)。また、複合体の合成条件と新しい精製法を確立し複合率ほぼ100%を達成することができた(図2A)(特許出願)。

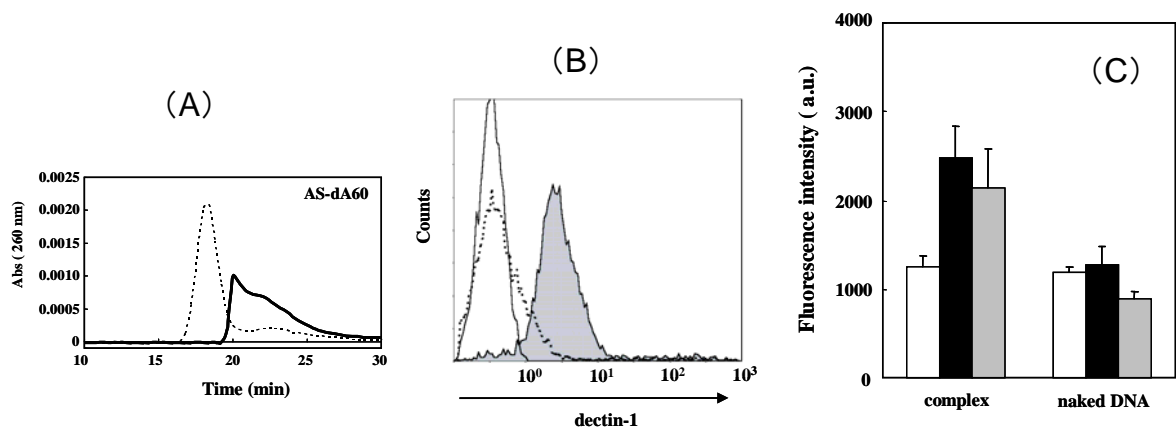


図2 (A) 複合体(破線)とDNA(実線)のGPCクロマトグラム。(B) チオエート培地で活性化したマクロファージ中の Dectin-1 の量。破線は培養0時間であり、グレーで塗りつぶしたものが24時間培養である。(C) LPS 刺激で産生される TNF α をアンチセンスで抑制した結果。多糖核酸複合体(complex)とDNAのみ(naked)の比較。白は0h、黒は24h、グレーは48h 培養した細胞。

東大 G

1) X線光子相関測定に向けた検出器・測定系の検討

X線光子相関測定の高度化に向けて、検出器の検討を実施した。測定時の試料へのX線の照射損傷を最小限に抑えるためには、これまで測定に用いてきた積分型の測定だけではなく光子計数型の測定が必要となる。そこで現在X線光子相関法の実験に用いている検出器を用いた光子計数型の測定を試験した。その結果、現行の検出器を用いても単一X線光子の信号を測定することができ、光子計数型の測定が可能であることを確認したものの、物質のダイナミクス解析へと応用するには、検出器改良の必要があることを確認した。また測定時の照射量を大きくした際の試料への影響を確認した。その結果、照射線量等によっては試料内部の粒子凝集構造・ダイナミクスが変化したり試料表面での変性が生じ、測定結果に影響を及ぼすことを確認した。

2) 位相差電子顕微鏡を用いた脂質/DNA複合遺伝子導入剤の観察

これまで北九大グループが小角X線散乱などを用いて脂質/DNA 複合遺伝子導入剤の構造解析を実施してきたが、さらに解析を進めるために、自然科学研究機構・生理学研究所の位相差電子顕微鏡を用いて、脂質/DNA 複合遺伝子導入剤の実空間観察を実施した。2009年後半に測定を実施し、これまでの小角X線散乱データと併せて現在解析を実施している。また、今まで無機材料で使われていた ASAX(anomalous small-angle X-ray scattering)を有機材料に適用するべく Siを用いたモデル系を確立した。

モデル試料

Si 吸収端で SAXS 強度が理論通りに波長依存することを確認!

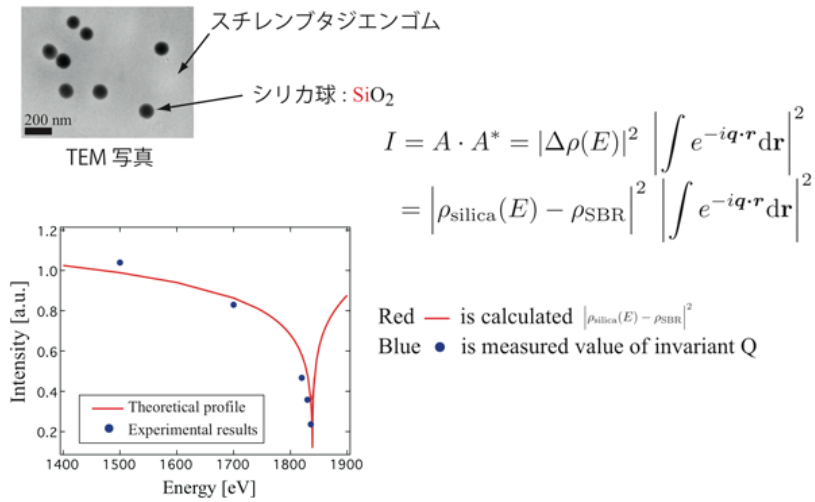


図3 ゴム中に分散したシリカ粒子の Si 原子からの異状吸収端の挙動に関して理論と実験が一致することを確認した。

八木 G

1) 広q領域測定を試み (JASRI-G)

放射光を用いた小角散乱(SAXS)測定においては、広角領域の回折や散乱(WAXD)を同時に測定することが必要な場合が多い。従来これには試料のすぐ下流に2台目のX線検出器を配置し、広角領域を別個に記録している。この方法はPF/BL15A、SPring-8/BL40B2などで用いられており、広角用検出器としてはイメージングプレートや一次元PSPC、CMOSフラットパネル検出器などが使用されている^{12,15}。この方法の欠点は、二つの検出器の露光タイミングや露光時間の調整や、イメージングプレートの着脱の煩雑さなどである。明らかに最良の方法は、一台の検出器で小角から広角までを一度に記録する広q領域測定である。これはSPring-8/BL40B2においてはイメージングプレート検出器(リガク RAXIS、測定範囲30cm角)を用いることによって行われている^{13,16}。dレンジで30nm~0.3nmをカバーできるが、検出器がイメージングプレートなので読み取りが遅いのが欠点である。

Setup at BL45PX

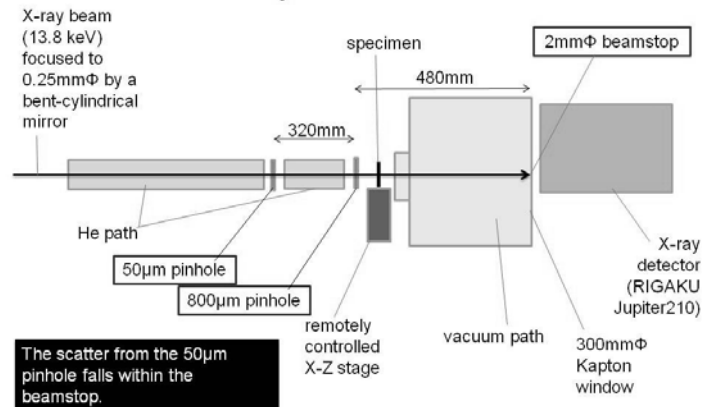


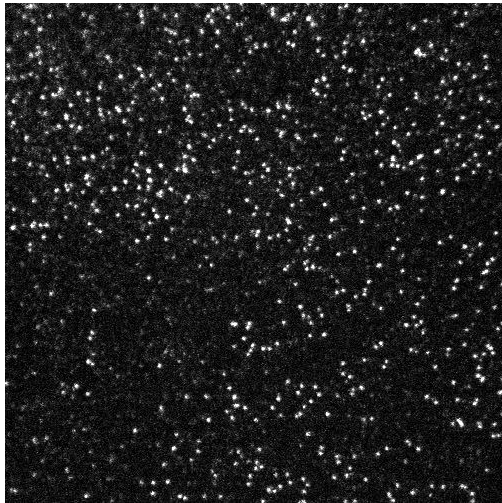
図4 SPring-8 の BL45XU B ハッチにおけるモザイク CCD

この問題を解決する試みとして、タンパク質結晶構造解析用モザイク CCD 検出器を用いて広い測定範囲を確保することにより、小角から広角までをカバーし、高速データ読み取りが可能なシステムを、SPring-8 の BL45XU B ハッチに構築した。図は、50 ミクロン径のピンホールを用いてビームを絞る場合の構成図である。このシステムでは、リガク社製 Jupiter210 (測定範囲 20cm 角) を用いることにより、30nm~0.25nm の d レンジの測定が可能である。一般に露光時間は数秒であり、CCD 検出器の読み出しは 10 秒以内に行えるため、試料の広範囲にわたるビームスキャンが可能となった。CCD 検出器のダイナミックレンジは 5000 程度に制限されるため、試料によっては強度の低い広角領域を計測するために露光時間を延長すると小角領域が飽和するという問題が生じた。この問題を解決するために、異なった露光時間を持つ複数の画像を一度に記録できるように、画像取得ソフトウェアを改良した。本手法による SAXS/WAXS 同時測定は、歯エナメル質や脳脂質に応用された⁹⁾。

2) 高時間分解X線検出器の評価(東大GとJASRI-Gの共同)

一般に高時間分解能実験においては観測する毎秒あたりのフォトン数は十分に多く、積分型検出器を用いて短いフレームごとに画像を読み出すことが多い。フォトン数が多いことは、そもそもフォトン数が少ないと短いフレームで十分な測定精度が得られないことから当然である。しかし、積分型検出器を用いることによりフォトン信号が平均化され、フォトン数の揺らぎなどが正確に測定できない可能性もある。したがってフォトンカウンティング計測が必要な実験も存在する。積分型検出器でも、1 フォトンを確認できるだけの増幅率があり、十分に速い読み出しを行えば、フォトンカウンティングを行える可能性があることから、ここではX線イメージンシファイアと EMCCD カメラを用いてそのテストを行った。X線イメージンシファイアはX線を電子に変換し、電子を加速することで増幅を行う機能を持っているため、この組み合わせは非常に高感度なX線検出システムとして動作することが予想される。使用した CCD カメラは、浜松ホトニクス社製 C9100-02 である。まず X 線強度を落として露光時間 30msec で X 線散乱を記録した。EMCCD のゲインは 255 (最大) とした。それが下の図5A である。X 線を入射しないときにも環境放射線が観測されるが、X 線フォトンの方がはるかに多い。明るさの比較的揃っているスポットが 15keV の X 線によるもので、他は環境放射線によると思われる。さらに X 線強度を増して、露光時間 100 μ sec で記録したのが下の図5B の画像である。背景は読み出しノイズと思われるが、X 線フォンはそれとは異なった比較的一定の輝度を持っており、画像処理によって各 X 線フォンを正確に計測できると考えられる。

A



B

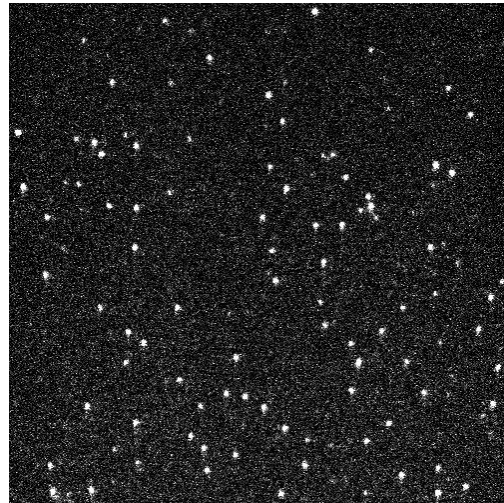


図5 浜松ホトニクス社製 C9100-02 からの光子カウンティングの結果

X線イメージインテンシファイアは空間分解能が $100\mu\text{m}$ と、ガス検出器やピクセル検出器と比較して空間分解能が高く、時間分解能も高速 CCD カメラを用いれば本実験のようにミリ秒以上が可能である。一般に積分型 X 線検出器は感度が低く、各 X 線光子を検出することは困難であるが、本システムのように増幅機能を持つ機器を適切に組み合わせれば、1X 線光子を検出することは十分可能であることが明らかとなった。この結果に基づいて、増幅用にマイクロチャンネルプレートを内蔵したBe窓付きX線イメージインテンシファイアユニットを設計し、製作した。

慈恵医大 G

本年度は薬物封入した高分子ミセルを重点にその各種サンプルを作製し、Spring8にて SAXS 測定し、測定に問題となる2次凝集があるかを検討した。

(1) 薬物封入高分子ミセル ³⁶⁾

薬物としては合成レチノイドの Am80 と LE540 を用いた。その構造を図6に示す。

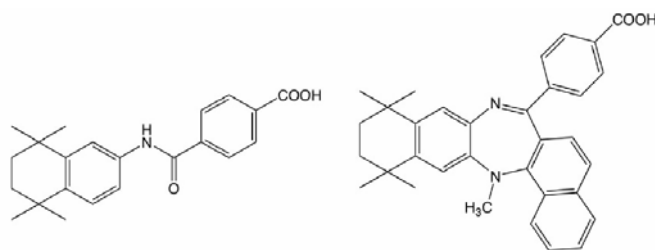


図6 薬物の化学構造 左:Am80 右:LE540

両方の薬物とも高収率(50~100%)で封入され、2次凝集の生成も比較的少ないことがわかっている。また、封入した薬物の放出速度は Am80>>LE540 であることがわかっている。まず、LE540 を封入したものを4種作製した。用いたポリマーは、図2に示す、ポリエチレングリコール-b-ポリ(アスパラギン酸ベンジルエステル)である。

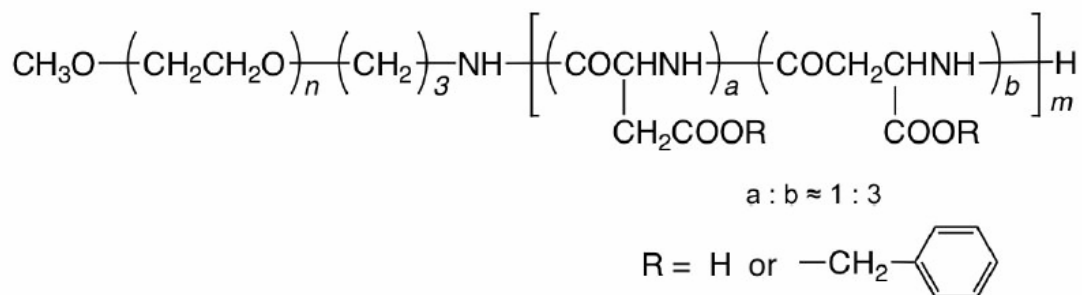


図7 ブロックポリマーの構造

ポリエチレングリコール(PEG)の分子量が 5,200 で、アスパラギン酸ユニット数は24のものである。アスパラギン酸側鎖の 83%がベンジルエステルとなったものである。(このポリマーは両薬物が高収率で封入され、その薬物放出も良好な徐放性を示すことから選択された。)LE540 は表1に示すように薬物収率が約50%で、4種のミセルが得られた。これらの薬物収率が比較的低いのは、ミセルを作製した後に遠心分離操作(3,900rpm,10min)をおこなっているためと考えられる。得られたミセルは表1に示すように、薬物封入量が最も大きいRun5においても、図8-1に示すように、動的光散乱測定では約 20nm の直径の構造以外に2次凝集は全く見られなかった。Run2-4 の LE540 封入の他のミセルサンプルでも同様に2次凝集は全く含有されていなかった。薬物封入のないミセルを含めて5種の高分子ミセルサンプルは、Spring8での SAXS 測定は問題なく実行された。

表 1 LE540封入高分子ミセルの組成

Run	ポリマーに対する仕込みの薬物割合 wt. %	ミセル中に封入された薬物割合 wt. %	Cumulant 平均粒径 (nm)
1	0	0	24
2	3.0	1.4	23
3	6.0	3.0	24
4	12.0	5.8	28
5	16.0	8.3	25

表 2 Am80封入高分子ミセルの組成

Run	ポリマーに対する仕込みの薬物割合 wt. %	ミセル中に封入された薬物割合 wt. %	Cumulant 平均粒径 (nm)
1	3.0	3.0	55
2	6.0	5.7	61
3	12.0	11.1	35
4	15.0	13.4	34

一方、LE540 と同じ封入方法を用いて、得た Am80 の封入高分子ミセルの結果を、表2に示す。薬物封入率はLE540 よりも高く、90%以上である。粒径はLE540 の場合よりも大きめである。また、動的光散乱測定では Run2 の DLS 測定結果を図8-2に示すように 100nm 以上に2次凝集のピークが見られた。体内のターゲティング目的にはこの程度の2次凝集の混入は影響ないのであるが、この2次凝集が SAXS 測定に悪影響を及ぼすかは、SAXS 測定の結果を待って対処することとする。

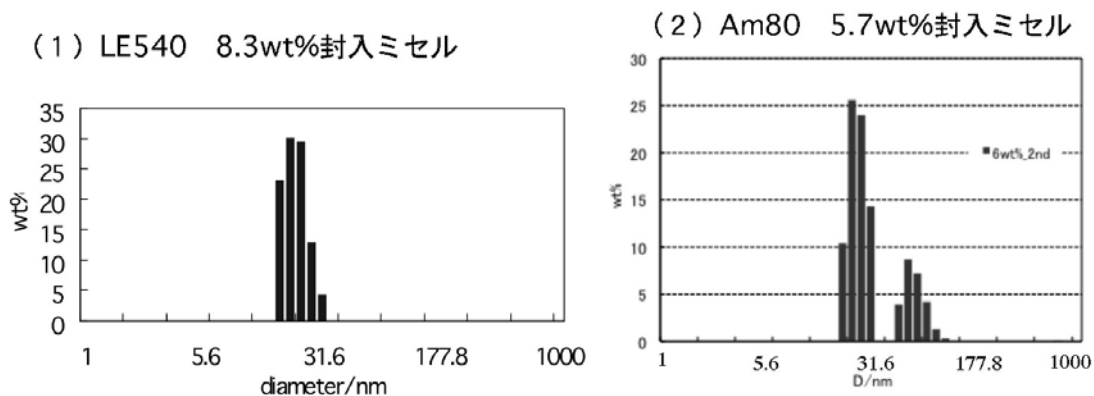


図8 薬物封入高分子ミセルの動的光散乱測定 (DLS)

(2)MRI造影剤封入高分子ミセル

MRIの造影剤成分であるGdイオンを封入したサンプルで、マウスがんをよく造影する組成のものを作製し、予備的にSAXS測定を行った。2次凝集の混入割合はAm80のRun2と同程度であったが、SAXS測定への悪影響はとて大きかった。Gdイオンは散乱強度が強いため2次凝集の悪影響が大きいと考えられる。MRI造影剤については、今後は高いレベルで2次凝集が生じない組成と2次凝集の厳密な除去法を検討する。

阪大 G

3)新規インフルエンザワクチンアジュバントの開発³⁷⁾

インフルエンザワクチンアジュバント(ベータグルカン-CpG ODN 複合体)の開発に関してはそのGMPロットの作製のための最適化を行った。複合体作成方法の改変、DNAの修飾などを行った結果100%複合化に成功し、安定なSPG-CpG ODNアジュバントを合成することが可能になった。

ワクチン、アジュバントの作用機序解明としてインフルエンザワクチンの機序解明を進め、全粒子ワクチン、スプリットワクチンの免疫原性の差が、インフルエンザRNAの有無によること、その形質細胞様樹状細胞によるTLR7を介した認識によりI型IFNの産生がおこり、このカスケードがその免疫原性に必須であることを示した。

詳細な解析の結果、形質細胞様樹状細胞(pDC)という特殊な細胞を除去した際に、インフルエンザ全粒子ワクチンによる肺の自然免疫反応および、その後の抗体誘導能が有意に減少した(図5)。このデータはさらに、ワクチン抗原を暴露させたpDCをナイーブマウスに移入する実験でも証明された。

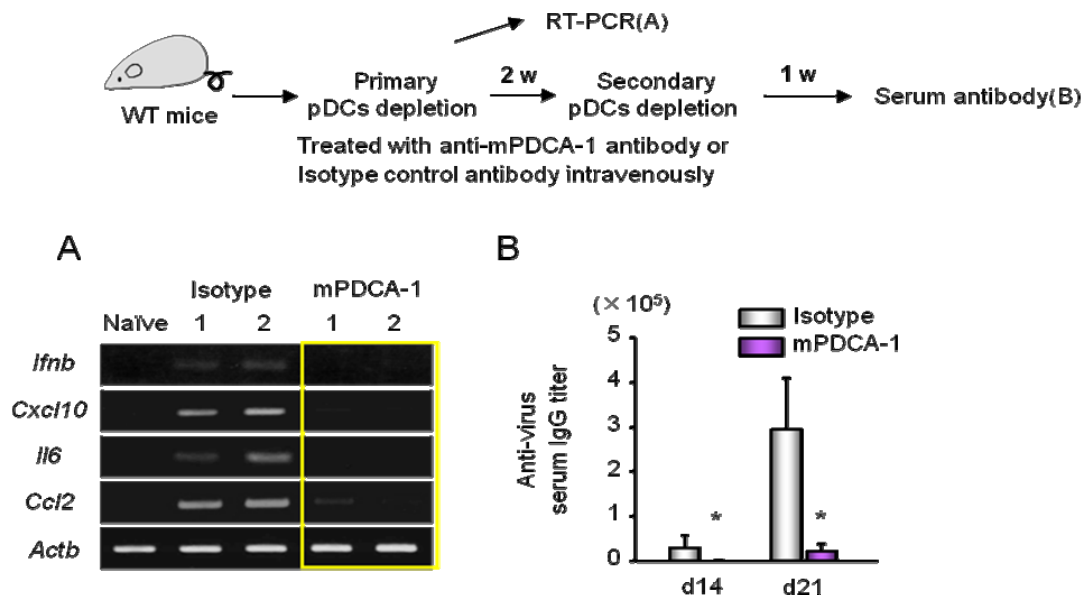


図 8:インフルエンザ全粒子ワクチンの自然免疫アジュバント活性、免疫原性は形質細胞様樹状細胞 (pDC) によってコントロールされる。

また、液性因子の探索を各種自然免疫関連遺伝子 KO マウスで検討したところ、IFN- γ R KO マウスにてインフルエンザ全粒子ワクチンの免疫原性が有意に減少していた。そこで WT や KO マウスの形質細胞様樹状細胞を上記と同様、ナイーブマウスに移入する実験を全粒子ワクチンの実験系で検討したところ、形質細胞様樹状細胞からインフルエンザ全粒子ワクチンの自然免疫活性化によって産生されるI型 IFN がこのワクチンの免疫原性に寄与していることが示唆された。

これまでインフルエンザウイルスの認識に関わる様々な自然免疫応答が研究され、Toll-like receptor (TLR) 7, Retinoic acid inducible gene-I, ある種の Nod-like receptor がインフルエンザウイルスの認識に関わることが知られており、今回は我々は、それらの自然免疫シグナル伝達経路に関わる因子を欠損したマウスを用いて、3 種類のワクチンの効果発現に関して比較検討した。その結果、弱毒化生ワクチン、不活化全粒子ワクチンの効果発現には TLR7 の活性化が必須である一方、不活化スプリットワクチンでは自然免疫の活性化は認めなかった。さらにマウスにおいては不活化スプリットワクチンのみの投与ではほとんど感染防御を誘導できなかった。ところが同じ不活化ワクチンでも、北九大で開発した多糖核酸複合体を用いて抗原提示細胞に添加すると、全粒子ワクチンと同様な効果が得られることが判明した(図9)。実際にスプリットワクチンに同じように pDC を活性化できる TLR9 のリガンドを加えることで獲得免疫の誘導が可能になった。また、このような pDC の活性はワクチンの初回投与の際に必須であったのに対し、すでに暴露された宿主では獲得免疫の誘導に必須ではなかった。この結果は、成人の末梢血をスプリットワクチンで刺激した際にも獲得免疫の指標となるインターフェロンガンマの産生が確認できたことから裏付けられた。本結果は、北九大と共同で Science Translational Medicine に受理をされた。

多糖CpG ODN複合体の応用

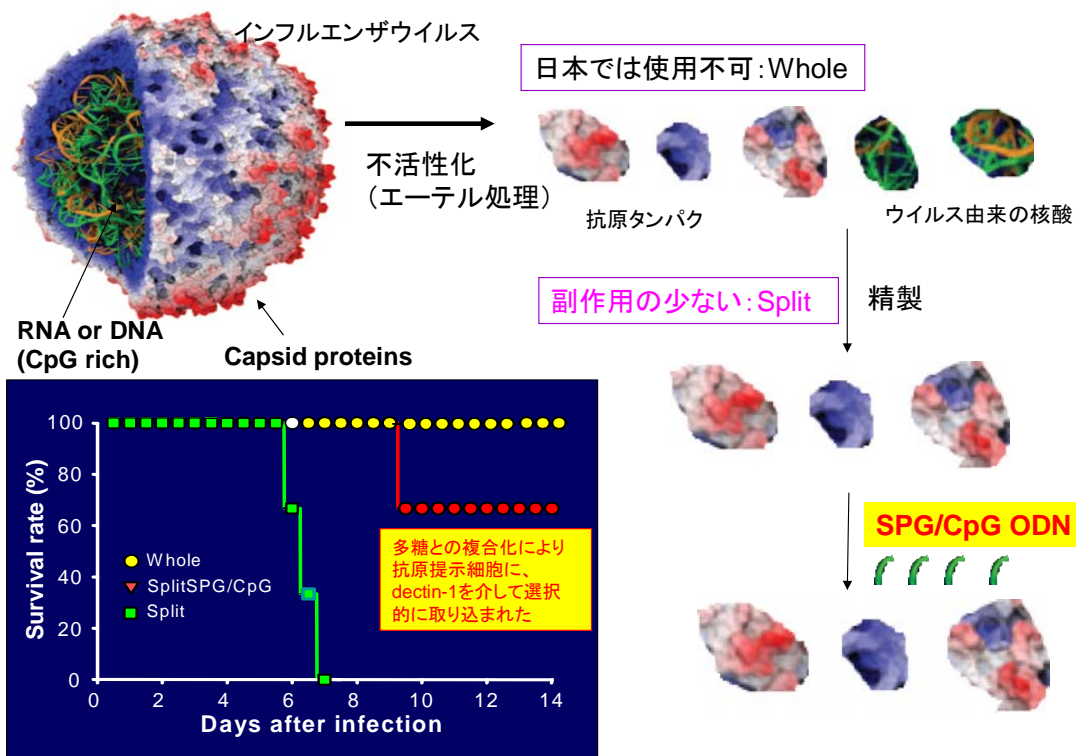


図9 スプリットワクチン(Split)は不活性化した全粒子ワクチン(Whole)を精製して抗原となるタンパク質のみを分離することで作成される。その過程で欠落したウイルス由来の CpG 配列を含んだ核酸の断片は自然免疫の活性化には不可欠であることが判明。これを補うために、免疫担当細胞に特異的に送達できる多糖(SPG)と複合化した CpGDNA を Split ワクチンと同時に添加した。致死量のウイルスに暴露した時の死亡率を比較すると、Split のみ(図緑)では未防御とほとんど変わらないが、これに SPG/CpG を同時に添加(赤)すると Whole(黄色)と同程度の致死率まで回復した。

以上

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Flexibility and Cross-Sectional Structure of an Anionic Dual-Surfactant Wormlike Micelle Explored with Small-Angle X-Ray Scattering Coupled with Contrast Variation Technique. Kenzo Naruse, Kenichi Eguchi, Isamu Akiba, Kazuo Sakurai, Hiroyasu Masunaga, Hiroki Ogawa, and John S. Fossey. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113 (30), 10222–10229 (2009) doi:10.1021/jp9019415
2. Supramolecular Structures of Benzyl Amine Derivate/DNA Complexes Explored with Synchrotron Small Angle X-ray Scattering at SPring-8. Mina Sakuragi, Shouta Kusuki, Emi Hamada, Hiroyasu Masunaga, Hiroki Ogawa, Isamu Akiba, and Kazuo Sakurai. *Journal of Physics* (Conference Series for IUMRS-ICA 2008), 184, 012008 (2009) doi:10.1088/1742-6596/184/1/012008
3. A Novel Polysaccharide/Polynucleotide Complex and its Application to Bio-functional DNA Delivery System. Shinichi Mochizuki and Kazuo Sakurai. *Polymer Journal*, vol.41, 343-353 No.5 (2009) (Award account) doi:10.1295/polymj.PJ2008309
4. Antisense Oligonucleotides Delivery to the Antigen Presenting Cells by using Schizophyllan. Shinichi Mochizuki, Jusaku Minari and Kazuo Sakurai. *MRS Fall Meeting Symposium HH* . Vol.1140, 17-22 doi:10.1557/PROC-1140-HH05-17
5. 「ポリカチオンに誘起された 5'-GMP 希薄溶液からの G-ワイヤーの形成」上原周一朗、櫻木美菜、櫻井和朗 高分子論文集 66, 179 (2009) doi:10.1295/koron.66.211
6. 「カチオン性ミセルと DNA が形成する超分子構造と遺伝子導入効率の関係」櫻木 美菜、楠木 翔太、濱田 衣美増永 啓康、佐々木 園、櫻井 和朗 高分子論文集 66, 211 (2009) doi:10.1295/koron.66.179
7. Synthesis of calcium phosphate-binding liposome for drug delivery. Takahisa Anada, Yoichi Takeda, Yoshitomo Honda, Kazuo Sakurai, and Osamu Suzuki. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19 (15), 4148-4150 (2009). doi:10.1016/j.bmcl.2009.05.117
8. Immunogenicity of Whole-Parasite Vaccines against Plasmodium falciparum Involves Malarial Hemozoin and Host TLR9. Cevayir Coban, Yoshikatsu Igari, Masanori Yagi, Thornik Reimer, Shohei Koyama, Taiki Aoshi, Keiichi Ohata, Toshihiro Tsukui, Fumihiko Takeshita, Kazuo Sakurai, Takahisa Ikegami, Atsushi Nakagawa, Toshihiro Horii, Gabriel Nunez, Ken J. Ishii, and Shizuo Akira. *Cell Host & Microbe* doi:10.1016/j.chom.2009.12.003
9. Y. Nozue, Y. Shinohara, Y. Ogawa, T. Takamizawa, T. Sakurai, T. Kasahara, N. Yamaguchi, N. Yagi, and Y. Amemiya, “Deformation behavior of banded spherulite during drawing investigated by simultaneous microbeam SAXS-WAXS and POM measurement”, *Polymer*, 51, 222-231 (2010). doi:10.1016/j.polymer.2009.11.031
10. T. Kikuzuki, Y. Shinohara, Y. Nozue, K. Ito, and Y. Amemiya “Determination of Lamellar Twisting Manner in a Banded Spherulite with Scanning Microbeam X-ray Scattering”, *Polymer*, 51, 1632-1638 (2010). doi:10.1016/j.polymer.2010.01.157
11. Yagi, N., N. Ohta and T. Matsuo. Structure of Amyloid Fibrils of Hen Egg White Lysozyme

doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.04.007

12. Inoue, K., Yagi, N., Urade, Y. & Inui, T. Compact Packing of Lipocalin-type Prostaglandin D Synthase Induced by Binding of Lipophilic Ligands. *J. Biochem.* **145**, 169-175 (2009) doi:10.1093/jb/mvn154
13. Tamura, T., J. Wakayama, K. Inoue, N. Yagi and H. Iwamoto. Dynamics of Thin-Filament Activation in Rabbit Skeletal Muscle Fibers Examined by Time-Resolved X-ray Diffraction. *Biophys. J.* **96**, 1045-1055 (2009) doi:10.1016/j.bpj.2008.09.022
14. Yagi, N., N. Ohta, T. Matsuo, T. Tanaka, Y. Terada, H. Kamasaka, K. To-o, T. Kometani and T. Kuriki. Evaluation of Enamel Crystallites in Subsurface Lesion by Microbeam X-ray Diffraction. *J. Synchrotron Rad.*, **16**, 398-404 (2009). doi:10.1107/S090904950900449X
15. Miyamoto, Y., S. Nishimura, K. Inoue, S. Shimamoto, T. Yoshida, A. Fukuhara, M. Yamada, Y. Urade, N. Yagi, and T. Ohkubo. Structural analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with biliverdin by small-angle X-ray scattering and multi-dimensional NMR. *J. Struct. Biol.* **169**, 209-218 (2010). doi:10.1016/j.jsb.2009.10.005
16. Yamaguchi, M., S. Takemori, M. Kimura, Y. Tanishima, T. Nakayoshi, S. Kimura, T. Ohno, N. Yagi, J. F. Y. Hoh and Y. Umazume. Protruding masticatory (superfast) myosin heads from staggered thick filaments of dog jaw muscle revealed by X-ray diffraction. *J. Biochem.* **147**, 53-61 (2010). doi:10.1093/jb/mvp143
17. T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, M. Yokoyama, Y. Maitani, Increase in tumour permeability following TGF- β type I receptor inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI, *British Journal of Cancer*, **101**, 1884-1890 (2009) doi:10.1038/sj.bjc.6605367
18. Huili Ma, Kouichi Shiraishi, Takuya Minowa, Kumi Kawano, Masayuki Yokoyama, Yoshiyuki Hattori, and Yoshie Maitani, Accelerated Blood Clearance Was Not Induced for a Gadolinium-Containing PEG-poly(L-lysine)-Based Polymeric Micelle in Mice, *Pharmaceutical Research*, **27**, 296-302 (2010) DOI: 10.1007/s11095-009-0018-9
19. Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, Vital microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels: macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **99**, 549-562 (2010) doi:10.1002/jps.21848
20. Therapeutic efficacy of a polymeric micellar doxorubicin infused by convection-enhanced delivery against intracranial 9L brain tumor models, T. Inoue, Y. Yamashita, M. Nishihara, S. Sugiyama, Y. Sonoda, T. Kumabe, M. Yokoyama, T. Tominaga, *Neuro-Oncology*, **11** (2), 151-157 (2009). doi:10.1215/15228517-2008-068
21. Preparation and in vivo imaging of PEG-poly(L-lysine)-based polymeric micelle MRI contrast agents, Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano; Takuya Minowa, Yoshie Maitani, and Masayuki Yokoyama, *Journal of Controlled Release*, **136** (1), 14-20 (2009). doi:10.1016/j.jconrel.2009.01.010
22. Enhanced in vivo antitumor efficacy of fenretinide encapsulated in polymeric micelles, Tomoyuki Okuda, Shigeru Kawakami, Yuriko Higuchi, Taku Satoh, Yoshimi Oka, Masayuki Yokoyama, Fumiyoshi Yamashita, and Mitsuru Hashida, *International Journal of Pharmaceutics*, **373**, 100-106 (2009) doi:10.1016/j.ijpharm.2009.01.019
23. In Vivo and In Vitro Evaluation of Gelation and Hemostatic Properties of a Novel

24. Histological study on side effects and tumor targeting of a block copolymer micelle on rats, Takanori Kawaguchi, Takashi Honda, Masamichi Nishihara, Tatsuhiro Yamamoto, and Masayuki Yokoyama, *Journal of Controlled Release*, **136**, 240-246 (2009) doi:10.1016/j.jconrel.2009.02.011
25. Encapsulation of the synthetic retinoids Am80 and LE540 into polymeric micelles and the retinoids' release control, Taku Satoh, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Mitsuru Hashida, Hiroyuki Kagechika, Koichi Shudo, Masayuki Yokoyama, *Journal of Controlled Release*, **136**, 187-195 (2009) doi:10.1016/j.jconrel.2009.02.024
26. Preparation of Perfluorocarbon/Fluoroalkyl Polymer Nanodroplets for Cancer-targeted Ultrasound Contrast Agents, Masamichi Nishihara, Kenji Imai, and Masayuki Yokoyama, *Chemistry Letters*, 38 (6), 556-557, (2009) doi:10.1246/cl.2009.556
27. Kobiyama K, Takeshita F, Jounai N, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, **Ishii KJ**, Kawai T, Sasaki S, Hirano H, Ishii N, Okuda K, Suzuki K. "Extra-chromosomal histone H2B mediates innate antiviral immune responses induced by intracellular double-stranded DNA." *J Virol*. 2010 84(2):822-3210.1128/JVI.01339-09
28. Reimer T, Shaw MH, Franchi L, Coban C, **Ishii KJ**, Akira S, Horii T, Rodriguez A, Núñez G. "Experimental Cerebral Malaria Progresses Independently of the Nlrp3 Inflammasome." *Eur J Immunol*. 2010 40(3):764-9. 10.1002/eji.200939996
29. Saitoh T, Fujita N, Hayashi T, Takahara K, Satoh T, Lee H, Matsunaga K, Kageyama S, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Kawai T, **Ishii K**, Takeuchi O, Yoshimori T, Akira S. "Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 106 (49) 20842-20846 10.1073/pnas.0911267106
30. S. Koyama, T. Aoshi, T. Tanimoto, Y. Kumagai, K. Kobiyama, T. Tougan, K. Sakurai, C. Coban, T. Horii, S. Akira, K. J. Ishii, Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci. Transl. Med.* 2, 25ra24 (2010). 10.1126/scitranslmed.3000759
31. McWhirter SM, Barbalat R, Monroe KM, Fontana MF, Hyodo M, Joncker NT, **Ishii KJ**, Akira S, Colonna M, Chen ZJ, Fitzgerald KA, Hayakawa Y, Vance RE. A host type-I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP. *J Exp Med*. 2009 206(9):1899-911. doi:10.1084/jem.20082874
32. Koyama S, Coban C, Aoshi T, Horii T, Akira S, **Ishii KJ***. "Innate immune control of nucleic acid-based vaccine immunogenicity." *Expert Rev Vaccines*. 2009 8(8):1099-107. (*Corresponding author) doi:10.1586/erv.09.57
33. Oma K, Zhao J, Ezoe H, Akeda Y, Koyama S, **Ishii KJ**, Kataoka K, Oishi K. "Intranasal immunization with a mixture of PspA and a Toll-like receptor agonist induces specific antibodies and enhances bacterial clearance in the airways of mice." *Vaccine*. 2009 27(24):3181-8. doi:10.1016/j.vaccine.2009.03.055
34. Abe T, Kaname Y, Wen X, Tani H, Moriishi K, Uematsu S, Takeuchi O, **Ishii KJ**, Kawai T, Akira S, Matsuura Y. "Baculovirus induces type I interferon production through toll-like receptor-dependent and -independent pathways in a cell-type-specific manner." *J Virol*. 2009 83(15):7629-40. doi:10.1128/JVI.00679-09

35. Kobiyama K, Takeshita F, **Ishii KJ**, Koyama S, Aoshi T, Akira S, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Yamanaka Y, Hirano H, Suzuki K, Okuda K. A signaling polypeptide derived from an innate immune adaptor molecule can be harnessed as a new class of vaccine adjuvant. *J Immunol.* 2009 Feb 1;182(3):1593-601. doi:182/3/1593
36. Isamu Akiba, Naotaka Terada, Satoshi Hashida, Taku Sato, Kouichi Shiraishi, and Masayoshi Yokoyama, Hiroyasu Masunaga, Hiroki Ogawa, Kazuki Ito, Naoto Yagi, and Kazuo Sakurai, "Encapsulation of a Hydrophobic Drug into a Polymer-Micelle Core Explored with Synchrotron SAXS". *Langmuir*, **2010**, **26(10)**, **P7544-7551** Doi:10.1021/la904355p
37. S. Koyama, T. Aoshi, T. Tanimoto, Y. Kumagai, K. Kobiyama, T. Tougan, K. Sakurai, C. Coban, T. Horii, S. Akira, K. J. Ishii, Plasmacytoid dendritic cells delineate immunogenicity of influenza vaccine subtypes. *Sci. Transl. Med.* 2, 25ra24 (2010). 10.1126/scitranslmed.3000759

(未発行論文)

- a. Tatsuhito Matsuo, Hiroyuki Iwamoto and Naoto Yagi, Monitoring of Structural Behavior of Troponin and Myoplasmic Free Ca^{2+} Concentration During Twitch of Frog Skeletal Muscles, *Biophys. J.*, **in press**
- b. Hiroyuki Iwamoto, Katsuaki Inoue†, and Naoto Yagi, Fast X-ray recordings reveal dynamic action of contractile and regulatory proteins in stretch-activated insect flight muscle, *Biophys. J.*, **in press**
- c. N Yagi, N Ohta, T Matsuo, T Tanaka, Y Terada, H Kamasaka, and T Kometani, A Microbeam Small-Angle X-ray Scattering Study on Enamel Crystallites in Subsurface Lesion. *J. Physics*, **in press**.
- d. Miyamoto, Y., S. Nishimura, K. Inoue, S. Shimamoto, T. Yoshida, A. Fukuhara, M. Yamada, Y. Urade, N. Yagi, and T. Ohkubo. Structural analysis of lipocalin-type prostaglandin D synthase complexed with biliverdin by small-angle X-ray scattering and multi-dimensional NMR. *J. Struct. Biol.* (**in press**)
- e. Yamaguchi, M., S. Takemori, M. Kimura, Y. Tanishima, T. Nakayoshi, S. Kimura, T. Ohno, N. Yagi, J. F. Y. Hoh and Y. Umazume. Protruding masticatory (superfast) myosin heads from staggered thick filaments of dog jaw muscle revealed by X-ray diffraction. *J. Biochem.* (**in press**)
- f. Vital microscopic analysis of polymeric micelle extravasation from tumor vessels: macromolecular delivery according to tumor vascular growth stage, Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, *Journal of Pharmaceutical Sciences* **in press**
- g. Increase in tumour permeability following TGF- β type I receptor inhibitor treatment observed by dynamic contrast-enhanced MRI, T. Minowa, K. Kawano, H. Kuribayashi, K. Shiraishi, T. Sugino, Y. Hattori, M. Yokoyama, Y. Maitani, *British Journal of Cancer*, **in press**
- h. The Combretastatin Derivative Cderiv, a Vascular Disrupting Agent, Enables Polymeric Nanomicelles to Accumulate in Microtumors, Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **Accepted**
- i. Katsuyoshi Hori, Masamichi Nishihara, and Masayuki Yokoyama, The Combretastatin Derivative Cderiv, a Vascular Disrupting Agent, Enables Polymeric Nanomicelles to Accumulate in Microtumors, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **in press** doi:10.1002/jps.22038

(4-2) 知財出願

① 平成21年度特許出願件数(国内 1 件)

② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)