

片岡一則

東京大学大学院工学系/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、高度なベクター機能を創り込んだ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ナノデバイスの創製とその高信頼性・高効率製造技術の確立によって、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、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。これまでに、*in vivo* で治療効果を発現するために有効と考えられる機能として、1) 標的指向性を高めるリガンド導入、2) ナノデバイス安定性向上に向けた化学構造導入、3) エンドソーム脱出や核移行性を促進する機能性素子の導入などの検討を行ってきた。同時に、疾患モデル動物を用いたナノデバイスの機能を評価する *in vivo* 評価系も確立し、一部の技術については実用的製造技術開発グループへの移転も行った。

平成 22 年度は、下記の研究実施内容において詳細を記すように、静脈投与を通じた皮下移植腫瘍・肺・肝臓での遺伝子導入、気管内投与を通じた肺での遺伝子導入、筋肉内投与を通じた遺伝子導入を通じて、各標的疾患に対するナノデバイス最適化作業の徹底化を進めるとともに、安

全性試験および実用的製造技術開発グループへの技術移転をさらに推し進めた。一方、ナノデバイスの長期保存および製剤化に向けた一つの試みとして吸入用ドライパウダー化を検討したところ、噴霧急速凍結乾燥法により高分子ミセル型ナノデバイスを中空多孔な微粒子とすることに成功し、また調製されたドライパウダーが肺に対して優れた遺伝子導入能を有することを確認した。さらに、新たに導入された高速レゾナントスキャナ搭載 *in vivo* 共焦点顕微鏡を駆使して、非侵襲的なリアルタイム *in vivo* イメージング法(ナノデバイスの血中動態や腫瘍集積挙動)などの新規評価技術を確立させるに至った。

§2. 研究実施体制

(A)「片岡・鄭」グループ

- ① 研究分担グループ長:片岡 一則 (東京大学大学院工学系/医学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・高分子ミセル型超分子ナノデバイスの創製とその革新的製造技術の確立

(B-1)「原島」グループ

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

(B-2)「小暮」グループ

- ① 研究分担グループ長:小暮 健太郎 (京都薬科大学・分析薬科学系、教授)
- ② 研究項目
 - ・多機能性エンベロップ型ナノ構造デバイス(MEND)の開発とその革新的製造技術の確立

(C)「長崎」グループ

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

(D-1)「佐々木」グループ

- ① 研究分担グループ長:佐々木茂貴 (九州大学大学院薬学研究院、教授)
- ② 研究項目

・インテリジェント機能性核酸の開発とナノ医療デバイスへの展開

(D-2)「永次」グループ

①研究分担グループ長:永次 史 (東北大学多元物質科学研究所、教授)

②研究項目

・インテリジェント機能性核酸の開発とナノ医療デバイスへの展開

(E)「松村」グループ

①研究分担グループ長:松村 保広 ((独)国立がん研究センター東病院 臨床開発センター
がん治療開発部、部長)

②研究項目

・超分子ナノデバイスを利用した難治がんの標的治療法の確立

(F)「斯波」グループ

①研究分担グループ長:斯波 真理子 ((独)国立循環器病研究センター研究所バイオサイエ
ンス部、室長)

②研究項目

・超分子ナノデバイスを利用した循環器疾患の低侵襲的治療法の確立

(G)「岡本」グループ

①研究分担グループ長:岡本 浩一 (名城大学大学院薬学研究科、教授)

②研究項目

・吸入用超分子ナノデバイスドライバウダーの開発

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

(A)「片岡・鄭」グループ

①分子ターゲティングのための生体適合型高分子ミセル型ナノデバイスの創製

平成21年度までに、生体内でのデバイス構造安定化と非特異的相互作用を軽減させるデバイス表層のポリエチレングリコール(PEG)密度制御に取り組んできた。その試みの一つが、構造安定化に向けた疎水基の導入と分岐状PEGブロック共重合体の開発である。実際に、PEG-アルキル鎖-ポリカチオンを合成したところ、期待されたデバイスの構造安定化に加え、*in vitro*評価系で遺伝子発現効率の大幅な向上が確認された。一方、ナノデバイスの製造的観点からは、ブロック共重合体中間層に疎水基を導入することによる製造・精製工程の問題に直面し、同等の性能を有しながら製造工程の簡素化が見込める、ポリカチオン鎖末端により疎水性の強いコレステロール基を導入したナノデバイスにシフトしていくことに決定し、製造技術のさらなる最適化を推進してきた。平成22年度は、まず従来的手法としてポリカチオン鎖の前駆体であるポリ(β -ベンジル-L-アスパルテート)(PBLA)の重合停止末端にコレステロールクロロ酸エステルを導入する手法について、反応時に使用する塩基の種類によってはPBLA主鎖の一部に若干の分解が生じることを明らかとし、適切な塩基に変更することによって問題を解決することに成功した。本手法はすでに日油(株)に技術供与し、安定的な大量製造技術として機能している。そして、より信頼性の高いナノデバイス製造技術としてコレステロール基を、塩基を使用せず、かつ安定なアミド結合によってPBLA末端に結合させるための手法として、コレステロールクロロ酸エステルの代替物として、コレステラミンを出発物質とするコレステラミド-N-ヒドロキシルスクシンイミド(NHS)の合成手法を確立した。これにより製造工程中の酸-塩基性環境下において懸念される加水分解の防止および将来的なナノデバイスのさらなる機能化が可能となる。これと並行して、コレステロール基を含有するナノデバイスの形態や内部構造解析に取り組むとともに、*in vivo*での活性、特に可溶性血管内皮成長因子(VEGF)-1型受容体(sFlt-1)遺伝子(プラスミドDNA(pDNA))に基づく抗腫瘍効果を評価した。結果として、sFlt-1 pDNAを搭載したミセル型ナノデバイスの静脈投与を通じて、皮下移植腫瘍がん(BxPC3)モデルに対する有意な抗腫瘍効果を得ることに成功した^{A-17}。

ナノデバイス表層のPEG密度向上を狙った分岐状PEGブロック共重合体については、超遠心分析よりPEG密度の向上を支持する結果が得られ、血中滞留性の向上が期待されたものの、コレステロール基導入なしのナノデバイスでは直鎖状ブロック共重合体と比して劇的な向上は認められなかったことから、直鎖状ブロック共重合体と同様にコレステロール基導入の最適化を現在進めている。一方、分岐状PEG型ナノデバイスでは、直鎖状PEG型と比して、表層PEG密度が向上しているにもかかわらず*in vitro*における細胞への取り込み、および遺伝子発現効率が有意に向上していることが明らかとなった。そのメカニズム解明に関する研究も進行中である。また、リガンド導入を視野に入れ、分岐状PEGの末端官能基化に向けて引き続き日油(株)との共同研究が進行中である。

また、これまでは血液中を循環する遺伝子キャリアの直接的な可視化は未知の領域であったが、本プロジェクトを通じて導入された高速レゾナンスキャナを搭載した *in vivo* 共焦点蛍光顕微鏡を用いることにより、その可視化に世界で初めて成功した^{A-13}。この観察を通じて、表面が PEG で覆われているか否かで、遺伝子キャリアの血中動態が大きく異なることを明らかにした。PEG で覆われていない遺伝子キャリアは、血液中で数十 μm の凝集塊を形成してしまう様子が観察された。詳細な解析より、血小板との相互作用により凝集塊形成が生じたことが確認された。一方、PEG で覆われた高分子ミセル型ナノデバイスは、その様な凝集塊形成を完全に抑制することが確認された。

②治療効果の空間的フォーカシングのための高分子ミセル型ナノデバイス創製

ナノデバイスが標的細胞内において機能発現するためには、高効率な遺伝子発現が得られるよう、ナノデバイス内に pDNA を規則的にパッケージングすることが重要である。これまでにポリカチオン鎖長及び pDNA との電荷比について検討し、ロッド状および球状ナノデバイスを造り分けられることを明らかにした。特にロッド状ナノデバイスにおいては規則化された折り畳み(ロッド長が折りたたみ回数 n に対し $1/2(n+1)$ の倍数と量子的に記述される)に基づいてパッケージングされることを見出した^{A-16}。平成 21 年度までに、そのロッド状ナノデバイスは、球状ナノデバイスや pDNA 単体より遺伝子発現効率が著しく高まることを無細胞転写・翻訳システム(*cell-free* システム)、マイクロインジェクションによる細胞質への直接投与、骨格筋を標的とした大伏静脈投与で認め、結果として皮下移植腫瘍がん(BxPC3)モデルマウスに対する骨格筋への異所性発現による有意な治療効果を得ている。さらに平成 22 年度には、ロッド状ナノデバイスが示す遺伝子発現向上のメカニズムを探求したところ、優れた核酸分解酵素耐性と pDNA 単体と遜色ない転写活性による効果のためであることが明らかとなった。

一方、全身投与のためには血中でのナノデバイスのさらなる安定化が必要であることから、デバイスコアにジスルフィド(SS)架橋を導入した系を進めてきた。平成 21 年度までに、(1) SS 架橋によって安定化された高分子ミセル型ナノデバイスの全身投与を通じて、固形がんへの遺伝子導入が可能であること、(2)増殖性の血管内皮細胞上での過剰発現が知られているインテグリンレセプターに特異的に結合する環状 RGD ペプチド(cRGD)リガンドを装着した cRGD/SS 架橋ミセルは、インテグリンを過剰発現した子宮がん(HeLa)細胞などに *in vitro* において早期かつ高い遺伝子導入能を示し、また全身投与後の組織分布に関しては皮下腫瘍組織への高い集積性を示すことを確認した^{A-18}。平成 22 年度は、cRGD 効果の詳細なメカニズムの解明とともに、PEG 鎖長に基づくリガンド効果の増強に取り組んだ。蛍光ラベル遺伝子と共焦点蛍光顕微鏡を用いたナノデバイス細胞内動態解析の結果より、cRGD の導入はクラスリン介在型エンドサイトーシスを促進することが強く示唆されるとともに、細胞内取り込みのみならずエンドソーム脱出にも寄与している可能性が示唆された。さらに、この cRGD の効果は、PEG の分子量 12,000 から 17,000 への増大に伴い、非特異的な細胞内取り込みの抑制を通じて増強されることも明らかとなった。結果として、分子量 17,000 の PEG に cRGD を導入した SS 架橋ミセルは、これまでの SS 架橋ミセルを有意に超

える in vivo 遺伝子導入能を発揮し、皮下移植 BxPC3 モデルマウスに対する優れた抗腫瘍効果を達成した。

上述の cRGD ペプチドリガンドだけでなく、抗体やアプタマーなどをリガンド分子として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、水中での高効率、高選択的な結合反応が必要となる。その具体的な手法として、まず、アジド基と末端アルキンによる双極付加反応(Click Chemistry)を検討し、Click Chemistry に必要な両官能基(アジド基とアルキン構造)を末端に有するヘテロ二官能性 PEG の合成法を確立した。さらに、日油(株)との協議を重ね、確立された合成法をベースにした製造方法開発を推し進め、中間体として高品質かつ十分な量のサンプル供給が開始される段階に至った。また、アジド-PEG-ポリリシン(PLys)を用いた遺伝子内包高分子ミセル型ナノデバイス調製に関しては、デバイス表層への蛍光プローブ導入および高速液体クロマトグラフィーによる分析を通じて、コンジュゲーション効率の定量的な評価を行った。この際に用いたミセル型ナノデバイスは、内核に SS 架橋を有するサンプルを適用し、実用レベルに近い条件で検討した。結果として、蛍光プローブ仕込みから見積もって約 30%が比較的短時間で効率良くミセル型ナノデバイス表層にコンジュゲートされることが明らかになった。抗体やアプタマーのようなレセプターとの選択性が非常に高い生理活性物質をリガンドとして用いる際、デバイス上に多く導入する必要はないと考えられるため、Click Chemistry によるリガンド導入効率としては約 30%でも有効な値であると期待される。

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

平成21年度までに、ポリアスパラギン酸(PAsp)骨格の側鎖にエチレンジアミン構造を配した PAsp(DET)は、そこから調製されるポリプレックスをエンドソームから細胞質内へ極めて効率的に移行させる機能を有し、かつ、その自己触媒型の生分解性機構によって細胞毒性の極めて低い低分子量体に速やかに断片化することによって、トランスフェクション後も細胞の恒常性を乱さず反復トランスフェクションにも十分耐えうる遺伝子導入試薬であることを明らかにしてきた。平成22年度は、分解メカニズムの知見を元にPAsp(DET)のもつ低毒性トランスフェクション試薬としての性能を損なうことなく、血中滞留型ナノデバイスとしての性能をより高めるために、①で記したように疎水基導入や分岐状PEGを利用した分子デザインへと展開した。その一方で、PAsp(DET)の機能発現機構解明の研究より、PAsp(DET)とエンドソーム膜との相互作用が導入遺伝子のエンドソーム脱出に重要であることが示唆されている。よって、PAsp(DET)を基盤とする遺伝子発現効率に優れたナノデバイス構築には、細胞(もしくはエンドソーム)内の還元(もしくは酸性)環境下でPAsp(DET)がデバイス表面に露出される材料設計が有効と考えられた。これを実現するために、以下に示す4つのアプローチに取り組んできた。

(1) ブロック/ホモポリマー混合系

平成22年度において、ブロック共重合体型ナノデバイスの調製時に、よりエンドソーム脱出機能に優れたPAsp(DET)ホモポリマーをブレンドする系を考案した。結果として、PAsp(DET)ホモポリ

マーの添加率を最適化すると、ホモポリマー単独と同等レベルに細胞内取り込みと遺伝子発現効率を高めることが出来るようになり、かつ細胞毒性を低い状態で維持することに成功した。さらに動物実験においては、全身投与により皮下移植腫瘍がん(BxPC3)モデルに対し、有意な抗腫瘍効果を得ることに成功した。また、本ナノデバイスの有する高遺伝子発現効率かつ低毒性である特性を活かした局所投与では、経気道肺投与によって高い導入効率と、低い組織傷害性、起炎症性の軽減を両立し、安全に効率よい遺伝子導入が可能であることを確認した。

(2) 細胞内還元環境にてPEGが脱離する系

平成21年度までに、細胞内還元環境にてPEGが脱離するPEG-SS-PAsp(DET)を合成し、実際に遺伝子のin vivo局所投与(肺や腹腔など)において顕著な遺伝子発現を達成してきた。また、PAsp(DET)側鎖を疎水化したPEG-SS-疎水化PAsp(DET)は、核酸医薬(siRNA)の静脈投与において肺転移がんデリバリーへの有効性が示唆されていた。そこで平成22年度は、スフェロイド培養系への適用を行った。これは、培養細胞の凝集塊であるスフェロイドを形成させることで、細胞本来の生理的機能を維持した培養を可能とするシステムであり、組織浸透性に優れたブロック共重合体型ナノデバイスを用いることで、この様なスフェロイド内部へも効率よい遺伝子導入が可能となる。実際、初代肝細胞スフェロイドに対する分泌型ルシフェラーゼを用いた検討で、1ヶ月以上にわたる効率よい遺伝子発現を確認した。

(3) 細胞内低pH環境でPEGが脱離する系

平成21年度までに、PEG末端へのアセタール構造の導入法を確立したので、平成22年度は、PEG末端へ導入したアセタール型リンカーの酸加水分解挙動に関して詳細な検討を行うと共に、PLysセグメントを有するブロック共重合体であるPEG-[acetal]-PLysを新たに合成した。結果として、エンドソーム内環境を想定したpH 6.0およびpH 5.0において良好な分解挙動を示すことを確認した。

(4) 電荷反転型ポリマーの応用

PAsp(DET)をナノデバイス表層に搭載すれば、ナノデバイスの効率的なエンドソーム脱出が期待できるが、ポリカチオンであるPAsp(DET)は生体成分と非特異的に相互作用する可能性があり、そのままでは全身投与に展開できない。これを解決するために、PAsp(DET)にcis-aconitic anhydrideを反応させ、中性環境では安定かつ酸性環境でPAsp(DET)へと還元されるアニオン性電荷反転型ポリマーPAsp(DET-Aco)を開発した。PAsp(DET-Aco)は生体成分との相互作用は弱いですが、エンドソーム内の低pH環境で還元されたPAsp(DET)はエンドソーム膜傷害を発現し、効率的なエンドソーム脱出につながると考えられる。平成21年度までに、PLysとpDNAより形成されるカチオン性複合体にPAsp(DET-Aco)を添加した3元系ナノデバイスにおいて、そのエンドソーム脱出が大幅に促進されることを確認した。この結果を踏まえ、平成22年度は、in vivoでの使用に向け、既存のSS架橋システムとの統合を図った。すなわち、PLysにチオール基を導入し、SS

架橋システムを調製した後に、PEG-PAsp(DET-Aco)を用いて3元系ナノデバイス調製するスキームである。調製された3元系ナノデバイスを培養肝臓がん(HuH-7)細胞に適用したところ、SS架橋導入とPEG-PAsp(DET-Aco)添加の相乗効果により、1桁近く高い遺伝子導入効率を達成した。さらに細胞毒性を評価したところ、PEG-PAsp(DET-Aco)の添加後は、細胞毒性がほとんど見られなくなることを確認した。

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高分子ミセル型ナノデバイスの創製

核酸医薬のin vivo応用に向け、平成21年度までの検討より、側鎖にステアロイル基(ST)を有するPAsp(DET)誘導体(PAsp(DET-ST))は、(1) ナノデバイスの安定化を通じて培養細胞に高効率で核酸導入可能であること、(2) デバイス表面を覆うPEGにより血球成分との非特異的相互作用が大幅に抑制されること、(3) 細胞内でPEGが脱離するPEG-SS型ナノデバイスを用いることで、静脈投与によりがんへの有意な核酸導入が可能となることが明らかとなった^{A-5}。よって平成22年度は、治療用核酸医薬を用いた抗腫瘍効果を検討した。VEGFに対するsiRNAを用い、皮下移植臓器がん(BxPC3)モデルへと展開したところ、100 μ g siRNA/mouseでの4回投与を通じて有意な抗腫瘍効果を得ることに成功した。さらに、リアルタイムPCRにより腫瘍組織でのVEGF mRNA量を定量したところ、非標的配列のsiRNAを投与した検体と比べ、VEGF-siRNAを投与した検体ではmRNA量の大きな減少が確認されたことから、RNA干渉に基づく抗腫瘍効果であることが強く示唆された。

また、cRGD-PEG-PLys の PLys 側鎖にイミノチオレイン N 置換体(IM)構造を導入したcRGD/IMミセルは、②で記述した従来のSS架橋ミセルと比べて、有意に安定であることが確認された。これにVEGFおよびその2型受容体(VEGFR2)に対するsiRNAを搭載し、cRGDの受容体であるインテグリンを過剰発現した子宮がん(HeLa)細胞の皮下移植モデルに対して適用したところ、10 μ g siRNA/mouse計6回の投与を通じて非常に強力な抗腫瘍効果を得ることに成功した。in vivo 共焦点蛍光顕微鏡観察を通じて、この優れた抗腫瘍効果は、cRGD/IM ミセル型ナノデバイスがインテグリンを過剰発現していると考えられる腫瘍新生血管および HeLa 細胞に選択的かつ高効率に集積したためであることが強く示唆された。

⑤高分子ミセル型ナノデバイスを利用した難治がんの標的治療法の確立

平成21年度までに、臨床における難治がん組織学的に高い類似性を有する皮下移植臓器がん(BxPC3)モデルマウスに対して、sFlt-1 遺伝子を搭載した種々のミセル型ナノデバイスが有意な抗腫瘍効果を示すことを確認した^{A-17,18}。平成22年度は、性能面だけではなく、製造的観点も含めてナノデバイスの絞り込みに取り組んだ。そして①で詳細を記述したように、製造工程の簡素化が見込まれる、ポリカチオン鎖末端に疎水性の高いコレステロール基を導入したブロック共重合体PEG-PAsp(DET)-Choleを基盤とするナノデバイスが、製造的および性能的観点から有用であることが明らかとなった。その一方で、④で記述したように、核酸医薬用ミセル型ナノデバイスについても、ステアロイル基を導入したPEG-SS-PAsp(DET-ST)にVEGFを搭載したシステム^{A-5}、およ

び cRGD-PEG-PLys にイミノチオレイン N 置換体構造を導入した cRGD/IM ミセルに VEGF/VEGFR2-siRNA を搭載したシステムにより、有意な抗腫瘍効果を得ることに成功した。今年度中に、さらなる絞り込みを行うと同時に、非常に優れた成果が見られた cRGD リガンドを PEG-PAsp(DET)-Chole システムへと展開する予定である。

⑥高分子ミセル型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

経肺投与による高分子ミセル型ナノデバイスを用いた遺伝子治療法を確立するため、片岡グループと斯波グループの共同研究で *in vivo* 遺伝子導入における条件検討を行ってきた。平成 21 年度までに、PEG-PAsp(DET)および PEG-SS-PAsp(DET)からなる高分子ミセル型ナノデバイスを用いた遺伝子導入による、肺動脈性肺高血圧症モデルラットに対するアドレノメデュリン遺伝子発現に基づく有意な右室圧の低下、すなわち有効性を証明している。平成 22 年度は臨床応用に向けて、(1)遺伝子発現効率の上昇、効果の持続の試み、(2)安全性の確立のために炎症を出来る限り抑制するための試みを行なった。遺伝子発現効率の上昇としては、前述のブロック/ホモポリマー混合系デバイスを用いることで、従前のブロック共重合体型ナノデバイスとくらべ、ルシフェラーゼ発現で 1 桁以上の発現の増加が得られた。さらに安全性の観点から、遺伝子導入後の肺組織での炎症性サイトカイン発現 (mRNA)、肺胞洗浄液中の LDH 計測、肺組織の病理組織学的評価を行い、ブロック/ホモポリマー混合系デバイスが肺での組織傷害や炎症をほとんど引き起こさずに遺伝子導入可能であることを確認した。さらに、昨年度より引き続き、投与部位での組織傷害、炎症軽減効果を持つコンドロイチン硫酸添加系の評価を進め、肺組織における投与条件を確立した。これらに関連して、投与する pDNA に含まれる大腸菌由来配列である CpG が肺組織中で著しい起炎症性を持つことを明らかとし、この配列を取り除いた pDNA による評価を開始した。既に発現タンパク部分 (ルシフェラーゼなど) だけでなく、プロモーターやその他プラスミドバックボーン部分も全て CpG フリー化した pDNA を用いた実験で、むしろ CAG など強力なウイルス由来プロモーターを用いた pDNA と比べても遜色ない遺伝子発現が得られることを確認しており、今後はモデル動物への疾患治療を目的とする遺伝子導入についても、pDNA の CpG フリー化を進める予定である。

さらに、経肺投与遺伝子導入の適応疾患を拡大するために、欧米で特に頻度が高く予後が悪い重篤な疾患である嚢胞性線維症 (CF) を対象として、治療に向けた基礎実験を開始している (斯波グループの項で詳述する)。

⑦高分子ミセル型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

平成 21 年度までの検討より確立したハイドロダイナミクス法による骨格筋をターゲットとした遺伝子投与法を用いて、運動器を中心とした機能再建への応用を開始した。四肢の虚血モデルに対する血管再生治療の試みとして、Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) の安定化に基づく血管新生因子群発現誘導を目的として、HIF-1 α のプロテアソーム分解を掌る Prolyl hydroxylase domain-2 (PHD2) に対する shRNA 発現 pDNA を骨格筋に導入した。ナノデバイスによる

pDNA の投与によって、虚血肢での血流量の増加が確認された。特にコンドロイチン硫酸添加したナノデバイスで顕著な治療効果が得られ、投与による組織傷害性、起炎症性を制御することが、遺伝子導入によって有効な治療効果を得るために重要な要素となることが強く示唆された。

さらに平成 22 年度は、神経損傷モデルへの応用を開始した。液体窒素で冷却した鑷子で、マウス坐骨神経を坐骨切痕部で 30 秒間把持することにより、下肢の一過性麻痺を起こさせる冷却損傷モデルを採用した。マウスでの自然経過では、数週後に徐々に下肢機能の改善(神経再支配)が始まり、その後数週でほぼ完全に麻痺は改善する。この運動機能評価として、マウスの歩行機能解析である **Sciatic Functional Index (SFI)** 評価法を確立した。さらに麻痺肢では著しい骨格筋の萎縮が生ずるが、骨格筋体積を定量的に評価するために、マイクロ CT による下肢の撮影を行った。骨格筋の筋萎縮防止に効果を持つ 1 型インスリン様成長因子(IGF-1) pDNA 投与を行ったところ、特にコンドロイチン硫酸を添加したナノデバイスによる遺伝子投与群で、麻痺による筋萎縮からの早期の筋量回復、それに伴う歩行機能の早期改善が観察された。今後、神経・筋組織の分子生物学的解析、組織学的解析など詳細な検討を進める予定である。

(B-1)「原島」グループ

①トランスサイトーシス誘起型ナノデバイスの創製と機能検証

平成 22 年度は、平成 21 年度において作成したナノ粒子用トランスウェルを用い、脳毛細血管内皮細胞の単層培養系を透過可能な各種ペプチドを表面修飾したリポソームを創製した。また、取り込み経路の各種阻害剤存在下でリポソームの取り込み活性を評価した結果、本ペプチド修飾リポソームが血管内皮細胞に対してカベオラ経路で取り込まれることを明らかとした。

一方で、今後本ペプチドリガンドを生かすためには、脳毛細血管内皮細胞を標的とするリガンド分子の同定が必須となる。そこで、末梢組織で産生され、脳で機能するホルモンが脳毛細血管内皮細胞標的化リガンドとして機能すると考え、探索した結果、レプチン由来ペプチドを表面修飾したリポソームが脳毛細血管内皮細胞に対して高い取り込み活性があることを見出した^{B-6}。

In vivo に向けては、IRQ ペプチドの肺へのデリバリーシステムを応用し、内皮細胞を標的とした遺伝子発現システムへと発展させた。平成 21 年度の解析により、IRQ を用いた肺への輸送を考える上で PEG が長いほうが有利であるという情報を得ているが、一方で、長鎖 PEG は細胞内取り込み等を減少させ、結果として遺伝子発現能をも低下させることを見出してきたが、細胞内動態の観点から、(1) IRQ を修飾する PEG 鎖長を短くする、(2) pH 感受性膜融合性ペプチド(GALA)の修飾、(3) ポリカチオン・脂質組成の変更などを行うことで、段階的に遺伝子発現活性を促進することに成功し、遺伝子発現活性を約 150,000 倍上昇させることに成功した。

②全身投与型ナノデバイスによる難治がんの治療実験

MEND の活性向上を目的に、機能性核酸をコア粒子化するポリカチオン分子のスクリーニングを行った結果、従来のステアロイル・オクタアルギニン(STR-R8)と比較してオルニチントリプトファンアナログによって GALA/PEG 脂質誘導体(PPD)-MEND の活性を向上させることを見出した

B-3。血清耐性のスクリーニングにより得られた脂質組成に ^3H 標識し、機能的核酸モデルとして siRNA を ^{32}P で標識し封入した放射性二重標識 MEND の調製法を確立した。この MEND を静脈内投与後の in vivo 血中 $^{32}\text{P}/^3\text{H}$ 濃度比から siRNA を効率よく保持可能な MEND の検討を行ったところ、GALA/PPD-MEND の滞留性は従来の PEG 修飾 MEND と比較して劣っていた。そこで GALA に着目し、アミノ酸配列の短縮した short GALA (shGALA) ペプチドを新規に設計した (特願 2010-39667)。shGALA 修飾 PEG-MEND (shGALA-MEND) は in vitro 細胞系で高い活性を示し、かつ in vivo で高い血中安定性を示した。そこで、shGALA-MEND にヒト内因性遺伝子に対する siRNA を封入し、ヒト繊維芽肉腫 HT1080 を背部皮下移植した担がんモデルマウスに対して静脈内投与したところ、がん組織における標的遺伝子発現抑制に成功した。また、in vivo 担がんモデルの検討では、Enhanced permeability and retention (EPR) 効果によるナノデバイス腫瘍集積挙動の観察が可能なモデルや肺転移モデルを作出した。

③効率的に肝細胞を標的化するためのナノデバイスの最適化

MEND を用いた肝臓への有用性を検証する為に、市販の in vivo 用遺伝子導入試薬である Lipotrust (脂質組成: DC6-14/DOPE/Cholesterol=40/30/30) と、同じ脂質組成の MEND の比較を試みた。その結果、Lipotrust では肺での遺伝子発現活性が肝臓よりも 25 倍高かったのに対し、MEND では肺での活性を大幅に抑えることが出来た。さらに MEND による肝臓での遺伝子発現活性は Lipotrust の場合に比べて 5 倍高く、MEND の構造体は肝臓への遺伝子送達システムとして有用であることが示された。次に肝臓での遺伝子発現活性の局在を調べるために、実質細胞と非実質細胞 (血管内皮細胞、kupffer 細胞) に分離して細胞数当たりの遺伝子発現活性を評価した。その結果、非実質細胞では実質細胞に比べて約 6 倍高いことから非実質細胞を標的とした疾患治療 (肝炎、肝硬変等) に応用できる可能性が示された。更に MEND にエンドソーム脱出素子である GALA を修飾すると、実質細胞、非実質細胞共に遺伝子発現活性が 18 倍、11 倍と上昇したことから、in vivo における GALA による細胞内動態の制御は効率的な遺伝子デリバリーシステムのために必要不可欠であることが示唆された^{B-2, 4}。一方で、肝臓への遺伝子デリバリーのさらなる向上を狙い、核移行性素子として機能する糖などを搭載した結果、マルトトリオースにより 10 倍程度遺伝子発現が促進することが見出された。外来 DNA からの発現効率の減少 (silencing) を防ぐために、転写調節因子である GAL4 と VP16 の融合タンパク質 (人工転写因子、activator) を発現する発現カセットの上流と下流に GAL4 結合部位を挿入した pDNA を構築し、また、ルシフェラーゼ (reporter) を発現する発現カセットの上流と下流に GAL4 結合部位を導入した pDNA を構築した。Activator pDNA との同時投与により、GAL4-VP16 が reporter pDNA からの外来遺伝子の発現を促進するとともに、GAL4-VP16 が positive feedback により、自身の発現をも促進すると考えられる (以降、自己活性化システム)。このシステムの有用性を既に培養細胞で確認していたが、今年度は、肝細胞における核内動態制御を可能とするために、肝臓特異的なアルブミンプロモーターを用いる自己活性化システムを構築し、マウス肝臓へ activator 及び reporter pDNA をハイドロダイナミクス法で投与した。その結果、activator pDNA との同

時投与により、reporter pDNA の単独投与に比べて 100 倍以上のルシフェラーゼ活性が観察された^{B-8}。また、核内タンパク質であるヒストン H3 との複合体として pDNA を培養細胞に導入したところ、発現効率は H3 の量に依存して減少した。これは、単にヒストンと複合体を形成させるだけでは核内における decondensation が不十分であり、核内動態制御のためには適切な空間的配置を考慮したヒストンとの複合体を形成させる必要性を示している^{B-9}。

次に、安全性向上の観点から、CpG 配列を含まない pDNA を用いてサイトカイン産生の抑制効果の評価した。その結果、CpG 配列を 429 個含む pDNA と比較して、全く含まない pDNA の場合ではサイトカインである IL-6、IFN-gamma、TNF-alpha の産生量は著しく減少し、TNF-alpha に関しては全く産生されなくなった。そして肝毒性の指標である GPT 値は約 3 倍減少した。従って、CpG 配列を含まない pDNA を選択することは、肝臓疾患を標的とした、安全な遺伝子デリバリーシステム構築に有用である可能性が示された。

(B-2)「小暮」グループ

①イオントフォレシスによる皮膚生理の変動解析と効率的な機能性核酸の経皮送達への展開

平成 21 年度に微弱電流刺激(イオントフォレシス)によるナノ粒子の経皮送達時に細胞間隙タンパク質であるコネクシンのリン酸化が亢進することを見出していた。一方、siRNA のような親水性高分子がイオントフォレシスによって効率よく皮内に送達されることを明らかにしている^{B-2-1}。さらに、CpG 配列を有するオリゴ DNA をイオントフォレシスすることによって、マウス皮下に移植した癌の成長を著しく抑制することに成功した^{B-2-2}。また、インスリンを封入したカチオン性リポソームを糖尿病ラットにイオントフォレシスすることで、血糖値の持続的で有意な抑制が観察され、イオントフォレシスによってナノ粒子も皮内に送達可能であることが確かめられた^{B-1-5}。そこで、平成 22 年度は、より詳細な解析を行うことで電気刺激時の皮膚生理状態の変化と物質の皮内透過との相関について検討した。その結果、微弱電流刺激時にコネクシン以外の細胞間隙タンパク質の著しい変動は認められなかった。また、このときカチオン性リポソームの存在が必須であることが確認された。さらに、より詳細にメカニズムを検討するために、単層培養した上皮細胞を用いて微弱電流刺激の影響を検討したところ、物質透過が促進されると同時に細胞間隙タンパク質の変動が観察された。このことから、イオントフォレシスによる皮膚細胞間隙の開裂がナノ粒子の皮内送達に関与していることが示唆された。さらに、長崎グループの開発した異なる大きさのナノゲルをイオントフォレシスしたところ、平均粒子径が 50nm のナノゲルのみが表皮層への透過を示したことから、イオントフォレシスによって開裂する皮膚細胞間隙の大きさは 50nm 前後であることが示唆された。

②凍結乾燥 MEND による in vivo 遺伝子送達

凍結乾燥 MEND による in vivo 遺伝子送達を検討するため、I 型糖尿病の治療遺伝子であるプロインスリンプラスミドを MEND に封入し、凍結乾燥後、少量の buffer に濃縮懸濁したものを無針注射器により皮内に投与したところ、皮膚・筋肉組織における有意なインスリン mRNA の発現を確認した。さらに、血液中へのインスリンの分泌も検出することができた。しかし、糖尿病によって高

くなった血糖値を有意に低下させることはできなかった。この原因として、インスリン発現量が不十分であることが考えられ、送達効率・遺伝子発現効率のさらなる向上が必要であると思われる。

(C)「長崎」グループ

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

本研究項目では、佐々木グループおよび原島グループとの共同研究により、PEG 化機能性核酸が細胞内で効果的に機能すること、および PEG 化脂質が *in vivo* において高い遺伝子発現を示すことをそれぞれ見出し、*in vivo* に向けた構造の最適化(PEG 鎖の鎖長、リガンド分子の導入)を検討してきた。平成 22 年度はこれらの PEG 化機能性核酸・脂質の実用化を進めるためこれらの PEG 化機能性分子の大量合成に向けた検討を行った。具体的にはこれまでに開発した PEG 化機能性核酸の固相合成の最適化を試みた。固相への担持量の解析方法の確立を行い、その後固定化法の検討を行った。これまでのところ $8 \mu\text{mol/g}$ の担持量を達成している。また新たな PEG 誘導体を開発し、様々な機能化 PEG 誘導体の開発に着手した。

一方で、PEG 化機能性核酸の新規ナノデバイスとして、架橋構造を有するナノサイズの三級アミンゲルと PEG 層から成るコアシェル型 PEG 化ナノゲル粒子の調製および評価を行ってきた。この PEG 化ナノゲル粒子の特徴は、架橋ポリアミン構造をコアに有していることで、全身投与後の希釈条件、高塩濃度条件でも解離、分解することのない点である。平成 22 年度は、この PEG 化ナノゲル粒子の粒子表面に更に PEG を修飾し、PEG 密度を高める事により体内動態の改善を試みた。PEG の修飾は三級アミンに末端をクロロメチルベンゼンで修飾した PEG 誘導体を反応させることにより行った。分子量 500 の PEG をナノゲル表面に修飾する事でナノゲルの体内動態が改善されることを確認した。この結果を受け、より分子量の大きい PEG でのナノゲル表面修飾による体内動態のさらなる改善を試みている。これまでのところ PEG の長さを長くすることで、粒子のゼータ電位が 0 に近づく事が確認されている。今後これら長鎖 PEG を修飾したナノゲルの体内動態を解析する予定である。

遺伝子キャリアとしてのナノ粒子はしばしばそれ自身の毒性や炎症が問題になりつつある。そこで、平成 22 年度から活性酸素消去能を有する PEG-ポリアミンブロック共重合体及び PEG-ポリアミングラフト共重合体を合成し、遺伝子キャリアとしての評価を始めた。合成した材料は PEG 鎖を有するポリクロロメチルスチレンに 4-アミノ TEMPO(2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシド)を高分子反応にて導入した。反応はほぼ定量的に進み、疎水性鎖の側鎖に安定ニトロキシラジカルとアミノ基を同時に導入することに成功した。得られた PEG-g-PSTEMPO を利用し、siRNA の複合化を行った。ニトロキシラジカルと遺伝子に導入した蛍光ラベルが効率的にエネルギー移動して消光することから効果的な錯体を形成していることが確認された。モデル反応によりこれらの粒子は効率的に活性酸素を消去することが確認された。さらに PEG-g-PSTEMPO と siRNA の複合体はポリエチレンイミンと同程度の遺伝子発現抑制能を有していることを確認した^{C-11}。

ニトロキシラジカルは特にスーパーオキシドジスムターゼ(SOD)様のスーパーオキシドだけでな

く、ヒドロキシラジカルも消去することが可能であることから、高い抗炎症効果が期待される。また、PEG-ポリアミンブロック共重合体を用いて作製したミセル Radical containing nanoparticle (RNP)はプラスミドの遺伝子発現を促進しているという非常に興味深い結果も得られている。

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。これまでにsiRNA/PEGインテリジェント界面をナノデバイスに創り込むためのプラットフォームとして、新たに金ナノ粒子を内包したPEG化ナノゲル粒子の調製および評価を行ってきた。平成22年度はこれらのナノデバイスのin vivoでの評価を行った。これまでに検討してきたナノゲルは必ずしも表層PEG密度が上がっていないために、in vivoでの毒性に懸念が残った。しかしながら、金コロイドを内封することによりポリアミンの表層への露出が減り毒性が低下していることが確認された。さらにこの金コロイド含有ナノゲル(GNG)に末端にメルカプト基を有するsiRNAを固定した。固定したsiRNAの標的遺伝子としてはサバイビンを選択した。静電相互作用とメルカプト基の金コロイド表面への結合という相乗効果で安定な固定が達成された。サバイビンは放射線治療などで高度に発現し、アポトーシスを抑制することが知られているため、今後サバイビンsiRNA担持GNGを放射線治療と併用する効果を確認する。現在、サバイビン発現細胞を利用した予備的観測での抑制が確認され、今後の検討が期待される。

本研究項目ではさらに効果的ターゲティングを目指した抗体/PEGハイブリッド表面の検討を行っている。平成22年度は抗体と表面との適度な反発力を利用することにより抗体の配向を制御することで、固定抗体の認識能を大幅に向上させることを見いだした。さらに表面に固定した抗体の周りにPEG密生層を構築することにより、抗体の活性低下を妨げるだけでなく、活性自身が向上することも確認された。

(D-1)「佐々木」グループ

①高感度センシングのための機能性分子開発

本項目では、高感度核酸センシングプローブの開発を目的として、まず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2核銅錯体を開発した。さらに、この新しい錯体を標的核酸上で集積させ触媒機能を活性化させるシステムを構築するためオリゴヌクレオチドを用いた検討を行なっている。これまでの予備的な検討をもとに、平成22年度には銅に対する配位子構造を5'-末端および3'-末端に導入したオリゴヌクレオチドを種々合成し、オリゴヌクレオチドと配位子部分とのスペーサー長さおよび基質核酸構造の最適化を検討した。その結果、標的となる核酸の1塩基を識別する高感度な検出プローブの開発に成功した^{D-1}。検出プローブ開発としては酸化損傷箇所の検出プローブの開発も行なっており^{D-4}、平成23年度はさらなる検出機能の向上を検討する。

②高次構造DNA結合リガンドの開発

3 本鎖DNA, 4 本鎖DNAなどとともに遺伝子発現に関係していると考えられている左巻きDNA(Z-DNA)への特異的な結合能をもつ低分子リガンドの開発を検討した。これまで2個の芳香環をもつスクシミドとスペルミンの結合体が、B-DNA(右巻き)をZ-DNAに遷移させるこれまでにない機能分子であることを明らかにしてきた。しかしその遷移機構の詳細は明らかではなかった。そこで平成22年度は、SPR(表面プラズモン共鳴)およびITC(等温滴定カロリメトリー)を用いて物理化学的パラメーターを求めた。その結果、リガンドは低分子:DNA=4:1の比率でDNAと結合し、脱水和することによりB-DNAを不安定化し、リガンドの芳香環部分のZ-DNA末端塩基対とのスタッキングによりZ-DNAを安定化することによりB-DNAからZ-DNAへの遷移を誘起することが分かった^{D-2}。この分子は遺伝子制御におけるZ-DNAの役割解明に有用な分子となるものと期待される。さらに、B-DNAからZ-DNAへの誘起能が光刺激によりスイッチングできれば、生体内でのZ-DNA機能解明にさらに有用性が高まると考えられるため、現在スイッチング機能分子を開発中である。

③RNA編集機能の非細胞系機能評価

人工核酸によるRNA編集機能の実現を目指して、非細胞系ルシフェラーゼ発現系を用いて検討を行っている。平成22年度は、ウラシルに迅速に化学架橋を形成する新規クロスリンク分子を開発した。この新規クロスリンク分子を組み込んだオリゴヌクレオチドは、室温かつpH7という緩和な条件で標的RNAのウラシルと選択的にクロスリンクを形成した(特許出願書類作成中)。現在、生体条件での利用のための活性化機構の付与を検討中である。

一方、従来型のクロスリンクユニット(2-アミノ-6-ビニルプリン誘導体)を用いてRNAに対して高い反応性を示す分子の開発にも成功している^{D-5}。天然型オリゴヌクレオチドを用いた非細胞系実験により、RNase-HによるmRNA切断を経由する短縮タンパク質の合成が可能であることを明らかにした。さらに、クロスリンク核酸を用いた場合には細胞内での検討においても天然型では観測されない短縮タンパク質が合成されることが見出された。そこで平成22年度はこの細胞内での短縮タンパク質合成機構を明らかにする目的で、天然型およびクロスリンク核酸とmRNA反応物の細胞抽出液中での安定性を評価した。その結果、天然型およびクロスリンク核酸ともにRNase-HによるmRNA切断を誘起するが、クロスリンクしたmRNA断片の分解速度は天然型よりも遅いことが明らかになった。これらの結果より、分解耐性の高まったクロスリンクしたmRNA断片が短縮タンパク質合成に関与していることが示唆された。そこで現在新規高効率クロスリンク核酸を搭載し、RNase-Hによる切断のあとより高い分解耐性をもつオリゴヌクレオチドによる検討を行なっている。

RNAの標的塩基を特異的に化学修飾する機能性核酸分子の開発を検討し、2-メチリデン-1,3-ジケトン構造のユニットをRNAの標的シトシン特異的な修飾反応に成功し、転移可能な官能基群の構築を確立している。引き続き溶液のpHをアルカリ性にするにより転移反応選択性をグアニンに変化させることに成功し^{D-6}、さらに、Ni²⁺、Co²⁺の共存により反応が著しく活性化し、pH7.4でも転移反応が進行することを見出した^{D-3}。しかし、従来この方法でも巨大分子であるmRNAの

特異的修飾を確認することができていなかったが、ビオチンによる修飾反応を行なうことで mRNA の化学修飾を確認することができた。この方法はさらに“Click Chemistry”を適用することで一般的な RNA 修飾法に展開することができた(国内特許出願)^{D-7}。この特異的修飾 mRNA を用いてタンパク質合成を検討したところ、期待された短縮タンパク質は確認されず、天然長とおなじタンパク質が合成された。現在、翻訳機能の実現を目指して、化学修飾の効率と立体的な大きさの検討を行なっている。

④機能性核酸を搭載したナノデバイスの機能検証

本項目では W 字型人工塩基による 3 本鎖形成配列の拡張について検討しており、すでにこれまで形成できなかった配列での 3 本鎖形成を可能にする人工塩基を開発し、認識配列の一部拡張に成功している。平成 22 年度は、より効果的な細胞増殖阻害活性を期待して bcl-2, サバイビンがん遺伝子を標的とした新たなアンチジーン人工核酸の設計と合成を行った。それらの遺伝子発現阻害効果を調べるため、市販の oligofectamine を用いて殺細胞効果を調べた結果、低濃度でも細胞増殖阻害活性が確認され、さらに 3 本鎖形成能の高い W 字型人工核酸搭載アンチジーン核酸の優位性も示すことに成功した。片岡グループの高分子ミセル型ナノデバイス、原島グループの MEND 型ナノデバイスでの検証およびその阻害機構の詳細について、更なる検証を継続している。

(D-2)「永次」グループ

①機能性核酸を組み込んだ PNA(ペプチド核酸)の合成及び機能評価

PNA は 2 本鎖 DNA に対してイン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。昨年度までに、第 1 世代インテリジェント核酸を組み込んだ PNA オリゴマーを合成しその反応性を評価した。しかし、期待したほど反応性は高くないことがわかった。そこで今年度はチミンに選択的に反応する第 2 世代インテリジェント核酸を組み込んだ PNA の合成を検討した。PNA モノマーの合成には成功し、現在カップリング反応を検討中である。

②RNA 型インテリジェント核酸の合成^{D-2-1}

従来用いていた第 1 世代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きた。そこで RNA に対する反応性向上を目指し、2'-OMeRNA 型インテリジェント核酸の合成を検討した。2'-OMeRNA は酵素耐性を持つことから細胞内での安定性も付与できると考えられる。昨年度は、2'-OMeRNA 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を行い、詳細にこの反応を検討したところ、中性条件下、DNA 中のチミンに対して選択的に反応することがわかった。さらに今年度、細胞内におけるアンチセンス効果及び miRNA の阻害について検討するために種々の配列を持つ 2'-OMe 型インテリジェント核酸を含む 2'-OMeRNA を合成し、まずその反応性を評価した。その結果、インテリジェント核酸が 3'GC5' に挟まれる配列では RNA に対して中性条件下においても反応することがわかった。そこでこの配列を用いてアンチセンス効果を検

討した。その結果、試験管内でチミンに反応した 2'-OMe 型インテリジェント核酸は、天然型の 2'-OMeRNA に比べ標的の蛋白質発現を効率的に阻害することに成功した。

③新規インテリジェント核酸の合成

前年度に合成した第 2 世代インテリジェント核酸を 2'-OMeRNA に組み込んだ結果、中性条件では反応が進行しなくなった。そこで今年度、新しいインテリジェント核酸として、グアニンに対して反応性を示すことを期待したインテリジェント核酸の合成を開始した。その結果、このインテリジェント核酸を組み込んだオリゴヌクレオチドの合成に成功した。

(E)「松村」グループ

①脳腫瘍モデルへの抗腫瘍効果

平成 22 年度は、脳腫瘍モデル(ヒト膠芽腫株 U87MG 5×10^5 個を 6-8 週齢のヌードマウス右脳に同所移植)に対する高分子ミセル型ナノデバイス(PEG-疎水基-PAsp(DET))を用いた抗腫瘍効果を検討した(20 μ g の pDNA を尾静脈より投与)。治療用遺伝子として sFlt-1 を用い、対照群として HEPES、緑色蛍光タンパク質(GFP)発現 pDNA、および抗体医薬である bevacizumab 投与群を用いた。抗腫瘍効果はリアルタイム in vivo イメージングシステム(IVIS システム)を用いた腫瘍細胞由来の生体発光強度の測定、および治療に伴う生存率の変化を指標に評価した。副作用の評価指標として体重変化を用いた。一連の実験は 2 回に渡って施行した。結果として、抗腫瘍効果の指標とした生体発光において sFlt-1 遺伝子投与群は negative control である GFP 遺伝子投与群、および HEPES 投与群との比較で有意な抑制効果は無く、生存期間の延長も認められなかった(図1A)。体重変化については他群との有意差はなく明らかな毒性は認められなかった。

②肝がんモデルへの抗腫瘍効果

平成 22 年度は、肝細胞がんモデル(ヒト肝細胞がん株 HepG2 5×10^6 個を 6-8 週齢の SCID マウス肝左下葉に同所移植)に対する高分子ミセル型ナノデバイス(PEG-疎水基-PAsp(DET))を用いた抗腫瘍効果を検討した(33 μ g の pDNA を開腹下に腫瘍へ局所投与)。治療用遺伝子として sFlt-1 を用い、対照群として HEPES、GFP 発現 pDNA、および bevacizumab 投与群をおいた。抗腫瘍効果は IVIS システムを用いた腫瘍細胞由来の生体発光強度の測定、および治療に伴う生存率の変化を指標に評価した。副作用の評価指標として体重変化を用いた。結果として、脳腫瘍の実験と同様に、抗腫瘍効果の指標とした生体発光において sFlt-1 遺伝子投与群は negative control である GFP 遺伝子投与群、および HEPES 投与群との比較で有意な抑制効果は無く、生存期間の延長も認められなかった(図1B)。体重変化については他群との有意差はなく明らかな毒性は認められなかった。

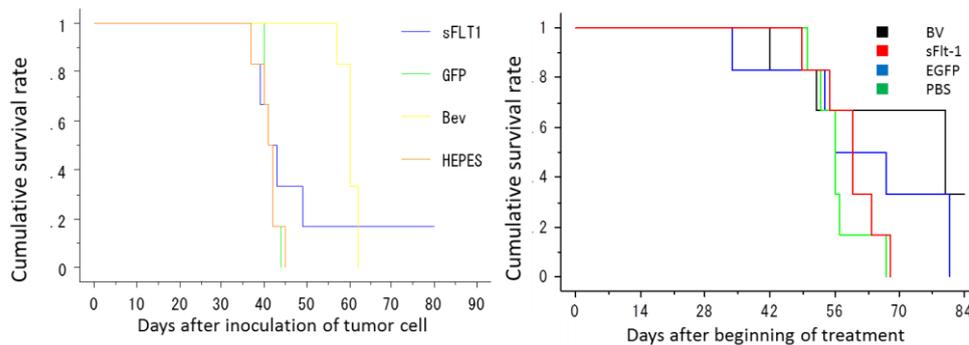


図1. sFlt-1遺伝子投与に伴う生存率の変化
A 脳腫瘍移植モデル、B 肝がん移植モデル

今回の実験における遺伝子投与量においては sFlt-1 ミセル型ナノデバイスによる抗腫瘍効果は認められなかった。本実験での治療対象とした脳腫瘍、肝がんは血管豊富な腫瘍であり VEGF の発現も高い。VEGF に対する中和作用を発揮するためには sFlt-1 の発現が相対的に不足した可能性が高い。腫瘍組織への遺伝子導入効率を高めるために腫瘍間質特異抗体、腫瘍細胞関連抗体のミセル体への付加も有用な方法であると考えられるため、現在抗マウス及び抗ヒト組織因子抗体を作製し、さらに F(ab)化(Fragment, antigen binding)を行っている。

(F)「斯波」グループ

①高分子ミセル型ナノデバイスを用いた経肺投与による遺伝子導入法の確立

経肺投与による高分子ミセル型ナノデバイスを用いた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* 遺伝子導入における条件検討を行ってきた。平成 21 年度までに、高分子ミセル型ナノデバイスとして、PEG-PAsp(DET) およびジスルフィド連結型ブロック共重合体からなる高分子ミセル型ナノデバイスを用いた遺伝子導入条件の最適化、PEG-PAsp(DET)を用いた遺伝子の *in vivo* 反復投与による遺伝子発現量の変化について検討した。平成 22 年度には、臨床応用に向けて、①遺伝子発現効率の上昇、効果の持続の試み、②安全性の確立のために炎症を出来る限り抑制するための試みを行った。遺伝子発現効率の上昇としては、オープンリーディングフレーム(ORF)以外の部位の CpG 配列も取り除いた pDNA を用いて遺伝子導入実験を行なった。アミン/リン酸モル比(N/P 比)=20 および 60 について、ルシフェラーゼ活性は 24 時間後がピークであること、N/P 比 20 に比べて 60 において発現量が極めて高いことが示された。TNF- α mRNA の発現量は、N/P 比 60 のもので 20 より有意に高く、コンドロイチン硫酸添加により低下を認めた。肺組織の病理組織学的観察では、CpG フリーの pDNA 投与により、N/P 比 60 では 3 日後まで炎症性変化を認めたが、7 日目には正常化していた。N/P 比 20 では、1 日後まで炎症性変化を認めたが、その程度は比較的軽いものであった。

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

平成 21 年度までの成果で、高分子ミセル型ナノデバイスを用いた経肺遺伝子導入による肺動

脈性肺高血圧症の治療実験に成功しており、さらに適応疾患を検討するために欧米で特に頻度が高く、予後が悪い重篤な疾患である嚢胞性線維症を対象として、治療への応用にむけた基礎実験を進めた。CF 患者由来気管上皮細胞において、正常気管上皮細胞に比べて CF transmembrane conductance regulator (CFTR) 遺伝子投入後の細胞の生存率の低下を認め、コンドロイチン硫酸添加にて、その毒性効果は消失した。嚢胞性線維症モデル動物として、CFTR ノックアウト(KO)マウスを Jackson Lab より購入して Specific pathogen free (SPF) 化し、当研究室でライン化した。このマウスは、約 1 年は生存できるように、小腸においてはヒト CFTR を発現するものである。肺における CFTR 遺伝子発現は認めず、PEG-PAsp(DET)を用いてヒト CFTR 遺伝子の導入が可能であった。CFTR 導入後の炎症性サイトカイン mRNA の発現は、コントロールベクター導入と比べ、有意に低下し、治療効果を認めた。

③嚢胞性線維症モデル動物の病態の基礎的検討

嚢胞性線維症モデル動物(CFTR-KO マウス)について、組織病理学的変化を観察したところ、肺において肺胞浸潤、肺胞の過形成を認め、肝臓においては脂肪変性や granuloma の存在を認めた。膵臓においては、限局性のリンパ球と好中球を主体とする細胞浸潤と軽度な出血が腺房組織に認め、その周辺にヘモンデリン様色素が観察された。尿管にタンパク円柱が多く観察され、腎臓への影響も示唆された。

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

平成 21 年度までの成果で、家族性高コレステロール血症に対する遺伝子治療法開発に向け、RNA レベルでは primer extension 法、蛋白レベルではウェスタンブロットティング法を用いて、アポリポプロテイン B 遺伝子発現修飾機能性核酸の in vitro 評価系を確立した。平成 22 年度において、佐々木グループから供給される機能性核酸を PEG-PAsp(DET)を用いて HepG2 細胞に導入して、上記方法を用いてアポリポプロテイン B 遺伝子発現の修飾作用を検討した。

⑤Apobec-1 ノックアウトマウスの病態解析

アポリポプロテイン B 遺伝子発現修飾機能性核酸の in vivo での機能解析のために、平成 21 年度に、Apobec-1 ノックアウトマウスを入手した。すなわち、マウスはヒトと異なり Apobec-1 が肝臓でも発現しているために、ApoB100とB48が肝臓において合成、分泌される。そのため、ApoBの RNA editing を評価するためには不適切である。そこで我々はアメリカから Apobec-1 ノックアウトマウスを入手して SPF 化作業を行ない、ライン化して病態の解析作業の準備を行っている。

(G)「岡本」グループ

①高分子ミセル型ナノデバイスを基盤とした吸入用ドライパウダーのアスパラギン酸重合度および N/P 比の最適化

レポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼをコードしたプラスミド DNA(pCAG-Luc)、ベクターとして PAsp(DET)または PEG-PAsp(DET)、賦形剤としてマンニトール(Man)、肺内送達を評価する色素としてインドシアニンググリーン(ICG)、粒子同士の付着凝集性の低下を目的にロイシン(Leu)を 5%添加した高分子ミセル型ナノデバイスドライパウダーを噴霧急速凍結乾燥(SFD)法により調製した。N/P 比については PAsp(DET)では 2、4、8、PEG-PAsp(DET)では 20、40、80 とし、アスパラギン酸重合度は PAsp(DET)で 49、54、68、PEG-PAsp(DET)で 54、62、89 を使用した。この結果、Man、ICG、Leu からなる製剤と同様、全て吸入剤に適した中空多孔な微粒子を得ることができた。カスケードインパクト法で吸入特性を評価したところ、PEG-PAsp(DET)製剤の空気力学的粒子径(MMAD)は $8.7 \mu\text{m}$ 、fine particle fraction(FPF)は 20%であったが、PAsp(DET)製剤では MMAD= $2.4 \mu\text{m}$ 、FPF=72%と極めて良好な値を示した。また、ゼータサイザーの測定結果から、pCAG-Luc と PAsp(DET) から成る複合体では調製前後でゼータ電位には大きな違いが見られないものの、平均粒子径が増大する製剤もあった。しかし、pCAG-Luc と PEG-PAsp(DET)から成る複合体では、ゼータ電位、平均粒子径とも大きな違いが確認されなかった。調製した各遺伝子粉末吸入剤を水で再溶解し、*in vitro* 遺伝子導入効果を評価した。この結果、PAsp(DET)製剤では遺伝子導入効果が減弱しているものの、PEG-PAsp(DET)製剤では PAsp(DET)製剤の遺伝子導入効果はある程度保持されていた。このことから PEG の保護効果により PEG-PAsp(DET)製剤は SFD 調製過程の物理的ストレスを回避していることが示唆された。以上、ゼータサイザーと *in vitro* 遺伝子導入評価の結果からは、PEG-PAsp(DET)を基盤とすることで、ドライパウダー製剤化後も高分子ミセル型ナノデバイスによる遺伝子導入効果が十分に保持されていると推察された。

超臨界二酸化炭素晶析法での微粒子調製を行った。SFD 製剤と同じ処方溶液(ただしロイシンを含まない)を用いることで、微粒子製剤を得ることができた。しかし、製剤再溶解後の複合体粒子径が増大した。再溶解液を用いた *in vitro* 遺伝子導入効率は、PEG-PAsp(DET)製剤では溶液とほぼ同程度であったものの、PAsp(DET)製剤では溶液の 1/100 程度まで低下した。

②高分子ミセル型ナノデバイスドライパウダーによる遺伝子肺送達

In vitro 遺伝子導入評価において導入効果が高かった重合度 62 の PEG-PAsp(DET) (N/P=40)の溶液および製剤をマウス肺内投与した。また、比較のために PAsp(DET)の中で最も *in vitro* 遺伝子導入効果が高かった重合度 68 (N/P=4)のポリマーを用いた溶液および製剤を投与した。投与後の *in vivo* 遺伝子導入効果については、リアルタイム *in vivo* イメージングシステム(IVIS)を用いてルシフェラーゼによる発光を経時的に定量するとともに、ICG 由来の蛍光強度により個々のマウスにおける製剤肺内送達量のばらつきを補正する「dual imaging 法」で評価した。この結果、*in vitro* 評価結果とは異なり、*in vivo* では PAsp(DET)により PEG-PAsp(DET)に匹敵する遺伝子発現が得られた。また、PAsp(DET)では投与後 6 hr ~ 12 hr に、PEG-PAsp(DET)では 24-30hr で最大発光値を示すことが明らかとなった。これら遺伝子製剤をマウス肺内に投与し、パルスオキシメータで酸素飽和度、心拍数、呼吸数を追跡したところ、有意

な変化は認められなかった。また、微粒子製剤を投与したマウス肺の組織切片観察でも障害性はほとんど認められなかった。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

- A-1. A. Kimura, H. Inose, F. Yano, K. Fujita, T. Ikeda, S. Sato, M. Iwasaki, T. Jinno, K. Abe, S. Fukumoto, Y. Takeuchi, H. Itoh, T. Imamura, H. Kawaguchi, U. Chung, J. F. Martin, S. Iseki, K. Shinomiya, S. Takeda, “Runx1 and Runx2 cooperate during sternum morphogenesis”, *Development* **137** (6) 1159-1167 (2010) (DOI: 10.1242/dev.045005)
- A-2. W. Kim, Y. Yamasaki, W. -D. Jang, K. Kataoka, “Thermodynamics of DNA condensation induced by poly(ethylene glycol)-block-polylysine through polyion complex micelle formation”, *Biomacromolecules*. **11** (5) 1180-1186 (2010) (DOI: 10.1021/bm901305p)
- A-3. L. F. Fröhlich, M. Mrakovcic, R. Steinborn, U. Chung, M. Bastepe, H. Jüppner, “Targeted deletion of the Nesp55 DMR defines another Gnas imprinting control region and provides a mouse model of autosomal dominant PHP-Ib”, *Proc. of Nat. Acad. of Sci.* **107** (20) 9275-9280 (2010) (DOI: 10.1073/pnas.0910224107)
- A-4. T. Saito, A. Fukai, A. Mabuchi, T. Ikeda, F. Yano, S. Ohba, N. Nishida, T. Akune, N. Yoshimura, T. Nakagawa, K. Nakamura, K. Tokunaga, U. Chung, H. Kawaguchi, “Transcriptional regulation of endochondral ossification by HIF2A during skeletal growth and osteoarthritis development”, *Nat. Med.* **16** (6) 678-686 (2010) (DOI: 10.1038/nm.2146)
- A-5. H. -J. Kim, A. Ishii, K. Miyata, Y. Lee, S. Wu, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, “Introduction of stearyl moieties into a biocompatible cationic polyaspartamide derivative, PAsp(DET), with endosomal escaping function for enhanced siRNA-mediated gene knockdown”, *J. Control. Release*. **145** (2) 141-148 (2010) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.03.019)
- A-6. A. Matsumoto, H. Cabral, N. Sato, K. Kataoka, Y. Miyahara, “Assessment of tumor metastasis via direct determination of cell membrane sialic acid expression”, *Angew. Chem. Int. Ed.* **49** (32) 5494-5497 (2010) (10.1002/anie.201001220)
- A-7. H. Hojo, S. Ohba, F. Yano, U. Chung, “Coordination of chondrogenesis and osteogenesis by hypertrophic chondrocytes in endochondral bone development”,

- J. Bone and Miner. Metabol.* **28** (5) 489-502 (2010) (DOI: 10.1007/s00774-10-0199-7)
- A-8. H. Hojo, F. Yano, S. Ohba, K. Igawa, K. Nakajima, Y. Komiyama, A. Kan, T. Ikeda, T. Yonezawa, J. Woo, T. Takato, K. Nakamura, H. Kawaguchi, U. Chung, "Identification of oxytetracycline as a chondrogenic compound using a cell-based screening system", *J. Bone Miner. Metabol.* **28** (6) 627-633 (2010) (DOI: 10.1007/s00774-10-0199-7)
- A-9. M. Kumagai, T. K. Sarma, H. Cabral, S. Kaida, M. Sekino, N. Herlambang, K. Osada, M. R. Kano, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Enhanced In vivo Magnetic Resonance Imaging of Tumors by PEGylated Iron Oxide-Gold Core-Shell Nanoparticles with Prolonged Blood Circulation Properties", *Macromol. Rapid Commun.* **31** (17) 1521-1528 (2010) (DOI: 10.1002/marc.201000341)
- A-10. S. Kaida, H. Cabral, M. Kumagai, A. Kishimura, Y. Terada, M. Sekino, I. Aoki, N. Nishiyama, T. Tani, K. Kataoka, "Visible-drug delivery by supra-molecular nanocarriers directing to single-platformed diagnosis and therapy of pancreatic tumor model", *Cancer Res.* **70** (18) 7031-7041 (2010) (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0303)
- A-11. T. Sakai, Y. Akagi, T. Matsunaga, M. Kurakazu, U. Chung, M. Shibayama, "Highly elastic and deformable hydrogel formed from tetra-arm polymers, *Macromol., Rapid Commun.* **31** (22) 1954-1959 (2010) (DOI: 10.1002/marc.20100028)
- A-12. Y. Mori, F. Yano, N. Shimohata, S. Suzuki, U. Chung, T. Takato. "Trehalose inhibits oral xerosis by protecting cell membrane", *Int. J. Oral and Maxillofacial Surg.* **39** (9) 916-921 (2010) (DOI: 10.1016/j.ijom.2010.04.047)
- A-13. Y. Matsumoto, T. Nomoto, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Watanabe, R. J. Christie, K. Miyata, M. Oba, T. Ogura, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, "Direct and instantaneous observation of intravenously injected substances using intravital confocal micro-videography", *Biomed. Opt. Express.* **1** (4) 1209-1216 (2010) (DOI: 10.1364/BOE.1.001209)
- A-14. T. -C. Lai, Y. Bae, T. Yoshida, K. Kataoka, G. -S. Kwon, "pH-Sensitive multi-PEGylated block copolymer as a bioresponsive pDNA delivery vector", *Pharm. Res.* **27** (11) 2260-2273 (2010) (DOI: 10.1007/s11095-010-0092-z)
- A-15. H. Takemoto, A. Ishii, K. Miyata, M. Nakanishi, M. Oba, T. Ishii, Y. Yamasaki, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Polyion complex stability and gene silencing efficiency with a siRNA-grafted polymer delivery system", *Biomaterials.* **31** (31) 8097-8105 (2010) (DOI: 10.1016/j.Biomaterials.2010.07.015)

- A-16. K. Osada, H. Oshima, D. Kobayashi, M. Doi, M. Enoki, Y. Yamasaki, K. Kataoka, "Quantized folding of plasmid DNA condensed with block cationer into characteristic rod structures promoting transgene efficacy", *J. Am. Chem. Soc.* **132** (35) 12343-12348 (2010) (DOI: 10.1021/ja102739b)
- A-17. M. Oba, K. Miyata, K. Osada, R. J. Christie, M. Sanjoh, W. Li, S. Fukushima, T. Ishii, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Kataoka, "Polyplex micelles prepared from ω -cholesteryl PEG-polycation block copolymers for systemic gene delivery", *Biomaterials*. **32** (2) 652-663 (2010) (DOI: 10.1016/j. Biomaterials. 2010.09.022)
- A-18. Y. Vachutinsky, M. Oba, K. Miyata, S. Hiki, M. R. Kano, N. Nishiyama, H. Koyama, K. Miyazono, K. Kataoka, "Antiangiogenic gene therapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles", *J. Control. Release*. **149** (1) 51-57 (2011) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.02.002)
- A-19. M. Murakami, H. Cabral, Y. Matsumoto, S. Wu, M. R. Kano, T. Yamori, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting", *Sci. Transl. Med.* **3** (64) 64ra2 (2011) (DOI: 10.1126/scitranslmed.3001385)
- A-20. R. Plummer, R. H. Wilson, H. Calvert, A. V. Boddy, M. Griffin, J. Sludden, M. J. Tilby, M. Eatock, D. G. Pearson, C. J. Ottley, Y. Matsumura, K. Kataoka, T. Nishiya, "A Phase I clinical study of cisplatin-incorporated polymeric micelles (NC-6004) in patients with solid tumours", *Br. J. Cancer* **104** (4) 593-598 (2011) DOI: 10.1038/bjc.2011.6
- A-21. F. Pittella, M. Zhang, Y. Lee, H.-J. Kim, T. Tockary, K. Osada, T. Ishii, K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, "Enhanced endosomal escape of siRNA- incorporating hybrid nanoparticles from calcium phosphate and PEG-block charge conversional polymer for efficient gene knockdown with negligible cytotoxicity", *Biomaterials* **32** (11) 3106-3114 (2011) DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.12.057
- A-22. T. Nomoto, Y. Matsumoto, K. Miyata, M. Oba, S. Fukushima, N. Nishiyama, T. Yamasoba, K. Kataoka, "In situ quantitative monitoring of polyplexes and polyplex micelles in the blood circulation using intravital real-time confocal laser scanning microscopy", *J. Control. Release* (in press) DOI: 10.1016/j.jconrel. 2011.02.011
- A-23. X. Li, Y. Tsutsui, T. Matsunaga, M. Shibayama, U. Chung, T. Sakai, "Precise control and prediction of hydrogel degradation behavior", *Macromolecules* (in press) DOI : 10.1021/ma2004234

- B-1-1. Y. Yamada, T. Nomura, H. Harashima, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, "Intranuclear DNA Release is a Determinant of Transfection Activity for a Non-viral vector: Biocleavable Polyrotaxane as a Supramolecularly Dissociative Condenser for Efficient Intranuclear DNA Release", *Biol. Pharm. Bull.* **33** (7) 1218-1222 (2010) (DOI: 10.1248/bpb.33.1218)
- B-1-2. J. Yamauchi, Y. Hayashi, K. Kajimoto, H. Akita, H. Harashima, "Comparison between a multifunctional envelope-type nano device and lipoplex for delivery to the liver", *Biol. Pharm. Bull.* **33** (5) 926-929 (2010) (DOI: 10.1248/bpb.33.926)
- B-1-3. S. Yusuke, H. Hatakeyama, H. Harashima, "Ornithine and tryptophan analogs as efficient polycations for siRNA delivery to tumor cells", *Biol. Pharm. Bull.* **33** (7) 1246-1249 (2010) (DOI: 10.1248/bpb.33.1246)
- B-1-4. M. Ukawa, H. Akita, T. Masuda, Y. Hayashi, T. Konno, K. Ishihara, H. Harashima, "2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (MPC)-coating improves the transfection activity of GALA-modified lipid nanoparticles by assisting the cellular uptake and intracellular dissociation of plasmid DNA in primary hepatocytes", *Biomaterials* **31** (24) 6355-6362 (2010) (DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.031)
- B-1-5. H. Akita, K. Kogure, R. Moriguchi, Y. Nakamura, T. Higashi, T. Nakamura, S. Serada, M. Fujimoto, T. Naka, S. Futaki, H. Harashima, "Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: Programmed endosomal escape and dissociation", *J Control Release* **143** (3) 311-317 (2010) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.01.012)
- B-1-6. M. Tamaru, H. Akita, T. Fujiwara, K. Kajimoto, H. Harashima, "Leptin-derived peptide, a targeting ligand for mouse brain-derived endothelial cells via macropinocytosis", *Biochem Biophys Res Commun.* **394** (3) 587-592 (2010) (DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.03.023)
- B-1-7. H. Akita, K. Enoto, T. Masuda, H. Mizuguchi, T. Tani, H. Harashima, "Particle Tracking of Intracellular Trafficking of Octaarginine-modified Liposomes: A Comparative Study With Adenovirus", *Mol Ther.* **18** (5) 955-964 (2010) (DOI: 10.1038/mt.2010.33)
- B-1-8. H. Ochiai, H. Harashima, H. Kamiya, "Positive feedback system provides efficient and persistent transgene expression", *Mol. Pharm.* **7** 1125-1132 (2010) (DOI: 10.1021/mp1000108)
- B-1-9. H. Kamiya, H. Goto, G. Kanda, Y. Yamada, H. Harashima: "Transgene expression efficiency from plasmid DNA delivered as a complex with histone H3", *Int. J. Pharm.* **392** 249-253 (2010) (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.035)

- B-1-10. J. Miyazaki, K. Kawai, T. Kojima, T. Oikawa, A. Joraku, T. Shimazui, A. Nakaya, I. Yano, T. Nakamura, H. Harashima, H. Akaza, "The liposome-incorporating cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guein can directly enhance the susceptobolity of cancer cells to ltmphokine-activated killer cells through up-regulation of NKG2D ligands", *BJU international* 2010 in press
- B-1-11. R. Furukawa, Y. Yamada, M. Takenaga, R. Igarashi, H. Harashima, "Octaarginine-modified liposomes enhance the anti-oxidant effect of Lecithinized superoxide dismutase by increasing its cellular uptake", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* in press
- B-1-12. D. Mudhakar, H. Akita, and H. Harashima. "Topology of octaarginines (R8) or IRQ ligand on liposomes affects the contribution of macropinocytosis- and caveolae-mediated cellular uptake", *Reactive and Functional Polymers* 71; 340-343 (2011)
- B-1-13. SM. Shaheen, H. Akita, A. Yamashita, R. Katoono, N. Yui, V. Biju, M. Ishikawa, H. Harashima. "Quantitative analysis of condensation/decondensation status of pDNA in the nuclear sub-domains by QD-FRET", *Nucleic Acids Res.* 2011 in press
- B-1-14. H. Hatakeyama, E. Ito, M. Yamamoto, H. Akita, Y. Hayashi, K. Kajimoto, N. Kaji, Y. Baba, H. Harashima, "A DNA microarray based analysis of the host response to a non-viral gene carrier: a strategy for improving the immune response", *Mol. Ther.*, (2011) in press (DOI:10.1038/mt.2011.24)
- B-1-15. H. Hatakeyama, H. Akita, E. Ito, Y. Hayashi, M. Oishi, Y. Nagasaki, R. Danev, K. Nagayama, N. Kaji, H. Kikuchi, Y. Baba, H. Harashima, "Systemic delivery of siRNA to tumors using a lipid nanoparticle containing a tumor-specific cleavable PEG-lipid", *Biomaterials*, 2011 in press
- B-2-1. K. Kigasawa, K. Kajimoto, S. Hama, A. Saito, K. Kanamura, K. Kogure, "Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat", *Int. J. Pharm.* **383** 157-160 (2010) (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.08.036)
- B-2-2. K. Kigasawa, K. Kajimoto, T. Nakamura, S. Hama, K. Kanamura, H. Harashima, K.Kogure, "Noninvasive and efficient transdermal delivery of CpG-oligodeoxynucleotide for cancer immunotherapy", *J. Control. Release* in press. (DOI:10.1016/j.jconrel.2011.01.018)
- B-2-3. K. Kajimoto, M. Yamamoto, M. Watanabe, K. Kigasawa, K. Kanamura, H. Harashima, K. Kogure, "Noninvasive and persistent transfollicular drug

- delivery system using a combination of liposomes and iontophoresis”, *Int. J. Pharm.* **403** 57-65 (2011) (DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.10.021)
- C-1. S. Tomita, L. Ito, H. Yamaguchi, G. Konishi, Y. Nagasaki, K. Shiraki, “Enzyme switch by complementary polymer pair system (CPPS)”, *Soft Matter* **6** (21) 5320-5326 (2010) (DOI: 10.1039/c000930)
- C-2. Y. Ikeda, D. Kubota, Y. Nagasaki, “Simple solid-phase synthesis and biological properties of carbohydrate-oligonucleotide conjugates modified at the 3'-terminus”, *Bioconjug. Chem.* **21** (9) 1685-1690 (2010) (DOI: 10.1021/bc100205v)
- C-3. N. Kanayama, K. Yamaguchi, Y. Nagasaki, “PEGylated polymer micelle-based nitric oxide (NO) photodonor with NO-mediated antitumor activity”, *Chem. Lett.* **39** (9) 1008-1009 (2010) (DOI: 10.1246/cl.2010.1008)
- C-4. A. Tamura, Y. Nagasak, “Smart siRNA delivery systems based on polymeric nano-assemblies and nanoparticles”, *Nanomedicine* **5** (7) 1089-1102 (2010) (DOI: 10.2217/nnm.10.76)
- C-5. A. Tamura, M. Oishi, Y. Nagasaki, “Efficient siRNA delivery based on PEGylated and partially quaternized polyamine nanogels: enhanced gene silencing activity by the cooperative effect of tertiary and quaternary amino groups in the core”, *J. Control Release* **146** (3) 378-387 (2010) (DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.05.031)
- C-6. K. Yoshimoto, M. Nishio, H. Sugasawa, Y. Nagasaki, “Direct observation of adsorption-induced inactivation of antibody fragments surrounded by mixed-PEG layer on a gold surface”, *J. Am. Chem. Soc.* **132** (23) 7982-7989 (2010) (DOI: 10.1021/ja910372e)
- C-7. S. Ganguli, Y. Keitaro, S. Tomita, H. Sakuma, T. Matsuoka, K. Shiraki, Y. Nagasaki, “Improving the heat resistance of ribonuclease A by the addition of poly(N,N-diethylaminoethyl methacrylate)-graft-poly(ethylene glycol) (PEAMA-g-PEG)”, *Macromol. Biosci.* **10** (8) 853-859 (2010) (DOI: 10.1002/mabi.200900432)
- C-8. T. Nakamura, A. Tamura, H. Murotani, M. Oishi, Y. Jinji, K. Matsuishi, Y. Nagasaki, “Large payloads of gold nanoparticles into the polyamine network core of stimuli-responsive PEGylated nanogels for selective and noninvasive cancer photothermal therapy”, *Nanoscale* **2** (5) 739-746 (2010) (DOI: 10.1039/B9NR00329K)
- C-9. M. Oishi, Y. Nagasaki, “Stimuli-responsive smart nanogels for cancer diagnostics and therapy”, *Nanomedicine* **5** (3) 451-468 (2010) (DOI: 10.2217/nnm.10.18)
- C-10. H. Furusho, M. Oishi, T. Kishi, A. Yasumori, Y. Nagasaki, “Preparation and molecular recognition of SERS probe based on gold nanoparticles constructed from PEG-oligoamine copolymer possessing a coumarin group between PEG and

- oligoamine”, *Chem. Lett.* **39** (1) 52-53 (2010) (DOI: 10.1246/cl.2010.52)
- C-11. Y. Ikeda, R. Suzuki, T. Yoshitomi, Y. Nagasaki, “Novel oligonucleotide carrier as scavenger for reactive oxygen species”, *Macromol. Biosci.* **11**, 344-351(2011) (DOI: 10.1002/mabi.201000305)
- C-12. P. Chonpathompikunlert, J. Han, K. Toh, I. Hiroko, Y. Nagasaki, “TEMPO protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell toxicity”, *Eur. J. Pharmacol.* **650** 544-549. (2010). (DOI:10.1016/j.ejphar.2010.10.028)
- C-13. A. Marushima, H. Tsurusima, T. Yoshitomi, K. Toh, A. Hirayama, Y. Nagasaki, A. Matumura, “Newly synthesized radical-containing nanoparticles (RNP), enhance neuroprotection after cerebral ischemia-reperfusion injury”, *Neurosurgery* accepted
- C-14. Y. Nagasaki, “Engineering of PEG tethered chain surface for high performance bionanoparticles”, *Science and Technology of Advanced Materials*, **11**(5),054505 (2010). (DOI:10.1088/1468-6996/11/5/054505)
- D-1-1. Y. Taniguchi, A. Nitta, S. M. Park, A. Kohara, T. Uzu, S. Sasaki, “The ODN probes conjugating the Cu(II) complex enhance the luminol chemiluminescence by assembling on the DNA template”, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (24), 8614-8617 (2010). DOI: 10.1016/j.bmc.2010.10.007
- D-1-2. I. Doi, G. Tsuji, K. Kawakami, O. Nakagawa, Y. Taniguchi, S. Sasaki, “The Spermine-Bisaryl Conjugate as a Potent Inducer for the B to Z-DNA Transition”, *Chem. Eur. J.* **16** (39), 11993-11999 (2010). DOI: 10.1002/chem.201000947
- D-1-3. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, “Activation and Alteration of Base Selectivity by Metal Cations in the Functionality-Transfer Reaction for RNA Modification”, *Bioconjugate Chem.* **21** (8), 1508-1512 (2010). DOI: 10.1021/bc100131j
- D-1-4. Z. Li, O. Nakagawa, Y. Koga, Y. Taniguchi, S. Sasaki, “Synthesis of New Derivatives of 8-oxoG-Clamp for Better Understanding the Recognition Mode and Improvement of Selective Affinity”, *Bioorg. Med. Chem.* **18** (11), 3992-3998 (2010). DOI: 10.1016/j.bmc.2010.04.025
- D-1-5. Y. Taniguchi, Y. Kurose, T. Nishioka, F. Nagatsugi, S. Sasaki, “The Alkyl-Connected 2-Amino-6-Vinylpurine (AVP) Crosslinking Agent for Improved Selectivity to the Cytosine”, *Bioorg. Med. Chem.*, **18** (8). 2894-2901 (2010). DOI: 10.1016/j.bmc.2010.03.008
- D-1-6. K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, “A New Usage of Functionalized

- Oligodeoxynucleotide Probe for Site-Specific Modification of a Guanine Base within RNA”, *Nucleic Acids Res.* **38** (5), 1760-1766 (2010). DOI: 10.1093/nar/gkp930
- D-1-7. K. Onizuka, A. Shibata, Y. Taniguchi, S. Sasaki, “Pin-Point Chemical Modification of RNA with Diverse Molecules through the Functionality Transfer Reaction and Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition Reaction”, *Chem. Commun.*, 2011, published on line, DOI: 10.1039/C1CC10582E
- D-2-1. S. Imoto, T. Hori, S. Hagihara, Y. Taniguchi, S. Sasaki, F. Nagatsugi, “Alteration of cross-linking selectivity with the 2'-OMe analogue of 2-amino-6-vinylpurine and evaluation of antisense effects”. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **20** 6121-6124 (2010)
- E-1. J. Kuroda, J. Kuratsu, M. Yasunaga, Y. Koga, T. Sugino, Y. Matsumura, “Antitumor Effect of NK012, SN-38 Incorporating Polymeric Micelle on U87MG Orthotopic Glioblastoma in Mice Compared with Irinotecan in Combination with Bevacizumab”, *Clin Cancer Res.* **15;16** (2) 521-9 (2010) (DOI: 1078-0432.CCR-09-2393 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-09-2393)
- E-2. H. Kenmotsu, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, A. Takahashi, T. Nagano, K. Goto, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura, “The antitumor activity of NK012, a SN-38 incorporating micelle, in combination with bevacizumab against lung cancer xenografts”, *Cancer*, October **1** 4597-4604 (2010) (DOI: 10.1002/encr.25233)
- E-3. T. Nagano, M. Yasunaga, K. Goto, H. Kenmotsu, Y. Koga, J. Kuroda, Y. Nishimura, T. Sugino, Y. Nishiwaki, Y. Matsumura, “Synergistic Antitumor Activity of the SN-38-Incorporating Polymeric Micelles NK012 with S-1 in a Mouse Model of Non-Small Cell Lung Cancer”, *Int J Cancer.* **127** (11) 2699-2706 (2010) (DOI: 10.1002/ijc.25282)
- E-4. S. Fujisawa, H. Arakawa, R. Suzuki, M. Kazuo, T. Kodama, M. Yasunaga, Y. Koga, Y. Matsumura, “Optimum conditions of ultrasound-mediated destruction of bubble liposome for siRNA transfer in bladder cancer”, *Therapeutic Delivery* **1** (2) 247-255 (2010) (DOI: 10.4155/tde.1023)
- E-5. A. Takahashi, N. Ohkohchi, M. Yasunaga, J. Kuroda, Y. Koga, H. Kenmotsu, T. Kinoshita, Y. Matsumura, “Detailed distribution of NK012, an SN-38 incorporating micelle, in the liver and its potent antitumor effects in mice bearing liver metastases”, *Clin Cancer Res.* **16** (19) 4822-4831 (2010) (DOI: 1078-0432.CCR-10-1467 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-10-1467)
- E-6. T. Hamaguchi, T. Doi, T. Eguchi-Nakajima, K. Kato, Y. Yamada, Y. Shimada, N. Fuse, A. Ohtsu, S. Matsumoto, M. Takanashi, Y. Matsumura, “Phase I Study of

- NK012, a Novel SN-38-Incorporating Micellar Nanoparticle, in Adult Patients with Solid Tumors”, *Clin Cancer Res* **16** (20) 5058-5066 (2010) (DOI: 1078-0432.CCR-10-0387 [pii] 10.1158/1078-0432.CCR-10-0387)
- F-1. L. Kang, Y. Tachibana, W. Kamata, A. Mahara, M. Harada-Shiba, T. Yamaoka, “Liver-Targeted siRNA delivery by polyethylenimine (PEI)-pullulan carrier”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **18** 3946-3950 (2010) (DOI: 10.1016/j.bmc.2010.04.031)
- F-2. M. Harada-Shiba, T. Sugisawa, H. Makino, M. Abe, M. Tsushima, Y. Yoshimasa, T. Yamashita, Y. Miyamoto, A. Yamamoto, H. Tomoike, S. Yokoyama, “Impact of statin treatment on the clinical fate of heterozygous familial hypercholesterolemia”, *J Atheroscler Thromb* **17** 667-674 (2010)
- F-3. K. Harada, Y. Miyamoto, H. Morisaki, N. Ohta, I. Yamanaka, Y. Kokubo, H. Makino, M. Harada-Shiba, A. Okayama, H. Tomoike, T. Okumura, Y. Saito, Y. Yoshimasa, T. Morisaki, “A novel Thr56Met mutation of the autosomal recessive hypercholesterolemia gene associated with hypercholesterolemia”, *J. Atheroscler Thromb* **17** 131-140 (2010)
- G-1. K. Mohri, T. Okuda, A. Mori, K. Danjo, H. Okamoto, “Optimized pulmonary gene transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation”, *J. Controlled Release*, **144** (2), 221-226 (2010), DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.02.018
- G-2. D. Hira, T. Okuda, D. Kito, K. Ishizeki, T. Okada, H. Okamoto, “Inhalation performance of physical-mixed dry powders evaluated with a simple simulator for human inspiratory flow patterns”, *Pharm. Res.*, **27**(10), 2131-2140 (2010), DOI: 10.1007/s11095-010-0215-6
- G-3. H. Okamoto, K. Shiraki, R. Yasuda, K. Danjo, Y. Watanabe, “Chitosan- interferon- β gene complex powder for inhalation treatment of lung metastasis in mice”, *J. Controlled Release*, **150**, 187-195 (2010), DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.12.006

(4-2) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 16 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 64 件)