

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「医療に向けた化学・生物系分子を利用
したバイオ素子・システムの創製」
研究課題「細胞対話型分子システムを用いる
革新的遺伝子送達概念の創製」

研究終了報告書

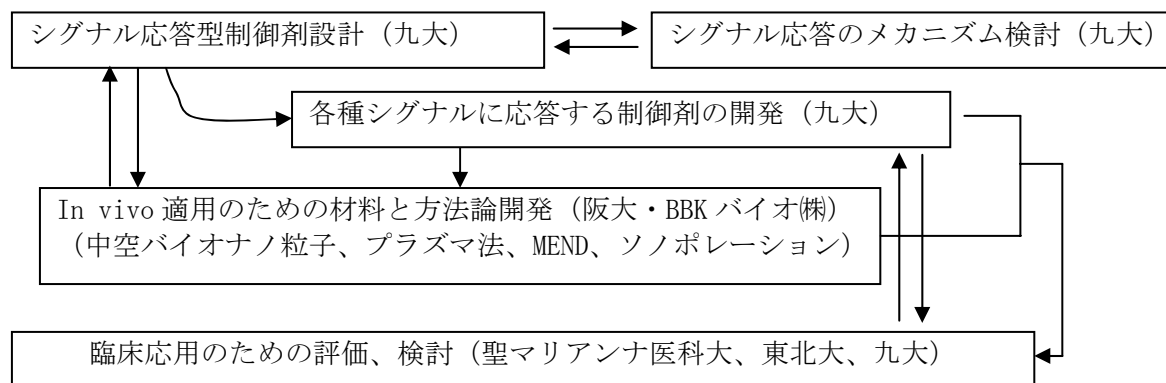
研究期間 平成15年10月～平成20年 3月

研究代表者：片山 佳樹
(九州大学大学院工学研究院
応用化学部門、教授)

1 研究実施の概要

本研究では、現行の遺伝子治療で解決できない最も重要な問題点である、細胞特異性の問題を解決する、新しい概念として、標的疾患細胞で特異的に亢進している細胞内シグナルに応答して、そこでだけ遺伝子を発現させる分子システムを構築し、その有効性を実証することを目的とした。

そこで、目標達成のために、基礎から応用まで必要な要素ごとに、以下の図のような項目を検討していくことで、最終目標に迫ることとした。



まず、標的疾患として、がん、ウイルス疾患、循環器疾患を設定し、これに対応するシグナルとして、プロテインキナーゼ A、プロテインキナーゼ C、I- κ -キナーゼ、Src、Rho キナーゼ、カスパーゼ、HIV プロテアーゼ、HTLV プロテアーゼ、HCV プロテアーゼを選んだ。これらに効果的に応答する遺伝子制御剤を開発するためには、まず、応答メカニズムを明らかにしつつ、それを踏まえてキャリアー設計の指針を確立した。それにより、各シグナルに応答する遺伝子制御剤を開発し、性能を無細胞系、細胞、in vivo で評価した。これらの成果は、直ちに遺伝子制御剤設計、各種遺伝子制御剤開発にフィードバックした。また、in vivo 適用のために、本分子システムを内包するキャリアーの開発、および内包手法の開発、プラズマ法、ソノポレーションなどの方法を検討し、開発したキャリアーと組み合わせて、実用的方法論の開発を試みた。以下、各項目を踏まえた成果ごとに、実施内容と成果を述べる。

1. 開始時に見出していた遺伝子制御剤を用いた細胞内での遺伝子制御に成功

まず、開始時に基質ペプチドをポリアクリルアミドにグラフトした高分子が、基本的に標的シグナルで遺伝子の転写を制御できることを、無細胞系で明らかにしていたため、プロテインキナーゼとプロテアーゼに対応するものとして、プロテインキナーゼ A とカスパーゼ-3 に応答する高分子を用いて、細胞系での遺伝子制御を検討した。いずれも、ポリカチオンとしての性質により遺伝子と複合体を形成し、遺伝子の転写を高効率に抑制し、前者はキナーゼによる基質のリン酸化で、後者は、プロテアーゼによるカチオン性ペプチド部分の切除により、カチオン性が減弱して、遺伝子を開放して転写を活性化する。まず、カスパーゼ3に関しては、側鎖のカチオン性ペプチド部分を、種々変化させたところ、遺伝子制御にはカチオン性部分は電荷が重要であって、アミノ酸配列は自由に変化できることがわかった。ただし、細胞透過型で知られるオリゴアルギニン、タンパクの合成過程を阻害することが分かった。そこで、そのような悪影響のない、細胞透過型ペプチドとして Tat ペプチドを組み込んだ制御剤を開発したところ、**遺伝子との複合体を培養細胞に導入でき、実際にスタウロスポリン刺激で細胞内のカスパーゼ-3 を活性化した場合のみ、遺伝子を発現できることに成功した。**また、プロテインキナーゼ A 応答型システムにおいては、まず、後述する中空バイオナノ粒子への封入モデルとして、センダイウイルスのエンベロップに遺伝子複合体を封入して細胞へ導入した。効率は高くないものの、**細胞への複合体導入に成功し、フォルスコリン刺激により細胞内プロテインキナーゼ A が亢進した場合のみ、遺伝子を発現させることに成功した。**また、多くの刺激剤で刺激後の本システムによる遺伝子発現プロファイルは、レポーター遺伝子を用いて評価した細胞内のプロテインキナーゼ A の活性プロファイルと完全に一致した。さらに、リン酸化サイトであるセリン残基をアラニンに変換したネガティブコントロールポリマーでは、一切の刺激によらず

遺伝子を発現しなかったことから、**本遺伝子制御が確かに細胞内プロテインキナーゼ A によるものであることを実証**した。また、カスパーゼ3に応答するシステムにおいても、後述する Tat を付加したシステムで細胞にレポーター遺伝子を導入し、スタウロスポリン刺激後の細胞内カスパーゼの活性と、レポーター遺伝子発現量の計測結果から、遺伝子発現は細胞内カスパーゼ3活性と完全に一致しており、**確かに細胞内カスパーゼ 3 により遺伝子が制御できる事を実証**した。

2. 遺伝子制御剤設計指針を確立

遺伝子制御剤の設計指針確立は、以下の目的のために必要である。

- (i) 本遺伝子制御剤を多くの標的シグナルに適用し、概念を一般化するため
- (ii) 中空バイオナノ粒子への封入のため

(i) については、例えば、キナーゼの基質には、アニオン性配列を要求するものがあり、本システムではカチオン性ペプチドを必要とするため、この問題をクリアせねばならない。そこで、Src および I- κ -キナーゼというアニオン性基質を要求するキナーゼに**応答する制御剤を対象に、この問題に対してアプローチした**。すなわち、基質配列に対してリンカーを介することも含め、様々な位置にリンジン残基を付加して、総荷電をカチオン性に見たところ、基質能力を損なうことなく、全体をカチオン性にするのが可能であることを見出した。これにより、**アニオン性基質要求キナーゼに対して、応答可能な制御剤を設計することに成功した**。

(ii) に関しては、より小さな複合体を形成する必要があるため、主鎖高分子の疎水性を変化させた。その結果、主鎖の疎水性を増大させると、複合体の平均粒径を約 100nm と、アクリルアミド型の約半分にするに成功した。しかし、この複合体は、ナノカプセルに封入するために必要な、高塩濃度では凝集する傾向にあった。この問題に関しては、PEG をグラフトすることで解決できることも見出し、**安定、かつ小さな複合体を実現**することに成功した。

3. 遺伝子制御メカニズムの解明に成功し、細胞における遺伝子制御の新しいモデルを提唱

本遺伝子制御メカニズムについては、不思議な点があった。すなわち、遺伝子の転写抑制は、DNA 鎖が高分子制御剤のカチオン性ペプチド側鎖と相互作用することによって RNA ポリメラーゼのアクセスを阻害するためであるが、一方、DNA と相互作用しているカチオン性ペプチドには、シグナル酵素は問題なくアクセスするという点である。この問題は、実際のゲノム遺伝子制御において、DNA 鎖がヒストンのカチオン性テールと相互作用して RNA ポリメラーゼアクセスを禁止しているにもかかわらず、このヒストンテールにヒストンアセチルトランスフェラーゼが問題なくアクセスして、転写を開始するという現象と同じ問題であり、これを解明することは、実際の遺伝子転写制御に対する問題にアプローチすることにもなる。

まず、カスパーゼ-3 応答型システムで、ホタルルシフェラーゼ遺伝子との複合体に、大過剰のウミホタルルシフェラーゼ遺伝子を添加したところ、一切、ホタルルシフェラーゼの発現は見られず、この複合体が非常に交換不活性な安定な複合体であることが分かった。ゼータ電位と動的光散乱計測より、この複合体の表面荷電は、カチオン性であるものの、その値は、予想される値よりもかなり小さく、複合体表面を中性の高分子主鎖が覆っていることが予想され、この表面を覆う高分子の立体障害が遺伝子転写の高効率な抑制や、ポリアニオンとの交換不活性である原因であると予想された。一方、プロテインキナーゼ A とカスパーゼ-3 応答型システムを用いて、どの程度基質が反応すれば複合体が崩壊するかを評価したところ、複合体の崩壊は、複合体の総荷電が相殺された直後に起こることが明らかになった。すなわち、遺伝子・高分子複合体の総荷電が非常に重要であることを見出した。

ここで、Src 応答型や I- κ -キナーゼ応答型システムにおいて、基質ペプチド側鎖のリン酸化を³²P-ATP を用いて評価したところ、驚くべきことに、基質の反応性は、DNA と結合することにより全く減弱しないばかりか、ある場合にはむしろ向上することが明らかとなった。また、非常に興味深いことが、蛍光顕微鏡による 1 分子観察によって明らかとなった。Src 応答型システムにおいて、複合体は Src 添加によるペプチド側鎖のリン酸化が進行すると崩壊するが、崩壊する直前の粒子で、粒子の拡散係数、すなわち運動性が急激に上昇した。また、その際の複合体内の DNA 鎖の運動性が

急激に増大し、このことが粒子の運動性を増大させたと考えられた。顕微鏡視野内での塩基英道の結果より、この運動性が向上は、粒子全体の表面荷電がゼロとなった時点であった。また、その時点で複合体上に転写産物であるメッセンジャーRNA が観察でき、さらに、RNA ポリメラーゼと同様に DNA 鎖をスライドする必要のある制限酵素のアクセスも可能になることが分かった。これらの事実は、**遺伝子の転写が DNA 鎖の運動性に支配**されていることを強く示唆するものである。本高分子が転写を効率よく抑制できるのは、DNA 鎖の運動を効率よく抑え込むためであると考えられる。電荷が中和した時点で、DNA 鎖の運動を抑制できなくなり転写が開始すると考えられる。これまで、生体分子の相互作用においても、小分子と同様の結合モードで制御が理解されてきたが、未解決の部分も多かった。この結果は、巨大分子同士の相互作用や認識には、**分子の揺らぎが重要であることを示唆しており、生体機能制御の新しいモデルが提唱できる**と期待している。

4. これまで不可能であった各種特異基質の開発に成功

遺伝子制御剤の設計に加え、本概念で細胞特異性を確保するために最も重要であるのが、グラフトする基質ペプチドの標的シグナルに対する特異性である。しかし、シグナルに対して特異的な基質はそれほど多くない。そこで、**独自の基質スクリーニング用ペプチドアレイを開発**し、ペプチドライブラリを用いて探索し、さらに、アミノ酸配列を最適化することで、標的シグナルに極めて特異的な基質を探索できるシステムを確立した。これを用いて、これまで開発は不可能とされてきた、**プロテインキナーゼ C の α 、 β 、 η サブタイプにそれぞれ特異的な基質の開発に成功**した。特に、 α 特異基質に関しては、各種担がんマウスにおいて、正常組織ではリン酸化されず、がん組織でのみリン酸化されることを確認した。これらは、本概念のがんへの適用を可能にし、さらに新たな診断法や創薬の可能性も開いた。また、これもこれまで存在しなかった **ROCK I と II それぞれに特異的な基質の開発にも成功**し、これらは循環器疾患への適用を可能にする。

5. 種々の細胞内シグナルに応答するキャリアーの開発に成功した

遺伝子制御剤の設計指針が確立したので、各標的シグナルに応答する遺伝子制御剤の開発を行い、プロテインキナーゼに関しては、プロテインキナーゼ A 応答型に加え、**がんに対するプロテインキナーゼ C α 、炎症性疾患(がん、ウイルス疾患、循環器疾患)に対する I- κ -キナーゼ、循環器疾患、がんに対する Src、循環器疾患に対する Rho キナーゼ、プロテアーゼに対しては、カスパーゼに加え、ウイルス疾患に対する、HIV プロテアーゼ、HTLV プロテアーゼ、コクサッキーウイルスプロテアーゼに対する各遺伝子制御剤の開発に成功した。**

6. 各遺伝子制御剤の評価において、細胞内、in vivo での制御に成功

前項で開発した各種キャリアーを評価し、**プロテインキナーゼ C α 、I- κ -キナーゼ、Src に関しては、細胞にマイクロインジェクションで導入し、細胞内で完璧に遺伝子制御できることを確認**できた。プロテインキナーゼ C α に関しては、がん由来細胞内で遺伝子を発現できる一方、ネガティブコントロールポリマーや、阻害剤処理細胞では遺伝子発現はなかった。また、I- κ -キナーゼに関しては、TNF α や LPS などの炎症性刺激を加えた場合のみ、遺伝子発現させることに成功し、Src に関しては、がん細胞で発現できる一方、リン酸化サイトのチロシン残基をフェニルアラニンに置換したネガティブコントロールポリマーでは、遺伝子発現は起こらなかった。また、各種ウイルスプロテアーゼ、および、Rho キナーゼに関しては、無細胞系で遺伝子制御が可能であることを確認した。

さらに、プロテインキナーゼ C α に関しては、**担がんマウスを用いた評価で、正常組織では遺伝子が発現しない一方、実際にがん組織で特異的な遺伝子の発現に成功した。**これは、細胞内シグナルで標的細胞特異的な遺伝子発現を in vivo で成功した初めての例であり、本概念の実用化に極めて大きな成果であった。

また、循環器系疾患の評価用に、血管炎症部位を特異的に認識して検出できる造影剤を開発し、また、当該部位への送達手段のモデル系として、ナノカプセルに薬物を内包しての投与法を確立した。

7. In vivo 用キャリアーの開発で、中空バイオナノ粒子、プラズマ法、ソノポレーション法に成功

(最終的な細胞特異的遺伝子制御の方法論実現に成功)

中空バイオナノ粒子は、B 型肝炎ウイルスのエンベロップタンパクと脂質から構成されるナノ中空粒子であり、本研究では、まず、その大量調製法を確立した。さらに、本遺伝子制御剤と遺伝子の複合体を内包させる手法として、還元法、ソノポレーション、エレクトロポレーション法、リポソーム法を検討し、最終的に当該複合体をリポソームで被覆してからバイオナノ粒子とインキュベートすることで内包できることを見出した。さらに、本手法により、プロテインキナーゼ C α 応答型システムを内包し、担がんマウスに投与したところ、ヒト肝臓がん由来の腫瘍組織にのみ遺伝子発現が効率よく起こり、ヒト大腸がん由来の腫瘍組織には発現が起らなかった。すなわち、本手法では、人の肝臓という組織特異性をナノカプセルが担い、さらに、肝臓内の正常細胞とがん細胞は、シグナル応答型遺伝子制御系で確保するという、**ダブルセキュリティシステム**が可能であり、**本研究の最終目標である、真に細胞特異的な遺伝子治療システムの原型を実現することに成功したこと**になる。また、標的臓器としては、肝臓だけでなく、遺伝子改変により抗体を担持できるzz粒子の開発に成功し、坑 EGF レセプター抗体を結合した、**上皮細胞標的型ナノカプセルの開発にも成功した**。

また、複合体をがん組織に局注して、ソノポレーション(超音波法)を試み、こちらも、まだ基礎的な結果ながら、腫瘍組織において、プロテインキナーゼ C α 応答型と、そのネガティブコントロールの間で、遺伝子発現の明確な差を作ることに成功しており、本手法も、細胞内シグナル応答型システムの in vivo 適用法として期待が持てる。

プラズマ法に関しては、当初、10cm シャーレでのみ、細胞に導入が可能であったが、順次、プラズマ発生装置の小型化を検討し、24mm シャーレ用の開発成功を経て、最近になって、**ペンシル型の小型発生プローブの開発に成功した**。この装置であれば、in vivo に適用可能であり、例えば、がん摘出手術後の周辺部位への、本遺伝子制御システムの投与が可能となり、手術で取りきれない腫瘍に対して、大きな効果が期待できる。

以上のように、本研究において、当初予定した細胞内シグナルを用いる、標的細胞特異的遺伝子治療システムは、その設計法、概念の一般化、各種対象シグナルに対する制御剤開発、それらの細胞内での遺伝子制御、さらに、がんにおいては、in vivo でのがん特異的な遺伝子発現法の確立に成功し、当初の予定を十分にクリアしたと考えている。さらには、本手法は、PET をしのぐ、がんなど疾患のイメージング法としても画期的であり、今後、各種基質探索用ペプチドアレイも組み合わせれば、**診断と治療、創薬を一体化でき、真のテーラーメイド医療を確立できる、一つの大きな医療システムとして確立できるのではないかと**、期待している。また、遺伝制御のメカニズム検討より、実際のゲノム遺伝子制御や、タンパク間相互作用による機能発現などにおける、分子の運動性支配という、全く新しい仮説も提唱できそうであり、**基礎科学としても新しい分野を切り開ける可能性**が出てきた。

2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

本件急のコンセプトは、疾患細胞のみで特異的に導入遺伝子を発現させる事の出来る、真に細胞特異的な遺伝子治療法の創製にあり、さらに、その実現のために、疾患細胞内で特異的に亢進している細胞内シグナルを利用するという、従来用いられてきた細胞表面のマーカーによる認識(アクティブターゲティング)とは本質的に異なる遺伝子制御・送達概念を創造する事である。細胞は、絶えず変化する外界からの情報を受容して、これに応答する事でその生命を正常に維持している。したがって、疾患とは、その情報処理過程が異常をきたした状態であると定義できる。そうであれば、その異常になった情報処理過程を、正常細胞と異常細胞を見分ける鍵とすることは、細胞認識に上で最も理にかなったものであるといえる。そこで、本研究の目的としては、がん、ウイルス疾患、循環器疾患、炎症(炎症はすべての疾患に適用可能な対象である)を対象疾患とし、それらで標的となりうる細胞内シグナルを設定し、これに応答して遺伝子発現を惹起させうる分子システムを開発し、それが実際に細胞内や体内で作動可能である事を実証し、最終的には、ion vivo に適用可能なシステムとして確立して、疾患細胞特異的遺伝子治療法の基礎を確立することである。

その目的を達成するためには、標的細胞内シグナルの受け手である基質ペプチドをカチオン性とし、これを中性高分子にグラフトした、高分子型遺伝子制御剤を開発し、これが実際に細胞内や生体内で遺伝子制御剤として働きうる事を実証し、ついで、これを種々の設定した標的シグナル応答型システムへと拡張するため、その制御機構を明らかにし、設計指針を確立していく事を研究の前半の主目的とした。この指針を利用しつつ、特異的基質を開発しながら、種々のシグナルに応答するシステムを開発していき、さらには、in vivo に適用するための、種々の手法の開発を進めて、これと、シグナル応答型システムを組み合わせる方法、および、その評価を行い、さらには、動物での評価系の確立を行って、最終目標である、細胞特異的遺伝子治療法の基礎確立へと向かった。本研究の実施に当たっては、大まかには、各項目は、個々の研究グループが受け持ったが、互いに密接に関連しあっており、各グループは、別個に研究を行うのではなく、全体でひとつの研究室であるかのごとく、常に連携して、項目にこだわらず、フレキシブルに技術を出し合って、研究を進めることとした。

まず、本研究構想の中核である、遺伝子制御剤の創製と基礎評価、遺伝子制御メカニズム検討、種々のシグナル応答型システムの開発に関しては、片山グループが取り組んだ。すなわち、まず、研究開始当初に見出していた、プロテインキナーゼ A とカスパーゼ3応答型の遺伝子制御能を有するペプチド-高分子コンジュゲートを用い、細胞での遺伝子制御能を評価した。さらに、その遺伝子制御能を、制御剤と遺伝子のコンプレックスの物性、反応性、1 分子観察の手法などから解明し、分子設計の基本指針を確立するとともに、アニオン性基質を要求するシグナルに対しても適用可能な方法を模索して概念の一般化を行った。また、メカニズム解明の過程で、細胞における遺伝子転写制御における重要な新しいモデルの創出にも成功した。さらにこの設計指針を利用して、各種シグナルに応答する遺伝子制御剤を合成して、基礎評価を行った。また、これら制御剤の細胞での評価は、東海林グループが中心となり、細胞内在性の異常シグナル、あるいは薬物刺激時の応答、阻害剤処理時や、ネガティブコントロールの応答評価を詳細に行って、細胞内での標的シグナル応答を実証した。これにより、本概念が一般性をもって、細胞特異的な遺伝子制御に適用可能である事を示し、実用化への道筋をつけた。

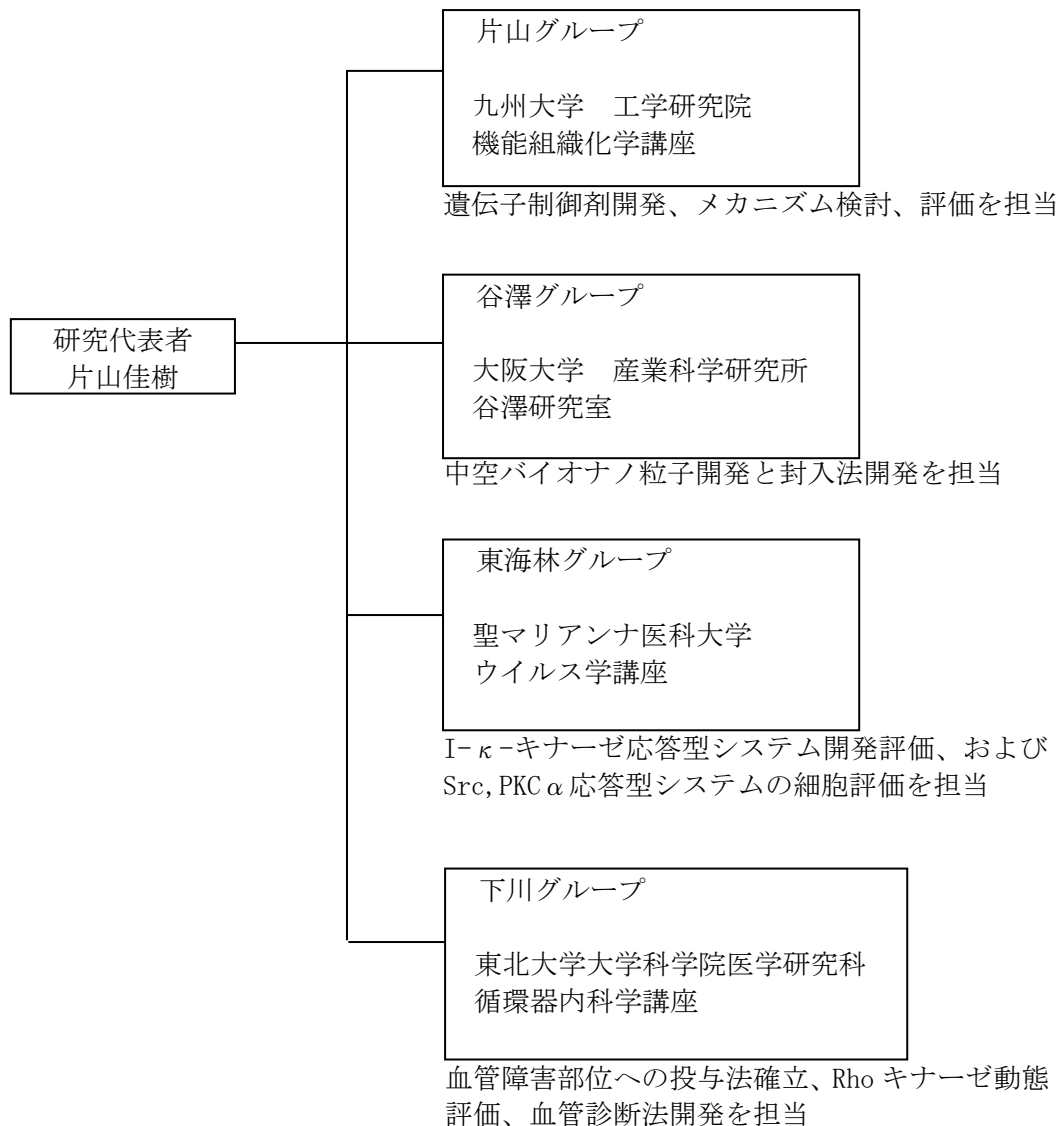
一方、in vivo への適用のためには、本遺伝子制御システム(すなわち、制御高分子・遺伝子複合体)を効率よく、組織細胞に運ぶための手法が必要である。これに関しては、いくつかの手法を平行して検討した。その中で、B 型肝炎ウイルスのエンベロップタンパクからなる、中空バイオナノ粒子の開発と、本システムへの適用に関しては、谷澤グループが中心となって行った。すなわち、まず、中空バイオナノ粒子の大量調製法を確立するとともに、本粒子内への複合体の封入法を検討し、確立した。また、本来、ヒト肝臓細胞へのターゲティング能を有する粒子を遺伝子改変し、抗体を担持させることで、他の細胞への標的化を可能として、本概念の臨床応用に重要な成果を得た。また、プラズマを用いて細胞内に遺伝子を導入できる手法を開発していた片山グループの BBK バイオを中心とするグループでは、プラズマ型遺伝子導入装置を、従来の大型シャーレによる細胞への導入装置を小型化して、小型シャーレや、マイクロタイタープレートにも適用できるようにし、さらに、ペンシル型装置を開発して、in vivo への適用に道筋をつけた。さらに、片山グループは、本領域の CREST 研究プロジェクト(リーダー:片岡教授)のメンバーである、北海道大学の原島教授のグループと共同で、MEND(脂質分子からなるナノカプセル)への、複合体の封入を検討して、初歩的な成果ながら、細胞レベルでのシグナル応答性遺伝子制御を可能とした。これらの他にも、片山グループでは、超音波を用いて遺伝子を組織に導入するソノポレーションや、パルス電圧を用いるエレクトロポレーションの適用に関しても検討し、成果を挙げた。

これらのシステムを臨床応用するための評価系の確立としては、循環器系疾患の評価系に関しては、下川グループが中心となって、動脈硬化モデル、バルーン障害モデルを確立するとともに、ナノ粒子の血管炎症部位への送達実験系、および、障害部の評価のための、新規な血管造影剤の開発を行った。また、血管障害部位での標的シグナルである、Rho キナーゼの評価を実施して、遺伝子制御のために必要な条件を抽出した。ウイルス疾患に関しては、東海林グループが中心となり、ウイルス感染の評価系として NO を利用したアッセイ法、および、ウイルス感染細胞での導入遺伝子の動態を評価した。

これらの検討を通じて、単に疾患ごとに画一の基質を用いる方法からさらに発展して、個々人に

おける最適基質を開発する事により、真のテイラーメイド遺伝子治療法の確立が可能である事が示唆され、基質の迅速な探索のために片山グループがペプチドアレイ法を開発して、これまで不可能とされた種々の新規基質の開発を行い、テイラーメイド医療システムの開発を可能にしている。さらには、ガン特異的な遺伝子発現を *in vivo*(マウス)で成功したが、これと、開発した有用基質を組み合わせ、治療用遺伝子の代わりにレポーター遺伝子を用いる事で、PET に勝る疾患診断システムも開発できることが明らかになりつつあり、今後は、診断、創薬、治療が一体となった、まったく新しいテイラーメイド医療システムの創製に向かって、研究を推進しつつある。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

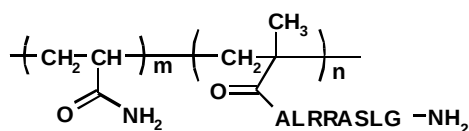
3.1 遺伝子制御剤の開発と、その基礎評価、メカニズム解析 (九州大学 片山グループ)

(1)研究実施内容及び成果

遺伝子制御剤の細胞内での遺伝子転写制御の実証

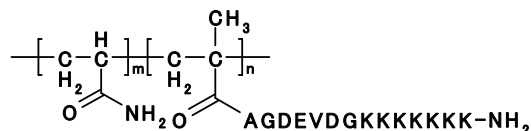
研究開始時に、プロテインキナーゼ A カスパーゼ 3 に応答する 2 つの系において、カチオン性ペプチドをグラフトとしたポリアクリルアミド型高分子を用いて、無細胞の系では、遺伝子発現が制御できるという知見を得ていた。そこで、この遺伝子制御が実際に生細胞中でも可能であるかどうかをまず実証しなければならなかった。そこで、まず、平成15年度に、プロテインキナーゼ A 応答型の PAK を用いて細胞への遺伝子導入を検討した。しかしながら、この高分子は複合体を形成した遺伝子を細胞内へ導入する事は不可能であった。そこで、最終的な in vivo 用キャリアーの中空バイオナノ粒子のモデルとして、センダイウイルスのエンベロップに封入して、細胞への導入を試みた。その結果、NHI3T3 細胞において、細胞をフォルスコリン処理して細胞内プロテインキナーゼ A を活性化した場合のみで、GFP の発現が見られた。これは、本システムが細胞内で実際に遺伝子を

(a) PAK



Peptide content 2.60 mol%

(b) CPCC



Peptide content 6.18 mol%

図 1-1 プロテインキナーゼ A 応答型 (PAK) とカスパーゼ 3 応答型 (CPCC) の構造

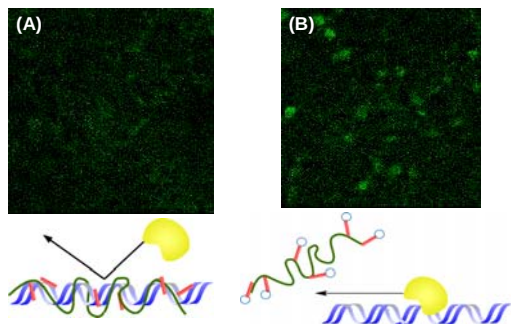
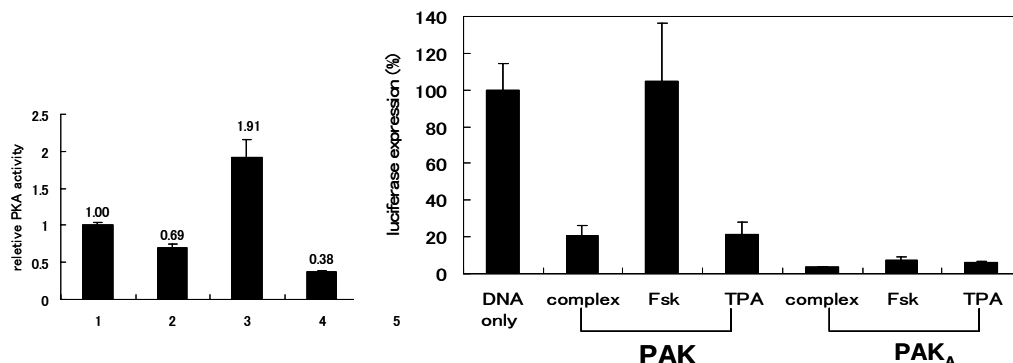


図 1-2 細胞内におけるプロテインキナーゼ A 応答型の遺伝子制御

(A) 無刺激、(B) フォルスコリン刺激時

制御する事を初めて示したものである。細胞内には、多くのプロテインキナーゼや、その他の酵素群があり、そのような複雑な環境化にあっても、標的のキナーゼに応答するという事は、非常に驚くべき事であった。さらに、平成16年度には、プロテインキナーゼ A 活性を、CRE プロモーターをもつレポーター遺伝子発現を用いて評価し、各種薬剤で刺激した時の、細胞内のプロテインキナーゼ A の活性プロファイル(図1-3の左)を得て、その際の本システムで遺伝子を導入した際の遺伝子発現量のプロファイル(図1-3の右)を



1;control 2;PACAP(10μM) 3;Fsk(50μM) 4;TPA(1μM) 5;Rottlerin(20μM)

図 1-3 各種薬物刺激時の細胞内 PKA 活性(左)と、遺伝子制御結果(右)

比較したところ、それが完全に一致した。一方、PAK において、プロテインキナーゼ A のリン酸化サイトであるセリン残基をアラニン残基に置換したネガティブコントロールポリマー PAK_A では、まったく薬物(それによって活性化するプロテインキナーゼ活性)に応答せず、これらの結果は、本遺伝子発現が、一義的に細胞内プロテインキナーゼ A の活性に依存している事を明確に実証する事が出来た。

さらに、細胞死のシグナルであるカスパーゼ3に応答する CPCC においては、キナーゼ応答型が、リン酸化に基づくアニオン荷電により制御剤のカチオン性を相殺するのと異なり、カチオン部分が切除されるため、無制限にカチオン残基を導入できるため、遺伝子との複合体がより強固であり、複合体単独である程度細胞内に入る事が分かった。平成15年度には、実際に GFP 遺伝子を CPCC を用いて細胞(NIH3T3 細胞)に導入してスタウロスポリン刺激して、細胞内のカスパーゼ3を亢進させたときにのみ遺伝子発現が起こる事を確認した。また、平成16年度には、生細胞での細胞内カスパーゼ3の活性と、CPCC を用いて導入したルシフェラーゼ遺伝子の発現の時間経過を同時計測したところ、両者が完全に一致し、プロテアーゼ応答系においても細胞内で、完璧に遺伝子転写制御が可能である事を実証した。

遺伝子制御剤設計指針の確立

本研究の目標である、細胞内シグナル応用型遺伝子制御システムの確立には、種々の標的シグナルに応答する制御剤開発や、in vivo における組織や細胞に適用する手段に適した物性の実現のため、一般性のある分子設計の指針を確立することが重要である。

当初得ていた制御剤と DNA の複合体は、平均粒径が 200 nm 前後と、後述する中空バイオナノ粒子に封入するには大きすぎ、また、時間とともに粒子同士が凝集していく傾向にあった。そこで、15 年度、16年度は、まず、遺伝子制御高分子と DNA の複合体の安定化と粒径を小さくすることを検討した。この時点で開発していた、プロテインキナーゼ A 応答型と、カスパーゼ 3 応答型の制御剤を用いて、複合体の荷電比や、主鎖の疎水性を変化させ、動的光散乱により粒径および、その時間変化を評価した。その結果、荷電比を上げても、平均粒径は変化せず、粒径分布が狭くなったが、主鎖の疎水性を上げると、平均粒径が小さくなり、例えば、主鎖をポリアクリルアミドから、ポリイソプロピルアクリルアミドに変化するだけで、相転移温度以上の37℃において、平均粒径は、約半分の 100 nm になる事が分かった。ただし、粒子の時間経過に伴う凝集は改善されなかった。

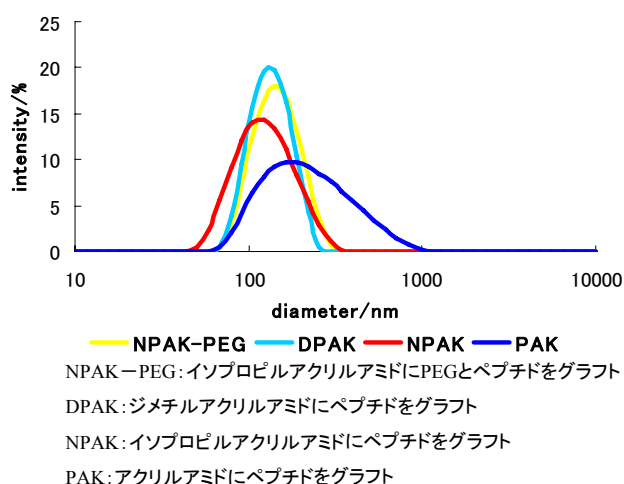


図1-4 制御剤分子構造と、複合体の粒径分布の関係

これに関しては、さらに、PEG 鎖をグラフトした3元共重合体を合成する事で解決した。すなわち、PEG 鎖を導入したものは、時間経過や塩濃度によらず、粒子の凝集は見られなかった。さらに、この程度の分子の変更では、無細胞系タンパク発現システムを用いた検討では、遺伝子の転写制御能には影響は見られなかった。

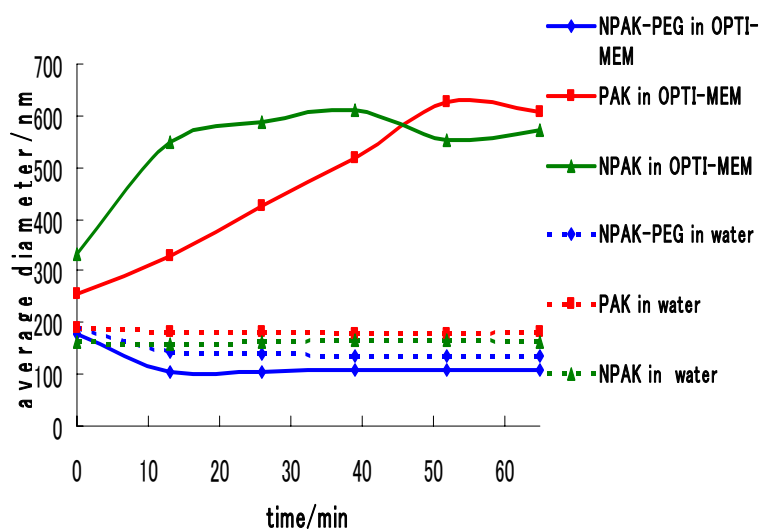


図 1－5 制御剤分子構造と、複合体粒子粒径の時間変化

さらに、細胞への導入能力を狙って、カスパーゼ3応答型制御剤において、高分子主鎖にグラフトする基質ペプチドに連結するカチオン性ペプチド部分の配列を、単純なカチオン性配列のオリゴジン、核移行シグナル、細胞膜透過能が知られる Tat 配列やオリゴアルギニンに変化した造影剤を合成して、遺伝子発現制御能と、その細胞への遺伝子複合体取り込み挙動を評価した。

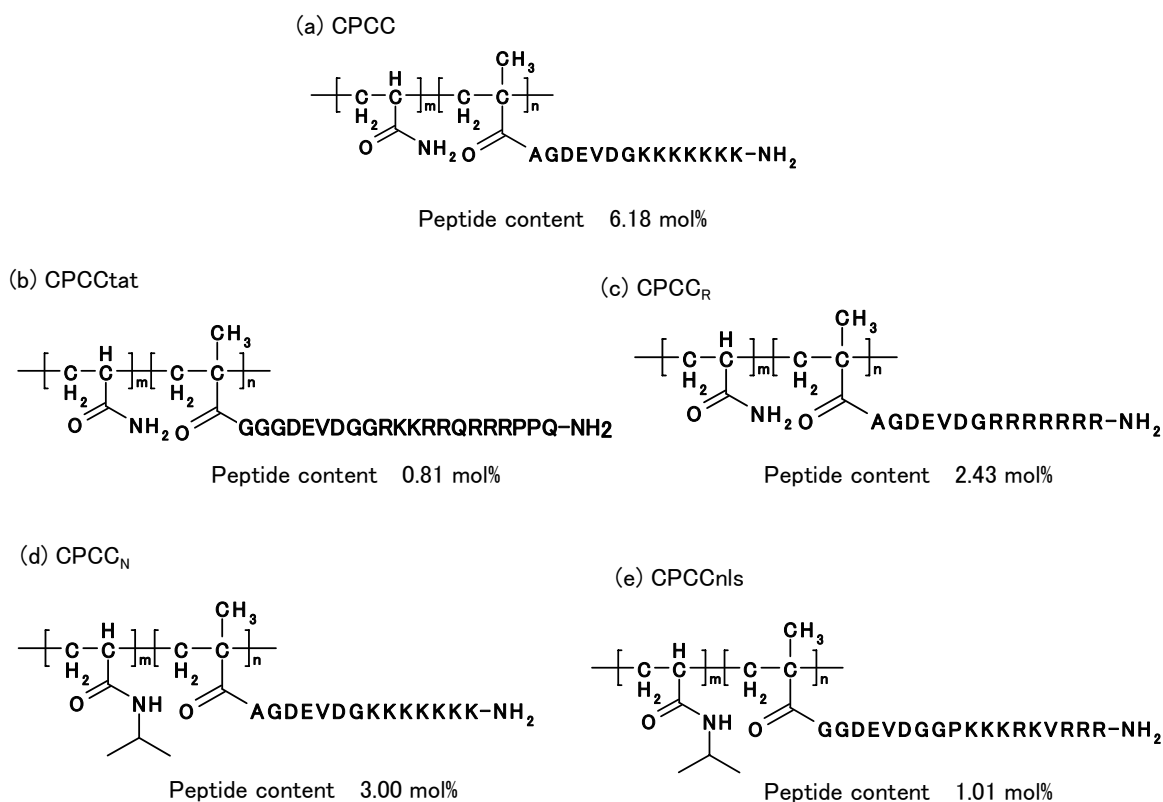


図 1－6 Caspase3 応答型遺伝子制御剤（CPCC 誘導体）の構造

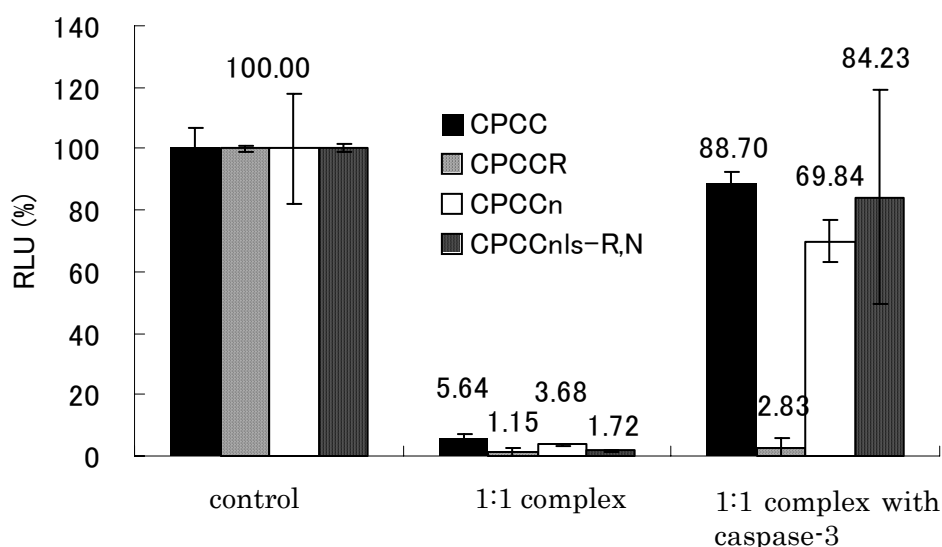


図 1-7 各種 CPCC 誘導体の無細胞系での遺伝子制御能

その結果、ペプチドのカチオン性部位の配列は、かなり自由に選んでも、遺伝子制御能に影響はない事が分かった。ただし、オリゴアルギニンに関しては、複合体系性で遺伝子の転写を高効率に抑制するものの、Caspase3 処理によっても遺伝子の発現は回復しなかった。これは、オリゴアルギニンが、タンパクの翻訳過程を阻害するからであると考えられた。そこで、それ以外の誘導体を用いて、レポーター遺伝子として GFP 遺伝子を用い、細胞への導入を検討した。主鎖が疎水性、あるいは、カチオン部位が細胞透過型である場合で、複合体として遺伝子を細胞内に導入可能であった。これは、プロテインキナーゼ A 応答型の結果を考慮すると、複合体が強固に凝集している疎水鎖が有利である事が分かる。また、細胞透過型ペプチドは、遺伝子との複合体の細胞への導入においても効果的であることが分かった。

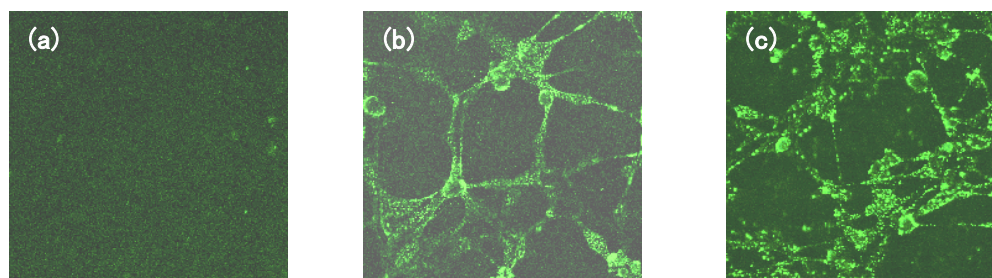


図 1-8 CPCC 誘導体による GFP 遺伝子の導入(発現はスタウロスポリン刺激による)
(a)CPCC、(b) CPCC_n、(c) CPCCtat

平成17年度になってくると、種々の標的シグナルに応答する制御剤の開発が実施が始まった。ここで問題となったのが、基質のカチオン荷電である。本概念では、制御剤は、グラフトしたペプチドのカチオン荷電により遺伝子と複合体を形成して、遺伝子転写を抑制する。したがって、用いる基質は、必ずカチオン性でなければならない。しかしながら、キナーゼには、アニオン基質を要求するものがあり、これを解決する必要が生じた。具体的には、本研究で選んだ、炎症性疾患特異的な I- κ -キナーゼや、循環器疾患やがんの特異的な Src は、アニオン性基質を要求する。これに関しては、本来のアニオン性基質配列を活かしつつ、そのアミノ末端側か、カルボキシル末端側に、直接、あるいはフレキシブルなリンカーを介してカチオン性残基であるリジンを導入して、全体としての荷電をカチオン性にすることを検討した。これに関しては、種々の標的シグナル応答型制御剤

の開発の項で詳述する。

本遺伝子制御システムの遺伝子転写制御メカニズムの解明と細胞の遺伝子制御モデルの創出

遺伝子キャリアーとしての高分子は、多種類のものが報告されている。いずれも、遺伝子と静電的に強固な複合体を形成するが、細胞内では遺伝子を放出して発現させるものばかりであり、本システムのように、標的シグナルのない状態では、たとえ細胞内に入っても遺伝子を発現させないものは存在しない。これは、本高分子型制御剤と遺伝子の複合体が、通常のポリカチオン型遺伝子キャリアーと遺伝子との複合体と本質的に異なる構造体を形成していることに起因していると考えられる。そこで、平成16年度からは、本複合体が通常のポリカチオン性キャリアーであるポリリジンと比較してどのように異なるのかをカスパーゼ3応答型である CPCC を用いて、平成17年度からjは Src 応答型制御剤も用いて検討した。

まず、これらの複合体の DNA 凝集能を、ポリリジンと比較するため、エチジウムブロミド排除実験を行った。エチジウムは、DNA にインターカレートして蛍光を発する色素であるが、DNA 鎖が凝集すると、追い出されるためにその分だけ蛍光が減少する。これを見積もったところ、カチオン荷電の大きな CPCC でさえ、その DNA 凝集能は、ポリリジンよりも弱い事が分かった。一方、カチオン荷電のより小さな Src 応答型制御剤(側鎖ペプチドの総荷電は+2、主鎖はポリアクリルアミド)では、DNA 鎖の凝集能は、ポリリジンとは比較にならないほど小さい事がわかった。本制御剤の DNA 鎖

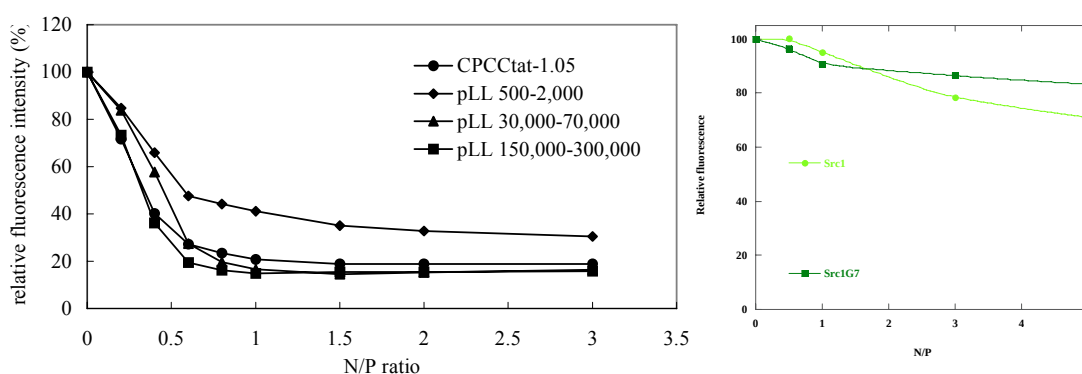


図1－9 CPCC とポリリジン(左)および Src 応答型制御剤の DNA 凝集能

凝集効果は、側鎖に導入したペプチド単独と DNA を混合したほうが大きく、高分子にグラフトしてポリカチオンとした事で返って弱くなっている。これは、中性の主鎖高分子が、静電相互作用しているペプチド部分と DNA の凝集を阻害している事を意味している。一方、遺伝子発現の抑制能は、本遺伝子制御剤のほうが強力で、側鎖ペプチドのカチオン荷電の多少にはほとんど依存せず、DNA との荷電比が0.5から1.0になると、溶液中での遺伝子発現抑制は、ほぼ完璧となった。一方、ポリリジンでは、相当する荷電比では遺伝子発現の抑制は不完全であった。一般に遺伝子の抑制は、ポリカチオンによる遺伝子の凝集(コンパクション)にあるといわれているが、それは正しくない事を意味している。

そこで、次に、高分子-DNA 複合体の表面電位(ζ 電位)と粒径を計測してみた。ポリリジンの場合、DNA との荷電比(カチオン/アニオン)をあげていくと、ζ 電位は、著しく正方向にシフトした。これに対し、カチオン荷電の大きな CPCC でも、ζ 電位の上昇は非常に小さく、荷電比2.0で、ポリリジンと DNA の複合体のζ 電位が27.41 mV であるのに対して、CPCC では僅かに8.74 mV であった(Table 1)。一方、さらに側鎖ペプチドのカチオン荷電の小さな Src 応答型制御剤では、ほとんどζ 電位は変化しなかった。これらの事実は、本遺伝子制御剤の場合は、DNA と静電複合体を形成した場合、表面の荷電をブロックしている事を意味している。これは、中性のポリマーの効果であると考えられる。事実、CPCC において、ペプチドのポリマー鎖あたりの含有率を上げすぎると、返って遺伝子発現の抑制が弱まってくることも分かった。すなわち、以上の事実を考え合わせると、本制御剤ポリマーの高度な遺伝子抑制効果は、中性の高分子に、側鎖としてオリゴカチオンがグラフトとされているという、特殊な構造に起因しており、その遺伝子発現抑制能は、主として中性高分子主鎖の立体効果であり、静電相互作用による DNA の凝集ではない事が分かる。この事実

Table1 Tris-HCl (pH7.5)中での DNA 複合体のζ 電位と粒径

N/P ratio	Diameter (nm)		Zeta potential (mV)	
	CPCctat-1.05	Poly-L-lysine	CPCctat-1.05	Poly-L-lysine
0.5	2034.0 ± 47.1	98.8 ± 3.5	-2.57 ± 0.06	-22.52 ± 0.89
1.0	388.5 ± 17.0	1097.3 ± 37.6	2.54 ± 0.16	2.17 ± 0.78
1.5	179.7 ± 7.6	159.1 ± 7.1	6.72 ± 0.37	12.97 ± 1.58
2.0	154.5 ± 5.0	76.6 ± 2.3	8.74 ± 0.29	27.41 ± 1.66

は、従来調べられてきた、ポリカチオンと DNA の相互作用とは本質的に異なるものである。

ここで、本研究開始当初から、常に不思議な点がある。本高分子型遺伝子制御剤は、カチオン性ペプチドを相互作用して DNA 鎖と複合体を作っている事は間違いない、この事によって、遺伝子転写は高効率に抑制される。すなわち、RNA ポリメラーゼのアクセスを阻害している。一方で、DNA と相互作用しているペプチドは、標的プロテインキナーゼや、プロテアーゼと容易に反応して複合体を崩壊して遺伝子転写を活性化させる。すなわち、これらの酵素のペプチドへのアクセスは、阻害されているように見えないという事である。これは、従来の分子間相互作用の観点からすると矛盾する事である。ここで、前述したように、本システムにおける遺伝子転写抑制は、カチオン性ペプチドにあるというよりも、むしろ中性高分子の立体効果にあるという事実を考え合わせると、あるいは、ナノ空間で考えるときには、ペプチドと DNA 鎖は、強固に(静的な意味では)相互作用していないのではないかと仮説が成り立つ。実際、溶液中でのポリアニオンであるヘパラン硫酸は、カルシウムイオンと極めて大きな結合定数で結合するが、溶液論での解析によると、その結合は、従来考えられていたような、複数の硫酸根によるキレートではなく、1:1のイオン対であることが分かっている。すなわち、ナノ空間では、硫酸根とカルシウムイオンは、相互作用しておらず、ただ、ポリアニオンの形成するアニオン場からカルシウムが逃れられないため、マクロな視点では、カルシウムは強固にポリアニオンに結合しているという報告がある。本システムでも、これに類似する事が起こっているのではないかと推察した。

そこで、平成18年からは、この問題の解明を試みた。まず、本制御剤ポリマーの側鎖基質ペプチドの標的酵素との反応性が、DNA と複合体を形成する前後でどのように変化するかを、Src 応答型ポリマーを用いて、Src による基質リン酸化を、³²P-ATP を用いて評価した。その結果、驚くべき事

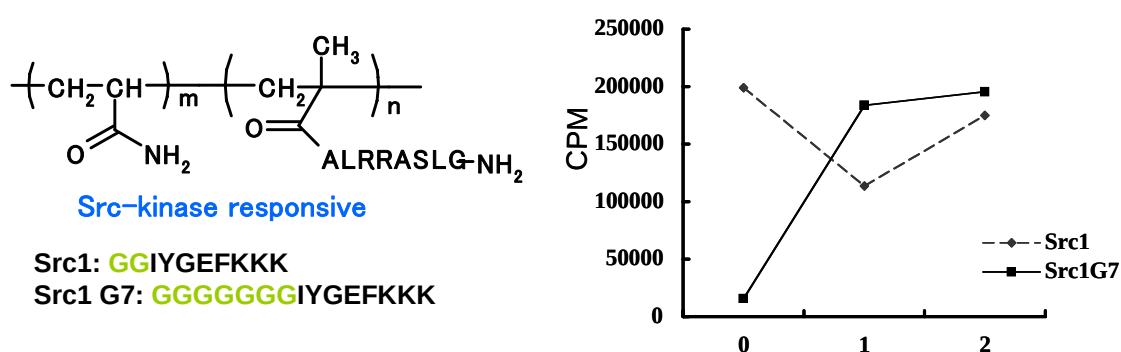


図 1-10 高分子型制御剤の DNA 複合体形成前後での側鎖ペプチドのリン酸化能の比較
反応1時間後でのリン酸化で比較。1:ポリマー単独、2:荷電比 1.0、3:荷電比 2.0

に、本ポリマーの側鎖ペプチドの反応性は、DNA 鎖との複合体形成によって減弱することなく、リンカーの長い Src1G7 では、むしろ DNA と複合体を形成したほうが、リン酸化能は向上するという結果となった。すなわち、本システムにおいては、静電複合体にもかかわらず、カチオン基質はまったく阻害されていないことになる。では、阻害される DNA 鎖のほうはどうなっているのだろうか、これを調べるために、DNA 鎖を蛍光色素 DAPI で標識し、蛍光顕微鏡視野で、複合体の挙動を観

察した。複合体に Src を添加してリン酸化反応を開始すると、DNA 鎖の運動が次第に激しくなり、ある時点で耐え切れなくなったかのように、一挙に複合体が崩壊した。ここで、各粒子の顕微鏡視野

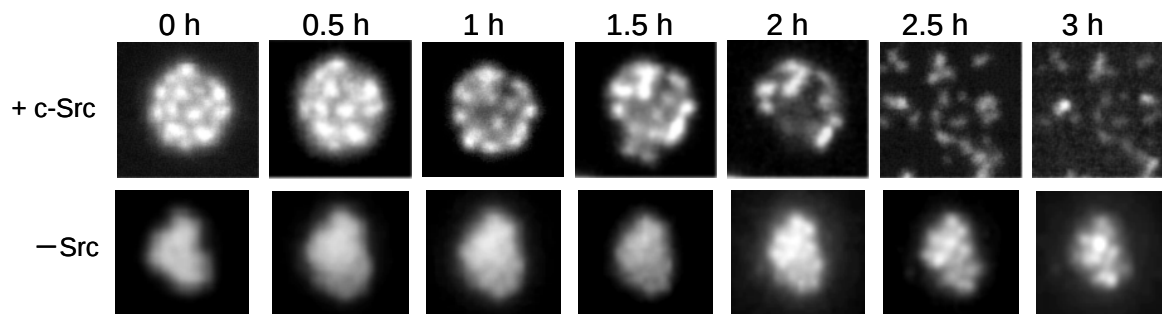


図 1-11 Src 応答型制御剤と DNA の複合体のリン酸化反応経過に伴う崩壊挙動の直接観察

内での運動(拡散係数)を計測すると、粒子が崩壊する少し前の時点(1. 5時間後辺り)で急に粒子の溶液内での運動性が上昇する事を見出した。顕微鏡視野内で、電圧をかけて粒子を泳動させ

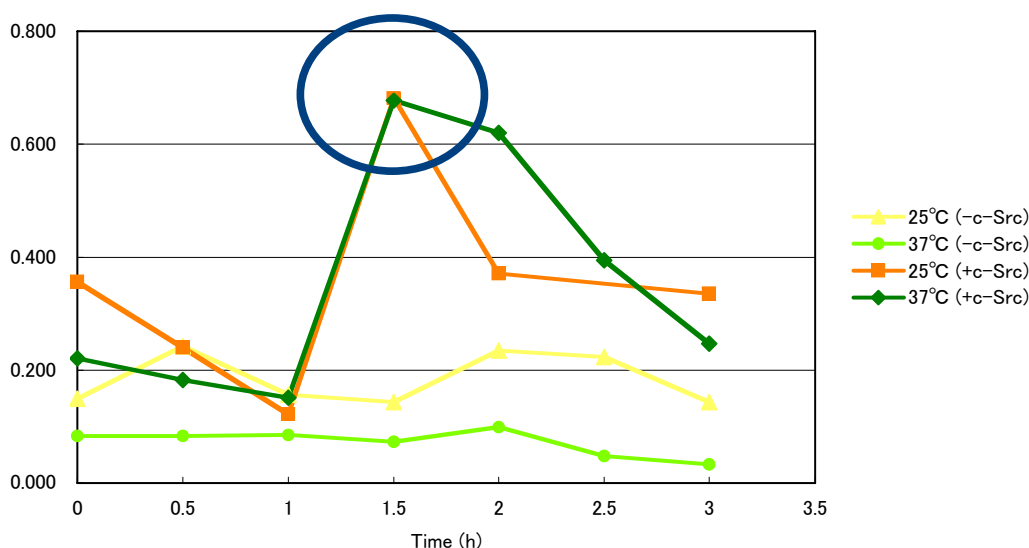


図 1-12 複合体粒子の拡散係数のリン酸化反応進行に伴う変化

たところ、それ以前は、1. 65V といった低電圧で粒子は等しく陰極に引かれ、粒子が正荷電を帯びていた事が分かった。また、2時間以後では、陰極に引かれるものと、陽極に引かれるものが出現した。これは、複合体が崩壊して、DNA が放出され、残った部分は正荷電が残るので、陰極に引かれ、放出された DNA が陽極に引かれていると理解できる。一方、粒子の運動性が急激に上昇する1. 5時間経過時点では、30V の電圧をかけても粒子は泳動せず、複合体全体として高分子の正荷電と、DNA の負荷電がちょうどつりあい、全体として中性粒子になっていることが明らかとなった。では、このときなぜ、粒子が溶液中を急に拡散するようになるのかであるが、複合体1分子を観察すると、それ以前では DNA 鎖はほとんど運動しておらず、1. 5時間経過した時点で、急に激しく運動を始めていることが分かった。すなわち、この DNA 鎖の激しい運動が、粒子を拡散させたのだと考えられた。遺伝子複合体は、DAPI 染色で観察できているが、遺伝子の転写によって生み出されるメッセンジャー RNA を Alexa で染色して観察する事を試みたところ、極めて興味深い事に、1. 5時間よりも以前には、複合体上に転写産物は観察されず転写が抑制されていたが、拡散係数

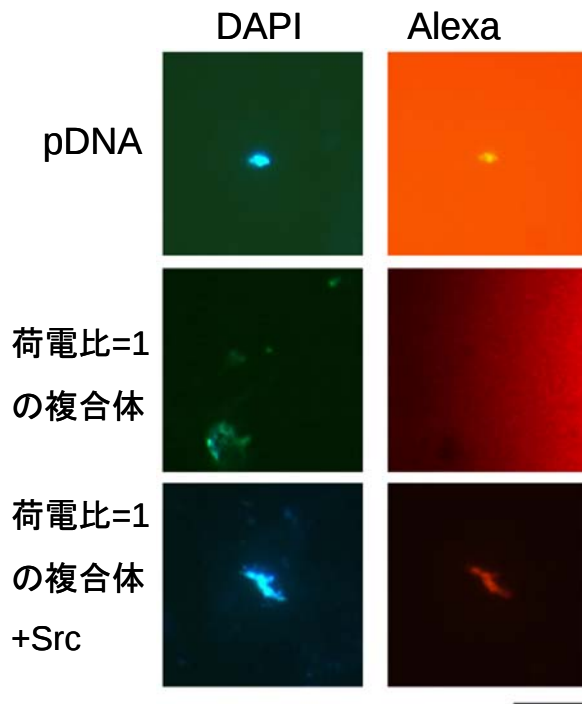


図 1-13 複合体の蛍光観察(左)と、複合体上の転写産物(mRNA、右)の観察

が増大する、すなわち、急にDNA鎖の運動が開始された時点で、複合体上に転写産物が確認された。この事は2つの事実を表している。まず、当初考えていたモデルでは、複合体がシグナル酵素との反応により崩壊して、遺伝子が放出されて転写が活性化するのであろうと予測していたが、実際には、転写の開始には複合体の完全な崩壊は必要ではないということである。第2は、複合体内での転写の開始は、DNA鎖の運動の開始とよく一致しているという事である。さらに、RNAポリメラーゼと同様、反応サイトまでDNA上をスライドする必要がある制限酵素の場合でも、電気泳動によるDNAの切断評価実験によると、まさにこのDNA鎖の運動性向上の時点で、DNA鎖が切断された。一方、DNA鎖に一点で反応するDNaseの場合は、リン酸化にかかわらず、その反応をまったく抑制できなかった。

これは、本複合体においてはDNA

鎖が強く凝集していないため、DNaseがDNA鎖にアクセスできるためであると考えられる。同じ酵素であるRNAポリメラーゼや制限酵素もDNA鎖にアクセスできるが、スライドできないという事が分かる。これがDNA鎖の運動性と極めて密接に連動しているらしい事が明らかになった。すなわち、高分子であるポリメラーゼとDNA鎖の認識(相互作用)は、両者の運動性が支配しているという興味深い新規なモデルが提唱できた事になる。

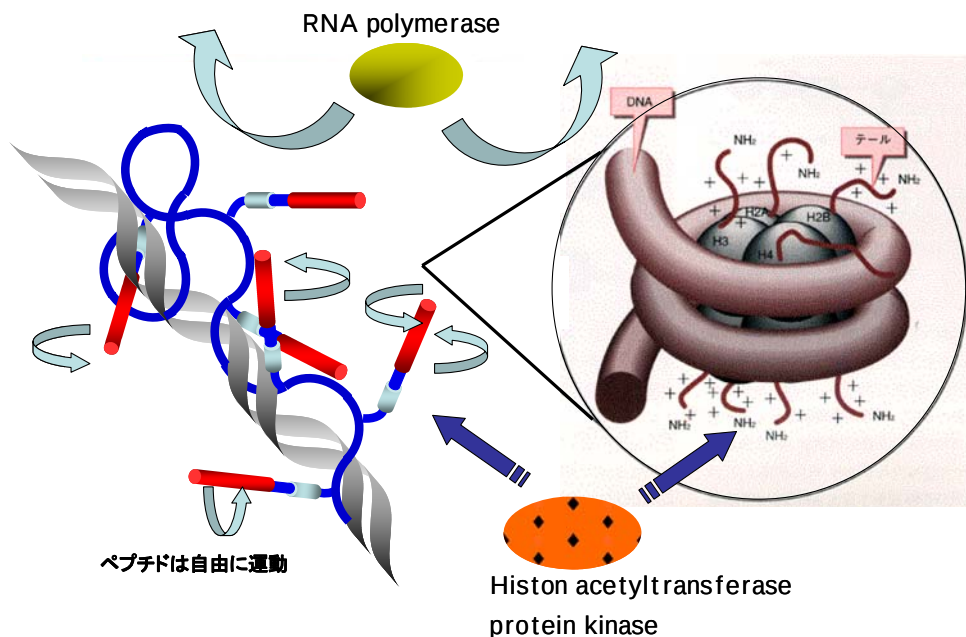


図 1-14 本システムと細胞におけるゲノム遺伝子の制御の対比

以上の成果は、本システムの遺伝子転写制御のメカニズムの本質の解明に迫るものであるが、一方、この現象は、細胞のゲノムにおける転写制御と非常に似通っている事が分かる。ゲノムでは、DNA はポリカチオン性のタンパク複合体であるヒストンと静電相互作用を駆動力として複合体(クロマチン)を形成して、その転写をロックしている。一方、転写を活性化するには、DNA 鎖と相互作用しているヒストンアミノ末端側のカチオンテールのリジン残基を、ヒストンアセチルトランスフェラーゼがアセチル化する。すなわち、相互作用しているはずのカチオン部位にこの場合でも酵素は容易にアクセスするのである。これまで、遺伝子の転写抑制は、クロマチンによる DNA 鎖のコンパクションが重要であると考えられてきたが、今回のモデルでは、実際のゲノムの転写抑制も、クロマチンによる DNA 鎖の運動性の抑制が重要である可能性があると考えられる。この事実は、これまで小分子の相互作用を基に考えられてきた、生体高分子間の相互作用による機能制御のメカニズムを根本から変える可能性があると考えられ、極めて興味深い。

特異基質の開発と種々の細胞内シグナルに応答する遺伝子制御剤の開発

制御剤の設計指針が確立してくるにつれ、そしてプロテインキナーゼ A 応答型制御剤 PAK とカスパーゼ 3 応答型制御剤 CPCC での細胞内での遺伝子転写制御の成功により、標的疾患にアプローチするための種々の細胞内シグナルに応答する制御剤の開発を行った。平成 16 年度からは、プロテインキナーゼ C α 応答型と HIV プロテアーゼ応答型、平成 17 年度からは、Src 応答型、I- κ - キナーゼ応答型、Rho キナーゼ応答型、平成 18 年からは、HTLV プロテアーゼ応答型、コクサッキーウイルスプロテアーゼ応答型システムの開発に着手した。また、平成 17 年度からは、効率のよい基質の開発のために、ペプチドアレイを用いた基質探索法を確立した。

まず、プロテインキナーゼ C α に関しては、平成 16 年度には、既知のプロテインキナーゼ C の基質配列を利用して、基本的にプロテインキナーゼと同じ分子設計に基づいて制御剤を合成した。電気泳動では、複合体のプロテインキナーゼ C 添加による崩壊が観察されたが、無細胞系での転写制御を評価しようとしたところ、酵素溶液中の何らかの添加剤がタンパク合成系を阻害してしまうために、評価が出来なかった。そこで、基礎評価も細胞系で行わねばならず、その評価は、東海林グループが担当した。プロテインキナーゼ C は、多くのサブタイプを有しており、そのいくつかが多くは正常臓器にも存在して活性を有している。ガンで特異的に亢進しており、正常組織では活性が見られないサブタイプは α であり、その特異基質が必要であったが、 α に特異的な基質は存在しなかった。さらに、 α の基質特異性は、 β と極めて似通っているため、その開発は不可能であるといわれていた。そこで、1200 種のペプチドライブラリを用意し、これを新規に開発したペプチドアレイ法によりスクリーニングしたところ、 α に反応性の高い数種の基質が見出された。これらのサブタイプごとの反応性は東海林グループがシンチレーションカウンターを利用して評価したが、その結果、PKC δ と名づけた基質が α に特性を有する事を見出した。この基質のサブタイプ特異性と、さらに、担ガンマウスを用いて、ガン組織と周辺正常組織の破碎液を用いて、基質をリン酸化したときの同一条件でのリン酸化率の比較を図 1-15 に示した。この基質は、前サブタイプ中、 α で最もよくリン酸化され、ガン組織では非常に高感度にリン酸化されるにもかかわらず、その他の正常臓器ではリン酸化されず、理想的なリン酸化プロファイルを有していた。そこで、この基質を利用して遺伝子制御剤を合成し、後述するように非常に性能の優れたガン特異的遺伝子制御剤を開発する事に成功した。

Src と I- κ - キナーゼに関しては、前述した様にアニオン性基質を要求するキナーゼであり、開発に当たっては、アニオン性基質の周辺部位にリジンを複数個導入して、全体としてカチオン性になるように設計した。その際、基質配列の N 末端側か C 末端側にカチオン性残基を直接連結する場合と、何らかのリンカーを介する場合など、種々の配列を設計して、その遺伝子発現制御能をゲル電気泳動で評価した。合成した基質配列を表 1 と表 2 に示す。Src の場合は、カチオン性残基は、主鎖側 (N 末側) ではなく、末端側 (C 末側) に導入する方が応答性がよくなり、さらにある程度のリンカーを主鎖と基質の間に導入する方が良

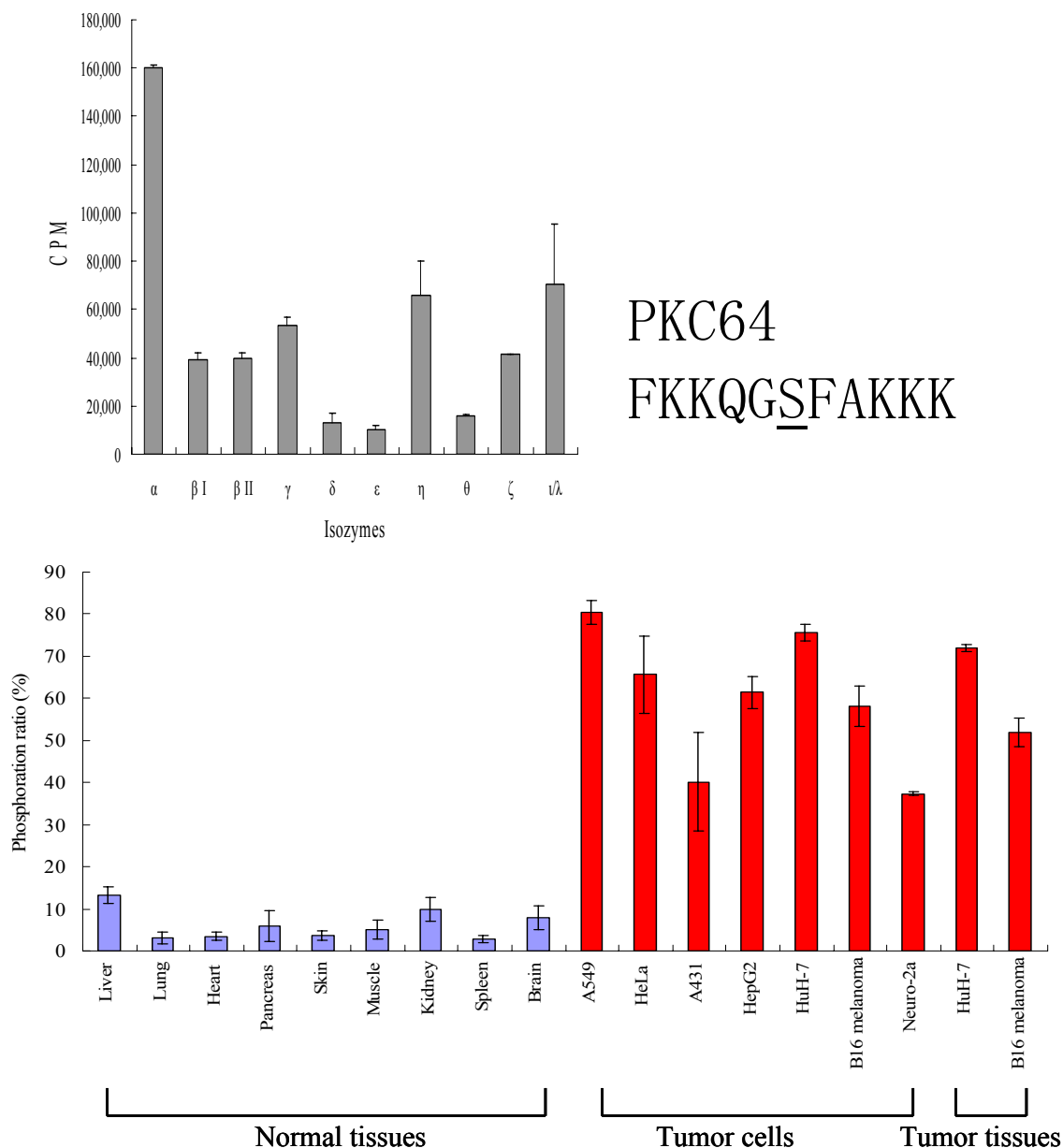


図 1-15 PKC α 特異的基質 PKC64 のサブタイプ特異性と、がん組織と正常組織でのリン酸化比較

いことがわかった。特にリン酸化効率よりも、それによる遺伝子の放出に効果が高かった。

一方、I- κ -キナーゼに関しては、表 2 のような基質を設計して評価した。リン酸化効率に関しては、東海林グループが担当した。こちらに関しては、カチオンの導入場所は、リン酸化効率には大きくは影響しなかったが、リン酸化に伴う DNA の放出には、むしろ主鎖側にカチオン性残基を入れ、さらに、主鎖とカチオン性残基の間に挿入するリンカーを長くするとよい結果が得られることが分かった。今回検討したものでは、# 2 のみが明確な DNA 放出能を示した。すなわち、アニオン性基質を要求するキナーゼに対する制御剤設計も、付加的にカチオン性残基を導入する事で解決できることが明らかとなり、本概念の一般化が可能となった。ただし、どの位置にカチオン性残基を挿入するかといった位置や、挿入の仕方、リンカーの必要性や位置は、キナーゼによってまちまちのようであり、標的キナーゼごとに最適化する必要性がありそうである。

表 1 Src 応答型制御剤開発のための基質配列一覧とリン酸化能

	配列	基質リン酸化効率
Src1	GGI YGE FKKK	79%
Src1G7	GGGGGGGI YGE FKKK	9%
Src2	GGYI YGS FK	79%
Src2K	GGYI YGS FKK	17%
L-Src2	-Link-GYI YGS FKK	
L2Src2	-Link-Link-GYI YGS FKK	60%
KLSrc2	G KK -Link-GYI YGS F	63%
KL2Src2	G KK -Link-Link-GYI YGS F	
Src6LF	- I YGE FA KKK	27%
Src6	-LinK-Link- I YGE FA KKK	78%
Src6Re	K KK -LinK-Link- I YGE FA	35%
Src7	GGT STEPQYQ PGENLKKK	52%

表 2 I- κ -キナーゼ応答型制御剤開発のための基質配列一覧とリン酸化能

Synthetic Peptides

Phosphorylated?

I κ B- α , #1: methacryloyl-GGA-RHDSGLDSMK-NH ₂	No
I κ B- α , #2: methacryloyl-GGA-KKERLLDDRHSGL-NH ₂	Yes (50%)
I κ B- α , #2': methacryloyl-GGA-KKKKERLLDDRHSGL-NH ₂	Yes (60%)
I κ B- α , #2'': methacryloyl-[Ada][Ada]-KKKKERLLDDRHSGL-NH ₂	Yes (60%)
I κ B- α , #2''': methacryloyl-[Ada][Ada][Ada]-KKKKERLLDDRHSGL-NH ₂	Yes (60%)
I κ B- α , #3: methacryloyl-GGA-KKERLLDDRHSMK-NH ₂	Yes (30%)
I κ B- α , #4: methacryloyl-[Ada][Ada]-KKKKERLLDDRHSGLDSMKDE-NH ₂	Yes (60%)
(G2AK2W: methacryloyl-GGA-KKW-NH ₂) ([Ada] = 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid)	

Rho キナーゼに関しても、良い気質が存在しないという問題点があった。特に、ROCK I と ROCK II (ROCK II が Rho キナーゼ) の間で特異的な基質が存在せず、特に循環器疾患では、両者を見分ける事の出来る基質は熱望されている。平成 17 年度は、まず、両者には特異性がないが Rho キナーゼと反応する事が知られている既知の基質を用いて、制御剤を合成した。無細胞のタンパク合成システム、および、ゲル電気泳動実験により、Rho キナーゼ添加時にのみ遺伝子が発現する事、電気泳動で DNA の放出が確認される事を見出し、基本的に Rho キナーゼ応答型システムが開発左脳である事を見出した。そこで、132 種類の基質を設計し、これを用いてその特異性を評価

表3 ペプチドアレイを用いて見出したROCK基質ペプチド例

	ROCK II リン酸化%	ROCK I リン酸化%
R-1	95. 8%	87. 9%
R-6	99. 0%	86. 7%
R-19	19. 8%	76. 3%
R-33	16. 8%	73. 6%
R-21	91. 2%	33. 0%

した。其の結果、表 3 に示すように、両サブタイプに特異的な基質をそれぞれ見出す事に成功した。これらの基質は、いずれもこれまで知られていなかった性能を有しており、非常に興味深い。ウイルスプロテアーゼに応答する制御剤に関しては、東海林グループが担当した。

In vivo 適用のための各種手法の開発

本システムは、遺伝子の転写制御能に関しては、申し分ない性能を有しているが、これを in vivo で投与して、標的疾患部位の細胞に取り込ませるには、細胞取り込み能、血液循環能に問題がある。そこで、これを可能にするために、いくつかの方法を検討した。

まず、平成 17 年度には、最も簡単な方法として、制御剤ポリマーにさらに、ガンなどに高発現しているインテグリンに対して結合能を有する RGD ペプチドを、イソプロピルアクリルアミド型のプロテインキナーゼ A 応答型制御剤である NPAK にグラフトした 3 元共重合体を開発した。これを培養細胞に添加したところ、RGD ユニートを導入していない場合には、複合体は一切細胞には取り込まれなかったが、RGD ユニートの添加量を上げていくと、2.4mol%では細胞に取り込まれ、細胞をフォルスコリンで刺激してプロテインキナーゼ A を活性化した場合でのみ、遺伝子の発現が見られた。

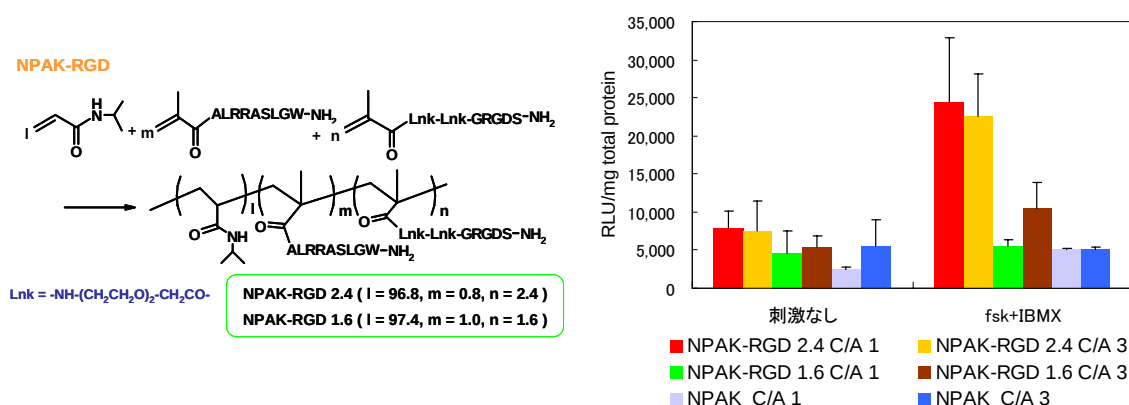


図 1-16 RGD ユニート導入制御剤とその遺伝子制御能

一方、がんにおいて、プロテインキナーゼ Cαを用いて、ルシフェラーゼ遺伝子を担がんマウスのがん組織で発現させるため、複合体をエレクトロポレーション法で組織に導入する手法も検討した。この場合、組織に 6 本一組の電極を差して実施した。その結果、確かにがん組織でルシフェラーゼの発現が認められたが、その発現量は非常に低いものであった。また、リン酸化サイトのセリン残基をアラニンに交換したネガティブコントロールポリマーで遺伝子を導入した場合でも、僅かではあるが遺伝子が発現しており、本複合体は電圧印加により不安定化することが示唆されたため、エレクトロポレーションは断念した。

また、プラズマ法に関しては、BBK バイオ、パール工業が中心となってプラズマヘッドの小型化に取り組み、まず、平成 17 年度には、24mmシャーレに適用できる程度の小型化に成功、平成 18 年度には、96穴マイクロプレートに適用可能なレベルまでの小型化に成功した。さらに、平成 19 年度には、in vivo 適用のためのペンシル型装置の開発に成功し、現在、其の性能を評価していると

ころである。

これらとは別に、マウスのがん組織にける遺伝子制御の実験系を確立すれば、本研究の最終目標をほぼ達成できるため、その実験系の確立にも力を注いだ。 エレクトロポレーション法は、本システムには好ましくなかったため、がん組織への複合体そのものを局注する方法論を検討してみた。その結果、予想外の事であったが、複合体はがん組織に取り込まれ、かなりの発現量を認める事が出来た。これは、組織を形成している細胞が、培養細胞とは性質を異にしているからであろうと考えられる。その結果、B16 メラノーマ(皮膚がん)移植担がんマウスにおいて、PKC α 応答型(PKC 64型) 制御剤でルシフェラーゼ遺伝子を複合体として投与した場合、がん組織にのみ発現がみられ、一方、正常皮下組織ではその発現は見られなかった。一方、リン酸化部位をアラニンに置換したネガティブコントロールポリマーでは、がん組織、皮下組織双方で発現が見られず、極めて理想的ながん特異的遺伝子制御を in vivo でも成し遂げる事が出来た。この結果は、本研究の最終目

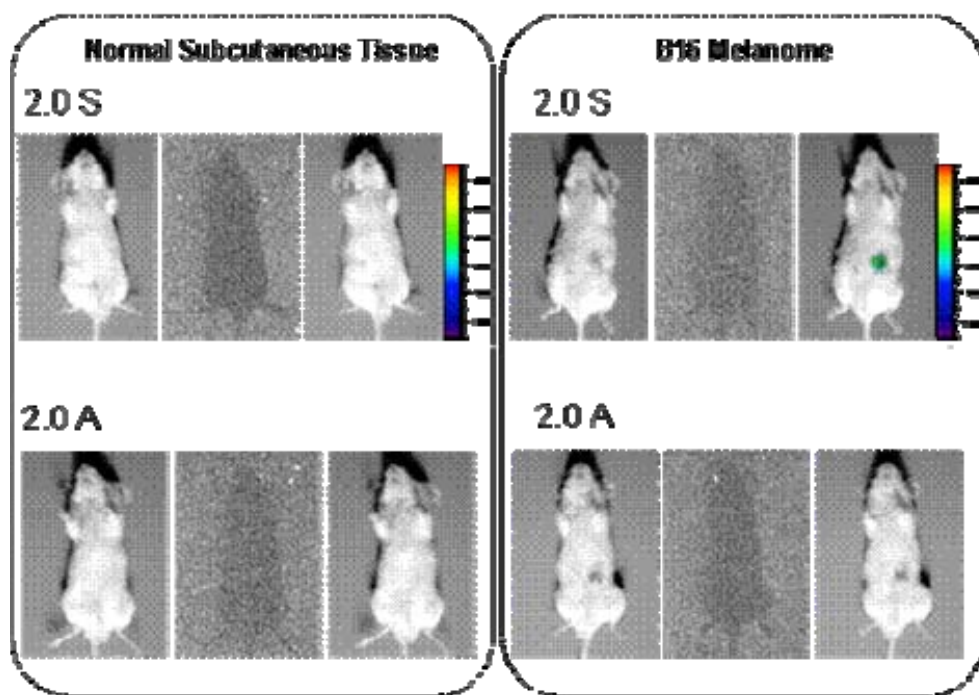


図 1-17 B16 メラノーマ移植マウスにおけるがん特異的ルシフェラーゼ発現

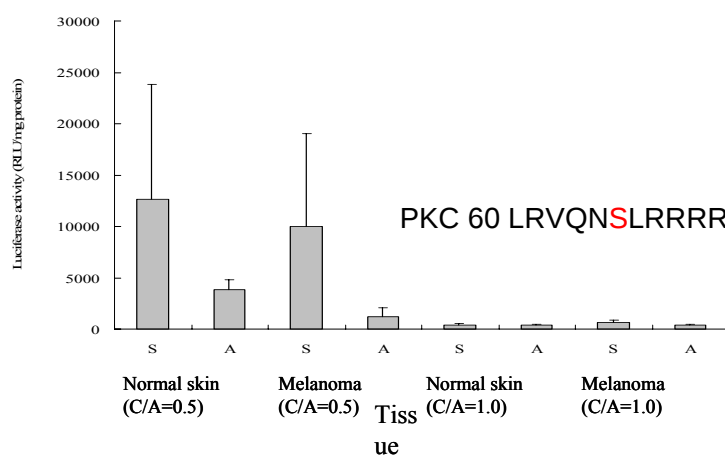


図 1-18 α 特異性を欠く基質 (PKC60) を用いたがん組織と正常皮下組織での遺伝子発現結果

標である疾患細胞特異的遺伝子送達法の基礎を確立するものであり、極めて重要な成果であった。一方、 α 特異性のない、あらゆるプロテインキナーゼ C サブタイプで良好な基質である PKC60を用いた場合には、図 1-18 に示すとおり、がん組織でルシフェラーゼの発現が認められたが、正常皮下組織でも同程度の発現が認められた。これは正常皮下組織に存在する他のプロテインキナーゼ C サブタイプの活性に応答したものと考えられる。これらの事実は、本システムが基質の性能に支配されている事を示しており、以下により基質を探索するかが重要である事がわかる。また、先のがん特異的な遺伝子発現が、確かに α サブタイプに応答している事も同時に示唆している。

また、in vivo 適用のためのキャリアーとして、本研究でもっとも期待した中空バイオナノ粒子に関しては、その開発と複合体の封入、細胞での検討は谷澤グループが担当したが、その結果をうけて、プロテインキナーゼ C α 応答型を用いた in vivo 適用を平成 18 年に検討した。すなわち、プロテインキナーゼ C α 応答型ポリマーとルシフェラーゼ遺伝子の複合体を調製し、中空バイオナノ粒子に封入して、がん、および正常皮下組織に投与した。ヌードマウスにヒト肝臓がん由来の HuH-7

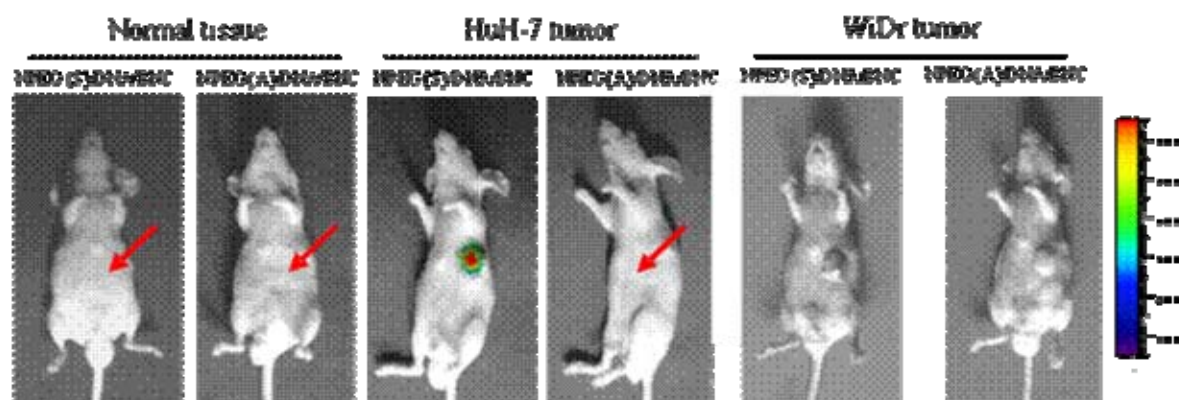


図 1-19 中空バイオナノ粒子とプロテインキナーゼ C α 応答型システムを用いた肝臓がん特異的遺伝子制御

と、ヒト大腸がん由来の WiDr を移植した場合、いずれもプロテインキナーゼ C α は亢進しているが、肝臓がん由来の HuH-7 でのみ遺伝子の強い発現を認めた。一方、正常皮下、および上皮がんである WiDr では遺伝子の発現は認められなかった。さらに、リン酸化部位をアラニンに置換したネガティブコントロールでは、いずれの場合でも遺伝子発現は起こらなかった。ここで用いた中空バイオナノ粒子は、B 型肝炎ウイルスのエンベロップを基本としているため、ヒトの肝臓由来の細胞にのみ送達される。すなわち、このシステムは、前述した複合体の直接投与の結果と考え合わせると、中空バイオナノ粒子で肝臓細胞に送達し、遺伝子制御システムでがん細胞と正常細胞を肝臓内で見分けるという、理想的なデュアルセキュリティシステムを実現した事になり、本研究の最終目標を達成したといえる成果である。

この他にも、北海道大学の原島教授と共同で、原島教授の開発した MEND(脂質被服なのカプセル)の適用も検討した。プロテインキナーゼ C α 応答型ポリマーとルシフェラーゼ遺伝子との間で複合体を調製し、原島教授のプロトコールに従って MEND での被服を試みた。その結果、培養細胞レベルではあるが、確かにプロテインキナーゼ C α 活性の高いがん細胞では、使用した DNA 量に依存した発現が認められ、ネガティブコントロールポリマーでは発現が認められなかった。すなわち、MEND も基本的に本システムに適用可能であると期待できる。ただ、現時点では、その被服条件が最適化されておらず、その最適化を行っているところである。また、平成 19 年度からは、超音波と、マイクロバブルを用いて遺伝子を導入する手法である、ソノポレーションも検討している。現在、アルブミンを主体とするフルオロアルカンのマイクロバブルと、本複合体を混合して、皮下組織に投与し、超音波照射することで、がん組織に遺伝子の発現が認められている。しかしながら、ネガティブコントロールとの差はあるものの、こちらにおいてもある程度の遺伝子が発現しており、今後の詳細な検討が必要であり、現在、条件の最適化を実施しているところである。

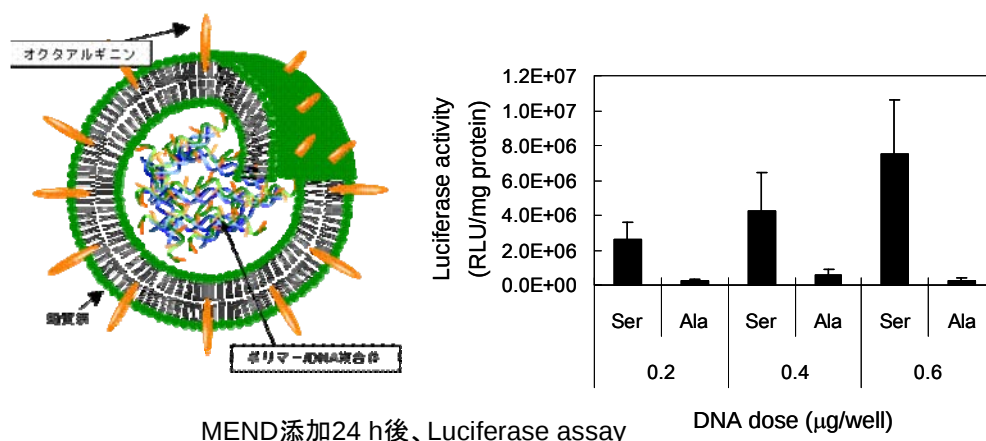


図 1-20 MEND で被覆したプロテインキナーゼ C α 応答型システムのがん細胞での発現

(2)研究成果の今後期待される効果

ここでは、本研究のコンセプトである、疾患細胞で特異的に亢進している細胞内シグナルに応答して遺伝子発現を活性化できる遺伝子制御システムの開発と、その適用を検討した。その結果、種々の細胞内シグナルに応答するシステムの開発に成功し、それが実際に細胞内、および生体内で働きうる事を実証した。これらの結果は、これまで解決できなかった、現行の遺伝子治療における細胞特異性の問題を解決するブレイクスルーとなる可能性を示唆している。治療用遺伝子を用いる場合、標的疾患細胞の周辺に存在する正常細胞での発現が大きな問題となる。例えば、遺伝子治療が大きく期待された、がんの自殺遺伝子による治療は、正常細胞での発現のため頓挫している。ここで成功した、がん細胞特異的な遺伝子発現制御系を転用すれば、正常細胞では遺伝子発現が抑えられるため、これまで期待されながらその使用が断念された多くの治療用遺伝子が復活すると期待でき、遺伝子治療の実用化に大きく貢献する事が期待できる。特に、中空バイオナノ粒子との併用で実現できる、臓器特異性と細胞特異性を一度に満たすダブルセキュリティシステムの確立は、大きな成果となると考えられる。

また、がん特異的な投与法、および種々のシグナルに応答する制御剤の開発を通して、特異的基質開発の重要性がクローズアップされた。これに対し、ペプチドアレイを用いるハイスループットなスクリーニング系を確立したが、この方法を併用すれば、患者の病理組織と正常組織を比較して、その患者でもっともコントラストの良い基質を探索できるため、真のテイラーメイド遺伝子治療システムが確立できると期待される。

さらに、今回担がんマウスで開発したレポーター遺伝子を用いたがん特異的な遺伝子発現の手法は、そのまま、がんの診断や、制癌剤開発における治療効果の評価のための in vivo イメージング法としても極めて有効であると考えられる。現在、がんのイメージング法としては、PET が有効であるが、これは、PET が、がんの大きさではなく、がん細胞の代謝活性をイメージングできるからである。翻って、細胞内シグナルは細胞の機能を最も端的に反映するものであり、細胞内シグナルの in vivo イメージングは、これまでに例がないが、細胞機能をもっとも詳細に評価できるものである。たとえば、がんにおけるプロテインキナーゼでは、 α は、あらゆるフェーズで亢進しているが、同時に、前がん期には、 β が、転移期には η が亢進する事が知られており、これらのシグナルを逐一イメージングして、そのパターンを評価すれば、がんの詳細な状態を診断できると考えられる。今回の研究で、 α 特異性基質以外にも、 β 特異性、 η 特異性の基質をすでに見出しており、今後、これらの基質を用いて制御剤を開発していけば、画期的な in vivo イメージング法が開発でき、創薬、診断、治療を一環して行える、テイラーメイド医療システムを確立できる事が分かってきた。現在、この大目標に向かって研究を進めているところである。

また、ここで開発した新規基質は、診断や創薬にも重要な情報を与え、きわめて価値の高いものである。実際、プロテインキナーゼ C α 基質から、これまで不可能であった α の阻害剤ペプチドも

開発してる。

3. 2 中空バイオナノ粒子の開発と、遺伝子制御システム適用検討(大阪大学 谷澤グループ)

(1)研究実施内容及び成果

中空バイオナノ粒子は、B 型肝炎ウイルスのエンベロップタンパクを酵母から発現させ、脂質を取り込んで自発的に生成される中空のナノカプセルであり、ヒトの肝臓細胞に特異的に送達されるユニークなカプセルである。本研究では、これを遺伝子制御システムを内包した in vivo 用キャリアーとして適用できるかどうかの検討を行った。

中空バイオナノ粒子の大量生産法の確立

バイオナノカプセルを実用的遺伝子治療に供するには、まず、安定に供給できる必要がある。研究開始当初、その製造法では、一週間で1mg ていどの生産が限界であった。そこで、まず平成 15 年度と 16 年度でその調製法を検討した。

まず、高純度のバイオナノカプセルを精製するために、精製法を検討した。PEG 沈殿、CsCl 密度勾配の超遠心分離とスクロースの超遠心分離、ゲルろ過を用いてのバイオナノカプセル精製を行ったが、この操作に 1 週間かかることが分かり、バイオナノカプセルを十分な供給するには足りなかった。そこで、次に熱処理により不純物を除き、Cellulofine のアフィニティカラムで分離する方法を検討し、さらに酵母から生産したバイオナノカプセルを超遠心分離による精製法を改良することに成功した。すなわち、タンパク質を分解するプロテアーゼなどの不純物を除去するために、70 度で 20 分間の熱処理を行った結果、熱安定性があるバイオナノカプセルは分解せずに不純物のみを除くことが可能になった。特に、熱処理により超遠心分離などの手順を省くことが可能であった。また、アフィニティカラムを取り入れることで大量の精製が可能であり、精製率を高めることが可能になった。この改良法は、精製にかかる時間も一週間から三日に短くなり、簡便・迅速なバイオナノカプセルが出来た。生産量も、同一のスケールで一週間に 20 から数十 mg 程度の生産が可能となった。

さらに、高純度に精製されたバイオナノカプセル精製した粒子が長時間の保管ができるような検討を加えた。これまでも、プロテアーゼ阻害剤を添加して精製することで、保管中に混在するプロテアーゼによるカプセルの劣化を防いでいたが、それだけでは不十分であった。ワクチンのような医薬品の保存には凍結乾燥法が用いられるので、この適用を試みた。その結果、凍結乾燥時に、5%スクロースを補充剤として一緒に添加することでバイオナノカプセルの物理的な特徴を保つまま、4℃で 1 年以上の長時間の保管が可能になった。

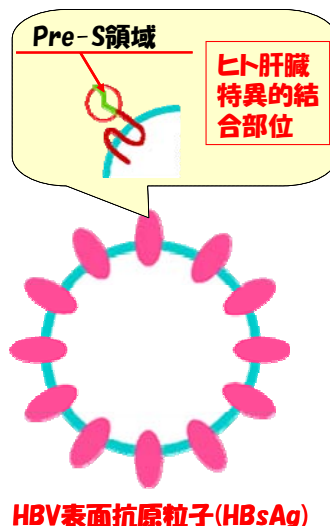


図 2-1 中空バイオナノ粒子

中空バイオナノ粒子への遺伝子制御剤・DNA 複合体封入法の確立

中空バイオナノ粒子には、これまでエレクトロポレーションを用いて DNA、薬剤、色素などの封入が可能であった、そこで、まず本研究で用いる遺伝子制御剤と DNA の複合体をエレクトロポレーションにより封入する事を考えた。これまで使用していた条件では、封入が不可能であったため、条件として電圧、電流、パルス、反応液を種々変化させつつ、最適条件を検討したが、良い条件は見つからなかった。そこで、次にバイオナノ粒子の表面を覆っている、B 型肝炎ウイルスのエンベロップタンパクに多く含まれるジスルフィドを還元によって切断して、カプセルを弱めてからエレクトロポレーションを行う事とし、電圧、電流条件を種々変化させて評価した。その結果、50V、950 μ F が一番高い封入率を示

した。しかし、バイオナノカプセルそのものの凝集がしばしば起こり、新たな導入法の検討が必要になった。これは、不安定化したカプセルタンパク同士が凝集して、分子間でジスルフィドを形成してしまったためかもしれない。

そこで次に、遺伝子や薬剤の封入に広く使われているリポソームとバイオナノカプセルの融合を試みた。まず、複合体ではなく、遺伝子そのものを含むリポソームをバイオナノカプセルとインキュベートすることで、簡単に内包できることが分かった。そこで、粒径をコンパクトに出来るペプチドと PEG をグラフトしたイソプロピルアミド型主鎖を有する 3 元共重合体型遺伝子制御剤ポリマーを用いて、検討したところ、複合体が封入可能である事を見出した。

センダイウイルスもリポソームとの複合体で使用する例が報告されたことがあるが、細胞・組織の区別がないセンダイウイルスと異なり、バイオナノカプセルとリポソームの複合体は肝臓特異的な認識能を維持していることが明らかになった。また、キャリアーであるバイオナノカプセルをフルオレsein でラベリングして in vivo イメージングで体内挙動を調べた結果、投与 4 時間後での腫瘍内での蓄積や投与 24 時間後での体外への積極的な排出が確認できたので、今後の投与法の改良に活かせると考えられた。

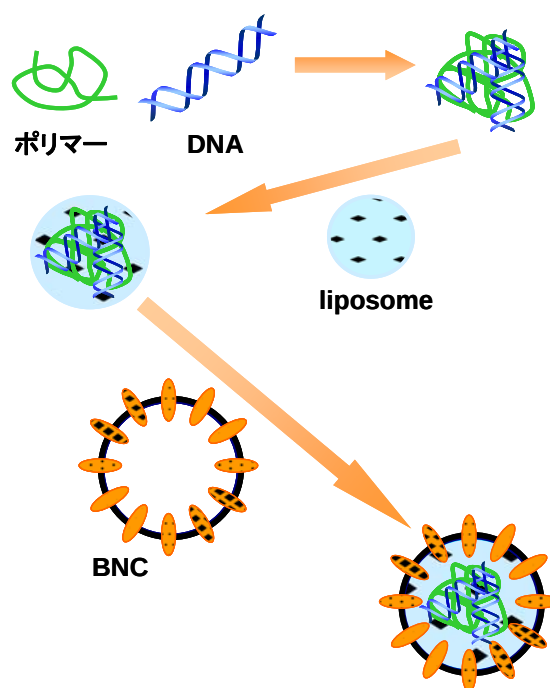


図 2-2 リポソーム法による複合体の内包スキーム

遺伝子制御型複合体封入中空バイオナノ粒子を用いた細胞での検討

リポソーム法を用いてプロテインキナーゼ A 応答型システム、およびプロテインキナーゼ C α 応答型システムを内包した中空バイオナノ粒子を用いて、実際に細胞に複合体を導入できるかどうかを検討した。プロテインキナーゼ A 応答型システムでは、細胞にフォスコリン刺激を加えて、細胞内プロテインキナーゼ A を活性化させた場合に、強い遺伝子 (GFP) の発現が見られた。また、プロテインキナーゼ C α 応答型を封入した場合、HuH7 細胞では、細胞内に強い GFP の発現が認められた。一方、リン酸化部位をアラニンに置換したネガティブコントロールポリマーの場合には、荷電比が低い場合は、若干の発現は認められたが、荷電比を 2 にすると、そのような発現は認められず、本手法によって複合体の封入および、細胞内への導入が可能である事を見出した(図 2-3)。しかしながら、同様にヒト肝臓がん由来の細胞株である、HepG2、および NuE 細胞では、HuH7 と同等に細胞内プロテインキナーゼ C α の活性が高いにもかかわらず、明確な発現は見られなかった。これらの結果より、中空バイオナノ粒子、あるいは、今回の方法で複合体を内包したバイオナノ粒子には、何らかの細胞の好みが存在するのかもしれない。

中空バイオナノ粒子の臓器指向性の改変 (ZZ 粒子の開発)

中空バイオナノ粒子は、ヒト肝臓に強い指向性を有しているが、この標的臓器を変えることが出来れば、さらに広範囲な応用が可能となる。肝臓指向性を有しているのはエンベロップタンパクの PreS 領域という部分であるため、この部分を分子生物学的に改変し、抗体の Fc 領域と結合可能な zzドメインの遺伝子を挿入する事で、種々の抗体を結合可能な中空バイオナノ粒子を開発する事を検討した。その結果、zz部位に EGF 受容体に対する抗体を結合させて、上皮細胞由来の細胞

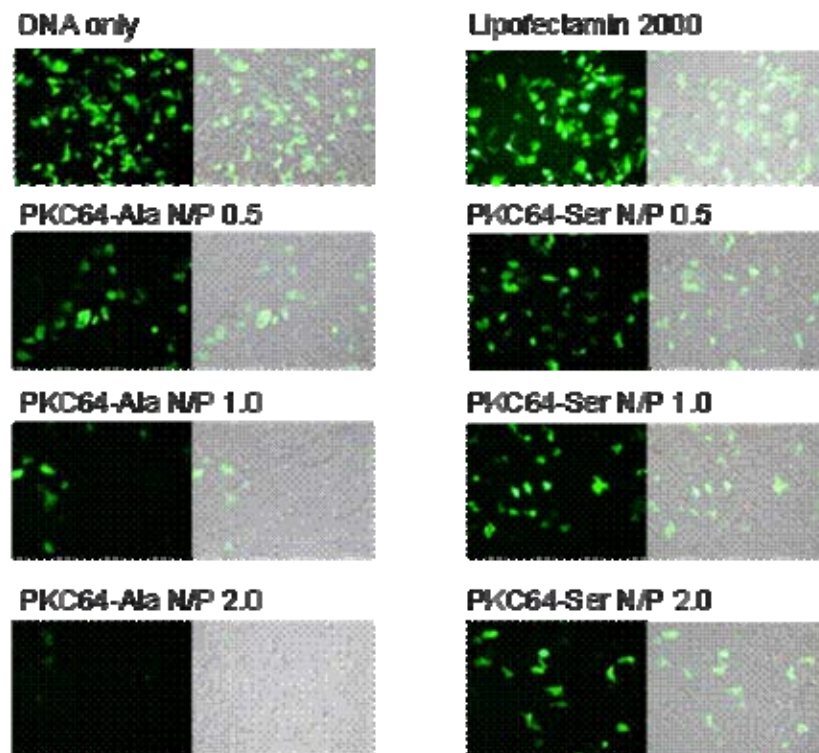


図 2-3 プロテインキナーゼ C α 応答型システム内包中空バイオナノカプセルによる HuH7 細胞での GFP 発現状況

に標的化することに成功した。この粒子に GFP 遺伝子を封入して、培養細胞とインキュベートしたところ、本来の標的細胞であった肝臓由来の細胞では遺伝子発現が認められず、変わって、上皮がんである A431 細胞や WiDr 細胞でのみ GFP 発現が認められた。これは、PrsS 領域を改変する事によって、細胞志向性が変化する事を実証するとともに、抗体として IgG を用いる事が出来るため、どんな標的分子にも標的化が可能である事を示している。

現在は、HIV 感染モデルに使われる Molt-4 細胞および Junktet 細胞に発現している CD3 を標的にするため、ZZ バイオナノカプセルに CD3 抗体を提示させて遺伝子のデリバリー条件を検討中である。HIV 感染細胞に選択的に活性化するポリマーと遺伝子の複合体をバイオナノカプセルによってデリバリーさせてその治療効果を期待している。

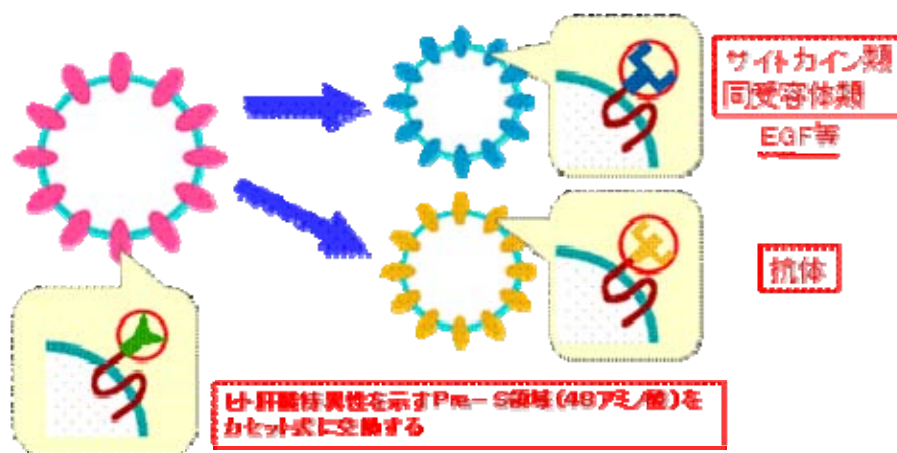


図 2-4 中空バイオナノ粒子の細胞指向性の変更

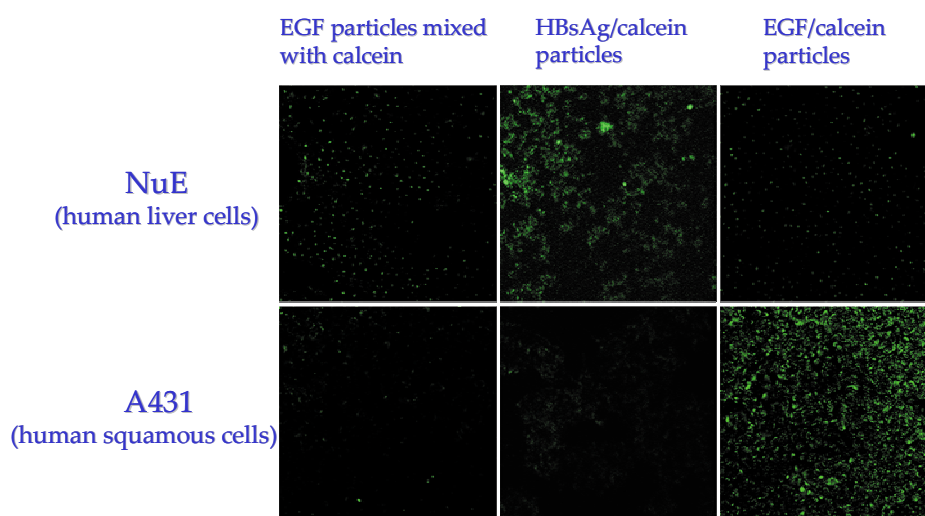


図 2-5 EGF 受容体指向バイオナノ粒子によるカルセインの送達例
 左:粒子とカルセインを単純に混合、中央:従来のバイオナノ粒子でカルセインを送達、右:EGF 受容体指向性バイオナノ粒子でカルセインを送達

(2)研究成果の今後期待される効果

細胞内シグナル応答型遺伝子制御システムは、ひとたび細胞内に入れば、従来の方法では実現できないほど、クリアカットな遺伝子の発現制御を実現することが可能である。しかしながら、本システムを実用化するためには、疾患臓器への局注以外に、血中投与が可能であることが好ましい。また、更なる細胞への取り込み能の増強が必須である。中空バイオナノ粒子は、その条件を満たしており、細胞内シグナル応答型遺伝子制御システムの実用的な細胞特異性の遺伝子治療法の確立に、非常に大きな力を発揮すると期待できる。また、従来、肝臓へのターゲティングに限られていた中空バイオナノ粒子を改変して、zz粒子の開発に成功したことは、中空バイオナノ粒子をあらゆるターゲティングに利用可能にした点で、重要な進歩である。zz粒子は、本研究における適用にとどまらず、その他の薬剤、遺伝子などの送達にも有効であると考えられ、今後の DDS に多くの有効な方法論を与えると期待している。

最も大きな効果としては、本中空バイオナノ粒子が、体内における臓器特異性を高度に確保することにより、標的疾患細胞と正常細胞の認識を細胞個々のレベルで可能にした、細胞内シグナル応答型遺伝子制御システムに、生体全体としてのさらなる厳密な特異性を賦与できる点にある。確かに、本研究で開発した細胞内シグナル応答型システムは、同一臓器では、疾患細胞特異的な細胞内シグナルを遺伝子発現のトリガーとして利用することで、正常細胞と明確な認識が可能であるが、生体内の全く異なる臓器では、正常細胞であっても、標的シグナルが亢進している場合がないとはいえない。この様な場合、ここで開発した中空バイオナノ粒子を併用することで、細胞内シグナル応答型システムの働く範囲を、標的臓器に限定することで更なる細胞特異性を発揮させうると考えられる。したがって、細胞内シグナル応答型システムと中空バイオナノ粒子を併用した、ダブルセキュリティシステムは、理想的な遺伝子治療の方法論を開発するに当たって非常に重要な成果であるといえる。現在、炎症疾患を標的として、CD3に対する抗体を結合したzz粒子を用いて、本システムの実現に向けて精力的に研究を展開しているところである。

3. 3 各種標的シグナル応答型システムの細胞内評価と、ウイルス疾患用プロテアーゼ応答型システムの開発、およびその評価系の確立(聖マリアンナ医科大学 東海林グループ)

(1)研究実施内容及び成果

本グループはプロジェクト開始時よりウイルスプロテアーゼ応答型キャリアーの評価を

担当していたが、平成18年度4月より片山グループ（九州大学）の専任PDの浅井が東海林グループ（聖マリアンナ医科大学微生物学教室）へ助教として異動したため、平成18年度よりキナーゼ応答型キャリアーの細胞内評価をも加えた形でプロジェクトを進めた。

ウイルス感染の評価系の確立

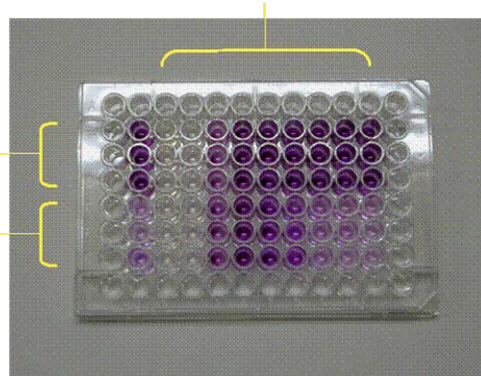
プロジェクト開始初年度は、細胞内シグナル応答型システムをウイルス疾患に適用するため、ウイルス感染を評価するアッセイ系を構築した。当該グループでは、研究開始時までに、単純ヘルペスウイルスI型（HSV-1）の immediate early gene の pre-mRNA4/5 に対する種々のアンチセンスDNAを作製し、ウイルス感染細胞の細胞変性効果（CPE）に及ぼす影響を観察することで *in vitro* の抗ヘルペス効果を報告してきた。ウイルス感染の評価に関しては、プラーク法やウイルスDNAの定量法も併用してきたが、これらの方法は多検体処理には不向きで、手技者の主観が入るなど正確さの面で問題があった。そこで、多検体処理を行うためにMTT法による抗ヘルペス効果の判定とさらに簡便なアッセイ系を確立した。また当該グループがこれまでに構築したMTT法やWST-8による抗HIV効果を判定するアッセイ系が、ウイルスプロテアーゼ応答型システムの評価に適用可能であることを確認した。

MTT法による抗ヘルペス活性のスクリーニング

50% cytotoxic concentration = CC_{50}
 50% effective concentration = EC_{50}
 $SI = CC_{50}/EC_{50}$

薬剤希釈系列

細胞毒性
 抗ウイルス効果



プラーク法

Vero細胞にHSV-1(Miyama GC+)を撒く
 CPE(細胞変成効果)を測定後、細胞を凍結・融解
 monolayerd Vero細胞に細胞抽出液を撒く

72時間後形成されたプラークを測定

プラーク形成ユニット (pfu)として表示

PCR法

プライマー

P1 5' CAT CAC CGA CCC GGA
 GAG GGA C 3'
 P2 5' GGG CCA GGC GCT TGT
 TGG TGT A 3'

PCRサイクルの条件

94°C 1min, 67°C 1 min, 72°C 1min
 35cycle

泳動後、コンピューターにて画像処理をし、泳動像の濃度を測定。

図 3-1 検討したウイルス感染の評価法（上段は、MTT 法）

また、感染細胞の形態変化から評価する手法も検討した。

MTT による生細胞の測定においては、培養したウイルス感染細胞と非感染細胞に 2～4 日後に 0.75mg/ml の MTT を 10 μ l/well 加えた。1 時間、培養した後、上清を吸引除去し DMSO を 100 μ l 加え、生成したホルマザンを溶解させた。吸光度を 570nm (対照波長 630nm) にて測定し、50%の細胞毒性を示す濃度を CC₅₀、50%の抗ヘルペス効果を示す有効濃度 EC₅₀ として、CC₅₀/EC₅₀ により Selectivity index (SI) を定義して、感染細胞での治療効果の評価ができる手法を確立した。ただし、MTT 法は感度が高くコストパフォーマンスも高い反面、不溶性のホルマザンを生成するため溶解しなければ吸光度測定ができないという欠点がある。溶解液の影響も強く受けるため様々な水溶性ホルマザンが開発されてきた。中でも MTT より感度が良く、ホルマザンの溶解行程を省略できる方法として WST-8 が既に調整された cell counting Kit-8 (同人化学) を用いて MTT 法との比較を行った。

これとは別に、細胞変性の顕微鏡観察による評価も検討した。10%FCS を加えた MEM 培地で Vero 細胞を 96 well マルチプレートに 1x10⁴/well になるように撹き、コンフルエントになった時点で培地を MEM に換え、単純ヘルペスウイルス 1 型 (HSV-1) 及び 2 型 (HSV-2) を 100pfu/well になるように調整し感染させた。ウイルスを感染させない細胞は、被験薬物の毒性を判定するために用いた。被験薬物として天然物由来の紅茶抽出液、並びにシルクプロテインを用い、ウイルス感染と同時に加えた。また、コントロールとしてアシクロビルを加えた。5%CO₂、37℃の条件下で培養し、24, 48, 72 時間後にそれぞれの細胞変性 (CPE) をスコア化し肉眼判定した。CPE 面積を 25%刻みでスコアとして (0～4) で表示した。CPE を阻止する薬剤の最小阻止濃度 (MIC) を求めて有効濃度とした。

CPE の変化を毎日観察し、ウイルス感染細胞の CPE がスコア 4 になる日を MTT 法による最終判定日とした。HSV-1 では 4 日後、HSV-2 では 2 日後であった。CPE の判定と MTT による判定は平行であったが、被験薬物によっては細胞毒性が強く、CPE からの MIC の判定が行えなかったものもあった。また、MTT 法の欠点として、ウイルス感染細胞における吸光度が高いことである。CPE の観察では完全にスコア 4 になっているにも関わらず、バックグラウンドが高いため、CC₅₀、EC₅₀ を求める時の吸光度差が少なく誤差の原因となる。そこで、Cell counting Kit-8 を用いて簡便な抗ヘルペス活性のスクリーニング系の構築を試みたところ、細胞数に比例した直線が得られた。MTT 法と比較すると直線の傾きが大きく感度も良くばらつきも少なかった。さらに、ウイルス感染細胞の CPE と比較すると、MTT 法では高かったバックグラウンドが解消された。これにより、cell counting Kit-8 を用いた方がより簡便で感度の高い判定ができるものと思われた。作業行程も少なくなり多検体処理にも適していた。

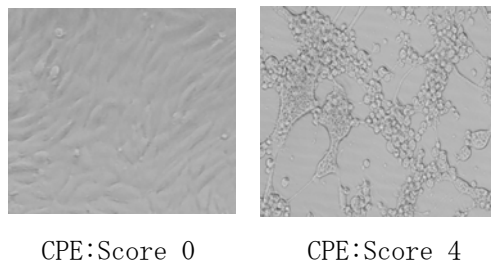


図 3-2 HSV-1 感染に伴う細胞変性

ウイルス感染・非感染細胞における導入遺伝子の細胞内分布の調査

ウイルスプロテアーゼ応答型の高分子を用いた遺伝子デリバリーを構築するうえで、導入遺伝子の細胞内動態を明らかにする必要がある。ポリアニオンであるアンチセンス DNA は細胞膜透過性が著しく悪いにも関わらず、ある程度の抗ウイルス効果が認められている。そこで HSV-1 感染細胞と非感染細胞におけるアンチセンス DNA の細胞内分布をビオチン標識アンチセンス DNA と透過型電子顕微鏡を用いて検討した。具体的には、ビオチン標識フォスフォロチオエート型アンチセンス DNA を Vero 細胞と 37℃にて 1 時間培養し、常法に従い透過型電子顕微鏡の試料を作製した。メッシュ上に集めた切片で抗ビオチンマウス抗体を反応させた。反応終了後、PBS にて良く洗浄し、ゴールド標識抗マウス抗体を反応させた。酢酸ウラニルと酢酸鉛で染色した後、透過型電子顕微鏡 (JAOL) にて観察した。その結果、ウイルス非感染細胞では、細胞質の細胞小器官と思われる部分にしか存在しなかった、対

照的に、ウイルス感染細胞ではアンチセンス DNA が高率にしかも核へ分布しているのが認められた。これは、ウイルス感染細胞系では、遺伝子デリバリーの効率、および、細胞内での局在が、通常の細胞とは変化することを示唆している。

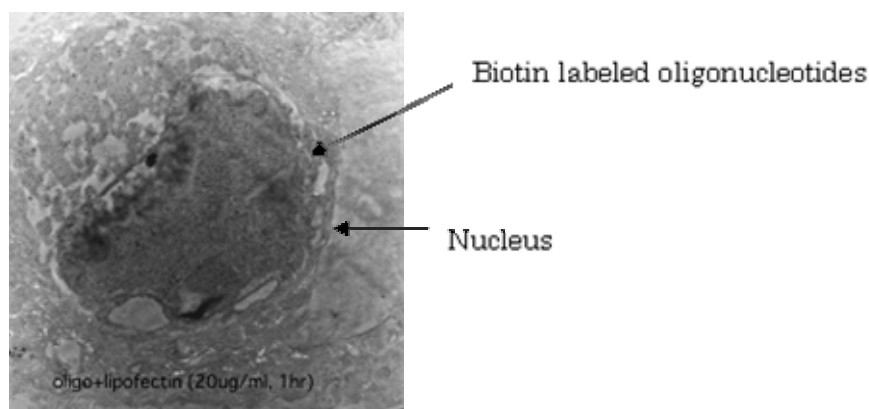


図 3-3 ウイルス感染細胞での導入 DNA の電子顕微鏡による直接観察

一酸化窒素のモニタリングシステムの構築とウイルス感染における一酸化窒素の役割に関する検討

細菌やウイルス感染に伴い NO が発生し、抗ウイルス効果並びに周辺組織への障害作用が報告されている。しかし、NO の半減期は極めて短く、直接測定することは困難であるため、感染における NO の役割についてはまだ不明な点が多い。直接経時的にモニタリングすることができれば、NO の感染における役割また治療のためのバイオマーカーとも成り得る。そこで、NO に選択的な多層被覆型微小電極を用い、細胞培養系における NO の測定系の確立を目指した。白金-イリジウム合金素子を NO 選択性特殊膜で被覆した微小電極 (Model NO-502, 栄行科学) を用い、NO ガスの検出を電気信号に変換し、検知した電気化学信号は Power-Lab (AD Instrument 社) にて測定、解析した。酸性側で NO を発生する NOC-7 を用いて検討したところ、無細胞系並びに細胞系で NO の発生を経時的にモニタリングできることが明らかとなった。NOC-7 から NO の発生速度は緩衝液の pH に依存して酸性側で速く、中性に近づくにつれて緩慢となる。この反応をよく反映した結果となり、pH 依存性が見られた。また、濃度依存性にも優れ、定量化が可能であることを確認した。現在、NO の代わりに NO^2 を測定する Griess 法が一番簡便な方法として繁用されている。直接 NO を測定する方法ではないが、この方法との相関性も見られた。しかし、Griess 法では理論値より低い値となり、 NO^{2-} 以外の酸化型 NO の存在も示唆された。また、 NO^2 がさらに反応していることも考えられた。以上より、NO 選択性微小電極本システムは従来法に比べ、直接 NO をモニタリングできる点で優れているものと思われた。

この測定系を用いて、細胞培養にてウイルス感染させた時の NO の発生を経時的にモニタリングしたところ、細胞の種類によって NOC-7 からの NO の発生を抑制するものがみられた。感染防御能の高さを計る指標に成り得る可能性も示唆された。また、Vero 細胞に HSV-1 型を感染させたところ、二相性に NO の発生が見られた。感染初期と感染後期では NO の発生の度合いが異なっているものと思われた。また、培養細胞での NO の産生が極めて早く、酸素の存在下で簡単に NO_x に酸化されてしまうため、カレントがマイナスに測定されることが観察された。これを解決するには、多層被覆型微小電極の改良が必要であると思われた。ウサギを用いて LPS 刺激後の NO の発生をリアルタイムで測定したところ、安定に硝子体中の NO の測定が可能であることが確認され、LPS 刺激により NO が 1 時間以内に発生しているのが確認された。

ウイルスプロテアーゼ応答型遺伝子制御剤の開発と評価

ウイルスプロテアーゼは、肝炎ウイルスや HIV、コクサッキーウイルスなどが、感染細胞内で増殖する際に、ウイルスゲノムが作り出すプロテアーゼである。したがって、このプロテアーゼの活性は、ウイルス感染細胞に限定されるので、ウイルス疾患を標的とする場合、最適の標的細胞内シグナルである。プロテアーゼ応答型に関しては、アポトーシスシグナルプロテアーゼであるカスパーゼに対する応答ポリマーが、無細胞系、および細胞内で遺伝子を制御できることが示されたので、平成 16 年度から、これをウイルスプロテアーゼに応用する検討を開始した。まず、最初の標的として、HIV プロテアーゼを選び、これに応答する遺伝子制御ポリマーの開発を試みた。HIV プロテアーゼの基質の開発に関しては、ある程度の切断基質アミノ酸配列は明らかになっているため、これを基本としていくつかのペプチドを合成した。これらのペプチドを用いて、リコンビナントプロテアーゼによる基質切断アッセイを構築して基質特異性を検討したところ、優れたペプチド基質を得た。この配列で CPCC と同様、カチオン性の Tat ペプチドを連結したペプチドを、ポリアクリルアミドにグラフトしたタイプの高分子を合成した。しかし、通常の基質ペプチド導入様式では、切断されにくかったため、フレキシブルなトリエチレングリコール類似のリンカーを開発して連結したところ、非常に応答性の良いキャリアを開発できた。これは、おそらく本プロテアーゼの活性サイトのポケットが深いため、ペプチドを直結した場合では、切断サイトにペプチドが達しないためであると推測される。さらにこのキャリアを用いて、無細胞タンパク合成系での評価を行ったところ、実際にリコンビナント HIV プロテアーゼで遺伝子発現制御が可能であった。また、蛍光標識プラスミド DNA の細胞内デリバリーの検討を行ったところ、平成 17 年度には HIV 感染細胞にのみ蛍光が観察された。次に、実際に細胞での実際の遺伝子発現制御評価ため、HIV 感染依存的に細胞内に HIV プロテアーゼが発現することを確認した。real time RT-PCR により経時的に HIV プロテアーゼの mRNA を定量したところ、ウイルス添加 (M.O.I. = 0.01) 1 時間後には発現上昇が認められ、HIV 添加により細胞内に HIV プロテアーゼが発現していることが判明した。そこで、開発した制御高分子が、HIV 感染細胞に GFP の発現プラスミドをデリバリーすることができるかを共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。しかしながらその蛍光強度は非常に弱く、キャリア/DNA 複合体の細胞内デリバリー効率が悪いことが原因であると考えられた。前年度見られた蛍光を発する細胞は、細胞内ではなく細胞表面への蛍光標識 DNA の集積によるものであると思われた。

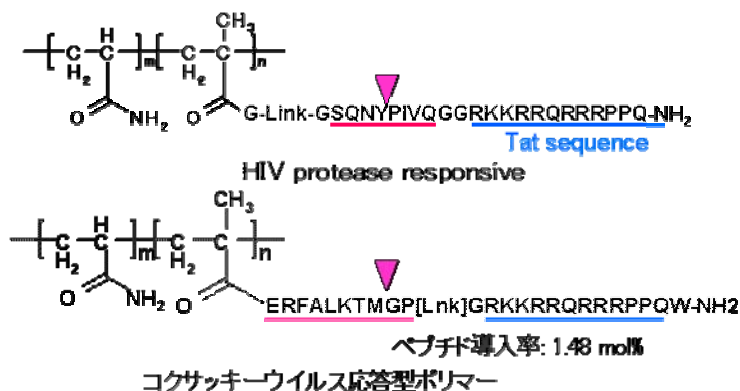


図 3-4 ウイルスプロテアーゼ応答型高分子の構造の例

ウイルスプロテアーゼ応答型システムの評価においては、最も困難な点は、安定な感染細胞株が存在しないことである。また、HIV プロテアーゼと HTLV プロテアーゼでは、感染細胞が血球系細胞であるため、一般にあらゆる遺伝子導入が困難なことも大きな問題である。そこで、HIV-1、HTLV-1 プロテアーゼ応答型については、ヒト T リンパ球由来培養細胞 MT-4 細胞および MOLT-4 細胞への効率の良い導入を達成すべく、膜透過性ペプチド修飾法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法を検討したが、いずれをもっても期待した導入率を得るに至らなかった。上述の試作型高分子を用いて得られた結果をフ

平成 18 年度からは、HTLV プロテアーゼ応答型、HCV プロテアーゼ応答型、コクサッキーウイルスプロテアーゼ応答型のポリマーの開発にも着手した。HCV プロテアーゼ応答型と HTLV プロテアーゼ応答型については、複数種の基質ペプチドの設計・合成を行い、リコンビナントプロテアーゼを用いて合成基質の評価を実施した。その結果、いずれに関しても優れたペプチド基質を見出した。

ードバックして、高分子の物性（ゼータ電位および高分子-pDNA 複合体の粒子半径）およびペプチド基質配列の面から改良を加え、新たに複数種の機能性高分子を設計・合成した。現在、この解決に関しては、谷澤グループが開発した $\alpha\alpha$ 型中空バイオナノ粒子の使用を検討していることである。ウイルスプロテアーゼ応答型キャリアーについては細胞膜移行機能をもつ種々のペプチドで修飾した高分子の調製を進めている。既に IkappaB キナーゼ応答型キャリアーに適用する E-selectin 抗体提示型中空バイオナノ粒子および HIV プロテアーゼ応答型キャリアーに適用する CD3 抗体提示型中空バイオナノ粒子の調製が完了している。

感染細胞におけるウイルスプロテアーゼ応答型機能性高分子の評価に血球系細胞の仕様が解決しないため、平成 18 年度からは、遺伝子導入が可能な接着細胞への感染実験が可能であるコクサッキーウイルス (CV) プロテアーゼを標的としたシステムの構築を開始した。CV プロテアーゼをクローニングして活性型リコンビナント CV プロテアーゼを調製した。複数種の基質ペプチドの設計・合成を行い、前述のリコンビナント CV プロテアーゼを用いて評価したところ、数種の優れたペプチド基質を見出した。この基質を用いて、CPCC 同様、切断配列に Tat ペプチドを連結したが、切断効率が悪かった。これは、Tat ペプチドと切断基質の間をフレキシブルなトリエチレングリコール様リンカーで連結することで解決できた。無細胞タンパク発現系で評価したところ、実際にコクサッキーウイルスプロテアーゼ添加時にのみ遺伝子の発現が確認でき、一方、熱で失活させたプロテアーゼでは、添加しても遺伝子は発現しなかった。これらの実験から、ウイルスプロテアーゼ応答型システムに関しても基本的に実現可能であることが分かった。

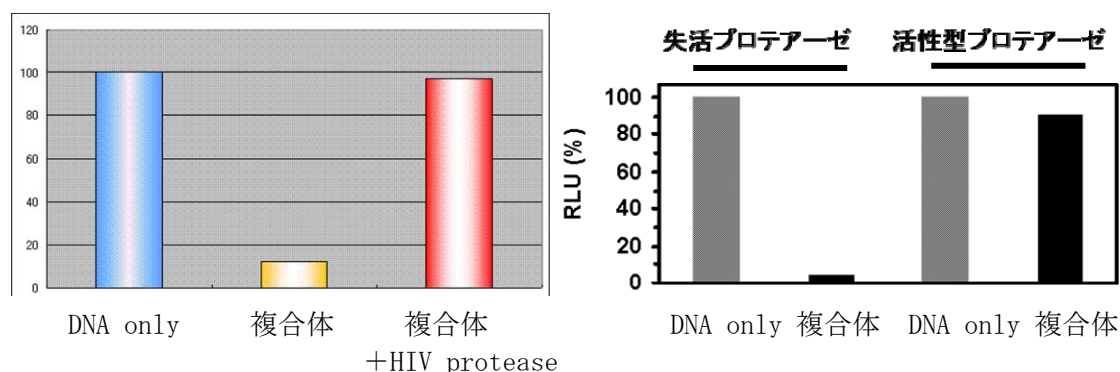


図 3-5 HIV プロテアーゼ応答型システム（左）とコクサッキーウイルスプロテアーゼ応答型システム（右）の無細胞系での遺伝子発現制御例

種々の細胞内シグナル応答型遺伝子制御剤の培養細胞を用いた機能評価

片山グループが開発したプロテインキナーゼ応答型システムに関しては、I- κ -キナーゼ応答型と、Src 応答型、プロテインキナーゼ C α 応答型に関しては、基質の性能評価を[γ -32P]ATP を用いたキナーゼアッセイ系を構築して調べ、よい基質を見出すことに成功したこのアッセイ系は Src キナーゼ応答型高分子の被リン酸化能評価も可能であることが判明し、キナーゼ基質含有高分子の被リン酸化能評価に広く適用でき、有用である。さらに、それを組み込んだ遺伝子制御剤の性能を培養細胞にて評価した。プロテアーゼ応答型と異なり、プロテインキナーゼ応答型高分子と遺伝子の複合体は、培養細胞への導入効率が低い。In vivo においては組織への導入が可能であるが、培養細胞では評価に耐えるレベルの導入を実現するには、中空バイオナノ粒子などのキャリアーへの内包が必要であり、評価が複雑になる。そこで、マイクロインジェクションにより複合体を細胞内に直接添加して評価する方法をとった。

まず、I- κ -キナーゼ応答型に関しては、まず、陰性コントロール高分子として基質リン酸化部位の Ser を Ala へ置換したアナログを合成した。次に、高分子-pDNA 複合体を複数種の培養細胞へマイクロインジェクション法により導入し、炎症性サイトカインである LPS や TNF

α で細胞を刺激して、高分子の遺伝子発現制御能を調べたところ、RAW264.7、NIH3T3、HeLa 細胞において炎症性サイトカイン刺激依存的な遺伝子発現が認められた。この現象は陰性コントロール高分子では見られなかった。これより、試験管内および培養細胞レベルにおける炎症性サイトカイン刺激に応じた遺伝子発現制御システムが確実なものとなった。一方、上述の試作型高分子を用いて得られた結果をフィードバックして高分子に改良を加え、新たに複数種の機能性高分子を設計・合成した。

また、プロテインキナーゼ C α および Src 応答型システムにおいても、標的酵素活性が亢進しているがん由来細胞に複合体を導入した場合、明確な遺伝子発現が見られたが、ネガティブコントロールポリマーを用いた複合体では、遺伝子発現がみられないことから、細胞内で遺伝子発現制御が可能であることを実証できた。また、プロテインキナーゼ C α 応答型では、さらに細胞をプロテインキナーゼ C の阻害剤で処理した場合にも、遺伝子の発現は見られず、本分子システムは、種々の標的シグナルにおいても、完璧に遺伝子発現が制御できることが実証できた。

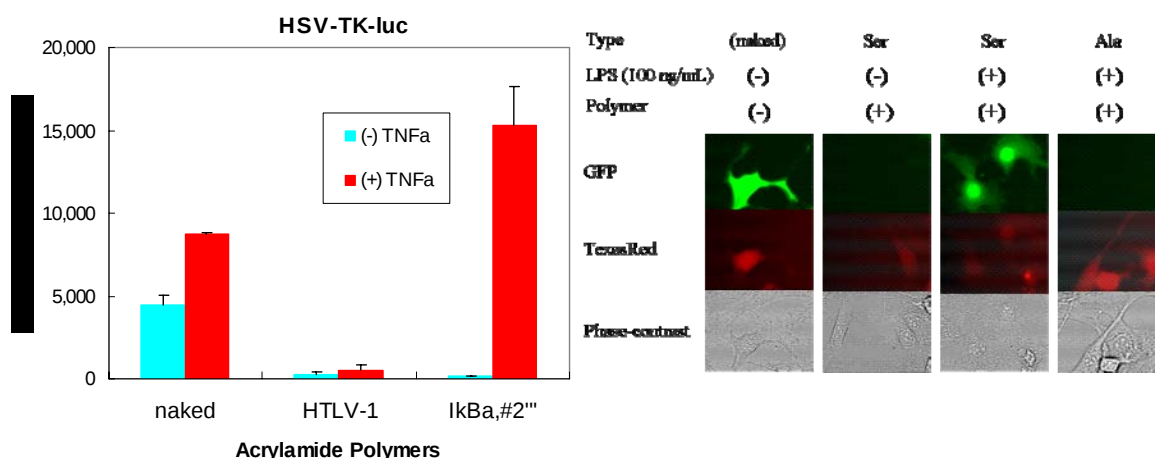
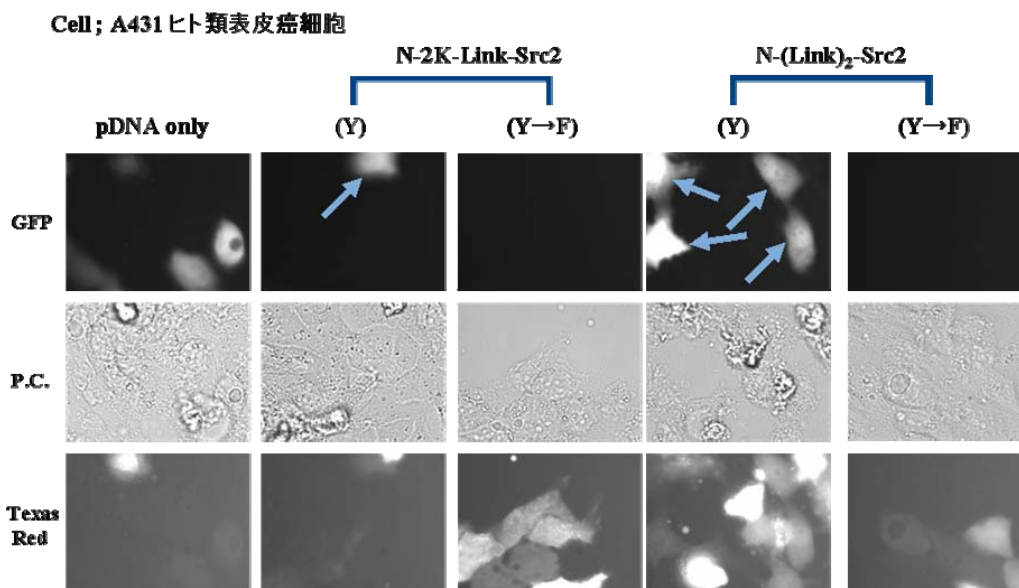


図 3-6 I- κ -キナーゼ応答型システムによる細胞内遺伝子制御
左では、TNF α 刺激時でのみ発現が見られる。また、右では LPS 刺激時にのみ発現が見られる。



○ A431 において、NIPAM-Src2 は ± 1.0 で完全な GFP の発現制御に成功した。

図 3-7 Src 応答型システムにおける細胞内遺伝子制御 Src が亢進しているので発現みられるが、ネガティブコントロールポリマーでは発現は見られない。

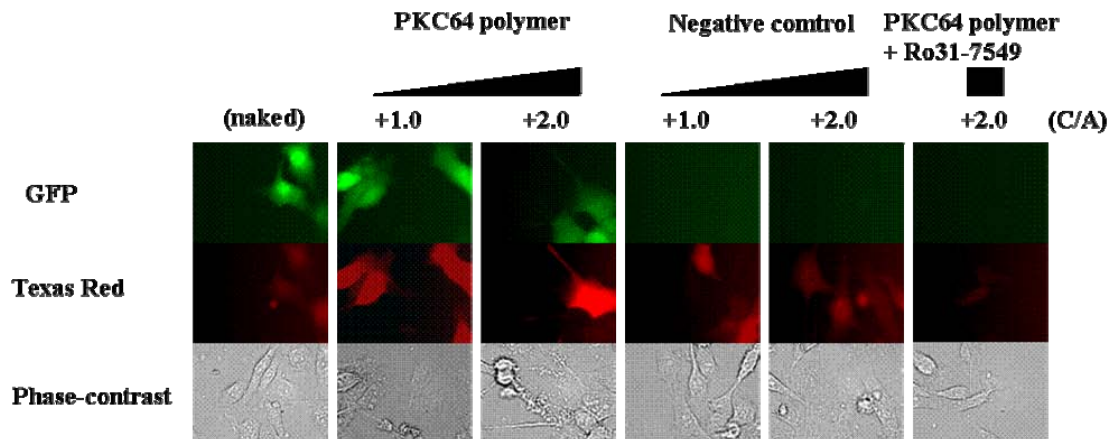


図 3-8 プロテインキナーゼ C α 応答型システムにおける細胞内遺伝子発現制御
PKC α が亢進しているがん細胞内で、遺伝子発現が起こるが、ネガティブコントロールポリマーおよび、PKC 阻害剤処理細胞では、遺伝子の発現は見られない。

(2)研究成果の今後期待される効果

細胞内に入りさえすれば、疾患細胞で異常亢進しているシグナルによって遺伝子を放出する遺伝子発現制御素子を手にした。細胞内シグナルの異常は疾患の本質であるため、本システムによってこれまでは薬理活性が強すぎて治療遺伝子としては使えなかった遺伝子を用いた自殺遺伝子治療法の確立が強く期待される。しかしながら、複合体が細胞内へ取り込まれる効率は当初期待していたよりも著しく低いことがわかり、現在これを克服すべく様々な方向からアプローチを実施している。複合体のサイズや表面電荷の最適化や別の種のキャリアーとの組み合わせ、PEGylation によるステルス化が功を奏するかもしれない。細胞表面に発現しているマーカー分子を狙ったアクティブターゲティング型のキャリアーは現在既に複数種が報告されている。その中でも特にグループメンバー内で調製された抗体提示型中空バイオナノ粒子が発揮するであろう種々の疾患細胞へのアクティブターゲティング能に大きな期待がよせられている。

既存する抗ウイルス薬に次々に抵抗性を獲得していく耐性ウイルスに対し、抗ウイルス活性を有する薬剤を新たに開発するという対応では限界があり、抗ウイルス薬によらない治療法の開発が求められている。こうしたなか、病原体そのものを標的にしたり、病原体が存在する細胞の環境・性質を変えうる遺伝子治療は魅力的な戦略である。いまだ根治治療法が存在しないエイズの原因ウイルスである HIV の標的はヒト T リンパ球やマクロファージであるが、現在これらの細胞に安全で高効率に遺伝子導入が可能な方法は存在しない。今年度調製が完了した CD3 抗体提示型中空バイオナノ粒子は市販の試薬よりも細胞毒性が低く、かつ市販の遺伝子導入試薬に匹敵する細胞導入効率をもつことが判明した。今後、プロテアーゼ応答型キャリアー/DNA 複合体の細胞導入のみならず、T リンパ球系の遺伝子導入剤としても期待される。

3. 4 循環器系疾患への遺伝子制御システム適用のための実験系の確立 (東北大学 下川グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ナノカプセルを用いたナノ治療の開発

本研究で開発する遺伝子制御システムは、in vivo に適用する際には、中空バイオナノ粒子をはじめとするナノカプセルに内包することになる。循環器系疾患では、ナノ粒子の適用法が確立さ

れないため、評価系の確立を検討した。ここでは、病変選択機能を有するナノカプセルに薬物（遺伝子）を内包させ、副作用の少ないナノ治療を開発した。すなわち、抗増殖薬であるドキソルビシンを内包し血管透過性亢進部位に集積する特徴を有するナノカプセルである NK911 の血管病変形成抑制効果を、ラット頸動脈のバルーン傷害モデルにおいて検討した。同モデルにおいて、バルーン傷害後にNK911を静注するだけで、バルーン傷害部位（内皮剥離部位）にドキソルビシンが選択的に送達され、4週間後の血管病変の形成が有意に抑制された。また、NK911の全身投与に伴う副作用は認めなかった。この結果から、ナノカプセルを用いたナノ治療が循環器領域で実際に臨床応用できる可能性が、初めて示された。

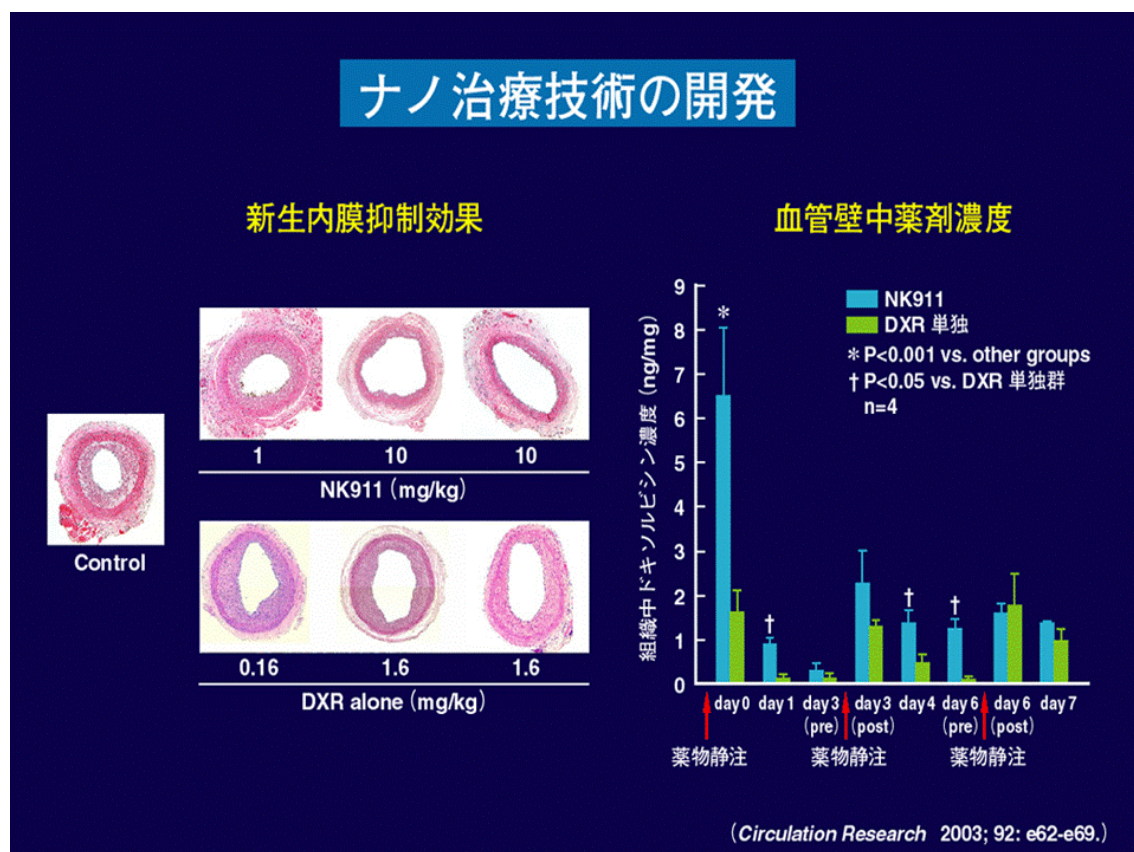


図 4-1 ナノカプセルの循環器疾患（バルーン障害モデルにおける再狭窄）への適用結果
ナノカプセルでは、内皮肥厚が顕著に抑制され、局所ドキソルビシン濃度が高い。

循環器疾患への治療効果評価のための機能化造影剤の開発

循環器系疾患への遺伝子治療効果を評価するためには、そのつど、動物を殺して血管を摘出しては、持続的な効果の評価が難しい。したがって、動物を生かしたまま、疾患の程度を持続的に評価できることが好ましいが、そのような手法は存在しなかった。そこで、本研究が目指す循環器系疾患である、動脈硬化、あるいは、バルーン処理後の血管炎症性障害を診断できる機能化 MRI 造影剤を、片山グループと共同で開発し、評価した。当初、炎症部位に特異的な E-セレクトインに結合する抗体やシアリルルイス X などの糖類を結合した MRI 造影剤を考えたが、いずれも良好な結果は得られなかった。そこで、考え方を変え、内皮障害部位が他の血管部位とマクロな物性が異なることを利用して、有機色素が特異的に吸着するのではないかと考え、種々の有機色素をスクリーニングした。有機色素は、組織染色に用いられるところから、内皮障害部位を染色できるものがあるのではないかと期待したが、実際に Evans Blue が極めて特異的に内皮障害部位に吸着することを見出した。そこで、片山グループで、Evans Blue 類似骨格を有する MRI 造影剤を合成し、これを評価した。その結果、この造影剤は、摘出ブタ大動脈展開標本において、機械的に内皮を傷害し

た部位にのみ吸着し、T1 強調シグナルを与えることが分かった。そこで、次に、ラットの頸動脈にバルーンカテーテルを挿入し、擦過することにより炎症を惹起したモデルを作成して、大体静脈から造影剤を投与したところ、障害側の頸動脈で、シグナルが観察できた。次に、動脈硬化病巣の評価に用いることが出来るかどうかを見極めるために、ApoE ノックアウトマウスを用いた。このマウスは、週齢が進むとともに、血管にアテローム様の動脈硬化病巣が多発する。このマウスに、本造影剤を投与し、大動脈部分の MRI 撮像をしたところ、複数のシグナルが観察でき、さらに、相当する大動脈を摘出し、展開したところ、MRI シグナル部位と、実際のアテローム部位は完全に一致した。これらの事実により、本造影剤は、血管の障害部位を非侵襲的に診断できる、初めての造影剤であることが分かった。また、ApoE ノックアウトマウスでは、週齢が若く、アテロームが進行していないときには、MRI シグナルは、小さな斑点状であり、週齢が進んでアテロームが進行すると、シグナルが大きくなっていく様子も観察でき、本造影剤を用いれば、血管障害部位の遺伝子治療効果を評価可能であることが明らかとなった。

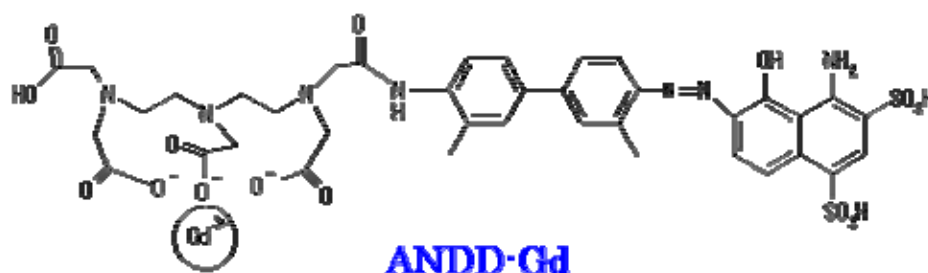


図 4-2 血管障害部位特異的なエバンスブルー類似型 MRI 造影剤

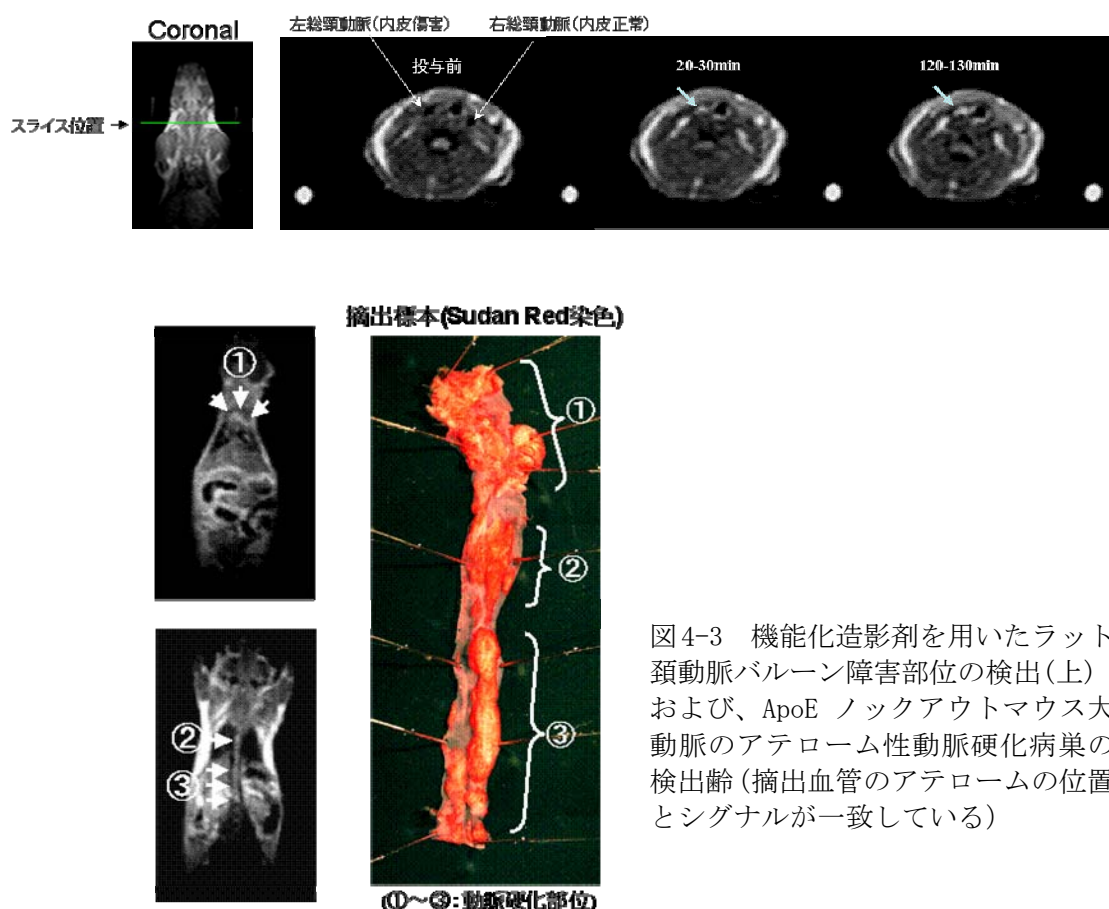


図 4-3 機能化造影剤を用いたラット頸動脈バルーン障害部位の検出(上)および、ApoE ノックアウトマウス大動脈のアテローム性動脈硬化病巣の検出(下)(摘出血管のアテロームの位置とシグナルが一致している)

循環器疾患における標的細胞内シグナルとしての Rho キナーゼの妥当性評価

Rho キナーゼの阻害剤を用いた治療検討により、Rho-kinase が難病として残る肺高血圧症の良い治療標的になりうることを明らかにした。また、Rho-kinase の活性化が、動脈硬化や虚血再灌流障害の分子機構にも深く関与していることを明らかにした。この原因として、ストレス時に冠動脈収縮反応が亢進する分子機構に Rho-kinase の活性化が主因になっていることを明らかにした。これらの結果は、Rho キナーゼを疾患特異的な細胞内シグナルとすることの妥当性を実証するものであった。一方、Rho キナーゼ活性の亢進は、正常細胞の 2 倍強であり、これを満足する基質を開発せねばならないことも明らかとなった。

(2)研究成果の今後期待される効果

循環器疾患は、がんと並んで重大な疾患であり、今後も罹患率が増加する可能性が高い。特に動脈硬化や血管の炎症が惹起する、狭心症発作や、肺高血圧症は、命に関わる危険な病態であり、有効な治療法が必要である。しかしながら、循環器疾患に対する有効なナノ治療法は未だ存在しない。本研究のコンセプトである、細胞内シグナル応答型遺伝子制御システムを用いた、細胞特異的遺伝子治療は、循環器疾患においても非常に有効な方法論となると期待できる。本システムを循環器疾患に適用するには、疾患特異的な細胞内シグナルを設定せねばならないが、ここでの検討により、標的シグナルとして Rho キナーゼが適していることを明らかにすることができた。さらに、実用的な Rho キナーゼ応答型システムが完成したとしても、実際に、循環器疾患へのナノカプセルの適用や、その治療効果の有効な評価法については全く先例がなかった。今回、この両者について、確立することに成功し、実用性の評価の体制が完全に整った。また、ここで開発した MRI 造影剤は、遺伝子制御システムの効果の評価に重要であるばかりでなく、それ自体、創薬や診断に極めて有望であると考えられ、今後の実用化に期待している。

4 研究参加者

①片山グループ(遺伝子制御剤の開発と、その基礎評価、メカニズム解析の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
片山佳樹	九州大学	教授	研究の総括 遺伝子制御剤の設計 システム化	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
新留琢郎	九州大学	准教授	In vivo での評価	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
森 健	九州大学	助教	遺伝子制御ポリマーの 設計、合成	平成 18 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
村田正治	九州大学	准教授 (助教)	高分子主鎖の効果検討	平成 15 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
姜 貞勲	九州大学	CREST 研 究員	In vivo および細胞にお ける制御剤評価	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月
佐藤祐子	九州大学	CREST 研 究員	Src 応答型キャリアーの 開発とメカニズム解析	平成 17 年1月～ 平成 20 年 3 月
浅井大輔	九州大学	CREST 研 究員	キャリアーの in vivo 適 用法開発	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月

児玉耕太	九州大学	CREST 研究員	HIVプロテアーゼ応答型システムの開発	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 6 月
河村健司	九州大学	博士課程学生	プロテアーゼ応答型システムの開発	平成 15 年 10 月～ 平成 19 年 3 月
紫垣修平	九州大学	博士課程学生	基質探索システム開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
井上雄介	九州大学	博士課程学生	基質探索法の開発	平成 15 年 10 月～ 平成 19 年 3 月
大石 潤	九州大学	博士課程学生	キナーゼ応答型キャリアの設計法の確立	平成 15 年 10 月～ 平成 19 年 3 月
西 健太郎	九州大学	博士課程学生	プロテアーゼ応答型システムの開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
佐尾賢太郎	九州大学	博士課程学生	がん特異的システムの評価	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
生田健次郎	九州大学	博士課程学生	循環器疾患用造影剤合成	平成 17 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
野上貴士	九州大学	修士課程学生	複合体細胞導入法の検討	平成 15 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
浦崎哲彦	九州大学	修士課程学生	循環器疾患用造影剤合成	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
山地 貴之	九州大学	修士課程学生	基質探索法の開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
姜 玉花	九州大学	修士課程学生	Rho キナーゼ応答型システム開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
韓 暁明	九州大学	修士課程学生	基質探索法の開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
佐藤 大	九州大学	修士課程学生	キャリアの検討	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
寺田 恵子	九州大学	修士課程学生	Src 応答型システムの開発とメカニズム検討	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 3 月
伊集院萌子	九州大学	修士課程学生	PKA 応答型システムによるカプセル適用	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
古賀 敦雄	九州大学	修士課程学生	造影剤開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
戸井田 力	九州大学	修士課程学生	MEND の適用	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
土屋 亨	九州大学	修士課程学生	ソノポレーション法の検討	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
倉本政則	九州大学	修士課程学生	プロテアーゼ応答型システム開発	平成 18 年 4 月～ 平成 19 年 10 月
斎藤善正	藤沢薬品工業株式会社	部長	プラズマ法の開発	平成 15 年 10 月～ 平成 17 年 3 月
小川恭弘	藤沢薬品工業株式会社	課長	プラズマ法の開発	平成 15 年 10 月～ 平成 18 年 3 月

佐藤 晋	BBK バイオ株式会社	社長	プラズマ法の開発	平成 18 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
飯尾明生	BBK バイオ株式会社	主任研究員	プラズマ法の開発	平成 18 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
佐伯 登	パール工業株式会社	技術開発室長	プラズマ法の開発	平成 18 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
橋口倫代	九州大学	チーム事務員	研究の事務	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
増本奈巳	九州大学	研究補助員	ペプチドの合成	平成 19 年 4 月～ 平成 20 年 3 月

②谷澤グループ(中空バイオナノ粒子の開発と、遺伝子制御システム適用検討の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
谷澤克行	大阪大学	教授	中空バイオナノ粒子開発と評価に関する研究の総括	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
黒田俊一	大阪大学	准教授	中空バイオナノ粒子開発と評価	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
立松健司	大阪大学	助教	カプシド発現株の樹立、精製法の確立	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
鄭 周姫	大阪大学	CREST 博士研究員	中空バイオナノ粒子開発と評価	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
山田忠範	大阪大学	J S P S 研究員	中空バイオナノ粒子への封入法検討	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
出射真奈	大阪大学	博士研究員	中空バイオナノ粒子の in vivo 検討	平成 16 年 4 月～ 平成 17 年 3 月
三好麻紀	大阪大学	研究補助員	中空バイオナノ粒子への封入法検討	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月
粕谷武史	大阪大学	修士課程学生	ナノ粒子の細胞への取り込み評価	平成 17 年 4 月～ 平成 18 年 3 月

③東海林グループ(各種標的シグナル応答型システムの細胞内評価と、ウイルス疾患用プロテアーゼ応答型システムの開発、およびその評価系の確立の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
東海林洋子	聖マリアンナ医科大学	准教授	ウイルス疾患への適用検討に関する研究の総括	平成 15 年 10 月～ 平成 20 年 3 月
中島秀喜	聖マリアンナ医科大学	教授	抗 HIV 効果の in vitro スクリーニングの研究総括	平成 16 年 4 月～ 平成 20 年 3 月

浅井大輔	聖マリアンナ医科大学	助教	細胞内シグナル応答型キャリアーの培養細胞で評価	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
寺久保繁美	聖マリアンナ医科大学	研究補助員	抗 HIV 効果の in vitro スクリーニング	平成 15 年 10 月～平成 17 年 3 月
乗松美貴	聖マリアンナ医科大学	研究補助員	抗 HSV 効果の in vitro スクリーニング	平成 15 年 10 月～平成 18 年 3 月
余村寧恵	聖マリアンナ医科大学	大学院生	NO のモニタリングシステムの構築	平成 16 年 4 月～平成 18 年 3 月

④下川グループ(循環器系疾患への遺伝子制御システム適用のための実験系の確立の研究)

氏 名	所 属	役 職	研究項目	参加時期
下川宏明	東北大学 H18 年 3 月までは九州大学	教授 (助教授)	循環器疾患への適用検討に関する研究の総括	平成 15 年 10 月～平成 20 年 3 月
橋本義弘	東北大学	助教	循環器疾患への適用検討	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
縄田 淳	東北大学	助教	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
伊藤健太	東北大学	研究員	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
杉村宏一郎	東北大学	医員	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
伊藤愛剛	東北大学	大学院生	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
白都 宗	東北大学	大学院生	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
田原俊介	東北大学	受託研究員	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
Mumnur Rashid	東北大学	学振特別研究員	循環器疾患への適用・ナノ医療開発	平成 18 年 4 月～平成 20 年 3 月
大井啓司	九州大学	大学院生	動物モデルでの検討	平成 15 年 10 月～平成 17 年 3 月
上徳豊和	九州大学	研究生	造影剤、ナノ医療開発	平成 15 年 10 月～平成 18 年 3 月
阿部弘太郎	九州大学	大学院生	培養細胞での検討	平成 15 年 10 月～平成 17 年 3 月
樋詰貴登士	九州大学	大学院生	大動物での検討	平成 15 年 10 月～平成 18 年 3 月
姉川 剛	九州大学	大学院生	機能化造影剤開発	平成 17 年 3 月～平成 18 年 3 月

5 招聘した研究者等

氏 名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
な し			

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌○件、国際誌△件)

《著者、論文タイトル、掲載誌 巻、号、発行年》

1. Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Riki Toita, Yuhua Jiang, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Role of plasma as activator and cofactor in phosphorylation by protein kinase C , *Cell Biochem. Funct.* in press
2. Yasuda S, Ikuta K, Uwatoku T, Oi K, Abe K, Hyodo F, Yoshimitsu K, Sugimura K, Utsumi H, Katayama Y, Shimokawa H. In vivo MRI imaging of atherosclerotic lesions with a newly developed Evans blue-DTPA-gadolinium contrast medium in apoprotein E-deficient mice. *J Vasc Res.* (in press).
3. Fukumoto Y, Mohri M, Inokuchi K, Ito A, Hirakawa Y, Masumoto A, Hirooka Y, Takeshita A, Shimokawa H. Anti-ischemic effects of fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina. *J Cardiovasc Pharmacol.* (in press).
4. Iwasaki Y., Ueda M., Yamada T., Kondo A., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S., Sakamoto M., Kitajima M., Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles, *Cancer Gene Ther.* 14, 74-81 (2007)
5. Jun Oishi, Yoji Asami, Takeshi Mori, Jeong-Hun Kang, Mihar Tanabe, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Measurement of homogeneous kinase activity for cell lysates based on the aggregation of gold nanoparticles, *ChemBioChem*, 8, 875-877, (2007)
6. Yomura, Y., Shoji, Y., Asai, D., Murakami, E., Ueno, S., and Nakashima, H.: Direct, real-time, simultaneous monitoring of intravitreal nitric oxide and oxygen in endotoxin-induced uveitis in rabbits., *Life Sci.*, 80, 1449-1457 (2007)
7. Takeshi Mori, Suguru Beppu, Isao Fukushima, Toru Kobayashi, Kenji Minagawa, Masami Tanaka, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Temperature-responsive poly(dehydroalanine)s: Diversifying phase transition temperatures utilizing alpha, alpha-disubstituted motif, *Chem. Lett.*, 36, 334-335 (2007)
8. Takeshi Mori, Shiro Yasutake, Hideki Inoue, Keiji Minagawa, Masami Tanaka, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, "Threading" of beta-sheet peptides via radical polymerization, *Biomacromolecules*, 8, 318-321 (2007)
9. Shuhei Shigaki, Takayuki Yamaji, Xiaoming Han, Go Yamanouchi, Tatsuhiko Sonoda, Osamu Okitsu, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiaki Katayama, A peptide microarray for the detection of protein kinase activity in cell lysate, *Anal. Sci.*, 23, 271-275 (2007)
10. Atsushi Shiotani, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yasuro Niidome, Yoshiaki Katayama, Stable incorporation of gold nanorods into N-isopropylacrylamide hydrogels and their rapid shrinkage induced by near-IR laser irradiation, *Langmuir*, 23, 4012-4018 (2007)
11. Takayuki Iida, Takeshi Mori, Yoshiaki Katayama, Takuro Niidome, Overall interaction of cytosolic proteins with the PEI/DNA complex, *J. Control Release*, 118, 364-369 (2007)
12. Nagaoka T., Fukuda T., Yoshida S., Yu D., Kuroda S., Tanizawa K., Kondo A., Ueda

- M., Yamada H., Tada H., Seno M., Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification, *J. Control Release*, 118, 348-356 (2007).
13. Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Riki Toita, Yuhua Jiang, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Role of plasma as activator and cofactor in phosphorylation by protein kinase C , *Cell Biochem. Funct. in press*
 14. Jeong-Hun Kang, Aishan Han, Shuhei Shigaki, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Riki Toita, Xiao Ming Han, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Mass-tag technology responding to intracellular signals as a novel assay system for the diagnosis of tumor, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 18, 106-112 (2007)
 15. Jeong-Hun Kang, Yuhua Jiang, Riki Toita, Jun Oishi, Kenji Kawamura, Aishan Han, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Masami Ishida, Kenji Tatematsu, Katsuyuki Tanizawa, Yoshiki Katayama, Phosphorylation of Rho-associated kinase (Rho-kinase/ROCK/ROK) substrates by protein kinases A and CPhosphorylation of Rho-associated kinase (Rho-kinase/ROCK/ROK) substrates by protein kinases A and C, *Biochimie*, 89, 39-47 (2007)
 16. Iwasaki, Y., Ueda, M., Yamada, T., Kondo, A., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Sakamoto, M., and Kitajima, M., Gene Therapy of Liver Tumors with Human Liver-Specific Nanoparticles, *Cancer Gene Ther.* 14, 74-81 (2007)
 17. Iwasaki Y., Ueda M., Yamada T., Kondo A., Seno M., Tanizawa K., Kuroda S., Sakamoto M., Kitajima M., Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles, *Cancer Gene Ther.* 14, 74-81 (2007)
 18. Tawara S, Fukumoto Y, Shimokawa H. Effects of combined therapy with a Rho-kinase inhibitor and prostacyclin on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 50:195-200,2007.
 19. Fukumoto Y, Mohri M, Inokuchi K, Ito A, Hirakawa Y, Masumoto A, Hirooka Y, Takeshita A, Shimokawa H. Anti-ischemic effects of fasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, in patients with stable effort angina. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49:117-121,2007.
 20. Jiang BH, Tawara S, Abe K, Takaki A, Fukumoto Y, Shimokawa H. Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 49:85-89,2007.
 21. Nagaoka T., Fukuda T., Yoshida S., Yu D., Kuroda S., Tanizawa K., Kondo A., Ueda M., Yamada H., Tada H., Seno M., Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification, *J. Control Release*, 118, 348-356 (2007)
 22. Kenji Kawamura, Jun Oishi, Shigeki Sakakihara, Takuto Niidome, Yoshiki Katayama, Intracellular signal-responsive artificial gene regulation. *J. Drug Target.* 14, 456-464 (2006)
 23. Jun Oishi, Moeko Ijuin, Tatsuhiko Sonoda, Jeong-Hun Kang, Kenji Kawamura, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A protein kinase signal-responsive gene carrier modified RGD peptide, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16, 5740-5743 (2006)
 24. Kota Kodama, Yoshiki Katayama, Yoko Shoji, Hideki Nakashima. The features and shortcomings for gene delivery of current non-viral carriers, *Curr. Med. Chem.*, 13, 2155-2161 (2006)
 25. Jeong-Hun Kang, Riki Toita, Yuhua Jiang, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Simultaneous analysis of phosphorylated peptides by MALDI-TOF-MS, *Chromatographia*, 63, 595-598 (2006)
 26. Jun Oishi, Kenji Kawamura, Jeong-Hun Kang, Kota Kodama, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, An intracellular kinase signal-responsible gene carrier for disordered cell-specific gene therapy, *J. Control. Release* 110, 431-436 (2006)
 27. Yasunari Sakai, Vahid Khajoei, Yasuro Ogawa, Koichi Kusuhara, Yoshiki Katayama, Toshiro Hara, A novel transfection method for mammalian cells using gas plasma, *J. Biothechnol.* 121, 299-308 (2006)

28. Shishido, T., Muraoka, M., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., Kuroda, S., Fukuda, H., and Kondo, A., Secretory production system of bionanocapsules using a stably transfected insect cell line, *Appl. Microbial. Biotechnol.* 73, 505-511 (2006)
29. Peridsky Y, Heilman D, Haorah J, Zelivyanskaya M, Persidsky R, Weber GA, Shimokawa H, Kaibuchi K, Ikezu T. Rho-mediated regulation of tight junctions during monocyte migration across blood-brain barrier in HIV encephalitis (HIVE). *Blood.* 107:4770-4780 (2006)..
30. Furuyama T, Komori K, Shimokawa H, Matsumoto Y, Uwatoku T, Hirano K, Yoshihiko Maehara Y. Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses intimal thickening in autologous vein graft in rabbits. *J Vasc Surg.* 43:1249-1256 (2006).
31. Yada T, Shimokawa H, Kajiya F. Cardioprotective effect of hydroxyfasudil as a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microvessels. *Clin Hemorheol Microcirc.* 34:177-183 (2006).
32. Chapados R, Abe K, Elliot J, Ihida-Stunbery K, McKean D, Gates AT, Kern M, Merklinger S, Elliot J, Plant A, Shimokawa H, Jones PL. ROCK controls matrix remodeling in pulmonary hypertension. *Circ Res.* 99:837-844 (2006).
33. Sun X, Minohara M, Kikuchi H, Ishizu T, Tanaka M, Piao H, Osoegawa M, Ohyagi Y, Shimokawa H, Kira J. The selective Rho-kinase inhibitor Fasudil is protective and therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 180:126-134 (2006).
34. Hizume T, Morikawa K, Takaki A, Abe K, Sunagawa K, Amano M, Kaibuchi K, Kubo C, Shimokawa H. Sustained elevation of serum cortisol level causes sensitization of coronary vasoconstricting responses in pigs in vivo. - A possible link between stress and coronary vasospasm -. *Circ Res.* 99:767-775 (2006).
35. Abe K, Tawara S, Oi K, Hizume T, Uwatoku T, Fukumoto Y, Kaibuchi K, Shimokawa H. Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 48:280-285 (2006).
36. Miura M, Hata Y, Hiratyama K, Kita T, Noda Y, Fujisawa K, Shimokawa H, Ishibashi T. Critical role of the Rho-kinase pathway in TGF- β 2-dependent collagen gel contraction by retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res.* 82:849-859 (2006).
37. Takahito Kawano, Masato Yamagata, Hironobu Takahashi, Yasuro Niidome, Sunao Yamada, Yoshiki Katayama, Takuro Niidome, Stabilizing of plasmid DNA *in vivo* by PEG-modified cationic gold nanoparticles and the gene expression assisted with electrical pulses, *J. Control. Release* 111, 382-389 (2006)
38. Aishan Han, Tatsuhiko Sonoda, Jeong-Hun Kang, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Development of a fluorescence peptide chip for the detection of caspase activity, *Comb. Chem. High T. Scr.* 9, 21-25, (2006).
39. Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Controlled gene delivery responding to cell signals using peptide-polymer conjugates, *Recent Res. Bioconjugate Chem.* 2, 145-158, (2005)
40. Tatsuhiko Sonoda, Takashi Nogami, Jun Oishi, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A Peptide Sequence Controls the Physical Properties of Nanoparticles Formed by Peptide-Polymer Conjugates That Respond to a Protein Kinase A Signal, *Bioconjugate Chem.* 16, 1542-1546, (2005)
41. Kazuki Inamori, Motoki Kyo, Yoshiaki Nishiya, Yusuke Inoue, Tatsuhiko Sonoda, Eiji Kinoshita, Tohru Koike, Yoshiki Katayama, Detection and Quantification of On-Chip Phosphorylated Peptides by Surface Plasmon Resonance Imaging Techniques Using a Phosphate Capture Molecule, *Anal. Chem.*, 77, 3979-3985, (2005)
42. Kenji Kawamura, Jun Oishi, Jeong Hun Kang, Kota Kodama, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Expression, *Biomacromolecules.* 6, 908-913, (2005)
43. Yu, D., Amano, C., Fukuda, T., Yamada, T., Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, H., Tada, H., and Seno, M., The Specific Delivery of Proteins to

- Human Liver Cells by Engineered, Bio-Nanocapsules., *FEBS J.* 272 3651-3660, (2005).
44. Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart.* 91:391-392,(2005).
 45. Ito K, Hirooka Y, Kimura Y, Shimokawa H, Takeshita A: Effects of hydroxyfasudil administered to the nucleus tractus solitarius on blood pressure and heart rate in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 3:269-277,(2005).
 46. Yada T, Shimokawa H, Hiramatsu O, Kajiya T, Shigeto F, Tanaka E, Shinozaki Y, Mori H, Kiyooka T, Katsura M, Ohkuma S, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F. Beneficial effects of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microcirculation in vivo. *J Am Coll Cardiol.* 45:599-607,(2005).
 47. Abe K, Morikawa K, Hizume T, Uwatoku T, Oi K, Seto M, Ikegaki I, Asano T, Kaibuchi K, Shimokawa H. Prostacyclin does not inhibit Rho-kinase: An implication for the treatment of pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol.* 45:120-124,(2005).
 48. Kishi T, Hirooka Y, Masumoto A, Ito K, Kimura Y, Inokuchi K, Tagawa T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circulation.* 111:2741-2747,(2005).
 49. Nagaoka T, Fagan KA, Gebb SA, Morris KG, Suzuki T, Shimokawa H, McMurtry IF, Oka M. Inhaled Rho kinase inhibitors are potent and selective vasodilators in rat pulmonary hypertension. *Am J Respir Critical Care Med.* 171:494-499,(2005).
 50. Hedjazifar S, Jenndahl LE, Shimokawa H, Baeckström D. PKB mediates c-erbB2-induced epithelial α 1 integrin conformational inactivation through Rho-independent F-actin rearrangements. *Exp Cell Res.* 307:259-275,(2005).
 51. Rao PV, Deng P, Maddala R, Epstein DL, Li CY, Shimokawa H. Expression of dominant-negative Rho-binding domain of Rho-kinase in organ cultured human eye anterior segments increases aqueous humor outflow. *Mol Vision.* 11:288-297,(2005).
 52. Ito K, Hirooka Y, Hori N, Kimura Y, Sagara Y, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa K. Inhibition of Rho-kinase in the nucleus tractus solitarius enhances glutamate sensitivity in rats. *Hypertension.* 46:360-365,(2005).
 53. Kozai T, Eto M, Matter C, Young Z, Shimokawa H, Luscher T. Stains prevent pulsatile stretch-induced proliferation of human saphenous vein smooth muscle cells via inhibition of Rho/Rho-kinase pathway. *Cardiovasc Res.* 68:475-482,(2005).
 54. Wakabayashi H., Nishishiro M, Arikawa S, Hashimoto K, Kikuchi H, Nishikawa H, Kurihara T, Terakubo S, Shoji Y, Nakashima H, Motohashi N, sakagami H. Cytotoxic activity of azulenequinones against human oral tumor cell line. *Anticancer Res.* 25:305-312,(2005)
 55. Sakagami H., Matsumoto H., Satoh K., Shioda S., Ali C.S., Hashimoto K., Kikuchi H., Nishikawa H., Terakubo S., Shoji Y., Nakashima H., Shimada J. Cytotoxicity and radical modulating activity of Moxa smoke. *In Vivo* 19:391-398,(2005)
 56. K. Kawamura, J. Oishi, J-H. Kang, K. Kodama, T. Sonoda, M. Murata, T. Niidome, Y. Katayama, Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Expression, *Biomacromolecules* 6, 908-913 (2005)
 57. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, F. Hyodo, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, H. Utsumi, Y. Katayama, In vivo MR Detection of Vascular Endothelial Injury Using A New Class of MRI Agent, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 2787-2790 (2004)
 58. T. Yamamoto, K. Ikuta, K. Oi, K. Abe, T. Uwatoku, M. Murata, N. Shigetani, K. Yoshimitsu, H. Shimokawa, Y. Katayama, , First Functionalized MRI Contrast Agent Recognizing Vascular Lesions, *Anal. Sci.* 20, 5-7 (2004)

59. T. Sonoda, S. Shigaki, T. Nagashima, O. Okitsu, Y. Kita, M. Muarata, Y. Katayama, Mass-Tag Technology for Monitoring of Protein Kinase Activity Using Mass Spectrometry, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**, 847-850 (2004)
60. Yamada, T., Kondo, A., Ueda, M., Seno, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S., Novel Tissue and Cell Type-specific Gene Delivery System Using Surface Engineered Hepatitis B Virus Nanoprotein Particles., *Current Drug Targets: Infectious Disorders* **4**, No. 2, 163-167, (2004).
61. Yamada, T., Seno, M., Kondo, A., Ueda, M., Tanizawa, K., and Kuroda, S., Pinpoint Drug Delivery System Using Hollow Bio-Nanoparticles, *高分子論文集* **61**, No. 12, 606-612 (2004).
62. Shoji Y., Nakashima H., Nutraceuticals and delivery systems, *J Drug Targeting*, **12(6)**, 385-391 (2004).

(2)その他の著作物（総説、書籍など）

1. 片山佳樹、細胞と対話する分子システムー細胞内シグナル応答を利用した遺伝子治療の可能性ー、現代科学、2007年6月
2. 片山佳樹、SNP(一塩基多型)による遺伝子診断法、ぶんせき、2007年6月
3. Ueda M, Iwasaki Y, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. *Cancer Gene Ther.* 14, 440 (2007)
4. 鄭周姫、粕谷武司、谷澤克行、黒田俊一 生体内ピンポイント投与を可能にするバイオナノカプセル 日本薬学会誌 *Yakugaku Zasshi*. 2007 May;127(5):797-805.
5. 黒田俊一(分担) ウイルス、ナノバイオ辞典 (株)テクノシステム(東京)(2007)
6. 黒田俊一(分担) 中空バイオナノ粒子、ナノバイオ辞典 (株)テクノシステム(東京)(2007)
7. 黒田俊一(分担) DDS、ナノバイオ辞典 (株)テクノシステム(東京)(2007)
8. 片山佳樹、MRI 造影剤の研究動向と展望、化学 61、23-27, 2006年1月
9. 片山佳樹、細胞情報に応答するポリマードラッグ、高分子 55、326-329, 2006年
10. 村田正治・片山佳樹・橋爪誠、電気化学バイオセンサによる蛋白質機能解析、臨床検査増刊号・ナノテクノロジーとバイオセンサ 50、1477-1486, 2006年
11. 片山佳樹、ペプチドアレイの現状と、診断・創薬のための細胞内シグナル解析用ペプチドアレイ、臨床検査増刊号・ナノテクノロジーとバイオセンサ 50、1538-1548, 2006年
12. 稲森和紀、京 基樹、松川和樹、片山佳樹、SPR 用バイオチップーSPR イメージング技術による On-chip リン酸化検出ー、BIOINDUSTRY、Vol.23, 35-43 (2006)
13. 河村健司・片山佳樹、細胞内シグナル応答型システムを用いる遺伝子送達、日本離床・特集 ナノテクノロジーと医療 64、265-270, 2006年
14. 片山佳樹(共著)、ナノ治療工学、生体工学概論・コロナ社、124-133 (2006)
15. Yu, D., Fukuda, T., Tuoya, Kuroda, S., Tanizawa, K., Kondo, A., Ueda, M., Yamada, T., Tada, H., and Seno, M., Engineered Bio-nanocapsules, the Selective Vector for Drug Delivery System, *IUBMB Life* **58** (2006), 1-6.
16. 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和、中空バイオナノ粒子を用いた DDS の開発とその産業化、*Drug Delivery System* (2006), Vol.21, No. 4, 435-443.
17. 粕谷武司、鄭 周姫、谷澤克行、黒田俊一、遺伝子・薬剤の生体内ピンポイントデリバリーを可能にするバイオナノカプセルの現状とこれから、化学と生物 (2006), Vol.44, No.11, 760-766.
18. 黒田俊一、粕谷武史、鄭周姫、谷澤克行、バイオナノカプセルの開発とバイオメディカル分野での応用、化学工業 (2006), Vol. 57, No.11, 869-874.
19. 黒田俊一、バイオナノカプセルの開発と医薬品分野での応用、*PHARM STAGE* (2006), Vol. 6, No. 8, 61-69.
20. 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和、バイオナノキャリアの開発とがん遺

- 伝子治療への応用、バイオテクノロジージャーナル(2007), Vol. 7. No. 1, 41-47.
21. Yamada, T., Jung, J., Seno M., Kondo A., Ueda M., Tanizawa K., Kuroda, S.(分担) Bionanocapsules using the hepatitis B virus envelope L protein, Gene Transfer (Delivery and expression of DNA and RNA) Cold Spring Harbor Laboratory Press, John Rossi & Theodore Friedmann Eds., 487-490 (2007).
 22. 鄭周姫、黒田俊一(分担) ピンポイントデリバリー ナノパーティクルテクノロジーハンドブック、細川益男・野城清編集、日刊工業新聞社 (2006).
 23. 黒田俊一(分担) ナノバイオ辞典(山根恒夫・松永是監修)(2007);株式会社テクノシステム(東京) DDS
 24. 黒田俊一(分担) ナノバイオ辞典(山根恒夫・松永是監修)(2007);株式会社テクノシステム(東京) 中空バイオナノ粒子
 25. 黒田俊一(分担) ナノバイオ辞典(山根恒夫・松永是監修)(2007);株式会社テクノシステム(東京) ウイルス
 26. Shimokawa H, Rashid M. Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine. Its rationale and current status. *Trends Pharmacol Sci.* (in press)
 27. Fukumoto Y, Tawara S, Shimokawa H. Recent progress in the treatment of pulmonary arterial hypertension -Expectation for Rho-kinase inhibitors- *Tohoku J Exp Med.* (in press)
 28. 田原俊介、下川宏明：血管平滑筋機能と病態 —Rho キナーゼの関与— 循環器科 59:226-232,2006.
 29. 田原俊介、下川宏明：循環器疾患と Rho キナーゼ. 循環制御 27:121-129,2006.
 30. 安田 聡、下川宏明：虚血性心臓病診療の現状と展望. 臨床と研究 84:1-6,2007
 31. 下川宏明：心血管病に対する先端医療の開発. 東北医学雑誌 118:129-131,2007.
 32. 田原俊介、下川宏明：Rho キナーゼ研究の進展と阻害剤の将来展望. YAKUGAKU ZASSHI 127:501-514,2007.
 33. 田原俊介、下川宏明：冠動脈攣縮と Rho キナーゼ. 菅村和夫、佐竹正延 (編)：シグナル伝達病を知る —その分子機序解明から新たな治療戦略まで— pp.301-305. メディカルドウ社、2006.
 34. 東海林洋子^{1,2}、児玉耕太³、浅井大輔^{1,2}、片山佳樹^{2,4}、中島秀喜^{1,2} (¹聖マリアンナ医大・微生物学、²JST-CREST、³岐阜大人獣感染防御研究セ、⁴九大院工)：感染細胞内におけるシグナル応答型の DDS、Drug Delivery System, 21, 505-515 (2006).
 35. 片山佳樹、山本竜広、下川宏明、内皮傷害部位を特異的に診断できる造影剤、Bio Medicinal Quick Review Net, No.4009, 1-5 (2004)
 36. 片山佳樹、ケミストからみたポストゲノム 10～プロテオミクスにおける質量分析へ、Dojin News, No.110, 10-16 (2004)
 37. 黒田俊一、妹尾昌治、近藤昭彦、上田政和、谷澤克行、中空バイオナノ粒子が拓く新しい医療技術、月刊「化学工業」 55, No. 12, 40-46 (2004)
 38. 鄭周姫、黒田俊一、ナノテクが導く「効果的な遺伝子治療」、月刊「化学」 60, No. 1, 23-25 (2005)
 39. 黒田俊一、バイオベンチャー起業物語「ビークル」、月刊「バイオインダストリー」 22, No. 4, 88-95(2005)
 40. 片山佳樹、山本竜広、下川宏明、内皮傷害部位を特異的に診断できる造影剤、Bio Medicinal Quick Review Net, No.4009, 1-5 (2004)
 41. 近藤昭彦、黒田俊一、谷澤克行、妹尾昌治、上田政和、“中空バイオナノ粒子によるピンポイントドラッグデリバリーシステム”，化学工学, Vol. 67, pp. 686?688 (2003).
 42. 妹尾昌治、黒田俊一、近藤昭彦、多田宏子、谷澤克行、上田政和，“バイオナノ粒子を用いる遺伝子・薬剤のピンポイントドラッグデリバリーシステム”，バイオインダストリー, Vol. 4, pp. 54?62 (2003).
 43. S. Kuroda, T. Yamada, and K. Tanizawa, "Nanoparticle-directed tissue-specific

- delivery system for genes and drugs”, Discovery Medicine, Vol. 3, No. 18, pp. 56-57 (2003).
44. 黒田俊一、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行（分担執筆）ナノバイオテクノロジーの最新技術（植田充美編著、総ページ数：439 頁）： CMC 出版、(2003)
 45. 黒田俊一、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行（分担執筆）ナノパーティクル・テクノロジー（細川益男監修・野城清編著、総ページ数：257 頁）：日刊工業新聞社、(2003)
 46. 黒田俊一、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行（分担執筆）ナノパーティクル・テクノロジー（細川益男監修・野城清編著、総ページ数：257 頁）：日刊工業新聞社、(2003)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

① 招待講演 58 件（国内会議40件、国際会議18件）

1. 片山佳樹(九州大学)、細胞内シグナルに着目した新しいナノメディスンと DDS、Molecular Cardiovascular Conference、北海道余市郡キロロ・ホテルピアノ、9 月 14 日、2007 年
2. Shimokawa H. (Tohoku University)、Development of Rho-kinase inhibitors for cardiovascular medicine.、the Hong Kong Pharmacological Society 、Hong Kong、6 月 29 日、2007 年
3. 片山佳樹(九州大学)、ガドリニウム錯体を用いる新規MRI造影剤の開発と応用、希土類学会、福岡市九州大学百年講堂、5 月 17 日、2007 年
4. Yoshiki Katayama (Kyushu University)、Novel Gene Regulation System Responding to Protein Kinase C α for Cancer Therapy and Imaging.、The Third A3 Foresight Joint Symposium on Gene Therapy、Daejeon, Korea (Legend Hotel)、5 月 8 日、2007 年
5. 片山佳樹(九州大学)、バイオ分析、日本化学会 第 87 春季年会、関西大学千里山キャンパス（大阪府吹田市）、3 月 26 日、2007 年
6. Kuroda S. (Osaka U.)、Development of in vivo pinpoint gene and drug delivery system---A world of fantastic voyage、SANKEN(Osaka University) Workshop on Nano-Bioscience 、Berkeley, CA, USA、2007 年 3 月 21-22 日
7. Shimokawa H. (Tohoku University)、Recent progress in the management of vasospastic angina、The Myung-In Cardiovascular Lecture、Kobe, Japan、3 月 16 日 2007 年
8. 下川宏明（東北大学）、Rho-kinase 阻害薬開発に向けての展開研究、第 80 回日本薬理学会年会(シンポジウム「創薬ターゲットとしてのプロテインキナーゼ」)、名古屋市、3 月 14 日、2007 年
9. Yoshiki Katayama (Kyushu Univ.)、New Concept for Gene Therapy using Intracellular-responsive Gene Regulating System、第 4 日瑞バイオナノワークショップ、(独) 物質・材料研究機構（茨城県つくば市）、2006 年 11 月 12-14 日
10. 片山佳樹(九州大学)、細胞の言葉を聞く分子を用いる新しい治療法、診断法、第 4 回化学イノベーションシンポジウム、九州大学百年記念講堂（福岡市東区）、2006 年 11 月 12 日
11. 片山佳樹(九州大学)、細胞と対話する分子 –副作用のない薬や治療法はできるか?、公開市民講座、福岡市ソフトリサーチパーク（福岡市早良区）、2006 年 10 月 29 日
12. Kuroda S. (Osaka U.)、Development of bio-nanocapsule technology for in vivo pinpoint gene delivery、La Jolla-Capri-Yamaguchi-Seoul Research Conferences、Hokumon Yashiki Hotel、山口、日本、2006 年 10 月 6 日～8 日
13. 下川宏明(東北大学)、心血管病の新しい治療標的としての Rho-kinase の意義、第 134 回東北大学病院臨床集談会、仙台市、宮城県、9 月 21 日、2006 年
14. 下川宏明(東北大学)、循環器領域における先端医療の開発、BioJapan 2006、大阪市、9 月 15 日、2006 年

15. Shimokawa H. (Tohoku Univ.)、Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine、Invited Lecture at the Headquarter of CoTherix Co.、San Francisco, USA、September 8, 2006 年
16. Shimokawa H. (Tohoku Univ.)、Rho-kinase inhibitors in cardiovascular diseases、Grover Conference on the Pulmonary Circulation、Denver, USA、September 6-10 日、2006 年
17. Shimokawa H. (Tohoku Univ.)、Rho-kinase inhibitors、XVth World Congress of Cardiology/European Society of Cardiology Congress 2006、Barcelona, Spain、September 2-6, 2006 年
18. 片山佳樹(九州大学)、創薬・診断用を指向した細胞内シグナル網羅的解析用ペプチドアレイ、東京コンファレンス・シンポジウムー ケミカルバイオロジーと分析化学、幕張メッセ (千葉市美浜区)、2006 年 9 月 1 日
19. Shimokawa H. (Tohoku Univ.)、Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine、The 15th World Congress of Pharmacology、Beijing, China、July 2-7, 2006 年
20. 片山佳樹(九州大学)、医工連携による新しいナノ診断法・ナノ治療法の開発、第 5 回 Vascular Science 研究会、東京都港区、ホテル日航東京、6 月 30 日、2006 年
21. Shimokawa H. (Tohoku Univ.)、Therapeutic importance of Rho-kinase in cardiovascular medicine、11th International Vascular Neuroeffector Mechanisms and Cardiovascular Pharmacology and Medicine Symposia、Soochow、June 27, 2006 年
22. 片山佳樹(九州大学)、ナノ工学を用いる新しい診断法・治療法、第 21 回福岡循環器病研究会、福岡市東区、九州大学医学部カンファレンスルーム、2006 年 5 月 29 日
23. 下川宏明 (東北大学)、虚血性心臓病の治療：最近の進歩、日本高血圧学会生涯教育セミナー、広島市、広島県、5 月 18 日、2006 年
24. 下川宏明 (東北大学)、循環器疾患の新たな治療標的としての Rho-kinase の意義、第 62 回福島循環器談話会、いわき市、岩手県、5 月 13 日、2006 年
25. 下川宏明 (東北大学)、創薬の標的としての Rho/Rho-kinase 経路の重要性、日本薬学会第 126 年会ランチョンセミナー、仙台市、3 月 30 日、2006 年
26. 片山佳樹 (九州大学)、生体情報のセンシングおよび利用技術の開発と新しいコンセプトの創製、BICS シンポジウム (日本化学会春季年会)、横浜、3 月 27 日、2006 年
27. 片山佳樹 (九州大学)、ポストゲノム時代のバイオテクノロジーと新しい技術開発の試み、BT/NT/IT 関連産業振興研究会、福岡市、3 月 22 日、2006 年
28. Yoshiki Katayama(Kyushu University)、Peptide array as novel tool for drug screening or diagnosis、The International Symposium on Regulation of Protein through Post-translational Modifications、北海道、3 月 16 日、2006 年
29. 黒田俊一 (大阪大学)、Development of Bio-nanocapsule Technology for in vivo Pinpoint Gene Delivery---A Hybrid of Virus and Liposome---、韓国忠南大学生物工学センター発足 20 周年記念国際シンポジウム、Taejon, Korea、2 月 15 日、2006 年
30. 下川宏明 (東北大学)、虚血性心臓疾患の治療：最近の進歩、第 178 回日本内科学会東北地方会 (生涯教育講演)、仙台市、2 月 18 日、2006 年
31. 黒田俊一 (大阪大学)、Bionanocapsules for Pinpoint Drug and Gene Delivery---A Hybrid of Virus and Liposome---、近畿バイオ主催第 4 回遺伝子治療シンポジウム、大阪市、2 月 3 日、2006 年
32. 片山佳樹 (九州大学)、生命・細胞情報と化学情報を相互変換して利用する分子システムー薬物探索、遺伝子機能解析から診断、治療までー、未来化学創造センター開所記念シンポジウム、東京、2 月 1 日
33. Yoshiki Katayama(Kyushu University)、Intracellular signal-responsive gene delivery for cell-specific gene therapy、阪大ナノサイエンスナノテクノロジー国際シンポジウム、大阪市、1 月 30 日、2006 年
34. 下川宏明 (東北大学)、虚血性心臓疾患の診療：最近の進歩、第 33 回日本内科学会九

- 州地方会生涯教育講演会、福岡市、1月28日、2006年
35. 黒田俊一 (大阪大学)、鄭周姫 (大阪大学)、谷澤克行 (大阪大学)、Bionanocapsules for Pinpoint Drug and Gene Delivery---A Hybrid of Virus and Liposome---、阪大ナノサイエンス国際シンポジウム、大阪市、1月30日、2006年
 36. Yoshiki Katayama(Kyushu University)、Peptide array as novel tool for drug screening or diagnosis、Pacifichem2005、Hawaii(USA)、12月18日、2005年
 37. 片山佳樹 (九州大学)、血管内皮障害部位の新規ターゲティング戦略と、MRI 用機能化造影剤への適用、分子生物学会バイオテクノロジーセミナー、福岡市、12月8日、2005年
 38. 黒田俊一 (大阪大学)、コンビバイオによるプロテオーム創薬システムの開発、大阪科学技術センター主催地域新生コンソーシアム成果発表会、大阪市、10月28日、2005年
 39. 片山佳樹 (九州大学)、細胞機能の指標としての細胞内シグナル網羅的解析と in vivo イメージングのための組織情報センシング、日大文理シンポジウム、東京、10月22日、2005年
 40. 黒田俊一 (大阪大学)、Novel drug screening system using yeast cells displaying ligand and receptor、全科展ヒューマンライフサイエンスフォーラム、大阪市、10月20日、2005年
 41. 黒田俊一 (大阪大学)、立松健司 (大阪大学)、植田充美 (大阪大学)、石井純 (大阪大学)、近藤昭彦 (大阪大学)、藤井郁夫 (大阪大学)、New strategy for discovering receptor agonists and antagonists using yeast cells、米国化学工学会 (E C I)、10月12日、2005年
 42. 片山佳樹 (九州大学)、タンパク・細胞機能解析のためのセンシングシステム、日本分析化学会第54年会、名古屋市、9月15日、2005年
 43. Shunichi Kuroda (Osaka University)、Bionanocapsules for Pinpoint Drug and Gene Delivery---A Hybrid of Virus and Liposome---、International Workshop Improving Gene and Drug Delivery to the Heart、Geneva Switzerland、9月1日、2005年
 44. 東海林洋子。感染細胞特異的な細胞内シグナルと DDS。第21回日本 DDS 学会 (シンポジウム)、佐世保市、7月22-23日、2005年
 45. 黒田俊一 (大阪大学)、瀬脇智満、夫夏玲、金哲仲、成文喜、Development of Mucosal Vaccines for Infectious Diseases Using a Novel Lactic Acid Bacteria Displaying System、財団法人化学及び血清療法研究所主催阿蘇シンポジウム、熊本県・阿蘇ロイヤルホテル、7月20日、2005年
 46. 片山佳樹 (九州大学)、細胞情報計測用バイオチップと細胞特異的遺伝子送達法、第42回化学関連支部合同九州大会、北九州市、7月2日、2005年
 47. 下川宏明 (東北大学)、Rho キナーゼ阻害薬の将来展望、第46回日本神経学会総会ランチョンセミナー、鹿児島市、5月25日、2005年
 48. 片山佳樹 (九州大学)、細胞対話型分子システムを用いる革新的遺伝子送達概念の創製、ナノメディシン・シンポジウム、東京。国連大学、11月、2004年
 49. 下川宏明、動脈硬化における Rho-kinase の関与、第52回日本心臓病学会学術集会、京都市、9月13-15日、2004年
 50. 下川宏明、動脈硬化の治療標的としての Rho-kinase の重要性、Translational Research Forum I「Metabolic Syndrome の分子基盤と新たな治療展開」、第41回日本臨床分子医学会学術集会、福岡市、7月16日、2004年
 51. 下川宏明、Rho-kinase 阻害薬の基礎的・臨床的研究、第110回日本薬理学会関東部会・シンポジウム「セリン／スレオニンキナーゼ阻害薬の基礎と臨床への展開」、静岡市、6月5日、2004年
- .
52. Shimokawa H、Rho-kinase as a novel therapeutic target for the treatment of inflammatory and arteriosclerotic vascular diseases: From bench to bedside. *Circ J.* • *Plenary Session*:

- Inflammation and Atherosclerosis: From Bench to Bedside* 68:12, 2004、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
53. 片山佳樹、細胞内シグナル応答型システムを用いるナノ医療、第67回日本循環器学会学術集会、福岡市、3月28-30日、2003年
 54. Shimokawa H, Takeshita A. Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of arteriosclerotic vascular diseases in Japanese. *Circ J.* 67 (Suppl 1): 15, 2003、第67回日本循環器学会学術集会・Plenary session, “Characteristics of atherosclerosis in Japanese –From genes to therapy–、福岡市、3月28-30日、2003年
 55. 下川宏明、動脈硬化性疾患の成因における Rho-kinase の意義、名古屋市、第33回日本脳卒中の外科学会サンセットセミナー、3月19日、2004年
 56. Shimokawa H. Application of nanotechnology for the prevention of restenosis after balloon injury、第76回日本生化学会大会・シンポジウム：「ドラッグデリバリーシステムを指向したライフサイエンスとナノテクノロジーの融合 —ナノ治療戦略の可能性—」、横浜市、10月18日、2003年
 57. 下川宏明、竹下 彰、血管病の成因における Rho/Rho-kinase 系の役割、第26回日本医学会総会・シンポジウム：血管病の原因をさぐる、福岡市、4月5日、2003年
 58. 下川宏明：Rho-kinase を標的とする分子治療の開発、第32回日本心脈管作動物質学会・シンポジウム：シグナル伝達・転写因子からの心血管疾患へのアプローチ —新たな治療ターゲットをめざして—、大阪市、2月2日、2003年

② 口頭発表 113 件（国内会議98件、国際会議17件）

1. 佐藤祐子、姜貞勲、大石潤、森健、新留琢郎、片山佳樹(九州大学)、遺伝子転写制御は、分子の運動性が支配する？—細胞内シグナル応答型遺伝子送達システム D-RECS を用いて—、第56回高分子討論会、名古屋市、名古屋工業大学、5月20日、2007年9月20日
2. 姜貞勲、大石潤、戸井田力、伊集院萌子、浅井大輔、佐藤祐子、鄭周姫、黒田俊一、谷澤克行、中島秀喜、森健、新留琢郎、片山佳樹(九州大学)、細胞内プロテインキナーゼ C α 応答型遺伝子制御システムの開発とがん特異的診断・治療法、第56回高分子討論会、名古屋市、名古屋工業大学、5月20日、2007年9月19日
3. T. Niidome(九州大学), T. Mori, Y. Katayama, Bioimaging and photothermal therapy using biocompatible gold nanorods, BIO KOREA 2007 Conference, 韓国ソウル Korea's Leading Convention & Exposition Center, 9月12-14日、2007年
4. Fukui S (東北大学), Fukumoto Y, Suzuki J, Saji K, Nawata J, Tawara S, Shinozaki T, Kagaya Y, Shimokawa H: The important role of Rho-kinase in the pathogenesis of diastolic heart failure in rats. *J Cardiac Failure.* 13(suppl 1):S28,2007、第11回日本心不全学会学術集会、千葉市、9月9-10日、2007年
5. T. Niidome(九州大学), T. Mori, Y. Katayama, In vivo monitoring of gold nanorods and photothermal therapy using infrared light, 応用物理学会75周年記念プレシンポジウム, 吹田市大阪大学基礎工学部, 8月2日、2007年
6. 大石潤(九州大学)、朝見陽次、姜貞勲、森 健、新留琢郎、片山佳樹、金ナノ粒子を利用した新規細胞内シグナル検出法の開発、九州分析化学若手の会夏季セミナー 平成19年度九州分析化学奨励賞受賞講演、長崎市四杖町 式見ハイツ、7月26-27日、2007年
7. Sato Y. (九州大学・CREST), Terada, K., Asai, D., Oishi, J., Kang, J.H., Mori, T., Niidome, T., and Katayama, Y, Drug and gene Delivery Responding to Cellular signal, 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 米国ロサンゼルス ロングビーチコンベンションセンター, 7月7-11日、2007年
8. K. Ikuta(九州大学), T. Mori, T. Niidome, H. Utsumi, H. Shimokawa, Y. Katayama, Development of A Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent for Imaging of Vascular Endothelial Dysfunction, 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled

- Release Society, 米国ロサンゼルス ロングビーチコンベンションセンター, 7 月 7-11 日, 2007 年
9. T. Niidome(九州大学), Yasuro Niidome, Masato Yamagata, Takahito Kawano, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Gold Nanorods as a Photosensitizer for Photothermal Therapy, 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 米国ロサンゼルス ロングビーチコンベンションセンター, 7 月 7-11 日, 2007 年
 10. A. Shiotani(九州大学), T. Mori, T. Niidome, Y. Niidome, Y. Katayama, Drugs release from gold nanorods embedded N-isopropylacrylamide hydrogels, 34th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 米国ロサンゼルス ロングビーチコンベンションセンター, 7 月 7-11 日, 2007 年
 11. Y. Katayama(九州大学), J-H. Kang, D. Asai, J. Oishi, R. Toida, M. Ijuin, B. Jun, K. Jonghwan, T. Mori, Takuro Niidome, Novel Cancer Cell-Specific Gene Expression using PKC α -resposivepeptide/polymer Conjugate, 10th Annual Meeting of American Society of Gene Therapy, Seattle, WA, USA (Washington State Convention & Trade Center), 6 月 30 日, 2007 年
 12. 新留琢郎(九州大学)、森健、片山佳樹非ウイルス性遺伝子導入法 ー機能性を持った遺伝子キャリアー、第 13 回日本遺伝子治療学会学術集会、名古屋市千種区国際医学交流センター(愛知がんセンター)、6 月 28-30 日、2007 年
 13. 新留琢郎(九州大学)、秋山泰之、森 健、片山佳樹、新留康郎、静脈投与された金ナノロッドの in vivo モニタリング、第23回日本 DDS 学会学術集会、熊本市ホテル日航熊本、6 月 14-15 日、2007 年
 14. 塩谷淳(九州大学)、森 健、新留琢郎、新留康郎、片山佳樹、近赤外光に応答して薬物放出を行う金ナノロッド分散ゲルの開発、第23回日本 DDS 学会学術集会、熊本市ホテル日航熊本、6 月 14-15 日、2007 年
 15. 姜貞勲(九州大学・CREST)、森健、新留琢郎、片山佳樹、第23回日本 DDS 学会学術集会、熊本市ホテル日航熊本、6 月 14-15 日、2007 年
 16. 鄭周姫(大阪大学・CREST)、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行、黒田俊一、ヒト肝臓特異的バイオナノカプセルの In vivo イメージングによる生体内動態解析、日本 DDS 学会、熊本日航ホテル(日本)、6 月 14-15 日、2007 年。
 17. 殿井裕之(大阪大学)、粕谷武史、角矢博保、鄭周姫、佐々木康雄、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行、黒田俊一(阪大)、ホーミングペプチド提示型バイオナノカプセルによる生体内ピンポイント DDS の開発、日本 DDS 学会、熊本日航ホテル(日本)、6 月 14-15 日、2007 年。
 18. 浅井大輔、中島秀喜(聖マリアンナ医科大学微生物)、自殺遺伝子治療を目指した疾患細胞選択的な遺伝子発現制御法 D-RECS の開発、第 55 回日本化学療法学会総会、仙台、6 月 1、2 日、2007 年
 19. 片山佳樹(九州大学)、大石潤、朝見陽次、森健、新留琢郎、金ナノ粒子を用いるプロテインキナーゼ活性のラベルフリーアッセイ、第68回分析化学討論会、宇都宮市、宇都宮大学峰キャンパス、5 月 18 日-20 日、2007 年
 20. 田原俊介(東北大学)、阿部弘太郎、福本義弘、下川宏明、Rho-kinase 阻害薬の肺高血圧症治療薬としての可能性、第 1 回肺循環研究会、仙台市、3 月 31 日、2007 年
 21. 朝見陽次(九州大学)、大石 潤、姜 貞勲、森 健、新留琢郎、片山佳樹、金ナノ粒子を用いた均一系キナーゼ活性検出法の開発、日本化学会第 87 春季年会、吹田市、関西大学千里山キャンパス、3 月 25 日-28 日、2007 年
 22. 倉本政則(九州大学)、河村健司、浅井大輔、森健、新留琢郎、東海林洋子、中島秀喜、片山佳樹、ウイルスプロテアーゼ応答型新規遺伝子キャリアの開発、日本化学会第 87 春季年会、関西大学、大阪、3 月 25-28 日、2007 年
 23. Fukui S(東北大学), Fukumoto Y, Suzuki J, Saji K, Nawata J, Shinozaki T, Kagaya Y, Shimokawa H. Rho-kinase pathway plays an important role in the pathogenesis of diastolic

- heart failure in Dahl salt-sensitive rats. *Circ J.* 71 (Suppl.1):434,2007、第 71 回日本循環器学会学術集会、神戸市、3 月 15-17 日、2007 年
24. Tsuburaya R, Yasuda S, Hizume T, Ito Y, Shioto T, Ito K, Shimokawa H. Long-term treatment with eicosapentaenoic acid suppresses coronary vasoconstriction and ventricular fibrillation in a porcine model of acute myocardial infarction. *Circ J.* 71 (Suppl.1):346,2007. 、第 71 回日本循環器学会学術集会、神戸市、3 月 15-17 日、2007 年
 25. Tawara S (東北大学) , Abe K, Morikawa K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Prostacyclin lacks inhibitory effects on Rho-kinase. –Possible benefits of combined therapy with prostacyclin and a Rho-kinase inhibitor in pulmonary hypertension- *Circ J.* 71 (Suppl.1):232,2007 、第 71 回日本循環器学会学術集会、神戸市、3 月 15-17 日、2007 年
 26. Rashid M (東北大学) , Tawara S, Fukumoto Y, Shimokawa H. Molecular mechanisms of the pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. –Different inhibitory effects on RhoA/Rho-kinase and Rac 1- *Circ J.* 71 (Suppl.1):139,2007、第 71 回日本循環器学会学術集会、神戸市、3 月 15-17 日、2007 年
 27. Onoue N (東北大学) , Nawata J, Tada T, Qiqige Z, Wang H, Sugimura K, Fukumoto Y, Shimokawa H. Increased static pressure promotes migration of vascular smooth muscle cells. –Involvement of Rho-kinase pathway- *Circ J.* 71 (Suppl.1):196,2007、第 71 回日本循環器学会学術集会、神戸市、3 月 15-17 日、2007 年
 28. Fukumoto Y (東北大学) , Shimokawa H. Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of coronary artery spasm. *Circ J.* 71 (Suppl.1):73,2007、第 71 回日本循環器学会学術集会、神戸市、3 月 15-17 日、2007 年
 29. Y. T. Sato (九州大学・CREST) , K. Terada, K. Kawamura, J. Oishi, J.-H. Kang, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama、日中韓フォーサイト事業国際フォーラム、鹿児島県指宿市岩崎ホテル、1 月 22 日～1 月 24 日、2007 年
 30. 紫垣修平 (九州大学) 、韓曉明、山地貴之、森健、新留琢郎、片山佳樹、創薬・診断のための細胞内シグナル網羅的解析用ペプチドチップ、第 28 回日本バイオマテリアル学会、東京都千代田区アルカディア市ヶ谷、11 月 27 日～28 日、2006 年
 31. 片山佳樹(九州大学)、大石潤、姜貞勲、伊集院萌子、鄭周姫、黒田俊一、森健、新留琢郎、谷澤克行、細胞内シグナル応答型遺伝子制御剤と中空バイオナノ粒子を併用した新規細胞特異的遺伝子送達、第 28 回日本バイオマテリアル学会、東京都千代田区アルカディア市ヶ谷、11 月 27 日～28 日、2006 年
 32. 福本義弘 (東北大学)、下川宏明、肺高血圧における Rho キナーゼの分子標的治療としての重要性、第 47 回日本脈管学会総会・パネルディスカッション：肺高血圧の最近の治療、神戸市、10 月 20-22 日、2006 年
 33. 大石潤(九州大学)、朝見陽次、田辺美晴、森 健、新留琢郎、片山佳樹、金ナノ粒子を用いたラベルフリーキナーゼ活性検出法、バイオ関連化学合同シンポジウム、京都市桂 京都大学桂キャンパス、9 月 29 日～31 日、2006 年
 34. 倉本政則(九州大学)、河村健司、浅井大輔、森健、新留琢郎、東海林洋子、中島秀喜、片山佳樹、ウイルス性疾患治療を指向した遺伝子キャリアの開発、第 55 回高分子討論会、富山市五福、富山大学五福キャンパス、9 月 20 日～22 日、2006 年
 35. 大石潤(九州大学)、伊集院萌子、姜貞勲、鄭周姫、黒田俊一、森 健、新留琢郎、谷澤克行、片山佳樹、バイオナノカプセルを用いた PKA シグナル応答型遺伝子デリバリー、第 55 回高分子討論会、富山市五福、富山大学五福キャンパス、9 月 20 日～22 日、2006 年
 36. 浅井大輔 (聖マリアンナ医科大学)、東海林洋子、片山佳樹、中島秀喜、疾患細胞特異的な遺伝子発現制御法の開発、第 60 回神奈川県感染症医学会、横浜市開港記念会館、横浜市、9 月 16 日、2006 年

37. 佐藤祐子(九州大学・CREST)・寺田恵子・大石潤・河村健司・姜貞勲・片山佳樹、細胞シグナル応答型遺伝子キャリアの構築、第6回遺伝子デリバリー夏期セミナー、箕面市 箕面山荘風の杜、9月7日～9日、2006年
38. 姜貞勲(九州大学・CREST)・戸伊田力・姜玉花・森健・新留琢郎・片山佳樹、新概念の癌治療法—細胞内シグナル応答型遺伝子治療法(D-RECS)、DDS学会、東京国際交流館(東京都江東区)、7月7～8日、2006年
39. 浅井大輔(聖マリアンナ医科大学)、東海林洋子、河村健司、大石潤、姜貞勲、佐藤裕子、新留琢郎、中島秀喜、片山佳樹、炎症細胞選択的な遺伝子送達を目指した機能性高分子の創製、第55回高分子学会年次大会、名古屋市熱田区、名古屋国際会議場、5月24～26日、2006年
40. 姜貞勲(九州大学・CREST)・大石潤・河村健司・浅井大輔・戸伊田力・姜玉花・佐藤祐子・片山佳樹、PKC α 細胞内シグナル応答型遺伝子デリバリーシステムの開発、第55回高分子学会年次大会、名古屋市熱田区、名古屋国際会議場、5月24～26日、2006年
41. 佐藤祐子(九州大学・CREST)・大石潤・河村健司・寺田恵子・浅井大輔・姜貞勲・片山佳樹、非受容体型チロシンキナーゼ応答型キャリア-DNA複合体のキャラクタリゼーション、第55回高分子学会年次大会、名古屋市熱田区、名古屋国際会議場、5月24～26日、2006年
42. 河村 健司(九州大学)、大石 潤、倉本政則、姜貞勲、浅井大輔、佐藤裕子、森 健、新留琢郎、片山佳樹、D-RECS(4) 細胞内プロテアーゼに応答する遺伝子キャリアの開発、第55回高分子学会年次大会、名古屋市熱田区、名古屋国際会議場、5月24～26日、2006年
43. 大石 潤(九州大学)、河村健司、伊集院萌子、姜貞勲、浅井大輔、佐藤裕子、片山佳樹、D-RECS(1) 細胞内PKA シグナル応答型遺伝子発現制御システム、第55回高分子学会年次大会、名古屋市熱田区、名古屋国際会議場、5月24～26日、2006年
44. 姜貞勲(九州大学・CREST)・戸伊田力・姜玉花・新留琢郎・片山佳樹、細胞内プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子治療、遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム、福岡市東区、九州大学馬出キャンパス、5月18日～19日、2006年
45. 大石 潤(九州大学)、河村健司、伊集院萌子、姜貞勲、浅井大輔、佐藤裕子、森 健、新留琢郎、片山佳樹、PKA シグナルに応答、し遺伝子を放出するポリマー/ペプチドコンジュゲート遺伝子・デリバリー研究会第6回シンポジウム、福岡市東区、九州大学馬出キャンパス、5月18日～19日、2006年
46. Yomura, Y. (聖マリアンナ医科大学), Shoji, Y., Munemasa, Y., Hayashi, Y., Kitaoka, Y., Murakami, E., Nakashima, H., Ueno, S. (St. Marianna medical Univ.), Direct real-time monitoring of intravitreal nitric oxide (NO) and oxygen (pO_2) simultaneously in endotoxin-induced uveitis (EIU) of rabbits, The Association for Research in Vision and Ophthalmology 2006 Annual meeting, Florida, U.S.A, 4月30～5月4日、2006年
47. 余村寧恵(聖マリアンナ医科大学)、東海林洋子、竹村弘、上野聰樹、中島秀喜、LPS刺激によるウサギぶどう膜炎惹起時に発生するNO・ pO_2 の同時測定を試み、第80回日本感染症学会総会、ホテル日航東京、東京、4月20、21日、2006年
48. 余村寧恵(聖マリアンナ医科大学)、東海林洋子、宗正泰成、林泰博、北岡康史、村上栄一、中島秀喜、上野聰樹、LPS刺激による家兎EIU惹起時に発生する硝子体内のNO- pO_2 同時測定を試み、第110回日本眼科学会総会、大阪国際会議場、大阪市、4月13～16日、2006年
49. 生田健次郎(九州大学)、浦崎哲彦、森健、吉満研吾、下川宏明、村田正治、内海英、新留琢郎、片山佳樹、Evans Blue 誘導体を用いた血管内皮障害特異的な薬物送達法の開発、第66回日本化学会春季年会、船橋、3月30日、2006年
50. 姜貞勲(九州大学・CREST)・戸井田力・姜玉花・生田健次郎・新留琢郎・片山佳樹、細胞

内シグナル応答型遺伝子治療法 日本化学学会第、千葉、3月29日、2006年

51. 戸井田力(九州大学)、姜貞勲、生田健次郎、姜玉花、新留琢郎、片山佳樹、細胞内シグナルプロテインキナーゼC応答型遺伝子デリバリー、第66回日本化学会春季年会、船橋、3月29日、2006年
52. Tawara S, Higashi (九州大学)、M, Sunagawa、K, Shimokawa H, Comparison of the inhibitory effects of HMG-CoA reductase inhibitors and Rho-kinase inhibitor on angiotensin II-induced cardiovascular lesion formation in rats、第70回日本循環器学会学術集会、名古屋市、3月24-26日、2006年
53. Jiang BH (九州大学)、Tawara S, Abe K, Takaki A, Shimokawa、H. Acute vasodilator effect of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rat、第70回日本循環器学会学術集会、名古屋市、3月24-26日、2006年
54. 樋詰貴登士(九州大学)、下川宏明、血清コルチゾール持続高値により惹起されたブタ冠動脈過収縮反応-Rho-kinase経路の関与-、第46回日本脈管学会総会、大阪市、12月1-3日、2005年
55. Nakata S (聖マリアンナ医科大学)、Tsutsui M, Shimokawa H, Morishita T, Sabanai K, Tasaki H, Yanagihara N, Nakashima Y. Atorvastatin upregulates vascular neuronal nitric oxide synthase through the Akt/NF- κ B pathway, Dallas, USA, November 13-16, 2005年
56. Hizume T (九州大学)、Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Abe K, Anegawa G, Shimokawa H., Sustained elevation of serum cortisol level enhances coronary vasospastic activity through Rho-kinase activation in pigs, Annual Scientific Meeting of the American Heart Association, Dallas, USA, November 13-16, 2005年
57. Kishi T (九州大学)、Hirooka Y, Masumoto A, Inokuchi K, Ito K, Tagawa T, Shimokawa H, Takeshita A, Sunagawa、Rho-kinase inhibitor improves increased vascular resistance and impaired vasodilatation of the forearm in patients with heart failure、第9回日本心不全学会学術集会、下関、10月20-22日、2005年
58. 鄭周姫(大阪大学)、山田忠範、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行、黒田俊一、バイオナノカプセル内部への効果的な遺伝子・薬剤封入法の開発、SCEJ 37th Autumn meeting, 岡山市、9月15-17日、2005年
59. 紫垣 修平(九州大学)・山地 貴之・園田 達彦・新留 琢郎・片山 佳樹、ゲノム創薬のための細胞内シグナル網羅的解析法の開発、九州バイオサイエンスシンポジウム、福岡市、9月2, 3日、2005年
60. 河村健司(九州大学)、大石潤、姜貞勲、児玉耕太、佐藤祐子、村田正治、新留琢郎¹・片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子送達法における遺伝子制御メカニズムの検討、第15回バイオ・高分子シンポジウム、東京都、8月1日、2005年
61. Y. Katayama (九州大学)、J.H Kang, K. Kodama, Y. Sato, J. Oishi, K. Kawamura, M. Murata, T. Niidome、Intracellular signal-responsive gene delivery for new cell-specific gene therapy using new class of polymer-peptide conjugates、The 8th International polymer conference (IPC2005)、福岡市、7月26-29日、2005年
62. Yoko Shoji (聖マリアンナ医科大学)、Gerileltu Borijihan, Toshiyuki Uryu, Hideki Nakashima, Effect of polysaccharides extracted from Artemisia Sphaerocephala Krasch on generation of nitric oxide, The first International Symposium on Chemistry of Herbal Medicine and Mongolian Drug, Hohhot Inner Mongolia China, 7月18-21日、2005年
63. 大井啓司(九州大学)、下川宏明、廣木潤子、武市早苗、中嶋克行、竹下 彰、ポックリ病患者由来のレムナントリポ蛋白分画の慢性刺激は冠動脈の攣縮性反応を惹起する、第37回日本動脈硬化学会総会、東京、7月14-15日、2005年
64. 樋詰貴登士(九州大学)、下川宏明、森川敬子、上徳豊和、大井啓司、阿部弘太郎、砂川賢二、血清コルチゾールの持続高値によるブタ冠動脈過収縮反応の惹起-Rho-kinase経路の関与-、第37回日本動脈硬化学会総会、東京、7月14-15、2005年

65. Kota Kodama (九州大学), Yoko Shoji, Hideki Nakashima, Jeong-Hun Kang, Kenji Kawamura, Jun Oishi, Takuro Niidome, and Yoshiki Katayama, Novel delivery system of gene activated only in HIV infected cells, 32nd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Miami Beach, Florida, U.S.A., 6月18-22日、2005年
66. 樋詰貴登士(九州大学)、下川宏明、森川敬子、上徳豊和、阿部弘太郎、大井啓司、砂川賢二、血中コルチゾールの持続高値はブタ冠動脈の過収縮反応を惹起する-Rho-kinase 経路の関与-, 第9回日本適応学会学術集会、宮崎氏、6月10-11日、2005年
67. 樋詰貴登士 (九州大学)、下川宏明、森川敬子、上徳豊和、阿部弘太郎、大井啓司、砂川賢二、血中コルチゾールの持続高値はブタ冠動脈の過収縮反応を惹起する-Rho-kinase 経路の関与-, 第9回日本適応学会学術集会、宮崎氏、6月10-11日、2005年
68. 井上雄介 (九州大学)、園田達彦、村田正治、稲森和紀、片山佳樹、2次元 SPR 装置を用いた細胞内リン酸化シグナル検出法の開発、第66回分析討論会、北見市、5月14日、2005年
69. 生田健次郎 (九州大学)・浦崎哲彦・上徳豊和・兵藤文紀・村田正治・新留琢郎・吉満研吾・下川宏明・片山佳樹、血管内皮障害特異的な機能化 MRI 造影剤の in vivo 評価、第66回分析化学討論会、北見市、5月14日、2005年
70. 山口将平 (九州大学)、橋爪 誠、川中博文、吉田大輔、金城 直、小西晃造、田上和夫、下川宏明、前原喜彦、肝虚血再灌流障害に関する Rho-kinase シグナル伝達系の検討、第105回日本外科学会定期学術集会、名古屋市、5月11-13日、2005年
71. 東海林洋子 (聖マリアンナ医科大学)、余村寧恵、竹村弘、上野聡樹、中島秀。感染細胞における NO の発生動態について一多層被覆型電極による direct 測定- 第5回日本 NO 学会学術集会、4月27, 28日、2005年
72. 東海林洋子 (聖マリアンナ医科大学)、余村寧恵、竹村弘、上野聡樹、中島秀喜。培養細胞系における一酸化窒素のリアルタイムモニタリングシステムの構築 第79回感染症学会総会、4月15, 16日、2005年
73. Jung J. H. (大阪大学・CREST), Yamada T., Tanizawa K., Kuroda S., 2005. Improving gene/drug delivery to human hepatocytes with hepatitis B virus surface antigen L particles, Third 21st Century COE "Towards Creating New Industries Based on Inter-Nanoscience" International Symposium, Oku-Biwako, March 9-10, 2005 年
74. 東海林洋子 (聖マリアンナ医科大学)、余村寧恵、竹村弘、上野聡樹、中島秀喜・多層被覆型電極を用いた一酸化窒素 (NO) の直接定量法、第57回神奈川感染症医学会、3月26日、2005年
75. 鄭周姫 (大阪大学・CREST)、山田 忠範、谷澤 克行、黒田 俊一、Improving gene/drug delivery to human hepatocytes with hepatitis B virus surface antigen L particles、第3回 COE プログラム 国際シンポジウム奥琵琶湖マキノプリンスホテル、2005年 3月9-10日、2005年
76. 余村寧恵 (聖マリアンナ医科大学)、乗松美貴、東海林洋子、中島秀喜、上野聡樹、細胞培養系における一酸化窒素と酸素分圧の Real-time 測定法確立の試み、第37回神奈川眼科臨床談話会、1月9日、2005年
77. 児玉耕太 (九州大学)、東海林洋子、中島秀喜、姜 貞勲、河村 健司、大石 潤、新留 琢郎、片山佳樹、HIV 治療を目的としたインテリジェントナノキャリアーの設計、第10回大阪市立大学ナノサイエンス・ナノテクノロジーフォーラム、11月、2004年
78. 大石 潤 (九州大学) 河村健司 園田達彦 村田正治 片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子発現制御システムの開発、高分子九州支部特別講演会 11月、2004年
79. 児玉耕太 (九州大学)、東海林洋子、中島秀喜、姜 貞勲、河村 健司、大石 潤、

- 新留 琢郎、片山佳樹、Artificial gene regulation system responding to HIV protease、ナノメディシン・シンポジウム、11 月、2004 年
80. 大石 潤 (九州大学)、河村健司、園田達彦、村田正治、新留琢郎、片山佳樹、細胞対話型分子を利用した新規遺伝子制御システム、ナノメディシン・シンポジウム、11 月、2004 年
 81. Kota Kodama (九州大学) , Yoko Shoji, Hideki Nakashima, Jeong-Hun Tang, Kenji Kawamura, Jun Ohishi, Takuro Niidome and Yoshiki Katayama 、Artificial gene regulation system responding to HIV protease 、APIPS-JPS 2004、 10 月、2004 年
 82. 野上貴司 (九州大学)、園田達彦、村田正治、秋吉一成、片山佳樹、D-RECS(2) リン酸化シグナル応答型材料の開発、第 53 回高分子討論会、9 月、2004 年
 83. 大石 潤 (九州大学)、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹、D-RECS(1) プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子発現制御システムの創製、第 53 回高分子討論会、9 月、2004 年
 84. 生田健次郎 (九州大学)、山本竜広、阿部弘太郎、上徳豊和、大井啓司、村田正治、下川宏明、片山佳樹、血管内障害を認識する薬物キャリアの機能評価、第 53 回高分子討論会、9 月、2004 年
 85. 浦崎哲彦 (九州大学)、山本竜広、生田健次郎、大井啓司、上徳豊和、阿部弘太郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹、血管内皮障害を認識する新規 MRI 造影剤の合成と評価、日本分析化学会第 53 年会、9 月、2004 年
 86. 福本義弘 (九州大学)、下川宏明、竹下 彰、砂川賢二、肺高血圧に対する新たな治療戦略：Rho キナーゼ阻害薬、第 5 回日本心臓病学会学術集会、京都、9 月 13-15 日、2004 年
 87. 大石 潤 (九州大学)、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹、細胞内シグナルに応答して遺伝子を制御する高分子-DNA 複合体、高分子若手講演会、8 月、2004 年
 88. 大石 潤 (九州大学)、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子発現制御システムの開発、第 41 回化学関連支部合同九州大会、7 月、2004 年
 89. Yoshiki Katayama (九州大学) , Kenji Kawamura, Jun Ohishi, Masaharu Murata, Intracellular Signal-responsive Gene Carrier for Novel Cellular Specific Regulation of Gene Expression、第 41 回高分子国際会議 (IUPAC Macro2004)、7 月、2004 年
 90. 河村健司 (九州大学)、大石潤、村田正治、片山佳樹、細胞内シグナルに応答して遺伝子転写を制御できる遺伝子送達法、第 14 回バイオ・高分子シンポジウム、7 月、2004 年
 91. 浦崎哲彦 (九州大学)、山本竜広、生田健次郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹、温度応答型 MRI 造影剤の開発、第 22 回九州分析化学若手の会 夏季セミナー、7 月、2004 年
 92. 浦崎哲彦 (九州大学)、山本竜広、生田健次郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹、熱応答型 MRI 造影剤の合成と造影能の評価、第 41 回化学関連支部合同九州大会、7 月、2004 年
 93. 生田健次郎 (九州大学)、山本竜広、阿部弘太郎、上徳豊和、大井啓司、村田正治、下川宏明、片山佳樹、血管内障害を認識する薬物キャリアの開発、第 41 回化学関連支部合同九州大会、7 月、2004 年
 94. 井上雄介 (九州大学)、濱口裕三、園田達彦、村田正治、稲森和紀、片山佳樹、2D-SPR を利用した細胞シグナル動態解析法の開発、第 41 回化学関連支部合同九州大会、7 月、2004 年
 95. 河村 健司 (九州大学)・大石 潤・園田 達彦・村田 正治・片山 佳樹、細胞内プロ

テアーゼシグナル応答型遺伝子送達システムの構築、第53回 高分子学会年次大会、5月、2004年

96. 浦崎哲彦 (九州大学)、山本竜広、生田健次郎、村田正治、吉満研吾、下川宏明、片山佳樹、熱応答型 MRI 造影剤の合成と基礎評価、第65回分析化学討論会、5月、2004年
97. 生田健次郎 (九州大学)、山本竜広、阿部弘太郎、上徳豊和、大井啓司、村田正治、下川宏明、片山佳樹、血管内障害を認識する薬物キャリアの合成と基礎評価、第53回 高分子学会年次大会、5月、2004年
98. 大石 潤 (九州大学)、河村健司、園田達彦、村田正治、片山佳樹、プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子導入剤の開発とその評価、第53回 高分子学会年次大会、5月、2004年
99. 野上貴司 (九州大学)、園田達彦、村田正治、秋吉一成、片山佳樹、細胞内リン酸化シグナル応答型ナノゲル微粒子、第53回 高分子学会年次大会、5月、2004年
100. Yada T (九州大学), Shimokawa H, Hiramatsu O, Kiyooka T, Hirota M, Kajiya M, Inai Y, Kajiya T, Shigeto F, Tachibana H, Goto M, Ogasawara Y, Kajiya F: Beneficial role of hydroxyfasudil, a specific Rho-kinase inhibitor, on ischemia-reperfusion injury in canine coronary microvessels. *Circ J.* 68:104, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
101. Hizume T (九州大学), Uwatoku T, Oi K, Abe K, Shimokawa H: Chronic administration of cortisol induces hypercontraction of porcine coronary arteries. –Possible involvement of Rho-kinase- *Circ J.* 68:149, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
102. Hattori T (九州大学), Shimokawa H, Oi K, Abe K, Uwatoku T, Tsutsui H, Takeshita A: Long-term inhibition of Rho-kinase suppresses left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circ J.* 68:167, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
103. Higashi M (九州大学), Hiroaki J, Shimokawa H: Heterogenous expression of Rho-kinase isoforms, Rho-kinase and Rho-kinase, in angiotensin II-infused mice. *Circ J.* 68:273, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
104. Abe K (九州大学), Uwatoku T, Oi K, Hizume T, Shimokawa H: Prostacyclin lacks direct inhibitory effect on Rho-kinase in its beneficial effects for the treatment of pulmonary hypertension. *Circ J.* 68:335, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
105. Hiroki J (九州大学), Shimokawa H, Takeshita A: Inflammatory stimuli upregulate Rho-kinase expression in human coronary vascular smooth muscle cells –Analysis of receptor subtype- *Circ J.* 68:420, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
106. Hirooka Y (九州大学), Masumoto A, Kishi T, Inokuchi K, Itoh K, Kimura Y, Tagawa T, Shimokawa H: Possible involvement of Rho-kinase in increased vascular resistance and impaired vasodilation of the forearm in patients with heart failure. *Circ J.* 68:435, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
107. Abe K (九州大学), Uwatoku T, Oi K, Hizume T, Shimokawa H: Long-term inhibition of Rho-kinase ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice independent of endothelial NO synthase. *Circ J.* 68:468, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年
108. Inokuchi K (九州大学), Ito A, Fukumoto Y, Matoba T, Shiose A, Nishida T, Masuda M, Morita S, Shimokawa H: Usefulness of fasudil, a Rho-kinase inhibitor, to treat intractable severe vasospasm after coronary artery bypass surgery. *Circ J.* 68:524, 2004.、第68回日本循環器学会学術集会、東京、3月27-29日、2004年

109. 井上雄介 (九州大学)、濱口裕三、園田達彦、村田正治、稲森和紀、片山佳樹、2D-SPR を利用した細胞内リン酸化シグナル検出システムの開発、日本化学会第84春季年会、3月、2004年
110. 大石 潤 河村健司 園田達彦 村田正治 片山佳樹、プロテインキナーゼシグナル応答型遺伝子転写制御システム、日本化学会第84春季年会、3月、2004年
111. 野上貴司、園田達彦、村田正治、秋吉一成、片山佳樹、リン酸化シグナル応答型ナノゲル微粒子、日本化学会第84春季年会、3月、2004年
112. 市来俊弘 (九州大学)、下川宏明：Rho-kinase 阻害薬の pleiotropic effects.、第33回日本心臓血管作動物質学会、東京、2月1日、2004年
113. 廣岡良隆 (九州大学)、伊藤浩司、下川宏明、竹下 彰：慢性的一酸化窒素合成阻害による高血圧における脳幹部 Rho/Rho-kinase 系の関与.、第33回日本心臓血管作動物質学会、東京、2月1日、2004年

③ ポスター発表 78件 (国内会議40件、国際会議38件)

1. Y. Katayama (九州大学), Y. Asami, J. Oishi, T. Mori, T. Niidome, High throughput assay for protein kinases using gold nano-particles, International Symposium for Single Cell Analysis, Tokyo, 9月、2007年
2. Kasuya T. (大阪大学), Jung J., Mastuzaki T., Yamada M., Tanizawa K., Kuroda S. (阪大), Analysis of HBV entry using yeast-derived HBsAg L particle: Role of putative HBV receptor SCCA1, The molecular biology of hepatitis B viruses, Rome (イタリア)、9月16-19日、2007年
3. Jeong-Hun Kang, Yuko Sato, Riki Toita, Takeshi Mori, Takuro Niidome, and Yoshiaki Katayama (九州大学)、New method for in vivo imaging of intracellular signals and its application to cancer imaging, 234th ACS National Meeting and Exposition, 米国ボストン McCormick Place Convention Center, 8月19日、2007年
4. T. Niidome (九州大学), Yasuyuki Akiyama, Takahito Kawano, Takeshi Mori, Yoshiaki Katayama, Yasuro Niidome, 234th ACS National Meeting and Exposition, 米国ボストン McCormick Place Convention Center, 8月19日、2007年
5. 朝見陽次 (九州大学)、大石 潤、姜 勲貞、森 健、新留琢郎、片山佳樹、金ナノ粒子を用いた均一系キナーゼ活性検出法の開発、第25回九州分析化学若手の会夏季セミナー、長崎市、ながさき式見ハイツ、7月25、26日、2007年
6. 土屋亨 (九州大学)、浅井大輔、大石潤、姜勲貞、森健、新留琢郎、片山佳樹、IkB キナーゼ応答性ペプチド担持ポリマーを用いた遺伝子デリバリー、第44回化学関連支部合同九州大会、北九州市、7月7日、2007年
7. 朝見陽次 (九州大学)、大石潤、姜勲貞、森健、新留琢郎、片山佳樹、金ナノ粒子を用いた均一系キナーゼ活性検出法の開発、第44回化学関連支部合同九州大会、北九州市、7月7日、2007年
8. 伊集院萌子 (九州大学)、大石潤、姜勲貞、鄭周姫、黒田俊一、森健、新留琢郎、谷澤克行、片山佳樹、バイオナノカプセルを用いた PKC シグナル応答型遺伝子デリバリー、第23回日本 Drug Delivery System(DDS)学会学術集会、熊本市、6月14日-15日、2007年
9. 姜勲貞 (九州大学・CREST)、戸井田力、森健、新留琢郎、片山佳樹、プロテインキナーゼ C α に応答して遺伝子を解離する遺伝子キャリアー、第23回日本 Drug Delivery System(DDS)学会学術集会、熊本市、6月14日-15日、2007年
10. 栗原亮介 (九州大学)、河野喬仁、森健、片山佳樹、新留琢郎、デンドリティックポリリジンによるマウス肝臓への siRNA デリバリー、第23回日本 DDS 学会、熊本市、6月14-15日、2007年
11. 岡本悠里 (九州大学)、秋山泰之、河野喬仁、新留康郎、森健、新留琢郎、片山佳樹、PEG 修飾およびリガンド修飾による金ナノロッドの機能化、第23回日本 DDS 学会、熊本市、

- 6 月 14–15 日、2007 年
12. 三瓶治史、粕谷武史、殿井裕之、佐々木康雄、角矢博保、鄭周姫、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行、黒田俊一(阪大)、糖鎖提示型バイオナノカプセルの開発、第 23 回日本 DDS 学会、熊本市、6 月 14–15 日、2007 年
 13. 粕谷武史、鄭周姫、佐々木康雄、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行、黒田俊一(阪大)、バイオナノカプセルを用いた B 型肝炎ウイルスのヒト肝臓特異的感染機構の解明、第 23 回日本 DDS 学会、熊本市、6 月 14–15 日、2007 年
 14. 佐々木康雄、粕谷武史、鄭周姫、近藤昭彦、妹尾昌治、上田政和、谷澤克行、黒田俊一(阪大)、バイオナノカプセルの In vivo イメージングに向けた化可視化、第 23 回日本 DDS 学会、熊本市、6 月 14–15 日、2007 年
 15. Y. Katayama(九州大学), J-K. Kang, J. Oishi, D. Asai, Y. Sato, R. Toita, T. Mori, H. Nakashima, T. Niidome, New Concept for Cancer cell-specific gene therapy using intracellular signal-responsive gene regulator, American Society of Gene Therapy, 10th Annual Meeting, 米国シアトル Washington State Convention & Trade Center, 6 月 1 日、2007 年
 16. T. Niidome(九州大学), Takayuki Iida, Takeshi Mori, Yoshiki Katayama, Identification of proteins interacting with DNA complex in cytosol, American Society of Gene Therapy, 10th Annual Meeting, 米国シアトル Washington State Convention & Trade Center, 6 月 1 日、2007 年
 17. R. Kurihara(九州大学), T. Kawano, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, In Vivo siRNA Delivery Mediated by Dendritic Poly (L-Lysine), American Society of Gene Therapy, 10th Annual Meeting, 米国シアトル Washington State Convention & Trade Center, 6 月 1 日、2007 年
 18. 姜貞勲(九州大学) 戸伊田力 大石潤 佐藤祐子 森健 新留琢郎 片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子キャリアの開発および in vivo 評価、第 56 回高分子化学会年次会、京都市左京区宝ヶ池、京都国際会館、5 月 29 日–31 日、2007 年
 19. 土屋亨(九州大学)、浅井大輔、大石潤、姜貞勲、森健、新留琢郎、片山佳樹、IkB キナーゼ応答性ペプチド担持ポリマーを用いた遺伝子デリバリー、第 56 回高分子化学会年次会、京都市左京区宝ヶ池、京都国際会館、5 月 29 日–31 日、2007 年
 20. 佐藤祐子(九州大学・CREST)、寺田恵子・浅井大輔・大石潤・姜貞勲・片山佳樹、非受容体型チロシンキナーゼ応答型キャリアの構築、第 56 回高分子化学会年次会、京都市左京区宝ヶ池、京都国際会館、5 月 29 日–31 日、2007 年
 21. 伊集院萌子(九州大学)、大石潤、姜貞勲、鄭周姫、黒田俊一、森健、新留琢郎、谷澤克行、片山佳樹、肝臓がんを標的とした PKC シグナル応答型遺伝子デリバリー、第 56 回高分子化学会年次会、京都市左京区宝ヶ池、京都国際会館、5 月 29 日–31 日、2007 年
 22. 大石潤(九州大学)、朝見陽次、姜貞勲、森健、新留琢郎、片山佳樹、金ナノ粒子を用いたキナーゼ活性検出法、第 56 回高分子化学会年次会、京都市左京区宝ヶ池、京都国際会館、5 月 29 日–31 日、2007 年
 23. 姜玉姫(九州大学)、姜貞勲、戸井田力、森健、新留琢郎、片山佳樹、Intracellular Rho-kinase Signal-Responsive Gene Carrier, The 18th Joint Seminar of the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan and the Busan Branch of the Korean Chemical Society、北九州国際会場(北九州市小倉北区浅野 3-8-1)、5 月 31 日、2007 年
 24. 韓曉明(九州大学)、森健、新留琢郎、片山佳樹、The 18th Joint Seminar of the Kyushu Branch of the Chemical Society of Japan and the Busan Branch of the Korean Chemical Society、北九州国際会場(北九州市小倉北区浅野 3-8-1)、5 月 31 日、2007 年
 25. R. Kurihara(九州大学), T. Kawano, T. Mori, Y. Katayama, T. Niidome, In Vivo siRNA Delivery Mediated by Dendritic Poly (L-Lysine), American Society of Gene Therapy's 10th Annual Meeting, 5 月 30 日–6 月 2 日、2007 年
 26. Jung J.(大阪大学), Yamada T., Kondo A., Seno M., Ueda M., Tanizawa K., Kuroda S., In

- vivo pinpoint drug/gene delivery system using bio-nanocapsules, Modern drug delivery & development, ペンシルベニアコンベンションセンタ (USA)、12 月 4-6 日、2006 年
27. Kasuya T.(大阪大学)、Uyeda A., Tanizawa K. Kuroda S., Human liver-specific delivering system using hepatitis B virus envelope pre-S region, Modern drug delivery & development, ペンシルベニアコンベンションセンタ (USA)、12 月 4-6 日、2006 年
 28. Shuhei Shigaki (九州大学)、Takayuki Yamaji、Xiaoming Han、Go Yamanouchi、Takeshi Mori、Takuro Niidome and Yoshiki Katayama, 5th Asian International Symposium on Biomaterials, Xiamen National Accounting Institution, Xiamen, China, 11 月、2006 年
 29. Yuko. T. Sato (九州大学・CREST)、Kenji Kawamura, T. Mori, T. Niidome, Y. Katayama, Structure and functional regulation of DNA complex formed with Cell-Signal responsive Gene Carrier, Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of Biophysical society of Japan, 宜野湾市 沖縄コンベンションセンター, 11 月 12 日-16 日, 2006 年
 30. Jun Oishi (九州大学)、Yoji Asami, Takeshi Mori, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, A Development of Gold Nanoparticles-based Protein Kinase Assay、The 2nd Symposium on Functional Innovation of Molecular Informatics、福岡市東区、11 月 1 日-2 日、2006 年
 31. 福本義弘 (東北大学)、下川宏明: 肺高血圧における Rho キナーゼの分子標的治療としての重要性、第 47 回日本脈管学会総会、神戸市、10 月 20-22 日、2006 年
 32. Tonoi H. (大阪大学)、Jung J., Kasuya T., Hoshijima M., Kondo A., Seno M., Ueda M., Tanizawa K., Kuroda S., Cardiomyocyte-specific pinpoint drug and gene delivery system using zz-displaying bio-nanocapsule、La Jolla-Capri-Yamaguchi-Seoul Research Conferences、山口市、10 月 6 日-8 日、2006 年
 33. 戸井田 力(九州大学)、姜 貞勲、姜 玉花、森 健、新留 琢郎、片山 佳樹、プロテインキナーゼ Ca に応答する新規遺伝子キャリア、第 55 回高分子討論会、富山市五福、富山大学五福キャンパス、9 月 20 日-22 日、2006 年
 34. 寺田 恵子(九州大学)・佐藤 祐子・森 健・新留 琢郎・片山 佳樹、非受容体型チロシンキナーゼ Src 応答型遺伝子キャリアの創製とその機能制御、第 55 回高分子討論会、富山市五福、富山大学五福キャンパス、9 月 20 日-22 日、2006 年
 35. 伊集院 萌子(九州大学)、大石 潤、森 健、新留 琢郎、片山 佳樹、RGD ペプチド修飾シグナル応答性遺伝子キャリアーの機能評価、生体関連化学若手の会サマースクール、山の上ホテル(福岡市中央区)、8 月 24 日、25 日、2006 年
 36. 戸井田 力(九州大学)、姜 貞勲、姜 玉花、森 健、新留 琢郎、片山 佳樹、細胞内プロテインキナーゼ Ca を利用した新規の遺伝子キャリア、生体関連化学若手の会サマースクール、山の上ホテル(福岡市中央区)、8 月 24 日、25 日、2006 年
 37. Yoshiki Katayama(九州大学)、Jeong-Hun Kang, Daisuke Asai, Yuko Sato, Jun Oishi, Takuro Niidome、Protein kinase-responsive artificial gene regulation for cell-specific gene therapy、33rd Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society、Austria Center, Vienna, Austria、7 月 22-26 日、2006 年
 38. 姜 玉花(九州大学)、姜 貞勲、戸井田力、大石 潤、河村 健司、森 健、新留 琢郎、片山佳樹、細胞内 Rho-kinase シグナルによる遺伝子発現の制御、第 43 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(北九州市小倉北区)、7 月 8 日、2006 年
 39. 戸井田 力(九州大学)、姜 貞勲、姜 玉花、大石 潤、河村 健司、森 健、新留 琢郎、片山 佳樹、プロテインキナーゼ Ca に応答する新規の遺伝子デリバリー材料、第 43 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(北九州市小倉北区)、7 月 8 日、2006 年
 40. 伊集院萌子(九州大学)、大石潤、河村健司、姜貞勲、佐藤裕子、片山佳樹、RGD ペプ

- チドを修飾した PKA シグナル応答型ポリマーの合成とその機能評価、第 43 回化学関連支部合同九州大会、北九州国際会議場(北九州市小倉北区)、7 月 8 日、2006 年
41. Kasuya T. (大阪大学), Uyeda A., Tanizawa K., Kuroda S., Hepatitis B Virus Envelope Pre-S Peptide Applicable for the Human Liver-specific Protein Delivering System、IUBMB、京都国際会議場、京都市、6 月 18 日～23 日、2006 年
 42. Jung J. (大阪大学), Yamada T., Kondo A., Seno M., Ueda M., Tanizawa K.), Kuroda S., Improvement of in vivo pinpoint drug delivery system using bio-nanocapsules、IUBMB、京都国際会議場、京都市、6 月 18 日～23 日、2006 年
 43. Yoshiki Katayama (九州大学), Jeong-Hun Lang, Daisuke Asai, Yuko Sato, Jun Oishi, Takuro Niidome, Novel Cell-Specific Gene Delivery for Tumors Using a Drug or Gene Delivery, American Society of Gene Therapy, 9th Annual Meeting, アメリカ合衆国メリーランド州ボルチモア、ボルチモアコンベンションセンタ、5 月 31 日～6 月 4 日、2006 年
 44. 伊集院萌子 (九州大学)、大石潤、河村健司、姜貞勲、浅井大輔、片山佳樹、PKA シグナル応答型ポリマーへの RGD ペプチドの修飾とその機能評価、第 55 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)、5 月 24 日～26 日、2006 年
 45. 寺田恵子 (九州大学)・佐藤祐子・大石潤・河村健司・姜貞勲・浅井大輔・片山佳樹、非受容体型チロシンキナーゼ応答型キャリアの創製と機能制御、第 55 回高分子学会年次大会、名古屋国際会議場(名古屋市熱田区)、5 月 24 日～26 日、2006 年
 46. 戸井田 力 (九州大学)、姜 貞勲、森 健、新留 琢郎、片山 佳樹、プロテインキナーゼ Ca 応答型遺伝子デリバリー材料、遺伝子・デリバリー研究会 第 6 回シンポジウム、福岡市、九州大学医学部、5 月 18 日、19 日、2006 年
 47. 河村 健司 (九州大学)、大石 潤、倉本政則、姜貞勲、浅井大輔、佐藤裕子、森 健、新留琢郎、片山佳樹、細胞内プロテアーゼに応答する遺伝子キャリア、遺伝子・デリバリー研究会 第 6 回シンポジウム、福岡市、九州大学医学部、5 月 18 日、19 日、2006 年
 48. 寺田恵子 (九州大学)・佐藤祐子・大石潤・河村健司・姜貞勲・浅井大輔・片山佳樹、非受容体型チロシンキナーゼ応答型キャリアの創製とその機能制御、遺伝子・デリバリー研究会 第 6 回シンポジウム、福岡市、九州大学医学部、5 月 18 日、19 日、2006 年
 49. 佐藤祐子 (九州大学・CREST)・大石潤・寺田恵子・河村健司・浅井大輔・姜貞勲・片山佳樹、非受容体型チロシンキナーゼ応答型キャリア-DNA 複合体の形態とその機能制御、遺伝子・デリバリー研究会 第 6 回シンポジウム、福岡市、九州大学医学部、5 月 18 日、19 日、2006 年
 50. Kenji Kawamura (九州大学), Jun Oishi, Jeong-Hun Kang, Kota Kodama, Masaharu Murata, Yoshiki Katayama, Intracellular protease signal-responsive gene carrier for cell-specific gene delivery, Pacificchem2005, Hawaii(USA)、12 月 15～20 日、2005 年
 51. J.H. Kang (九州大学・CREST), J.Oishi, K.Kawamura, K.Kodama; M.Murata; T.Niidome; Y.Katayama, Novel gene delivery system based on responses to protein kinase C (PKC) alpha intracellular signals, PACIFICHEM2005, Pacificchem2005, Hawaii(USA)、12 月 15～20 日、2005 年
 52. Yusuke Inoue (九州大学), Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Kazuki Inamori, Yoshiki Katayama, Detection of kinase activity by surface plasmon resonance imaging technique on a peptie array、Pacificchem2005、Hawaii(USA)、12 月 15～20 日、2005 年
 53. J. Oishi (九州大学), K. Kawamura, J.H Kang, K. Kodama, M. Murata, T. Niidome, Y. Katayama, Artificial gene regulation system responding to intracellular protein kinase A for cell-specific gene therapy, PACIFICHEM2005, Pacificchem2005, Hawaii(USA)、12 月 15～20 日、2005 年
 54. Kota Kodama (九州大学), Daisuke Asai, Yoko Shoji, Hideki Nakashima, Jeong-Hun Kang,

- Kenji Kawamura, Jun Oishi, Takuro Niidome, and Yoshiki Katayama, Artificial gene regulation system responding to Virus infection, Pacificchem2005, Hawaii(USA)、12月15～20日、2005年
55. K. Ikuta (九州大学) , T. Yamamoto, F. Hyodo, T. Uwatoku, T. Urasaki, M. Murata, H. Shimokawa, T. Niidome, H. Utsumi and Y. Katayama, In Vivo Imaging of Vascular Endothelial Dysfunction using a Novel Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent, Pacificchem2005, Hawaii(USA)、12月19日、2005年
 56. S. Shigaki (九州大学) , T. Sonoda, O. Okitsu, M. Murata, Y. Katayama, Development of protein kinase assay using peptide probe and mass spectrometry, Pacificchem2005, Hawaii(USA)、12月17日、2005年
 57. 児玉耕太 (九州大学)、浅井大輔、Kang Jeong-Hun、新留琢郎、片山佳樹、東海林洋子、中島秀喜、HIV感染応答性遺伝子放出キャリアーによるHIV遺伝子治療法の開発、HIV学会、熊本、12月1～3日、2005年
 58. 樋詰貴登士、下川宏明：血清コルチゾール持続高値により惹起されたブタ冠動脈過収縮反応—Rho-kinase 経路の関与—、第46回日本脈管学会総会、大阪市、12月1～3日、2005年
 59. Jeong-Hun Kang (九州大学・CREST) , Jun Oishi, Kenji Kawamura, Takuro Niidome , and Yoshiki Katayama, Novel method for gene therapy using a gene delivery system based on responses to intercellular signals, 2005 Kyushu-Seibu/Pusan-Kyeongnam Joint Symposium on High Polymers (12th) and Fibers (10th), 北九州市、11月4日、2005年
 60. Kenji Kawamura (九州大学) , Jun Oishi, Jeong-Hun Kang, Tatsuhiko Sonoda, Masaharu Murata, Takuro Niidome, Yoshiki Katayama, Intracellular Caspase-3 Signal-Responsive Gene Carrier for Novel Gene Delivery, 05 Pusan-Kyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium On High Polymers (12th) and Fibers (10th), 北九州市、11月4日、2005年
 61. J. Oishi (九州大学) , K. Kawamura, J-H. Kang, T. Sonoda, T. Niidome and Y. Katayama, Protein kinase signal-responsive gene delivery using polymer-peptide conjugates, poster,, Pusan-Kyeongnam/Kyushu-Seibu Joint Symposium on High Polymers(12th)and Fibers(10th), 北九州市、11月4日、2005年
 62. Kenji Kawamura (九州大学) , Jeoung-Hun Kang, Yoshiki Katayama, Novel gene delivery system responding to intracellular Caspase-3 signal , The 6th CMC-Kyushu Chemistry Symposium, 福岡市、10月28～30日、2005年
 63. Jeong-Hun Kang (九州大学・CREST) , Jun Oishi, Kenji Kawamura, Takuro Niidome , and Yoshiki Katayama, New method for gene therapy of tumor using drug or gene delivery system based on responses to cellular signals (D-RECS), The 6th CMC-Kyushu Chemistry Symposium, Fukuoka, 10月28-29日、2005年
 64. J. Oishi (九州大学) , K. Kawamura, J.H Kang, K. Kodama, M. Murata, T. Niidome, Y. Katayama, Cell-specific gene regulation system responding to protein kinase signal, poster, The 8th International polymer conference (IPC2005),福岡県福岡市 2005年 7月26日-29日、2005年
 65. K. Ikuta (九州大学) , T. Yamamoto, K. Abe, T. Uwatoku, K. Oi, M. Murata, H. Shimokawa, T. Niidome and Y. , Novel Drug Delivery Systems for Recognizing Vascular Endothelial Disorder, The 8th International polymer conference (IPC2005)、福岡市、7月26～29日、2005年
 66. 樋詰貴登士、下川宏明、森川敬子、上徳豊和、大井啓司、阿部弘太郎、砂川賢二：血清コルチゾールの持続高値によるブタ冠動脈過収縮反応の惹起 —Rho-kinase 経路の関与—、第37回日本動脈硬化学会総会、東京、7月14～15日、2005年
 67. 大井啓司、下川宏明、廣木潤子、武市早苗、中嶋克行、竹下 彰：ポックリ病患者由来のレムナントリポ蛋白分画の慢性刺激は冠動脈の攣縮性反応を惹起する、第37回日本動脈硬化学会総会、東京、7月14～15日、2005年
 68. Shoji Y. (聖マリアンナ医科大学) , Oowada S., Ishii Y., Takemura H., Kubota S.,

- Nakashima H. Application of in vivo ESR spectroscopy to assess the oxidative stress in the liver of a diabetic model animal. 32nd Annual meeting & Exposition of the Controlled Release Society. 6月18-22日、2005年
69. 生田健次郎 (九州大学)、浦崎哲彦、上徳豊和、兵藤文紀、村田正治、新留琢郎、吉満研吾、下川宏明、内海英雄、片山佳樹、血管内皮障害特異的な新規ターゲティングシステムの開発、第11回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、福岡市、5月23日、2005年
 70. 姜貞勲 (九州大学・CREST)、児玉耕太、大石潤、河村健司、新留琢郎、片山佳樹、細胞内シグナル応答型遺伝子送達システム、高分子学会、横浜、5月25-27日
 71. 姜貞勲 (九州大学・CREST)、大石潤、河村健司、児玉耕太、村田正治、新留琢郎、片山佳樹、Protein kinase C alpha 細胞内シグナルを利用した新しい遺伝子治療方法の開発、The 5th Anniversary Symposium for Gene Design and Delivery Program、Tokyo、5月20-21日、2005年
 72. Yoshiki Katayama (九州大学)、Jeong Hun Kang, Kota Kodama, Jun Oishi, Takuro Niidome、Intracellular Signal-Responsive Gene Carrier for Cell-Specific Gene Therapy, ASGT 8th Annual Meeting、St. Louis、5月2日、2005年
 73. Hizume T (九州大学)、Shimokawa H, Morikawa K, Uwatoku T, Oi K, Abe K, Kubo C. Sustained elevation of serum levels of cortisol induces hypercontraction of porcine coronary arteries -Possible involvement of Rho-kinase-, The 11th Congress of the Asian College of Psychosomatic Medicine、那覇、沖縄、10月23-25日、2004年
 74. 服部 剛 (九州大学)、阿部弘太郎、東みどり子、松本泰治、廣木潤子、向井 靖、江頭泰博、盛重邦雄、下川宏明：血管リモデリングの治療標的としての Rho-kinase の意義、第36回日本動脈硬化学会学術総会、福岡市、7月23-24日、2004年
 75. 東みどり子 (九州大学)、下川宏明：Angiotensin II 誘発性心血管肥大における Rho-kinase の関与、第36回日本動脈硬化学会学術総会、福岡市、7月23-24日、2004年
 76. 阿部弘太郎 (九州大学)、下川宏明：Rho-kinase を標的とした原発性肺高血圧治療の新しい分子治療法の開発、第36回日本動脈硬化学会学術総会、福岡市、7月23-24日、2004年
 77. 東みどり子 (九州大学)、下川宏明、森川敬子、高橋 成輔：Angiotensin II 投与マウスにおける Rho-kinase のアイソフォーム Rho-kinase と Rho-kinase の発現の相違、日本麻酔学会、名古屋市、5月27-29日、2004年
 78. 阿部弘太郎 (九州大学)、上徳豊和、大井啓司、樋詰貴登士、下川宏明：Monocrotaline 誘発性ラット肺高血圧症の成因における Rho-kinase の関与、第44回日本脈管学会総会、福岡市、11月6日-8日、2003年

(4)特許出願

①国内出願 (17件)

1. Rho-kinase に高い親和性を持つ新規基質ペプチド、片山佳樹、姜貞勲、出願人：九州大学、特願 2007-032018
2. リン酸化酵素の新規基質ポリペプチド、片山佳樹、姜貞勲、出願人：九州大学、特願 2007-032018
3. ドラッグデリバリーシステムに用いる複合粒子 清水宣明、荻野千秋、黒田俊一、出願人：国立大学法人 金沢大学、国立大学法人 大阪大学、2007年2月13日、特願 2007-032765 (2007年2月13日)

4. 免疫学的測定用ビオチン化ナノ粒子 平松伸吾、鄭 基晩、畠平智子、金森大典、角矢博保、黒田俊一、谷澤克行、出願人：(株)東レ、国立大学法人 大阪大学、2007 年1月 11 日、特願 2007-3677
5. プロテインキナーゼのリン酸化酵素活性ならびに脱リン酸化酵素活性の測定方法、片山佳樹、大石潤、出願人：九州大学、特願 2006-237358
6. ビオチン化ないしホーミングペプチド提示型バイオナノカプセル 黒田俊一、植田淳子、名木田真奈、殿井裕之、出願人：科学技術振興機構(RX03P63)、国立大学法人大阪大学、(株)ビークル、2006 年 12 月 28 日、特願 2006-356378
7. 免疫学的測定用ナノ粒子 平松伸吾、鄭 基晩、畠平智子、金森大典、黒田俊一、谷澤克行、出願人：東レ、(株)ビークル、2006 年 9 月 25 日、特願 2006-258398
8. 基板およびその製造方法 平松伸吾、鄭 基晩、畠平智子、金森大典、黒田俊一、谷澤克行、出願人：東レ、(株)ビークル、2006 年 9 月 22 日、特願 2006-257829
9. バイオナノカプセル内部への効率的な物質封入方法 黒田俊一、植田淳子、名木田真奈、出願人：科学技術振興事業機構、国立大学法人 大阪大学、(株)ビークル、2006 年 9 月 5 日、出願 2006-240746
10. 中空バイオナノ粒子への遺伝子導入剤及び導入法 黒田俊一、鄭周姫、谷澤克行、大石潤、片山佳樹、カン貞勲、山田忠範、出願人：国立大学法人 大阪大学、国立大学法人 九州大学、(株)ビークル、2006 年 7 月 28 日、特願 2006-205698
11. リン酸化酵素の新規基質ポリペプチド”、片山佳樹・姜貞勲、出願人：国立大学法人九州大学、平成 18 年 2 月 10 日、特願 2006-34243
12. 癌治療用薬剤およびその作製方法 妹尾昌治、多田宏子、福田隆之、黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、浜田博喜、出願人：(株)ビークル、(株)バイオ・タキソール、国立大学法人岡山大学、2005 年 3 月 23 日、出願 2005-84438
13. リン酸化一脱リン酸化反応検出用基質群およびそれを用いた検出法、沖津修、長島健之、村元正和、和田卓也、西村伸太郎、片山佳樹、園田達彦、喜多康浩、高橋紀代子、土田暁子、出願人：藤澤薬品工業株式会社、2005 年 2 月 4 日、出願番号：特願 2005-29690
14. バイオナノカプセルの効率的な精製方法 黒田俊一、前川圭美、名木田真奈、出願人：科学技術振興事業機構、国立大学法人 大阪大学、(株)ビークル、2006 年 2 月 13 日、特願 2006-35666
15. 抗ウイルス剤、：山瀬利博、東海林洋子、出願人：財団法人 理工学振興会、平成 16 年 5 月 17 日、出願番号：特願 2004-146114
16. 中空ナノ粒子を用いたセンシングツールおよびそれを用いたセンシング法 谷澤克行、

黒田俊一、鄭基晩、秋山英雄、信正均、出願人：東レ、2004 年 3 月 31 日、出願
2004-104702

17. 心血管病の治療又は予防の為の医薬組成物、下川宏明、出願人：三共株式会社、
2004 年 1 月 29 日、出願番号：2004-21864

②海外出願（1件）

1. MRI 造影剤、片山佳樹、下川宏明、山本竜広、出願人：（株）産学連携機構九州（整
理番号 03020&02056）、2004 年 2 月 3 日、国際出願番号：PCT/JP2004/001063、国際
公開日：2004 年 9 月 10 日

(5)受賞等

①受賞

2007 年

大石潤、九州分析化学奨励賞

朝見陽次、第 44 回化学関連支部合同九州大会、優秀ポスター賞

2006 年

下川弘明：2006 年度米国心臓協会（AHA）学会賞受賞

黒田俊一、平成17年度 大阪大学教育・研究功績賞

伊集院萌子、第 18 回生体機能関連化学若手の会サマースクール、優秀ポスター賞

2005 年

黒田俊一、谷澤克行、平成 16 年度大阪大学教育・研究功績賞

黒田俊一、妹尾昌治、上田政和、平成17年度 中国地域産学官連携功労者表彰大学発
ベンチャー功労賞

黒田俊一（共同）、第4回日本バイオベンチャー大賞・文部科学大臣賞受賞

2004 年

黒田俊一、バイオビジネスコンペ JAPAN 優秀賞

黒田俊一、財団法人病態代謝研究会 最優秀理事長賞

大石潤、高分子学会九州支部若手奨励賞

②新聞報道

1. 動脈硬化病変を描出する MRI 用機能化造影剤の開発 2004 年 11 月 9 日読売新聞
朝刊
2. ベルギーとの中空バイオナノ粒子を用いる血友病遺伝子治療法の臨床段階以降に
関して 平成 15 年 11 月 6 日(化学工業日報)、平成 15 年 11 月 10 日(日本工業新
聞)、平成 15 年 11 月 17 日(日刊工業新聞)
3. 扁平上皮癌に再標的化した中空ナノ粒子による癌治療実験成功に関して 平成 16
年 3 月 24 日(毎日新聞)
4. 科学技術振興機構(JST)が 00 年、01 年に実施した権利化試験事業が順調に推移し、
特に黒田がリーダーを務めたプロジェクトが高い評価を受けたことに関して 平成 16
年 7 月 17 日(日刊工業新聞)
5. 黒田が関与するビークルが、中空バイオナノ粒子による医薬開発加速一昨年 3 試薬
投入することに関して 平成 16 年 7 月 21 日(日刊工業新聞)
6. 黒田が関与するビークルに関する特集 平成 16 年 9 月号 (日経バイオビジネス)
7. 文部科学大臣賞受賞 平成17年10月5日(フジサンケイビジネスアイ)
8. ㈱ビークルの紹介記事 平成17年12月6日 (日刊工業新聞)

9. 樹皮の紹介記事 平成18年5月10日 (日刊工業新聞)
10. ナノサイズのDDS、治療応用間近に 平成18年11月27日 (日経ナノビジネス)
11. 画期的な運搬体「バイオナノカプセル」薬剤を必要な場所に適量運ぶ 平成19年1月号(JST NEWS (Vol 3, No. 10))
12. 薬物送達システム 粒子表面に抗体付着 平成19年2月10日(日経産業新聞)

④ その他

TV番組「サイエンスフロンティア21」(35)夢の医療 ドラッグデリバリーシステム バイオナノカプセルで病気を狙い撃て！(製作 JST) 平成18年3月22日(木) 17時00分～17時29分 CS衛星放送「SKY Perfec TV！」765-ch「子育て支援・サイエンスチャンネル」

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
平成 16 年 2 月 6 日	チームミーティング	九州大学	18 人	今後のグループ間の連携と、研究の目的について話しあった。
2007/04/11	チームミーティング	九州大学	8 人	E-selectin 型中空バイオナノ粒子を用いたキャリアー/DNA 複合体の細胞導入についてのプロポーザル
本チームでは、最初のチームミーティング後は、全体で集まることはせず、常時、メールなどで連絡をとりながら、必要なメンバーが常時、互いに行き来して研究を遂行した。				

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

平成 19－20 年 科学研究費補助金「萌芽研究」

平成 19－20 年 科学研究費補助金「特定領域研究」

平成16－18 厚生労働省 厚生労働科学研究費補助金 萌芽的先端医療技術推進研究事業 ナノメディシン分野 (研究分担者として)

平成18－20 科学技術振興事業機構(JST)「地域研究開発資源活用促進プログラム」(プロジェクトリーダー)

(2)実用化に向けた展開

本研究で開発を行った基質ペプチド探索システムは、診断、創薬ツールとして複数の企業よりアクセスがあり、日本の企業3社とのプロジェクト申請も視野に入れた共同研究に発展している。そのほかにも、韓国の企業との共同研究も始まろうとしている。また、フランスの企業からも問い合わせが来ている。さらに、機能化造影剤に関しては、アメリカの企業2社から問い合わせが来ている。

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

領域会議への参加がきっかけとなり、同領域の片岡チームの原島教授(北海道大学)と、遺伝子制御システムの in vivo 適用のためのキャリアーとして、MENDの適用の共同研究を開始している。

(2)領域横断的活動とその効果
特になし

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

本研究成果で、最も化学技術の進歩に資すると考えられるのは、これまで純粋に医学、生物学の領域の研究対象であった、細胞内情報伝達系に工学的にアプローチし、それを利用し、あるいは人工的に制御できる技術を確立したことにある。これまで、DDSにおいては、細胞の表面に存在するマーカーを利用する技術が存在するのみであったが、これでは、臓器選択性は出せても、in vivo において、疾患細胞への特異性は実現できていなかった。あるいは、疾患細胞に標的かできたとしても、それ以外の肝臓などの臓器での集積が、それ以上に起こってしまい、これを解決する方法論が見つかっていなかった。本研究では、工学的に細胞内シグナルを利用して、遺伝子の転写を制御する概念を確立し、細胞の中で細胞を見分ける、全く新しい概念が、実現可能であることを、細胞、動物を用いて示すことができた。実際に、これまでのDDSの手法に比べて、比較にならないほどの高度な細胞の認識を実現できた。この成果は、今後のDDSや治療法の開発に、大きな貢献をするものであり、これまで解決できずにいた多くのDDS分野への波及効果は非常に大きいといえる。

さらに、レポーター遺伝子を併用した in vivo の遺伝子制御の成果は、in vivo での細胞内イメージングであり、学術的にも画期的なことであると考えている。細胞内シグナルは、生命機能を形成する源であるため、その研究は極めて重要であるが、これまでは、培養細胞でのイメージング法しか存在しなかった。しかし、本成果により、生物個体内での、特定細胞の細胞内シグナルの挙動を研究できるわけであり、生命機能の研究に、本質的に異なる情報をもたらし、学術的に極めて大きなブレイクスルーである。

また、本研究における遺伝子制御のメカニズム解明から分かってきた、生命分子間の相互認識や機能発現における、分子の運動性の支配の仮説は、これまで、結晶解析と小分子での知見を基に考えられてきた、静的な分子認識の考え方を根本から覆す可能性を秘めており、生物物理や基礎医学への波及効果はもちろん、ポストゲノム研究を含む、生命昨日発現の理解に資する効果は、計り知れないものがある。これまで、ゲノム遺伝子転写の制御メカニズムは、ほとんどわかっていなかったが、ことによると、ゲノム遺伝子の抑制は、DNA鎖の運動を抑え込むことに原因があり、ヒストンアセチル化や、エンハンサーへの転写因子の結合に伴う遺伝子の迅速な活性化は、その部分のDNA鎖の運動性の開放によるのかもしれない。このような考え方は、これまで存在せず、今後、学術的に大きな影響を及ぼすのではないかと期待している。

さらに、本研究では、これまで不可能とされてきた特異基質が複数開発できた。これらの基質はそれ自体、有用なプローブとして利用できるほか、これを利用して、阻害剤などの開発も可能であり、シグナル伝達研究や疾患の治療研究、診断法開発などにも非常に有効である。事実、Rhoキナーゼの基質に関しては、すでに、欧米を中心に多くの問い合わせが来ている。また、このような、新規基質を創出できるようになった、ペプチドアレイを中心とした方法論も、今後の薬学を中心とした多くの学術分野に大きな波及効果を有していると考えている。

また、循環器疾患適用のための多くの検討より、Rho/Rho-kinase 経路の各種疾患の成因における役割が明らかにされ、Rho-kinase を標的とした分子標的治療の開発につながる成果が得られた。さらに、Evans blue 骨格を用いた MRI 用造影剤の開発により、非侵襲的な動脈硬化の診断基礎技術が開発でき、これに関してもRoyal Societyなど複数の学術機関の研究者からも問い合わせが来ており、今後の基礎、臨床医学への大きな波及効果を期待している。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

本研究成果は、細胞特異性の問題から、実用化が進んでいない難治性疾患に対する遺伝子治療に対して法を解決する可能性を与えるものである。本手法の更なる実用化へ雄検討により、

これまで使用が断念されてきた多くの治療用遺伝子が、使用可能となることが期待でき、それら治療用遺伝子開発が使用できるようになれば、経済効果は大きく、また、それにより、がんなどの治療への道が開ければ、社会的な貢献も非常に大きいものがある。

また、本研究成果を基にした、レポーター遺伝子を併用する細胞内シグナルの *in vivo* イメージングは、がんをはじめとする多くの疾患の診断法や、それら疾患に対する薬物開発時における、効果判定用の創薬ツールとして、極めて重要である。現在、がんの診断ではPETが有効であるが、これはがん細胞の代謝活性を診断できるからである。これに対し、細胞内シグナルは、細胞の代謝活性のみでなく、あらゆる機能の指標となりうる。したがって、本研究での成果を利用して、複数のシグナルをイメージングできれば、さらに詳細な診断が可能であると期待できる。PETは、高価で、特別な設備が必要であるが、本手法が確立すれば、安価で多くの病院で使用できる診断法となりうると期待できる。また、創薬に用いる場合、新薬の開発速度を劇的に加速できる可能性があり、その高価は大きいと期待している。さらには、それにより開発できた分子標的薬が実用化された場合、この評価に用いられたイメージング法は、その薬の投薬前診断として利用できることも期待でき、社会的価値は大きい。

最終的には、基質探索、イメージングによる創薬と診断、治療用遺伝子を用いた遺伝子治療を一貫して行える、医療システムに発展させていけば、創薬、診断、治療を同時に一貫して行え、しかも、テラメドの医療が本質的に可能となり、画期的なシステムになると期待できる。現在、欧米を中心に、診断と創薬の一体化、あるいは、診断と治療の一体化が叫ばれているが、その具体的な出口はまだない。しかし、本システムでは、さらに一歩進んで、3社を一体化でき、医療を本質的に変えてしまう可能性さえあると考えている。

11 結び

本研究では、遺伝子治療の問題点を解決する、新しい細胞特異的な遺伝子治療法概念として、細胞内シグナルを利用する遺伝子転写制御システムを開発し、それが実際に、細胞、さらには生体内で機能しうることを実証し、概念の確立と、がん、ウイルス疾患、循環器疾患に対する適用を確立することにあつた。これに対し、当初予定したシグナルに応答する制御剤は、すべて開発でき、さらに、計画になかったコクサッキーウイルスプロテアーゼに対するものも開発できた。さらに、本概念が、実際に細胞内と生体内で完璧に遺伝子発現を制御できることを実証することもでき、その意味では、経過をおおむね達成できたと考えている。特にがんに関しては、実際に治療法の検討に入るところまですることができた。一方、循環器系疾患と、ウイルス疾患に関しては、前者は、Rhoキナーゼの基質開発が予想よりも困難で、よい基質ができたが、生体での検討までは至らなかった。また、ウイルス疾患に関しては、よいモデルを作成することに困難があり、せいじまでの検討には至っていない。これらに関しては、循環器疾患については、評価系は確立したので、見出した基質を組み込んだ制御剤を用いて、今後、生体での効果を検証していく。また、ウイルス疾患に関しては、中空バイオナノ粒子(zz粒子)を用いた手法に期待している。中空バイオナノ粒子や、プラズマ法などを用いる細胞内シグナル応答型システムの投与方法に関しては、今後とも精力的に展開していく。

一方、計画にはなかったが、遺伝子制御メカニズム検討から生まれた新しい、生命機能発現における仮説は、今後、さらに検証を重ね、現在、解明できていない生命機能発現の機構解明ができるという大きな期待がある。また、研究に必要性から開発した、基質探索システムや、機能化造影剤は、それ自体も今後の医療に大きな貢献をすると評価している。

今後は、得られた成果を基に、

- 1) 新規 *in vivo* イメージングによる画期的がん診断法の開発
- 2) 実際に治療遺伝子を用いたがん治療法の開発
- 3) ウイルス疾患、循環器系疾患への適用の実用化
- 4) 基質探索システム、診断システム、治療システムを統合した究極の医療システムj開発
- 5) 生命機能に対する運動制御理論の確立

を目指して、研究を展開していく。

本研究においては、グループが、独自の研究をそれぞれを行うのではなく、密接な連携を行うことを心かけた。そのため、形式的な会議を行うのではなく、常に、メールで情報をやり取りし、必要に応じて、頻繁にメンバーが互いを行き来した。また、ひとつのテーマでも互いの技術を出しあって、研究を進めた。また、その中で、片山グループのCREST研究員が東海林グループの助教となるなど、人の異動も起こった。そのため、合成した試料や、物品を互いに送りあったりすることが多かったが、これを問題視されて理由を提出させられることもあった。しかしながら、真に互いが連携すると、ものや人が移動しないほうが異常ではないか考える。

CRESTは、リスクも大きかった研究構想を、多くの方々に助けを得ながら、潤沢な資金で効果的に勧めることができ、非常にありがたい 4 年間を与えていただき、感謝している。博士研究員を多く採用できたことも、非常に効果的であった。



研究室のメンバー