

櫻井 和朗

北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科 ・ 教授

DDS 粒子のナノ界面と鳥インフルエンザワクチン等への応用

§ 1. 研究実施体制

(1) 北九大グループ

- ① 研究代表者: 櫻井 和朗(北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科・教授)
- ② 研究項目「生体条件下での DDS 構造の解明と多糖核酸複合体の界面構造」
 - ・カチオン性脂質と DNA 複合体からの異常 X 線小角散乱 (ASAXS) 測定
 - ・高分子ミセルの内部構造と生理活性の相関把握
 - ・多糖核酸複合体の物性と薬理効果の相関: siRNA 系の構築
 - ・ウイルス模倣の立方体ミセル系の構築

(2) 東大グループ

- ① 主たる共同研究者: 雨宮慶幸 (東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授)
- ② 研究項目「X 線光子相関法を用いたゲル中でのナノ粒子ダイナミクスの解析」
 - ・pH 応答性ナノゲルの構造解析の精密化
 - ・XPCS 測定手法の高度化
 - ・高分子ミセルの構造揺らぎの準弾性 X 線散乱法による解析に関する検討

(3) JASRI グループ

- ① 主たる共同研究者: 八木 直人
((財) 高輝度光科学研究センター・利用研究促進部門・副部門長)
- ② 研究項目「高精度の散乱測定技術の確立」
 - ・時分割小角散乱測定法の開発 (山田好輝、八木直人)
 - ・ab initio 形状決定ソフトと MD 計算による分子集合体の構造決定 (E. Mylonas、八木直人)
 - ・X 線溶液小角散乱法による TLR9 の構造解析
 - ・X 線溶液小角散乱法によるテトラポッド型 DNA の構造解析

(4) 東京慈恵会医科大学グループ

- ①主たる共同研究者:横山昌幸(東京慈恵会医科大学医用エンジニアリング研究室、准教授)
- ②研究項目「高分子ミセルの薬物・造影剤封入内核の構造解析」
 - ・Br 原子ラベル薬物モデル封入高分子ミセルの作製
 - ・内核-外殻界面での PEG 密度を制御した高分子ミセルの体内動態測定
 - ・ABC 現象での ELISA による抗原特異性解析

(5) 医薬基盤研グループ

- ①主たる共同研究者:石井 健
(独)医薬基盤研究所 アジュバント開発プロジェクト・プロジェクトリーダー)
- ②研究項目「ナノ DDS 粒子を用いた新規ワクチン開発研究」
 - ・ヒト化 CpG-SPG 複合体のヒト細胞における自然免疫応答の検討
 - ・ヒト化 CpG-SPG 複合体のアジュバント効果とその免疫学的解析

(6) 有明高専グループ

- ①主たる共同研究者:大河平 紀司 (有明工業高等専門学校物質工学科・助教)
- ②研究項目「多糖核酸複合体の計算化学」
 - ・多糖核酸複合体(R 体および S 体)の構造解析

§ 2. 研究実施内容

(文中の[論文1]などの番号は(3-1)の文献リストに対応する)

(1) 北九大グループ

カチオン性脂質と DNA 複合体からの異常 X 線小角散乱 (ASAXS) 測定

DNA との複合化前後での構造変化を明確に判別できる系を見出した。脂質と DNA の双方にマーカーである臭素を修飾して、臭素の吸収端における X 線異常散乱をもちいて、構造決定を行っていく。これに関して、計算プログラムが必要であることがわかり、その開発も併せておこなった。

ASAXSを用いた高分子ミセルの薬剤内包状態の解析

高分子ミセルに内包する薬剤のモデル化合物として、tetrabromobenzenediol を選び、内包率を変化させた数種類の高分子ミセルからの ASAXS を実施した。薬剤の添加率が低い時は疎水鎖が形成するコアの内部に薬剤が留まっているが、添加率が増加するにつれて、プローブである Br の存在範囲はコアの外側の約 1nm まで広がっていることが分かった。ASAXS を使ったソフトマテリアルの研究は世界でも珍しく、この結果は、JACS [論文 14] および Macromolecules [論文 10] に受理された。

また、FFF と SAXS を組み合わせた高分子ミセルの精密な構造解析を行い、界面における PEG の密集状態を世界で初めて明らかにした [論文 8、9]。

(2) 東大グループ

XPCS 測定手法の高度化

ダイナミクス測定手法として強力な手法である XPCS (X-ray Photon Correlation Spectroscopy) であるが、ソフトマターへの応用に際しては照射損傷や測定可能な時間領域に関して改善が求められていた。そこで上記の課題を解決する手法として、スペックル散乱像の Visibility から XPCS と同等の情報が得られる X-ray Speckle Visibility Spectroscopy を検討し、光子数揺らぎなどの影響を考慮することでその結論を確認した (I. Inoue, *Optics Express*, 2012)。今後は本手法を用いることで、従来よりも高速な動的変化マイクロ秒 – ミリ秒程度のダイナミクス測定を検討する。

高分子ミセルの構造揺らぎの準弾性X線散乱法による解析に関する検討

ナノ秒領域の高分子ミセルの構造揺らぎを測定する手法として、核共鳴散乱を利用した準弾性X線散乱に着目し、予備検討測定を実施した。その結果、構造揺らぎを測定することは原理的には可能であるものの、本研究で対象とする高分子ミセルでは強度が数桁足りないため、本 CREST 期間内に本手法を応用して構造揺らぎを測定することは困難であることを確認した。

(3) JASRIグループ & 有明高専グループ

時分割小角散乱測定法の開発[論文 1]

多くのソフトマテリアルは動的に揺らいでおり、それが本質的に重要な性質を決める。そこで、比較的大きな構造を観測できる小角散乱を時間分解で測定し、材料の時間的な揺らぎを観測することを目的とした。これと同時に、高速X線検出器(低残光X線イメージインテンシファイアと高速 CMOS カメラ)を用いて、実空間での観測をおこない、小角散乱のデータと比較をした。モデルとして、細胞内カルシウム信号伝達蛋白質カルモデュリンのカルシウム結合に伴う構造変化を解析した。実験は SPring-8 のビームライン BL40XU において行った。試料溶液は光分解によってカルシウムを放出する「ケージ化合物」と共に試料セルに入れ、高輝度X線による放射線損傷を避けるために計測中は毎秒 50mm の速度でX線ビーム上を動かした。500 マイクロ秒の露光時間で連続的にX線小角散乱を記録しつつ、YAG レーザーによる光照射でケージ化合物を分解してカルシウムを放出し、カルシウム結合後のカルモデュリンのコンフォメーション変化を追跡した。その結果、従来知られていなかった中間状態がカルシウム結合後 20 ミリ秒の間に存在することを明らかにした。

ab initio 形状決定ソフトと MD 計算による分子集合体の構造決定

高分子ミセルのモデルとして各種 Calix-arene 分子のミセル構造を分子動力学法(MD)を用いて検討し、安定したミセルは常に高い対称性を示すことを明らかにした。また、最近、免疫系を刺激することが判明した、多足型構造を形成する DNA の溶液中における構造を MD を用いて解析し、DNA 鎖の形状と小角散乱データとの対応付けを検討した。

X 線溶液小角散乱法による TLR9 の構造解析

自然免疫系において非メチル CpG DNA 結合タンパク質として機能する TLR9 の構造を、X 線小角溶液散乱法を用いて検討した。バクテリアで発現し精製した TLR9 分子の X 線散乱データは、

類似タンパク質の結晶構造から予想されるものと良く合致しており、同様の構造を有していることが示唆された。リガンド DNA を結合した TLR9 では、分子量とサイズの増加が認められたが、結合 DNA の位置や量については更に検討を要する。

X線溶液小角散乱法によるテトラポッド型 DNA の構造解析

自然免疫誘導能を持つ CpG モチーフを含んだテトラポッド型 DNA の溶液構造を、X線小角散乱法を用いて解析した。散乱データは、大まかには正四面体状に四本の標準的 B 型 DNA が伸びた形状と一致する。しかし中心部分における DNA の構造が X 線散乱に影響を与えることが予想されるので、さらに細かく構造の解析を行っている。

(4) 慈恵医大グループ

高分子ミセルの作製と物性評価

薬物のミセル内核中での分布 ASAXS 測定のため、臭素原子が4あるいは5つ置換したベンゼン(残りの位置は OH 置換)化合物を、凝集を生じることなく2-4%程度封入し、ASAXS 測定に供した。また、内核-外殻界面での PEG 密度 σ を SAXS 測定によって求めた2つの高分子ミセルについてそのマウス血液中濃度を測定した。PEG 密度 ($\sigma = 7.4$) の高いものが静脈内投与4時間後に81%が血中にあるのに対し、PEG 密度 ($\sigma = 5.1$) の低いものは26%と低い値であった。この結果は *in vitro* GPC 溶出率のデータと相関した。(溶出率が高い方が血中濃度が高い)即ち、SAXS による測定で、高分子ミセルの体内動態を予測する可能性がもたらされた。

ABC 現象

上記の PEG 密度 (σ 値) を変えた高分子ミセルについて ABC 現象の誘起能を測定したところ、有意な差は観察されなかった。ABC 現象は投与量が重要な因子であり、今後これを変えてより詳細な差を解析する。一方、ABC 現象を起こしたマウスの血漿を用いてサンドイッチ ELISA 法を行うと PEG そのものをサンドイッチすると単なる溶媒である PBS の場合の negative control と同じで特異結合抗体が検出されなかった。これらの原因については検討中。

(5) 医薬基盤研グループ

ヒト化 CpG -SPG 複合体のヒト細胞における自然免疫応答の検討

これまでに検討を行ってきたヒト型 CpG ODN である K3 と SPG の複合体 (K3-dA-SPG) のヒト PBMC (末梢血単核細胞) における自然免疫誘導能、特に IFN- α 産生について *in vitro* で検討した。異なる4人の健常人の PBMC を用いて、K3、K3-dA、K3-dA-SPG で刺激を行い、24時間後の IFN- α の産生を ELISA にて測定した。その結果、従来の K3 に比べ K3-dA-SPG で刺激した際に、強力に IFN- α 産生が誘導された。IFN- α 産生細胞を明らかとするために刺激後の細胞を特異的抗体で染色後、フローサイトメーターを用いて検証した。その結果、plasmacytoid dendritic cell から強く IFN- α が産生されている事が明らかとなった。これらの結果より、これまでに明らかとしたマウスやサルの結果同様に、ヒト細胞においても複合体が強く自然免疫応答を誘導できることが強く示唆された。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. A Stimulus-Responsive Shape-Persistent Micelle Bearing a Calix[4]arene Building Block: Reversible pH-Dependent Transition between Spherical and Cylindrical Forms. Shota Fujii, Yusuke Sanada, Tomoki Nishimura, Isamu Akiba, and Kazuo Sakurai, Naoto Yagi and Efstratios Mylonas. *Langmuir*, 2012, 28 (6), pp 3092–3101, DOI: 10.1021/la2037668
2. β -1,3-d-Glucan Schizophyllan/Poly(dA) Triple-Helical Complex in Dilute Solution. Yusuke Sanada, Tsubasa Matsuzaki, Shinichi Mochizuki, Tadashi Okobira, Kazuya Uezu, and Kazuo Sakurai. *J. Phys. Chem. B*, 2012, 116(1), pp 87–94, DOI: 10.1021/jp209027u
3. A New Therapeutic Approach Using a Schizophyllan-based Drug Delivery System for Inflammatory Bowel Disease. Hidetoshi Takedatsu, Keiichi Mitsuyama, Shinichi Mochizuki, Teppei Kobayashi, Kazuo Sakurai, Hiroshi Takeda, Yoshihide Fujiyama, Yoshikazu Koyama, Jun Nishihira and Michio Sata. *Molecular Therapy*, (14 February 2012) doi:10.1038/mt.2012.24
4. Quaternary-ammonium-bearing Aromatic Surfactants: Effect of the Alkyl Chain Positions on Their Micelle and DNA-complex Structures. Takuma Matsuo, Shota Fujii, Yumi Kamikawa, Tomoki Nishimura, Yusuke Sanada, Shinichi Mochizuki and Kazuo Sakurai. *Chemistry Letters*. Vol. 40 (2011), No. 12 p.1340-1342. doi:10.1246/cl.2011.1340
5. Modeling and Evaluation of a Twist Drive Actuator for Soft Robotics. Ivan Godler, Takashi Sonoda and Kazuo Sakurai. *Advanced Robotics* 26 (2012) 765–783. DOI:10.1163/156855312X626307
6. Relationship between DNA-Transfection Efficiency and Chemical Structures of Aromatic Cationic Lipids. Shinichi Mochizuki, Yumi Kamikawa, Koichi Nishina, Shota Fujii, Emi Hamada, Shota Kusuki, Takuma Matsuo, and Kazuo Sakurai. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* Vol. 85, No. 3, 354359(2012), DOI: 10.1246/bcsj.20110296
7. Thermodynamics of Lipoplex Formation: Relationship between the Lipid Alkyl Tail Length and Thermodynamic Functions. Shota Fujii, Tomoki Nishimura, and Kazuo Sakurai. *Chem. Lett.* Vol.41, No.5, pp.501--503, (2012) doi:10.1246/cl.2012.501
8. Composition Dependence of the Micellar Architecture Made from Poly(ethylene glycol)-block-Poly(partially benzyl-esterified aspartic acid). Sanada Y, Akiba I, Hashida S, Sakurai K, Shiraishi K, Yokoyama M, Yagi N, Shinohara Y, Amemiya Y. *The Journal of PHYSICAL CHEMISTRY. B.* 2012, 116 (28), pp 8241–8250 DOI: 10.1021/jp300936d
9. SAXSとFFF-MALSを組合せた高分子ミセルのキャラクタリゼーション. 真田雄介, 秋葉勇, 橋田智史, 白石貢一, 横山昌幸, 八木直人, 篠原佑也, 雨宮慶幸, 櫻井和朗. *高分子論文集 (Kobunshi Ronbunshu)* Vol.69, No.7, pp. 346-357(Jul.,2012) DOI: 10.1295/koron.69.346

10. Anomalous Small-Angle X-ray Scattering Study of Structure of Polymer Micelles Having Bromines in Hydrophobic Core. Isamu Akiba, Atsuro Takechi, Megumi Sakou, Masashi Handa, Yuya Shinohara, Yoshiyuki Amemiya, Naoto Yagi, and Kazuo Sakurai. *Macromolecules*, 2012, 45 (15), pp 6150–6157, DOI: 10.1021/ma300461d
11. ssDNA-dsRNAs are cleaved at the next to its chimera-junction point by an unknown RNase activity Corresponding Author. Shinichi Mochizuki, Sadaharu Higuchi, Kazuo Sakurai. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 428(4), 433-437 (2012) doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.100.
12. The role of the helper lipid dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE) for DNA transfection cooperating with a cationic lipid bearing ethylenediamine. Mochizuki S, Kanegae N, Nishina K, Kamikawa Y, Koiwai K, Masunaga H, Sakurai K. *Biochim. Biophys. Acta*.1828(2), 412-418 (2013). 10.1016/j.bbame.2012.10.017
13. A simple visual sensor with the potential for determining the concentration of fluoride in water at environmentally significant levels. Tomoki Nishimura , Su-Ying Xu , Yun-Bao Jiang , John S. Fossey , Kazuo Sakurai , Steven D. Bull and Tony D. James. *Chemical Communications*, 2013,49, 478-480 DOI: 10.1039/C2CC36107H
14. Hydrophobic Molecules Infiltrating into the Poly(ethylene glycol) Domain of the Core/Shell Interface of a Polymeric Micelle: Evidence Obtained with Anomalous Small-Angle X-ray Scattering. Yusuke Sanada, Isamu Akiba, Kazuo Sakurai, Kouichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama, Efstratios Mylonas, Noboru Ohta, Naoto Yagi, Yuya Shinohara , and Yoshiyuki Amemiya. *Journal of the American Chemical Society*. Publication Date (Web): January 31, 2013 DOI: 10.1021/ja308965j
15. A bimolecular micelle constructed from amphiphilic pillar[5]arene molecules. Tomoki Nishimura , Yusuke Sanada , Takuma Matsuo , Tadashi Okobira , Efstratios Mylonas , Naoto Yagi and Kazuo Sakurai. *Chem. Commun.*, 2013, 49, 3052-3054 DOI: 10.1039/C3CC41186A
16. Structural Transition of Lipopolysaccharide and Reduction in the Biological Activity by Amphiphilic Lipid with Cationic Amino Acid. Li, Wenjing; Mochizuki, Shinichi; Sakurai, Kazuo. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* in press
17. 糖アルコールを有するカチオン性ミセルの pH 応答性による構造転移. 松尾拓馬、藤井翔太、眞田雄介、櫻井和朗. 高分子論文集 in press
18. Macrophage specific delivery of TNF- α siRNA complexed with β -1,3-glucan inhibits LPS-induced cytokine production in a murine acute hepatitis model. S Mochizuki, H Morishita, K Sakurai *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. In press
19. Shusaku Nagano, Yusuke Koizuka, Tomoya Murase, Masami Sano, Yuya Shinohara, Yoshiyuki Amemiya, and Takahiro Seki, “Synergy Effect on Morphology Switching: Real-Time Observation of Photo-Orientation of Microphase Separation in a Block Copolymer,” *Angewandte Chemie International Edition*, 51, 5884-5888, 2012 (DOI: 10.1002/anie.201201346).

20. Yoshinobu Nozue, Shuichiro Seno, Tatsuhiro Nagamatsu, Satoru Hosoda, Yuya Shinohara, Yoshiyuki Amemiya, E. B. Berda, G. Rojas, and K. B. Wagener, "Cross Nucelation in Polyethylene with Precisely Spaced Ethyl Branches," *ACS Macro Letters*, 1, 772-775, 2012 (DOI: 10.1021/mz300215u).
21. Ichiro Inoue, Yuya Shinohara, Akira Watanabe, and Yoshiyuki Amemiya, "Effect of shot noise on X-ray speckle visibility spectroscopy," *Optics Express*, 20, 26878-26887, 2012 (DOI: 10.1364/OE.20.026878).
22. Yamada, Y., T. Matsuo, H. Iwamoto and N. Yagi. A compact intermediate state of calmodulin in the process of target binding. *Biochemistry* 51(19), 3963-3970 (2012). (DOI: dx.doi.org/10.1021/bi3002192)
23. Yagi, N., T. Matsuo and N. Ohta. An X-ray Diffraction Study on a Single Rod Outer Segment from Frog Retina. *Journal of Synchrotron Radiation* 19, 574-578 (2012). (DOI: doi:10.1107/S0909049512018535)
24. Kouichi Shiraishi, Yoshiko Harada, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, Katsuyoshi Hori, Kazuyoshi Yanagihara, Misato Takigahira, and Masayuki Yokoyama, Tumor environment changed by combretastatin derivative (Cderiv) pretreatment that leads to effective tumor targeting, MRI studies and antitumor activity of polymeric micelle carrier systems, *Pharmaceutical Research*, 29: 178-186 (2012) doi: 10.1007/s11095-011-0525-3
25. Hiroyuki Koide, Tomohiro Asai, Hidenori Ando, Kouichi Shiraishi, Masayuki Yokoyama, and Naoto Oku, Size-dependent induction of accelerated blood clearance phenomenon by repeated injections of polymeric micelles, *International Journal of Pharmaceutics*, 432, 75-79 (2012) doi: 10.1016/j.ijpharm.2012.04.049.
26. Jun Shimizu, Reiko Endo, Takahiro Fukuda, Takuya Inagaki, Hiroshi Hano, Rei Asami, Ken-ichi Kawabata, Masayuki Yokoyama, and Hiroshi Furuhata, Safety evaluation of superheated perfluorocarbon nanodroplets for novel phase change type neurological therapeutic agents. *Perspective in Medicine*, 1, 25-29 (2012) doi:10.1016/j.permed.2012.02.058
27. Hayato Koganei, Manabu Ueno, Shoji Tachikawa, Lisa Tasaki, Hyun Seung Ban, Minoru Suzuki, Kouichi Shiraishi, Kumi Kawano, Masayuki Yokoyama, Yoshie Maitani, Koji Ono, and Hiroyuki Nakamura, Development of High Boron Content Liposomes and Their Promising Antitumor Effect for Neutron Capture Therapy of Cancers, *Bioconjugate Chemistry*, 24 (1), 124–132 (2013) doi: 10.1021/bc300527n
28. Kouichi Shiraishi, Mikiko Hamano, Ma Huili, Kumi Kawano, Yoshie Maitani, Taiki Aoshi, Ken J Ishii, Masayuki Yokoyama, Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon, *J. Controlled Release*, 165(3), 183-190 (2013) doi: 10.1016/j.jconrel.2012.11.016.
29. Tang CK, Aoshi T, Jounai N, Ito J, Ohata K, Kobiyama, K, Dessailly BH, Kuroda E, Akira S, Mizuguchi K, Coban C and Ishii KJ The chemotherapeutic agent DMXAA as a unique IRF3-dependent type-2 vaccine adjuvant *PLOS one* 2013 doi:10.1371/journal.pone.0060038 In press

30. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 110(8):2969-74. doi: 10.1073/pnas.1222694110.
31. Tougan T, Aoshi T, Coban C, Katakai Y, Kai C, Yasutomi Y, Ishii KJ, Horii T. TLR9 adjuvants enhance immunogenicity and protective efficacy of the SE36/AHG malaria vaccine in nonhuman primate models. *Hum Vaccin Immunother*. 2013 4;9(2) 283-290. doi.org/10.4161/hv.22950
32. Zhao H, Konishi A, Fujita Y, Yagi M, Ohata K, Aoshi T, Itagaki S, Sato S, Narita H, Abdelgelil NH, Inoue M, Culleton R, Kaneko O, Nakagawa A, Horii T, Akira S, Ishii KJ, Coban C. Lipocalin 2 bolsters innate and adaptive immune responses to blood-stage malaria infection by reinforcing host iron metabolism. *Cell Host Microbe*. 2012 Nov 15;12(5):705-16. doi: 10.1016/j.chom.2012.10.010.
33. Nakayama T, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) induced IgG1 and IgG4 antibody responses in young children. *Vaccine*. 2012 Oct 24. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.10.006.
34. Shoji M, Tachibana M, Katayama K, Tomita K, Tsuzuki S, Sakurai F, Kawabata K, Ishii KJ, Akira S, Mizuguchi H. Type-I IFN signaling is required for the induction of antigen-specific CD8(+) T cell responses by adenovirus vector vaccine in the gut-mucosa. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Aug 17;425(1):89-93. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.07.056.
35. Nakayama T, Kashiwagi Y, Kawashima H, Kumagai T, Ishii KJ, Ihara T. Alum-adjuvanted H5N1 whole virion inactivated vaccine (WIV) enhanced inflammatory cytokine productions. *Vaccine*. 2012 Jun 6;30(26):3885-90. doi: 10.1016/j.vaccine.2012.04.004.
36. Haenuki Y, Matsushita K, Futatsugi-Yumikura S, Ishii KJ, Kawagoe T, Imoto Y, Fujieda S, Yasuda M, Hisa Y, Akira S, Nakanishi K, Yoshimoto T. A critical role of IL-33 in experimental allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Jul;130(1):184-94.e11. doi: 10.1016/j.jaci.2012.02.013.

(3-2) 知財出願

①平成 24 年度特許出願件数(国内 0 件)

①CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)