

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	多段階的な細胞内・核内動態精密制御機能を搭載した多重コーティング型ナノ粒子の創製
研究機関・ 部局・職名	北海道大学 ・ 大学院薬学研究院 ・ 准教授
氏名	秋田 英万

1. 当該年度の研究目的

本年度は、①多重パッケージング法の開発、②細胞内における転写・翻訳制御を見据えた新規脂質組成の開拓、③新規細胞内動態制御素子の開発を目的とした。

① に関しては、複雑な製剤プロセスを踏まえ、1段階目のコーティングで精製し、さらに凍結乾燥などにより長期保存するための基本技術を確立することを目的とする。②に関しては、平成 22 年度に見いだした、新規脂質の特許化に必要なデータを取得すると共に、本脂質の in vivo 応用についても検討を前倒しで行う。また、③に関しては、A. 核膜孔内環境に親和性を持つ新規ペプチド、B. トランスサイトーシス標的化ペプチド配列、C. 微小管輸送タンパクへの機能性結合配列の観点から新規の機能性ペプチド素子を探索を目的とした。

2. 研究の実施状況

目的①の項目に関して、多重膜パッケージングに関しては、H22 年度に開発している 1 枚膜粒子に対し、異なる脂質組成の脂質膜でコーティングする技術の検討を行った。モデルとなる脂質膜組成の組み合わせで調製後、スクロース濃度勾配遠心を行い、電子顕微鏡により粒子を解析した結果、2枚膜の粒子が出来ていることが確認された。一方、下記に示す、新規脂質組成の組み合わせを用いた際の粒子形成には更なる検討が必要であり、その条件検討の設定が今後の課題となる。また、目的②に関しては、日油株式会社との共同開発により、一つの分子内に2本の脂肪酸ユニットと2つの3級アミンを有し、さらにそれがジスルフィド結合により架橋された脂質様物質(SS-cleavable pH-activated lipid-like material; Palm_{ss})を合成した。本設計は、細胞外では中性であるが、エンドソーム環境特異的に3級アミンがプロトン化され、正電荷を有することでエンドソーム脱出に寄与する。一方、細胞質の中性pH 環境に応じて正電荷が消失し、mRNA との静電的相互作用も回避できると考えられる。さらに、還元環境に応じて Palm_{ss} は開裂し、エンベロープ構造の不安定化とともに遺伝子が脱被覆されるように設計されている。これらの mRNA との相互作用の回避や、遺伝子の解離は、送達遺伝子の転写や翻訳効率を高める上で有用である。遺伝子発現などの機能評価に加え細胞内動態などの解析結果などを合わせて特許を申請した。目的③に関して、核膜孔に対して親和性の高いペプチドに関しては同定には至らなかったが、別の戦略に基づいて、探索を再度行った結果、細胞質内の中性 pH 環境下で融合性を示すペプチドが核膜の突破に有効であることを示し、本ペプチドを脂質膜上に提示するための脂質誘導体を開発した。さらに、本素子は、DNAワクチンへの展開の鍵となる樹状細胞への遺伝子発現増強を可能とするだけでなく、樹状細胞自体を活性化し、免疫増強出来ることを明らかとした。本結果を加え、国際特許出願を完了した。また、一方でトランスサイトーシスを増強できる新規ペプチドを同定し、アミノ酸配列の改変と機能との相関を解析することでコンセンサス配列の同定をおこなっている。さらに、微小管モータータンパクへの結合ドメインを搭載した粒子設計なども行い、細胞内動態のリアルタイム解析などをおこなった。

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 6 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 4 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Shaheen SM, Akita H, Nakamura T, Takayama S, Futaki S, Yamashita A, Katoono R, Yui N, Harashima H. Biomaterials 32(26):6342-50 (2011) 2. Akita H, Umetsu Y, Kurihara D, Harashima H. Dual imaging of mRNA and protein production: an investigation of the mechanism of heterogeneity in cationic lipid-mediated transgene expression. Int J Pharm. 415(1-2):218-20 (2011) 3. Ishitsuka T, Akita H, Harashima H. Functional improvement of an IRQ-PEG-MEND for delivering genes to the lung. J Control Release. 154(1):77-83 (2011) 4. Akita H, Masuda T, Nishio T, Niikura K, Ijro K, Harashima H. Improving in vivo hepatic transfection activity by controlling intracellular trafficking: the function of GALA and maltotriose. Mol Pharm. 8(4):1436-42 (2011). <p>(掲載済み一査読無し) 計 0 件</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nakamura T, Akita H, Yamada Y, Hatakeyama H, Harashima H. A Multifunctional Envelope-type Nanodevice for Use in Nanomedicine: Concept and Applications. Acc Chem Res. <i>in press</i> 2. Nakase I, Akita H, Kogure K, Gräslund A, Langel U, Harashima H, Futaki S. Efficient Intracellular Delivery of Nucleic Acid Pharmaceuticals Using Cell-Penetrating Peptides. Acc Chem Res. <i>in press</i>
<p>会議発表 計 10 件</p>	<p>専門家向け 計 10 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 秋田英万 リアルタイムイメージングを用いたナノ粒子の細胞内動態解析とその制御 札幌 2011年6月3-4日、札幌、東京大学ナノバイオ・インテグレーション研究拠点 (CNBI) 2. Akita H, KALA-modified multi-layered nano particles as antigen gene carrier for MHC Class-I mediated antigen presentation in DNA vaccine approach 38th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (CRS) July 30 - Aug. 3, 2011, USA, CRS 3. 石井聡一郎、秋田英万、シャリフ・M・シャヒーン、林泰弘、二木史朗、加地範匡、馬場嘉信、原島秀吉 樹状細胞由来細胞株での新規膜融合性ペプチドによる遺伝子発現促進メカニズムの解明 2011年5月11日 日本薬学会北海道支部第136回例会、札幌、日本薬学会 4. 秋田英万、榎戸薫、原島秀吉 ダイニン結合配列を表面搭載した遺伝子封入ナノ構造体の細胞内動態に関するリアルタイムイメージング解析 2011年6月9-10日 第27回日本DDS学会、東京、日本DDS学会 5. Hidetaka Akita Control of intracellular trafficking and intra-nuclear disposition of pDNA for DNA vaccine. SNU-HU Joint Sympodium, Nov. 19, Korea, Hokkaido Univ & Seoul Univ. 6. 秋田英万 樹状細胞由来細胞を標的としたDNA導入システム～DNAワクチンへの応用へ向けて～ 2011年9月21-24日 第84回日本生化学会大会、京都、日本生化学会 7. 鶉川 真実、秋田 英万、石破 諒平、丹下 耕太、新井 将也、久保 和弘、原島 秀吉 pH 応答性脂質様物質を用いた肝臓標的遺伝子キャリアの最適化 2011年11月21日-22日 第33回日本バイオマテリアル学会大会、京都、日本バイオマテリアル学会 8. 石破諒平、秋田英万、畠山浩人、佐藤悠介、田中浩揮、丹下耕太、新井将也、久保和弘、原島秀吉 pH 応答性脂質様物質を用いた遺伝子封入中性ナノ粒子の創製 2011年11月24-25日 第33回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、岡山、日本薬学会物理系薬学部会 9. 石破諒平、秋田英万、畠山浩人、佐藤悠介、田中浩揮、丹下耕太、新井将也、久保和弘、原島秀吉 pH 応答性脂質様物質を用いた遺伝子封入中性ナノ粒子の創製 2011年12月3日 日本薬学会北海道支部第137回例会、北海道、日本薬学会北海道支部 10. 秋田英万 樹状細胞由来細胞を標的とした遺伝子導入システム～DNA ワクチンへの応用へ向けて～ 2012年3月7日 第2回先端技術ワークショップ、東京、セルプロセス計測評価研究部会主催 <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 3 件</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 秋田英万、山田勇磨、山田勇磨、中村孝司、畠山浩人、林泰弘、梶本和昭、原島秀吉 バイオテクノロジーシリーズ(監修:菊地和也) 蛍光イメージング/MRI プローブの開発、P163-172 ISBN978-4-7813-0454-0 CMC 出版 (2011) 2. Akita H., Hatakeyama H., Khalil I.A., Yamada Y., and Harashima H. (2011) Delivery of Nucleic Acids and Gene Delivery. In: P. Ducheyne, K.E. Healy, D.W. Huttmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick (eds.). Comprehensive Biomaterials, vol. 4, pp. 411-444 Elsevier. ISBN-978-0-08-055302-3 3. 秋田英万、石田竜弘 新薬剤学;改定第3版(編集:原島秀吉)「7. 新しい剤形:ドラッグ・デリバリーシステム」、370-401 ISBN978-4-524-40286-1 南江堂 (2011)

様式19 別紙1

<p>産業財産権 出願・取得状 況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件 非公開情報に記載</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html http://or.research.hokudai.ac.jp/next/resercher/akita/</p>
<p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p>	<p>・第61回サイエンスカフェ・札幌「くすりよ届け。～ナノサイズ船細胞の宇宙に行く～」2012年1月21日、紀伊國屋書店(札幌)、一般市民対象、100名～120名 北海道大学高等教育推進機構科学技術コミュニケーション教育研究部門(CoSTEP)主催にて、研究並びに薬学全般の紹介 http://costep.huucc.hokudai.ac.jp/costep/report/article/466/</p> <p>・国民の皆様から寄せられた質問に対して Web 上で回答 http://costep.huucc.hokudai.ac.jp/costep/report/article/468/</p> <p>・北海道大学高等教育推進機構科学技術コミュニケーション教育研究部門(CoSTEP)と共同で、研究の紹介映像「くすりよ届け～ナノサイズ船 細胞の宇宙に行く」を作成し、HP 上で掲載 http://costep.huucc.hokudai.ac.jp/costep/report/article/477/</p>
<p>新聞・一般雑 誌等掲載 計0件</p>	
<p>その他</p>	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

	①交付決定額	②既受領額 (前年度迄の 累計)	③当該年度受 領額	④(=①-②- ③)未受領額	既返還額(前 年度迄の累 計)
直接経費	117,000,000	53,770,000	0	63,230,000	0
間接経費	35,100,000	16,131,000	0	18,969,000	0
合計	152,100,000	69,901,000	0	82,199,000	0

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

	①前年度未執 行額	②当該年度受 領額	③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く)	④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入	⑤当該年度執 行額	⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額	当該年度返還 額
直接経費	53,460,000	0	0	53,460,000	53,460,000	0	0
間接経費	16,038,000	0	0	16,038,000	16,038,000	0	0
合計	69,498,000	0	0	69,498,000	69,498,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	48,176,663	in vivoイメージング解析装置、顕微鏡、実験試薬
旅費	1,108,442	研究成果発表旅費(国内学会8回、国際学会1回)
謝金・人件費等	3,223,552	研究補助員人件費
その他	951,343	電子顕微鏡解析受託、受託化合物合成等
直接経費計	53,460,000	
間接経費計	16,038,000	
合計	69,498,000	

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能 等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関 名
ゲル解析システム	BioRad製 Gel Doc EZ用PCシステム	1	997,500	997,500	2011/4/21	北海道大学
純水精製装置一式	ミリボア製 Milli-Q Integral 10	1	2,218,335	2,218,335	2011/6/24	北海道大学
ルミノメーター	Atto製 クロノディオ	1	2,814,000	2,814,000	2011/7/20	北海道大学
微量高速冷却遠心機	TOMY製 MX-305	2	586,950	1,173,900	2011/6/29 2011/7/15	北海道大学
ユニバーサル冷却遠心機	KUBOTA製 5922	1	766,500	766,500	2011/8/22	北海道大学
低温シェイクシステム	EYELA製 LTI-700 およびシェーカー	1	546,000	546,000	2011/8/23	北海道大学
in vivo可視化装置一式	米国Caliper社製 IVIS Lumina II Imaging System	1	14,910,000	14,910,000	2011/9/5	北海道大学
ビーズ式細胞破碎装置	Tomy製 MS-100R	1	997,500	997,500	2011/9/8	北海道大学
レーザー発生装置一式	ニコン 倒立顕微鏡Ti 用 レーザーシステム	1	4,851,630	4,851,630	2012/3/29	北海道大学