

課題番号	LR001
------	-------

**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 24 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

これまでに体内動態・細胞内動態を制御するための素子を探索した結果、①ex vivo において樹状細胞に対して効率的に遺伝子導入と免疫活性増強を可能とするペプチド性素子の同定や、②遺伝子・核酸を封入するための膜構成成分としての脂質様材料(ssPalm)の開発をおこなってきた。

H24 年度は、上記①で挙げた樹状細胞の活性化効果(アジュバント効果)に対して、そのメカニズムの解明をおこなう。また、本アジュバントとしての性質をタンパクワクチンへ応用するために、in vivo 効果(抗腫瘍ワクチン効果)を検証する。②に関しては、本脂質様材料を用いた粒子が生理的条件下で中性であるという特徴を生かし、肝臓への遺伝子・核酸導入システムとしての有用性を評価する。一方で、細胞内動態の観点から、血管内皮細胞の透過を促進するためのトランスサイトーシス標的化ペプチドの最小ユニットの探索を継続して行うと共に、その細胞内動態(細胞内取り込み経路)の同定を行う。また、製剤化および肝臓・癌などへの送達効率促進の観点から、粒子サイズの微小化を目指した研究を開始する。

2. 研究の実施状況

①に関して、自然免疫に関わる細胞膜上受容体(Toll 様受容体)を欠損したマウスから単離した樹状細胞を用いても野生型と同等な免疫活性化効果が得られることや、本機構には内封遺伝子の細胞質輸送が鍵を握ることを明らかとした。また、各種の阻害剤を用いた検討により、長鎖 DNA を認識する細胞質センサーが樹状細胞の活性化に関わることを見出した。さらに、本素子を修飾したリポソームに対して抗原を封入することによりアジュバント機能が認められ、タンパクワクチンとしての抗腫瘍効果が増強することが明らかとなった。

②に関して、ssPalm を含む脂質膜を in vivo 用に最適化した結果、血中投与によって肝臓特異的、かつ長期遺伝子の発現を実現することにも成功している。また、生きた肝臓組織内における粒子の挙動を解析した結果、凝集せずに血液中を流れ、速やかに肝臓に集積することを明らかとした。さらに、ssPalm からなる粒子に siRNA を封入することによって、内因性遺伝子のノックダウン効果を得ることに成功し、現在、より低い投与量で効果を得るための改良を進めている。一方、細胞内動態の観点から遺伝子の核輸送を送達するための材料として、脂質様物質の足場を改変した第二世代型 ssPalm を設計した結果、核周辺への高い集積性、さらには高い遺伝子発現活性を発揮できることを見出した。

トランスサイトーシス標的化ペプチドに関しては、アミノ酸配列を系統的に改変し、その細胞透過活性を比較することで、本経路標的化のための最小単位を同定した。本リポソームは血管内皮細胞内に、従来のクラスリン介在性経路とは異なる経路により取り込まれ、本経路がリソソーム分解経路から回避可能であることを見出した。

また、製剤的観点から、制限酵素処理により直線型された DNA を用いることで、従来の環状 DNA よりも小さな粒子ができる条件を見出すことに成功している。本技術は製剤学的観点からの改良にも有用であると考えている。

様式19 別紙1

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 7 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Akita H, Enoto K, Tanaka H, Harashima H. Particle tracking analysis for the intracellular trafficking of nanoparticles modified with African swine fever virus protein p54-derived peptide. <i>Mol Ther.</i> 21(2):309-17. (2013) doi: 10.1038/mt.2012.235. (Cover Art として掲載) 2. Yamada Y, Akita H, Harashima H. Multifunctional envelope-type nano device (MEND) for organelle targeting via a stepwise membrane fusion process. <i>Methods Enzymol.</i> 509: 301-26 (2012) doi: 10.1016/B978-0-12-391858-1.00015-0. 3. Kusumoto K, Akita H, El-Sayed A, Harashima H. Effect of the anchor in polyethylene glycol-lipids on the transfection activity of PEGylated cationic liposomes encapsulating DNA. <i>Biol Pharm Bull.</i> 35(4):445-8. (2012) doi: http://dx.doi.org/10.1248/bpb.35.445 4. Nakamura T, Akita H, Yamada Y, Hatakeyama H, Harashima H. A multifunctional envelope-type nanodevice for use in nanomedicine: concept and applications. <i>Acc Chem Res.</i> 45(7):1113-21. (2012) doi: 10.1021/ar200254s. 5. 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. <i>Acc Chem Res.</i> 45(7):1132-9. (2012) doi: 10.1021/ar200256e. <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. Togashi R, Akita H, Harashima H. Production of small nano-sized particles by complex formation between polycations and linearized plasmid DNA at a low pH. <i>J Biosci Bioeng.</i> <i>in press.</i> 2. Akita H, Ishiba R, Hatakeyama H, Tanaka H, Sato Y, Tange K, Arai M, Kubo K, Harashima H. A Neutral Envelope-Type Nanoparticle Containing pH-Responsive and SS-Cleavable Lipid-Like Material as a Carrier for Plasmid DNA. <i>Adv Healthc Mater.</i> <i>in press.</i> doi: 10.1002/adhm.201200431.
<p>会議発表 計 8 件</p>	<p>専門家向け 計 8 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 秋田英万、藤原孝博、田畑泰彦、梶本和昭、原島秀吉 リポソームのトランスサイトーシス評価系並びに血管内皮透過促進用素子の開発 日本薬剤学会 第 27 年会 2012 年 5 月 25 日 (神戸) 2. 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 日本薬剤学会 第 27 年会 2012 年 5 月 25 日 (神戸) 3. 秋田英万 細胞内動態・シグナルの制御を可能とする DNA ワクチン用遺伝子封入ナノ粒子の開発 第 28 回日本 DDS 学会 2012 年 7 月 4 日 (札幌) 4. 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 応答性脂質様物質から形成される遺伝子封入中性ナノ粒子の機能および細胞内動態解析 第 28 回日本 DDS 学会 2012 年 7 月 5 日 (札幌) 5. Akita H. Development of the nanoparticle for DNA vaccine based on the control of intracellular trafficking and signaling. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 20 日 (札幌) 6. Akita H. Design of the pDNA/siRNA-encapsulating lipid nanoparticle for control of the intracellular trafficking, unpacking and bio-interaction. Liposome Research Day 2012, 2012 年 10 月 11 日 Westlake Musium, Hanzou (China) 7. 田中浩貴, 秋田英万, 丹下耕太, 丹下耕太、新井将也、久保和弘、原島秀吉 Gene delivery using lipid-like material consisting of fat-soluble vitamin. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2012 年 11 月 23 日 (京都) 8. 秋田英万, Shaheen SM., 石井聡一郎, 三浦尚哉, 原島秀吉. Development of the KALA-modified DNA nanoparticle for the control of intracellular trafficking and signaling in dendritic cells. 第 6 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム 2012 年 11 月 24 日 (京都) <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 0 件</p>	

様式19 別紙1

産業財産権 出願・取得状 況 計0件	(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件
Webページ (URL)	・薬剤分子設計学研究室HP http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html ・HOKUDAI NEXT http://or.research.hokudai.ac.jp/next/resercher/akita/
国民との科 学・技術対話 の実施状況	からだところの発見塾主催サイエンスカフェ開催 “細胞の中を旅する『ナノ宇宙船』でクスリを運ぶ” 参加人数 20名程度に対して研究の紹介 2012年11月12日 http://www.youtube.com/watch?v=ZLXRyQUbapQ&feature=youtu.be サステナビリティ・ウィーク 2012 GiFT2012にて、インターネット講演 “Have Drug, Will Travel” 2012年10月6日 http://www.youtube.com/watch?v=UGaWyAIU7G4&list=PLZPU3P50KtD0sC91_I0THbw7gxJlgAydX&index=2
新聞・一般雑 誌等掲載 計2件	1. 2012年4月9日 北海道新聞(夕刊) 研究内容が掲載された 2. 2012年9月23日 読売新聞(朝刊科学欄) 第71回日本癌学会学術総会における研究発表の内容が掲載された
その他	

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成24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	43,230,000	20,000,000	0
間接経費	35,100,000	16,131,000	12,969,000	6,000,000	0
合計	152,100,000	69,901,000	56,199,000	26,000,000	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	0	43,230,000	0	43,230,000	43,230,000	0	0
間接経費	0	12,969,000	0	12,969,000	12,969,000	0	0
合計	0	56,199,000	0	56,199,000	56,199,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	38,805,884	イメージング解析装置、粒子系測定装置、実験試薬
旅費	869,640	研究成果発表旅費(国内学会9回、国際学会1回)
謝金・人件費等	3,336,018	研究補助員人件費
その他	218,458	学会参加費、電子顕微鏡解析受託
直接経費計	43,230,000	
間接経費計	12,969,000	
合計	56,199,000	

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
EX Filter励起光源 セット	米国Caliper社製 XF0-10	1	2,520,000	2,520,000	2012/5/31	北海道大学
Standard EM Filter	米国Caliper社製 123324	1	840,000	840,000	2012/5/31	北海道大学
PSA酸素濃縮装置 一式	米国Caliper社製 XGI-8	1	840,000	840,000	2012/5/30	北海道大学
ニコン倒立顕微鏡 用共焦点システム 一式	CSU-X1	1	9,814,770	9,814,770	2012/8/28	北海道大学
ダブルシリンジポン プ MODEL一式	HARVARD社 55-3333	1	687,225	687,225	2012/10/5	北海道大学
ゼータ電位・粒子 径・分子量測定装 置一式	ゼータサイザー ナノ ZS	1	6,499,500	6,499,500	2013/2/14	北海道大学