

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) 実績報告書

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. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	117,000,000	117,000,000	0	117,000,000	117,000,000	0	0
間接経費	35,100,000	35,100,000	0	35,100,000	35,100,000	0	0
合計	152,100,000	152,100,000	0	152,100,000	152,100,000	0	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	310,000	48,176,663	38,805,884	15,015,143	102,307,690
旅費	0	1,108,442	869,640	1,130,428	3,108,510
謝金・人件費等	0	3,223,552	3,336,018	2,530,311	9,089,881
その他	0	951,343	218,458	1,324,118	2,493,919
直接経費計	310,000	53,460,000	43,230,000	20,000,000	117,000,000
間接経費計	93,000	16,038,000	12,969,000	6,000,000	35,100,000
合計	403,000	69,498,000	56,199,000	26,000,000	152,100,000

4. 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	ミリポア製 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 クロスDio	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
低温シェイカーシステム	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
ピース式細胞破碎装置	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
EX Filter励起光源セット	米国Caliper社製 XFO-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

5. 研究成果の概要

細胞内の微小環境に応答して性質を変化させる仕組みを搭載した脂質様材料を開発した。本材料から形成されるナノカプセルに遺伝子を導入することにより、血中投与により肝臓、癌などに外来遺伝子を送達させ、癌を治療できる技術確立した。一方、本研究では、体内や細胞の中においてナノ粒子の動きを制御するための様々な素子を開発した。一例として、従来発現が困難であった免疫担当細胞等に対して高効率に遺伝子を導入し、同時に活性化もすることができる遺伝子封入ナノ粒子の開発に成功している。この技術を用いれば、次世代のワクチン(DNAワクチン)が開発できると考えられる。

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) 研究成果報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	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
	Development of multi-layered nanoparticle for a step-wise control of intracellular trafficking and intra-nuclear disposition
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	北海道大学 ・ 大学院薬学研究院 ・ 准教授
	Associated Professor ・ Faculty of Pharmaceutical Sciences ・ Hokkaido University
氏名 (下段英語表記)	秋田 英万
	Hidetaka Akita

研究成果の概要

(和文): 遺伝子がナノサイズのカプセル内に封入された粒子を基盤とし、①目的や必要に応じて膜を高次化する方法や、②その膜を形成する細胞内環境応答性材料、さらには③表面に修飾する機能性素子を新たに開拓しながら、血液を介して遺伝子を特定の臓器に届ける技術や、さらに細胞の中における粒子の動きを操る技術を開発した。その結果、次世代の医療技術へ繋がるDNA ワクチンや、肝臓やがんを標的とした遺伝子送達システムを創成することに成功した。一部の材料は『国産の製剤材料』として脂質メーカーより供給する予定であり、幅広い用途で有用性が評価・開拓されることで、国内医薬品産業の活性化などの様々な波及効果が生まれると期待できる。

(英文): We developed a technology for delivering gene-encapsulating nano-sized capsules to specific organs via intravenous administration, and subsequently to control intracellular trafficking via the use of 3 types of innovations: 1. A novel method for preparing highly-ordered capsule structures, 2. Intracellular environment-responsive materials for preparing capsule structures, and 3. A functional device modified on the capsule structure. As a result, a nano particle for use as a DNA vaccine and gene delivery system targeting the liver or tumors was prepared, which can be applicable for new-generation medical technologies. Some of the materials developed in this project will soon be supplied to the lipid manufacturer as “domestically-produced materials for drug delivery platforms”. If novel applications of these materials are discovered by researchers in other research fields, as well as in the area of drug discovery, it will have spillover effects, including an acceleration in the development of new drugs.

1. 執行金額 152,100,000 円
(うち、直接経費 117,000,000 円、間接経費 35,100,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年 3月31日

3. 研究目的

遺伝子デリバリーの有用性は、先天的遺伝性疾患に対する遺伝子補足療法から、成長因子等の遺伝子発現による後天的な末梢疾患治療、さらにはDNAワクチンとしての免疫療法へと広がりを見せている。本研究では、遺伝子とポリカチオンから形成されるコア粒子(静電的複合体)が脂質膜によりコーティングされた脂質エンベロープ型ナノ粒子を基盤技術とし、その脂質膜構造を高次化することや、新たに開発される機能性素子を表面に搭載することにより高度に機能化することで、血液投与後における体内動態や、細胞内における動態を制御するための技術を開発することを目的としている。

一方、非ウイルスベクターとしてはこれまで、カチオン性材料(リボソームやポリマー)が広く用いられてきたが、永年にわたる研究にもかかわらず、未だに実用化には至っていない。この背景には、遺伝子発現効率が不十分であることや、血中投与後の高い凝集性あるいは細胞毒性などの問題点が挙げられる。また、研究代表者自身の長年に渡る研究により、カチオン性成分が細胞内に導入されると、送達遺伝子や mRNA との静電的相互作用を介して転写・翻訳過程を阻害する要因となることも明らかとしている。本研究では、上記の遺伝子封入ナノ粒子の脂質膜構成材料を根本的に見直し、カチオン性成分を極力含まないナノ粒子へと設計の転換を図る。

本研究の具体的なアウトプットとして、(1)DNA ワクチン技術の創出に向けた樹状細胞への *ex vivo* 遺伝子導入技術、および(2) *in vivo* 血中投与を可能とする癌・肝臓標的型遺伝子デリバリーシステムについて開発を進めた。また、(3)正常臓器の血管内皮細胞標的化や本血管を超えて組織実質まで輸送するためのナノ粒子の開発を進めた。

4. 研究計画・方法

(1)DNA ワクチン技術の創出に向けた樹状細胞への *ex vivo* 遺伝子導入技術

樹状細胞は免疫応答の開始、制御を司る上で中心的な役割を果たす細胞であり、DNA ワクチンの開発には本細胞への効率的な遺伝子導入技術の開発が重要である。エンドソーム膜や核膜を膜融合によって段階的に突破して、遺伝子を核まで輸送するというコンセプトの基、各々の生体膜と高い融合性を有する脂質膜を用いて遺伝子を多重にコーティングした階層型ナノ粒子を基盤としたベクターを進めた。各々の膜と生体膜の融合性を高める為に、生理的環境(pH7.4)で融合性を有するペプチド(KALA)を搭載すると共に、遺伝子の核内転写を効率化するための工夫として、遺伝子をコンパクションするポリカチオンを極力減らしたナノ粒子調製を試みた。

一方、研究が進むにつれ、本 KALA 修飾による劇的な遺伝子導入効率の向上には、当初目的とした細胞内動態の改善とは別のメカニズムが関与することが示唆された。そこでマイクロアレイ

を用いて本粒子に対する樹状細胞側の応答性を解析した。

(2) *in vivo* 血中投与を可能とする癌・肝臓標的型遺伝子デリバリーシステム

カチオン性材料の利用を前提とした従来の遺伝子ベクターとは対を成す発想として、カチオン性成分を極力排除した『電荷的に中性』な粒子の設計を目指した。本設計を可能とする膜構成材料として、エンドソーム内の酸性環境や細胞質の還元環境下で特異的に正に帯電し、さらに分解をうける脂質様分子の開発を進めた。本分子から形成される粒子のエンドソーム脱出や細胞内崩壊性をイメージングにより実証すると共に、遺伝子導入効率や細胞毒性などの評価も進めた。また、第2世代分子として脂溶性ビタミンを足場とする分子を開発し、各々のビタミンが特有に有する輸送特性や生理学的機能を搭載した遺伝子封入ナノ粒子の開発も進めた。

一方、本粒子を *in vivo* における肝臓・がんへの遺伝子導入技術へと発展させるべく、血液中における安定性や滞留性を考慮した粒子の設計を進めた。*in vivo* 血流中におけるナノ粒子の動的挙動をリアルタイム共焦点レーザー顕微鏡によって明らかとしながら、遺伝子導入効率や免疫応答性などを評価し、従来から利用されてきたカチオン性材料との機能的な差別化を図った。また、癌においては、血管新生阻害蛋白の導入による抗腫瘍効果についても評価した。

(3) 正常臓器の血管内皮細胞標的化や本血管を超えて組織実質まで輸送するためのナノ粒子

肝臓やがんは、その血管に存在する小孔、あるいは粗い血管構造に起因する細胞間隙を介して比較的ナノ粒子が蓄積しやすい臓器である。一方、その他の正常組織における血管内皮は、互いに隣接する細胞間で密な結合を有しており、ナノ粒子の透過は著しく制限される。血液中から血管内皮を超え、さらに組織実質まで物質を届ける技術は、薬物送達研究の究極的な目標と言えよう。本目標の実現に向けて、血管内皮細胞を標的化する新規リガンドと、さらにその血管内皮内の細胞内動態を制御してナノ粒子を透過させる新たなペプチドの同定を試みた。ナノ粒子の浸透性に優れた新材料からなるトランスウェル上に脳毛細血管内皮由来細胞を単層培養し、系統的に改変したペプチド搭載リポソームの細胞透過性を指標として目的のペプチドを同定した。

一方、研究の中で、これまでエンドソーム脱出促進因子用として用いてきたペプチドが肺血管内皮細胞の標的化リガンドとして機能する事を見出した。そこで、本ペプチドの標的分子を同定すると共に、本ペプチド修飾粒子へ siRNA を搭載した際の肺血管内皮における遺伝子ノックダウン効果についても検証した。

5. 研究成果・波及効果

(1) DNA ワクチン技術の創出に向けた樹状細胞への *ex vivo* 遺伝子導入技術

中性 pH(7.4)において α ヘリックス構造を有し、膜融合性を促進する KALA ペプチドの脂質誘導体を合成し、脂質膜に提示した。さらに、核内に導入された後の脱凝縮過程、さらには転写効率を促進する目的で、遺伝子をコンパクションするためのポリカチオンを極力少なくした粒子を調製した。その結果、これらの工夫により樹状細胞由来細胞株における遺伝子発現活性は相乗的に亢進した。本発現レベルは、抗原提示を示す上で十分であることも確認している。さらに、マウス骨髄由来細胞に対して、本細胞用に最適化した KALA 修飾粒子を用いて抗原遺伝子を導入し、さら

にマウスに免疫することにより、極めて効率的な抗腫瘍効果が得られた。

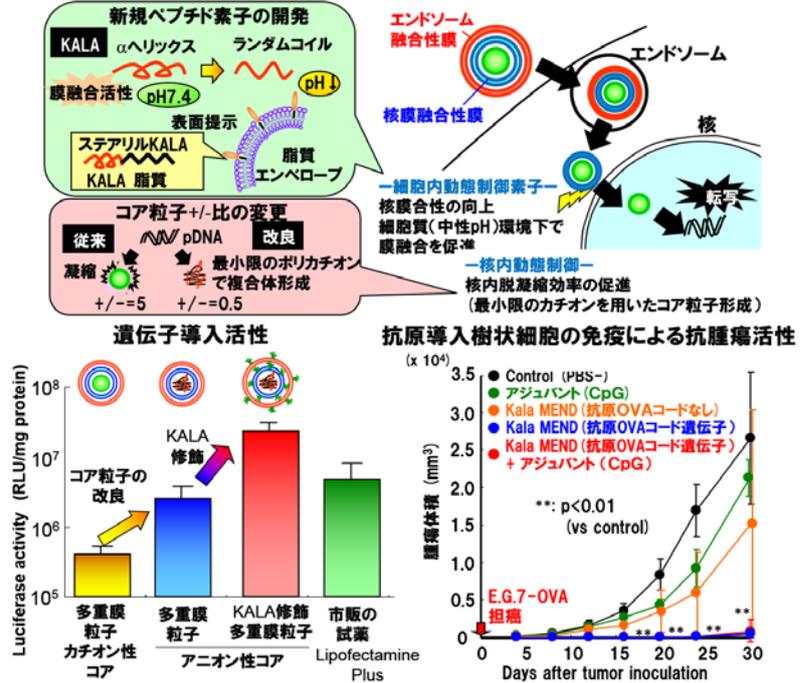
一方、マイクロアレイ解析を用いて、遺伝子導入時における樹状細胞内の遺伝子発現変動を解析した結果、KALA 未修飾の場合と比較して、KALA 修飾粒子を作用した場合において、劇的に遺伝子発現が変動し、さらに、KALA 修飾ナノ粒子は樹状細胞内の『スイッチ』分子に作用してシグナル伝達経路を活性化することで、樹状細胞を刺激し（アジュバント効果）、さらにその結果として外来遺伝子の核内

転写が促進する機能を有することが示唆された。言い換えると、KALA 修飾粒子は、DNA ワクチン効果に必須な免疫誘導能と遺伝子導入能を兼ね備えていることを意味する。DNA ワクチンとしての実用化に向けてヒト樹状細胞を用いた評価についても開始予定である。

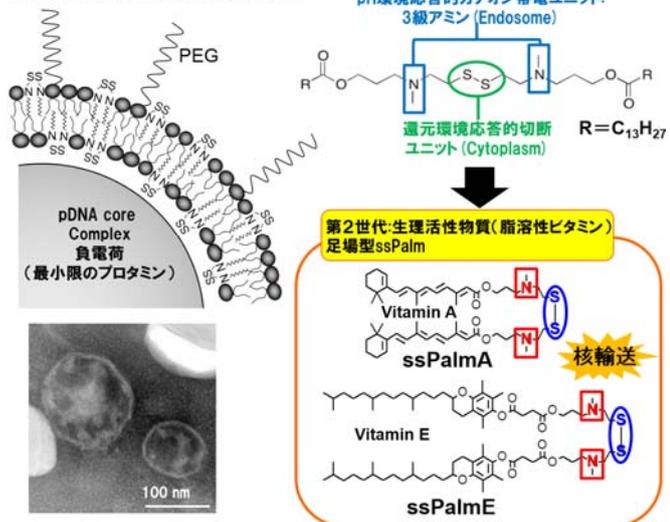
(2) in vivo 血中投与を可能とする癌・肝臓標的型遺伝子デリバリーシステム

血液中の生理的pH環境では電荷的に中性であり、一方で細胞内に取り込まれると、エンドソーム内の酸性環境化に応じて正帯電し、さらに細胞質中の還元環境下で自ら崩壊性を示すナノ粒子を設計した。本コンセプトを実現するための脂質構成材料として脂質様サーファクタント（SS-cleavable and pH-activated lipid-like material: ssPalm）を開発した（国内および国際特許出願済み^{注1)}）。本分子は、膜を形成するための脂溶性基（ミリスチン酸）と、pH依存的にプロトン化を受ける第三級アミンがジスルフィド結合で連結された構造を有する(ssPalmM)。本粒子は、従来型から使用されてきたカチオン性リポソームと比較して、取り込み効率は低いものの同程度の遺伝子発現を示すことを明らかとした。また、細胞毒性が極めて低いことや、90%マウス血清中においても24時間以上安定に遺伝子を保持できることを見出した。

細胞内動態制御素子(KALA)と核内動態制御(コア粒子のカチオン成分最少化)による樹状細胞標的型の遺伝子導入技術の開発

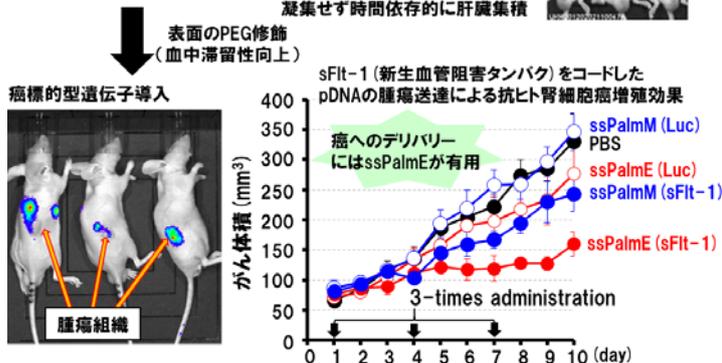
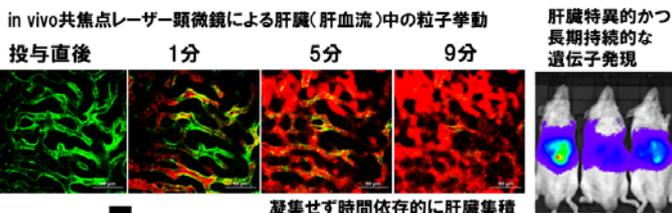


エンドソーム環境と細胞質環境にตอบสนองする脂質用物質の設計



蛍光ラベル化された ssPalmM 粒子を血中に投与し、*in vivo*リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡により肝臓中における動的挙動を解析した結果、本粒子は凝集することなく極めて分散した形で肝血液中を流れ、さらに肝細胞中に速やかに蓄積することを明らかとした。また、本粒子は、肝臓特異的な遺伝子導入が可能であり、さらにその発現は 2 週間持続すること発見している。また、この際、サイトカイン産生レベルも極めて低いことから、安全

ssPalm粒子を用いた*in vivo*血管投与型遺伝子製剤としての機能



性も優れると考えられる。さらに、粒子表面の水溶性ポリマー修飾により、血中投与後の滞留性が向上し、腎細胞癌モデルマウスにおいて癌特異的な遺伝子導入が達成された。

一方、第二世代の分子として、脂溶性ビタミン(vitamin A、E)を足場として有する ssPalm (ssPalmA、ssPalmE)を開発している。ssPalmAを用いて調製した粒子は、細胞内のビタミンA輸送系により効率的に核周辺に集積し、高い遺伝子導入効果を発揮することを見出した。また、上記の癌を標的とした遺伝子導入においては、ssPalmEを用いる事によりさらに遺伝子導入効率が高まり、腫瘍新生血管阻害蛋白を発現することにより抗腫瘍効果も得られることを実証した。本粒子に対して様々なリガンドを搭載することによって、その他の臓器の標的化も可能となると期待されることから、ssPalm 粒子は、血中投与型遺伝子導入システムの新たなプラットフォームとなると期待している。

(3) 正常臓器の血管内皮細胞標的化や本血管を超えて組織実質まで輸送するためのナノ粒子

これまでエンドソーム脱出素子として用いてきたペプチドが、肺血管内皮細胞上のシアル酸末端糖鎖を認識して肺血管内皮細胞を標的可能であることを見出した。本リガンド修飾粒子に siRNA を封入することにより、肺血管内皮における遺伝子(CD31)のノックダウンが可能となった。さらに、本遺伝子のノックダウンにより、癌の肺転移が抑制できることも見出した。

一方、系統的に配列の挿入、欠損、置換を施したペプチドを合成し、各種ペプチドを修飾したりリポソームを調製した。これらリポソームの脳毛細血管内皮細胞における透過性を評価することで、血管透過能を発揮する最小単位を同定した。また、カチオン性粒子は、血管内皮細胞内に取り込まれた後に速やかに分解経路に輸送されるのに対し、本ペプチド修飾リポソームは、脂質ラフト介在性エンドサイトーシスによって取り込まれ、リソソーム経路を回避できることを明らかとした。

注1) 本研究で得られた材料は脂質メーカーを介して供給を開始する。分野を超えて有用性が評価・開拓されることで、国内医薬品産業の活性化などの様々な波及効果が生まれると期待できる。

6. 研究発表等

雑誌論文 計24件	<p>(掲載済み一査読有り) 計 20 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. KALA-modified multi-layered nanoparticles as gene carriers for MHC class-I mediated antigen presentation for a DNA vaccine. <i>Biomaterials</i> 32(26):6342-50 (2011) doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.014. 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. <i>Int J Pharm.</i> 415(1-2):218-20 (2011) doi: 10.1016/j.ijpharm.2011.05.051. 3. Ishitsuka T, Akita H*, Harashima H. Functional improvement of an IRQ-PEG-MEND for delivering genes to the lung. <i>J Control Release.</i> 154(1):77-83 (2011) doi: 10.1016/j.jconrel.2011.05.012. 4. Akita H*, Masuda T, Nishio T, Niikura K, Ijiro K, Harashima H. Improving in vivo hepatic transfection activity by controlling intracellular trafficking: the function of GALA and maltotriose. <i>Mol Pharm.</i> 8(4):1436-42 (2011). doi: 10.1021/mp200189s. 5. 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. 6. 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. 7. 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) 8. Yamada Y, Akita H (Equal contribution to 1st author), 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. 9. 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 10. Togashi R., Akita H* (Equal contribution to 1st author), 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> 116(4):528-31. (2013) doi: 10.1016/j.jbiosc.2013.04.009. 11. Hossen MN, Kajimoto K, Akita H, Hyodo M, Harashima H. A comparative study between nanoparticle-targeted therapeutics and bioconjugates as obesity medication. <i>J Control Release.</i> 171(2):104-112. (2013) doi: 10.1016/j.jconrel.2013.07.013 12. Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Harashima H. Gene silencing via RNAi and siRNA quantification in tumor tissue using MEND, a liposomal siRNA delivery system. <i>Mol Ther.</i> 21(6):1195-203 (2013) doi: 10.1038/mt.2013.57. 13. Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. <i>Biol Pharm Bull.</i>;36(6):892-9 (2013) 14. Hossen N, Kajimoto K, Akita H, Hyodo M, Ishitsuka T, Harashima H. Therapeutic assessment of cytochrome C for the prevention of obesity through endothelial cell-targeted nanoparticulate system. <i>Mol Ther.</i> 21(3):533-41 (2013) doi: 10.1038/mt.2012.256. 15. Kusumoto K, Akita H (Equal contribution to 1st author), Ishitsuka T, Matsumoto Y, Nomoto T, Furukawa R, El-Sayed A, Hatakeyama H, Kajimoto K, Yamada Y, Kataoka K, Harashima H. Lipid Envelope-Type Nanoparticle Incorporating a Multifunctional Peptide for Systemic siRNA Delivery to the Pulmonary Endothelium. <i>ACS Nano.</i> 24;7(9):7534-41. (2013) doi: 10.1021/nn401317t. 16. Akita H*, Ishiba., Hatakeyama H., Tanaka H., Sato Y., Tange K., Arai M., Kubo K. Harashima H. A
--------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like materials as a carrier for plasmid DNA. <i>Adv Healthc Mater.</i> 2: 1120-25 (2013) doi: 10.1002/adhm.201200431.</p> <p>17. Akita H*, Ishii S, Miura N, Shaheen SM, Hayashi Y, Nakamura T, Kaji N, Baba Y, Harashima H. A DNA microarray-based analysis of immune-stimulatory and transcriptional responses of dendritic cells to KALA-modified nanoparticles. <i>Biomaterials.</i> 34(35): 8979-90 (2013) doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.003.</p> <p>18. Tanaka H, Akita H* (Equal contribution to 1st author), Ishiba R, Tange K, Arai M, Kubo K, Harashima H. Neutral biodegradable lipid-envelope-type nanoparticle using vitamin A-Scaffold for nuclear targeting of plasmid DNA. <i>Biomaterials.</i> 35(5):1755-61. (2014) doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.016.</p> <p>19. Sakurai Y, Hatakeyama H, Sato Y, Hyodo M, Akita H, Ohga N, Hida K, Harashima H. RNAi-mediated gene knockdown and anti-angiogenic therapy of RCCs using a cyclic RGD-modified liposomal-siRNA system. <i>J Control Release.</i> 173:110-8 (2014) doi: 10.1016/j.jconrel.2013.10.003.</p> <p>20. Tamaru M, Akita H* (Equal contribution to 1st author), Kajimoto K, Sato Y, Hatakeyama H, Harashima H. An apolipoprotein E modified liposomal nanoparticle: Ligand dependent efficiency as a siRNA delivery carrier for mouse-derived brain endothelial cells. <i>Int J Pharm.</i> 465:77-82 (2014) doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.02.016.</p> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <p>1. 秋田英万 「細胞内イメージングを駆使したナノ粒子動態解析情報に基づく遺伝子送達用ベクターの創出 第5回日本DDS学会奨励賞によせて」 <i>Drug Delivery System.</i> Vol 28(4) 355-362 (2013)</p> <p>(未掲載) 計 3 件</p> <p>1. Ukawa M, Akita H*(Equal contribution to 1st author) Hayashi Y, Ishiba R, Tange K, Arai M, Kubo K, Higuchi Y, Shimizu K, Konishi S, Hashida M, Harashima H. Neutralized Nanoparticle Composed of SS-Cleavable and pH-Activated Lipid-Like Material as a Long-Lasting and Liver-Specific Gene Delivery System. <i>Adv Healthc Mater. in press.</i> doi: 10.1002/adhm.201300629.</p> <p>2. Hyodo M, Sakurai Y, Akita H and Harashima H. "Programmed packaging" for gene delivery. <i>J Control Release. in press.</i> doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.023.</p> <p>3. Sakurai Y, Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. Improvement of Doxorubicin Efficacy Using Liposomal Anti-Polo-like Kinase 1 siRNA in Human Renal Cell Carcinomas. <i>Mol Pharm. in press</i></p>
<p>会議発表 計 38 件</p>	<p>専門家向け 計 38 件</p> <p>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)</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>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</p> <p>5. Akita H Control of intracellular trafficking and intra-nuclear disposition of pDNA for DNA vaccine. SNU-HU Joint Symposium, Nov. 19, Korea, Hokkaido Univ & Seoul Univ.</p> <p>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</p> <p>7. 鶴川 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</p> <p>8. 石破諒平、秋田英万、島山浩人、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</p> <p>9. 石破諒平、秋田英万、島山浩人、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</p>

	<p>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</p> <ol style="list-style-type: none"> 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、セルプロセッシング計測評価研究部会主催 11. 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) 12. 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) 13. 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) 14. 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) 15. 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) 16. 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) 17. 田中浩貴、秋田英万、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) 18. 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) 19. 秋田英万、鶴川真実、林泰弘、石破諒平、丹下耕太 2、新井将也、久保和弘、樋口ゆり子、清水一憲、小西聡、橋田充、原島秀吉 細胞内崩壊性を有する中性ナノ粒子を用いた肝臓への長期発現型遺伝子デリバリー 日本薬剤学会第28年会 2013年5月23日-25日、ウイック愛知 20. 富樫亮平、秋田英万、原島秀吉. プラスミド DNA 形状の違いがDNA/ポリカチオン複合体形成に及ぼす影響. 第29回日本 DDS 学会学術集会. 2013年7月5日、京都 21. 三浦尚也、秋田英万、石井聡一郎、シャリフシャヒー、中村孝司、原島秀吉. 樹状細胞に対する KALA 修飾 MEND の免疫活性化能評価. 第29回日本 DDS 学会学術集会. 2013年7月5日 京都 22. 田中浩揮、秋田英万、石破諒平、丹下耕太、新井将也、久保和弘、原島秀吉. 脂溶性ビタミンを構造内を含む脂質様物質を用いた遺伝子送達. 第29回日本 DDS 学会学術集会. 2013年7月4-5日 京都 23. 鶴川 真実、秋田英万、林 泰弘、石破 諒平、丹下 耕太、新井 将也、久保 和弘、樋口 ゆり子、清水 一憲、小西 聡、橋田 充、原島 秀吉. 細胞内環境応答性を有する脂質様物質を用いた肝臓標的型遺伝子デリバリーシステムの開発. 第29回日本 DDS 学会学術集会. 2013年7月4-5日 京都 24. 田丸みな、秋田英万、梶本和昭、佐藤悠介、畠山浩人、原島秀吉 ApoE を用いた siRNA キャリアの脳毛細血管内皮細胞における有用性評価 第29回日本 DDS 学会学術集会. 2013年7月4-5日 京都 25. 秋田英万、原島秀吉、人工遺伝子デリバリーシステムの体内動態・細胞内動態の可視化と最適化、第29回日本 DDS 学会(ワークショップ)、2013年7月5日 26. 秋田英万 細胞内イメージングを駆使したナノ粒子動態解析情報に基づく遺伝子送達ナノ粒子の創出 第5回日本 DDS 学会奨励賞(基礎)受賞講演 第29回日本 DDS 学会学術集会. 2013年7月5日 京都 27. 三浦尚也、秋田英万、石井聡一郎、シャリフシャヒー、中村孝司、原島秀吉. 樹状細胞に対する KALA 修飾 MEND の免疫活性化能評価. 医療薬学フォーラム 2013 第21回クリニカルファーマシーシンポジウム. 2013年7月20日 金沢 28. 秋田英万 pH 感受性脂質様サーファクタント膜から形成される中性粒子を用いた遺伝子デリバリー遺伝子・デリバリー研究会 第13回夏期セミナー 2013年7月24日 Honolulu, Hawaii, USA 29. 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 materials as a carrier
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>for plasmid DNA 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</p> <p>30. Togashi R, Akita H, Kamiya H, Harashima H The effect of plasmid DNA sequence on gene expression and polycation complex formation 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</p> <p>31. Ukawa M, Akita H, Hayashi Y, Ishiba R, Tange K, Arai M, Kubo K, Higuchi Y, Shimizu K, Konishi S, Hashida M, Harashima H Neutralized lipid envelope-type nanoparticle encapsulating pDNA as a liver-specific and long-lasting gene expression 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</p> <p>32. Tanaka H, Akita H, Ishiba R, Tange K, Masaya Arai, Kazuhiro Kubo and Hideyoshi Harashima. Gene delivery using lipid-like material composed of fat soluble vitamin. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</p> <p>33. Akita H, A neutral envelope-type nanoparticle containing pH-responsive and SS-cleavable lipid-like materials for control of intracellular gene trafficking. 15th Asian Chemical Congress. August 19-23, 2013. Resorts World Sentosa, Singapore</p> <p>34. 三浦 尚也, 秋田英万, 中村孝司, 原島秀吉 樹状細胞に対する pDNA 及び KALA ペプチドの免疫活性可能評価 Evaluation of dendritic cells activation by plasmid DNA and KALA peptide. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜</p> <p>35. 秋田英万, 三浦 尚也, 中村孝司, 原島秀吉 樹状細胞への効率的な抗原提示を可能とする KALA 修飾抗原封入リポソームの創製 Development of KALA-modified liposome as the antigen- delivery system for dendritic cells. 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 3-5 日 横浜</p> <p>36. 秋田英万 細胞内ナノ環境応答性ユニットを搭載した脂質様サーファクタントの開発と DDS 用技術への展開 DDS technology based on the lipid-like surfactant mounting the intracellular nano environment-responsive units. 第 7 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(学際研究イニシアチブセッション) 2013 年 11 月 24 日 仙台</p> <p>37. 秋田英万 ナノ粒子の細胞内動態制御技術;エンベロープ型遺伝子封入ナノ粒子を利用した DNA ワクチンを中心として北海道地域 新技術説明会 2013 年 11 月 29 日 東京</p> <p>38. Akita H. A neutral envelope-type nanoparticle formed with pH-responsive and SS-cleavable lipid-like materials as a novel platform for the gene delivery. 2nd CRED Symposium for Academic Drug Discovery. 2014 年 2 月 24 日. 北海道大学</p> <p>一般向け 計 0 件</p>
<p>図書 計 3 件</p>	<p>1. 秋田英万, 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)</p> <p>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. Hutmacher, D.W. Grainger, C.J. Kirkpatrick (eds.). Comprehensive Biomaterials, vol. 4, pp. 411-444 Elsevier ISBN-978-0-08-055302-3</p> <p>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)</p>
<p>産業 財産 権 出 願 取 得 状 況</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(出願中) 計 4 件</p> <p>1. 核移行性を有する脂質膜構造体 原島秀吉, 秋田英万, シャリフモハメドシャヒーン, 中村孝司, 石井聡一郎, 二木史朗; 北海道大学, PCT/JP2011/059738 (2011 年 4 月 10 日) 外国</p> <p>2. 細胞内動態を改善したカチオン性脂質 秋田英万, 畠山浩人, 石破諒平, 鶴川真美, 丹下耕太, 久保和弘, 横山晶一, 原島秀吉; 北海道大学, 日油株式会社 特願 2011-252309 (2011 年 11 月 8 日) 国内</p> <p>3. 肺送達のためのベクター, 導入剤及び使用 楠本憲司, 原島秀吉, 秋田英万, 畠山浩人, 石塚太一; 大鵬薬品工業, 北海道大学 PCT/JP2012/056406 (2012 年 3 月 13 日) 外国</p> <p>4. 細胞内動態を改善したカチオン性脂質 秋田英万, 畠山浩人, 石破諒平, 鶴川真美, 田中浩揮, 丹下</p>

様式21

計4件	<p>耕太、久保和弘、横山晶一、原島秀吉;北海道大学、日油株式会社 PCT/JP2012/079160 (2012年11月9日) 外国</p>
Webページ (URL)	<p>・薬剤分子設計学研究室HP http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html</p> <p>・HOKUDAI NEXT http://or.research.hokudai.ac.jp/next/researcher/akita/</p>
国民との科学技術対話の実施状況	<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～」2011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.hucc.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.hucc.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.hucc.hokudai.ac.jp/costep/report/article/477/</p> <p>・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</p> <p>・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</p> <p>・北大セミナー in 富山「ナノサイズ船 からだと細胞内の宇宙を旅する」2013年8月21日 高校生対象、100名 薬学全般の紹介と、研究内容に関しての模擬講義をおこなった。</p>
新聞・一般雑誌等掲載計3件	<ol style="list-style-type: none"> 1. 北海道バイオレポート2011 (経済産業省 北海道経済産業局発行) 14ページ目に研究紹介記事の掲載 2. 2012年4月9日 北海道新聞 (夕刊) 研究内容が掲載された 3. 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	<p>第5回日本DDS学会奨励賞 受賞 2013年7月5日 「細胞内イメージングを駆使したナノ粒子動態解析情報に基づく遺伝子送達ナノ粒子の創出」</p>

7. その他特記事項