

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 25 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

<p>①本事業で開発した脂質様サーファクタント分子(ssPalm)から形成される遺伝子封入ナノ粒子の応用性をさらに拡大すべく、腫瘍における遺伝子発現評価と、抗腫瘍効果について検証する。腫瘍における遺伝子発現においては、第二世代のssPalmも含め、腫瘍遺伝子発現に有利な化学構造の同定を行う。</p> <p>②DNAワクチンのプロジェクトに関しては、現在使用しているペプチドをさらに系統的に改変し、遺伝子発現、免疫活性化効果(アジュバント効果)の観点から評価し、これら樹状細胞における有用性を発揮できる最小ユニットの同定をおこなう。</p> <p>③トランスサイトーシスペプチドに関しては、組織標的化リガンドとの併用による血管内皮突破能に関して検討を行う。共焦点レーザー顕微鏡を用いたリポソームの血管透過性を評価する。また、血管を透過した先にある上皮細胞(実質細胞)に特異的に発現する遺伝子に対するsiRNAを封入し、遺伝子ノックダウン効果を検証する。特に申請者は、肺を選択的に標的化可能なりガンドを同定することに成功しており、本アプローチにおいては、肺上皮細胞を標的細胞として検討を行う。</p> <p>④また、肺以外の臓器として脳への標的化を目指し、脂質粒子のApoE修飾をはかる。脳毛細血管内皮細胞への取り込み促進効果を解析し、ApoEの脳標的化リガンドとしての有用性を評価すると共に、血管内皮細胞に対するsiRNA導入効果を検証する。</p> <p>⑤上記の各材料、素子の有用性を広げる研究と並行して、脂質様物質ssPalmを用いた多重化技術について確立を目指す。</p>
--

2. 研究の実施状況

<p>①肝臓において長期に遺伝子発現を示したssPalm粒子に対してポリエチレングリコール鎖修飾を施すことにより、血中滞留性の向上と共に腫瘍選択的な遺伝子導入が可能となった。また、腫瘍血管新生阻害タンパク遺伝子をコードする遺伝子を搭載することにより、薬剤耐性癌であるヒト腎細胞がんにおいて抗腫瘍効果が得られた。また、本抗腫瘍効果においては、ビタミンEを脂溶性足場とする分子においてより高い効果が得られており、脂溶性ビタミン足場型ssPalmの有用性も実証された。</p> <p>②DNAワクチンに関しては、従来のアミノ酸と比較して短くしたペプチドにおいても、高い遺伝子発現と免疫応答が両立可能であることを見出した。</p> <p>③肺や脂肪の血管内皮標的化リガンドとトランスサイトーシス標的化素子を組み合わせたりポソームを投与した結果、一部のリポソームがこれら臓器の血管を超えて実質まで移行する様子が認められた。また、肺においては、上皮細胞に局在する遺伝子に対するsiRNAを投与した結果、有意な遺伝子ノックダウンが認められた。</p> <p>④に関しては、siRNA封入粒子のApoE修飾によって脳毛細血管内皮細胞における取り込み促進や、それに伴う遺伝子ノックダウン効果の促進が認められた。また、脳室内に、ssPalmから形成されるプラスミドDNA封入粒子を投与した結果、脂溶性足場の構造・種類によって全く遺伝子発現効率が異なることが明らかとなった。特に、ビタミンE足場においては脳由来細胞において、ApoE依存的に高い取り込みがみとめられたことから、ApoEの吸着に極めて有用な構造であることが見出された。</p> <p>⑤に関しては、従来の多重化方法とはことなる原理によるパッケージング方を考案し、本戦略の実現に必要な素材の合成と、本戦略による粒子集合が可能となることを見出した。</p>
---

3. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 15 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 11 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 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)</li> <li>2. 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)</li> <li>3. 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)</li> <li>4. 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)</li> <li>5. 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)</li> <li>6. 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)</li> <li>7. Akita H., Ishiba., 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 for plasmid DNA. <i>Adv Healthc Mater.</i> 2: 1120-25 (2013)</li> <li>8. 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)</li> <li>9. 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)</li> <li>10. 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)</li> <li>11. 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)</li> </ol> <p>(掲載済み一査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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)</li> </ol> <p>(未掲載) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>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. <i>Adv Healthc Mater.</i> <i>in press.</i></li> <li>2. Hyodo M, Sakurai Y, Akita H and Harashima H. <i>J Control Release.</i> <i>in press.</i></li> <li>3. Sakurai Y, Hatakeyama H, Akita H, Harashima H. <i>Mol Pharm.</i> <i>in press</i></li> </ol>
<p>会議発表 計 20 件</p>	<p>専門家向け 計 20 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 秋田英万、鶴川真美、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 日本薬学会第 28 年会 2013 年 5 月 23 日-25 日、ウインク愛知</li> <li>2. 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</li> <li>3. 三浦尚也、秋田英万、石井聡一郎、シャリフシャヒーン、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</li> <li>4. 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</li> </ol>

	<p>に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</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. 鵜川 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</li> <li>6. 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</li> <li>7. 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</li> <li>8. 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</li> <li>9. 三浦尚也、秋田英万、石井聡一郎、シャリフシャヒーン、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</li> <li>10. 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</li> <li>11. 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 for plasmid DNA 40th Annual Meeting &amp; Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</li> <li>12. Togashi R, Hidetaka A, Kamiya H, Harashima H The effect of plasmid DNA sequence on gene expression and polycation complex formation 40th Annual Meeting &amp; Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</li> <li>13. 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 &amp; Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</li> <li>14. Hiroki Tanaka, Hidetaka Akita, Ryohei Ishiba, Kota Tange, Masaya Arai, Kazuhiro Kubo and Hideyoshi Harashima. Gene delivery using lipid-like material composed of fat soluble vitamin. 40th Annual Meeting &amp; Exposition of the Controlled Release Society. July 21-24, 2013. Honolulu, Hawaii, USA.</li> <li>15. 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</li> <li>16. 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</li> <li>17. 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</li> <li>18. 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</li> <li>19. 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</li> <li>20. 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 GRED Symposium for Academic Drug Discovery. 2014年2月24日. 北海道大学</li> </ol> <p>一般向け 計0件</p>
<p>図書 計0件</p>	
<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>

様式19 別紙1

Webページ (URL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>・薬剤分子設計学研究室HP</li> <li><a href="http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html">http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakusetu/index.html</a></li> <li>・HOKUDAI NEXT</li> <li><a href="http://or.research.hokudai.ac.jp/next/resercher/akita/">http://or.research.hokudai.ac.jp/next/resercher/akita/</a></li> </ul>
国民との科学・技術対話の実施状況	<ul style="list-style-type: none"> <li>・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</li> <li>高校生対象、100名 薬学全般の紹介と、研究内容に関する模擬講義をおこなった。</li> </ul>
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	<ul style="list-style-type: none"> <li>第5回日本DDS学会奨励賞 受賞 2013年7月5日</li> <li>「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」</li> </ul>

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成25年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されず

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	97,000,000	20,000,000	0	0
間接経費	35,100,000	29,100,000	6,000,000	0	0
合計	152,100,000	126,100,000	26,000,000	0	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	20,000,000	0	20,000,000	20,000,000	0	0
間接経費	0	6,000,000	0	6,000,000	6,000,000	0	0
合計	0	26,000,000	0	26,000,000	26,000,000	0	0

3. 当該年度の執行額内訳 (単位:円)

	金額	備考
物品費	15,015,143	実験試薬,実験動物等
旅費	1,130,428	研究成果発表旅費(国内学会5回、国際学会4回)
謝金・人件費等	2,530,311	研究補助員人件費
その他	1,324,118	学会参加費、論文投稿料、印刷料など
直接経費計	20,000,000	
間接経費計	6,000,000	
合計	26,000,000	

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
				0		
				0		
				0		