

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18109001

研究課題名(和文)ヌクレアーゼ抵抗性修飾核酸を搭載した多機能性ナノ構造体による新規核酸医薬の創製

研究課題名(英文)Development of multifunctional envelope-type nano device encapsulating highly nuclease resistant oligonucleotides

研究代表者

松田 彰(MATSUDA AKIRA)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90157313

研究成果の概要(和文)：(1) MEND に搭載したヌクレアーゼ抵抗性 2'-O-methyl-4'-thioribonucleosides を含む siRNA (標的：ルシフェラーゼ遺伝子, apoB 遺伝子) は *in vitro* で作用の持続が, *in vivo* で血中コレステロール濃度の低下が観察された。この時, 副作用となる自然免疫系を賦活化しなかった。(2) ヌクレアーゼ抵抗性ベクター作製のために PCR により d^sNTPs を取り込ませた。2種類までの dNTPs を d^sNTPs に置換できたが, それ以上の置換では増幅しなかった。そこで, 化学合成した 4'-thioDNA (42mer) を酵素的に組み込んだルシフェラーゼ発現ベクターを構築し, NIH3T3 細胞での発現を調べたところ, 天然型ベクターと比較して 20-40%ではあるが活性発現が見られた。(3) MEND をマトリックスメタロプロテアーゼで切断される PEG 修飾し PPD-MEND を作製した。また, pH 応答性膜融合ペプチド GALA を短鎖化した shGALA-MEND を作製した。これらは, 細胞内取り込みの増加, エンドソーム脱出効率の向上により *in vitro* のみならず *in vivo* での抗腫瘍性を増強した。

研究成果の概要(英文)：(1) Small interfering RNAs (siRNAs) containing 2'-O-methyl-4'-thioribonucleosides, nuclease-resistant nucleosides, encapsulated in MEND (multifunctional envelope-type nano-device) showed a long-term luciferase gene silencing effect in HeLa cells and lowering-effect of cholesterol concentrations in mouse blood. This modification did not act as triggers of the innate immune response. (2) In order to construct a nuclease-resistant vector, enzymatic incorporation using 2'-deoxy-4'-thioribonucleoside 5'-triphosphates (d^sNTPs) by PCR was tried. Although two dNTPs could be substituted by d^sNTPs to produce 4'-thioDNA with 30-80% efficiency of the unmodified dNTPs, further increased substitution gave unfruitful results. Therefore, chemically synthesized 42mer 4'-thioDNAs (2 dNs were substituted by 2d^sNs) were ligated to construct the luciferase vectors by a ligase. When these vectors were transfected into NIH3T3 cells, the modified vectors showed about 20-40% activity of that of the unmodified vector after 24-72 h. (3) siRNAs encapsulated in MENDs which have a shorter length of the pH-sensitive fusogenic peptide (shGALA) or a PEG derivative with a cleavage site of matrix metalloproteinase (PPD) showed improved knockdown ability of the target gene *in vitro* and *in vivo*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	25,200,000	7,560,000	32,760,000
2007年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2008年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2009年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
2010年度	14,500,000	4,350,000	18,850,000
総計	83,200,000	24,960,000	108,160,000

研究分野：医薬化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ヌクレアーゼ抵抗性, 4'-チオ核酸, siRNA, ベクター, 薬物送達システム

1. 研究開始当初の背景

生体高分子である蛋白質が薬として比較的容易に医薬として開発されるのに対して、生体高分子である核酸の開発がなぜ困難なのか。アンチセンス法が発見されて以来、多くの臨床試験が実施されたが、Vitravene が眼内注射薬として 1998 年に米国で認可されたのみである。また、RNA アプタマーが加齢性黄斑変性症治療薬（眼球内注射）として米国で認可されたのは 2004 年であった。これらの現実を考えると、「核酸医薬」を実現するためには、エンドヌクレアーゼ抵抗性核酸の必要性とそれを搭載するキャリア（DDS）開発が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

- (1) エンドヌクレアーゼ抵抗性核酸（修飾 DNA, 修飾 RNA）の創製とそれを含む siRNA の作用持続性
- (2) ヌクレアーゼ抵抗性核酸ベクター創出
- (3) これらの「核酸医薬」を細胞質や核に十分量到達させるためのナノキャリア=薬物送達システム（DDS）の開発

3. 研究の方法

- (1) 各種 4'-チオヌクレオシドの糖部修飾体を合成し、それらを含む DNA や RNA を化学合成し、ヒト血漿中を含むヌクレアーゼ抵抗性を測定する。さらに各種物理化学測定から熱的安定性や全体構造を明らかにする。また、ヌクレアーゼ抵抗性素子を含む siRNA を合成し、*in vitro* および *in vivo* での活性を未修飾の siRNA と比較する。
- (2) 2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド 5'-三リン酸 (d^SNTPs) を化学合成し、DNA ポリメラーゼの基質性を調べる。また、PCR についても検討する。2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドを含むベクターを調製し、細胞内に導入し RNAi 活性を測定する。
- (3) siRNA やプラスミドを搭載した MEND に細胞膜透過性素子、角膜透過性素子、エンドソーム脱出素子を加えそれぞれの機能を最適化し、*in vitro* のみならず *in vivo* 実験に適用する。

4. 研究成果

- (1) エンドヌクレアーゼ抵抗性核酸（修飾 DNA, 修飾 RNA）の創製
 - ① 各種糖部修飾 4'-チオヌクレオシド (^SNs) の合成とそれらを含むオリゴヌクレオチド (ON) のヒト血漿を含むヌクレアーゼ抵抗性：Pummerer 反応を用いてスルホキシド糖誘導体とシリル化核酸塩基を縮合し ^SNs を合成した。得られた ^SNs の 2'-位保護基を除去後、2'-位での化学修飾を検討し、2'-F, 2'-NH₂,

2'-OMe 体を合成した。これらを含む二本鎖 RNA (15mer) を化学合成し、熱的安定性を調べた。天然型 RNA 二本鎖の 50%融解温度 (T_m 値, 0.1 M NaCl, pH7.0) は、66.2°C であり、天然型 2'-OMe-RNA, および、天然型 2'-F-RNA 二本鎖の T_m 値は、それぞれ 70.3°C, 77.4°C と熱的安定性が上昇した。同じ鎖長、配列を持つ 4'-チオ RNA, 4'-チオ-2'-OMe-RNA (以下、^SOMe-RNA とする) 4'-チオ-2'-F-RNA (^SF-RNA とする) 二本鎖の T_m 値は、73.3°C, 73.3°C, 76.1°C を示し天然型とほぼ同等～やや安定であった。次に、これらの ³²P ラベラー一本鎖 RNA を合成し、50% ヒト血漿中での安定性を比較した。その結果、天然型 RNA の半減期が 10 秒以下である時に、4'-チオ RNA は 1.1 時間と 2'-水酸基があるにもかかわらず極めて安定であった。一方、天然型 2'-F-RNA は 0.89 時間、天然型 2'-OMe-RNA は 7.5 時間であった。一方、^SF-RNA は 2.0 時間、^SOMe-RNA は 27.2 時間と極めて安定であった。4'-チオ-2'-NH₂ 基を含む RNA は一残基含むだけで T_m 値を 8.3°C 低下させることが判明したのでこれ以上の検討は中止した。以上の基礎的検討から ^SOMe-RNA は十分な二本鎖熱的安定性とヌクレアーゼ抵抗性を示すことから以下の *in vitro* および *in vivo* の検討に用いることにした。

- ② ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする ^SOMe-siRNA の作用：ルシフェラーゼ遺伝子 (GL3) を標的とする修飾 siRNA を合成し、それらを本研究で作製したリポソーム (MEND) に搭載し GL3 を安定に発現する HeLa 細胞での遺伝子発現抑制効果を調べた。その結果, day 2 では天然型 siRNA (Luc; day 2 での EC₅₀ = 24.7 nM, day 6 での EC₅₀ = 448.4 nM) と同等の活性を示したが, day 6 では天然型よりも 5 倍以上活性が高く, 天然

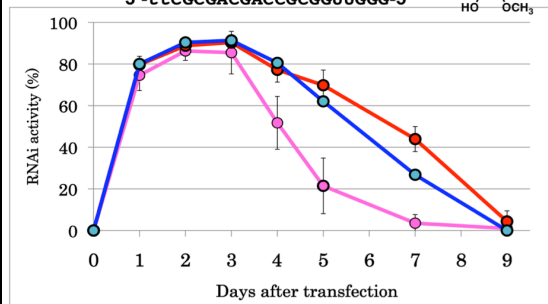
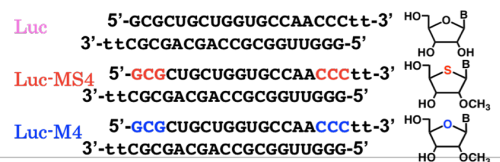


図 1. 修飾 siRNA によるルシフェラーゼ mRNA のノックダウン効果の *in vitro* での持続性

型よりも 40% 持続的に効果を発現する Luc-MS4 (day 2 での EC₅₀ = 24.6 nM, day 6 での EC₅₀ = 83.8 nM) を見出した (図 1)。この Luc-MS4 はマウス血清中で Luc より 5.5 倍安定であり、細胞内残存量を qRT-PCR で定量したところ天然型よりも 3 倍細胞内濃度が高く残存していた。従って、^sOMe-RNA の前述したヌクレアーゼ抵抗性が持続性に関与していると考えられた。

③ apoB mRNA の siRNA による *in vivo* でのノックダウン効果と自然免疫活性化回避：apolipoprotein B (apoB) は生体内で低密度リポ蛋白質 (LDL) の形成に必須なタンパク質であり、LDL 受容体のリガンドとして働いていることが知られている。血中の apoB レベルは LDL やコレステロールのそれと同様に、冠動脈疾患のリスクと大きく関連している。現在、このような疾患の原因となる高コレステロール血症は内因性のコレステロール合成を直接阻害する HMG-CoA 還元酵素阻害剤や、食物由来のコレステロールに作用する医薬が広く用いられている。しかし、apoB は従来の低分子医薬やタンパク質医薬には非感受性であるが、核酸医薬のよい標的となり得ることが期待されている。

そこで apoB の mRNA を標的とした修飾型 siRNA を設計・合成し、それらの *in vivo* における apoB 遺伝子発現抑制効果および核酸医薬に対する副作用 (off-target 効果) と考えられる自然免疫賦活能について評価した。前述したルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA の作用が持続する修飾様式を参考に、apoB1 siRNA のセンス鎖中の太字部分 (5'-**GGAAUCUUUAUUUGAUCCA***A*A*U-3', *はホスホロチオエート結合) を ^sOMe や OMe で修飾し、未修飾体 (U) と活性を比較した。それぞれの siRNA をリポソームに搭載し、C57BL/6 マウスに 1.25 mg/kg で尾静脈投与した。投与後 48 時間における apoB mRNA を qRT-PCR を用いて定量したところ、天然型 siRNA (U) 投与群では、siRNA 非投与群と比較して約 40% の遺伝子ノックダウン活性を示した。一方、OMeRNA 修飾型 siRNA (M6) 投与群と ^sOMeRNA 修飾型 siRNA (S6) 投与群では 75% 以上の遺伝子ノックダウン活性を示した (図 2a)。これらを U と比較してもその差に有意性があることが明らかになった。同様に、血中コレステロール濃度を調べたところ、M6 と S6 投与群で非投与群 (NC) や U よりも低下した (図 2b)。以上のように修飾 siRNA による肝臓 apoB のノックダウンによる表現形として血中総コレステロール濃度の低下より *in vivo* での活性が確認された。

天然型 siRNA は、生体内で自然免疫を賦活化し副作用となるが、このような自然免疫

による認識は 2' 水酸基の Me 化などの化学修飾により回避できることが知られている。そこで、それぞれの siRNA 投与群で、siRNA の自然免疫賦活化により産生される IL-6 と IFN- α の投与 6 時間後における血中濃度を測定した。その結果、S6 および M6 の i.v. 投与で IL-6 の産生量は U の投与群と比較して約 12 分の 1 に低下し、さらに IFN- α 産生は認められなかった。以上の結果より、^sOMe 修飾型 siRNA は OMeR 修飾型 siRNA と同様に *in vivo* でも有効であり、かつ免疫応答を回避できる優れた化学修飾法であることが明らかとなった。

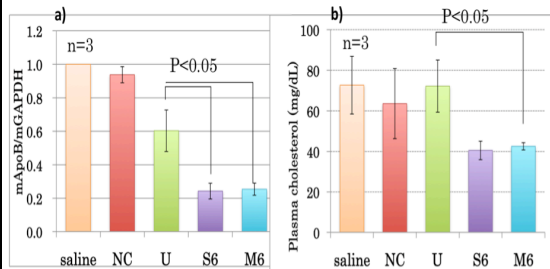


図 2. apoB mRNA のノックダウン効果と血中コレステロール濃度

(2) ヌクレアーゼ抵抗性核酸ベクターの創出 ① 2'-deoxy-4'-thionucleoside 5'-triphosphates (d^sNTPs) の各種 DNA ポリメラーゼによる PCR の検討：化学合成した d^sNTPs を用いて市販の DNA ポリメラーゼ (pol) による PCR を行った。種々の耐熱性 DNA pol の中で KOD Dash および DMSO 添加条件下での 9° Nm が最も増幅効率が高かった。しかし、図 3 に示すように 1-2 種類の天然型 dNTPs を d^sNTPs に置換してもそれらは取り込まれたが、3-4 種類の d^sNTPs を用いた場合には増幅反応は進行しなかった。この原因を速度論的に精査したところ、プライマーやテンプレートに thioDNA が含まれると DNA 構造が B 型から A 型 (RNA のとる構造) に変化する (2 本鎖 4'-thioDNA は A 型様構造をとることを NMR により明らかにした) ために、酵素と二本鎖テンプレート・プライマーが複合体を形

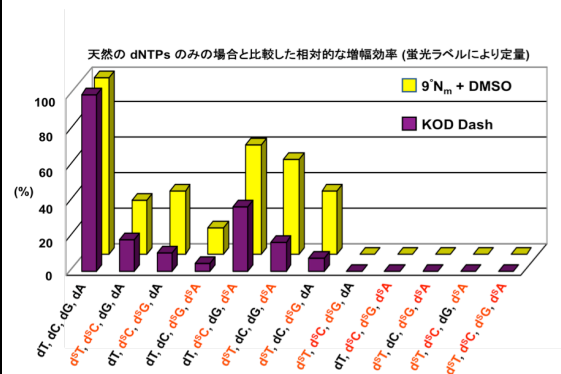


図 3. KOD Dash および 9° Nm (DMSO) DNA polymerases による dsNTPs の取り込み効率

成しにくくなり鎖伸張効率が低下することが明らかになった。

②4'-thioDNA 修飾型ルシフェラーゼ発現ベクターの化学・酵素合成と活性発現：2種類のヌクレオシドを4'-チオヌクレオシドに置換した42merのオリゴヌクレオチド(°ODN)を化学的に合成した。pGL2ルシフェラーゼ発現ベクターを制限酵素(Bms-BI, Bst-EII)で切断し、上記の°ODNを酵素的にライゲーションして4'-thioDNA(42mer)を部分的に含むベクターを調製した(ライゲーション効率は1-2%)。このベクターをマウスNIH3T3細胞にトランスフェクションし、24-72時間のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、4'-thioDNA修飾型ベクターからも天然型ベクターの約20-40%程度のルシフェラーゼ活性が発現し、部分的に4'-thioDNAで修飾されていても細胞内のRNAポリメラーゼで転写反応が起きていることが明らかになった。さらに、72時間後でもほぼ同程度のルシフェラーゼ活性が維持されていることも見出した(図4)。

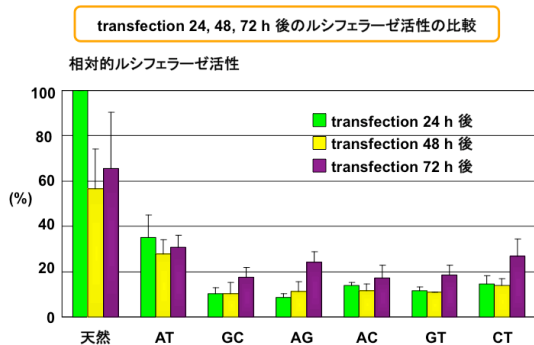


図4. 4'-thioDNAを含むルシフェラーゼ発現ベクターによるNIH3T3細胞中での相対的転写活性

(3)「核酸医薬」を送達するナノキャリア＝薬物送達システム(DDS)の開発

①腫瘍環境に応答して切断されるPEG脂質誘導体(PPD)によるsiRNAデリバリー：腫瘍で高発現するマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)によって分解するペプチドスペーサーを有するPEG脂質誘導体(PPD)の合成を行い、MENDを修飾したPPD-MENDによるsiRNAデリバリーを試みた(図5A)。PPD-MENDのin vitro細胞培養におけるノックダウン活性は、通常の切断されないPEGを修飾したPEG-MENDと比較して向上した(図5B)。これはMENDの細胞内取り込み量やエンドソーム脱出効率の向上によることが示された(図5B)。また、in vivoで最適化されたPPD-MENDを担癌モデルマウスへ静脈内投与し腫瘍組織の切片を観察した結果、腫瘍組織に広く分布

している様子が観察された(図5C)。さらに腫瘍組織の標的遺伝子活性を70%程度ノックダウンすることに成功した(図5D)。

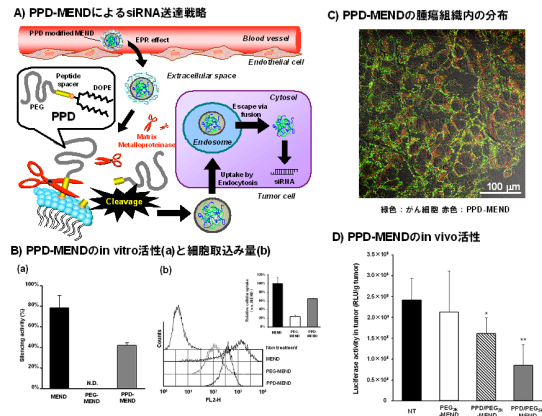


図5 PPD-MEND

②pH応答性膜融合ペプチドGALAを用いたsiRNAデリバリー：酸性環境で膜融合を誘起するpH応答性膜融合ペプチドGALAのアミノ酸基を短縮したshort GALA(shGALA)を開発し、shGALAを修飾したPEG-MEND(shGALA-MEND)によるsiRNAデリバリーを試みた(図6A)。shGALA-MENDは、PEG-MENDと比較してエンドソーム脱出が促進された結果in vitro細胞培養におけるノックダウン活性が向上した(図6B)。shGALA-MENDを担癌マウスへ静脈内投与すると、腫瘍組織に広く分布している様子が観察され(図6C)、shGALA修飾に依存した標的遺伝子のmRNAノックダウンを確認した(図6D)。さらにshGALA-MENDの投与により腫瘍増殖が抑制され、抗腫瘍効果が見られた。

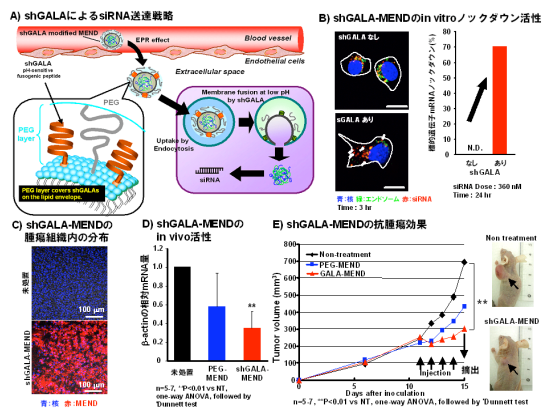


図6. shGALA-MEND

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計166件)

査読有りの英文原著論文のみを掲載

- 1) Hirose, W.; Sato, K.; Matsuda, A. Selective detection of 5-formyl-2'-deoxyuridine, an oxidative lesion of thymidine, in DNA by a fluorogenic reagent. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 8392-8394.
- 2) Tomaya, K.; Takahashi, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Convenient RNA synthesis using a phosphoramidite possessing a biotinylated photocleavable group. *Org. Lett.* **2010**, *12*, 3836-3839.
- 3) Ogino, T.; Sato, K.; Matsuda, A. Incorporation of 2'-deoxy-2'-isonucleoside 5'-triphosphates into DNA by A- and B-family DNA polymerases with different recognition mechanisms. *ChemBioChem.* **2010**, *11*, 2597-2605.
- 4) Takara, K.; Hatakeyama, H.; Ohga, N.; Hida, K.; Harashima, H. Design of a dual-ligand system using a specific ligand and cell penetrating peptide, resulting in a synergistic effect on selectivity and cellular uptake. *Int J Pharm.* **2010**, *396*, 143-148.
- 5) Sato, Y.; Hatakeyama, H.; Harashima, H. Ornithine and tryptophan analogs as efficient polycations for short interference RNA delivery to tumor cells. *Biol Pharm Bull.* **2010**, *33*, 1246-1249.
- 6) Akita, H.; Kogure, K.; Moriguchi, R.; Nakamura, Y.; Higashi, T.; Nakamura, T.; Serada, S.; Fujimoto, M.; Naka, T.; Futaki, S.; Harashima, H. Nanoparticles for ex vivo siRNA delivery to dendritic cells for cancer vaccines: Programmed endosomal escape and dissociation. *J. Control. Release* **2010**, *143*, 311-317.
- 7) Ogata, S.; Takahashi, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Unnatural imidazopyridopyrimidine:naphthyridine base pairs: selective incorporation and extension reaction by Deep Vent (exo-) DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 5602-5609.
- 8) Minakawa, N.; Ogata, S.; Takahashi, M.; Matsuda, A. Selective recognition of unnatural imidazopyridopyrimidine:naphthyridine base pairs consisting of four hydrogen bonds by the Klenow fragment. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 1644-1645.
- 9) Takahashi, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Synthesis and characterization of 2'-modified-4'-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, 1353-1362.
- 10) Sakurai, Y.; Hatakeyama, H.; Akita, H.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Futaki, S.; Harashima, H. Efficient short interference RNA delivery to tumor cells using a combination of octaarginine, GALA and tumor-specific, cleavable polyethylene glycol system. *Biol Pharm Bull.* **2009**, *32*, 928-932.
- 11) Hatakeyama, H.; Ito, E.; Akita, H.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Futaki, S.; Harashima, H. A pH-sensitive fusogenic peptide facilitates endosomal escape and greatly enhances the gene silencing of siRNA-containing nanoparticles in vitro and in vivo. *J Control Release.* **2009**, *139*, 127-132.
- 12) Minakawa, N.; Sanji, M.; Kato, Y.; Matsuda, A. Investigations toward the selection of fully-modified 4'-thioRNA aptamers: optimization of in vitro transcription step in the presence of 4'-thioNTPs. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9450-9456.
- 13) Takahashi, M.; Daidouji, S.; Shiro, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Synthesis and crystal structure of 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-thioribonucleosides: substrates for the synthesis of novel modified RNAs. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 4313-4324.
- 14) Matsugami, A.; Ohyama, T.; Inada, M.; Inoue, N.; Minakawa, N.; Matsuda, A.; Katahira, M. Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, as revealed by NMR, and the implication on the mechanism of nuclease-resistance. *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1805-1812.
- 15) Nakane, M.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. Triazole-linked dumbbell oligodeoxynucleotides with NF- κ B binding ability as potential decoy molecules. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 1842-1851.
- 16) Minakawa, N.; Kawano, Y.; Murata, S.; Inoue, N.; Matsuda, A. Oligonucleotides containing 3-bromo-3-deazaadenine and 7-bromo-7-deazaadenine 2'-deoxynucleosides as chemical probes to investigate DNA-protein interactions. *ChemBioChem.* **2008**, *9*, 464-470.
- 17) El-Sayed, A.; Khalil, IA.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. Octaarginine- and octalysine-modified nanoparticles have different modes of endosomal escape. *J Biol Chem.* **2008**, *283*, 23450-23461.
- 18) Sasaki, K.; Kogure, K.; Chaki, S.; Nakamura, Y.; Hamada, H.; Ueno, M.; Futaki, S.; Harashima, H. An artificial virus-like nano carrier system: Enhanced endosomal escape of nanoparticles via synergistic action of pH-sensitive fusogenic peptide derivatives. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2717-2727.
- 19) Inoue, N.; Shionoya, A.; Minakawa, N.; Ogawa, N.; Matsuda, A. Amplification of 4'-thioDNA in the presence of 4'-thio-dTTP and 4'-thio-dCTP, and 4'-thioDNA-directed transcription in vitro and in mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15424-15425.
- 20) Hoshika, S.; Minakawa, N.; Shionoya, A.;

Imada, K.; Ogawa, N.; Matsuda, A. Study of modification pattern-RNAi activity relationships using siRNAs modified with 4'-thioribonucleosides; finding an effective modification irrespective of target sequence. *ChemBioChem*. **2007**, *8*, 2133-2138.

21) Murata, S.; Mizumura, Y.; Hino, K.; Ueno, Y.; Ichikawa, S.; Matsuda, A. Modular bent DNAs: A new class of artificial DNAs with a protein binding ability. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 10300-10301.

22) Juan, E. C. M.; Kondo, J.; Kurihara, T.; Ito, T.; Ueno, Y.; Matsuda, A.; Takenaka, A. Crystal structures of DNA:DNA and DNA:RNA duplexes containing 5-(N-aminoethyl)carbamoyl-modified uracils reveal the basis for properties as antigens and antisense molecules. *Nucleic Acids Res.* **2007**, *35*, 1969-1977.

23) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Ishida, E.; Hashimoto, K.; Kobayashi, H.; Aoki, T.; Yasuda, J.; Obata, K.; Kikuchi, H.; Ishida, T.; Kiwada, H.; Harashima, H. Tumor targeting of doxorubicin by anti MT1-MMP antibody-modified PEG liposomes. *Int. J. Pharm.* **2007**, *342*, 194-200.

24) Nakamura, Y.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. Octaarginine-modified multifunctional envelope-type nano device for siRNA. *J. Cont. Rel.* **2007**, *119*, 360-367.

25) Hikishima, S.; Minakawa, N.; Kuramoto, K.; Ogata, S.; Matsuda, A. Synthesis and characterization of oligodeoxynucleotides containing naphthyridine:imidazopyridopyrimidine base pairs at their sticky ends. Application as thermally stabilized decoy molecules. *ChemBioChem* **2006**, *7*, 1970-1975.

26) Inoue, N.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Synthesis and properties of 4'-thioDNA: unexpected RNA-like behavior of 4'-thioDNA. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 3476-3483.

27) Hatakeyama, H.; Akita, H.; Kogure, K.; Oishi, M.; Nagasaki, Y.; Kihira, Y.; Ueno, M.; Kobayashi, H.; Kikuchi, H.; Harashima, H. Development of a novel systemic gene delivery system for cancer therapy with a tumor-specific cleavable PEG-lipid. *Gene Therapy* **2006**, *14*, 68-77.

28) Iwasa, A.; Akita, H.; Khalil, I.A.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. Cellular uptake and subsequent intracellular trafficking of R8-liposomes introduced at low temperature. *BBA-Biomembranes* **2006**, *1758*, 713-720.

[学会発表] (計 5 0 3 件)

[図書] (計 2 2 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 0 件)

名称: shRNA 発現用 DNA カセット

発明者: 松田 彰, 南川典昭, 塩野谷亜紀, 尾川直樹

権利者: 北海道大学

種類: 特願

番号: 2007-298097

出願年月日: 平成 19 年 11 月 16 日

国内外の別: 国内

名称: 機能性ポリペプチド及び当該ポリペプチドで修飾された脂質膜構造体

発明者: 原島秀吉, 秋田英万, 畠山浩人, 他

権利者: 北海道大学

種類: 特願

番号: 2010-39667

出願年月日: 平成 22 年 2 月 25 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/yakka01.html>

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/yakusetu01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)

研究者番号: 9 0 1 5 7 3 1 3

(2) 研究分担者

原島 秀吉 (HARASHIMA HIDEYOSHI)

研究者番号: 0 0 1 8 3 5 6 7

南川 典昭 (MINAKAWA NORIAKI)

研究者番号: 4 0 2 0 9 8 2 0

(3) 連携研究者

なし