がん免疫療法への PEG 化材料からのアプローチ

筑波大学 物質工学・フロンティア医科学・WPI-MANA・NIMS サテライト*

長崎幸夫*

Design of Novel PEGylated Materials for Different Approaches to Cancer Immunotherapy

Cancer immunotherapies are attracting much attention as one of emerging cancer treatments. Because immunotherapy is based on the stimulation of a patient's own immune system, it is believed to be patient friendly. However, there are several hurdles in developing living cells and bioactive proteins for immunotherapy because of the several serious issues such as long-term cultivation, stability and systemic toxicities, called “immune-related adverse events”, caused by their conventional injection formulations. Increasing costs are also one of other serious issues. To overcome these issues, we designed new local protein delivery system by using a protein-loaded, redox-active, injectable gel (RIG), which is formed by a polyion complex (PIC) comprising three components, viz., cationic polyamine-poly(ethylene glycol)-polyamine triblock copolymer possessing ROS-scavenging moieties as side chains; anionic poly(acrylic acid); and a protein. The mixture formed the protein-loaded PIC flower micelles at room temperature, which immediately converted to a gel with high mechanical strength upon exposure to physiological conditions. Because the protein electrostatically interacts with the PIC gel network, RIG provided a sustained release of the protein without a significant initial burst, regardless of the types of proteins in vitro, and much longer retention of the protein at the local injection site in mice than that of the naked protein. Subcutaneous injections of IL-12 @RIG in the vicinity of tumor tissue showed remarkable tumor growth inhibition in tumor-bearing mice, compared to that observed with injection of IL-12 alone, suppressing adverse events caused by IL-12 induced ROS. Another approach is to deliver arginine to macrophages in tumor environment by our original PIC micelle composed of PEG-b-poly(L-arginine) block copolymer coupled with chondroitin sulfate. After a phagocytosis of this PIC micelle by the macrophages, it hydrolyzed to arginine followed by nitric oxide by iNOS expressed in the activated macrophages to result in suppression of tumor growth. These approaches are different from conventional antitumor immunotherapies but promising as emerging technique from PEGylated materials.

近年、患者自身の免疫能を向上させ、抗がん治療を進めるアプローチが盛んになりつつある。患者自身の細胞や免疫システムを活性化させるタンパク質などを利用するこの治療法は、これまでの化学療法に比べて副作用が小さく、高い QOL が期待されている。しかしながら工程の複雑さ、コスト、安定性など、問題も少なくなく、免疫関連の副作用も明らかになりつつある。このような問題点を踏まえ、筆者らはポリカチオン-PEG-ポリカチオンをベースにポリイオンコンプレックス型インジェクタブルゲルによる局所タンパク質デリバリーシステムを開発し、がん免疫治療に適用した。また、アルギニン放出ナノ粒子を新たに設計し、タンパク質を使わないマクロファージ活性化によるがん治療を行った。これらに関するレドックスナノメディシンの効果を紹介する。

Yukio Nagasaki^{*1,2)}

Keywords: Cancer immunotherapy, Redox injectable gel, Nitric oxide, Polyion complex micelle, IL-12

^{*1)} Department of Materials Science, Graduate School of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba, Master's School of Medical Sciences, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba, Satellite Laboratory, International Center for Materials Nanoarchitectonics (WPI-MANA), National Institute for Materials Science (NIMS), University of Tsukuba, Tennoudai 1-1-1, Tsukuba 305-8573, Japan
茨城県つくば市天王台1-1-1

1. はじめに

1980年代に入って Allison らは、T細胞受容体 (T-Cell receptor ; TCR) を阻害すれば T細胞ががん細胞をアタックできるかもしれないとの独創的発想を持ち¹⁾、細胞傷害性 T リンパ球抗原 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 ; CTLA-4) 抗体が、がん成長を抑制することを見出した²⁾。以来、患者自身の免疫能を向上させ、抗がん治療を進めるアプローチが盛んになりつつある。がん免疫療法には、患者自身の活性化したリンパ球やナチュラルキラー細胞などを利用する免疫細胞療法、樹状細胞などを利用するがんワクチン療法、インターロイキンやインターフェロンなどのタンパク質を利用するサイトカイン療法、抗体を利用する抗体療法など、幅広く研究されている。

がん免疫療法は、患者自身の免疫細胞を増やして使う、あるいは体内で活性化させるため、患者に優しく副作用が抑制されるなどが期待されている。しかしながら、これらの新しい治療法では、正常細胞が持つ同一抗原などに対する自己免疫の問題、サイトカインなどによる免疫誘導に対する副作用の問題や肥大化する開発費の問題など、解決すべき問題が多い。

例えばインターロイキン-2 (IL-2) の投与による細胞傷害性 T細胞やナチュラルキラー細胞の活性化が検討されてきたものの、IL-2は腫瘍組織への特異的取り込み能を持たないため、現状では過剰量を全身投与しており、そのため重篤な毒性が確認されている。また、がん細胞が腫瘍増殖因子またはトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) というサイトカインを分泌し始めた腫瘍環境では、免疫細胞の活性化は限られてしまうことも解決しなければならない課題である。

筆者らはこのような問題点を材料設計の立場から解決するべく新しい材料の設計を行った。それらのアプローチに関して紹介する。

2. レドックスインジェクタブルゲルによる IL-12 の局所デリバリー

がん免疫療法は、取り出した免疫細胞を直接活性化し、体内に戻す方法だけでなく、サイトカインや抗体による患者自身の免疫能の回復なども広く進められている。バイオ医薬品としてのタンパク質の投与に関しては、がん免疫療法のみならず広く行われているものの、易代謝性、分解性、免疫原性などの問題から、PEG化タンパク質医薬など、さまざまに検討されている (タンパク質 PEG 化に関しては本特集 池田 豊博士の総説参照)。PEG化タンパク質はいくつか上市されているものの、その活性が著しく低下するため、すべてのタンパク質に適用するのは困難である。ナノ粒子に封入し、デリバリーする試みもあるが、その安定性の問題から十分な効率が上がらないのが現状である。

上述したように IL-2 などをバイオアベイラビリティやターゲティングの問題から大量に投与することが不可欠であり、これが副作用につながっていることから、筆者らは低濃度でも継続してリリースする局所投与が効果的であろうとの結論に達した。タンパク質を局所投与すべき材料として、筆者らはポリイオンコンプレックス (PIC) 型のインジェクタブルゲルを設計した。これはチャージを持つタンパク質を容易にコアに封入することができ、皮下投与でゲル化するため、投与領域で長時間滞在することが可能であることが特徴である。また、材料と生体成分との接触により惹起される炎症を抑制するため、活性酸素種 (ROS) 除去能をインジェクタブルゲル内に導入した (レドックスインジェクタブルゲル、RIG)。

2-1 レドックスインジェクタブルゲルの設計とタンパク質封入

疎水性高分子 A と親水性高分子 B を A-B-A という形で結合させたトリブロック共重合体は、水中で自己組織化し、A が水に不溶なコア、B がループを形成した表層シェルを形成し、ナノサイズの粒子を形成する。親水性高分子 B がループを形成するため、一般に「フラワーミセル」といわれているこの

ナノ粒子は、温度が上昇すると、ループのエントロピー損失が上昇するとともに、疎水性相互作用が増すため、ゲル化することが知られている³⁾。しかしながらそのゲル化挙動は可逆的で力学的強度が極めて低く、材料としての応用に問題があった。筆者らは疎水性のポリアミンを A セグメントに用いた A-B-A (PMNT-b-PEG-b-PMNT と略記する) トリブロック共重合体を設計し、ポリアニオンと混合することにより、A セグメントとポリアニオンが PIC を形成して疎水化するため、機械的強度に優れた PIC フラワーミセルを作製することに成功した (図1)^{4,5)}。

筆者らはこれまで、ROS 消去能を有するインジェクタブルゲル、RIG を歯周病治療⁶⁾ やスプレー型臓器癒着防止剤としての開発を行い、高い効果を実証してきた⁷⁾。筆者らの設計したフラワーミセルは、①ポリアミンセグメントに ROS 消去能を有するニトロキシドラジカルを導入するとともに、②生体投与によりゲル化し、機械的強度の比較的高いハイドロゲルを形成するだけでなく、③PIC というイオン相互作用によるコア凝集力を利用しているため、ペプチド、タンパク質やオリゴ核酸などのチャージを持つ生体分子を容易に内封できるという特徴を有する。そこで、タンパク質の局所投与とコントロールデリバリーのため、タンパク質内包 RIG を調製し、評価を行った。

化学当量のポリアニオンとポリカチオンからなる PIC は、そのチャージバランスを制御することにより容易にタンパク質の封入が可能である。RIG と表面電荷や分子量の異なるタンパク質を混合し、動的光散乱 (DLS) にてサイズを求めると、図2に示すようにタンパク質未封入よりわずかに増大した 60 nm 程度のナノ粒子を与えた⁸⁾。このナノ粒子の表面電位は 0 ~ +0.6 mV 程度でほとんどチャージを持たないことが確認されている。これは図1に示すように PEG がループを形成して PIC コアをカバーしている構造を保っていることを示す。

レオメーターを用い、温度上昇にともなう機械的強度変化を測定した結果を図3に示す。上述したように、PLGA-b-PEG-b-PLGA の親疎水型 A-B-A トリブロック共重合体によるゲルは、生体環境下

図1 ROS消去能を有するインジェクタブルゲルの設計

図2 種々タンパク質を封入した RIG の粒径分布
(Elsevier 社から許可を得て ref.8 を改変して掲載)

図3 タンパク質封入 RIG の機械的強度の温度依存性
(Elsevier 社から許可を得て ref.8 を改変して掲載)

において0.1~1.0 Pa程度の機械的強度であるものの、筆者らのRIGはタンパク質封入にもかかわらず10~20 kPaと飛躍的に高い機械的強度を示した。

2-2 タンパク質内包レドックスインジェクタブルゲルからのタンパク質放出

ポリイオンコンプレックスは、多荷静电相互作用により高い安定性を示すものの、血液のような高イオン強度下において、静电遮蔽により安定性が大きく低下することが知られている。しかしながら筆者らの設計したA-B-Aトリブロック共重合体は、AセグメントのPMNTに疎水性ポリアミンを用いているため、イオン強度の上昇においても高い安定性を示す。この安定化により内封タンパク質を初期バーストすることなく2週間にわたってリリースすることが可能となった(図4)。

2-3 マウス皮下投与による薬物滞留効果

*in vivo*局所投与におけるタンパク質およびゲルの局在性を検討するため、インドシアニングリーン(ICG)ラベル化BSA(ICG-BSA)をHylite647ラベル化RIG(Hylite647-RIG)に内封し(ICG-BSA@Hylite647-RIG)、マウス皮下に投与しIVISで観測

した。ICG-BSAを皮下に単独投与すると7時間以内に消失したのに対し、ICG-BSA@Hylite647-RIGでは2週間継続的に観測され、*in vitro*の結果とよく相関した。また、Hylite647-RIGはおおよそ1カ月間観測され、PICがゆっくりほどけて消失していく様子がわかる(図5)。これは、局所に投与したゲルが長期にわたりROSを消去する効果を期待させる。

2-4 マウス皮下投与による

担がんマウスの抗腫瘍効果

このようにタンパク質を安定に内封し、皮下投与によりゲル化して長時間にわたり放出が可能となったため、IL-12をモデル薬物とし、IL-12@RIGによる担がんマウスの腫瘍増殖抑制効果を検討した。皮下移植担がんマウスの腫瘍から5 mm離れた皮下に投与した8 mg IL-12(400 g/kg)単独投与に比べ、IL-12@RIG(4 mg,200 g/kg)を皮下投与すると有意に腫瘍増殖抑制効果が現れていることがわかる。さらに5回投与では、投与期間中はIL-12とIL-12@RIGの効果はほとんど同じであったものの、IL-12@RIGはその後長期にわたり、腫瘍増殖抑制効果が見られた(図6)。

図4 タンパク質内封レドックスインジェクタブルゲル(RIG)からの*in vitro*リリース挙動

(100 μ g/mL protein, 55 mg/mL RIG, $r = 1:1$, pH 6.2)

(Elsevier社から許可を得て ref.8を改変して掲載)

(a) ICG labeled BSA

(b) ICG labeled BSA loaded, Hilyte 647 conjugated RIG

(c) Hilyte 647-conjugated RIG after subcutaneous administration of ICG-BSA-loaded, Hilyte 647-conjugated RIG

図5 タンパク質内封レドックスインジェクタブルゲル(RIG)からの*in vivo*リリース挙動

- (a) ICG-ラベル化BSA 単独投与による経時変化
(b) ICG-BSA@ Hilyte 647-ラベル化RIG における ICG 蛍光強度変化
(c) ICG-BSA@ Hilyte 647-RIG からの Hilyte 647 蛍光強度変化

(Elsevier社から許可を得て ref.8を改変して掲載)

図6 IL-12内封RIGの局所投与による抗腫瘍効果

(a) 1回投与、(b) 4日おき5回投与。 * $p < 0.05$ as compared with IL-12. # $p < 0.05$ as compared with PBS. \$ $p < 0.05$ as compared with RIG (Elsevier社から許可を得て ref.8を改変して掲載)

2-5 IL-12 @RIG の副作用抑制効果

IL-12は免疫細胞の活性化を促すだけでなく、ROS産生にともなう強い副作用が問題とされている。IL-12の投与による血中のTNF- α レベルを調べたところ、IL-12単独では極めて上昇しているのに対し、IL-12 @RIG ではほぼ上昇が抑制された(図7)。これはRIGによるIL-12の血中への急激な上昇を有意に抑制するだけでなく、RIGによるROS消去能が強く関与しているものと考えられる。このようにRIGはタンパク質内封により局所コン

トロールドリリリースとROS消去による副作用の抑制が期待される新しい材料として有望である。

3. 腫瘍近傍マクロファージをターゲットとする一酸化窒素(NO)発生ナノ粒子の設計と治療

上述したようにRIGによるIL-12の送達では、マトリックスのゲル化によるIL-12濃度の急激な増加が抑制され、材料自身の抗酸化能とも相まって、効果が得られている。しかしながらタンパク質をデリバリーするうえで、その分解、代謝、免疫原性、集積性などさまざまなハードルを越えなければならず、長年苦勞に苦勞が重ねられてきているのが現状である。

そこで免疫サイトカインの投与に頼らず、免疫細胞を活性化するために、マクロファージ(M ϕ)へアルギニンをターゲッティングする戦略をとった。腫瘍近傍に浸潤するM ϕ は、細胞内に誘導一酸化窒素合成酵素(iNOS)を高発現しており、アルギニンを基質とすることでNOを産生する。このNOは脂溶性のガス状分子であり、M ϕ から産生されるとすぐに組織中に拡散し、がん細胞内に侵入する。NOは高濃度にかん細胞内に侵入した場合、DNAの損傷や細胞内タンパク質のニトロソ化を介してアポ

図7 皮下移植がんマウスに対する薬物投与
図6(b)の条件40日後の血中TNF- α レベル。* $p < 0.05$
(Elsevier社から許可を得て ref.8を改変して掲載)

トーシスを誘導する。このように Mφ による抗腫瘍活性において NO が中心的役割をする。しかしながら Mφ による NO 産生量は、アルギニン濃度が律速段階になっているため、腫瘍内にアルギニンを大量に運ぶことがポイントとなり、これが達成できれば Mφ による抗腫瘍活性が向上することが期待できる。このような状況の下、アルギニンを投与する試みなどが行われているものの、アルギニンが腫瘍に集まるメカニズムがないため、ほとんど効果が出ていない。

筆者らは全身投与による腫瘍組織へのアルギニン送達を目的とし、新たに設計したポリエチレングリコール-b-ポリ(L-アルギニン) (PEG-b-P(L-Arg)) とポリアニオンにより形成されるナノ粒子による腫瘍近傍 Mφ をターゲットとしたナノメディシンの開発を行った(図8)。

3-1 PEG-b-P(L-Arg) の分子デザインのナノ粒子の設計

PEG-b-P(L-Arg) は、アミン末端 PEG を開始剤とし、オルニチン N-カルボキシ無水物(NCA)の開環重合とグアニジノ基の導入という2段階法によって合成した(図9)⁹⁾。

図8 PEG-b-ポリアルギニンブロック共重合体によるポリイオンコンプレックスミセルの調製とマクロファージターゲティング抗がんナノメディシン戦略

図9 ポリ(エチレングリコール)-b-ポリ(L-アルギニン)ブロック共重合体(PEG-b-P(L-Arg))の合成経路

このようにして合成した PEG-b-P(L-Arg) はポリカチオンであるので、コンドロイチン硫酸(CS)などのポリアニオンと混合することによりポリイオンコンプレックス(PIC)を形成し、ナノ粒子を与える。図10に示すように、ポリアニオンとしてCSを用い、PEG-b-P(L-Arg)と種々混合比で混合し動的光散乱を測定したところ、いずれの比においても30~40 nm のナノ粒子が形成する。特にアニオン：カチオンの化学当量比で形成した粒子は、粒径

分布が最も小さく、ほぼ完全に表面電荷が遮蔽された粒子を与える。

PIC形成を証明するため、PEG-b-P(L-Arg) および CS にそれぞれ Cy3 および フルオレセイン (FL) 蛍光基を導入し、その蛍光強度を測定した。PEG-b-P(L-Orn) および ヒアルロン酸 (HA) を比較として用いた。図11に示すように強い蛍光エネルギー移動(FRET)が見られ、ポリイオンコンプレックス形成によりナノ粒子が形成していることが確認

図10 PEG-b-P(L-Arg)/CS ポリイオンコンプレックス(PIC) ミセルの動的光散乱(DLS)解析結果

- (A) 散乱強度(○)、多分散度(▼)のカチオン/アニオン比依存性
 (B) Z平均粒径(●)、ゼータ電位(□)のカチオン/アニオン比依存性
 (C) ヒストグラム解析結果

(Wiley 社から許可を得て ref.9 を改変して掲載)

図11 Cy3-ラベル化PEG-b-ポリカチオンとFL-ラベル化CS PIC ミセル(C/A=1/1)のFRET効率
(A)FRET効率のイオン強度依存性: PEG-b-P(L-Arg)/CS(▼)、PEG-b-P(L-Arg)/ヒアルロン酸(HA)(◆)、PEG-b-P(L-Orn)/CS(□)、PEG-b-P(L-Orn)/HA(○)
(B)FRET効率のC/A比依存性: PEG-b-P(L-Arg)/CS(▼)、PEG-b-P(L-Arg)/ヒアルロン酸(HA)(◆)、PEG-b-P(L-Orn)/CS(□)、PEG-b-P(L-Orn)/HA(○)
(C)FRET効率の血清タンパク質存在効果(n=3, S.D.) (Wiley社から許可を得て ref.9を改変して掲載)

される。興味深いことに前駆体の PEG-b-P(L-Orn) に比べ、PEG-b-P(L-Arg)の方が強く FRETが見られた。また HA に比べて CS の方が強い FRETが見られた。これは二価カチオンを有するグアニジノ基やチャージ密度の高い CS により静電相互作用が強まったためと考えられる。PIC ミセルは高イオン強度下では静電遮蔽によりその凝集力が低下し、崩壊する。図11にイオン強度に対する FRET 強度変化を示すとおり、イオン強度に対する安定性も PEG-b-P(L-Orn) に比べ、PEG-b-P(L-Arg)の方が高く、これは血清存在下においても同様の傾向を示した。

3-2 マクロファージターゲティング NO 放出効果

上述のようにして作製した PEG-b-P(L-Arg)/CS PIC ナノ粒子(IANP と略記する)の NO 放出挙動を見る前に、ポリマーからの NO 放出挙動を確認した。

図12に示すように、市販 iNOS を L-アルギニン + PEG 混合物と混合すると NO の産生が見られるものの、合成した PEG-b-P(L-Arg) ブロック共重合体では NO の産生は見られない。一方、この系にトリプシンを共存させることにより定量的に NO を産生した。これはトリプシンによりポリ(L-Arg)が加水分解し、生成した L-Arg が iNOS により酵

図12 誘導一酸化窒素合成酵素(iNOS)による一酸化窒素産生試験
トリプシン存在下(■)、非存在下(□) (n=3, mean ± S.D.)
(Elsevier社から許可を得て ref.10を改変して掲載)

素分解し、NO を産生したものと考えられる。一方、コントロールで合成した PEG-b-P(D-Arg) および PEG-b-P(L-Lys-G) (ポリリジンのアミノ基をグアニジノ基に変換)では、トリプシン共存下においても NO 産生は見られなかった。このように PEG-b-P(L-Arg) は Mφ に取り込まれることにより、Mφ 内に高発現しているペプチダーゼで加水分解を受け、NO を産生することが期待される。

そこで次に Mφ にナノ粒子を加え、NO 産生能を評価した。市販 Mφ (RAW264.7) に IANP を加え

て培養し、NO の産生を評価したところ、ほとんど NO の産生が見られなかった。一方、M ϕ を活性化するリポ多糖(LPS)を加えると NO 産生が見られた。これはコントロールで作製したナノ粒子 dANP および gLNP(それぞれ PEG-b-P(D-Arg) および PEG-b-P(L-Lys-G) と CS との複合ナノ粒子)の場合より有意に NO 産生が確認された。未活性化 M ϕ (LPS 非投与) では iNOS は発現しないため、産生された NO は iNOS 由来であると結論づけられる。このように IANP は企図したように活性化 M ϕ の iNOS による選択的 NO 産生を引き起こすことが確認された(図13)。

IANP (14 mg (L-Arg)/kg) を担がんマウスに尾静注し、腫瘍増殖を評価した(図14)。低濃度 IANP を1~2回投与した群では、コントロールマウスに比べて有意に腫瘍成長を促進した。一方、投与回数が3回になるとコントロールと同程度、投与回数4回で有意に腫瘍増殖抑制が見られた。このように IANP 低濃度投与では血管増殖による腫瘍増殖増強効果が見られ、一方、IANP 至適濃度投与では腫瘍増殖抑制効果が見られた。この結果は報告されている NO の生理作用とよい相関を示している。また IANP は投与回数によって体重減少がほとんど見られず、安全性が高いナノ粒子である。このように

PEG-b-P(L-Arg)をベースとするナノ粒子 IANP は新しいナノメディシン、ナノキャリアとして有望な材料である¹⁰⁾。

4. おわりに

がん三大療法の1つとしてがん化学療法は広く行われているものの、最大の問題点として、がんが重

図13 RAW264.7マクロファージ(M ϕ)による一酸化窒素産生試験
リポポリサッカライド(LPS)存在下(■)、非存在下(□) (n=3, mean $\pm$ S.D.)
IANP: PEG-b-P(L-Arg)/CS ナノ粒子、dANP: PEG-b-P(D-Arg)/CS ナノ粒子、gLNP: PEG-b-P(L-Lys-G)/CS ナノ粒子、CS: コンドロイチン硫酸 (n=3, mean $\pm$ S.D., * p<0.05) (Elsevier 社から許可を得て ref.10 を改変して掲載)

図14 皮下移植担がんマウスに対する IANP の効果

(a) 相対体重変化、(b) 腫瘍サイズの経時変化
IANP (16 mg/kg) 1回投与(0 d, ●)、2回投与(0,1 d, △)、3回投与(0,1,2 d, ▼)、4回投与(0,1,2,3 d, ◇)、コントロール(□) (n=4, expressed as mean $\pm$ S.E., * p<0.05) (Elsevier 社から許可を得て ref.10 を改変して掲載)

篤疾患であったため、抗がん剤に強い副作用があっても認可されてきたという歴史があり、心臓毒性や消化管毒性など極めて強い副作用が惹起され、多くの患者を苦しめている。バイオ医薬品のなかでも免疫療法は患者本人の免疫機能を巧みに利用した治療法であり、多方面から期待されているものの、正常細胞が持つ同一抗原などに対する自己免疫の問題、

サイトカインなどによる免疫誘導に対する副作用の問題や肥大化する開発費の問題など、解決すべき問題が多い。このような問題を真摯に受け止め、筆者らが進めてきたPEGを基盤とする材料が、少しでも患者に優しい治療法の創出を目指していくことを祈念して本稿を閉じる。

文献

- 1) Allison JP, *et al.* Tumor-specific antigen of murine T-lymphoma defined with monoclonal antibody. *J Immunol.* 1982;129(5):2293-2300
- 2) Jillian H. Hurst, Cancer immunotherapy innovator James Allison receives the 2015 Lasker-DeBakey Clinical Medical Research Award, *J. Clin. Invest.* 2015;125(10): 3732-3736 (doi:10.1172/JCI84236)
- 3) Byeongmoon Jeong, *et al.* Biodegradable block copolymers as injectable drug-delivery systems, *Nature* 1997;388 (28):860-862
- 4) Min Ley Pua, *et al.* Redox-active Injectable Gel Using Thermo-responsive Nanoscale Polyion Complex Flower Micelle for Noninvasive Treatment of Local Inflammation, *Journal of Controlled Release*, 2013;172(3):914-920(doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.10.009)
- 5) Shiro Ishii, *et al.* Dual stimuli-responsive redox-active injectable gel by polyion complex based flower micelles for biomedical applications, *Macromolecules*, 2015;48:3088-3094 (doi: 10.1021/acs.macromol.5b00305)
- 6) Makiko Saita, *et al.* Novel antioxidative nanotherapeutics in a rat periodontitis model: Reactive oxygen species scavenging by redox injectable gel suppresses alveolar bone resorption, *Biomaterials*, 2016;76:292-301(doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.077)
- 7) Hiroyuki Nakagawa, *et al.* Design of high-performance anti-adhesion agent using injectable gel with an anti-oxidative stress function, *Biomaterials*, 2015;69:165-173(doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.018)
- 8) Shiro Ishii, *et al.*, Development of a long-acting, protein-loaded, redox-active, injectable gel formed by a polyion complex for local protein therapeutics, *Biomaterials*, 2016; 84:210-218 (doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.01.029)
- 9) Sinpei Kudo, *et al.* Facile and Quantitative Synthesis of a Poly(Ethylene Glycol)-b-Poly(L-Arginine) Block Copolymer and Its Use for the Preparation of Polyion Complex Micelles with Polyanions for Biomedical Applications, *Macromolecular Rapid Communications*, 2015;36 (21):1916-1922 (doi: 10.1002/marc.201500224)
- 10) Shinpei Kudo, *et al.* A Novel Nitric Oxide-based Anticancer therapeutics by Macrophage-targeted Poly(L-Arginine)-based Nanoparticles, *Journal of Controlled Release*, 2015; 217: 256-262(doi: 10.1016/j.jconrel.2015.09.019)

参考URL

長崎研究室
http://www.ims.tsukuba.ac.jp/~nagasaki_lab/index.htm
高分子学会 <http://main.spsj.or.jp>
日本酸化ストレス学会 <http://sfrj.umin.jp>
日本バイオマテリアル学会 <http://kokuhoken.net/jsbm/>
日本DDS学会 <http://square.umin.ac.jp/js-dds/>
潰瘍性大腸炎
https://www.youtube.com/watch?v=DyW5tAQ2M1I&list=PL1DE0E0B4378B4525&index=2&feature=plpp_video