

ナノゲル工学による新規タンパク質 DDS の 開発と医療応用

第 14 回日本 DDS 学会永井賞によせて

*Development of nanogel engineering for new protein
drug delivery system and medical applications*

Kazunari Akiyoshi*

はじめに

核酸やペプチド・タンパク質などのバイオ医薬品は、革新的な次世代医薬品として期待されている。一方で、一般に安定性が低く製剤化が難しいことや、体内での分解や不活化を受けやすく半減期が短いなどの課題もある。そこで、バイオ医薬品を安定に目的の部位、かつ必要な時間に、送達、発現、あるいは徐放させることのできるドラッグデリバリーシステム (DDS) の進展が望まれている。

代表的なナノキャリアとして、リポソーム、高分子ミセルやデンドリマーなどが挙げられるが、近年、架橋された三次元網目構造を有するナノサイズの微粒子であるナノゲルが注目されている。ナノゲルは、高分子鎖間の架橋が施されていないナノスフェアなどの粒子とは異なり、含水率の高い状態で架橋された三次元ネットワークの中にタンパク質、核酸などの生体分子を安定に閉じ込めることができる。さらに、種々の刺激によるゲル

の膨潤、収縮により内包物放出の制御を行えるのが特徴である¹⁾。

ナノゲルはその架橋の様式により、化学架橋ナノゲルと物理架橋ナノゲルの2種類に分けられる。化学架橋ナノゲルは重合反応などにより得られ、共有結合により架橋されたゲルである。それに対して、物理架橋ナノゲルは、静電相互作用、ファンデルワールス力、疎水相互作用、水素結合といった分子間力により架橋されたゲルであ



写真 授賞式(左: 秋吉一成先生、右: 永井恒司名誉理事)

* JST ERATO, Graduate School of Engineering,
Kyoto University
京都大学大学院工学研究科

るが、一般にサイズのそろった安定なナノゲルを形成させることは難しかった。我々は、会合性高分子を利用することで自己組織的にナノサイズの物理架橋ゲルを調製する手法を世界に先駆けて開発した。また、疎水化多糖を基盤とした物理架橋ナノゲルは、分子シャペロン機能を発現することを見だし、特にタンパク質 DDS として有用であることを明らかにしてきた。さらに、ナノゲルをビルディングブロックとしたボトムアップゲル製造技術により、新規再生医療用ナノゲル架橋ゲル材料としての展開を行っている。本稿では、自己組織化ナノゲルの特性とナノゲル基盤材料の設計、また、主にタンパク質 DDS に関する医療応用について我々の研究を紹介する。

自己組織化ナノゲルの発見と展開

親水鎖と疎水鎖が末端で連結されたブロック型両親媒性高分子は、球状のサイズのそろった高分子ミセルを形成する。東京大学の片岡教授らがナノキャリアとしての有用性を示して以来、極めて多くの研究が報告されている。一方、1990 年代初めに、我々は疎水基が親水ポリマー鎖に部分的に導入されたグラフト型両親媒性高分子に注目し、その会合体形成と新規なナノキャリアとしての応用に関する研究を開始した。そのなかで、水

溶性多糖に部分的に長鎖アルキル基やコレステロール基を導入した疎水化多糖が、希薄水溶液中において高分子鎖数分子が自発的に会合して直径数十 nm の安定なナノ粒子を形成することを見だした(図 1)²⁾。特にコレステロール基置換プルラン(CHP)は、コレステロール基の高い疎水性と強い Van der Waals 力によってプルラン鎖が強固につながり止められて、安定なナノ微粒子を形成していることが明らかになった³⁾。この現象は、両親媒性ポリペプチド鎖がフォールディングしてタンパク質を形成するのによく似た現象である。タンパク質は、そのペプチド鎖中の疎水性のアミノ酸残基が 50% 程度を占めるために、内部がよくパッキングされた剛体球構造を取っている。一方、CHP の疎水性基は全体の 5% 程度(100 単糖当たり 1 から 2 個のコレステロール基を導入)であり、微粒子形成後も水を 80% 以上含み、疎水性基の会合領域を架橋点とする物理架橋ナノゲルを形成していることを明らかとした。このナノゲルの最大の特長は、その動的な構造により疎水的な会合力を利用してタンパク質やペプチドをその内部に包接しえるということである。この特性は、後に述べる分子シャペロン機能の発見と繋がった。

多糖は生体適合性が高いことから DDS への応用に適しており、プルランだけでなくマンナン⁴⁾

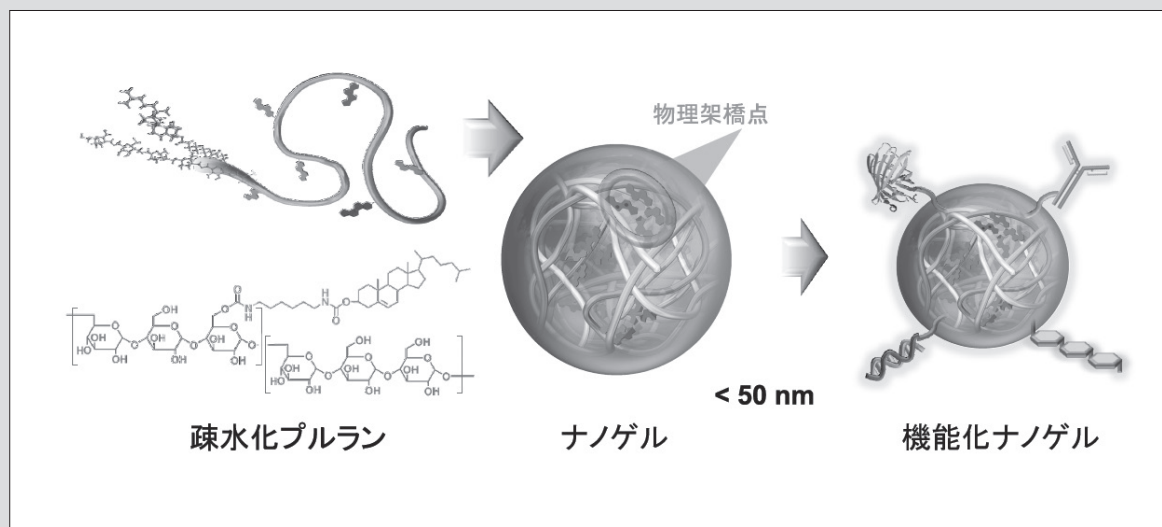


図1 自己組織化ナノゲル模式図

やクラスターデキストリン⁵⁾、ヒアルロン酸⁶⁾などでも物理架橋ナノゲルが形成した。多糖の他に、ポリアミノ酸⁷⁾などを用いることもできる。高分子鎖や疎水基の構造やその置換度が自己集合のナノ構造に大きな影響を与えることが明らかになっている。酵素的に合成したグリコゲンにコレステロール基を導入した新規な両親媒性多糖ナノボールも報告している⁸⁾。

また、疎水化多糖ナノゲルと細胞との相互作用を制御する目的で、カチオン性、アニオン性さらに RGD などの細胞認識性ペプチド⁹⁾を導入したさまざまな機能性多糖を設計した。この自己組織化ナノゲル法は、世界的にも広く受け入れられ、種々の多糖への適用や合成高分子系へと展開され、特に DDS ナノキャリアとしての有用性が実証されている。また、本手法は、自己組織化会合因子を高分子鎖に部分的にグラフト化することで高分子の会合を動的に制御し、新規物理架橋ナノゲルを調製する手法として一般化しえる。会合因子としては、疎水の会合力以外にも種々の分子間力を利用した新規ナノゲルの設計が可能であり、幅広い応用が可能となってきた(図 2)¹⁰⁾。

近年、DDS や再生医療への応用を目的とした刺激応答性材料の開発が活発に行われている。刺激応答ナノゲルも刺激への応答が早いことから多くの関心を集めている。物理架橋ナノゲルでは、架橋を引き起こす非共有結合的な相互作用が外部刺激によって容易に変化することから、熱、光、pH、酸化還元、酸分解性などの刺激応答性ナノゲルの調製が可能である。また、多糖ナノゲルをテンプレートとして用いたリン酸カルシウムナノゲルハイブリッドナノ微粒子の調製¹¹⁾や量子ドットとの有機-無機ハイブリッドによるバイオイメージング¹²⁾などを展開しているが、詳細は他の総説を参照していただきたい⁹⁾。

ナノゲルの分子シャペロン機能とタンパク質 DDS

タンパク質 DDS 開発において解決すべき重要な課題は、不安定なタンパク質の失活・凝集抑制と徐放制御である。タンパク質は比較的疎水性の

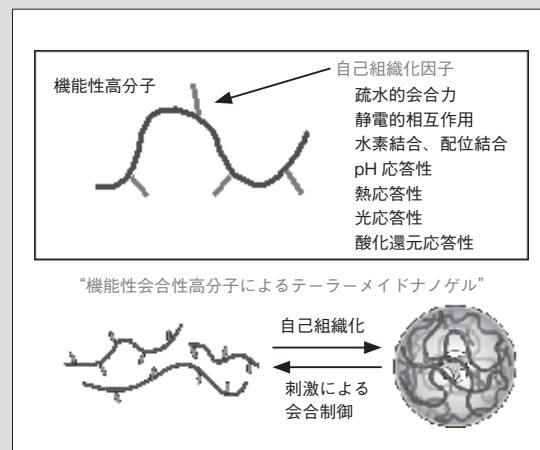


図2 会合性高分子によるスマートナノゲルの設計

高いポリペプチドのフォールディングにより形成されているために、種々のストレスにより変性して、それまで隠れていた疎水面が露出して凝集してしまうという性質を本来有している。生体系においてもタンパク質の凝集は重大な問題であり、この解決のためにタンパク質の凝集を防ぎ、その生理機能を制御する分子シャペロンタンパク質群を進化の過程で獲得している。その基本的な戦略は、露出した疎水面を分子シャペロンの疎水面により一時的に覆うことで保護し、ATP などの刺激により分子シャペロンを外してタンパク質を再生するというものである。また、凝集しやすい変性タンパク質を、疎水性相互作用を利用してナノ空間に取り込む高分子のホスト・ゲスト系ともいえる分子シャペロンも存在する¹³⁾。

我々は、疎水化多糖ナノゲルが分子シャペロンと同様な機能を発現しえることを見だし^{14,15)}、タンパク質 DDS の開発に重要な概念であることを提唱している。熱変性タンパク質やタンパク質の巻き戻り中間体を効率的に封入でき、凝集を抑制した。ナノゲルにトラップされたタンパク質は凝集することなく、水溶液状態で安定に存在しえた(図 3)。つまり、ナノエンカプシュレーションにより、タンパク質を保存安定化させる新規な手法である¹⁶⁾。ナノゲルからタンパク質を放出する方法としては、*in vitro* ではシクロデキストリンを添加することによって物理架橋されたナノゲル構造を壊すとタンパク質が放出され、その活性を回

復する。pH、熱、光などの外部刺激により架橋点を変化させることで、タンパク質の放出制御も可能である¹³⁾。また、過剰な他のタンパク質の存在下では、交換反応により最初に取り込まれたタンパク質が放出されることもわかった。細胞内へ取り込まれた後には、タンパク質濃度の増加にともなう交換反応の促進と多糖の酵素分解によってタンパク質は放出しえるものと考えられる。

自己組織化ナノゲルの持つこれらの機能は、まさに熱ショックタンパク質などが実際に細胞内で行っている分子シャペロンの機能と同等であり、疎水化多糖ナノゲルは世界初の分子シャペロンインスパイアード材料として、後述するようにタンパク質デリバリーの新規ナノキャリアとして有益であることが明らかになってきた。

ナノゲルボトムアップ法による 新規ゲル材料の開発

一般にハイドロゲルは、DDSの徐放性材料や再生医療用足場材料として広く用いられている。しかし、ナノレベルで構造制御されたハイドロゲ

ルの設計は、現在においても重要な課題である。我々はナノゲルを集積することにより、階層性と機能性を有するゲルや界面を構築するナノゲルテクトニクス工学を提唱している。個々の要素(ナノゲルテクトン)を階層的に集積することで、ナノ構造を制御したゲル材料や機能性ナノ/マイクロソフトゲル界面を構築するための新しい戦略である。

最初に我々は、ナノゲル濃度が比較的高い条件下(30mg/mL)でナノゲルが集積し、マクロなハイドロゲルを形成することを見いだした¹⁷⁾。さらにナノゲルの特性を生かしたハイドロゲル設計を目的とし、反応性ナノゲルをビルディングブロックとしたナノ構造制御されたマクロゲルの開発を行った。この目的のために、メタクリロイル基を有する疎水化多糖を合成し、重合可能なナノゲルを得た。このメタクリロイル基修飾 CHP ナノゲルと他のさまざまな水溶性モノマーを重合することにより、ゲル中に固定化された人工分子シャペロン機能¹⁸⁾や熱に対する早い応答性¹⁹⁾を有する新規なナノゲル架橋ゲル(nanogel cross-linked gel, NanoClik gel)の開発に成功した(図4)。

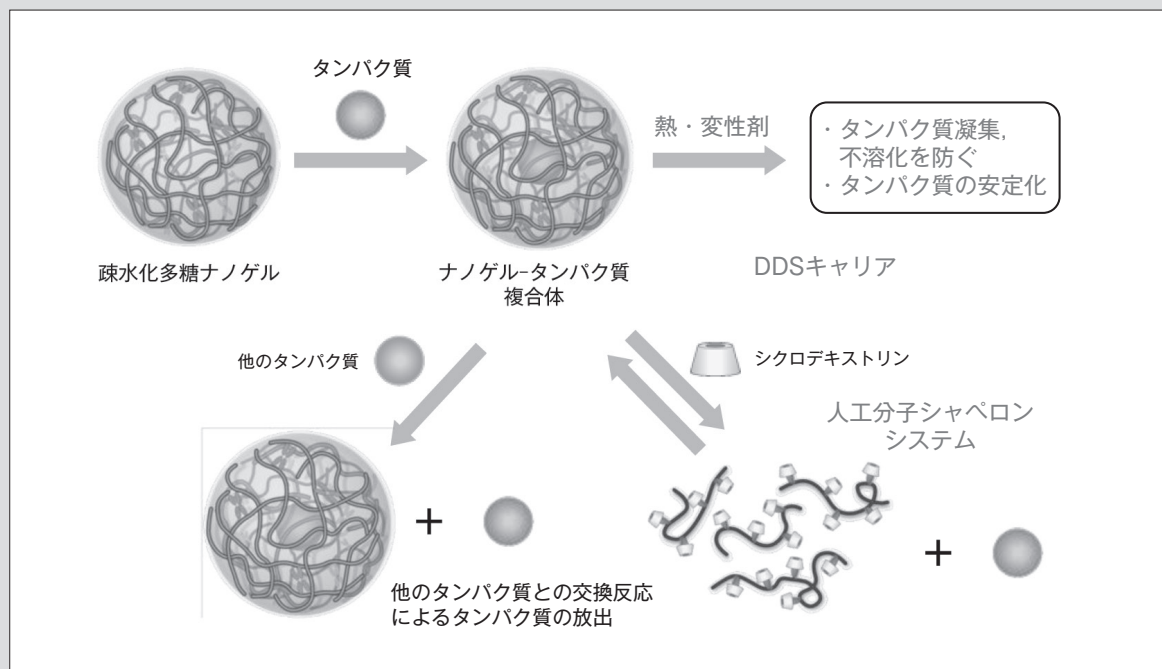


図3 疎水化多糖ナノゲルのタンパク質取り込みと放出

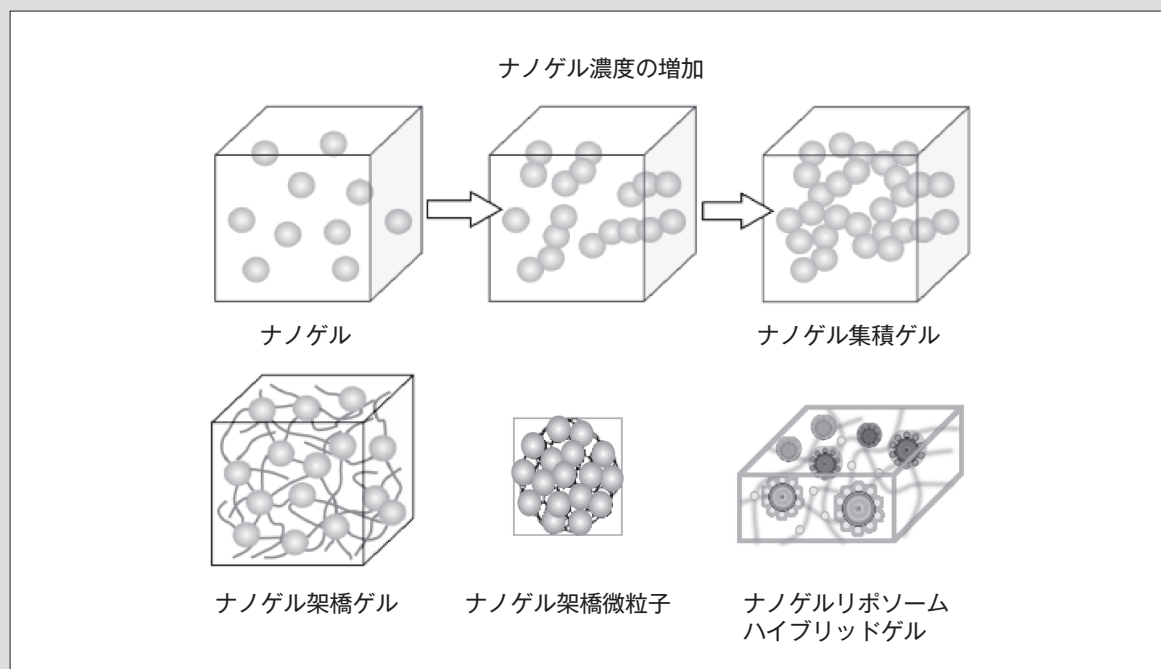


図4 ナノゲル基盤材料の種類

ハイドロゲルは、薬品の徐放が可能な人工細胞外マトリックスとして再生医療で用いられてきた。組織を十分に再生するためには、複数のサイトカインとホルモンの放出を正確に制御しなければならない。従って再生医療への応用では、薬剤を安定に比較的長期間にわたって徐放するマトリックスの開発が重要である。しかし、多くの場合、薬剤を短期間にバースト的に放出してしまう。これはゲル中の架橋点の制御が難しく、ナノスケールでの不均質構造が生じているためである。別の問題として、ゲル中においてタンパク質が変成し、不可逆に凝集して機能を失うことも挙げられる。

分子シャペロン機能を有するナノゲルを基盤とするゲル材料は上記の問題を解決しえるものである。例えば、アクリロイル基で修飾した CHP と末端にチオール基をもつ 4 本鎖のポリエチレングリコールでつくられる生分解性のハイブリッド NanoClik ゲルが得られる。このゲルは、ナノゲルと PEG 鎖をつなぐエステル結合が加水分解を受けることで、タンパク質等の薬剤を取り込んだナノゲルが放出されるという、従来にない特徴を

有している²⁰⁾。また、アクリロイル基修飾 CHP ナノゲルを比較的低い濃度において PEGSH で架橋するとナノゲル(約 30nm)が集積し、ラズベリー状の NanoClik ナノ粒子(100~150nm)が形成した²¹⁾。通常の物理架橋ナノゲルである CHP ナノゲルは、過剰のタンパク質が存在する血中では安定にタンパク質を保持できないが、PEG 鎖で架橋、被覆された NanoClik ナノ粒子は、血中での安定性が増加するために、DDS における使用用途がさらに広まった。また、リポソームと共存下でアクリロイル基修飾 CHP ナノゲルと PEGSH を架橋反応させるとリポソームをナノゲルが被覆し、その間が PEG で架橋されたハイブリッドゲルを得ることができた²²⁾。このハイブリッドゲルは、リポソームとナノゲルという 2 種類のキャリアからの段階的な徐放という、新たな機能を有するゲル材料として期待される。

ナノゲル基盤材料の DDS 応用

これまで述べてきたナノゲル材料をタンパク質や核酸の DDS および再生医療用 DDS として幅

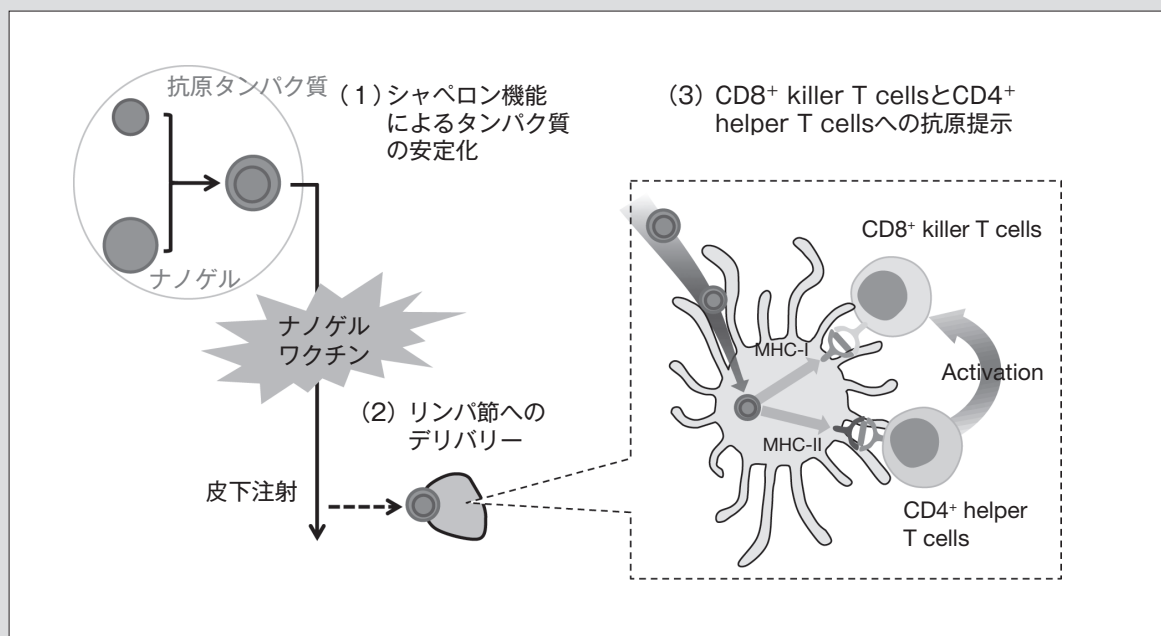


図5 リンパ節指向型ナノゲルがんワクチンの概念図

広く応用展開してきた。以下、その具体的な応用例を紹介する。

がん免疫ワクチン

抗原タンパク質や抗原ペプチドを用いた免疫療法は、がんの有効かつ安全な治療法として期待されている。その際、外来性の抗原を効率よく免疫局所の所属リンパ節に存在する抗原提示細胞に輸送し、さらに細胞内取り込みの後、MHCクラスIやクラスII経路への送達を制御することが課題である。珠玖教授(三重大学)は、多価ワクチンとしての抗原タンパク質の優位性に着目した研究を展開していた。しかし、抗原タンパク質は、一般に疎水性が高く、難水溶性で極めて凝集しやすいために製剤化においても問題があった。これらの課題をCHPナノゲルが解決し、優れた治療用のがん免疫ワクチンとして有用であることを実証してきた。CHPナノゲルは、抗原タンパク質をその分子シャペロン作用により安定に取り込み、注射製剤としての投与を可能にした。これまでにHER2、NY-ESO-1、MAGE-A4などの抗原タンパク質について検討してきた。CHPナノゲルとの複合体として投与された抗原タンパク質は、リ

ンパ管を経由して所属リンパ節内の抗原提示細胞に選択的かつ高効率に送達されることが明らかとなった。さらに、抗原特異的な細胞障害性T細胞およびヘルパーT細胞の両者を効率よく活性化させることを見いだした^{23,24)}。CHPナノゲルは、抗原特異的リンパ球の強い活性化を誘導し、がんタンパク質ワクチンの効果を高める機能を有することが明らかとなった(図5)。

日本油脂(株)によりCHPが製造され、臨床試験においてもその有効性が実証され^{25,26)}、現在、難治性食道がんに対するCHP-NY-ESO-1がんワクチンおよびMAGE-A4抗原陽性難治性悪性腫瘍、進行期非小細胞肺癌に対するCHP-MAGE-A4がんワクチンの臨床試験が日本と米国で行われている。

経鼻粘膜ワクチン

粘膜ワクチンは全身系免疫システムに免疫応答を誘導すると同時に、粘膜免疫システムにも免疫応答を誘導し、粘膜を介して感染・発症するような病原体に対する防御に非常に有用である。近年、パッチやナノキャリア等の抗原デリバリー担

体の開発により、経皮、経鼻、経口などの新たな投与経路を用いたワクチンの研究が進められている。粘膜組織は、元来、外来異物を分解・排除するための機能が発達しているため、抗原を単独投与しても効果的に抗原特異的な免疫応答が得られない場合が多い。そのため粘膜関連リンパ組織(MALT)へ効率的に抗原をデリバリーする技術が必要である。

清野教授、幸助教(東京大学)らは、粘膜アジュバントとしてコレラ毒素を用いた経鼻投与ワクチンを検討していたが、嗅覚細胞を介して中枢神経系への移行にともなう副作用の危険性をともなうことから、ヒトでの応用は難しくアジュバントを必要としない経鼻ワクチン開発を模索していた。一方、我々は、エチレンジアミン基を導入したカチオン性 CHP ナノゲルを用いることにより細胞内に効率的にタンパク質を輸送可能なことを報告していた²⁷⁾。そこで、このカチオン性 CHP ナノゲル(cCHP)を用いた経鼻ワクチンの共同研究を開始した。ボツリヌス毒素の抗原部位をコードした Hc タンパク質と cCHP を複合化し経鼻投与することにより、IgG および IgA 抗体の産生量が有意に上昇することを見だし、アジュバント非存在下において粘膜免疫を誘導できることを見だした²⁸⁾。ナノゲルを用いることで、抗原を鼻粘膜に長時間滞留させ、継続的に鼻上皮細胞層を通過させることが可能となった。また、さらに上皮層を通過した抗原は、鼻粘膜組織に存在する樹状細胞に効果的に取り込まれた。さらに脳への移行は観察されず、鼻粘膜上に抗原タンパク質を留めて効率的に免疫細胞へ取り込ませるアジュバントフリーのワクチンであることが明らかとなった。

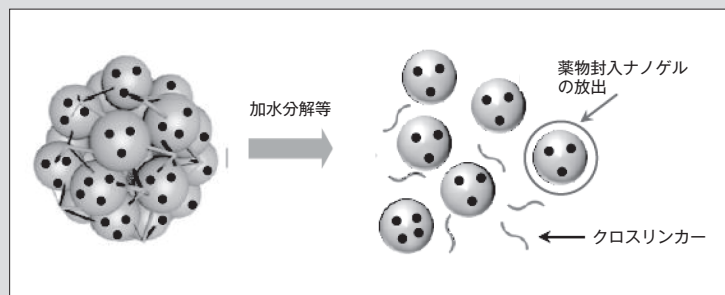


図6 NanoClik 微粒子によるナノゲル徐放

肺炎球菌に対するワクチンとしても有効であることも最近明らかになった²⁹⁾。

生理活性タンパク質、サイトカイン DDS

近年、さまざまな生理活性タンパク質やサイトカインが治療に用いられている。一方で、生体内における短い半減期や大量投与にともなう重篤な副作用などが、有効な治療効果を得るための障壁となっている。我々は、ナノゲルの生理活性タンパク質やサイトカインにおける徐放 DDS としての可能性について検討した。例えば、CHP ナノゲルはインスリンを効率よく取り込み、安定化し、その保存安定性を向上させることがわかった³⁰⁾。また、カチオン性ナノゲルはインスリンの経口デリバリーにおいて有用である可能性を示唆する結果も得られている(山本教授(京都薬科大)との共同研究)。

感染防御や抗腫瘍、免疫不全の改善などの治療薬として期待されている IL-12 の皮下投与製剤としての有用性について検討した(松田教授(京都府立医大)との共同研究)。IL-12 と CHP ナノゲルは混合するだけで容易に安定な複合体が得られた。CSA1M 線維肉腫担持マウスに CHP/IL-12 複合体を投与し、抗腫瘍効果を確認したところ、少ない投与回数(7 日間隔で 3 回投与)で腫瘍増殖の抑制効果とマウスの生存期間の延長が認められた。IL-12 を CHP ナノゲルと複合化することで血中安定性が向上するとともに、生理活性な IL-12 の長期徐放により、薬物の有効血中濃度が比較的長期間維持されることが明らかとなった³¹⁾。

さらなる長期徐放を目指し、先に述べたアクリロイル基置換 CHP ナノゲルと末端をチオール化したポリエチレングリコール(PEGSH)で架橋した NanoClik ナノ粒子系を用いた²¹⁾。このナノ粒子は、エステル結合の加水分解によりナノゲルが徐々に放出され、その後、ナノゲルからタンパク質が放出される 2 段階薬物放出機構を有しており、サイトカインなどのタンパク質を長期に徐放しえるイン

ジェクタブルキャリアとしての有用性が明らかになった(図6)。今後、さまざまなタンパク質の徐放システムとして利用が期待される。

また、本稿では詳細は割愛するが、最近注目されている核酸医薬においてもナノゲルの有用性が明らかになってきた。CpGDNA や siRNA のデリバリーとがん治療や生体内に存在するリン脂質分解酵素(ホスホリパーゼ)の機能に着目し、酵素反応による脂質膜の破壊を利用した pDNA のエンドソーム脱出促進制御を行う新しいシステムを開発している^{32,33)}。

ナノゲル基盤材料による再生医療応用

NanoClik ゲルを用いた骨再生

骨形成タンパク質である bone morphogenetic protein(BMP) や 骨 量 増 加 作 用 の あ る Prostaglandin E(PGE)は歯科材料や骨欠損部における治療を促す物質として注目されている。しかし、半減期が短いため不安定であることや、大量生産にはコストがかかることから、これらを安定に生体内で機能させる材料が必要となる。米国では BMP-2 はすでに臨床応用されているが、投与量はいまだ大量に必要であることなどの問題が残っている。そこで、これらのタンパク質をナノゲルに封入し、その後 PEG 誘導体と反応させて得られるナノゲル架橋ゲルをマウスの頭蓋骨欠損モデルへ埋め込み、4週間後にマイクロCTで骨形態を評価したところ、効果的な骨形成が観察された。PGE については、単独投与を20回行った場合よりも副作用なく顕著な骨形成が見られ³⁴⁾、BMP-2 単独投与では、今回用いた5倍量を1日おきに10日投与で同程度の効果が得られた³⁵⁾。また、最近では PGE-2 のレセプターの1つである EP4 のアゴニスト(EP4A)と BMP-2 を組み合わせることで、低用量の BMP-2 でも骨形成を促すことが確認された(野田教授(東京医科歯科大学)との共同研究)³⁶⁾。FGF-18 と BMP-2 を共デリバリーすることにより、低容量の BMP-2 でもよく発達した骨形成が促進されることも明らかになった(井関教授(東京医科歯科大学)との共同研究)³⁷⁾。また、低カルシウム食飼育によって

引き起こされる骨吸収を抑制できる腫瘍壊死因子(TNF- α)の拮抗薬として設計された WP9QY ペプチド(W9 ペプチド)の徐放による骨再生治療にも有用であった(青木洵教授(東京医科歯科大学)との共同研究)³⁸⁾。ナノゲル架橋ゲルは種々の再生医療用足場材料としての応用が期待される。

NanoClik ゲル膜による骨再生誘導(GBR)

骨再生誘導法(guided bone regeneration, GBR)は、骨欠損部をバリアー膜で覆い、骨再生のスペースを確保するとともに骨再生を促す治療法である。この方法を用いることで、インプラントを行う際に骨が不足している人でも骨の量を増加させることができ、治療が可能になる。現在、最も広く用いられている GBR 膜はコラーゲン由来であり、感染症のリスクをとめない、適応症が限られているという問題点がある。そこで、CHP ナノゲルを PEGSH によって架橋したマクロゲルの GBR 膜としての応用を試みたところ、新生骨量、成熟度ともに従来型のコラーゲン由来膜と同等かそれ以上の治療効果が見られた(春日井教授(東京医科歯科大)との共同研究)³⁹⁾。これは前述のようにナノゲルがタンパク質と容易に相互作用できることから、血中のサイトカインをトラップし、徐放することで骨形成が促進されたためだと考えられる。この成果によってナノゲル架橋ゲルは、新しい GBR 膜のための材料として有用であることが明らかとなった。

謝辞

DDS 研究をはじめの契機となったのは、当時の長崎大学砂本順三教授の研究室に赴任した1987年からでした。その年に長崎で第1回高分子医薬と高分子性薬物運搬体—その開発と実用化—に関する国際会議が砂本先生主催により開催されました。この DDS の黎明期に、ご活躍の錚々たる先生方との出会いと活気あふれる講演の数々に受けた強烈な印象は今でも忘れられません。その後、京都大学に移ってからの10数年にわたりご指導いただいた故砂本順三先生に深く感謝申し上げます。また、がん免疫研究の基礎からご指導賜り、ナノゲルの DDS の実用化への道筋を示していただいている三重大学珠玖洋教授に心よ

り感謝申し上げます。

東京医科歯科大学に移ってからは、多くの優れた共同研究者に恵まれ、骨再生、生理活性タンパク質、ペプチド、核酸デリバリー、経鼻ワクチン、分子シャペロン機能等におけるナノゲル材料の有用性を発展させることができました。本文で名前を挙げさせていただいた先生方をはじめ、その他にも数多くの共同研究者の皆様に深く感謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、研究室のスタッフとして尽力いただいた岩崎泰彦博士(現関西大学教授)、森本展行博士(現東北大学准教授)、野村慎一郎博士(現東北大学准教授)、佐々木善浩博士(現京都大学准教授)、澤田晋一博士(現京都大学助教)、向井貞篤博士(現京

都大学特定准教授)、菅原(鳴滝)彩絵博士(現名古屋大学准教授)、JST ERATO バイオナノトランスポートプロジェクトに参画していただいている皆様、そして京都大学および東京医科歯科大学の大学院学生、学部学生の真摯な努力に感謝いたします。

最後になりましたが、公益財団法人永井記念薬学国際交流財団ならびに助手時代からご薫陶をいただいております永井恒司先生へ深く感謝申し上げます。また、日本 DDS 学会理事長今井浩三先生、歴代理事長の岡野光夫先生、橋田充先生、前 CRS 会長片岡一則先生、第 30 回日本 DDS 学会大会長水島徹先生、および関係の諸先生方に厚くお礼申し上げます。

文献

- 1) Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Nanogel engineering for new nanobiomaterials: From chaperoning engineering to biomedical applications, *The Chemical Record*, 10, 366-376 (2010)
- 2) K. Akiyoshi, S. Deguchi, N. Moriguchi, S. Yamaguchi, J. Sunamoto, Self-Aggregates of Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles, *Macromolecules*, 26, 3062-3068 (1993).
- 3) K. Akiyoshi, S. Deguchi, H. Tajima, T. Nishikawa, J. Sunamoto, Microscopic Structure and Thermoresponsiveness of a Hydrogel Nanoparticle by Self-Assembly of a Hydrophobized Polysaccharide, *Macromolecules*, 30, 857-861 (1997)
- 4) E. Akiyama, N. Morimoto, P. Kujawa, F. M. Winnik, K. Akiyoshi, Self-assembled Nanogels of Cholesteryl-modified Polysaccharides: Effect of the Polysaccharide Structure on Their Association Characteristics in the Dilute and Semi-dilute Regimes, *Biomacromolecules*, 8, 2366-2373 (2007).
- 5) Y. Ozawa, S. Sawada, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Self-assembled nanogel of hydrophobized dendritic dextrin for protein delivery, *Macromol. Biosci.*, 9, 694-701 (2009).
- 6) T. Nakai, T. Hirakura, Y. Sakurai, T. Shimoboji, M. Ishigai, K. Akiyoshi, Injectable Hydrogel for Sustained Protein Release by Salt-Induced Association of Hyaluronic Acid Nanogel, *Macromol. Bioscience*, 12, 475-483 (2012)
- 7) N. Morimoto, M. Yamazaki, J. Tamada, K. Akiyoshi, Polysaccharide-hair cationic polypeptide nanogels: Self-assembly and enzymatic polymerization of amylose primer modified cholesteryl poly(L-lysine), *Langmuir*, 29, 7509-7514 (2013)
- 8) H. Takahashi, S. Sawada, K. Akiyoshi, Amphiphilic polysaccharide nanoballs: a new building block for nanogel biomedical engineering and artificial chaperone, *ACS Nano*, 5, no.1, 337-345 (2011).
- 9) A. Shimoda, S. Sawada, K. Akiyoshi, Cell specific peptide-conjugated polysaccharide nanogels for protein delivery, *Macromol. Bioscience*, 11, 882-888 (2011)
- 10) Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Self-assembled Nanogel Engineering for Advanced Biomedical Technology, *Chem. Lett. Highlight review*, 41, 202-208 (2012)
- 11) A. Sugawara, S. Yamane, K. Akiyoshi, Nanogel-Templated Mineralization: Polymer- Calcium Phosphate Hybrid Nanomaterials, *Macromol. Rapid Commun.*, 27, 441-446 (2006).
- 12) U. Hasegawa, M.S.Nomura, C.S. Kaul, T. Hirano, K. Akiyoshi, Nanogel-quantum dot hybrid nanoparticles for live cell imaging, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 331, 917-921 (2005).
- 13) Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Development of an Artificial Chaperone System Based on Cyclodextrin, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 300-305 (2010).
- 14) K. Akiyoshi, Y. Sasaki, J. Sunamoto, Molecular Chaperone-like Activity of Hydrogel Nanoparticles of Hydrophobized Polysaccharide : Thermal Stabilization with Refolding of Cationic Anhydride B, *Bioconjugate Chem.*, 10, 321-324 (1999)
- 15) Y. Nomura, M. Ikeda, N. Yamaguchi, Y. Aoyama, K. Akiyoshi, Protein refolding assisted by self-assembled nanogels as novel artificial molecular chaperone, *FEBS Lett.*, 553, 271-276 (2003).
- 16) T. Nishikawa, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, Macromolecular Complexation between Bovine Serum Albumin and Self-assembled Hydrogel Nanoparticle of Hydrophobized Polysaccharides, *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 6110-6115 (1996)
- 17) K. Kuroda, K. Fujimoto, J. Sunamoto, K. Akiyoshi, Hierarchical self-assembly of hydrophobically modified pullulan in water: gelation by networks of nanoparticles, *Langmuir*, 18, 3780-3786 (2002).
- 18) N. Morimoto, T. Endo, Y. Iwasaki, K. Akiyoshi, Design of Hybrid Hydrogels with Self-Assembled Nanogels as Cross-Linkers: Interaction with Proteins and Chaperone-Like Activity, *Biomacromolecules*, 6, 1829-1834 (2005).
- 19) N. Morimoto, T. Ohki, K. Kurita, K. Akiyoshi,

- Thermo-responsive hydrogels with nanodomains: rapid shrinking of nanogel-crosslinking hydrogel of poly (N-isopropyl acrylamide), *Macromol. Rapid Commun.*, 29, 672–676 (2008).
- 20) A. Shimoda, Y. Yamamoto, S. Sawada, K. Akiyoshi, Biodegradable Nanogel-integrated Hydrogels for Sustained Protein Delivery, *Macromol. Research*, 20, 266–270 (2012)
 - 21) U. Hasegawa, S. Sawada, T. Shimizu, T. Kishida, E. Otsuji, O. Mazda, K. Akiyoshi, Raspberry-Like Assembly of Cross-Linked Nanogels for Protein Delivery, *J. Controlled Release*, 140, 312–317 (2009).
 - 22) Y. Sekine, Y. Moritani, T. Ikeda-Fukazawa, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, Hybrid hydrogel biomaterial by nanogel engineering: bottom-up design with nanogel and liposome building blocks to develop a multi-drug delivery system, *Advance Healthcare Materials*, 1(6), 722–728 (2012)
 - 23) X-G. Gu, M. Schmitt, A. Hiasa, Y. Nagata, H. Ikeda, Y. Sasaki, K. Akiyoshi, J. Sunamoto, H. Nakamura, K. Kuribayashi, H. Shiku, A Novel Hydrophobized Polysaccharide/Oncoprotein Complex Vaccine Induces in Vitro and in Vivo Cellular and Humoral Immune Responses against HER2 Expressing Murine Sarcoma, *Cancer Res.*, 58, 3385–3390 (1998).
 - 24) Y. Ikuta, N. Katayama, L. Wang, T. Okugawa, Y. Takahashi, M. Schmitt, X. Gu, M. Watanabe, K. Akiyoshi, H. Nakamura, K. Kuribayashi, J. Sunamoto, H. Shiku, Presentation of a major histocompatibility complex class I-binding peptide by monocyte-derived dendritic cells incorporating hydrophobized polysaccharide-truncated HER2 protein complex: implications for a polyvalent immuno-cell therapy, *Blood*, 99(10), 3717–3124 (2002).
 - 25) S. Kageyama, S. Kitano, M. Hirayama, Y. Nagata, H. Imai, T. Shiraishi, K. Akiyoshi, A. Scott, R. Murphy, E. Hoffman, L. Old, N. Katayama, H. Shiku, Humoral immune responses in patients vaccinated with 1-146 HER2 protein complexed with cholesteryl pullulan nanogel (CHP-HER2), *Cancer Sci.*, 99, 601–607 (2008)
 - 26) A. Uenaka, H. Wada, M. Isobe, T. Saika, K. Tsuji, E. Sato, S. Sato, Y. Noguchi, R. Kawabata, T. Yasuda, Y. Doki, H. Kumon, K. Iwatsuki, H. Shiku, M. Monden, A.A. Jungbluth, G. Ritter, R. Murphy, E. Hoffman, L.J. Old, E. Nakayama, T cell immunomonitoring and tumor responses in patients immunized with a complex of cholesterolbearing hydrophobized pullulan (CHP) and NY-ESO-1 protein, *Cancer Immunity*, 7, 9 (2007)
 - 27) H. Ayame, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Self-assembled cationic nanogels for intracellular protein delivery system, *Bioconjugate Chem.*, 19, 882–890 (2008).
 - 28) T. Nochi, Y. Yuki, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, T. Kohda, N. Harada, G. Kong, A. Sato, N. Kataoka, D. Tokuhara, S. Kurokawa, Y. Takahashi, H. Tsukada, S. Kozaki, K. Akiyoshi, H. Kiyono, Nanogel antigenic protein delivery system for adjuvant-free intranasal vaccines, *Nature Materials*, 9, 572–578 (2010).
 - 29) I. Kong, A. Sato, Y. Yuki, T. Nochi, H. Takahashi, S. Sawada, M. Mejima, S. Kurokawa, K. Okada, S. Sato, D. E. Briles, J. Kunisawa, Y. Inoue, K. Akiyoshi, H. Kiyono, Nanogel-Based PspA Intranasal Vaccine Prevents Invasive Disease and Nasal Colonization by *Streptococcus pneumoniae*, *Infect. Immun.* 81(5), 1625–1634 (2013).
 - 30) K. Akiyoshi, S. Kobayashi, S. Shichibe, D. Mix, M. Baudys, S. W. Kim, J. Sunamoto, Self-assembled Hydrogel Nanoparticle of Cholesterol-Bearing Pullulan as a Carrier of Protein Drugs: Complexation and Stabilization of Insulin, *J. Controlled Release*, 54, 313–320 (1998).
 - 31) T. Shimizu, T. Kishida, U. Hasegawa, Y. Ueda, J. Imanishi, H. Yamagishi, K. Akiyoshi, E. Otsuji, O. Mazda, Nanogel DDS enables sustained release of a cytokine for tumor immunotherapy, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 367, 330–335 (2008)
 - 32) S. Toita, Y. Soma, N. Morimoto, K. Akiyoshi, Cycloamylose-based Biomaterial: Nanogels of Cholesterol-bearing Cationic Cycloamylose for siRNA Delivery, *Chem. Lett.*, 38, 1114–1115 (2009).
 - 33) S. Toita, S. Sawada, K. Akiyoshi, Polysaccharide nanogel gene delivery system with endosome-escaping function: Co-delivery of plasmid DNA and phospholipase A2, *J. Controlled Release*, 155, 54–59 (2011)
 - 34) N. Kato, U. Hasegawa, N. Morimoto, Y. Saita, K. Nakashima, Y. Ezura, H. Kurosawa, K. Akiyoshi, M. Noda, Nanogel-based Delivery System Enhances PGE2 Effects on Bone Formation, *J. Cell. Biochem.*, 101, 1063–1070 (2007)
 - 35) C. Hayashi, U. Hasegawa, Y. Saita, H. Hemmi, T. Hayata, K. Nakashima, Y. Ezura, T. Amagasa, K. Akiyoshi, M. Noda, Osteoblastic bone formation is induced by using nanogel-crosslinking hydrogel as novel scaffold for bone growth factor, *J. Cell. Phys.*, 220(1), 1–7 (2009)
 - 36) P. Kamolratanakul, T. Hayata, Y. Ezura, A. Kawamata, C. Hayashi, Y. Yamamoto, H. Hemmi, M. Nagao, R. Hanyu, T. Notomi, T. Nakamoto, T. Amagasa, K. Akiyoshi, M. Noda, Nanogel-Based Scaffold Delivery of Prostaglandin E2 Receptor-Specific Agonist in Combination With a Low Dose of Growth Factor Heals Critical-Size Bone Defects in Mice, *Arthritis and Rheumatism*, 63(4), 1021–1033 (2011)
 - 37) M. Fujioka-Kobayashi, M. S. Ota, A. Shimoda, K. Nakahama, K. Akiyoshi, Y. Miyamoto, S. Iseki, Cholesteryl group- and acryloyl group-bearing pullulan nanogel to deliver BMP2 and FGF18 for bone tissue engineering, *Biomaterials*, 33, 7613–7620 (2012)
 - 38) N. Alles, N. S. Soysa, A. H. Mian, N. Tomomatsu, H. Saito, R. Baron, N. Morimoto, K. Aoki, K. Akiyoshi, K. Ohya, Polysaccharide nanogel delivery of a TNF- α and RANKL antagonist peptide allows systemic prevention of bone loss, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37(2), 83–88 (2009).
 - 39) T. Miyahara, M. Nyan, A. Shimoda, Y. Yamamoto, S. Kuroda, M. Shiota, K. Akiyoshi, S. Kasugai, Exploitation of a novel polysaccharide nanogel cross-linking membrane for guided bone regeneration (GBR), *J. Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6, 666–672 (2012)