

20020755

厚生労働科学研究費補助金

萌芽的先端医療技術推進研究事業

半導体などナノ粒子による DDS

(H14-ナノ-004)

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成15（2003）年3月

目次

I. 総括報告

半導体などナノ粒子による DDS

主任研究者

山本 健二(国立国際医療センター研究所・部長) 1

II. 分担研究者報告

1. 半導体ナノ粒子による DDS 研究班

1) 半導体などナノ粒子による DDS 9

山本 健二(国立国際医療センター研究所・部長)

2) ヒト血液細胞に対するアンチセンステクノロジーを応用した DDS の開発に向けて
湯尾 明(国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部・部長) 17

3) ナノ粒子の感染症研究への応用について
切替 照雄(国立国際医療センター研究所・感染熱帯病研究部・部長) 21

4) マラリアに関する DDS
狩野 繁之(国立国際医療センター研究所・適性技術開発移転・部長) 27

5) ペプチドを用いた細胞標的診断法及び治療法の開発
石坂 幸人(国立国際医療センター研究所・難治疾患・部長) 29

6) 腎疾患治療に向けた DDS
名取 泰博(国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長) 31

7) 角化細胞の分化・誘導と付属器の誘導の評価
大河内仁志(国立国際医療センター研究所・細胞組織再生医学研究部・部長) . . . 37

8) 中空ナノ粒子によるピンポイント DDS
尾又 一実(国立国際医療センター研究所・医療社会学研究室・室長) 41

9) 腎・血管に関する DDS
鈴木 和男(国立感染症研究所・生物活性物質部・室長) 47

10) 半導体ナノ粒子の安全性の検討
太田 敏博(東京薬科大学・環境生物部・助教授) 53

2. ナノミセルによる DDS

1) 遺伝子ベクターとして的高分子ナノ粒子
斯波真理子(国立循環器センター研究所・バイオサイエンス部・部長) 59

2) 半導体などナノ粒子による DDS
片岡 一則(東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授) 63

2. 研究協力者

古谷 昌弘(セキスイ化学・水無瀬研究所・主任研究者)

佐々木 有(国立八戸高等専門学校・教諭)

Ⅲ.	研究班会議, 研究成果の刊行に関する業績一覧	71
Ⅳ.	研究成果の刊行物・別刷	83

半導体などナノ粒子による DDS

主任研究者

山本健二 国立国際医療センター研究所・部長

分担研究者

1. 半導体ナノ粒子による DDS 研究班

湯尾明（国立国際医療センター研究所・血液疾患研究部・部長）

切替照雄（国立国際医療センター研究所・感染熱帯病研究部・部長）

狩野繁之（国立国際医療センター研究所・適正技術開発移転・部長）

石坂幸人（国立国際医療センター研究所・難治疾患・部長）

名取泰博（国立国際医療センター研究所・臨床薬理研究部・部長）

大河内仁志（国立国際医療センター研究所・細胞組織再生医学研究部・部長）

尾又一実（国立国際医療センター研究所・医療社会学研究室・室長）

鈴木和男（国立感染症研究所・生体防御研究室・室長）

太田敏夫（東京薬科大学・環境生物学部・助教授）

2. ナノミセルによる DDS

斯波真理子（国立循環器病センター研究所・バイオサイエンス部・室長）

片岡一則（東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授）

3. 研究協力者

古谷昌弘（セキスイ化学・水無瀬研究所・主任研究者）

佐々木有（国立八戸高等専門学校・教諭）

研究概要

合衆国においては、1960年代より原子力、航空宇宙、情報工学の3分野を国家プロジェクトとして全産業より優先して開発し、大きな成果を挙げた。近年クリントン合衆国大統領は、上記3分野に加えバイオテクノロジー、ナノテクノロジーの2つの分野を新たにこれら5分野を国民生活より優先して行うことを表明し、現在の政権に於いても引き続き精力的に国家プロジェクトとして研究開発されている。2001年7月NASのメンバーがワシントンに集まり（1）Proximal Probes（2）Optical Techniques（3）Quantum Dots & Clusters（4）Nanowires, Molecular Wires, & Devices（5）Nanostructure Synthesis and Self-Assemblyの5部門をナノテクノロジー研究開発を組織しこれを推進した。一方我が国においては、2001年3月nedo主催のにおいてバイオ・医療分科会まとめられた『ナノテクノロジーの現状とその動向』の概

論においてナノテクノロジーは、(1) 材料・化学、(2) IT・エレクトロニクス、(3) バイオ・医療、(4) 計測・加工の4分野に分けられた。

ナノテクノロジーは、従来のエンジニアリングとは、かなり異なる。10 μ m以上の粒子については、重力が主要な力であり、ナビエストークスの方程式でその運動が記述できる。反対に粒子サイズが10nm以下なら、分子動力学で記述でき、分子量が小さければ比較的正確に計算できうる。ところが10nm以上10 μ m以下の粒子について分子動力学では、あまりに巨大であり、分子数も超多数である。また、ナビエストークスの方程式では、粒子サイズが小さすぎ近似ができず、これで記述する事ができない。この空間には、表面張力や、静電気力をはじめ、分子間力、重力などが存在し、有効に記述できる力学方程式がいまだ示されていない。

本研究の目的は、ナノ粒子を合成、表面加工、表面修飾を行ない生物・医療に有効な応用を行ない薬剤伝達システムの開発を行なうことである。

1) Cd/Seの半導体ナノ粒子を用いた研究開発

米国におけるナノテクノロジー研究の最重点課題の一つとされている量子サイズ効果(Quantum Dots)理論に基づき、半導体が長時間蛍光を保持し、サイズにより蛍光色が異なるという極めて特異的な性質を利用して、生体に安全でかつ様々な機能を果たす半導体ナノ粒子の開発を行なう。また、開発したナノ粒子に薬物を結合させた(Tagging)物質の細胞(血球細胞、血管内皮細胞等)、組織、生体における薬物動態を解析することにより、そのメカニズムを解明し、有効な薬物伝達システム(DDS)の開発を目指している

2) ブロック共重合体を用いた研究開発

合成高分子であるブロック共重合体の分子設計を通して、生体内異物認識系による排除、ベクター自体の毒性、搭載可能なDNA分子量に関する制約などの問題点を解決する新しい遺伝子ベクターシステムを構築し、その遺伝子治療における有用性を明らかにすることにある。本年度は、合成手法が確立されているポリエチレングリコール・ポリカチンブロック共重合体に関して、そのin vivo有用性を確認した。さらに、より優れた高分子ミセル型ベクターを構築するために新しい合成手法を確立するとともに、蛍光顕微鏡を用いた細胞内動態評価手法を確立した。

A. 研究目的

1) 研究の背景

ナノテクノロジーにより薬剤が効率良く患部に運ばれば、極少量の薬物量でも局所的に高濃度となり、ターゲットに対して有効性を示すと考えられる。そのためこれまで問題となっていた副作用も軽減され安全で効率の良い治療が可能となる。またこれまで摂取した薬剤が必要な部位以外に臓器にも到達しそこで副作用の引き金となる反応が起こるため、安全な薬剤として利用する事が不可能であったものも存在する。この

ような薬剤に対しピンポイントで患部に到達する事が可能となるなら、これまで使用不可能な薬剤も再び使用する事の可能性が出てくる。このため安全で有効なドラッグデリバリーシステムの開発を目指すナノ粒子の研究開発が行なわれている。

2) 目的

大きさが1nm~10nm程度の金属微粒子集団(量子サイズドット; QD)の比熱、磁化率などの物性は、マクロサイズのふつうの金属としてのものと著しく異なるこ

とが1961年久保亮五によって理論的に示され、(量子サイズ効果)。その後、久保理論の定量的検証は困難であるが、定性的にはこの効果の存在が認められ、微粒子系物理の大原理として国際的に認められた。この金属微粒子集団(QD)の物性は、そのサイズにより異なる性質があることから、その後の工学的応用は、QDのサイズをいかにして一様に製造できるかが問題であった。Alivisatosらは1998年半導体を用いてこれを可能とした。半導体QD(半導体ナノ粒子)は、蛍光性を持ち、蛍光持続時間が長く、サイズにより異なる蛍光色を発する性質を持つが親水性に乏しく、また塩濃度、pHなどにより、細胞培養条件では凝集し易く医薬生物学への応用が困難であった。昨年我々は、この半導体ナノ粒子を表面加工し医療への応用が十分可能であるようにした。そのような観点に立ち立生物材料などを通じた、バイオナノ工学的に自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、超極限分子プローブとして生物・医療応用を行う事を目的としている。

また高分子ナノミセルについては、分担研究者の片岡が世界に先駆けて高分子のナノ集積手法に基づいて創製した高分子ナノミセルであり、は、ウサイズがウイルス(~50ナノメートル)と同等という微小サイズでありながら、分子認識能や環境応答能などのマルチ機能を搭載可能な超機能化システムであり、表面を生体適合化する事も可能である。本研究においては図に示すように、遺伝子等を内核に搭載した超機能化高分子ミセルの開発を行い、「必要な時(timing)に、必要な部位(location)で、必要な診断や治療(action)」を最小限の副作用で達成する「ナノ遺伝子治療」を創出する。

3) ゴール

半導体ナノ粒子開発においては、米国におけるナノテクノロジー研究の最重点課題

の一つとされている量子サイズ効果(Quantum Dots)理論に基づき、半導体が長時間蛍光を保持し、サイズにより蛍光色が異なるという極めて特異的な性質を利用して、生体に安全でかつ様々な機能を果たす半導体ナノ粒子の開発を行なう。また、開発したナノ粒子に薬物を結合させた(Tagging)物質の細胞(血球細胞、血管内皮細胞等)、組織、生体における薬物動態を解析することにより、そのメカニズムを解明し、有効な薬物伝達システム(DDS)の開発を目指している。

また超機能高分子ミセルは、ウイルスと同等という微小なサイズでありながら、分子認識能や環境応答などのマルチ機能搭載可能な超機能高分子ミセルであり、表面を生体適合化することも可能であるため、遺伝子等を内核に搭載した超機能分子ミセルを用い、肺高血圧症、高脂血症、虚血性冠動脈疾患の再狭窄予防などを視野にいれ、臨床応用可能な治療システムの開発を目指す。

4) 研究の発展

半導体ナノ粒子の研究開発は米国におけるナノテクノロジー研究の最重要課題の一つとされている量子サイズ効果(Quantum Dot Effect)理論に基づく新規な化合物で、粒子サイズにより発光色が変化し、発光強度と耐光性が既存の有機系蛍光色素をはるかに凌駕することが知られている。半導体ナノ粒子はまた、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。

半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定であるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力

によっても強固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発に成功している。

一方、カルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は、非特異的に血清アルブミンと複合体を形成する。その複合体は生理食塩水または動物細胞用培地中でも分散安定である。そして、その複合体はヒト肝細胞やアフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞に貪食されて、エンドソームに蓄積される。その様子は蛍光顕微鏡下で半導体ナノ粒子の蛍光を観察することで容易に確認することができる。エンドソームマーカーとしては、一般にフルオレセインやローダミンといった有機系蛍光色素標識アルブミンやデキストランが用いられているが、半導体ナノ粒子の高い光量と耐光性という特質によりカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子と血清アルブミンの複合体は既存のエンドソームマーカーに代わるものとしてその応用が期待される。

5) 具体的な目標

高分子ナノミセルにおいては、体内動態の正確な制御を達成するために、高分子ミセルのサイズ分布は天然のウイルス並みに狭くなるように揃え、かつ遺伝子やオリゴ核酸など、特性の異なる搭載分子に適合するような内核構造設計を達成する(第1世代)。更に、外殻への効率的な標的指向分子(センサー分子)の導入法を確立し、細胞選択的なターゲティングを可能とする(第2世代)。第3世代高分子ミセルにおいては、局所温度変化等の環境変化に鋭敏に応答するように内核・外殻の構造制御を行うことである。

5) 具体的な目標

生物・医療応用について有効なナノ粒子の開発をめざしてきた。半導体ナノ粒子においては、その製造過程の安定化および収率、表面修飾の様々な条件、またアルブミンとのタギングおよびその細胞導入について検討してきた。

具体的には

1) 半導体ナノ粒子の合成

メルカプト亜鉛の分量の調節また、メルカプトウンデカニク酸のアルキル機の効果、TOPOの残存について、またその製造過程の見直し。

2) 半導体ナノ粒子のマルチカラー

半導体ナノ粒子は、その粒直径を換えることで異なる蛍光色を出すことが可能である。このため赤、橙、黄、緑などマルチカラーの製造

3) 近赤外光励起、近赤外光蛍光

製造過程において調整することによって近赤外光の蛍光を出すことが確認された。今後、近赤外光励起、近赤外光蛍光が可能なナノ粒子の合成を目指す

4) 半導体ナノ粒子の表面加工

有効な生物・医療応用が可能な表面加工を目指す。特に現在はカルボン酸のデンドリマーとなっているが、アミノ基についても検討する

5) タンパク、核酸へのタギング

アルブミンへのタギングは、既に済んでいるが、今後その他の蛋白質、薬物に展開する。

6) 細胞標識

細胞にアルブミンタギングしたナノ粒子を用いて標識下実験をすでに行なっている。生体内動態の解析を発展させる予定である。

B.研究結果

本年度は以下の成果が得られた

- 1) 半導体ナノ粒子の生物・医療応用
 - (1) 生物・医療応用可能な半導体ナノ粒子の合成・加工およびその応用
 - (2) アンチセンスオリゴによる細胞内デリバリーのトレース
 - (3) 感染症学研究及び感染症診断への応用
 - (4) 抗マラリア剤のDDSについての量子ドットによる動態解析
 - (5) ペプチドを用いた標的治療の評価
 - (6) 糸球体に指向性を有するリボソーム
 - (7) 再生医療へのES細胞と培養支持体の評価
 - (8) タンパク質中空ナノ粒子を用いたピンポイントデリバリー
 - (9) 血管障害の解明への応用
 - (10) 半導体ナノ粒子の安全性の検討

- 2) 超機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム
 - (1) ポリイオンコンプレックスミセル型遺伝子治療用ベクターの開発
 - (2) 高分子ミセル型ベクターの開発

以下にの分担の研究概要を記載する。詳細は、各分担の項参照。

- 1) 半導体ナノ粒子の生物・医療応用班
 - (1) ナノテクノロジーにより蛍光を発する超微粒子(～5nm)の国内における製造技術、表面加工、表面修飾法を新しく開発する。さらに生物・医療分野に安全に利用できるように開発し、さらにタンパク、核酸など生体分子や薬物に結合(Tagging)したり、細胞に標識するなどして、細胞や生体内動態を解析し、疾病の解明や、安全な薬物伝達システムの開発に利用することを目的としている。本年度は、その準備段階として、既に合成手法が確立されている5nmのCd/Seの半導体ナノ粒子(量子ドット)を利用し、蛍光顕微鏡を用いそのプローブの細胞内動態評価手法確立し、その

in vitro の有用性を確認した。

- (2) cAMP応答エレメント結合蛋白CREBに対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド(20量体、ホスホロチオエート型)は複数のヒト血液細胞株に対してアンチセンス特異的に増殖抑制と細胞死を誘導した。この作用機序に関しては、真のアンチセンスではなかったがアプタメリック効果でもなく、更に検討した。すなわち、我々が用いたアンチセンスオリゴと同様の配列を有し、しかもCREBそのものではない遺伝子の存在を検索したところ、CREB遺伝子のエクソン3からAlu配列へとつながるmRNAがESTクローンから見出された。検討したヒト血液細胞株においても、ほぼ同一のCREB・Alu融合遺伝子の発現が確認され、その融合遺伝子発現が用いたアンチセンスオリゴによって消失することも明らかにされた。Alu配列部分を標的としたアンチセンスオリゴにおいても血液細胞の増殖抑制が確認された。このような実験系を用いて、アンチセンスオリゴの細胞内デリバリーの評価が可能であると考えられた。

- (3) ナノ粒子カンタムドットの感染症学研究及び感染症診断への応用を目的とした基礎研究を実施した。本年度は、表面加工を加えていないカンタムドット及び表面にカルボキシル基を修飾したカンタムドットを用い細菌への標識が可能かどうか検討した。大腸菌、出血性大腸菌0157、サルモネラ菌、緑膿菌、結核菌、非結核性抗酸菌、MRSA、バンコマイシン耐性腸球菌、バクテロイデス、インフルエンザ桿菌を用いて検討した。これらの生菌及び死菌をpH7、pH9、pH5の条件でカンタムドットと接触させ、細菌がカンタムドットと結合するかどうか蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(4) 熱帯熱マラリア原虫の解糖系の酵素であるエノラーゼを標的とした薬剤の開発研究ならびに、同酵素をターゲットとした選択的な DDS の開発を、同分子の機能と構造をナノスケールで詳細に検討することで行う。そのために、組換えタンパクおよび人工ペプチドの立体構造を、ホモロジー解析によるコンピューターグラフィックスおよび CD スペクトルによる解析で行った。さらには一部のペプチドは NMR による構造解析も行った。熱帯熱マラリア患者血清のこれらのエノラーゼ分子に対する反応性を調べたところ、この酵素の機能上・構造上重要な部位に対する抗体を持つ患者は少なかった。一方、このような重要部位に対して高い反応性を示す血清を持つ患者の病状は極めて軽度であることが認められた。今後この酵素をターゲットとした薬物の生体内細胞内動態を量子ドットを用いて解析することにより有効な DDS 開発への基盤が構築された。

(5) ペプチドを用いた標的治療を行うため、レセプター型チロシンキナーゼ RET に結合するペプチド（以下 RBP-1; RET binding peptide）に磁性体を付加し、MRI による診断法の確立に向けたパイロット実験を行った。RBP-1 の C-末端にシステインを付加し、デキストランでコートした磁性体を-S-S-結合させた RBP-1/DM を作成した。RBP-1/DM を RET 発現細胞の培養液中に添加すると効率良く胞体内に取り込まれた。またこの RBP-1/DM を用いて NMR により、RET 遺伝子を高発現している細胞を検出することが可能であった。今後細胞内動態をより詳しく調べるために量子ドットを用いる基盤ができた。

(6) 糸球体に指向性を有する DDS 製剤・塩基性脂質 TRX-20 添加ポリエチレングリコール修飾リポソームにステロイド剤を内封させた薬剤が半月体性糸球体腎炎の

動物モデルにおいて有効であることを示した。

(7) 再生医療においてstem細胞を培養するにあたってその培養支持体が有効であるか否かを評価することが重要である。今年度の研究においてその評価基盤を目指しその足場の検討を行ない PGA 含有コラーゲンが有効であることが判明した。今後量子ドットによるトレーシングにより更に詳しく解析する。

(8) ウイルスの感染効率に着目して、ウイルスの表面抗原からなるタンパク質中空ナノ粒子を、遺伝子や薬剤をピンポイントで効率よく導入するナノサイズカプセルとして利用することを試みた。具体的には、ヒト肝臓に特異的な B 型肝炎ウイルス (HBV) の表面抗原である L タンパク質 (pre-S1 ペプチド+pre-S2 ペプチド+S タンパク質) を酵母細胞に発現させて得られるナノ粒子を用い、ヒト肝臓に特異的に遺伝子導入できることを明らかにした。また、pre-S1 領域には、肝臓への感染のためのレセプターがコードされていることが、最近明らかにされたため、この部分を他の標的細胞を特異的に認識するためのレセプターに変換することで、任意の細胞にピンポイント導入できるナノ粒子に変換できると期待される。そこで、この任意の細胞標的を可能とするレセプター分子をコンビナトリアル・バイオケミストリー的な手法により創製するために、酵母細胞表面ディスプレイシステムを開発した。

(9) DDS による血管炎の治療をめざした新たなナノメディシンの技術を開発し、併せてその発症機構を明らかにすることを目的とした。本年度は、真菌 *C.andida* 由来の分子 CADS/CAWS によって誘導した血管炎モデルを用いて、新たなイメージング技術として *in vivo* イメージング法をほ

は確立した。本方法により、腎臓の血管への分子のDDSを生きた生体での検討が可能になった。具体的には、CAWSとanti-mouseMPOを投与後、再度、CAWSとanti-mouseMPOおよびFMLPを投与して、腎臓の血管傷害の誘導状態をin vivoでのイメージングにより解析した。その結果、マウスが生きた状態で、白血球の血管内皮へ接着を観察できた。また、血流速度の低下、血流停止、逆流を観察し、腎表面血流の停止に至る過程を解析した。本血管炎誘導モデルにおいて開発したin vivoイメージングの評価法は、腎臓をはじめとした血管内・血管表面での薬剤・分子のDDS状態を解析することを可能にした。これにより、血管炎の治療法の開発、治癒機転や発症機構を解析する上で有用であることを示した。今後は、現在開発中の種々のナノプローブのDDSについてin vivoイメージング評価法により解析をめざす。

(10) 親水性有機化合物(11-メルカプトウンデカン酸ナトリウム塩)で表面被覆したCdSe/ZnSコアシェル型ナノ粒子(QD: Lot. SZU020521A)、およびこのサンプル中に混在するTrioctylphosphine oxide (TOPO)、硫化亜鉛(ZnS)について、細胞毒性ならびにDNA損傷性の有無を検索した。試験にはヒト培養細胞であるWTK-1細胞を用いて4時間処理を行い、生存率の測定とコメットアッセイによるDNA損傷性を調べた。コメットアッセイ法(アルカリ条件下での単一細胞ゲル電気泳動法)は被験物質処理によってDNA上に生じた脱塩基部位をアルカリ処理によってDNA鎖切断として検出する方法である。

親水加工CdSe/ZnSナノ粒子の懸濁液では500 µg/ml未満の濃度で細胞毒性を示さず、250 µg/ml未満の濃度でDNA損傷性が認められなかった。

2) 超機能高分子ミセルによる遺伝子導入

システム開発班

(1) ポリイオンコンプレックスミセル型遺伝子治療用ベクターの開発を行っている。ポリLリジン(PLL)とポリエチレングリコール(PEG)との共重合体は、DNAと会合し粒径100nm以下のナノ微粒子を形成する。我々はこのナノ微粒子がマウス血流中で安定に存在する条件を見出し、遺伝子導入ベクターとしてin vitroおよびin vivoで有用であることを示した。

(2) 合成高分子であるブロック共重合体の分子設計を通して、生体内異物認識系による排除、ベクター自体の毒性、搭載可能なDNA分子量に関する制約などの問題点を解決する新しい遺伝子ベクターシステムを構築し、その遺伝子治療における有用性を明らかとすることにある。本年度は、合成手法が確立されているポリエチレングリコール-ポリカチンブロック共重合体に関して、そのin vivo有用性を確認した。さらに、より優れた高分子ミセル型ベクターを構築するために新しい合成手法を確立するとともに、蛍光顕微鏡を用いた細胞内動態評価手法を確立した。

C.まとめ

本年度研究を通じて、半導体ナノ粒子がタンパク質やその他の生体分子に結合させその細胞内動態を観察するのに十分な特性を有する事がしめせた。更に、in vitro, in vivoのみならずEX-vivoおよび生体内動態について広範な動態解析する事も可能と成るといふ極めて特徴的な性質を有するため、生物・医療において今後の展開に向けての素地が築かれたと言える。

細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布や生体分布について実際に応用し今後新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

近年多くの新規機能材料が設計・製造さ

れ使用され廃棄されている。また今後増々加速度的に新しい製造方法とともに世に出てくるだろうと考える。まず設計段階では、技術、ニーズなどのレベルでは異分野の交流が必要となる。また製造段階、使用段階、廃棄を通じて安全性について十分検討する必要がある。それらの全ての過程をについて技術者の養成が必要でありそのための訓練マニュアルを必要とする。

D. 健康危険情報

特になし。

E. 研究発表

論文発表一覧および学会発表または、分担者の項参照

F. 知的財産権の出願・登録状況

特許出願

- (1) 山本健二 発光素子
- (2) 山本健二 分子認識蛍光体およびそれを用いた標識物質の測定方法
- (3) 横山昌幸、片岡一則、岡野光夫、櫻井靖久、勢藤隆、福島重人、町田芽久美、浴本久雄、岡本一也、真柴洋子、ブロック共重合体—抗癌剤複合体医薬製剤、特開2002-179556

生物・医療応用可能な半導体ナノ粒子の 合成・加工およびその応用

主任研究者 山本 健二 国立国際医療センター 部長
協力研究者 花木 賢一 国立国際医療センター 協力研究員
協力研究者 桃あさみ 国立国際医療センター 研究生
協力研究者 奥泰介 国立国際医療センター 研究生

本研究の目的は、ナノテクノロジーにより蛍光を発する超微粒子（～5 nm）の国内における製造技術、表面加工、表面修飾法を新しく開発する。さらに生物・医療分野に安全に利用できるように開発し、さらにタンパク、核酸など生体分子や薬物に結合（Tagging）したり、細胞に標識するなどして、細胞や生体内動態を解析し、疾病の解明や、安全な薬物伝達システムの開発に利用することを目的にしている。本年度は、その準備段階として、既に合成手法が確立されている5 nmの Cd/Se の半導体ナノ粒子（量子ドット）を利用し、蛍光顕微鏡を用いそのプローブの細胞内動態評価手法確立し、その *in vitro* の有用性を確認した。

A. 研究目的

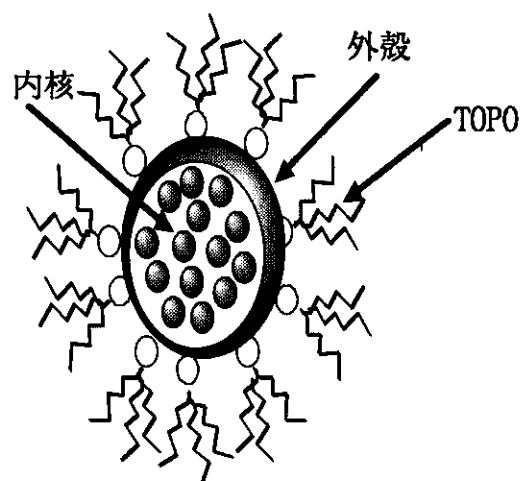
近年ナノメートルサイズの視点で捕らえる生物学が盛んである。X線やNMRで構造を解析したり様々な装置に直結した質量分析計、1分子のリアルタイムの可視化などがそれである。すなわち従来m、mm、 μ と進んできた生物学の延長上の先に有るのがナノバイオロジーである。本分担研究はこれを目指すのではない。粉碎することにより機能材料を作るのには、限界があり一桁 nm サイズのそれを作るには従来技術では対応が難しい。ところが前人未踏の世界というわけでもない。生物は、細胞レベルでそれに直面してきたわけでまさに nm サイズのエンジニアリングを心得ている。そのような観点に立ち立生物材料などを通じた、バイオナノ工学的立場に自己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行ない、タンパク、核酸など生体分子や薬物に結合（Tagging）したり、細胞に標識するなどして、細胞や生体内動態のメカニズムを解明する。

B. 研究方法

1. 合成方法

研究に用いている半導体ナノ粒子はセレン化カドミウムを核、硫化亜鉛を殻とするコア・シェル型ナノ粒子である。この粒子はトリ・オクチル・フォスフィン・オキサ

イド (TOPO) とする有機溶媒を350℃に加熱し、溶融させた状態で（トリ・オクチル・フォスフィン・オキサイドは、爆発性があるため脱気するかアルゴンで充填した状態で合成を行う）で合成されている。則ち、その溶融した TOPO に酸化カドミウムとセレンを同時に打ち込み単分子分散させる。分散した時に、溶媒の温度が270℃程度の一旦低下するが、さらに加熱し300℃にて一定に保つと、TOPO 溶媒内で半導体ナノ粒子が自己組織化する事により生成されてくる。半導体ナノ粒子は、量子サ



イズ効果を持っているためこのように非常に均質な粒子直径を持つように製造される必要がある。

2. 表面加工

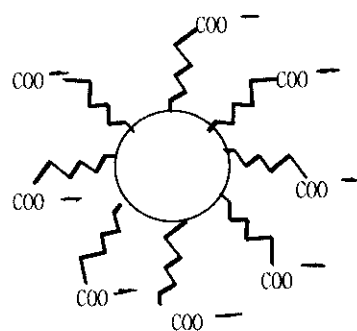
上述のようにして製造された半導体ナノ粒子は、IT 分野においては、メモリーとして、光工学的には、超小型のレーザー発生デバイスとして、国の内外でしのぎを削って開発されている。ところが、上述の方法で製造された半導体ナノ粒子は、トルエンなどの有機溶媒には溶解可能であるが、このままでは、水に溶解しない。これについては、現在までに水に溶けるための様々な親水加工法が開発されている。例えば、珪酸で半導体ナノ粒子の表面を覆いその被覆した珪酸分子どうしを架橋する。それが丁度半導体ナノ粒子を覆う籠のようなものとなり、親和性が高くなり水に安定に溶解する。他の方法としては、同様の概念で、珪酸の代わりにポリアクリル酸を使う方法がある。半導体ナノ粒子の表面を覆いその被覆した表面を光で架橋する方法である。これらとは少し異なる方法として、前述のようにして (TOPO 法によって) 製造された半導体ナノ粒子は、その表面が TOPO で覆われている (上図)。TOPO のアルキル基が親水性でないため水に溶けないので、この代わりに、カルボン酸で置き換える方法である。この方法では、カルボキシル基の反対側をメルカプト基とし、シエルと安定に結合させる。このようにして表面加工された半導体ナノ粒子は、ナトリウム塩や、カリウム塩として水に溶かすことができる。疎水性化合物であるが、11-メルカプトウンデカン酸と硫化亜鉛とを結合させて粒子表面にカルボキシル基を出させることによって親水性粒子としている。この置換方法は、まず 11-メルカプトウンデカン酸を 80℃ に加熱し恒温に保つと溶融しており、この溶融した 11-メルカプトウンデカン酸に前述の量子ドットを溶かしこみ数時間放置することにより置換し、さらにナトリウム塩又は、カリウム塩として親水性を示すようになる。

3. 表面修飾

ところがこのままでは、中性または、塩基性水溶液には分散できるが、下の図に示すよう酸性酸い溶液中または高塩濃度において凝集し析出してくると言った欠点がある。

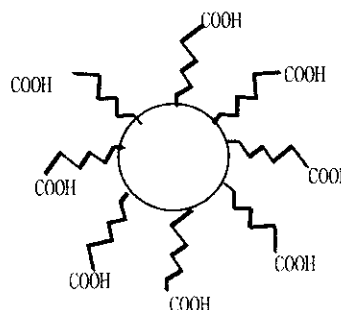
半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定であるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力によっても強固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表

塩基性溶媒中



分散

酸性溶媒中



凝集

面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発を検討している。

現在はこのカルボン酸のデンドリマーとなる量子ドットをさらに表面修飾し生物・医療用途に利用可能と成るように両親倍性物質で表面修飾を施してある。

C. 研究結果

(1) 半導体ナノ粒子の励起光とマルチカラー化

半導体ナノ粒子は、大きさを変えるとその蛍光色が変わることにおいては、前述のごとくである。さらにもう一つの特徴として励起波長を選ばない点がある。現在様々な研究においてマルチカラー化が行なわれている。その時最大の問題点は同時多色化である。同時に複数の色を出すため複数の種類の異なる蛍光物質を使用すれば、現在のところその各々に特徴の有る励起光を用いる必要性がありそのため複数のレーザーを用意する必要性が出てくる。ところが、半導体ナノ粒子の場合、一つの励起光で同時に複数の大きさの半導体ナノ粒子を励起することができる。裏を返せば。半導体ナノ粒子は、励起光を自由に選べる点が、極めて特徴的である。その例を図Aに示す。図Aの4枚のパネル写真はすべて同じ視野である。図A左上は、紫外光で励起している。そのためダピで染められた細胞の核と、赤色半導体ナノ粒子が細胞内に確認できる。図A左下は、同じ視野を青色光で励起したものである。FITCで染めたミトコンドリアと赤色半導体ナノ粒子が細胞内に確認できる。図A右上は、黄色で励起したものである。この場合赤色半導体ナノ粒子のみが細胞内に確認できる。すなわちすべての励起光で赤色半導体ナノ粒子のみが観察できることがわかる。

(2) 安全性の確認

半導体ナノ粒子についての細胞毒性等の安全性について様々な方法によって現在確認しているが、その一つとして、細胞増殖試験がある。試験法としては、半導体ナノ粒子を取り込ませた細胞を長時間観察

するものである。図Bにその結果を示す。図B左は、半導体ナノ粒子を動物細胞に取り込ませた直後蛍光顕微鏡で観察した像である。赤い粒状に見えるのが、細胞に取り込まれた半導体ナノ粒子である。核を取り囲んでライソゾームに貯留した半導体ナノ粒子が確認できる。連続的に同じ細胞を追って撮影している。図B中央は、9時間後の像である。細胞分裂が始まっており、核も細胞も2分裂しはじめているのが確認できる。半導体ナノ粒子も均等に別れつつある。図B右は、18時間後の同じ細胞の像である。核は、完全に分裂を終了している。この後順調に細胞分裂が進み完了したことを確認している。この濃度では、細胞分裂を阻害するものではないことを確認することができた。

本研究で合成・表面加工し生物・医療応用した半導体ナノ粒子は、このナノ粒子はセレン、カドミウムという重金属を主成分として含むため、その安全性については関心の集まる場所であるが、現在までのところそれに言及した発表は皆無である。セレン化カドミウム自身はカドミウムレッドに代表される赤色系顔料として1920年頃から用いられており、現在も絵の具、ガラスや陶器などの彩色に使われている。しかし、その毒性のため医薬品害毒物に指定されている。一方、半導体ナノ粒子のセレン化カドミウムは硫化亜鉛に強固に封入されているため、カドミウムレッドに比べて毒性は低いと思われる。しかし、硫化亜鉛に未封入または不完全封入のセレン化カドミウム粒子の夾雑は排除できないために、その毒性評価は重要である。現在研究に用いている半導体ナノ粒子は実験室レベルで合成されたもので、動物個体での毒性評価を行うためには量的に潤沢でない。そのため、動物培養細胞を用いて合成ロット毎に毒性評価を行っている。

(3) 表面加工

半導体ナノ粒子の親水化は既報の研究ではカルボン酸によるものがほとんどである。このカルボン酸で親水化した半導体ナノ粒子は中性から塩基性水溶液では分散安定であるが、酸性または中性であっても生理食塩水や動物細胞用培地のように塩を含むものでは凝集体を形成してしまう。ナノスケールにおける凝集は分子間力によっても強

固で、再分散させることは困難である。そして、生体内では塩を含み酸性である場合がほとんどのため、現行のカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は応用が難しい。酸性下での分散安定な半導体ナノ粒子を調製するため、現在、アミノ基を出すような表面修飾の開発を検討している。

一方、カルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子は、非特異的に血清アルブミンと複合体を形成する。その複合体は生理食塩水または動物細胞用培地中でも分散安定である。そして、その複合体はヒト肝細胞やアフリカミドリザル腎由来の Vero 細胞に貪食されて、エンドソームに蓄積される。その様子は蛍光顕微鏡下で半導体ナノ粒子の蛍光を観察することで容易に確認することができる。エンドソームマーカーとしては、一般にフルオレセインやローダミンといった有機系蛍光色素標識アルブミンやデキストランが用いられているが、半導体ナノ粒子の高い光量と耐光性という特質によりカルボン酸で表面修飾した半導体ナノ粒子と血清アルブミンの複合体は既存のエンドソームマーカーに代わるものとしてその応用が期待される。

D. 考察

1) 達成度について

我が国において、はじめて量子ドットを使った生物学・医学応用が本年度我々の研究でなされた。特定細胞の標識およびその標識された細胞の生体内導入に必要な準備がなされたと言える。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

半導体ナノ粒子の研究開発は米国におけるナノテクノロジー研究の最重要課題の一つとされている量子サイズ効果 (Quantum Dot Effect) 理論に基づく新規な化合物で、粒子サイズにより発光色が変化し、発光強度と耐光性が既存の有機系蛍光色素をはるかに凌駕することが知られている。半導体ナノ粒子はまた、表面加工により様々な機能を賦与することが可能である。そこで、生体に安全な半導体ナノ粒子を開発し、開発した半導体ナノ粒子に様々な薬剤を結合させ、薬物動態を半導体ナノ粒子の可視光観察によって細胞・組織・臓器・生体レベルで解析する事は国際的に極めて重要である。

また量子ドットにより特定細胞に標識しその標識された細胞を正常マウスに導入する事によりその生体内動態を明らかにしホストとの相互作用を見る事により、血管炎による多臓器不全について解析する事は、国民医療における難病を克服する事は、社会的にも意義が大きいと考える。

3) 今後の展望について

次年度以降は、細胞内動態解析のために必要な表面加工法を開発するとともに、実際開発された方法を利用して、細胞内分布や生体分布についてに実際応用し新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

今後実験デザイン1、および実験デザイン2に示すように血管炎についての解析を行う予定である。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、半導体ナノ粒子がタンパク質やその他の生体分子に結合させその細胞内動態を観察するのに十分な特性を有する事がしめせた。更に、*in vitro*, *in vivo* のみならず *EX-vivo* および生体内動態について広範な動態解析する事も可能と成るといって極めて特徴的な性質を有するため、生物・医療において今後の展開に向けての素地が築かれたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) K. Hanaki, A. Momo, T. Oku, A. Omoto., Y. Yamaguchi and K. Yamamoto. Semiconductor quantum dot/albumin complex Is a long-life and highly photostable endosome marker, B.B.R.C. (In press).
- 2) J. Kizu, M. Arakawa, K. Yamamoto, Is There Relation between Antibiotic Sensitivity of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus and Consumption of Antibiotics in a Hospital?: A Study in April 1993 - March. Jpn. J. Infect. (2002) 55 : 65-67.

- 3) Takeuchi, F., Futamura, Y., Yoshikura, H., Yamamoto, K. Statistics of trinucleotides in coding sequences and evolution, *J. Theor. Biol.*, (In press).
- 4) Baba T., Takeuchi F, Kuroda M, Yuzawa H, Aoki K, Oguchi A, Nagai Y, Iwama N, Asano K, Naimi T, Kuroda H, Cui L, Yamamoto K, Hiramatsu K. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA, *Lancet* (2002) 359, 1819-1827

2. 学会発表

- 1) 花木賢一 桃あさみ 山本健二、エンドソームマーカーとしての半導体ナノ粒子の応用、第11回日本バイオイメージング学会学術集会、2002.10.31
- 2) 山本健二、半導体ナノ粒子の生物・医療応用、第16回日本ME学会、分子・細胞療法におけるME研究会（招待講演）
- 3) 栄羽範子、前之園信也、山本健二、山口由岐夫、半導体ナノ粒子水溶液の蛍光強度振動現象の非線形反応解析」、物理学会、秋季大会（2002）、愛知県春日井
- 4) 栄羽範子、前之園信也、山本健二、山口由岐夫、半導体ナノ粒子水溶液の蛍光振動解析、化学工学会、第35回秋季大会（2002）、神戸

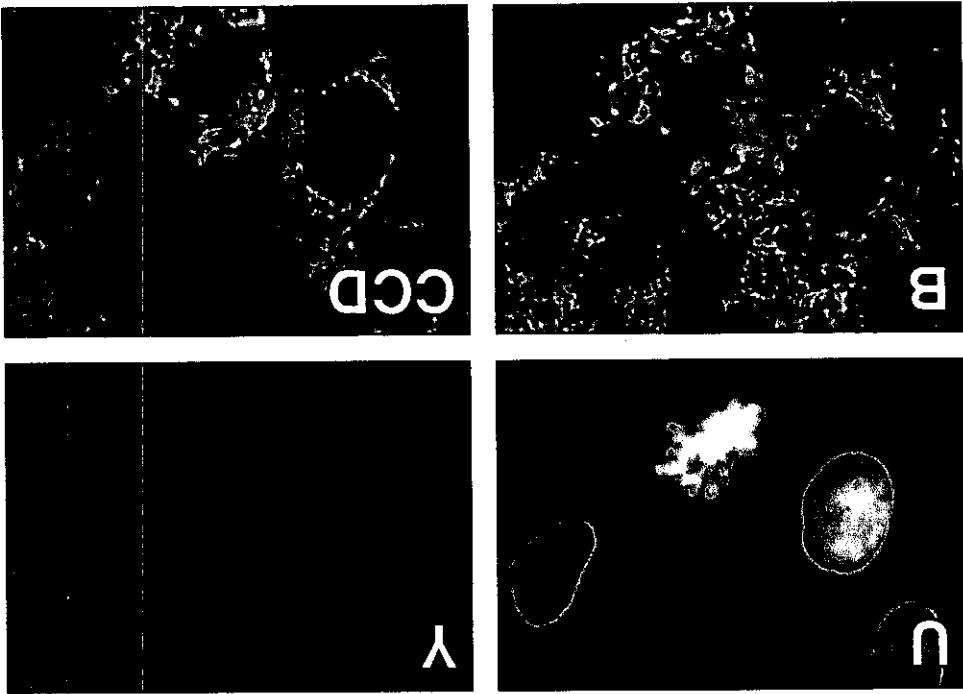
H. 知的所有権の出願・取得状況

特許出願

- (1) 山本健二 発光素子
- (2) 山本健二 分子認識蛍光体およびそれを用いた標識物質の測定方法



☒ B



☒ A

ヒト血液細胞に対するアンチセンステクノロジーを応用したDDSの開発へむけて

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長

研究要旨 cAMP応答エレメント結合蛋白CREBに対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド(20量体、ホスホロチオエート型)は複数のヒト血液細胞株に対してアンチセンス特異的に増殖抑制と細胞死を誘導した。この作用機序に関しては、真のアンチセンスではなかったがアプタメリック効果でもなく、更に検討した。すなわち、我々が用いたアンチセンスオリゴと同様の配列を有し、しかもCREBそのものではない遺伝子の存在を検索したところ、CREB遺伝子のエクソン3からAlu配列へとつながるmRNAがESTクローンから見出された。検討したヒト血液細胞株においても、ほぼ同一のCREB・Alu融合遺伝子の発現が確認され、その融合遺伝子発現が用いたアンチセンスオリゴによって消失することも明らかにされた。Alu配列部分を標的としたアンチセンスオリゴにおいても血液細胞の増殖抑制が確認された。このような実験系を用いて、アンチセンスオリゴの細胞内デリバリーの評価が可能であると考えられた。

A. 研究目的

cAMP応答エレメント結合蛋白(cAMP responsive element binding protein、CREB)は、細胞内のcAMP濃度が上昇することによって転写が亢進する遺伝子の上流域の特定の塩基配列(CRE配列)に結合するタンパク質で、その蛋白の転写を調節する転写因子である。従来の研究においては、その臓器分布やノクアウトマウスの所見などから神経系における役割に焦点を当てた研究が行われてきた。一方、当研究者のグループは、CREBが線維芽細胞において特定の細胞周期に依存してリン酸化されていること、CREBを過剰発現させると同細胞のアポトーシスが誘導されること、CREBに対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチドがヒト血液細胞に対してアンチセンス特異的に増殖抑制と細胞死を誘導することを、などを報告してきた。今年度は、CREBのアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド(ASODN)の血液細胞への作用機序について検討した。

B. 研究方法

ASODNおよびそれぞれのASODNに対応するセンスオリゴは、ホスホロチオエート型の20量体のものを合成した。Alu配列に対するASODNは、CREB・Alu融合遺伝子の2次構造を想定して、出来るだけ有効な部位を標的としてデザイン、合成した。細胞は、ヒト骨髓系血液細胞株であるHL-60を用いた。細胞の増殖は生細胞の算定により行った。アポトーシスの同定は、DNA断片化の同定、顕微鏡による形態観察により行った。融合遺伝子の検出は、オリゴdT

による逆転写の後、エクソン1とAlu配列からそれぞれプライマーを選んで、ネステッドPCRを行った。

C. 研究結果

検討したASODNの中で、5'非翻訳領域と開始コドンを含む領域を対象としたもの3種が、アンチセンス特異的にHL-60細胞に対して強力な増殖抑制作用を有した。RNA解析や蛋白解析から、CREBの発現の低下を介した真のアンチセンス効果ではないことが明らかになったが、欠失変異体や置換変異体の結果から特定の短い配列に依存するアプタメリック効果ではなく、むしろ何らかの対象分子とのハイブリダイゼーションを介する作用であることが示唆された。

そこで、検討したASODNがCREBの遺伝子配列を部分的に有しながら、CREB遺伝子そのものではない遺伝子を標的としてハイブリダイゼーションを介した効果を発揮したと仮定した。データベースをサーチした結果、中国(上海)のグループが、CREB遺伝子のエクソン3から同じ2番染色体上のAlu配列につながった融合メッセージをESTクローンとして登録していることが判明した。

次に、このような融合メッセージが実際に我々が検討したヒト血液細胞株において発現しているか否かを、CREB遺伝子エクソン2とAlu配列からそれぞれプライマーを選んで、ネステッドPCRを行って検討したところ、予想される分子量のあたりに増幅されたバンドが検出され、それがASODNによって消失していた。このバンドを切り出して

塩基配列を同定したところ、実際に報告されている配列とほぼ同じようなCREB・Alu融合遺伝子であることが判明した。ただし、報告とは一部異なり、エクソン2の途中からAlu配列に融合した遺伝子でエクソン3は含まれなかった。このような融合遺伝子はゲノムレベルでのPCRでは検出されなかった。

最後に、CREB・Alu融合遺伝子の2次構造を想定して、Alu配列に対するASODN（ホスホロチオエート型の20量体のもの）を5種類、デザイン、合成して検討した。ヒト白血病細胞株であるHL-60の増殖とアポトーシスを指標に解析したところ、合成したASODNの中に、CREBに対するASODNとほぼ同等の作用（増殖抑制作用、アポトーシス誘導作用）を有するものを1種類見出した。

D. 考察

CREBに対するASODNの作用機序を解析した。RNA解析や蛋白解析から、CREBの発現の低下を介した真のアンチセンス効果ではないことが明らかになったが、欠失変異体や置換変異体の結果から特定の短い配列に依存するアプタメリック効果ではなく、むしろ何らかの対象分子とのハイブリダイゼーションを介する作用であることが示唆された。このような、不可解な現象はこれまでも知られているが、それ以上の解析は困難でなされていない。我々は、CREBの遺伝子配列を部分的に有しながら、CREB遺伝子そのものではない遺伝子を想定して、実際に、CREB遺伝子のエクソン3から同じ2番染色体上のAlu配列につながった融合メッセージをESTクローンから見出した。さらに、このような融合メッセージが実際に我々が検討したヒト血液細胞株において発現している事、それが我々の用いたASODNによって消失することを確認した。

これまでに合成オリゴヌクレオチドの持つ生物効果に関しては「真のアンチセンス機序」と「アプタメリック効果」の2つが報告されている。しかし、多くの研究者がそのどちらでもない「不可解な効果」を経験している。にもかかわらずこのことに関しては手つかずのままである。今回の発見はこれに答えを与えるものである。このような新しい概念（既知の構造遺伝子とAluが融合したメッセージが存在し、細胞内で機能している）は、合成オリゴの持つ不可解な作用を解明することに貢献するだけではなく、ヒトゲノムに特異的に存在するAlu配列の意義を考える上でもきわめて有用である。ゲノムに多数存在してい

ながら機能不明であるAlu配列の個々の役割が解明されると、生物学上の大きな発展が生まれる可能性が高い。また、我々が同定した融合メッセージは超微量に存在しているため、添加した合成アンチセンスオリゴの影響を極めて敏感に受ける。このことは、これまでに副作用の関係で投与量に制限があったアンチセンス療法に新たな展開を与えるものになると期待される。さらに、このような実験系は、アンチセンスオリゴのDDS実験系として極めて有用と考えられた。

E. 結論

cAMP応答エレメント結合蛋白CREB Bに対するアンチセンスオリゴデオキシリボヌクレオチド（20量体、ホスホロチオエート型）は複数のヒト血液細胞株に対してアンチセンス特異的に増殖抑制と細胞死を誘導した。この作用機序に関して検討した。すなわち、我々が用いたアンチセンスオリゴと同様の配列を有し、しかもCREBそのものではない遺伝子の存在を検索したところ、CREB遺伝子のエクソン3からAlu配列へとつながるmRNAがESTクローンから見出された。検討したヒト血液細胞株においても、ほぼ同一のCREB・Alu融合遺伝子の発現が確認され、その融合遺伝子発現が用いたアンチセンスオリゴによって消失することも明らかにされた。融合遺伝子はゲノムレベルでの組み換えではなかった。Alu配列部分を標的としたアンチセンスオリゴにおいても血液細胞の増殖抑制が確認された。このような実験系は、アンチセンスオリゴのDDS実験系として極めて有用と考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Saeki K, Okuma E, Yuo A: Recurrent growth factor deprivation promotes multi-drug resistance in leukemic cells. *Brit J Cancer* 86:292-300, 2002.
2. Yasugi E, Uemura I, Kumagai T, Nishikawa Y, Yasugi S, Yuo A: Disruption of mitochondria is an early event during dolichylmonophosphate-induced apoptosis in U937 cells. *Zool Sci* 19:7-13, 2002.
3. Okuma E, Inazawa Y, Saeki K, Yuo A: Potential roles of extracellular-signal regulated kinase (ERK) but not p38 during myeloid differentiation of U937 cells stimulated by cytokines: Augmentation of differentiation via prolonged activation of ERK. *Exp Hematol*

30:571-581,2002.

4. Saeki K, Kobayashi N, Inazawa Y, Zhang H, Nishitoh H, Ichijo h, Saeki K, Isemura M, Yuo A: Oxidation-triggered c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways for apoptosis in human leukemic cells stimulated by epigallocatechin-3-gallate (EGCG): a distinct pathway form those of chemically-induced and receptor-mediated

apoptosis. Biochem J 368:705-720,2002.

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

- | | |
|-----------|----|
| 1. 特許取得 | なし |
| 2. 実用新案取得 | なし |
| 3. その他 | なし |