

## ナノ粒子の感染症研究への応用について

分担研究者 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

研究要旨：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。実験したいずれの条件でも細菌のカンタムドットの結合は観察されなかった。

A:研究目的：様々な波長で安定した高い輝度の蛍光を発するナノ粒子カンタムドットは、将来の感染症学研究や感染症診断への応用にとって欠かすことできない手段となると考えられる。本研究では、感染症学研究や感染症診断にカンタムドットがどのように応用できるのかを明らかにする。

B:研究方法：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培養し、生理食塩水で洗浄後、食塩添加リン酸緩衝液 (pH7)、食塩添加酢酸緩衝液 (pH5)、食塩添加トリス塩酸緩衝液 (pH9) に浮遊させ、表面加工を加えていないカンタムドットまたは表面にカルボキシル基を修飾したカンタムドットと 30 分間接触させた。これらの生菌及び死菌を 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。

また、細菌のチュブリンホモログである FtsZ の機能に関する検討を加える目的で、結核菌、非結核性抗酸菌、MRSA 及びバンコマイシン耐性腸球菌の FtsZ 遺伝子をクローニングし、リコンビナントタンパク質を精製した。

C:研究結果：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が、実験したいずれの条件でも細菌のカンタムドットの結合は観察されなかった。また、細菌のチュブリンホモログである FtsZ の機能に関する検討を加える目的で、結核菌、非結核性抗酸菌、MRSA 及びバンコマイシン耐性腸球菌の FtsZ 遺伝子のリコンビナントタンパク質を取得した。

D:考察：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が、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とは直接結合できないことが明らかとなった。したがって、カンタムドットの表面加工を工夫することが必要であると思われる。細菌のチュプリンホモログである FtsZ の機能に関する検討を加える目的で、結核菌、非結核性抗酸菌、MRSA 及びバンコマイシン耐性腸球菌の FtsZ 遺伝子をクローニングし、リコンビナントタンパク質を取得した。今後、カンタムドット標識し、FtsZ 重合の制御メカニズムをの細菌分裂に関与する。

F.健康危機情報：これらの実験は、BSL 2 実験室で実験を実施している。また、実験内容は、機関内の承認を得ている。

#### G.研究発表：

##### 1. 論文発表：

1. Hashimoto, H., Kirikae, F., Dohi, T., Adachi, S., Kusumoto, S., Suda, Y., Fujita, T., Naoki, H., Kirikae, T.: Structural study on lipid A and the O-specific polysaccharide of the lipopolysaccharide from a clinical isolate *Bacteroides vulgatus* from a patient with Crohn's disease. *Eur. J. Biochem.*, 269:3715-3721, 2002.
2. Takai, S., Tharavichitkul, P., Sasaki, C., Onishi, Y., Yamano, S., Kakuda, T., Tsubaki, S., Trinarong, C., Rojanasthien, S., Sirimalaisuwan, A., Tesaprateep, T., Maneekarn, N., Sirisanthana, T., Kirikae, T.: Identification of virulence-associated antigens and plasmids in *Rhodococcus equi* from AIDS patients and prevalence of virulent *R. equi* in soil collected from domestic animal farms in Chiang Mai. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66:52-55, 2002.
3. Yoshida, J., Kirikae, T., Yamanaka, N., Suzuki, H., Onzuka, T., Hisahara, M., Ueno, Y.: Evidence-based infection control in thoracic surgery. *Jpn. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 50:273-279, 2002.
4. Sasaki, R., Fujino, T., Saruta, K., Kawasaki, J., Shigeto, N., Kirikae, T.: Molecular epidemiological surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Hiroshima community hospital in 2002. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55:93-95, 2002.
5. Yonamori, K., Takezako, N., Nishimura, K., Onose, T., Yamanishi, F., Kawahata, H., Kawana, A., Mori, N., Kirikae, F., Kirikae, T., Kuratsuji, T., Kudo, K., Kobori, O., Yazaki, Y., Tetsuyoshi Miwa, T.: Fungal Infection in Neutropenic Patients During Construction in a Hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55: 126-127, 2002.
6. Funatogawa, K., Ide, T., Kirikae, F., Saruta, K., Nakano, M., Kirikae, T.: Use of Immunoglobulin Enriched Bovine Colostrum against Oral Challenge with Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in Mice. *Microbiol. Immunol.*, 46: 761-766, 2002.

7. Fujino, T., Sekiguchi, J., Kawana, A., Konosaki, H., Nishimura, H., Saruta, K., Kudo, K., Kobori, O., Yazaki, Y., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Tokyo hospital in 2002. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55: 210-213. 2002.
  8. Takahara, M., Fujino, T., Otsuka, Y., Saruta, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Pulmonary *Mycobacterium avium* Infection in an Immunocompetent Aged Woman Related to Use of Home Bath with a Circulating Water System. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 55: 210-213, 2002.
  9. Ojima, I., Fumero-Oderda, C.L., Kuduk, S.D., Ma, Z., Kirikae, F., Kirikae, T.: Structure-activity study of taxoids for their ability to activate murine macrophages as well as inhibit the growth of macrophage-like cells. *Bioorg. Med. Chem.*, in press.
  10. Kawano, F., Miyazaki, Y., Takami, J., Fujino, T., Saruta, K., Kuratsuji, T., Kirikae, T.: Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in a Kumamoto Hospital in 2002. *Jpn. J. Infect. Dis.*, in press.
2. 学会発表：
1. 四宮博人、永井功造、切替照雄、豊岡公德、平田 肇、角田恒輔、浅野喜博：防御系細胞特異的 p65/L-plastin の菌体刺激による動態の3次元解析。第75回日本細菌学会総会、2002年4月4日、横浜。
  2. 切替照雄：*Mycobacterium tuberculosis* 及び *M. leprae* ゲノム DNA におけるトリプレットリピート配列 (TRS)。第75回日本細菌学会総会、2002年4月4日、横浜。
  3. 川上正也、A. Swierzko、M. Cedzynski、切替照雄、切替富美子：Proteus vulgaris 025 のLPSは補体レクチン経路活性化によるアナフィラクトイド反応を起こす。第75回日本細菌学会総会、2002年4月4日、横浜。
  4. 徳元康人、豊岡公德、切替照雄：結核菌の食胞内生存にかかわる宿主側因子 TACO と食胞内細菌の相互作用をリアルタイムで観察する試み。第75回日本細菌学会総会、2002年4月5日、横浜。
  5. 森那美子、人見重美、岡慎一、川畑久、豊田恵美子、倉辻忠俊、森澤雄司、奥住捷子、大塚喜人、永井英明、森亨、味澤篤、白阪琢磨、切替照雄、木村哲：HIV 陽性者から分離した *Mycobacterium* 属の分子疫学的検討。第76回日本感染症学会総会 2002年4月11日、大阪。
  6. 豊岡公德、高井伸二、切替照雄：細胞内寄生性細菌 *Rhodococcus equi* はファゴゾームの酸性化を抑制する。第55回日本細胞生物学会大会、2002年5月22日、横浜。
  7. Parniewski, P., Kai, T., Kirikae, T.: Tinucleotide Repeat Sequences in *Mycobacterium tuberculosis* and *M. leprae*. The 102<sup>nd</sup> American Society for Microbiology General Meeting, May 21, 2002, Salt Lake City, USA.
  8. Shinomiya, H., Liu, F., Nagai, K., Toyooka, K., Kirikae, T., Hirata, H.,

- Sumita, K. and Asano, Y. Differentiation-dependent expression of p65/L-plastin protein in bone marrow cell subpopulations. 11th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, June 21, 2002, Niigata, Japan.
9. Otsuka, Y., Parniewski, P., Kai, T., Fujino, T., Kirikae, F., Sekiguti, J., Ohtsuki, T., Tokumoto, Y., Kirikae, T. Characterization of a trinucleotide repeat sequence (CGG)<sub>5</sub> and its potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. 42nd Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 27-1, 2002, San Diego, U.S.A.2002.
  10. Kirikae, T, Fujino, T.: Significance of MRSA Pulse Net for hospital infection controls: different profiles of numbers, frequencies and distribution of MRSA clones among hospitals. 10th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. Tsukuba. October 18, 2002.
  11. Treeratweeraphong, V., Munsrichum, A., Chotpitayasunondh, T., Waranawat, N., Kirikae, T: *Mycobacterium* and nontuberculous mycobacterial infection from HIV-uninfected and HIV-infected children in Queen Sirikit National Institute of Child Health. 1st Asian Congress of Pediatric Infectious Diseases, Pattaya, Thailand, November 12, 2002.
  12. 関口純一郎、藤野智子、小林寅吉吉、切替照雄：院内感染多発事例起因菌であった多剤耐性緑膿菌の特性. 第 85 回日本細菌学会関東支部総会、東京、2002 年 11 月.
  13. 内記良一、豊岡公德、楊軍、切替富美子、徳元康人、切替照雄：LPS 結合タンパク質 CAP-18 は好中球からプロセッシングされずに遊離される. 第 8 回日本エンドトキシン研究会、2002 年 11 月 30 日、大阪. 公演抄録集 p31.
  14. Shirai, Y., Hashimoto, M., Kato, R., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Kirikae, T., Dohi, T.: Lipopolysaccharideinduced CD25 expression on chronic lamina propria lymphocytes.
  15. 四宮博人、Fengtzhi Liu、永井巧造、豊岡公德、切替照雄、平田肇、角田恒輔、浅野喜博：防御系細胞特異的 p65/L-plastin の感作防御における役割について. 第 32 回日本免疫学会総会、2002 年 12 月 5 日、東京.
  16. 徳元 康人、Apperly, James、Gao, Fen-Biao、Raff, Martin：サイクリン依存性キナーゼ阻害蛋白 p 1 8 と p 2 7 は転写後調節によりオリゴデンドロサイトの分化タイミングの決定に関わる。第 2 5 回日本分子生物学会年会、2002 年 12 月 13 日、横浜.
  17. 宮澤廣文、切替照雄、川名明彦、照屋勝治、桐原裕次郎、富岡譲二、中村雅美、小野瀬友子、濱敏広、此崎寿美、関口純一郎、倉辻忠俊：パルスフィールド電気泳動を用いた NICU における MRSA の病院疫学調査の結果. 第 18 回日本環境感染学会総会、横浜、2003 年

- 2月16日.
18. 関口純一郎、菊池秀子、浅黄司、藤野智子、小林寅吉吉、菊池喜博、切替照雄：クラス1 インテグロンを有する多剤耐性緑膿菌による院内感染多発事例の分子疫学解析. 第18回日本環境感染学会総会、横浜、2003年2月15日.
  19. 切替照雄、人見公代、方尾志津、藤嶋美和、高田彩里、小倉さゆり、大槻隆司、関口純一郎、小野瀬友子：手洗いの定量的評価～EBNに基づいた手洗いの評価をするために～. 第18回日本環境感染学会総会、横浜、2003年2月15日.
  20. 吉井博、藤野智子、切替照雄：一般市中病院におけるMRSA分子疫学調査結果について. 第18回日本環境感染学会総会、横浜、2003年2月16日.
  21. 関口純一郎、大槻隆司、藤野智子、切替富美子、切替照雄：ダイレクトシーケンシング法による薬剤耐性結核の迅速診断法の開発. 特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」感染症若手研究者沖縄フォーラム、沖縄、2003年1月22日.
  22. 大塚弥生、関口純一郎、大槻隆司、徳元康人、切替富美子、切替照雄：タキソール誘導体の抗菌活性の機序：微小管ホモログ FtsZ が標的分子である可能性. 特定領域研究「感染の成立と宿主応答の分子基盤」感染症若手研究者沖縄フォーラム、沖縄、2003年1月22日.
  23. 切替照雄、田村弘志、石坂彰敏：好中球由来塩基性タンパク質 CAP18 の生体内での動態と慢性肺疾患における意

義、第43回日本呼吸器学会総会、平成15年3月15日、福岡。

24. 高原誠、切替照雄：結核親子感染例におけるRFLP解析、第43回日本呼吸器学会総会、平成15年3月13日、福岡。

#### H.知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許

###### 特許出願等

切替照雄、大槻隆司、大塚弥生、根本清一、牧野 徹：特異的繰り返し配列が多数含まれる結核菌特異的遺伝子群を用いたタイピング用DNAチップおよびその利用、特願2002-284507、特許出願中

切替照雄、関口純一郎、大槻隆司：結核菌に含まれる薬剤耐性遺伝子を検出する方法、PCR用プライマーペアセット、塩基配列用プライマーセット、及び薬剤耐性結核菌の診断用試薬キット、特願2003-005370、特許出願中

以上

## 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 適正技術開発・移転研究部長

**研究要旨** 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口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。薬剤ターゲットとなりうる分子構造への DDS 開発には、その分子の免疫学的特徴を詳細に検討する必要がある。

### A. 研究目的

本研究は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を初期の目的とするが、同酵素をターゲットとした選択的な DDS の開発を、その候補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おこなう。本研究の成果が近年世界に猖獗する薬剤耐性マラリアを克服するための、新規抗マラリア薬の開発研究に基礎的な知見を提供することを期待すると共に、マラリアの病態解明・その疫学的意味論の展開へ連続する基盤研究を計画している。

### B. 研究方法

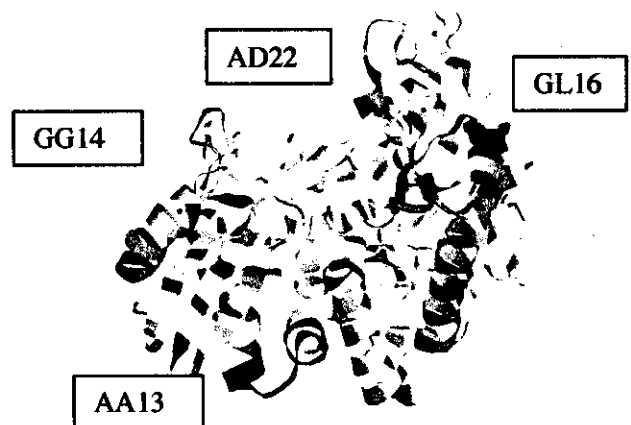
1. 大腸菌への遺伝子導入の手法により、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの組換えタンパク（リコンビナント熱帯熱マラリア原虫エノラーゼ：rPfEno）を作成した、
2. また、熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの特定部分の人工合成ペプチド（AD22, GL16, AA13 及び GG14）を作製した。
3. 上記の組換えタンパクおよび人口ペプチドの立体構造を、ホモロジー解析によるコンピューターグラフィックスおよび CD スペクトルによる解析で行った。さらには一部のペプチドは NMR による構造解析も行った。

4. さらに上記の組換えタンパクおよび人口ペプチドと、熱帯熱マラリア原虫全タンパクの粗抽出タンパクをそれぞれ抗原として、熱帯熱マラリア患者の血清抗体の反応性を ELISA 法を用いて測定した。

（倫理面への配慮）

マラリア患者血清採取にあたっては、すべて患者からインフォームドコンセントを書面で得た。また動物実験に関しては、国立国際医療センター研究所動物実験ガイドラインに従い、同研究所実験動物委員会の許可を得た。

### C. 研究結果



エノラーゼ分子の立体構造

1. 上図のエノラーゼの立体構造はホモロジーモデリングにより構築した。アミノ酸配列は Read ら(Eur J Biochem, 1994)および河津ら(GenBankAB026051)の報告をもとに、立体構造は 64%相同な配列を持つイースト由来酵素の結晶構造をもとに、アミノ酸を置換・挿入・削除した後、構造最適化を行うことで作製した。また、ヒトのエノラーゼとは配列の大きく異なるところの 4カ所を人工抗原の候補 (AD22, GL16, AA13 及び GG14) を選択した。なお、AD22 はエノラーゼの基質結合部位の一部であり、立体構造を保つ上でも重要と考えられる部分である。GG14 はその相同性が植物に見られる部位でもあるが、熱帯熱マラリア原虫が進化の過程で藻類の二次共生を受けた際に藻類との遺伝子交換が行われたものと考えられる。

AA13 に関する NMR によるペプチド骨格のコンフォーメーション解析を行い、下図のような構造を描くことが出来た。



2. フィリピン人熱帯熱マラリア患者 30 名の血清を使用し、原虫粗抗原に対する反応性を調べたところ、それらの反応性は極めて高かった。しかしながら rPfEno、AD22 に対して高い反応性を示す血清は非常に少ないことが明らかとなった。一方、AD22 と部位は異なるが同じ熱帯熱マラリア原虫エノラーゼの一部である GG14 に対しては、すべての患者血清と、それどころか対照群である健常人血清とも高い反応性を示した。rPfEno、AD22 に対して高い反応性を示したいくつかの血清の患者の末梢血中の原虫血症を調べてみると、寄生率は極めて低いことも明らかとなった。

#### D. 考察

熱帯熱マラリア原虫の解糖系酵素エノラーゼは、原虫の生存にとって必要不可欠な酵素

であるが、熱帯熱マラリア患者はマラリアの自然感染によってこの分子に一定の抗体を産生することとなる。しかしながら本研究でエノラーゼの部分ペプチドを作製し、それぞれの抗原ポリペプチドに対する患者血清の反応性を詳細に検討すると、患者はエノラーゼ分子の機能や構造上重要な部位に対して十分な抗体量を産生しない場合があることが認められた。一方、構造上あまり重要とは考えられない様な部位に対して、非常に大量の抗体が産生されることもあることが分かった。このように、原虫にとってアキレス腱ともなる部位に対して宿主が抗体を作りにくいような原虫側の仕掛けや、抗体が産生されても酵素活性に影響がない部分には大量に宿主に抗体を作らせるような抗原を配置するなど、いわゆる免疫学的スモークスクリーンと呼ばれる戦略を原虫が獲得している可能性もある。

いずれにせよ、ナノレベルの構造を把握し、その構造タンパクの抗原としての重要性を理解することが出来たので、今後どの分子に対する薬剤の開発を進めるべきかの基礎的な知見を得ることが出来たと考える。

#### E. 結論

エノラーゼを候補分子とした薬剤開発を行う上では、マラリア原虫が宿主の免疫系を効果的に回避し host-parasite relationship をより原虫有利に運ぶための戦略を良く理解し、薬剤ターゲットとなる酵素の機能上・立体構造上の重要性を把握する必要がある。増殖を有効に阻害する抗体が反応するペプチド抗原部位が薬剤ターゲット分子となりうるのではないかと想定し、その分子に選択的に薬剤が効果を及ぼすための DDS を開発してゆく。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Kokubo M, Oku H, Yamada K, Sato K, Kano S, Suzuki M and Katakai R: Synthesis of multiple-antigenic peptides having partial sequence of enolase, *In* Peptide Chemistry 2001, H. Aoyagi, ed., Protein Research Foundation, Osaka, 331-334, 2002

##### 2. 学会発表

奥浩之、野中敬祐、小久保美穂、石黒正、佐藤久美子、狩野繁之、山田圭一、片貝良一：熱帯熱マラリア原虫の解糖系酵素を標的としたペプチド抗原の合成と性質、日本化学会第 81 春季年会、早稲田大学西早稲田キャンパス、2002.3.26-29

「ペプチドを用いた細胞標的診断法及び治療法の開発」に関する研究  
分担研究者 石坂幸人 国立国際医療センター研究所 難治性疾患研究部長

研究要旨 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。今回の解析によりペプチドを用いた癌細胞の診断の道が開かれ、将来的に標的ペプチドと感温性ミセルを用いた選択的 DDS の可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

これまでの癌標的では EGF レセプター、HER2 など、標的細胞に選択的に発現する膜抗原に対する抗体を介して行われてきたが、近年抗体に代わって膜抗原に結合するペプチドを用いた標的化の可能性が明らかとなり、その簡易性と高い安全性により今後の臨床応用が期待されている。特に HER2 遺伝子産物に結合するペプチド (Nat Biotechnol, 18:194-8, 2000) は、抗体と同様 HER2 発現細胞に対して増殖阻害活性を示すことが示されている。

分担研究者はこれまでに、神経芽腫細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼ、RET に結合する 8 個のアミノ酸からなるペプチド (RBP-1) を同定し、RBP-1 がリコンビナント蛋白質に結合することを明らかにしてきた。本研究ではパイロット実験として、RBP-1 を用いた RET 陽性癌細胞の高感度検出法とペプチドを用いた標的治療法の開発を行うことを目的としている。具体的には、標的ペプチドに磁性体または感温性ミセルを付加し、MRI で診断しながら高周波照射による選択的 DDS を試みる。今年度は、RBP-1 に磁性体を付加した RBP-1/DM を作成し、ポータブル NMR による癌細胞の診断法の可能性を明らかにした。

#### B. 研究方法

Carboxy methyl dextran magnetite (以下、DM) に RBP-1 を-S-S-結合で付加し、RET 陽性細胞に対する NMR による診断法の開発を試みた。直径約 40 nm の DM に RBP-1 を結合させ、RET 陽性細胞の培養液に添加後、一晚培養した。その後、胞体内への取込を確認後、NMR (4.7 テララー) で RET 陽性細胞を観察した。

#### C. 研究成果

RBP-1/DM を RET 陽性細胞に作用させた後 4.7 テスラーの磁場を用いて MRI による画像解析を試みた。その結果 RET 依存性に磁性体が検出され、ペプチドを用いた MRI による画像診断法の可能性が示唆された。RBP-1/DM の胞体内への取込を観察したところ、RET 依存性に取り込まれることが見出された。また

一方、標的細胞に対して蛋白質を用いた形質転換を可能にするため、細胞外に添加した高分子を効率よく胞体内に輸送するためのシステムを開発した。即ち、HIV-1 の遺伝子産物のひとつである VPR 由来ペプチドをリコンビナント蛋白質に付与すると、培養液に添加するだけで、目的の蛋白質が細胞内に取り込まれることが観察された。このシステムを用いることにより、例えばアポトーシスを誘導する遺伝子産物を効率良く作用させることが可能になるものと期待される。

#### D. 考察

標的ペプチドを用いた画像診断法の可能性が明らかになった。今回 RET に結合するペプチドとして RBP-1 を用いたが、今後種々のペプチドを同定し、それぞれの腫瘍に選択的に使用する事が可能なシステムの構築を目指したい。また、形質転換因子を包埋させることが可能なナノミセルを使用し、選択的な癌治療法の開発を試みたいと考えている。

#### E. 結論

ペプチドに磁性体を付加する方法が確立できた。今後、MRI 検出感度の改良を行う一方、今回用いた磁性体を熱源とし得る高周波の波長を選定し、温熱療法の可能性を明らかにしたい。

#### F. 健康危険情報 無

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Minemoto, Y., Uchida, S., Ohtsubo, M., Shimura, M., Sasagawa, T., Hirata, M., Nakagama, H., Ishizaka, Y., and Yamashita, K. Loss of p53 Induces M-phase retardation following G2 DNA damage Checkpoint abrogation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, in press.

2. Mishima, T., Mishima, Y., Terui, Y., Katsuyama, M., Yamada, M., Mori, M., Ishizaka, Y., Ikeda, K., Watanabe, J., Mizunuma, N., Hayasawa, H., and Hatake, K.: Resistance mechanisms of CD13/



Aminopeptidase-N to apoptosis mediated by endothelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 94:1020-1028, 2002.

3. Mishima Y, Terui Y, Mishima Y, Katsuyama M, Mori M, Tomizuka H, Takizawa T, Miyazato A, Ueda M, Yamada M, Hayasawa H, Mizunuma N, Ishizaka Y, Ikeda K, Kato T, Ozawa K, Hatake K. New human myelodysplastic cell line, TER-3: G-CSF specific downregulation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase IV. *J Cell Physiol.* 191:183-190, 2002.

## 2. 口頭発表

1. Separation. Cell cycle meeting, Salk, May, (2001). Shimura, M., and Ishizaka, Y. Abnormal mitosis induced by human immunodeficiency virus accessory gene Vpr. The 18<sup>th</sup> annual meeting on oncogenes. Salk, June, (2002).
2. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常とヘテロクロマチン蛋白;HP-1 第61回日本癌学会年会. 2002年10月、東京.
3. 鈴木康哲、志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子産物 Vpr を標的としたエイズ発症予防法の開発 第25回日本分子生物学会年会. 2002年12月、横浜.
4. 志村まり、石坂幸人: HIV アクセサリー遺伝子 Vpr による細胞分裂異常とヘテロクロマチン蛋白;HP-1 第25回日本分子生物学会年会. 2002年12月、横浜.

## H. 知的財産権の出願登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得、出願準備中
2. 実用新案登録、無
3. その他、無

## 腎疾患治療に向けた DDS

分担研究者

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

### 研究要旨

本研究では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。

### A. 目的

現在、慢性糸球体腎炎や糖尿病性腎症の進行を確実に阻止する方法はなく、その多くは慢性腎不全へと移行し、人工透析や腎移植を必要とするようになる。維持透析の普及は慢性腎不全患者の生命を救うという点では画期的な方法ではあるが、患者の平均余命は依然として正常人より10年以上短いと言われており、また患者のQOLの点からも慢性腎不全を阻止することが重要な課題であることに変わりはない。ステロイド剤は種々の腎炎の治療に広く用いられているが、その副作用が大きいこともあり、その使用には種々の制限がある。また免疫抑制剤など、腎疾患の治療に用いられている他の薬剤についても、その副作用がしばしば問題となっている。これらを克服するために、本研究では腎疾患治療薬を腎の病変組織に集中する新しい手法を確立することを目的とし、そのために半導体ナノ粒子を用いた標的指向型 DDS 製剤の開発を試みる。

急速進行性糸球体腎炎は病理学的には半月体性糸球体腎炎像を呈し、発症から数週

間 数ヶ月で腎不全に至る予後の悪い疾患であるが、その一部の患者にはステロイドパルス療法が有効と言われている。しかし半月体性糸球体腎炎は比較的まれな疾患であること、進行が早いことなどの理由により、コントロールスタディは行われていない。我々はこれまで半月体性糸球体腎炎の動物モデルを用いて病理学的及び免疫組織化学的解析によりステロイドパルス療法の有効性を示した。一方、木村らは新規に開発した塩基性脂質 TRX-20 (3, 5-dipentadecyloxy-benzamidinehydrochloride) を添加したポリエチレングリコール修飾リポソームが培養腎糸球体メサンギウム細胞に選択的に取り込まれること、また、メサンギウム増殖性糸球体腎炎モデルのラットにおいては、同リポソームを尾静脈より投与すると糸球体に集積することを明らかにした。そこで本研究ではまず最初に、同リポソームにプレドニソロンを内封させたりポソーム製剤を用いて、半月体性糸球体腎炎の動物モデルに対する治療効果を通常のフリーのステロイド剤と比較した。

## B. 研究方法

カチオン化脂質 TRX を添加した PEG 修飾リポソーム (TRX リポソーム) にリン酸プレドニゾロンナトリウムを内封させた製剤を調製した。また何も内封しない空のリポソームを調整し、コントロールとした。

半月体性系球体腎炎モデルは Wistar Kyoto 系ラット (雄、90-110 g 体重) にウサギ抗ラット系球体基底膜抗血清 (20  $\mu$ L/100 g 体重) を尾静脈投与して作製した。このモデルでは、腎炎惹起後 7 日目までに尿蛋白の上昇が見られ、組織学的には単球やリンパ球の系球体への浸潤も顕著であり、多くの系球体に細胞性半月体が形成される。そこで、同モデルに対する治療効果を調べるために、腎炎惹起後 7 日目から薬剤の投与を開始し、以降は 1 週間に一度の間隔で投与を行った。すなわち、7 日目の尿蛋白を測定した後にラットを 1) 正常ラット群、2) 疾患コントロール無治療群、3) 空リポソームコントロール群、4) フリーステロイド 1 mg/kg 群 (Free-PSL/1)、5) フリーステロイド 3 mg/kg 群 (Free-PSL/3)、6) リポソーム内封ステロイド 1 mg/kg 群 (Lipo-PSL/1)、及び 7) リポソーム内封ステロイド 3 mg/kg 群 (Lipo-PSL/3) の計 7 群に分け、各治療を行った。

またラットにおけるリポソームの挙動は、ローダミン標識ステロイド内封リポソームを用いて行った。すなわち、上記と同様の腎炎モデルを惹起後、標識リポソームを投与し、24 時間後に屠殺して腎を採取した。PAS 染色を行い、同一切片上にて光顕所見及びローダミンの蛍光所見を調べた。

## C. 研究結果

半月体性系球体腎炎は管外増殖性系球体腎炎とも呼ばれるように、系球体毛細血管外 (ポーマン腔内) への炎症細胞の集積と上皮細胞の増殖が見られる腎炎である。Wistar Kyoto 系ラットに抗系球体基底膜抗血清を投与して作製する動物モデルでは腎炎惹起後 7 日目までに細胞性半月体腎炎の形態像が形成され、尿蛋白が増加した後、蛋白尿は維持され、次第に腎機能の低下が起きて血清クレアチニン値や BUN が上昇し、60~100 日目には腎不全に陥り死亡する。

3 mg/kg のリポソーム内封リン酸プレドニゾロンナトリウムを投与した Lipo-PSL/3 群は治療を開始した翌週、すなわち腎炎惹起後 2 週目から尿蛋白の増加が有意に抑制されたのに対し、空リポソーム群、リン酸プレドニゾロンナトリウム生食溶液投与群、及び 1 mg/kg リポソーム内封リン酸プレドニゾロンナトリウム投与群では全く抑制されず、疾患コントロール群と同程度であった (表 1)。この傾向は実験を終了した 6 週目まで続き、Lipo-PSL/3 群では 2 週目以降の尿蛋白の増加がほぼ完全に抑制された。一方、他の群では、6 週目に空リポソーム群と 1 mg/kg リポソーム内封リン酸プレドニゾロンナトリウム投与群で若干低い値を示したのを除き、最後まで全く抑制が見られなかった。

また BUN を指標とした腎機能低下に対する効果においてもリポソーム製剤は有効性を示した (表 2)。すなわち、Lipo-PSL/1 群及び Lipo-PSL/3 群では 3 週目から 6 週目まで BUN の上昇が有意に抑制され、特に Lipo-PSL/3 群ではほぼ正常値で推移した。Free-PSL/3 群も 3 週目及び 6 週目の時点で有意な抑制が見られたが、その程度は弱かつ

た。また6週目の血清クレアチニン値については Lipo-PSL/3 群でのみ有意な抑制が見られたが、他の群では疾患コントロール群と差はなかった。以上の結果から、臨床的パラメータに対する効果はリポソーム内封ステロイド剤が有意に優れていることが明らかとなった。

次に半月体に対する治療効果を見るために、6週目に屠殺したラットの腎の PAS 染色光顕像を調べた。その結果、疾患コントロール群では多くの糸球体に半月体の形成が見られたのに対し、Lipo-PSL/3 群では有意に抑制されていた（疾患群、 $63.0 \pm 6.1$  vs. Lipo-PSL/3 群、 $28.8 \pm 11.1$ ,  $p < 0.05$ ）。我々のこれまでの研究の結果、半月体形成は腎炎惹起後7日目までには多くの糸球体で起きていることから、今回の結果はリポソーム内封ステロイド剤は半月体形成を抑制したのではなく、既に形成された半月体を治癒させたものと考えられる。

ステロイド剤の抗炎症効果を見るために、糸球体内の白血球数を免疫組織学的に測定した。その結果、糸球体内の単球/マクロファージ数は未治療群に比べて、リポソーム群はいずれも少なかった（未治療群、 $25 \pm 3$ ；、Lipo-PSL/1 群、 $20 \pm 3$ ,  $p < 0.01$ ；、Lipo-PSL/3 群、 $17 \pm 1$ ,  $p < 0.0001$ ）。一方リン酸プレドニゾロンナトリウム生食溶液群はいずれも未治療群と比較して有意差はなかった（Free-PSL/1 群、 $25 \pm 3$ ；Free-PSL/3 群、 $23 \pm 1$ ）。糸球体内 CD4 陽性細胞数は生食溶液群、リポソーム群ともに未治療群に比べて有意に少なく、また Lipo-PSL/3 群では他の治療群に比べて有意に少なかった（未治療群、 $2.9 \pm 0.6$ ；Free-PSL/1 群、 $1.8 \pm 0.1$ ,  $p < 0.0001$ ；Free-PSL/3 群、 $1.7 \pm 0.4$ ,  $p < 0.0001$ ；Lipo-PSL/1 群、 $1.8$

$\pm 0.3$ ,  $p < 0.0001$ ；Lipo-PSL/3 群、 $1.2 \pm 0.2$ ,  $p < 0.0001$  vs 未治療群、 $p < 0.05$  vs 他治療群)。また CD8 陽性細胞数についても Free-PSL/1 群を除き、他の治療群で有意に減少していた（未治療群、 $4.4 \pm 0.5$ ；Free-PSL/1 群、 $4.1 \pm 0.2$ ,  $p > 0.05$ ；Free-PSL/3 群、 $3.6 \pm 0.6$ ,  $p < 0.01$ ；Lipo-PSL/1 群、 $3.2 \pm 0.3$ ,  $p < 0.0001$ ；Lipo-PSL/3 群、 $2.7 \pm 0.3$ ,  $p < 0.0001$ ）。また Free-PSL/3 群に比べて Lipo-PSL/3 群は有意に少なかった（ $p < 0.001$ ）。尚、空のリポソーム投与群は未治療群と比べていずれの数値においても差はなく、上記の治療効果はリポソームに内封したステロイド剤によることが示された。

最後に半月体性糸球体腎炎モデルにおいて、ステロイド内封リポソームが糸球体に集積しているか否かをローダミン標識したリポソームを用いて検討した。その結果、ローダミンの蛍光が糸球体に集積している像が観察されたことから、同モデルにおいても本リポソーム製剤は糸球体指向性を示すことが確認された。

以上の結果から、半月体性糸球体腎炎のモデルにおいて、ステロイド内封リポソームは疾患糸球体に集積する性質を示し、そのために、フリーのステロイド剤に比べて臨床的及び病理学的な治療効果が高いことが明らかとなった。

#### D. 考察

ステロイド剤は抗炎症作用、免疫抑制作用が強い反面、易感染性などの副作用も強いためにその多用には問題が多い。本研究は糸球体に指向性を有すると考えられるリポソームにステロイド剤を内封させることにより、副作用を抑えて効果的に糸球体障

害を抑制することを試みた。その結果同製剤が、糸球体毛細血管壁の障害に起因し上皮細胞の増殖と白血球浸潤が顕著な半月体性糸球体腎炎において糸球体指向性を示し、フリーのステロイド剤に比べて有意に良好な治療効果を示すことが明らかとなった。

近年、生体内で安定なリポソームを製造する技術が開発されたことにより、リポソームの実用化への道が開かれた。特に、この過程で開発された PEG 修飾リポソームは、その長期循環型の性質と、適当な粒径により、結果的に標的組織にかなりの量が集積する、パッシブターゲティング製剤となった。このような標的組織集積性は、必要な場所に、必要な時間、必要な量だけ、薬物を作用させるという DDS の理想に明らかに一步近づいた成果である。さらに本研究では、カチオン化脂質 TRX を導入したリポソームを用いた。この TRX 含有 PEG 修飾リポソームは *in vitro* 及び *in vivo* において糸球体メサンギウム細胞に対して指向性を示す。本研究に用いた半月体性糸球体腎炎モデルではメサンギウム細胞の障害が起きている可能性は低いですが、糸球体毛細血管壁の障害が起き、半月体ができていることからその血管透過性が亢進していることは確実であり、リポソームがメサンギウム細胞に接触する確率が上昇していることも十分に考えられる。今後、このような可能性も含め、半導体ナノ粒子で標識したりリポソームなどを用い、リポソームの挙動を詳細に検討する予定である。

#### E. 結論

半月体性糸球体腎炎の動物モデルにおいて、リポソームに内封したステロイド剤は

疾患糸球体に選択的に集積し、フリーのステロイド剤に比べて良い治療効果を示すことがわかった。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

なし

表1. リポソーム封入ステロイド剤の尿蛋白に対する効果

	0W	1W	2W	3W	4W	5W	6W
Normal	1.0±0.5	1.9± 0.7	4.7± 1.4	7.1± 3.0	12.2± 3.7	14.0± 1.5	24.9± 2.8
Disease cont.	0.7±0.4	41.6± 57.6	138.4± 35.1	177.0± 50.2	243.2± 57.9	265.0± 61.3	443.8± 88.8
Lipo-only	0.4±0.6	44.9± 74.5	155.6± 55.6	158.9± 66.6	169.6± 88.9	182.3± 102.8	271.2± 129.1*
Free-PSL/1	0.7±0.4	33.3± 20.3	160.5± 33.7	206.9± 54.3	259.6± 86.4	315.6± 112.0	457.3± 115.9
Free-PSL/3	0.9±0.5	32.0± 12.7	141.5± 66.0	194.2± 97.2	220.2± 116.4	236.8± 128.5	389.0± 204.3
Lipo-PSL/1	1.2±0.5	32.8± 12.0	142.5± 28.9	157.3± 45.0	176.6± 70.0	175.0± 79.2	272.3± 98.1*
Lipo-PSL/3	0.9±0.4	32.7± 11.9	65.4± 33.5*	57.5± 32.3**	54.6± 22.6***	58.6± 25.1***	77.1± 34.0***

\*, p<0.05; \*\*, p,0.01; \*\*\*, p<0.001 vs. disease control.

表2. リポソーム封入ステロイド剤の血液尿素窒素値 (BUN) に対する効果

	3W	4W	5W	6W
Normal	13.6± 2.2	13.7 ± 3.3	15.1± 2.4	16.4± 1.3
Disease control	24.9± 8.1	23.3 ± 8.2	26.2± 6.2	31.2± 6.7
Liposome only	21.2± 7.9	19.6 ± 6.5	23.5± 7.3	24.9± 6.7*
Free-PSL/1	22.8± 3.0	24.1 ± 5.1	25.1± 5.8	28.9± 5.2
Free-PSL/3	18.0± 5.0*	18.8 ± 6.6	20.4± 5.7	24.9± 5.3*
Lipo-PSL/1	17.2± 4.3*	15.8 ± 3.5*	18.3± 4.3*	20.3± 4.2**
Lipo-PSL/3	17.4± 2.1*	14.9 ± 2.1*	15.5± 2.8**	15.7± 1.7***

\*, p<0.05; \*\*, p<0.01; \*\*\*, p<0.001 vs. disease control.

## 角化細胞の分化・誘導と付属器の誘導の評価

分担研究者 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長

### 研究要旨

角化細胞の新しい幹細胞マーカーを見つけるために ES 細胞から角化細胞を誘導する系を確立した。また表皮細胞と間葉系細胞を混合してヌードマウス背部のシリコンチェンバ 内に移植し、発毛を検討した。細胞移植の足場として PGA 含有コラーゲンスポンジを用いて有用性を示した。

### A. 研究目的

ケラチノサイトの幹細胞については生物学的にまだ不明な点が多い。新しい幹細胞マーカーを見つけるために ES 細胞から角化細胞を分化誘導する方法を確立すること目的とする。

また付属器をもった培養皮膚を開発するためには発毛させる実験系が必要である。未分化な細胞を用いて in vivo で発毛させる系を構築することを目的とする。

### B 研究方法

#### 1. ES 細胞から角化細胞の誘導

マウス ES 細胞 (D3) を PA6 の feeder layer 上で培養し、BMP4 などのサイトカインを加えて、ケラチン 14 の発現を免疫染色並びに RT-PCR にて経時的に追い、角化細胞に分化する条件を検討した。DMEM に ITS を加えたものを基本培地として用い、BMP4 を 0.01-100ng/ml で至適濃度を検討した。

#### 2 発毛誘導

マウス胎児期 (E17.5 前後) の表皮細胞と間葉系細胞をバラバラにした後、再び混合してヌードマウス背部のシリコンチェンバ 内に移植し、発毛を検討した。細胞移植の足場として

従来のコラーゲンスポンジと PGA 含有コラーゲンスポンジとを用いて比較検討した。ヒトの培養細胞の組み合わせでも試みた。

(倫理面への配慮)

今回用いた、マウス ES 細胞は市販のものを使用したため、特別な倫理上の配慮は要しないものと考えた。実験に用いたマウスは動物実験委員会の承認を得て、愛護上の配慮をもって行った。

### C 研究結果

#### 1 ES 細胞から角化細胞の誘導

マウス ES 細胞を PA6 の feeder layer 上で培養し、ケラチン 14 の発現を検討した。BMP4 の濃度は 1-10ng/ml でケラチン 14 陽性細胞が 12-14 日の培養で出現した。またケラチン 14 のプロモーターに GFP をレポーターとするプラスミドを作成し、ES 細胞に導入して蛍光色素による選別法を開発中である。

#### 2 発毛誘導

マウス胎児の表皮細胞と間葉系細胞 (毛乳頭細胞) を混合して移植することにより、2-3 週間で発毛がみられた。細胞がチェンバ ーから漏れ出たり、偏ったりするのを防ぐために、通常のコラーゲンスポンジを足場として用いると表皮嚢腫の形成が増加した。ポリグリコール酸を加えたコラーゲンスポンジでは細胞の漏出

が抑制され、正常な発毛がみられた。ヒトの培養細胞の組み合わせでは発毛がみられなかった。

#### D 考察

従来の ES 細胞から角化細胞を誘導する系は胚様体(Embryoid body)を介して4週間程度かかるものが報告されているが、今回の我々の系は2週間で角化細胞が出現したことが特筆される点である。マウスの胎生期において10日前後でケラチン14の発現がみられることから、我々の確立した培養系は *in vivo* の発生過程に近づいたといえる。まだ角化細胞への分化が100%ではないので、分化効率を高める必要がある。さらに誘導された角化細胞を大量に増やすためには培養液を改良する必要がある。同様に feeder layer を用いない系で、かつ無血清培地で角化細胞に誘導する実験系も検討中である。今後 differential display 法などにより角化細胞の新しい幹細胞マーカーを検討していきたいと考えている。

*In vitro* で発毛させる系は存在しないので *in vivo* で発毛する系を構築した。細胞の足場としてコラーゲンスポンジを用いたが、予想に反して表皮嚢腫が多発した。この原因として培養液に浸軟させるとスポンジがつぶれてしまい、細胞の自由な動きが制限された可能性が考えられた。PGA 含有コラーゲンスポンジは培養液を加えても形状を保つことができたので、正常な発毛を誘導できたと考えた。ヒトの培養細胞の組み合わせでは発毛がみられなかった原因として、表皮細胞の分化能力が毛乳頭細胞の毛髪誘導能力が低下していると考えられた。

#### E 結論

ES 細胞から角化細胞を誘導する系を新たに構築するとともに、付属器の *in vivo* での誘導系も確立した。

#### F 健康危険情報

特になし。

#### G 研究発表

##### 1 論文発表

Yano, S., Komine M, Fujimoto M, Okochi, H., Tamaki, K: Interleukin 15 induces the Signals of Epidermal proliferation through ERK and PI3-kinase in human epidermal keratinocyte cell line, HaCaT *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301:841-847, 2003  
Yano S, Nakamura K, Okochi H, Tamaki K: Analysis of the expression of cutaneous lymphocyte-associated antigen on the peripheral blood and cutaneous lymphocytes of alopecia areata patients. *Acta Derm Venereol* 2002;82:82-85

大河内仁志 天疱瘡・類天疱瘡 薬学部学生のための臨床医学テキスト 文光堂 印刷中

大河内仁志 糖尿病性潰瘍 難治性皮膚疾患をなおすスキル 文光堂 印刷中

大河内仁志 皮膚の幹細胞と再生医療 最新医学 印刷中

大河内仁志 毛髪の再生医療 遺伝子医学 印刷中

大河内仁志 皮膚と再生医療 日皮会誌 113:247-251, 2003

大河内仁志 毛髪の再生にむけて 臨床現場での再生医療の最前線 羊土社 p84-88 2003年3月

大河内仁志 皮膚にある幹細胞と再生医療への応用 *BIO Clinica* 18:76-80, 2003



大河内仁志 皮膚を幹細胞ソースに

Doctor's magazine 38:38-39, 2002

大河内仁志 皮膚に存在する多能性幹細胞

Medical Practice 19:1220-1221, 2002

大河内仁志 皮膚の幹細胞について 日本臨

床皮膚科医学会雑誌 72:92-96, 2002

大河内仁志 若年性類天疱瘡 最新皮膚科学

体系6 水疱症 膿疱症 中山書店

p 117 120 2002年5月31日

大河内仁志 薬物による粘膜障害、物理化学的

粘膜障害 今日の皮膚疾患治療指針 第3版

医学書院 p 669 672 2002年6

月1日

2学会発表

Okochi H: A keratinocyte outgrowth system

useful as a new tool for analyzing

proliferation, migration and

differentiation

Timberline Symposium 2003 2003年2月3日

ポートランド (米国)

G 知的所有権の取得状況

なし

分担研究報告書

中空ナノ粒子によるピンポイントDDS

分担研究者：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)

研究要旨：

本研究では、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、酵母細胞表層ディスプレイシステムを開発した。

A. 目的：

遺伝子治療は、癌などの難治療性疾患における有望な治療法として期待されている。このため、各種のウイルスを利用した遺伝子治療用ベクターが開発され、その有効性が示されてはいるものの、患部近傍の正常な細胞にも非特異的に遺伝子が導入されることにより、思わぬ副作用が起こることが問題となっている。また、ウイルスに由来するDNAが持ち込まれる可能性があることは、より重大な安全上の問題である。こうした点を解決するために、本研究では、ウイルスの感染効率に着目して、ウイルスのLタンパク質からなるタンパク質中空ナノ粒子を酵母により生

産し、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手法を開発することを目的とする。酵母でSタンパク質を発現させて作られる粒子は、以前よりHBワクチンとして利用されてきており、その安全性が示されてきている。また、肝臓以外の標的細胞への遺伝子・薬剤のピンポイント導入を可能とするため、細胞特異的なレセプター分子を、酵母細胞表層提示系を用いたコンビナトリアル・バイオケミストリーの手法で創製し、タンパク質中空ナノ粒子に組み込むことを目指す。

B. 研究方法：

### (1) タンパク質ナノ粒子によるヒト肝細胞特異的な遺伝子導入

L タンパク質を酵母で発現させた。この酵母を破碎して、塩化セシウムおよびスクロース超遠心分離超遠心分離を繰り返すことで、L タンパク質ナノ粒子を得た。この精製された L 粒子を原子間力顕微鏡 (AFM) 等によって観察した。また L タンパク質ナノ粒子を、導入する遺伝子 (ここでは、グラゲ緑色蛍光タンパク質 GFP の動物細胞発現用ベクター) と混ぜてエレクトロポレーションすることで、遺伝子を封入した粒子を調製した。この遺伝子封入粒子を、ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 の培養液に加えて 2 日間培養したのち、GFP 由来の蛍光を蛍光顕微鏡で観察した。次に GFP 遺伝子導入粒子を、ヒト肝臓癌由来細胞 HuH-7 および大腸癌由来細胞 (WiDr: 対照) を移植した担癌ヌードマウスとヌードラットに投与した。粒子の投与はその到達能力を調べるために、尾静脈から行った。投与後 2 週間で、腫瘍を切除して組織内の蛍光を観察した。

### (2) 酵母細胞表層ディスプレイ系の開発

酵母細胞表層の  $\alpha$ -アグルチニン C 末端領域およびフロッキュリン Flo1 の各種タンパク質を用いた、酵母細胞表層に提示するプラスミドの構築を行った。多様なタンパク質の細胞表層ディスプレイが可能であることを確認するため、各種酵素等の発現用プラスミドを構築した。次に、各プラスミドを酵母に酢酸リチウム法により形質転換し、目的タンパク質が酵母細胞表層に提示されている確認を行った。形質転換体を坂口フラスコを用

いて、100ml の SDC 培地(0.67% yeast nitrogen base w/o amino acid, 0.5% glucose, 2.0% casamino acids)で培養を行った後、蛍光標識抗体を用いて発現タンパク質を免疫染色し蛍光顕微鏡にて確認した。あわせて、細胞表層からの抽出タンパク質のウエスタンブロットティングによる解析を行うとともに、各種発現酵素の活性測定を行った。また、細胞表層ディスプレイしたタンパク質間の相互作用が検出できるかを、抗体結合タンパク質 (ZZ) および抗体の Fc 提示酵母の相互作用による凝集体形成により確認した。

### C. 研究結果：

#### (1) タンパク質ナノ粒子によるヒト肝細胞特異的な遺伝子導入

L タンパク質を酵母で発現させた場合、可溶性タンパク質の 42% 程度まで生産した。この酵母を破碎して、超遠心分離を繰り返すことで、L タンパク質ナノ粒子を得ることができた。この精製された L 粒子を AFM 等によって観察すると、粒子径は 50-500 nm 程度であり、約 110 個程度の L タンパク質から形成されていることが分かった。また L タンパク質ナノ粒子に GFP の動物細胞発現用ベクターを封入した粒子を調製して、ヒト肝臓癌由来細胞株 HepG2 の培養液に加えて 2 日間培養すると、GFP 由来の強い蛍光が細胞に観察された。一方、対照用のヒト以外の肝細胞では導入が見られなかった。そこで、次に GFP 遺伝子導入粒子を、ヒト肝臓癌由来細胞 HuH-7 および大腸癌由来細胞 (WiDr: 対照) を移植した担癌ヌードマウスとヌードラットに尾静脈から投与し、2 週間後に、腫

瘍を切除して組織内の蛍光を観察すると、HuH-7細胞のみで特異的に GFP が発現していることが明らかとなった。

## (2) 酵母細胞表面ディスプレイ系の開発

分子量や由来の異なる各種タンパク質の細胞表面発現系を導入した酵母では、いずれの場合も、免疫蛍光染色後の蛍光顕微鏡観察では、酵母の細胞表面に蛍光が見られ、細胞表面発現が確認できた。また、多くのタンパク質は、その活性を示すことから、細胞表面に活性を保持した状態でディスプレイできることが明らかとなった。分子量に関してもペプチドの様な小さなものから、分子量 14 万程度の大きなものまでディスプレイ可能であった。また、複数のサブユニットから構成されるタンパク質のディスプレイも可能であることが明らかとなった。さらに ZZ タンパク質提示酵母及び、Fc 部位提示酵母を混合培養した場合、Fc-ZZ 間相互作用により酵母が凝集体を形成することが示され、細胞表面ディスプレイ系により相互作用解析が可能になったことが明らかとなった。

## D. 考察：

酵母で生産した L タンパク質ナノ粒子は、肝臓特異的な遺伝子導入に有効であることが、培養細胞レベルおよび動物実験レベルで明らかになったと言える。特に、尻静脈からの投与で目的部位のみにピンポイントで遺伝子導入できた点は重要である。さらに、現在、pre-S1 領域の一部を各種のリガンドに置き換えることで、特異性を変換した各種ナノ粒子を作製するために基本となる発現系を

構築するため、欠失変異体の作製を行っている。抗原性の問題等、解決すべき点は多いが、タンパク質ナノ粒子は、ピンポイント DDS の有力な手法の一つに発展するものと期待される。一方、酵母細胞表面提示技術により、各種の機能性タンパク質の細胞表面における機能評価が可能になった。このシステムは特異的な相互作用を起こすレセプター分子のコンビナトリアル・バイオケミストリーによる探索に有用な分子ツールとなるものと期待される。

## E. 結論：

L タンパク質ナノ粒子は、肝臓特異的な遺伝子導入に有効であると言える。さらに臓器特異的な、レセプター分子を酵母表面ディスプレイ系で創製し、これをタンパク質中空ナノ粒子の特異性決定領域に挿入することで、様々な臓器にピンポイント遺伝子導入が可能となると考えられ、広範囲な DDS に有用なキャリアーナノ粒子となるものと期待される。

## F. 健康危険情報：

無し

## G. 研究発表：

### 1. 論文発表

- 1) Kohda, J., Endo, Y., Okumura, N., Kurokawa, Y., Nishihara, K., Yanagi, H., Yura, T., Fukuda, H., and Kondo, A. (2002) Improvement of Productivity of Active Form of Glutamate Racemase in *Escherichia coli* by Coexpression of