

- Folding Accessory Proteins., *Biochemical Engineering Journal*, **10(1)**, 39-45.
- 2) Kondo, A., Shigechi, H., Abe, M., Uyama, K., Matsumoto, T., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Kishimoto, M., and Fukuda, H. (2002) High-Level Ethanol Production from Starch by a Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strain Displaying Cell-Surface Glucoamylase., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58(3)**, 291-296.
 - 3) Fujita, Y., Katahira, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Fukuda, H., and Kondo, A. (2002) Construction of Whole-Cell Biocatalyst for Xylan Degradation through Cell-Surface Xylanase Display in *Saccharomyces cerevisiae*., *Journal of Molecular Catalysis B*, **17(3-5)**, 189-195.
 - 4) Nam, J., Fujita, Y., Arai, T., Kondo, A., Morikawa, Y., Okada, H., Ueda, M., and Tanaka, A. (2002) Construction of Engineered Yeast with the Ability of Binding to Cellulose., *Journal of Molecular Catalysis B*, **17(3-5)**, 197-202.
 - 5) Kohda, J., Kawahara, N., Fukuda, H., and Kondo, A. (2002) Effect of Oxidized and Reduced Forms of *Escherichia coli* DsbC on Protein Refolding., *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **94(2)**, 130-134.
 - 6) Matsumoto, T., Fukuda, H., Ueda, M., Tanaka, A., and Kondo, A. (2002) Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain., *Applied and Environmental Microbiology*, **68(9)**, 4517-4522.
 - 7) Fujita, Y., Takahashi, S., Ueda, M., Tanaka, A., Okada, H., Morikawa, Y., Kawaguchi, T., Arai, M., Fukuda, H., and Kondo, A. (2002) Direct and Efficient Production of Ethanol from Cellulosic Material with a Yeast Strain Displaying Cellulolytic Enzymes., *Applied and Environmental Microbiology*, **68(10)**, 5136-5141.
 - 8) Sato, N., Matsumoto, T., Ueda, M., Tanaka, A., Fukuda, H., and Kondo, A. (2002) Long Anchor Using Flo1 Protein Enhances Reactivity of Cell Surface-Displayed Glucoamylase to Polymer Substrates., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60(4)**, 469-474.
2. 学会発表
- 1) セルロース結合ドメインの組換えによる高機能性エンドグルカナーゼの構築、伊藤純二・藤田靖也・福田秀樹・上田充美・近藤昭彦、化学工学会 第 68 年会 (2002)
 - 2) セルラーゼ群共提示酵母による不溶性セルロースからの直接エタノール生産、藤田靖也・福田秀樹・上田充美・近藤昭彦、化学工学会 第 68 年会 (2002)
 - 3) ドラッグデリバリーを目指した特異性改変型 B 型肝炎表面抗原中空ナノ粒子の開発、村岡優・上田政和・妹尾昌治・谷澤克行・黒田俊一・福田秀樹・近藤昭彦、化学工学会 第 68 年会 (2002)

- 4) コンビナトリアル・ライブラリーを用いたエタノール耐性酵母の育種、石川真也・松本健史・福田秀樹・近藤昭彦、化学工学会 第35回秋季大会 (2002)
- 5) リパーゼ表層提示酵母を用いたエナンチオ選択的エステル合成、松本健史・中村由利絵・福田秀樹・近藤昭彦、化学工学会 第35回秋季大会 (2002)
- 6) タンパク質中空ナノ粒子を用いた遺伝子導入効率の検討、山田忠範・岩路秀彦・上田政和・妹尾昌治・谷澤克行・黒田俊一・近藤昭彦・福田秀樹、化学工学会 第35回秋季大会 (2002)
- 7) ウイルスタンパク質ナノ粒子を用いたピンポイント DDS、近藤昭彦、公開シンポジウム「バイオイメージングとナノテクノロジー」(2003)
- 4) 「タンパク質中空ナノ粒子を用いた肝臓疾患治療用薬剤」黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、妹尾昌治、岩路秀彦、特許出願 2002-97457

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

- 1) 「中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質を融合させた薬剤」黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、妹尾昌治、多田宏子、特許出願 2002-97280
- 2) 「増殖因子等を提示するタンパク質中空ナノ粒子を用いた治療薬剤」黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、妹尾昌治、岩路秀彦、特許出願 2002-97395
- 3) 「抗体を提示するタンパク質中空ナノ粒子を用いた治療薬剤」黒田俊一、谷澤克行、近藤昭彦、上田政和、妹尾昌治、岡島俊英、特許出願 2002-97424

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)
分担研究報告書

腎・血管に関する DDS

分担研究者：鈴木 和男 国立感染症研究所 生物活性物質部 室長

Tel: 03-5285-1111 内線 2329 Fax: 03-5285-1160 E-mail: ksuzuki@nih.go.jp

研究要旨：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ぼ確立した。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。

尚、本研究は、長尾朋和、越尾修（以上、国立感染研）、山本健二（国立国際医療センター）、大野尚仁、三浦典子（東京薬大）、高橋啓、大原関利章、直江史郎（以上、東邦大・医・大橋病院）、南谷晴之（慶応義塾大学・院基理工）、馬淵綾子（日医大・微生物免疫）、中山俊憲（千葉大・院医）各博士の協力のもとに行なわれた。

A. 研究目的

腎炎をはじめ全身性の血管炎の発症要因には、好中球殺菌酵素の自己抗体の産生に関与することをこれまでに報告してきた (Tomizawa et al. *J Clin. Immunol.* 18, 142-152, 1998、および Fujii et al. *Clin.*

Nephrology 53, 242-252, 2000)。好中球殺菌酵素の不全は、重篤な免疫不全の誘発に加え、自己抗体の産生に関与し、難治性血管炎の発症およびその要因になっていることが強く示唆されている。すなわち、好中球自己抗体 (anti-neutrophil cytoplasmic antibodies:

ANCA) が好中球を活性化し、血管炎の発症に関わっているのではないかと指摘されている。

カンジダ菌成分 (*Candida albicans* derived substances (CADS)) の接種によって冠状動脈炎を発症するモデルマウスにおいて、血管炎発症にともない、好中球抗体 MPO-ANCA が誘導される。この MPO-ANCA 上昇には、MPO が関与してことを MPO ノックアウトマウス (MPO-KO) に CADS を接種して証明した (Inflammation 25:381,2001)。

一方、血管炎の病態には、活性化好中球や ANCA のクロナリティーが関連しており、 γ グロブリンなどの治療法の有効性を検討する必要性があった。また、これら治療が実際の血管傷害修復の局所に DDS されているかをふくめ明らかにする必要がある。しかし、これまでの治療の評価や血管炎発症機構の理解は、病理学的解析あるいは *in vitro* での細胞機能やサイトカインの解析によっていた。そこで、本研究では、腎炎モデルマウスを作製して、薬剤などの DDS を直接イメージング観察するシステム (*in vivo* イメージング) を確立するとともに、血管内皮細胞の apoptosis カスケードを解析することにより、血管炎発症機構を検討することにした。本年度は、特に、*in vivo* における好中球活性化による血管傷害機構の解明を目的とし、腎微小血管傷害の誘導とその血流動態について検討した。

B. 研究方法

- 1) 血管炎モデルマウスの調整: 本疾患モデルは、川崎病リスクの冠状動脈炎発症モデルとして作られ、罹患児糞便から分離した *C. albicans* 由来物質 (CADS および CAWS) を投与して誘導した。
- 2) *In vivo* イメージング: C57BL/6 マウス (オス、9 週齢) に CAWS (150 mg/mouse) を iv 投与し、その 3 時間後に anti-mMPO (1 mg/mouse) を iv 投与した。その 5 日後、同様に CAWS と anti-mMPO を投与した後、加えて fMet-Leu-Phe (FMLP, 10^8 mol/mouse, 細菌由来トリペプチド) を iv 投与し、その 3 日後に腎表面における血流状態を観察した。血流の可視化には FITC-dextran を用い、各マウスの腎表面における尿細管周囲毛細血管の血流を観察した。観察される血流動態は顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影し、DVD に録画した。
- 3) 血管内皮細胞 (HUVEC) apoptosis にかかわるシグナルの変動の解析: 抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法により MAPK 活性および Caspase 活性を測定した。

C. 研究結果

in vivo イメージングにおいては、CAWS、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe の投与によって、腎微小循環が悪化してくる様子が観察された (図1左)。

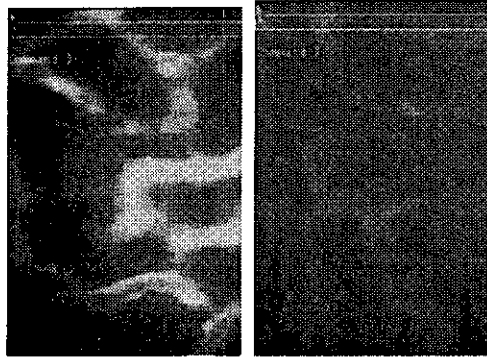


図1 CAWS 誘導の腎血管傷害の

in vivo イメージング

左：CAWS + anti-mouseMPO+ fMet-Leu-Phe の投与による状態。右：PBS コントロール

また、in vivo イメージングの解析では、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた (図1左)。

また、腎臓表面血管の流速の変化も CAWS+ anti-mouseMPO+ fMet-Leu-Phe の時に、悪化することがわかった (表1)。具体的には、血流速度の低下・血流停止・血液の逆流等の現象が観察され、CAWS または FMLP 単独投与の場合と比較し、両者に加えて anti-mMPO を投与した場合に血流停止が誘発され (観察した血管の約 10%)、広範囲にわたる腎表面血流の悪化が観察された (約 30%)。さらに、この腎微小循環

の悪化には血管内皮への白血球の接着を伴ったものも見られた。

表1. 腎臓表面血管の流速の変化

	Incidence (%)	
	Occlusion	Abnormal
Control	4	5
CAWS		
+anti-mMPO		
+FMLP	8	28
CAWS+anti-mMPO	10	11
CAWS	4	8
FMLP	2	9
SCG	6	33

さらに、内皮細胞傷害に関与する MAPK のカスケードを検討した。その結果、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化は、Caspase8 と連動する p38MAPK が関与していた (図2)。また、好中球や脱顆粒成分によっても、この反応が誘導された。

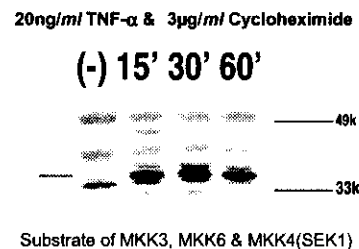


図3. p38MAPK のリン酸化

D. 考察

CAWS、anti-mouseMPO および fMet-Leu-Phe を投与し、*in vivo* イメージングすることにより、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流が観察され、腎表面血流の停止や血管内皮への白血球の接着も見られた。この *in vivo* での現象が、腎血管傷害の誘導を説明できると思われるが、分子機構との関係を明らかにする必要があり、さらに検討する必要がある。CAWS および anti-mMPO によって誘導される腎微小血管傷害誘導モデルを用いた *in vivo* イメージングの解析から、種々の血管炎治療の際に薬剤の DDS を評価できることが示された。また、*in vivo* イメージングから、血管内皮細胞の関与が示唆されることから、血管内皮細胞のアポトーシスに関わるシグナル伝達の変化を解析、Caspase8 と連動する p38MAPK の関与が明らかとなった。この分子を標的とした薬剤の DDS の評価法として利用可能と考えられる。以上から、本研究により開発した *in vivo* イメージングによる評価法は、IVIg をはじめ腎炎、血管炎の治療の DDS の評価や、治癒機転を解析する上で、新しい *in vivo* の評価系として有用であると思われる。

E. 結論

本研究における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・血管表面での分子の DDS 状態を解析することを可能にした。これにより、腎炎・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を用いて、本 *in vivo* イメージングを新しい DDS 評価法として確立することをめざす。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. Mie Ito, Oda, Yamagoe S, Suzuki K, Tanokura, M. Expression, oxidative refolding and characterization of six-histidine-tagged recombinant human LECT2, a 16 kDa chemotactic protein with three disulfide bonds. Protein Expression Purif. in press.
2. Frederik Vilhardt, Olivier Plastre, Makoto Sawada, Kazuo Suzuki, Maciej Wiznerowicz, Etsuko Kiyokawa, Didier Trono, and Karl-Heinz Krause. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. J Biol. Chem. 277: 42136-43, 2002.

3. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med. Mycol.* 40: 557-563, 2002.

4. Kohji Ichimori, Naoto Fukuyama, Hiroe Nakazawa, Yasuaki Aratani, Hideki Koyama, Shunya Takizawa, Yosuke Kmeoka, Akiko Ishida-Okawara, Fumikazu Kohi and Kazuo Suzuki. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* in press.

5. Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M.C., Maeda, N., and Koyama, H : Critical role of myeloperoxidase and NADPH-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J.*

Infect. Dis. 185: 1833-1837, 2002:

6. A. Ishida-Okawara, T. Oharaseki, K. Takahashi, Y. Hashimoto, Y. Aratani, H. Koyama, N. Maeda, S. Naoe, K. Suzuki. Contribution of myeloperoxidase to coronary artery vasculitis associated with MPO-ANCA production. *Inflammation* 25: 381-387, 2001.

7. 鈴木和男:SCG/Kj マウスと ANCA 関連血管炎—血管炎病態に関与する好中球機能：動物モデルを用いた 解析から—
リウマチ科 28:560-577, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

半導体ナノ粒子の安全性の検討

研究分担者 太田敏博 (東京薬科大学・生命科学部 助教授)

研究要旨

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 g/ml 以上の濃度で細胞毒性を示し、250 g/ml 以上の濃度で DNA 損傷性が認められた。ZnS には DNA 損傷性は認められず、TOPO は高濃度で DNA 損傷性が認められた。遠心分離によって TOPO, ZnS を除いた QD 懸濁液を用いた場合にも、細胞毒性と DNA 損傷性が確認されたことから、QD には DNA を損傷する作用があると考えられた。

A. 目的

セレン化カドミウムの半導体ナノ粒子は UV を照射すると、その粒径に応じて可視光領域で発光波長が変化する特徴を有する。半導体ナノ粒子は極めて耐光性が高く長時間露光によって劣化しないため、蛍光標識試薬として用いられる FITC やローダミン等の有機色素に比べて、遙かに長時間の蛍光観察が可能である。この性質を利用して、親水加工した半導体ナノ粒子で標識することによる蛍光抗体法、DNA に標識することによる FISH 法など生体への応用研究が進められている。しかしこれらの新規化合物の毒性について

は全く調べられていない。またこれらの物質が環境中に放出された場合の生態系への影響についても未知である。本研究では、まずヒト培養細胞を用いて親水加工したナノ粒子およびこのサンプル中の混在物の DNA 損傷性の有無についてコメットアッセイで調べることを目的とした。

B. 研究方法

(1) 材料

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) を用いた。この QD サンプル中には製造過程で使用された Trioctylphosphine oxide (TOPO)、硫化亜鉛 (ZnS) および親水加工が不十分な QD が相当量含まれている。8.9 mg の QD サンプルを滅菌 Milli-Q 水に懸濁し、vortex で十分に分散させた。マイクロチューブ用遠心機で 10,000 rpm で 20 分間、室温で遠心した。沈殿した TOPO, ZnS および親水加工が不十分な QD を除き、上清の親水化 QD を回収した。沈渣の乾燥重量は 3.0 mg で、上清の QD 濃度は重量の 66% であると計算された。QD が培養液中の NaCl と反応して凝集沈殿するのを防ぐため、血清アルブミン (BSA) を最終濃度 0.5 mg/ml となるように加えた。また比較実験として、QD サンプルを BSA 含有滅菌 Milli-Q 水に懸濁しただけのもの、TOPO (和光純薬工業)、ZnS (和光純薬工業) を用いた。TOPO はアセトンに溶解して、また、ZnS は滅菌 Milli-Q 水に懸濁して用いた。

ヒト培養細胞である WTK-1 細胞を用いた。WTK-1 細胞は 1990 年、Little らによって WIL-2-NS 細胞のチミジンキナーゼ遺伝子 (*tk*) をヘテロに改変した細胞株である。WIL-2-NS 細胞は p53 に異常を持つことが知られており、遺伝性貧血患者 (男性) のリンパ芽球様細胞を EB ウィルスによって樹立された WIL-2 細胞に由来する。WTK-1 細胞は *tk* 遺伝子突然変異試験に有用であるばかりではなく、染色体構成も近 2 倍

体であることから染色体異常試験にも利用可能であり、またコメットアッセイなどにも利用されている。この細胞は浮遊細胞であるため、少量の培養液中で高濃度の QD 処理が可能である。Ham's F12 培地 (日水製薬) に 10% fetal bovine serum (FBS、Armour Pharmaceutical Co., U.S.A.) を加えた培養液で 37°C、5% CO₂ インキュベーター中で培養した。

(2) 方法

WTK-1 細胞を種々の濃度の QD (または TOPO, ZnS) で 4 時間処理した。細胞の生存率は trypan blue 排除法によって調べた。溶解した 1% GP-42 agarose (半井化学) の 75 μ l を全面フロストスライドガラス (マツナミ) の上に置き、もう一枚のスライドガラスを重ねてアガロースを薄く広げ、室温で固化させた後、上のスライドガラスを外して第一層ゲルを作製した。処理細胞液を等量の 2% 低融点 agarose-LGT と混合し、その 75 μ l を同様の方法で第一層の上に広げて第二層ゲルを作製した。さらに、75 μ l の 1% GP-42 agarose を重曹して第三層ゲルを作製した。作製したアガロースゲルスライドを核溶解液 (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Trizma, 1% sarkosyl, 10% DMSO, and 1% Triton X-100, pH 10) に浸して、遮光条件下で 4°C、60 分間処理した。アガロースゲルスライドをサブマリン型電気泳動槽に移し、

氷冷した泳動バッファー (300 mM NaOH and 1 mM Na₂-EDTA, pH >13) を加え、0℃で 20 分間静置 (遮光) して DNA の unwinding を行わせた。0℃低温インキュベーター内 (遮光) で 25 V で 20 分間の定電圧電気泳動を行った。アガロースゲルスライドを中和液 (400 mM Trizma, pH 7.5) に移し 10-20 分間静置した。スライドを取りだし 20 g/ml ethidium bromide 液を 50 μl 滴下し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で観察した。核から流れ出た DNA 断片のテールの長さ (migration) を 50 個の細胞について計測した。結果は ANOVA および Dunnett の方法で統計処理して有意差検定を行った。

C. 研究結果

(1) QD

懸濁した QD では 125、250、500、1000、2000 g/ml の 5 濃度で処理を行った。4 時間処理で 1000 g/ml で強い細胞毒性が現れ生存率は 1/3 に低下した。また 2000 g/ml では全細胞が死滅した。DNA 損傷の指標となる migration の長さは 250 g/ml 以上で有意に長くなり、 comet assay は陽性の結果を得た。

一方、10000 rpm で遠心した上清画分に存在する親水化 QD では、83、165、330、660、1320 g/ml の 5 濃度で処理した。細胞毒性については 660 g/ml 以上の用量で 20-28% の生存率の低下が認められ

た。また、migration の長さについてもこの用量で有意差が認められ、 comet assay の結果は陽性であった (Table 1)。

(2) TOPO

62.5、125、250、500、1000 g/ml の 5 濃度で処理を行った。500 g/ml 以上の用量で 20-23% の生存率の低下が認められた。この用量においては migration の長さが 45 mm であり対照群の 25 mm に較べ有意に長くなり、 comet assay の結果は陽性であった (Table 1)。

(3) ZnS

62.5、125、250、500、1000 g/ml の 5 濃度で処理を行った。顕著な細胞毒性も認められず、また comet assay の結果も陰性であった (Table 1)。

D. 考察

comet assay は単一細胞ゲル電気泳動法とも呼ばれ、アルカリ条件下で細胞核を電気泳動して、核から流れ出てくる DNA 断片の量を可視的に測定する方法である。この方法では被験物質処理で生じた DNA 切断だけでなく、塩基が脱落した AP 部位もアルカリ処理によって DNA 鎖切断として検出が可能であるため、DNA 損傷性の検出感度が高い。

親水加工 CdSe/ZnS ナノ粒子の懸濁液では

250 g/ml以上の濃度でDNA損傷性が認められた。一方、ZnSにはDNA損傷性は認められず、TOPOは500 g/ml以上の濃度で弱いDNA損傷性が認められた。遠心分離によってTOPOおよびZnSを除いたQD懸濁液を用いた場合にも、660 g/ml以上の濃度でDNA損傷性が確認された。このことから、懸濁液で認められたDNA損傷性はサンプル中に混在するTOPOのものではないと推定され、親水加工QDには高濃度でDNAを損傷する作用があると考えられた。今後、粒径が異なるQDについても毒性の強弱を比較し、QDのDNA損傷性を確認する必要があると考えられる。

ところで今回検出されたDNA損傷作用は、その全てが細胞に致死作用を及ぼすわけではない。正常細胞においては、細胞が有する様々なDNA修復機能が働いてDNA切断部位は再結合され、AP部位には元通りの塩基が挿入され、損傷のほとんどが修復される。またDNA損傷がひどくて修復が困難な細胞はアポトーシスで死滅し、新たな分裂細胞によって置き換えられる。したがって、生じたDNA損傷が遺伝子の変異として固定されて、生存する細胞が出現する頻度は非常に低いと考えられる。したがって、QDによって誘発されたDNA損傷が、染色体の構造異常の誘発や遺伝子突然変異につながるものであるかについての詳細な検討が必要である。今回使用したWTK-1細胞では、*tk*遺伝子をヘテロでもっているためこれを指標にして遺伝

子突然変異を測定することができる。また、染色体構成も近2倍体であることから染色体異常試験にも利用可能である。今後、これらの試験を行ってQDの遺伝毒性を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

親水加工CdSe/ZnSナノ粒子には高濃度でDNA損傷性があると考えられた。その作用メカニズムについては不明であるが、生じたDNA損傷に起因して遺伝子突然変異や染色体異常が引き起こされるか否かについて、さらに詳細な検討が必要であると判断された。

F. 健康危険情報

今回用いたナノ粒子の懸濁液には高濃度においてヒト培養細胞に対して細胞毒性ならびにDNA損傷を誘発する作用が認められている。DNA損傷は細胞が有する修復機能によってそのほとんどが直され、また損傷のひどい細胞は死滅する。したがって、遺伝子の変異として固定されて生存する細胞が出現する頻度は非常に低いと考えられるが、今後、染色体の構造異常の誘発や遺伝子突然変異を指標にした系での詳細な検討が必要である。十分なデータをもとに毒性評価がなされるまでは、取り扱い、廃棄には注意すべきであると考えられる。

G. 研究発表

学会発表

日本環境変異原学会 第 31 回大会
(2002. 11. 27-29、東京)

CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討

和田栄子¹、佐々木有¹、花木賢一²、山本健二²、太田敏博³

(¹ 八戸高専、² 国際医療センター研、³ 東薬大)

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

遺伝子ベクターとしての高分子ナノ粒子

分担研究者 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

研究要旨： 我々は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。

A. 目的： 遺伝子導入ベクターとしてウィルスベクターが広く用いられているのは、ウィルスがその外殻によって内包する遺伝子を外部環境から隔離していること、内包する遺伝子を効率よく折り畳み、非常に小さなサイズにすること、細胞内移行がスムーズに行われることなどの性質を持っているからである。しかし、近年のウィルスベクターに対する安全性に関する懸念から、ポリマーを用いたベクターの開発が注目されるようになってきた。ポリマーベクターはウィルスベクターに比し、安全性、免疫原性、多量に化学合成できることなどの面で利点を有するが、発現効率が充分でないと言われている。本研究は、循環器疾患に対する遺伝子治療を目的とし、カチオニックポリマーとポリエチレンイミンのブロック共重合体を用い、安全で効率の良い遺伝子導入ベクターの開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法：カチオニックポリマーとしてポリLリジンを用い、ポリエチレンイミンとのブロック共重合体と DNA との複合体を作製した。この複合体は透過電子顕微鏡で直径 100nm のナノ粒子を形成した。このナノ粒子が血中で安定に存在する条件を見出すために、マウス尾静脈より投与、経時的に採血、サザンブロッティングを行った。*in vitro* および *in vivo* のナノ粒子形成条件と遺伝子発現の関係を探るため、リポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、ルシフェラーゼ活性測定にて遺伝子発現効率を判定した。*In vitro* 遺伝子発現としては、Hep G2 細胞へのトランスフェクションを行った。*In vivo* 遺伝子発現は、上腸間膜静脈からの投与を行った。

C. 研究成果：ナノ微粒子のターンオーバースタディより、PLL の長さは、19 マーと 48 マーでは 48 マーのものが血中安定性

が高く、DNA と PLL のチャージ比率は 1 : 4-1 : 8 のものが 1 : 1-1 : 2 のものより安定であることがわかった。in vitro における遺伝子発現を HepG2 細胞を用いて行った。遺伝子発現効率は、図 1 に示すようにチャージ比率が 1 : 2-1 : 4 のもので最大であった。フリーのポリマーとの preincubation により遺伝子発現効率が低下したことより、PIC ミセルによる遺伝子導入は、カチオニックポリマーの静電相互作用によりおこるものであることが示唆された。in vivo における PIC ミセルの遺伝子発現をマウスを用いて検討した。CMV-Control を用い、チャージ比率が 1 : 0-1 : 6 の PIC ミセルを上腸間膜静脈から投与したところ、図 2 に示すように 1 : 4 のもので肝臓に著明な活性を認めた。その他の臓器においては有為な活性の上昇を認めなかった。以上より、PIC ミセルは遺伝子導入ベクターとして in vitro および in vivo で有用であることが示唆された。

D. 考察：ポリマーベクターとしてポリリンジンを用い、遺伝子導入を行う技術は既に報告があるが、その問題点としてポリマーのカチオンと DNA のアニオンが等価であれば、沈澱をひきおこすこと、カチオンが過剰であれば、血中のアニオン性蛋白質と容易に結合して巨大分子となり、網内系から取り除かれることが知られている。本研究に用いているブロック

共重合体は、カチオンとアニオンが等価であっても沈澱を引き起こさないこと、カチオンが過剰である条件下でもポリエチレングリコールの存在により、表面電位は 0 に近いことから、遺伝子を血中で安定に存在させることを可能にしていると考えられる。また、in vitro および in vivo での遺伝子導入も可能であることが示された。これらのことから、今後はリガンドの導入などにより、ターゲティングが可能になると考えられる。

E. 結論：ナノ粒子が血中で安定に存在し得ること、in vitro および in vivo での遺伝子導入が可能であることが示された。リガンドの導入を含めた組織特異的遺伝子導入を行うことの基礎技術が確立したと考えられる。

F. 健康危険情報：特になし

G. 研究発表：

1)論文発表

1. Harada-Shiba M, Takagi A, Miyamoto Y, Tsushima M, Ikeda Y, Yokoyama S, Yamamoto A: Clinical features and genetic analysis of autosomal recessive hypercholesterolemia. J. Clin. Endocrinol. Met. in press

2. Harada-Shiba M, Yamauchi K, Harada A, Takamisawa I, Shimokado K, Kataoka K: Polyion complex micelles as vectors in gene therapy. Pharmacokinetics and in vivo gene transfer-. Gene Therapy 9: 407-414, 2002

2)学会発表

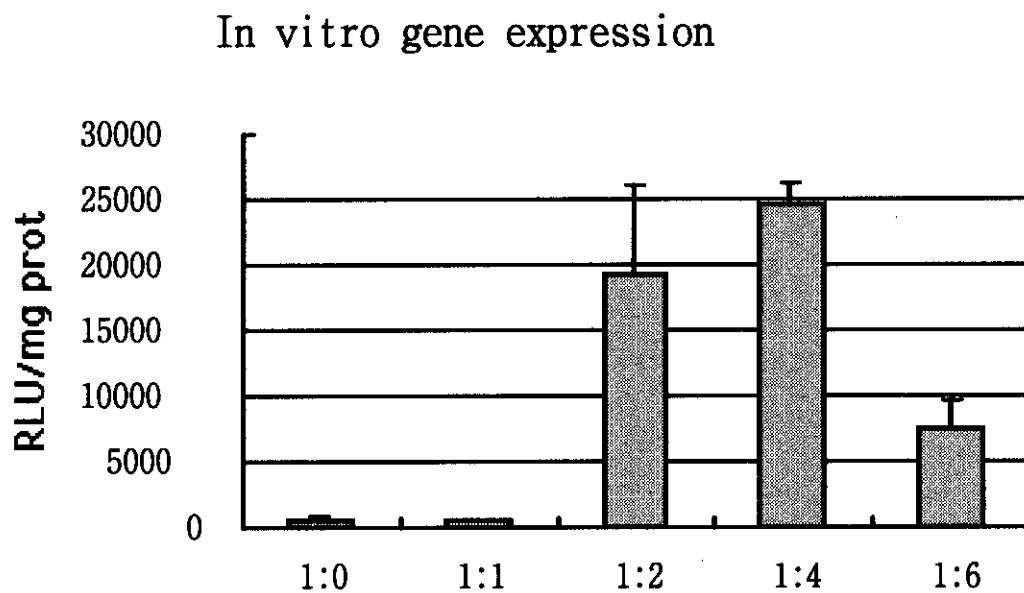
1. 高見澤格、陳偉、神野桂子、斯波真理子
Surfactantを用いた筋肉での遺伝子発現増
強効果 第34回動脈硬化学会総会

2. 斯波真理子 遺伝子導入ベクターとして
の高分子なナノミセル箱根山ワークショッ
プ

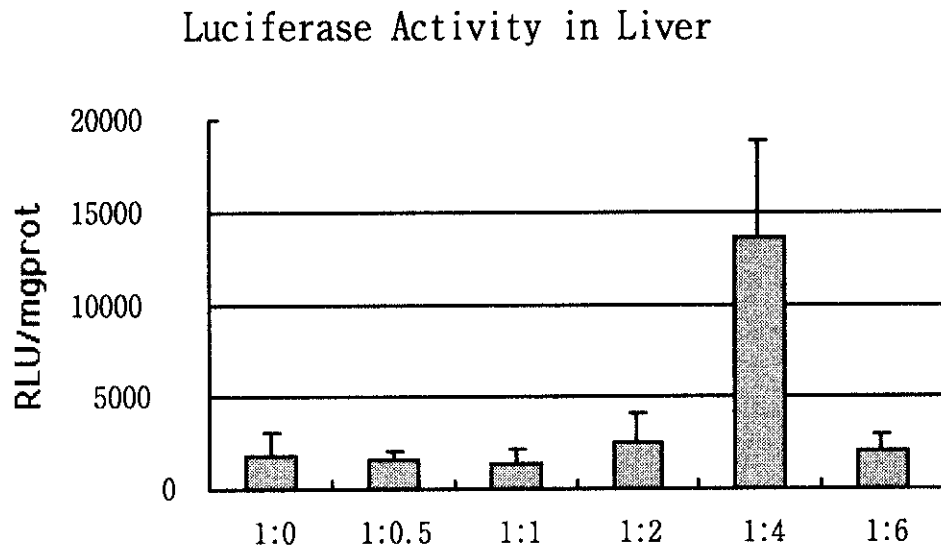
H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 「筋肉注射による遺伝子治療の効果を
増強する方法」特許出願中

図1



☒2



高分子ナノミセルによる遺伝子デリバリー

分担研究者 片岡 一則 東京大学大学院工学系研究科 教授

本研究の目的は、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

近年、ナノテクノロジーという百万分の一ミリ規模の超微小スケールでの集積化技術が長足の進歩を遂げつつある。本分担研究請者である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は、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。

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（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。

B. 研究方法

1) PEG-PLL を用いた高分子ミセル型ベクターの血中動態評価

高分子ミセル型ベクター調製条件を確立した poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine) ブロック共重合体(PEG-PLL)と pDNA からなる高分子ミセル型ベクターに関して、*in vivo* における血中動態を評価した。balb/c マウス尾静脈よりミセルを投与し、一定時間経過後 pentobarbital 麻酔下、下大静脈より血液試料を採取した。また、肺、肝臓、脾臓を摘出した。血液ならびに各臓器における DNA 分布の検定は southern blotting 法により行い、検出には Fuji Imaging Plate を用いた。各臓器における遺伝子発現はホモゲナイズした摘出臓器についてルシフェラーゼ活性を測定する事によって行った。

2) 種々カチオン性連鎖を有する新規ブロック共重合体合成法の検討

種々カチオン性連鎖と PEG からブロック共重合体の新規合成手法を検討した。合成手法が確立されている PEG-poly(β -benzyl-L-aspartate) ブロック共重合体 (PEG-PBLA) の PBLA 連鎖の側鎖へエステルアミド交換反応により種々カチ

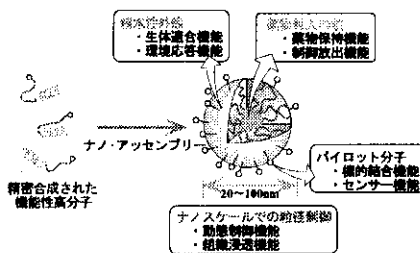


図 高分子ナノテクノロジーに基づく超機能化高分子ミセルの創製

オン性物質を導入することにより、同一重合度を有しカチオン性ユニットの構造だけが異なる PEG-ポリカチオンブロック共重合体を合成した(下の合成経路参照)。DMF 中で、PEG-PBLA と 1 級アミノ基を有する 6 種類の試薬をそれぞれ BLA ユニットに対して 10 倍量添加し、40°C で 24 時間反応後、0.01N HCl に対して透析、凍結乾燥することにより白色の粉末を得た。得られた粉末について ¹H NMR 測定を行い、構造の確認を行った。

3) 高分子ミセル型ベクターの調製

pDNA 溶液(10mM TrisHCl,pH7.4)に対し、混合時のカチオン電荷と pDNA のアニオン電荷の比(混合電荷比: $r = [\text{cation unit}] / [\text{Nucleotide}]$)が様々な値となるようにブロック共重合体溶液(10mM Tris-HCl,pH7.4)を加え、DNA 濃度一定で様々な混合電荷比(r)の高分子ミセルを調製し、動的光散乱法によって平均粒径を決定した。

4) 二重蛍光標識 pDNA を用いた蛍光顕微鏡による細胞内動態評価法の確立

Label-IT Nucleic Acid Labeling Kit を用いて、fluorescein と Cy3 の二重蛍光標識を施した pDNA と polyplex 型ベクターとして用いられている linear poly(ethylene imine) (L-PEI)、branched PEI (B-PEI)、PLL の 3 種のカチオン性高分子の間で形成される polyplex の細胞内動態を蛍光顕微鏡で FITC および Cy3 の分布を観察し、両者の像を画像処理することによって細胞内動態の比較を行った。

C. 研究結果

1) PEG-PLL を用いた高分子ミセル型ベクターの血中動態評価

各種荷電比の異なる PEG-PLL 系ミセル型ベクターについて、循環血中での安定性を評価したところ、これまでの物性評価において single plasmid complex を形成する臨界 r 値である 2 を越える組成のミセルに内包された pDNA は安定に super coil 状態を保持出来ることが明らかとなった。投与 15 分後においてフリーの pDNA は完全に分解しているのに対して、 $r > 2$ 以上の組成のミセル系で super coil が安定に存在している事が明らかである。また、肝臓におけるルシフェ

ラーゼの発現が 3 日の間持続することも判明した。これは、高分子ミセル型ベクターの構造的特徴に起因する効果であると考えられる。

2) ブロック共重合体のカチオン性連鎖の検討

これまでに polyplex 型ベクターに関する研究は数多くあり、ポリカチオンの化学構造・分子量が異なる場合には、遺伝子ベクターとしての機能は異なってくるということは明らかなことである。本研究で検討を行う高分子ミセル型ベクターに関しても、これは共通して当てはまる事項であると考えられる。しかし、従来の合成手法では、カチオン性連鎖の化学構造が異なるブロック共重合体は個別に重合反応を行う必要があり、異なる重合度(分子量)のカチオン性連鎖となってしまう、厳密にはカチオン性連鎖の化学構造の効果だけを議論することはできない。これは、ブロック共重合体だけでなく、カチオン性高分子全般に関して共通する問題点であり、最適な遺伝子ベクターを構築するためにこの問題点を克服する合成手法の確立が重要である。そこで、ブロック共重合体を合成した後に、側鎖の官能基を変換することによって重合度が同一で種々化学構造を有するカチオン性連鎖を有する PEG-ポリカチオンブロック共重合体の合成法を検討した。Ar 下 DMF 中で PEG-PBLA の PBLA 連鎖のベンジルエステルと 1 級アミノ基を有する化合物とのエステルアミド交換反応を行うことにより 1 級アミノ基を有する化合物がアミド結合を介して PBLA 側鎖に導入可能であることが確認された。検討を行った 6 種類の化合物は 1 級アミノ基とともに異なる pKa 値を示すカチオン性部位を有しており、得られたブロック共重合体から調製された高分子ミセル型ベクターは、異なる遺伝子ベクター特性(遺伝子発現効率や細胞内動態)を示すと予想される。

エステルアミド交換反応により得られたブロック共重合体と pDNA からの高分子ミセル型ベクター形成に関して動的光散乱測定により評価した結果、いずれのブロック共重合体に関しても平均粒径 100nm 程度の高分子ミセル型ベクターが形成されることが確認された。

3) 二重蛍光標識 pDNA を用いた蛍光顕微鏡による細胞内動態評価法

蛍光色素 (FITC, Cy3) で二重標識された pDNA は、ポリイオンコンプレックスを形成していない状態においては、分子内の蛍光分子間の距離が離れているため、蛍光エネルギー移動現象は生じないが、ポリイオンコンプレックスを形成すると、pDNA が凝縮状態となるため、蛍光分子間の距離が近くなり、FITC から Cy3 への蛍光エネルギー移動が生じる。つまり、FITC を励起した場合、FITC の蛍光の一部は Cy3 へ移動するため、結果として FITC の蛍光強度が減少することになる。このような現象を利用した細胞内動態評価手法の確立を検討した。

カチオン性高分子としては、L-PEI, B-PEI, PLL の 3 種を用い、二重標識 pDNA との間で polyplex を調製した。これらを細胞に播種し、蛍光顕微鏡により FITC, Cy3 それぞれの細胞内分布を一定時間ごとに観察した。観察後、FITC, Cy3 それぞれの像の輝度の比を取った像を画像処理により得た。その結果、PLL に関しては、エンドソーム内で蛍光エネルギー移動が生じていることが確認され、pDNA は polyplex 中に凝縮状態とどまっている事が示された。これは、PLL との polyplex が安定であるために解離せず、エンドソームから脱出できていないことを示唆している。これに対し、L-PEI 系と B-PEI 系は、いずれの場合もエンドソームから細胞質へ脱出し、一部の pDNA が核近傍へも分布していることが観察されたが、細胞質内での polyplex からの pDNA 放出の様子が異なることが示唆された。この蛍光二重標識 pDNA を用いた細胞内動態評価結果は各の遺伝子発現効率の違いと良い相関を示しており、各種 polyplex 型ベクターの構造—機能相関を明らかとする新しい細胞内動態評価手法として有用であることが確認された。

D. 考察

1) 達成度について

PEG-PLL 系に関しては、高分子ミセル型ベクターの in vivo での有用性が確認された。また、より有用なブロック共重合体の開発を目的として、カチオン性連鎖の構造制御が可能なブロック共重合体の合法手法が確立され、更に、高分子ミセル型ベクターの調製が可能であることが確認された。また、

蛍光エネルギー移動に基づく新しい細胞内動態評価手法も確立されるなど、当初目標を上回る達成度であると考えられる。

2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

凝縮状態にある遺伝子 DNA を親水性外殻が包み込むというウイルス類似の明確な二相構造を特徴とする高分子ミセル型ベクターは溶解性、安定性、生体適合性のいずれにおいても従来から知られている合成ベクターの特性を凌駕するものであり、特に、本年度得られた成果である in vivo における安定性と遺伝子導入活性の確認は、本システムの将来の臨床応用にとって特筆すべき意義を有している。本研究の成果は国際的にも注目されており、6. 研究発表の項に示すように国外における国際研究集会での多数の講演招請という形で表れている。

3) 今後の展望について

次年度以降は、エステル—アミド交換反応により得られるブロック共重合体を用いて様々な物性を有する高分子ミセル型ベクターを調製し、その物理化学的特性解析及び in vitro 遺伝子発現効率を評価する。また、今年度確立された細胞内動態評価法を利用して、細胞内分布や核内移行等の intracellular trafficking についても検討を行う。さらに、環境応答機能などを付与したシステムの構築を目指したブロック共重合体の構造設計を行うとともに、動物実験による in vivo 評価を行い、臨床へ向けた最適な高分子ミセル型ベクターシステムを構築していく。

E. 結論

以上のように、本研究を通じて、高分子ミセル型遺伝子ベクターの生体条件における安定性ならびに遺伝子導入活性を確認する事が出来た。更に、ポリカチオン構造の制御に基づいて広範な性質を有するミセル型ベクターの構築が可能である事が明らかとなり、臨床応用へ向けた素地が築かれたと言える。

F. 健康危険情報

本研究では健康に危険を及ぼす可能性は皆無である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Otsuka, E. Uchimura, H. Koshino, T. Okano, K. Kataoka, Anomalous binding profile of phenylboronic acid with N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) in aqueous solution with varying pH, *J. Am. Chem. Soc.*, **in press**
- 2) N. Nishiyama, F. Koizumi, S. Okazaki, Y. Matsumura, K. Nishio, K. Kataoka, Differential gene expression profile between PC-14 cells treated with free cisplatin- and cisplatin-incorporated polymeric micelles, *Bioconjugate Chemistry*, **ASAP on the Web**
- 3) G.-D. Zhang, N. Nishiyama, A. Harada, D.-L. Jiang, T. Aida, K. Kataoka, pH-sensitive assembly of light-harvesting dendrimer zinc porphyrin bearing periphery groups of primary amine with poly(ethylene glycol)-b-poly(aspartic acid) in aqueous solution, *Macromolecules*, **36**(4), 1304-1309 (2003)
- 4) E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles exhibit fast-rate binding and high affinity towards a protein bed simulating a cell surface. A surface plasmon resonance study, *Bioconjugate Chemistry*, **14**(1), 177-186 (2003)
- 5) N. Nishiyama, H. R. Stapert, G.-D. Zhang, D. Takasu, D.-L. Jiang, T. Nagano, T. Aida, K. Kataoka, Light-harvesting ionic dendrimer porphyrins as new photosensitizers for photodynamic therapy, *Bioconjugate Chemistry*, **14**(1), 58-66 (2003)
- 6) E. Jule, Y. Nagasaki, K. Kataoka, A surface plasmon resonance study on the interaction between lactose-installed poly(ethylene glycol)-poly(D, L-lactide) block copolymer micelles and lectins immobilized on a gold surface, *Langmuir*, **18**(26), 10334-10339 (2002)
- 7) Y. Yamamoto, K. Yasugi, A. Harada, Y. Nagasaki, K. Kataoka, Temperature-related change in the properties relevant to drug delivery of poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles in aqueous milieu, *Journal of Controlled Release*, **82**(2-3), 359-371 (2002)
- 8) K. Itaka, A. Harada, K. Nakamura, H. Kawaguchi, K. Kataoka, Evaluation by fluorescence resonance energy transfer of the stability on nonviral gene delivery vectors under physiological conditions, *Biomacromolecules*, **3**(4), 841-845 (2002)
- 9) Y. Kakizawa, K. Kataoka, Block copolymer self-assembly into monodisperse nanoparticles with hybrid core of antisense DNA and calcium phosphate, *Langmuir*, **18**(2), 4539-4543 (2002)
- 10) M. Harada-Shiba, K. Ymauchi, A. Harada, K. Shimokado, K. Kataoka, Polyion complex micelles as a vector for gene therapy -Pharmacokinetics and in vivo gene transfer-, *Gene Therapy*, **9**(6), 407-414 (2002)
- 11) Y. Kakizawa, K. Kataoka, Block copolymer micelles for delivery of gene and related compounds, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**(2), 203-222 (2002)
- 12) N.-P. Huang, G. Csucs, K. Emoto, Y. Nagasaki, K. Kataoka, M. Textor, N. D. Spencer, Covalent attachment of novel poly(ethylene glycol)-poly(DL-lactic acid) block copolymeric micelles to TiO₂ surfaces, *Langmuir*, **18**(1), 252-258 (2002)

2. 学会発表

- 1) K. Kataoka, Development of a non-viral gene vector based on the self-assembly of charged block copolymers, Symposium on "Carrier-based Drug Delivery" (223rd Spring National Meeting of American Chemical Society), Orlando, Florida, USA, 2002.4.9 (招待講演)
- 2) K. Kataoka, N. Nishiyama, H. R. Stapert, G.-D. Zhang, D.-L. Jiang, T. Aida, Polyion complex micelles encapsulating light-harvesting ionic dendrimer