

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者

山 本 健 二

平成16（2004）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. 半導体などナノ粒子による DDS 研究班

#### 1) 半導体などナノ粒子による生物・医療応用

山本 健二(国立国際医療センター研究所・部長) . . . . . 11

#### 2) ヒト血液細胞などに対する遺伝子導入効率改善による効果的 DDS 技術開発

湯尾 明(国立国際医療センター・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) . . . 19

#### 4) QD を用いた in vivo 細胞トラフィックの解析

土肥 多恵子(国立国際医療センター研究所・消化器疾患研究部・部長) . . 23

#### 5) ペプチド標的治療に対するモニターリング法の可能性

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・部長) . . . 27

#### 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) . . . . 29

#### 7) 正常ヒト角化細胞と線維芽細胞における半導体ナノ粒子の取り込み

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) 31

#### 8) ピンポイント DDS

近藤 昭彦(神戸大学工学部教授) . . . . . 35

#### 9) CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討

太田 敏博(東京薬科大学・生命科学部・助教授) . . . . . 39

#### 10) 血管炎発症治療にかかわる DDS 機構のイメージング

鈴木 和男(国立感染症研究所・生物活性物質部・室長) . . . . . 43

#### 11) 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・部長) . 55

### 2. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

#### 1) アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

落谷 孝広(国立がんセンター研究所・室長) . . . . . 57

- 3. ナノミセルによる DDS
  - 1) 遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価  
 斯波 真理子(国立循環器病センター研究所・室長) . . . . . 61
  - 2) 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー  
 片岡 一則(東京大学大学院工学系研究科・材料学・教授) . . . . . 65
- 4. 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 73

### Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷 . . . . . 105

## 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（医療センター研究所・感染熱帯病研究部・部長）

土肥多恵子（医療センター研究所・消化器疾患研究部・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）

近藤昭彦（神戸大学工学部科化学工学科・教授）

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. アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS 研究班

落谷孝広（国立がんセンター研究所・がん転移研究室・室長）

#### 3. ナノミセルによる DDS 研究班

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）

#### 4. 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

近年様々な新規機能材料が開発され、産業に利用されようとしている。これらの新規材料は、エネルギー、IT、生物・医療等様々な分野で従来の効率を遥かに上回る可能性のあるものばかりである。その新規機能材料の一つに量子ドットがある。我々が製造している量子ドットは、当初一回の製造で50mg程度であったが、現在1g程度製造できる状態であり今後近い将来大量に製造されることとなるだろう。このような新規材料を作るにあたって安全性は、重要課題である。ひとつは、製造者の健康に関する労働安全上の問題であり、

もう一つは、製造する一方で廃棄されその結果環境への影響である。この2点について手これまでのところデータが十分出されていない。

これにたいし本研究で我々は、細胞毒性について閾値が存在することを示した。幾つかの内分泌攪乱の場合には閾値が存在しないことが知られているため、その物質を産業に利用することは不可能である。今回我々の量子ドットで閾値が存在することを示し安全な基準目標を設定することが可能と成り産業化への道につながることを発見は意義あることである。今後さらに微生物や、動物個体への影響を調べる必要がある一方、この細胞毒性のメカニズムを解明することが量子ドットを人類が利用するにあたって最重要課題である。

この半導体ナノ粒子をはじめ、下記に示しているように本研究では、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロック共重合体を用いた薬剤伝達システムの開発を行っている。

### 1) 半導体ナノ粒子を用いた薬剤伝達システムの開発

Cd/S、白金/鉄、シリコン、シリコン/チタンなどの半導体ナノ粒子を用いた生物・医療応用は、日本、米国、欧州共同体において、その他の産業分野と同じく凌ぎを削って開発競争をしている。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) アテロコラーゲンナノ粒子を用いた薬剤伝達システムの開発

バイオマテリアルの一種であるアテロコラーゲンは、生体コラーゲンの抗原性のある両端を加水分解させたポリマーであり、DNA と相互作用して複合体を形成し、効率よく細胞に取り込まれた後、遺伝子を発現させる能力があることを明らかにしてきた。アテロコラーゲンは複合体を形成した DNA の細胞への取り込み、酵素分解に対する抵抗性、さらには徐放効果を促進する働きがあるため、遺伝子治療用ベクターの生体内へのデリバリー方法として優れている。さらに最近この複合体はナノサイズの粒子を形成することが明らかとなり、疾患部位に応じた様々なデリバリーシステムの構築が可能であることを意味する。この複合体の粒子形成の詳細な検討を行い、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA の遺伝子医薬の安定なナノ粒子形成の条件設定を行っており、十分な成果を達成した。

### 3) ブロック共重合体を用いた遺伝子伝達システムの研究開発

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。

## A. 研究目的

### 1) 研究の背景

昨年度より我々は、現在飛躍的な進歩を遂げているナノテクノロジーを利用し、薬剤を効率良く患部に運び、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薬剤伝達システムの開発を行っている。副作用を軽減し、安全で効率の良い治療が可能となるよう、研究開発を続けている。またこれまで摂取した薬剤が必要な部位以外にの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、薬剤として利用可能となるように考えている。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必要となり、それを行っている。

### 2) 目的

ナノ粒子の利用法について近年様々な展開が見られる。例えば量子ドットについて考えてみた場合、量子メモリー、RGBの量子ドットを用いたディスプレイ等の工業的利用、プローブとしてのイメージング技術への応用やドラッグデリバリーシステムのキャリアーとして等の生物・医療応用など幅広い分野に渡っている。

特徴のある新規材料を利用するにあたって、現在知られていない様々な性質が存在すると考える。今後これら新規材料の製造過程、利用方法、廃棄に於ける安全性の検討が必要となてくるだろう。またこのような新規材料を再利用するなどリサイクルについての技術開発も必要である。それと同時にバイオナノテクノロジーなど新規分野は、様々な学術バックグラウンドが必要でありこの分野の技術開発には、異分野の融合が必要である。特に化学工学と生命科学との連携が重要であると考え。ま

た後継者となる研究者の養成が必要であると考え。原子力、航空宇宙、情報工学の3分野が、これまでに発展してきたようにナノテクノロジーも今後継続的に発展させるだけの十分な成果があると確信している。

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。

また近年、ゲノムバイオロジーの進歩により、新しい遺伝子製剤が次々と登場し、遺伝子治療も現実に患者に適應される時代になった。外来遺伝子を生体内の標的部位へと運ぶ遺伝子治療用ベクターも高度な進化を遂げている。しかしこれらの遺伝子ベクターが生体内で最大限の治療効果を発揮するためには、生体内への投与方法、発現量や発現期間の制御の方策、標的への確実なデリバリーなどをさらに改良・工夫し、同時に生体にとって安全かつ副作用の少ない方策を考る必要がある。これらの目的を達成するためのアプローチとして、再生医学・組織工学の領域で用いられる生体親和性の高いバイオマテリアルと遺伝子治療に用いる DNA ベクターとを融合させることにより、最適な濃度一時間軸に従って生体への遺伝子ベクターの導入とその発現を制御する方法の開発に取り組む必要がある。本研究でアテロコラーゲンを用いて遺伝子との複合体は条件によってはナノサイズの粒子を形成する。このナノ

サイズ複合体の安定な供給をはかるとともに、そこにさまざまな成分を共存させることによって、治療用外来遺伝子を体全体あるいは特定の作用部位へとデリバリー可能な画期的な技術を提供することがアテロコラーゲンナノ粒子による DDS 開発研究班の研究目的である。

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。

またアテロコラーゲンナノ粒子による遺伝子ベクター研究開発では、アテロコラーゲンと遺伝子のナノサイズの複合体の安定な供給をはかるとともに、そこにさまざまな成分を共存させることによって、治

療外来遺伝子を体全体あるいは特定の作用部位へとデリバリー可能な画期的な技術を提供することが研究目的である。

さらに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

TOPO (Tri-Octyl-Phosphin-Oxide) やその他の界面活性剤などを利用して一桁ナノ空間を作成しその空間の中に半導体を自己組織させるものである。遷移金属やシリコンによる半導体は、一桁ナノメートルの小さな粒子 (クラスター) にまでなると量子サイズ効果により様々な特異的性質を持つようになる。この大きさでは、金属の性質、非金属の性質と分けられず、カーボンナノチューブやフラーレンも半導体として利用できるようになる。金属クラスターは、蛍光を発することができ、その蛍光色は粒子の径が小さいほど小さな波長の蛍光色と成る。其の蛍光を得るための励起光は、蛍光波長より短い波長ならばよい。またこのナノ粒子は、一度励起された後、さらにもう一度励起すると光量が増すと言う量子メモリー効果を持っている。Cd/Se からなる半導体は、さらに安定化するために ZnS の外郭を持って安定化させ全体で 4 nm 程のナノ粒子を得ることができ。このナノ粒子はトルエンなどの有機溶媒には可溶であるが、水溶液にはほとんど解けないため生物・医療応用するためには水溶性表面加工を行って水溶液中でも溶解させることができる。表面加工としては、有機酸、アクリル酸、シロキ酸、アミンな

どである。これら表面加工を行い表面加工を行った官能基を用いて生体分子、例えば蛋白、オリゴペプチド、核酸などに結合 (Tagging) させることが可能である。有機色素の場合それぞれ特異的励起波長が必要であるが、量子ドットは、いずれの波長による励起でも認められるという極めて特徴的な性質を持つ。

さて、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。

#### 5) 具体的な目標

半導体ナノ粒子、アテロコラーゲンナノ粒子、ブロックポリマーの3つに分けてその各々の目的を以下に記述する。

##### (a)半導体ナノ粒子

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、また様々なタンパク質や核酸とのタギングおよびその細胞導入、また導入され標識された細胞の生体内導体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ッ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

過程を見直し、昨年度1バッチ当たり30mg程度であったものが現在1バッチ当たり300mg程度になっている。

##### 2) 半導体ナノ粒子のマルチカラー

半導体ナノ粒子は、その構成材料を代えたり、粒直径を換えることで様々な異なる蛍光色を出すことが可能である。このためカドミウム/セレンの半導体ナノ粒子では、赤、橙、黄、緑、シリコンナノ粒子では、青色などマルチカラーの製造が可能となっている。

##### 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、アミノ、水酸基を持つポリマーおよびその複合体となっている。

##### 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、抗体、DNAなどにタギングしている。

##### 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可能とし、具体的にマウスを用い、尾静脈よりリンパ球系株化細胞を導入しその生体内導体を観察し解析することに成功した。

##### (b)アテロコラーゲンナノ粒子

これまでは遺伝子導入と発現の効率のみに重点がおかれ、副作用や治療終了後の発現の制御にはあまり注意が払われなかったが、生体内から自由に取り出すことが可能な点はアテロコラーゲンの大きな特色であり、安全性の面も考慮した新規な遺伝子導入技術である。しかし、遺伝子のDDSにおいて最も重要な点は、標的・特異的に遺伝子をデリバリーする技術である。そのためにはまずアテロコラーゲンと遺伝子複合体の形状を



ナノサイズの粒子に設計し、さらに標的特異性をシグナル法の可能性

を持たせることの可能な分子を組み込む技術が必(5)腎疾患治療に向けた DDS

要となる。

本年度は、まずこの複合体の形状をナノサイズにするために、アテロコラーゲンと遺伝子の混合の比率や添加物の有無などの条件を詳細に検討し、ナノサイズの粒子形成の条件を設定することに焦点を絞った。

### (c)ブロックポリマーナノ粒子

血流中で安定に pDNA を保持し、細胞内へ取り込まれることにより不安定化し、pDNA を放出可能な状態へ変化するベクターシステムの構築を目指す。そのため環境応答機能を付与したブロック共重合体の合成とミセル型ベクター調製を検討した。細胞内の方が血流中と比較して高いグルタチオン濃度であることに着目し、poly(ethyleneglycol)-poly(L-lysine)

(PEG-PLL)ブロック共重合体の PLL 側鎖アミノ基へのチオール基 (SH 基) の導入を検討した。PEG-PLL へ導入された SH 基はミセル内核においてポリマー鎖間のジスルフィド結合 (SS 結合) を生起させることが可能であると予想される。SH 基の導入は、2 種類の試薬 (3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), 2-mercaptoethylamine (IT) を用いて検討する。構造の確認は、<sup>1</sup>H NMR 測定により行った。

この様にして合成した SH 基導入 PEG-PLL を用い、前項と同様に pDNA の内包を行い、更に透析を行うことによって、SS 架橋をベクター内部に形成させることを目標とする。

## 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) 半導体ナノ粒子による細胞生体内導体の解析技術の開発
- (2) ヒト血液細胞などに対する遺伝導入効率改善による効果的 DDS 技術開発
- (3) ナノ粒子の感染症研究への応用について
- (4) ペプチド標的治療に対するモニターリ

(6) 正常ヒト角化細胞と線維芽細胞における半導体ナノ粒子の取り込み

(7) QD を用いた in vivo 細胞トラフィックの解析

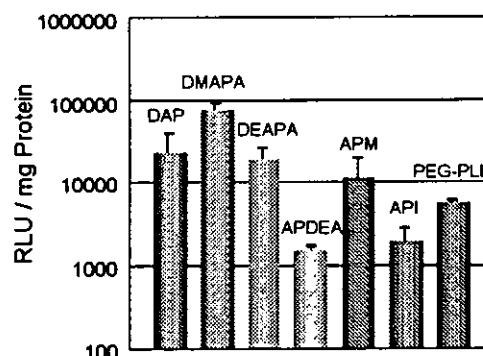
(8) 半導体などナノ粒子による DDS ピンポイント DDS

(9) CdSe/ZnS コアシェル型の半導体ナノ粒子の DNA 損傷性の検討

2) アテロコラーゲンナノ粒子による DDS

3) 機能高分子ミセルによる遺伝子導入システム

(1) 遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価



(2) 高分子ナノテクノロジーに基づく薬物・遺伝子デリバリー

以下に主任研究者および分担研究者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) 本研究は、一桁ナノメートルサイズの量子ドットを用いて、生物・医療分野に利用できるように、表面加工および表面修飾し、薬物伝達システムの開発を可能することを目的として行うものである。本年度は、実際に細胞を量子ドットで標識しその細胞をマウス生体内に導入し、その生体内動態を観察した。その結果、尾静脈から注入された、量子ドット標識化リンパ球系株化細胞 (EL4) は、導入後 5 日間、血管

中に存在し、7日後には消失する事を観測した。この事からこの細胞の生体導入後動態解析システムの有用性を確認した。また、安全性についても検討し、細胞レベルでの毒性試験を行って評価した。その結果、現在の Cd/Se の製造方法、および表面加工の課程を経て利用している量子ドットに関しては、0.1mg/ml で細胞毒性がではじめる事が判明した。それにより、このナノ粒子の細胞毒性の出ない閾値があることが判り、産業的に安全性の目標と成る基準値が設定可能であることが示唆された。

(2) ヒト血液細胞への遺伝子や蛋白などの分子導入が困難で、このことが効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。本研究においては、ヒト血液細胞株を用いて、遺伝子(オリゴヌクレオチド、プラスミド)の導入効率改善を試みた。蛍光指標としては、FITC などの従来より用いられてきたものの他に、量子ドットも用いた。又、一部の実験においては、マウスの *in vivo* の系への応用も考慮して、マウス細胞株での検討を行った。検討した遺伝子導入手法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン (EPEI) 法、HVJエンベロープベクター、ヌクレオフェクターの3つの方法で、いずれも従来の手法よりはるかに良好な結果を生み出したが、中でも特にヌクレオフェクターが最も効率が優れ、プラスミドDNAの導入実験に貢献した。一方、HVJエンベロープベクターは、蛋白の導入にも有効で、ヒトのみではなくマウスの血液細胞にも有効であった。しかも、エンドゾームではなく細胞質への直接の導入が可能であった。

(3) 様々な波長で安定した高い輝度の蛍光を発する量子ドットは、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の出来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かを明らかにする。抗 IgG 抗体標識 Qdot を用いて、感染症とくに、肺結核の診断への応用をめざし研究を行った。

(4) 標的治療は病巣局所治療薬の濃度を向上させ、薬剤使用量や副作用の軽減につながり、臨床上大変有用である。我々は、ペプチドによる特定分子 (RET 蛋白) に対する標的化について検討を行ってきた。RET binding peptide (RBPI) は、8つのペプチドからなり神経芽腫に好発する RET 蛋白を認識する。臨床診断応用のために、3価の Fe を有する磁性体ナノパーティクルに RBPI を結合させることに成功し、これまでに、MRI (4.7T) により  $5 \times 10^6$  個の RET 陽性細胞を認識している。さらに、RBPI と化学療法剤との複合体形成により、治療効果の増大も期待される。しかしながら、実際の標的化の効果について、磁性体や化学療法剤を細胞レベルで直接評価することは困難である。今回、われわれは蛍光放射光顕微鏡 (SX-FM) の開発により、細胞内元素分布の画像化を可能とした。SX-FM は、磁性体である Fe や Pt 製剤 (シスプラチン) の細胞内での局在を明らかにした。今後、白金などの生体になく元素をラベルすることで、SX-FM は標的化のモニターに有用と考えられる。

(5) 尿細管間質病変の進展は糸球体腎炎の増悪に重要な役割を果たす。本研究では、尿細管上皮細胞への選択的 DDS の標的分子の候補としてフラクタルカイン (FKN) に注目し、ヒト腎疾患及びラットモデルを用いてその発現動態を調べた。正常腎組織には FKN の発現はほとんど見られなかったのに対し、腎疾患患者 52 例中 15 例の腎尿細管間質領域 (多くは尿細管上皮細胞) に FKN が検出された。FKN 陽性例の多くは FKN 受容体も陽性であり、FKN 陽性例は陰性例に比べて、血液尿素窒素、血清クレアチニン値、尿蛋白のいずれも高値を示

した。また間質への白血球浸潤の程度は FKN の発現が高い症例ほど顕著であり、FKN 陽性の尿細管の周囲には多数の白血球が観察されることが多かった。同様の現象は動物モデルでも観察された。これらの結果から、FKN 発現尿細管上皮細胞は腎炎における間質白血球浸潤や病態の進展に重要な役割を担うことが示唆され、DDS の標的分子となる可能性が示された。

(6) 正常ヒト角化細胞と線維芽細胞への半導体ナノ粒子の取り込みを検討し、14 日間の観察を行った。ともに細胞内に取り込まれたが、細胞分裂に従って、個々の蛍光強度は減少した。創傷治癒過程のモデルとしてのヒト角化細胞によるシート状増殖する新しい実験系を構築した。

(7) 本研究の目的は、低侵襲な方法（注射等）により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入することで、副作用を軽減することができるキャリアー（運搬体）を開発することである。本研究では B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることを試みた。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、内部に薬剤等を封入することで、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。本年度は、このタンパク質中空ナノ粒子に外来タンパク質を封入し、ヒト肝臓に特異的に導入することを試みた。モデルタンパク質としてオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用い、HBsAg タンパク質の C 末端側に融合させて形成した粒子が、ヒト肝臓に効率よく GFP を導入可能であることを確認した。

(8) 本研究の目的は、低侵襲な方法（注射等）により生体内で標的部位へピンポイントに薬剤、遺伝子、タンパク質等を輸送して効率よく導入することで、副作用を軽

減することができるキャリアー（運搬体）を開発することである。本研究では B 型肝炎ウイルス表面抗原(HBsAg)粒子をキャリアーとして用いることを試みた。この粒子は、ウイルスゲノムを除去したタンパク質中空ナノ粒子であるため、内部に薬剤等を封入することで、ヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入することができる。本年度は、このタンパク質中空ナノ粒子に外来タンパク質を封入し、ヒト肝臓に特異的に導入することを試みた。モデルタンパク質としてオワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用い、HBsAg タンパク質の C 末端側に融合させて形成した粒子が、ヒト肝臓に効率よく GFP を導入可能であることを確認した。

(9) 親水性有機化合物（11-メルカプトウンデカン酸：MUA）で表面被覆した CdSe/ZnS コアシェル型ナノ粒子 (QD-MUA)、およびサンプル中に混在する MUA の DNA 損傷性の有無について、ヒトのリンパ腫由来の WTK1 細胞を用いたコメットアッセイで調べた。WTK1 細胞を 2 種の QD-MUA（粗精製品、限外濾過精製品）、および MUA で 2、12、24 時間処理した後、常法にしたがってアガロースゲルに包埋したスライド標本を作成し、細胞を低温でアルカリ溶解後、アルカリ条件下 (pH13, 0°C) で DNA unwinding と電気泳動を行った。1 本鎖 DNA 切断によって核から流れ出す DNA 断片を、エチジウムブロマイドで染色して DNA 移動距離 (tail length) を 50 個の核について測定した。QD-MUA は 50  $\mu$ g/ml 以上の用量で WTK1 細胞に DNA 損傷を誘発したが、その作用は精製品の方が弱かった。MUA は 25  $\mu$ g/ml 以上の用量で強い DNA 損傷性を示した。以上の結果から、QD-MUA の DNA 損傷性の原因が親水性加工に用いた MUA に起因していることが推定され、親水化加工に用いる物質の選択が重要であることが示唆された。

また、5 mg/ml QD-MUA（粗精製品）0.5

ml をマウスに強制経口投与、および腹腔内投与 (90 mg/kg BW) したが、投与後 2 週間において毒性兆候となる臨床症状は認められなかった。

2)アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS  
我々はバイオマテリアルの一種であるアテロコラーゲンが DNA と相互作用して複合体を形成し、効率よく細胞に取り込まれた後、遺伝子を発現させる能力があることを明らかにしてきた。アテロコラーゲンは複合体を形成した DNA の細胞への取り込み、酵素分解に対する抵抗性、さらには徐放効果を促進する働きがあるため、遺伝子治療用ベクターの生体内へのデリバリー方法として優れている。さらに最近この複合体はナノサイズの粒子を形成することが明らかとなり、疾患部位に応じた様々なデリバリーシステムの構築が可能なことを意味する。本年度は、この複合体の粒子形成の詳細な検討を行い、アンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA の遺伝子医薬の安定なナノ粒子形成の条件設定に至った。

3)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) 本研究の目的は、ナノテクノロジーを用いて、種々の機能を持つ遺伝子導入ベクターを開発し、*in vitro* および *in vivo* の遺伝子導入実験を行い、遺伝子導入ベクターとしての評価を行うことである。われわれが以前に報告した、ポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルの内核を SS 結合で架橋することにより、さらに血中安定性を上昇させること、また、細胞内の還元環境ではベクターが DNA から遊離すると考えられ、*in vivo* での発現効率を上げるのではないかと考えられ、実験を行った。SS 結合を導入することにより、*in vivo* での血中安定性を上昇することができた。*In vitro* での遺伝子発現は HepG2 細胞、Cos-1 細胞、血管内皮細胞、THP-1 細胞、平滑筋細胞を用いて

行った。架橋ミセルにより、HepG2 細胞、Cos-1 細胞、血管内皮細胞、THP-1 細胞への遺伝子導入が可能であった。特に血管内皮細胞および THP-1 細胞では SS 結合の導入により、遺伝子発現の効率の著明な上昇を認めた。また、SS 結合の導入により、*in vivo* での遺伝子発現を認めた。

(2)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とすることにある。本年度は、種々カチオン構造を有するブロック共重合体からなるベクターの培養細胞に対する遺伝子導入効率を測定するとともに、側鎖に細胞内環境で選択的に開裂する架橋を施すことによって発現効率を大幅に高めることに成功した。

### C.まとめ

本年度研究を通じて、半導体ナノ粒子の合成効率が、10 倍以上に良く成った。そのため、今後様々な分野で使用されることが予想されるこの新規材料の安全性について今後十分検討していく必要性が出て来た。我々が合成している半導体ナノ粒子について、細胞毒性を調べて見たところ、いずれの直径のものでも 0.1mg 以下なら細胞毒性を示さずに使用可能であることが判明した。また更に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。

昨年度我々は、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。今年度我々は、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、実際応用し今後新しいナノプローブの性能を評価した。すなわち半導体ナノ粒子を、リンパ球系株化細胞（EL4）を用いそれを半導体ナノ粒子によって染色し、それを用いてマウス生体に尾静脈より導入した。10日間の観測により、7日間は、血管内に導入された細胞のほとんどが存在したが、その後、肺、脾臓に集積することが確認できた。

今後半導体ナノ粒子を薬物やタンパク質に結合し、動物生体内の導体を生きたまま体外より解析することが可能となると考える。このことより、生物・医療における更に安全な展開に向けての素地が築かれたと言える。

#### 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）発明の名称：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

発明者：切替照雄、他

出願日：平成15年12月26日

出願番号：PCT/JP03/16

（2）発明の名称：核酸導入促進剤

出願番号：特願 2001-18630

発明者：落谷孝広、他

出願状況：国際出願 2003. 6.

（3）発明の名称：

出願番号：

発明者：山本健二、他

出願番号：

## 半導体などナノ粒子による生物・医療応用

分担研究者 山本 健二 国立国際医療センター 研究所・部長

協力研究者 星野 昭芳 国立国際医療センター研究所・流動研究員

協力研究者 藤岡 宏樹 国立国際医療センター研究所・研究生

本研究は、一桁ナノメートルサイズの蛍光半導体ナノ粒子（量子ドット）を生物・医療分野へ応用可能な形態に表面を加工・修飾することで、薬物伝達システムの開発を可能することを目的として行うものである。本年度は、実際に細胞を蛍光半導体ナノ粒子で標識しその細胞をマウス生体内に導入しその生体内動態を観察した。その結果、尾静脈から注入された蛍光半導体ナノ粒子標識化リンパ球系株化細胞（EL4）は、導入後5日間、血管中に存在し、7日後には消失する事を観測した。この事からこの細胞の生体導入後動態解析システムの有用性を確認した。また、安全性についても検討し、細胞レベルでの毒性試験を行って評価した。その結果、現在のCdSe蛍光半導体ナノ粒子の製造方法および表面加工の課程を経て、利用している半導体ナノ粒子に関しては、0.1mg/mlの濃度で細胞毒性がはじめる事が判明した。それにより、このナノ粒子の細胞毒性の出ない閾値があることが判り産業的に安全性の目標と成る基準値が設定可能であることが示唆された。

### A. 研究目的

近年、薬の副作用に関する安全性、あるいは、薬効の増強のため、薬剤伝達システムの開発が、世界規模で行われている。その中の代表的なものは、リポソーム、ブロックポリマーなどである。前者は、ミセル構造の中に薬物などを封入し患部まで運ぶキャリアーであり、後者は、ポリエチレングリコールなど親水性物質で半分ができており、もう半分は、正・負の電荷が入れ替わり順番に重合させたものでできているブロックポリマーである。このブロックポリマーは、水溶液中で重合し巨大分子塊を組織化する。両者のサイズは、比較的大きくて、50nm～100nmである。一方量子ドットは、2nm～6nmであり、生態分子並に十分小さく人体のあらゆる場所に伝達可能であると考える。

我々は、薬剤伝達システムの開発を行っているが、それと並行して、細胞伝達システムの開発も行っている。細胞療法など、機能有る細胞を生体に導入し、その細胞を患部臓器まで伝達させそこで疾患患部を治

療する方法が様々な臓器に於いて考えられている。その例として心臓や脳等において実際に研究が進み、動物実験によって一定の成果を得ている。

一方、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に変化し、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。この新機材料を用い、IT分野における記憶装置の開発は、我が国に於いても材料ナノテクノロジー分野にて国家プロジェクトとして精力的に開発研究が進んでいる。本研究で現在用いている半導体ナノ粒子のサイズは、4nm～5nmであり、この材料を用いての薬剤伝達システムをはじめ、その他の医療応用に、日米でしのぎを削っている。

本研究はバイオナノ工学的立場で己組織化法による蛍光ナノ粒子の合成を行い、安全で有効な薬剤伝達システムの開発のため

に利用することを目的に研究を進める。また、細胞に取り込ませる加工を行い、細胞を標識したのち生体に導入してその動態の観測および解析を行う。その応用として蛍光ナノプローブを用いて疾患のモデルマウスなどに標識し、その標識された特定細胞を正常のマウス血管に導入しその生体内動態を解析することで、疾患のメカニズムを明らかにすると共に治療に対する評価を行うことも可能となる。

## B. 研究方法

### 1. 量子ドットの合成と表面加工

研究に用いている蛍光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 (CdSe/ZnS) 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 (Trioctyl phosphine oxide=TOPO) とする両親媒性物質を 350℃ に加熱し溶解させた逆ミセル形成性の状態で合成されている。則ち、その溶解した TOPO にメチル化カドミウムとメチル化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℃ 程度まで一旦低下するが、さらに加熱し 300℃ にて一定に保つと、TOPO 内で半導体ナノ粒子が自己組織化により成長してくる。半導体ナノ粒子は、粒子サイズに依存した量子サイズ効果を持っているためこのように厳密な温度管理のもと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。

前述の記述のようにして合成された蛍光半導体ナノ粒子は表面が TOPO で被覆された疎水性粒子であるが、TOPO を 11-メルカプトウンデカン酸で置換させて粒子表面にカルボキシル基付加させることによって親水性を付加している。この置換方法は、まず 11-メルカプトウンデカン酸を 80℃ に加熱し溶解させた上で量子ドットを溶かしこみ数時間加熱することにより置換させ、さらにナトリウム塩又はカリウム塩とすることで親水性を獲得させている (図 1)。

### 2. 表面修飾

上記のようにして表面加工された量子ドットは、中性または塩基性水溶液には分散できるが、酸性溶液中または塩の存在する溶媒中においては凝集し蛍光を消失する欠点がある。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。

## C. 研究結果

前年度は、細胞内に安定して導入する技術を開発したが、今年度はそれに引き続き、半導体ナノ粒子を導入した細胞をマウス生体内に導入し、その生体内動態を解析した。また一方では、半導体ナノ粒子の安全性について評価した。

### ① 量子ドットに標識された細胞による生体内動態の解析

具体的には、半導体ナノ粒子の細胞内安定性を見るため、まず *in vitro* において、シャーレで培養したマウスリンパ球系株化細胞 (EL4) に、赤色半導体ナノ粒子 (CdSe/ZnS; 蛍光波長 640nm) を導入した。導入方法としては、羊アルブミンを同濃度の赤色半導体ナノ粒子水溶液と混和し、それを無血清培地に添加、細胞内に取り込ませた後、培養しながら蛍光顕微鏡 (オリンパス) にて観測した。

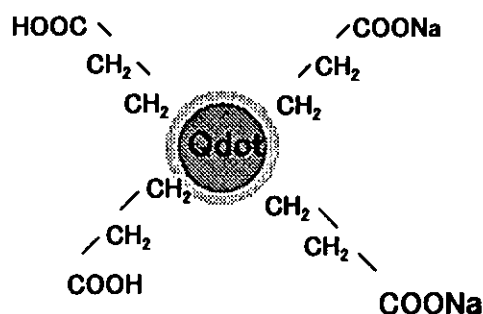


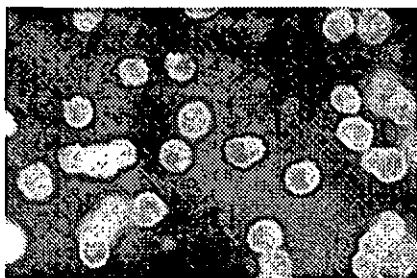
図 1 カルボン酸付加による水への可溶性

その結果、蛍光半導体ナノ粒子の細胞内への取り込みは能動的に温度依存性であることが判明した。すなわち、37℃では図 2 に示すように、細胞に取り込まれ、エンドソームに顆粒状に量子ドットが蓄積されていることが観察できるが、4℃条件では半導体ナノ粒子が細胞へ取り込まれている痕跡はないことが判明した。このことにより、量子ドットは細胞の持つ生理的な異物処理・輸送経路により積極的に取り込まれていることが判る。

さらに半導体ナノ粒子の動物個体内における安定性を見るため、in vivoにおいて、シャーレで蛍光ナノ粒子標識したマウスリンパ球系株化細胞 (EL4) をマウス尾静脈よりマウス体内に導入した。図 2 にその概略を示す。



Culture media (serum free) に添加するとエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれる



↓ 尾静脈投与



↓ 血液・組織を観察

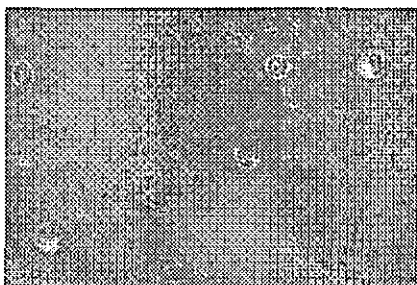
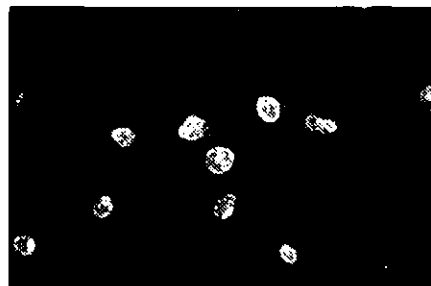


図 2 蛍光ナノ粒子動物個体内挙動実験のアウトライン

染色前



染色1日後



染色10日後

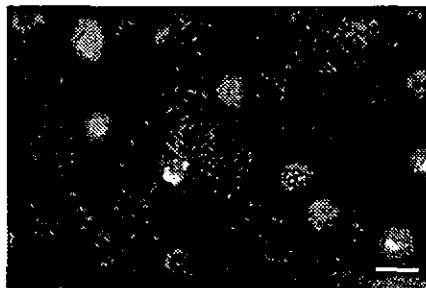


図 3 マウス末梢血に移入した蛍光ナノ粒子標識リンパ球の経時変化

実験結果を図 3 に示す。上図で示すよう染色 1 日後には、導入した細胞の 97% は細胞内に存在するが、5 日後には 38%、7 日後には 32%、そして 10 日後には 14% まで減少している。導入 10 日後のマウスの臓器について病理切片を作成し、半導体ナノ粒子に染色された細胞の臓器内分布を解析した。その結果大部分は肺に存在し、その他脾臓・肝臓に分布したが、腎臓にはほとんど存在しなかったことが判明した。(図 4)

② 量子ドットの細胞毒性

産業の進歩とは材料の進歩であると考えられる。情報産業・計算機産業・ネットワーク産業の躍進は近年目を見張るものがある。しかしながら、これらの産業がシリコンを中心とする新規材料の進歩がなくては



成立し得なかった。また液晶・プラズマ発光体・有機 EL 等の発光素子や発光化学材料の発展がこれを支えて来た。

ところが、近年の溢れるばかりの新規機能材料の開発はあまりにも急速で、またその速度は衰えるどころか、開発された新規機能材料を利用してさらに新たな機能材料の設計および開発が行われている現状ではその安全性を検証するに時間さえ与えられていないのが現状である。

これら新規物質の開発や製造にあたって、その作業に従事する労働者の安全性は、十分には議論されているとはいえない。特に、われわれが手掛けているナノサイズ超微粒子（量子ドット）については、著名な雑誌である、Nature や Science などでは、ほとんどの論文で、“この論文に使用した半導体など名の粒子については安全である”と記述されているものばかりであるにも関わらず誰もそれについて評価したことがなかった。われわれは、ヒト肝臓細胞、ならびに Hela 細胞・Vero 細胞・リンパ球系株化細胞 EL4 等を用い、様々な濃度の量子ドットをふくむ培養液で 24 時間培養し、MTT アッセイにて細胞障害性を評価した。その結果いずれの場合でもおよそ 0.1mg/ml を境にわずかな障害性が出るのが判明した。この濃度は、通常我々が使用している濃度の 100 倍以上であり、また染色するための時間は通常 1 時間以内であることから、通常使用には問題ないと考えられた。

どの細胞でも上記の閾値以下ならば障害性は観察されていない。換言すれば閾値以下ならば細胞障害性は観測されていないことから、この材料について工業的に生産するにあたっての安全基準の目標が得られる。環境ホルモン（内分泌攪乱物質）などは、閾値が存在しないことが示唆されているためいかなる濃度でも使用できないとされている。しかしこの材料においては閾値が存在することから、今後の産業における展開について十分期待できることが示すことができた。

前述のように特徴のある新規材料を利用するにあたって、現在知られていない様々な性質が存在すると予想される。今後これら新規材料の製造過程、利用方法、廃棄に於ける安全性の検討が必要となってくるだろう。またこのような新規材料を再利用するなどリサイクルについての技術開発も必

要である。それと同時にバイオナノテクノロジーなど新規分野は、様々な学術バックグラウンドが必要でありこの分野の技術開発には、異分野の融合が必要である。特に化学工学と生命科学との連携が重要であるため、幅広い分野に広い知識を有するゼネラリストの後継研究者の養成が必要であると考えている。原子力・航空宇宙・情報工学の 3 分野が複合的な知識集積の上で発展してきたように、ナノテクノロジーも異分野との幅広い連携により、今後継続的に発展させるだけの十分な成果があると確信している。

#### D. 考察

##### 1) 達成度について

我が国においてはじめて半導体ナノ粒子（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あり、同一な化学組成でありながら粒子サイズにより発光色が変化し、なおかつ発光強度と蛍光寿命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、その半導体ナノ粒子に様々な薬剤を結合させ、その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。また特定細胞を蛍光ナノ粒子で標識し、その標識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宿主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を予定している。これは国民医療における難病を克服するという社会的にも大きい意義があると考えている。

##### 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、実際応用することで新しいナノプローブの性能を評価する予定である。

今後は、実験デザイン1および2に示すように血管炎の発症メカニズム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、半導体ナノ粒子標識細胞を用いて、マウス生体内における標識細胞の動態解析に応用することが可能である事が判明した。昨年度我々は、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を示した事と合せ、分子の細胞内動態から、細胞の生体内動態まで観測できるシステムを構築した。このように、ナノ粒子は極めて特徴的な性質を有するため、血管炎による多臓器不全のメカニズムを解明するため蛍光ナノプローブを用いて自己免疫疾患のモデルマウスの免疫細胞に標識し、その標識された特定細胞を正常のマウス血管に導入しその生体内動態を解析することで疾患メカニズムを明らかにする、などの生物・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) Hoshino A, Hanaki K, Suzuki K, and Yamamoto K. Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body. *Biochem Biophys Res Commun.* (2004) 314:46-53
- 2) Kitagawa J, Futamura Y, Yamamoto K. Analysis of the conformational energy landscape of human snRNA with a metric based on tree representation of RNA structures *Nucleic Acids Res.* (2003) 31:2006-13.

- 3) Aringazin AK, Dahnovsky Y, Krevchik VD, Semenov MB, Ovchinnikov AA, and Yamamoto K. Two-dimension tunnel correlations with dissipation *Phys Rev B* (2003) 68,155426-38.
- 4) Komoto A, Hanaki K, Maeno S, Wakano JY, Yamaguchi Y, and Yamamoto K. Growth dynamics of *Bacillus circulans* colony, *J. Theoretical Biol.* (2003) 25:91-97
- 5) Takeuchi F, Futamura Y, Yoshikura H, and Yamamoto K. Statistics of Trinucleotides in Coding Sequences and Evolution *J. Theoretical Biol.* (2003) 222: 139-149.

##### (総説)

- 1) 星野昭芳,山本健二 最先端テクノロジーの現状～ナノテクの生物・医療分野への応用～ 新医療 (2003)31,113-115.
- 2) 山本健二 生物学領域におけるナノテクノロジーの応用と展望に迫る。実験医学(2003) 21, 2121-2124.
- 3) 山本健二 光を用いた細胞・組織のバリデーションとその展開。O PULSE 新技術コミュニケーション (2003) 25, 545-548.

##### 2. 学会発表

###### (国内学会)

- 1) 山本健二：蛍光ナノ粒子を用いた診断、化学工学会・日本バイオイメージング主催「ナノとバイオの融合学理構築と産業基盤形成」宮城県松島 (2003.9)
- 2) 山本健二：生体分子トレーサーとしての量子ドット 第26回医学会総会 マリンメッセ福岡 (2003.4)
- 3) 山本健二：ナノ粒子の機能分子のデリバリーシステムと解析、日本バイオイメージング学会主催「バイオイメージングとナノテクノロジー」東京国際フォーラム (2003.2)
- 4) 山本健二：量子ドットの生物医療応用。ナノバイオテクノロジーの最前線～化学工学会バイオナノ委員会

- 主催、バイオイメージング学会共催。  
 東京大学山上会館会議場 (2004.2)
- 5) 山本健二、星野昭芳、藤岡宏樹：量子ドットによる Cell Delivery System および Drug Delivery System の開発～細胞機能を視る、測る、解析する技術の開発と蛍光プローブの創薬への応用～ ヒューマンサイエンス振興財団、メルパルク東京 (2004.3)
  - 6) 山本健二：水溶液中のナノ粒子のランダム性と自己組織化について 第 53 回理論応用力学講演会 (NCTAM2004)、日本学術会議 (2004.1)
  - 7) 山本健二：ナノテクノロジーの生物・医療分野への展開～量子ドットの生物・医療応用とその問題点～ 第 12 回バイオイメージング学会学術集会 慶応大学日吉校舎 (2003.11)
  - 8) 星野昭芳、花木賢一、鈴木和男、山本健二：生体内移入細胞標識マーカーとしての量子ドットの応用 第 12 回バイオイメージング学会学術集会 (2003.11)

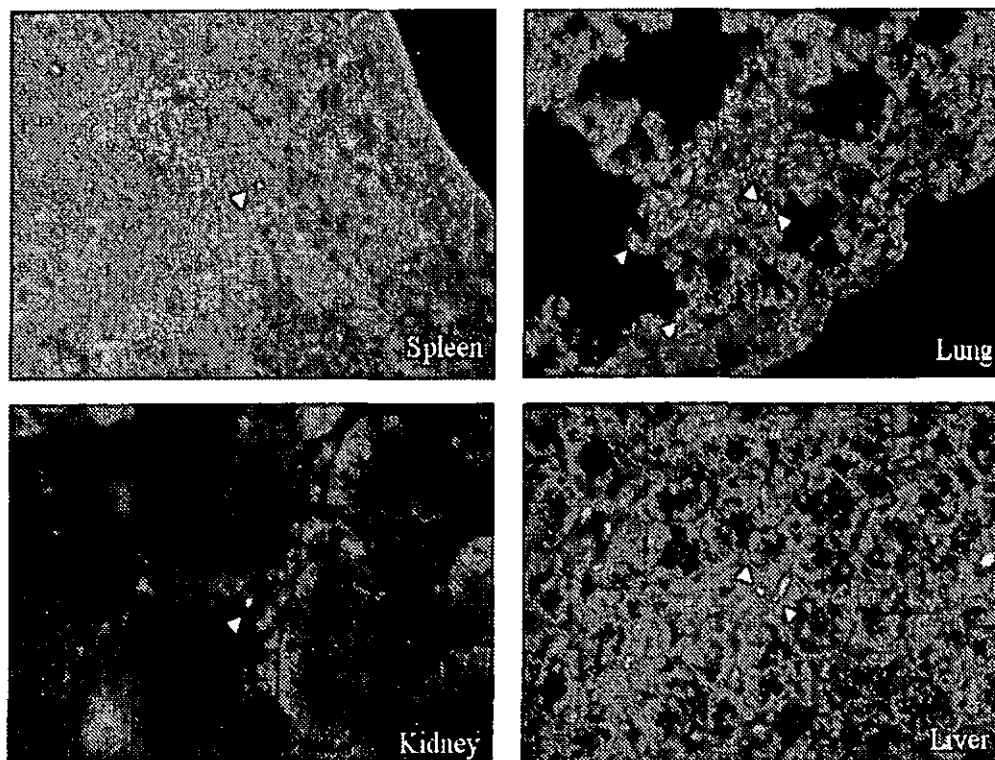
(国際学会)

- 1) Yamamoto K and Shiohara A.: Quantum Dot and cytotoxicity. TOP-NANO 21, St. Gallen University, Switzerland. (2003.9)
- 2) K. Yamamoto. : Semiconductor nano-particle and the application for the bio-medical engineering. International Symposium on Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nano-technology. Sapporo, Japan. (2003.8)

(知的所有権の出願・取得状況)

- 1) 特許特願 2003-200778  
 蛋白質の検出方法  
 出願者 山本、桃、花木、大川  
 発明者 山本、桃、花木、大川
- 2) その他なし

図 4 マウス体内へ導入した半導体ナノ粒子標識リンパ球の臓器内分布



## ヒト血液細胞などに対する遺伝子導入効率改善による効果的DDS技術開発

分担研究者 湯尾 明 国立国際医療センター研究所部長  
協力研究者 佐伯 久美子 国立国際医療センター研究所室長  
協力研究者 小柳 真 国立国際医療センター研究所研究生

**研究要旨** ヒト血液細胞への遺伝子や蛋白などの分子導入が困難で、このことが効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。本研究においては、ヒト血液細胞株を用いて、遺伝子 (オリゴヌクレオチド、プラスミド) の導入効率改善を試みた。蛍光指標としては、FITCなどの従来より用いられてきたものの他に、量子ドットも用いた。又、一部の実験においては、マウスの *in vivo* の系への応用も考慮して、マウス細胞株での検討を行った。検討した遺伝子導入手法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン (EPEI) 法、HVJエンベロープベクター、ヌクレオフェクターの3つの方法で、いずれも従来の手法よりはるかに良好な結果を生み出したが、その中でも特にヌクレオフェクターが最も効率が優れ、プラスミドDNAの導入実験に貢献した。一方、HVJエンベロープベクターは、蛋白の導入にも有効で、ヒトのみではなくマウスの血液細胞にも有効であった。しかも、エンドゾームではなく細胞質への直接の導入が可能であった。

### A. 研究目的

ヒト血液細胞への分子導入は極めて困難であることは良く知られている。この状況は、正常血球であっても白血病細胞であってもほぼ同様であり、また、導入分子がプラスミドサイズの遺伝子であっても、低分子量のオリゴヌクレオチドであっても、同様である。このような状況は、様々の疾患に対する新しい分子標的療法を行う際の、効果的な薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の開発の大きな妨げとなっている。

今回の研究では、このような状況を打破するためにヒト血液細胞 (株) への効率の良い遺伝子導入法の開発を試みた。

### B. 研究方法

細胞は主にヒト白血病細胞株 (主にU937) を用いたが、実験によっては他の白血病細胞株 (HL-60、OCI-AML1a、F36P) も用いた。また、今後マウスの *in vivo* の系を導入する際の基礎検討として、マウス血液細胞株 (P388D1、J744.1) も検討対象とした。

プラスミドの導入効率を検討するために、GFP蛋白をコードする発現プラスミドを用いた。また、FITCラベルのオリゴヌクレオチドやアレクサ標識IgGも用いた。この他に蛍光マーカーとして、量子ドットを用いた実験をマウス細胞株にて行った。さらに、白血病細胞のアポトーシスの実験系において、p38やJNKの経路が関与していることをこれらの経路の分子の *dominant negative* 変異体を用いた実験で確認を試みた。

今年度において試みた遺伝子導入促進法は、エトキシレーテッドポリエチレンイミン (EPEI) を用いた手法、HVJエンベロープベクター

を用いた手法、ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法、であった。

### C. 研究結果

アンチセンスオリゴのヒト血液細胞内導入に関しては、主にU937細胞を用いて、昨年度の研究において良好な結果を得たEPEIを用いた系により行った。オリゴヌクレオチドの場合でもプラスミドDNAの場合でも、安定した導入、発現が確認された。

一方、HVJエンベロープベクターを用いた場合は、細胞の凝集が起こりやすくなる傾向があったが、遺伝子の導入、発現はオリゴヌクレオチドでもプラスミドDNAでも良好であった。さらに、アレクサ標識IgGを用いた実験によって、HVJエンベロープベクターは蛋白の導入にも応用できることが確認された。

マウス血液細胞株を用いた検討においては、HVJエンベロープベクターはP388D1細胞における量子ドットの導入効率を著明に改善した。一方、J744.1細胞は量子ドット単独でも著明に細胞内に導入されたが、HVJエンベロープベクターを用いると細胞内にびまん性に導入され、エンドゾームではなく細胞質に直接導入されていると考えられた。

ヌクレオフェクターを用いたエレクトロポレーション法は、今回用いた全ての白血病細胞株において極めて良好な (30-60%) 導入、発現効率を示した (GFP発現プラスミドによる)。また、ASK1、MKK4、MKK6、MKK7、JNK1の *dominant negative* 遺伝子の導入、発現に極めて有効で、ヒト白血病細胞におけるアポトーシスの阻害実験の系において、予想された阻害効