

た QD-MUA 分画を再度 $0.1 \mu\text{m}$ のメンブレンフィルターに通したものを QD-MUA (限外濾過精製品) とした。QD-MUA が培養液中の NaCl の作用で凝集することを防ぐため、いずれも、使用直前にヒツジ血清アルブミンを最終濃度 5 mg/ml で添加した。

WTK-1 細胞を種々の濃度の QD-MUA (または MUA) で 2 時間および 12 時間処理した。溶解した 1% GP-42 agarose (半井化学) の $75 \mu\text{l}$ 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 $75 \mu\text{l}$ 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、 $75 \mu\text{l}$ 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 , $100 \text{ mM Na}_2\text{-EDTA}$, 10 mM Trizma , 1% sarkosyl, 10% DMSO, 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 $1 \text{ mM Na}_2\text{-EDTA}$, pH >13) を加え、 0°C で 20 分間静置 (遮光) して DNA の unwinding を行わせた。 0°C 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 $20 \mu\text{g/ml}$ ethidium bromide 液を $50 \mu\text{l}$ 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) MUA

25 、 50 、 100 、 200 、 $400 \mu\text{g/ml}$ の 5 濃度で処理を行った。2 時間処理では DNA 損傷の指標となる migration の長さが $50 \mu\text{g/ml}$ 以上で有意に長くなり、コメットアッセイは陽性の結果を得た。特に $200 \mu\text{g/ml}$ 以上では強い DNA 損傷性が認められた。一方、12 時間処理では $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の用量では

細胞毒性のため細胞が死滅し観察ができなかった。 $50 \mu\text{g/ml}$ では migration の長さが対照群に較べ有意に長くなり、陽性の結果であった (Table 1)。

(2) QD-MUA

25 、 50 、 100 、 $200 \mu\text{g/ml}$ の 4 濃度で処理を行った。2 時間処理では粗精製品の $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で、また限外濾過精製品では $200 \mu\text{g/ml}$ で、コメットアッセイ陽性の結果を得た。一方、12 時間処理では粗精製品の $200 \mu\text{g/ml}$ の濃度では陽性であったが、限外濾過精製品では有意な差は認められなかった (Table 1)。以上の結果から、QD-MUA の精製を行うことによって、DNA 損傷作用が軽減することがわかった。

D. 考察

コメットアッセイ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。

昨年度の研究により、QD-MUA 処理で DNA 損傷の誘発が認められたが、一方で QD はそのサイズから考えて核膜を通過して核内に容易に入り込むことは思えず、実際に細胞内に取り込まれた QD-MUA の蛍光を観察すると、細胞質には存在するが核内には認められていない。したがって、QD-MUA が直接 DNA に作用したとは考えにくい。今回の実験で、MUA に強い細胞毒性と DNA 損傷性があることが判明し、QD-MUA 懸濁液中の低分子物質をゲル濾過と限外濾過で除くことによって、このような精製を行っていない QD-MUA に較べ DNA 損傷活性が軽減されることが示された。還元状態の環境にある細胞内に取り込まれた QD-MUA から MUA が遊離する可能性も考えられることから、QD-MUA で認められた DNA 損傷性は MUA に起因していると推定された。親水加工材料として Cysteamine や Thioglycerol を用いた QD も合成されているので、今後、これらの QD について試験を行って比較し、QD の遺伝毒

性を明らかにしたいと考えている。

E. 結論

MUA で親水加工した CdSe/ZnS ナノ粒子 (QD-MUA) には弱い DNA 損傷性が認められているが、試料中に混在する MUA あるいは細胞内に取り込まれた QD-MUA から遊離した MUA が原因物質になっている可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

培養細胞における QD-MUA の DNA 損傷性は MUA に起因すると考えられる。マウスに 90 mg/kg BW の用量で強制経口投与、および腹腔内投与した急性毒性試験では QD-MUA の毒性は認められない。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Watanabe-Akanuma, M., T. Ohta, and H.

Yamagata, (2003) Photomutagenicity of thiabendazole, a post-harvest fungicide, in bacterial assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, 41, 92-98.

(2) Sekihashi, K., H. Saitoh, S. Hori, M. Nakagawa and M. Miyagawa, Y.F. Sasaki (2003) Effect of in vitro exposure time on comet assay results, *Environ. Mutagen Res.*, 25, 83-86.

(3) Ohsawa, K. S. Nakagawa, M. Kimura, C. Shimada, S. Tsuda, K. Kabasawa, S. Kawaguchi, Y.F. Sasaki (2003) Detection of in vivo genotoxicity of endogenously formed N-nitrosocompounds and its suppression by ascorbic acid, teas and fruit juices, *Mutat Res.*, 539, 65-76.

H. 知的所有権の出願・取得状況

「なし」

Table 1.

Compound	Dose (μ g/ml)	Tail length of 50 nuclei (μ m, mean \pm SE)	
		2-h treatment	12-h treatment
QD-MUA (purified)	0.23.5 \pm 0.81	24.1 \pm 1.05	
	25	22.1 \pm 0.37	23.2 \pm 0.88
	50	23.5 \pm 0.95	24.2 \pm 1.28
	100	24.1 \pm 1.46	25.4 \pm 1.34
	200	34.9 \pm 2.30*	25.1 \pm 1.35
QD-MUA (crude)	0	23.4 \pm 1.05	23.9 \pm 1.21
	25	24.5 \pm 0.90	24.4 \pm 1.13
	50	23.5 \pm 0.91	25.3 \pm 1.08
	100	34.2 \pm 2.49*	25.9 \pm 1.24
	200	41.1 \pm 2.51*	36.4 \pm 2.28*
MUA	0	23.4 \pm 1.05	23.9 \pm 1.21
	25	25.6 \pm 0.58	28.1 \pm 1.31
	50	33.8 \pm 2.38*	41.2 \pm 3.31*
	100	54.6 \pm 3.27*	Toxic
	200	76.0 \pm 3.52*	Toxic
	400	80.3 \pm 3.18*	Toxic

血管炎発症治療にかかわるDDS機構のイメージング

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

研究要旨：血管炎や腎炎での治療のための効果的な薬剤のデリバリーをめざして、病態解析、プローブ開発、DDSイメージングについて検討することを目的とした。まず、血管炎モデルマウスを開発し、そのマウスを用いて解析を行った。急性進行性腎炎(RPGN)の病態を示す良いモデルであるSCG/Kjマウス、Candida成分(CADS/CAWS)誘導の冠状動脈炎やIFN- γ の反応と産生が抑制されているマウス(転写因子IRF-8/ICSBP遺伝子欠損)について解析した。一方、血管傷害によって血管炎が誘発される要因に、Myeloperoxidaseを抗原とする好中球自己抗体MPO-ANCAがある。そこで、本研究では、そのMPO-ANCAの投与によって血管内皮細胞が障害を受けことを認めた。すなわち、MPO抗体投与によって*in vivo*で作動する血流、血管傷害をイメージングにより解析した。また、あわせてMPO抗体を結合したQdot-抗体(QD-Ab)の作製を開始した。

A. 研究目的

重篤な免疫不全、自己抗体の産生に好中球殺菌酵素MPOの不全が関与している。とりわけ、血管炎の発症要因との関連を強く示唆していることを報告した(Inflammation 25:381, 2001)。これらの自己免疫疾患などには、活性化好中球や病態マーカーとして臨床検査として現在広く利用されている好中球自己抗体(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies: ANCA)が関与していることが明らかにされてきている。このように、自己抗体MPO-ANCA抗体と活性化好中球の関与が難治性血管炎のキーになっていることがわかってきている。一方、臨床のデータに加えて、モデルマウスにおいてもこれらの関与について明らかにされてきている。そこ

で、血管炎や腎炎での治療をめざして、効果的な薬剤・分子のデリバリー(DDS)によって、病態解析、プローブ開発、DDSイメージングについて検討することを目的とした。

そのためには、まず、血管炎モデルのマウスおよびDDSの評価マーカー・プローブを開発し、DDSへの有効性について検討することにした。具体的には、MPO-ANCA関連血管炎の発症機構と治療薬のDDSを目的とした。

すでに、急性進行性糸球体腎炎(RPGN)の病態を示す良いモデルであるSCG/Kjマウスは、活性化好中球が、腎炎の発症に関与することを報告した(Okawara et al, NDT 2004, in press)。また、Candida成分(CADS/CAWS)誘導の冠状動脈炎やIFN-

γ の反応と産生が抑制されているマウス (転写因子 IRF-8/ICSBP 遺伝子欠損) は、好中球の異常と活性化状態を示し、好中球の末梢血や脾臓等への異常増加や分化異常、Gr-1+細胞の脾臓での増大と腎臓への浸潤が認められる。

一方、血管炎誘導のごく初期の血管傷害のイメージング解析により、白血球のかかわりについて検討してきた。T細胞の早期活性化マーカーとして知られている CD69 分子が血小板に恒常的に発現していることに着目し、活性酸素誘導性の血小板血栓形成を指標として、血小板機能における CD69 分子の役割を in-vivo imaging により検討し、血管傷害初期の CD69 分子と好中球の関与があきらかになりつつある。

本年度は、特に、MPO 抗体を結合させた QD(QD-MPO-Ab) を用いた in-vivo imaging による解析に主眼をおいて、QD-MPO-Ab 調製も試みた。

B. 研究方法

1) 血管炎モデルマウス:

a) *C. albicans* 由来物質 (CAWS) を投与し、冠状動脈炎を誘導した。

b) SCG/Kj マウス—自然発症 RPGN

2) in-vivo imaging による血流動態解析:

8 週令の雄の (C57BL/6) マウスを使用した。光感受性物質 zinc coproporphyrin III を各マウスに尾静脈投与し、腸間膜微小循環系細静脈に対して水銀ランプ G 励起光

(540 nm) を照射した。血管内において光化学反応由来の活性酸素を局所産生させた。照射部位の観察には RITC-dextran を用い、顕微鏡に接続したビデオカメラで撮影し、In-vivo imaging 解析した。

3) QD-MPO-Ab の調製:

カルボン酸表面加工 QD と抗マウス igG (ヤギ) 抗体または抗マウス igG (ウサギ) 抗体とを、EDC タンパク質架橋試薬 (Pierce 社) 存在化混合し架橋させた。得られた QD ラベル化抗体液について、Vero 細胞の細胞骨格 tubulin に対する免疫染色を行った。

C. 研究結果

血管炎や腎炎での MPO-ANCA の挙動を解析するために、血管炎モデルマウスを開発した。本マウスにより、MPO-ANCA 分子の DDS を観察した。また、In-vivo Imaging により、血管傷害初期の MPO-ANCA と好中球の関与について検討した。

1) 血管傷害による血流動態の変動:

MPO-ANCA によって血管傷害が引き起こされ、腎炎が誘発された。その初期機構と MPO-Ab の DDS を in-vivo イメージングにより解析した。

蛍光標識した分子で、通常血管傷害に影響を与えないデキストランを投与して、血管傷害を誘発がおこるかを検出した。anti-mouse MPO 抗体の投与によって、糸

球体の血流の速度の低下が観察された（図1）。



図1. マウスの糸球体のイメージング

蛍光標識デキストラン分子の動態により観察。

腎表面血流の *in vivo* イメージングの解析により、血流速度の低下、血流停止、血液の逆流も観察され、血流の停止や血管内皮への白血球の接着についても観察された。また、*in vivo* イメージングの解析から、糸球体の血流速度の低下もみられた。

さらに、マウス糸球体からの血管内皮細胞を分離し、*primary culture* により血管内皮細胞の機能を *in vitro* で解析した。*anti-mouse MPO* の投与によって、インテグリン、セレクチンなどの *adhesion*

molecules の発現が増加した。しかし、コントロールとして用いた *MPO* 抗体を含まない *IgG* の投与では、変化は見られなかった。

2) QD-MPO-Ab の作製：

抗マウス *igG* (ヤギ) 抗体は *QD* との混合によりそのほとんどが不溶性の粗大集合体を形成した。集合体を遠心分離し上清から微量の *QD* ラベル化抗体を得た。この抗体と *FITC* ラベル抗マウス *IgG* の免疫染色像を比較した。*QD* ラベル抗体による染色像は *FITC* のそれと比較して細胞の内部ほど不明瞭であった。これは *QD* の大きさのため細胞に対する透過性が有機色素よりも劣るためと推察される。また、輝度の面では *FITC* に劣るものの *FITC* ラベル抗体より長時間渡り免疫染色像の観察が可能であった（図2）。



図2. *QD-antiTubulin* 抗体で *Vero* 細胞をイメージングした。

D. 考察

血管炎モデルマウスおよび臨床研究の結

果から、MPO および MPO-ANCA 産生が血管炎の発症誘導に不可欠であること、また、炎症性サイトカインが血管炎の発症に連動し、特に、TNF- α , IL-6, IL-10 が重要であることが明らかになってきている。

このことは、これらサイトカインに連動した MPO と MPO-ANCA がこれらサイトカインと連動してこの発症の原因になっていることが強く示唆されている。さらに、これらサイトカインおよび MPO-ANCA は好中球を活性化する際にも重要な役割を担っているものと考えられている (NDT, in press)。一方、本年度は、この現象を MPO-Antibody によって直接観察できたので、QD-MPO-Ab を調製することを試みた。ほぼ、QD-MPO-Ab はできあがっているが、まだ、解析までには、至っていない。来年度、これらを中心に検討する。

以上のように、*in vitro*での解析に加え、本年度の *in vivo* imaging の研究により、MPO-ANCA が好中球と連動あるいは直接に血管傷害を引き起こし、腎機能障害をおこしていることが明らかになった。

2) 糸球体血管内皮細胞の傷害と関連する adhesion molecules の発現:

一方、マウス糸球体の血管内皮細胞の primary culture による血管内皮細胞の傷害を *in vitro* で解析した結果、コントロー

ルの MPO 抗体を含まない IgG の投与では、その発現の変化が認められないインテグリン、セレクチンなどの adhesion molecules が、anti-mouse MPO の投与によって、その発現が増加した。この現象は、好中球を介し、あるいは直接、血管内皮細胞に MPO 抗体が作用していることが考えられる。以上のことから、図2の Scheme に示すように MPO-ANCA が好中球を活性化し、なおかつ直接糸球体の血管内皮細胞に作用して adhesion molecules を発現させ、再度好中球を活性化している可能性がある。

これらのことから、次年度以降、MPO-ANCA による好中球の活性化と血管内皮細胞との関係について *in vivo* imaging と *in vitro*での adhesion molecules の発現を QD-MPO-Ab の DDS の手法により検討する必要がある。

E. 結論

血管炎や腎炎での MPO-ANCA の役割を明らかにするために、血管炎モデルマウスを開発し、MPO-ANCA に関連した発症機構を *In-vivo* Imaging により検討し、血管傷害初期の MPO-ANCA と好中球の関与について検討した。

anti-mouse MPO の投与による *in vivo* イメージングの解析により、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に

についても観察された。

本年度は、この現象を MPO-Antibody に起因することが直接観察できたので、QD-MPO-Ab を調製することを試みた。QD-MPO-Ab は、図3の様な構成で調製していた。

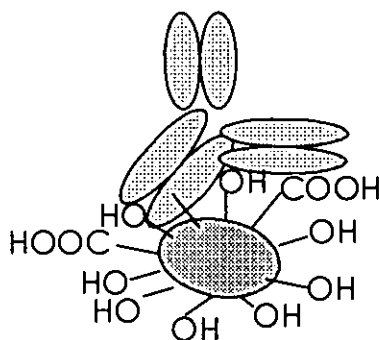


図3. 抗体結合 QD (QD-Ab)

しかし、抗原との結合性、溶解性について問題点をクリアできていないので、再度検討する必要がある。ほぼ、QD-MPO-Ab はできあがっているが、まだ、解析までには、至っていない。

今後は、MPO-ANCA による好中球の活性化と血管内皮細胞との関係について合成した QD-MPO 抗体を用いて、血管傷害のイベントを *in vivo imaging* によって解析するとともに障害する MPO 抗体をブロックする薬剤を投与し、特異的に腎血管にデリバリーする分子を *adhesion molecules* を含めスクリーニングして明らかにする必要がある。

尚、本研究は、国立感染症研究所・長尾朋和博士、国立国際医療センター研究所・山本健二部長および星野昭芳さんの協力に

より行われた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

(1) 誌上発表

1. Akiko Ishida-Okawara, T. Ito-Ihara, Eri Muso, Takahiko Ono, Kan Saiga, Kyuichi Nemoto, Kazuo Suzuki. Neutrophil contribution to the crescentic glomerulonephritis in SCG/Kj mice. *Nephrology, Dialysis and Transplantation*, 2004 in press
2. Ohashi, Y.Y., Kameoka, Y., Persad, A.S., Kohi, F., Yamagoe, S., Hashimoto, K., and Suzuki, K.. Novel missense mutation found in Japanese patient with myeloperoxidase deficiency. *Gene* 327: 195-200, 2004.
3. 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. Comm.* 314: 46-53, 2004.
4. Ichimori, K., Fukuyama, N., Nakazawa, H., Aratani, Y., Koyama,

- H., Takizawa, S., Kameoka, Y., Ishida-Okawara, A., Kohi, F., and Suzuki, K. Myeloperoxidase has directly-opposed effects on nitration reaction - Study on myeloperoxidase-deficient patient and myeloperoxidase-knockout mice. *Free Radical Research* 37: 481-489, 2003.
5. Murata, K., Inami, M., Kubo, S., Kimura, M., Yamashita, M., Hosokawa, H., Nagao, T., Suzuki, K., Hashimoto, K., Shinkai, H., Koseki, H., Taniguchi, M., Ziegler, S.F., H., Nakayama, T. CD69-null mice protected from arthritis induced with anti-type-II collagen antibodies. *Int. Immunol.* 15: 987-992, 2003.
 6. Nunoi, H., Kohi, F., Kajiwara, H., Suzuki, K. Prevalence of Inherited Myeloperoxidase Deficiency in Japan. *Microbiol Immunol.* 47: 527-531, 2003.
 7. Sakamoto, M., Hasegawa, A., Sugaya K., Hashimoto, K., Kimura, M., Yamashita, M., Suzuki, K., Nakayama, T. Distinct calcium response induced by T-cell antigen receptor stimulation in thymocytes and mature T cells. *Bioimages* 11: 1-8, 2003.
 8. Suzuki, K. Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related vasculitis *Internal Med.* 42: 552-553, 2003.
 9. Kamei, K., Sano, A., Kikuchi, K., Makimura, K., Niimi, K., Suzuki, K., Uehara, Y., Okabe N., Nishimura, K., Miyaji, M. The trend of imported myucoses in Japan. *J. Infect. Chemother.* 9: 16-20, 2003.
 10. 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.* 27: 272-278, 2003.
 11. 鈴木和男 血管炎をめぐる世界の動き 「医学のあゆみ」 206:123-126, 2003
 12. 鈴木和男 血管炎発症機構の解析研究 —活性化好中球の関与「医学のあゆみ」 206:133-139, 2003
 13. 鈴木和男 ANCA 関連血管炎の発症機序—活性化好中球の関与—リウマチ科 29:228-236, 2003.
 14. 大川原明子、鈴木和男、猪原登志子、

小野孝彦、武曾恵理、雑賀 寛、根本
久一：半月体形成性腎炎モデルとして
の SCG/Kj マウスの好中球機能
Pharma Medica 21: 157-161, 2003.

(2)学会発表

1. Kazuo Suzuki Seminar in the Department of Biochemistry, Cornell University, Medical School (New York City, USA). "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging", June 6, 2003, New York City, USA.
2. 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 nicotianamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*." Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
3. Kazuo Suzuki "Role of activated neutrophils in vasculitis development". Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
4. Nagao, T., Koshio, O., Mabuchi, A., Ohno, N., Takahashi, K., Minamitani, H., Suzuki, K. "Imaging of renal microvascular injury induced by immune abnormality" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
5. Koshio, O, Nagao, T., Ishida-Okawara, A., Mabuchi, A., Suzuki, K. "The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell" Gordon Research Conferences, June 8-13, 2003, New London, USA.
6. Kazuo Suzuki Seminar in Marine Biological Laboratories. "Role of activated neutrophils in vasculitis development: in-vivo imaging" USA, June 13, 2003, Woods Hole.
7. 猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男、武曾恵理「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第46回日本腎臓病学会学術総会、2003年5月23日、東京
8. Kazuo Suzuki International Symposium Sponsored by Center of Excellence for Advanced Life Science on the Base of Bioscience and Nanotechnology, Sapporo (北海道大学 21世紀 COE プログラム - バイオとナノを融合する新生命科学拠点 - ナノ・イメージングによって切り開く新たなバイオ医療 "In-vivo Imaging of Vasculitis"、2003年7月19日、札幌
9. Manger, B., Suzuki, K. 5th

- International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium, "Chair Talk: The Use of IVIG in Collagen Vascular Diseases, Vasculitis and Atherosclerosis", September 25—27, 2003, Interlaken, Switzerland
10. Ito-Ihara, T., Suzuki, K., Ono, T., Nogaki, F., Suyama, K., Kita, T., Muso, E. 5th International Symposium on IVIG-Intravenous Immunoglobulins in the Third Millenium. "Beneficial effect of intravenous immunoglobulin for patients with myeloperoxidase-antineutrophil cytoplasmic antibody (MPO-ANCA)-associated rapidly progressive glomerulonephritis", September 25—27, 2003, Interlaken, Switzerland
 11. 鈴木和男「血管炎の研究がめざす新たな展開：特に ANCA 関連血管炎」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 12. 高橋啓、大原関利章、鈴木和男、直江史郎「マウス系統的血管炎誘発モデルにおける動脈病変の免疫組織学的検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 13. 武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦、野垣文昭、北徹、鈴木和男「ANCA 関連腎炎・血管炎に対するヒト免疫グロブリン (IVIg) 治療効果の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 14. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、鈴木和男、大野尚仁「真菌多糖の in vitro における IFN- γ 産生増強作用の検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 15. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎および血管炎の発症における CD69 分子の役割」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 16. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎への好中球の関与と炎症性サイトカインによるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 5 回オステオポンチン研究会、生体防御機能異常ワークショップ 2003、第 6 回肝臓生物学会合同年会、2003 年 7 月 17 日～18 日、札幌
 17. 鈴木和男「レビュートーク：血管炎に関するインターフェロン γ 」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京

18. 三浦典子、新郷裕子、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大川原明子、鈴木和男、大野尚仁「Candida albicans 由来可溶性菌体外多糖 CAWS の血管炎誘発活性」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
19. 原田敏江、三浦典子、安達禎之、栗原和記、Keiko Ozato、鈴木和男、大野尚仁第「真菌多糖の樹状細胞分化の調節におよぼす影響—IRF-8 欠損マウスの解析から—」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
20. 越尾修、長尾朋和、石田-大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「血管炎に関与する TNF α および IL-1 β によるヒト血管内皮細胞のアポトーシス誘導シグナルの検討」第 68 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2003 年 7 月 23 日～24 日、東京
21. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第 14 回日本生体防御学会、2003 年 7 月 31 日～8 月 2 日、京都
22. 鈴木和男、松岡俊行、栗原和記、佐々木健夫、Keiko Ozato「血管炎に関与する異常好中球：IRF-8 ノックアウトマウスによる解析」第 14 回日本生体防御学会、2003 年 7 月 31 日～8 月 2 日、京都
23. 鈴木和男、大川原明子、長尾朋和、村山研、亀岡洋祐、大原関利章、高橋啓、直江史郎、大野尚仁、三浦典子、武曾恵理、猪原登志子、小野孝彦「血管炎発症における活性化好中球の関与」第 14 回日本生体防御学会、2003 年 7 月 31 日～8 月 2 日、京都
24. 鈴木和男、南谷晴之、山本健二、眞島利和「日本バイオイメーキング学会と化学工学会の連携による『ナノとバイオの融合学理構築、産業基盤形成』シンポジウム—公開シンポジウム「ナノとバイオの融合 学理構築、産業基盤形成」開催から学ぶ—」、2003 年 9 月 10 日～11 日、松島
25. 鈴木和男、長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾修、馬淵綾子、南谷晴之「新しいイメージング技術へ向けて—IVI 技術 (in-vivo imaging)—」2003 年 9 月 10 日～11 日、松島
26. 大川原明子、猪原登志子、武曾恵理、小野孝彦、雑賀寛、根本久一、鈴木和男「糸球体腎炎の発症、進行における好中球活性化の役割—SCG/Kj マウスを用いた解析—」第 15 回腎とフリーラジカル研究会、2003 年 9 月 20 日、東京
27. Mabuchi, A., Nagao, T., Koshio, O., Suzuki, K., and Wheatley, A.M. "Induction of F4/80^{high+} Mac-1^{high+} nonparenchymal adherent liver cell suppressor function in T cell-mediated murine hepatic injury: involvement of nitric oxide?" American Association of Liver

- Diseases in 2003, October 24-28, 2003, Boston, USA..
28. 鈴木和男、長尾朋和、越尾 修、馬淵綾子、大野尚仁、高橋 啓、南谷晴之、直江史郎「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第8回血管炎研究会、2003年10月18日、秋田
 29. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 30. 長谷川明洋、長尾朋和、村田薫、稲見真倫、鈴木和男、中山俊憲「関節炎の発症における CD69 分子の役割」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 31. 川上真紀子、鈴木和男、F. Vilhardt, K-H Krause, 澤田誠 「脳内細胞ミクログリアのMPO産生」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 32. 荒谷康昭、倉 文明、渡辺治雄、赤川久義、高野幸枝、鈴木和男、Nobuyo Maeda、小山秀機 「ミエロペルオキシダーゼ欠損マウスのクリプトコッカス感染防御能の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 33. 長尾朋和、長谷川明洋、中山俊憲、大野尚仁、三浦典子、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、鈴木和男 「In-vivo イメージングによる腎微小血管傷害の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 34. 大原関利章、横内 幸、若山 恵、山田仁美、三浦典子、鈴木和男、大野尚仁、直江史郎、高橋 啓「カンジダ菌体抽出物誘導動脈炎モデルにおける動脈炎形成過程の経時的検討」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 35. 三浦典子、三川浩輝、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 菌体外多糖画分 CAWS の DBA/2 マウスに対する血管炎誘発活性と反応性の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 36. 大川原 明子、武曾 恵理、猪原 登志子、高野 薫、野口 洋子、松田 潤一郎、鈴木 和男 「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 37. 亀岡洋祐、Amanda Persad、池田文恵、仁保善之、鈴木和男「新規ミエロペルオキシダーゼ欠損症患者に同定された遺伝子変異」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 38. 鈴木和男「MPO-ANCA 関連血管炎」第9回MPO研究会、2003年10月24日—25日、八王子
 39. 越尾修、長尾朋和、大川原明子、馬淵綾子、鈴木和男「The contribution of PMN and the degranulated substances to the activation of p38 MAPK and Caspase 8 in the introduction of Apoptosis of human Endothelial cell」第76回日本

- 生化学会大会、2003年10月16日～18日、横浜
40. 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回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日～31日、横浜
 41. 鈴木和男「細胞・組織障害のメカニズム解析—血管炎を分子とバイオイメージングで解析する—」第12回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日～31日、横浜
 42. 長尾朋和・長谷川明洋・越尾 修・馬淵綾子・南谷晴之・中山俊憲・鈴木和男「活性酸素誘導の血小板血栓形成におけるCD69の役割」第12回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日～31日、横浜
 43. 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回日本バイオイメージング学会学術集会、2003年10月29日～31日、横浜
 44. 三川浩輝、三浦典子、安達禎之、大川原明子、大原関利章、高橋 啓、直江史郎、鈴木和男、大野尚仁「*Candida albicans* 由来菌体外多糖画分CAWSによる致死性血管炎誘発メカニズムの解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 45. 大川原明子、三浦典子、大野尚仁、鈴木和男「*C. albicans* 由来物質 CAWS によって誘起されるマウス冠状動脈炎発症における活性化好中球の役割について」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 46. 村田薫、稲見真倫、長谷川明洋、久保秀一、宮本健志、木村元子、山下政克、長尾朋和、鈴木和男、谷口克、中山俊憲「CD69 ノックアウトマウスにおける抗 type II コラーゲン抗体誘導性関節炎発症の抑制」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 47. 長尾朋和、長谷川明洋、越尾 修、馬淵綾子、南谷晴之、中山俊憲、鈴木和男「活性酸素誘導性の血小板血栓形成におけるCD69の役割」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 48. 村山 研、長尾朋和、越尾 修、長谷川明洋、中山俊憲、新井孝夫、鈴木和男「活性化好中球におけるCD69分子の表面局在」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 49. 濱野慶朋、広瀬幸子、鈴木和男「MPO-ANCA 関連半月体形成性腎炎自然発症モデル SCG/Kj マウスの遺伝的解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 50. 武曾恵理、大川原明子、鈴木和男「遺伝的ネフローゼ腎炎モデルマウス ICGN の好中球活性化の解析」第33回日本免疫学会総会・学術集会、2003年12月8日～10日、福岡
 51. 鈴木和男「Neutrophil functions of patients with MPO-ANCA-related

vasculitis” 第 33 回日本免疫学会総
会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10
日、福岡

52. Aratani, Y., Kura, F., Suzuki, K., and
Koyama, H. “*In vivo* role of
myeloperoxidase for the host defense
against fungal and bacterial
infectios.” 第 33 回日本免疫学会総
会・学術集会、福岡、2003 年 12 月 8 日
～10 日、福岡

53. 荒谷康昭、倉 文明、鈴木和男、小山秀
機「*Cryptococcus neoformans* 感染に対
する生体防御におけるミエロペルオキ
シダーゼの役割」第 33 回日本免疫学会
総会・学術集会、2003 年 12 月 8 日～10
日、福岡

54. 亀岡 洋祐、Persad Amanda、橋本 雄之、
鈴木 和男「ミエロペルオキシダーゼの
第 8 ヘリックスにおける日本人集団の
変異頻度」第 26 回 日本分子生物学会
年会 2003 年 12 月 10—13 日、神戸

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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

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、エノラーゼの4つのターゲット候補タンパク部分の内、GL16の一部のペプチドシーケンスを用いた MAPs (Multiple antigenic peptides) の作製を行い、その構造の解析を行った。CD スペクトラ法により、Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs が、 α ヘリックス構造を示して抗原部位を強く提示することが判明した。今後、ターゲットとなりうる分子構造への DDS 開発のために、その分子の免疫学的特徴を詳細に検討する必要があると考えられた。

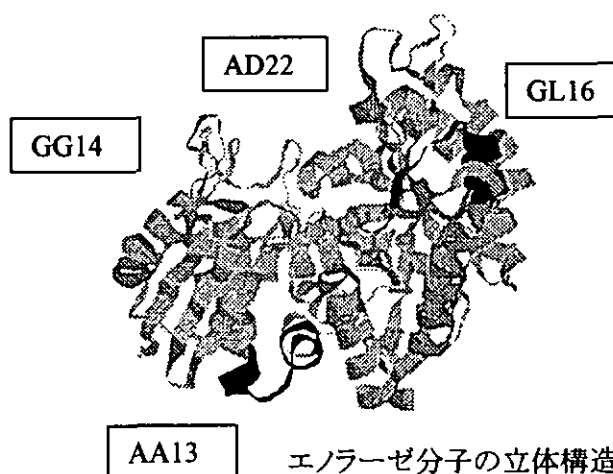
A. 研究目的

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。

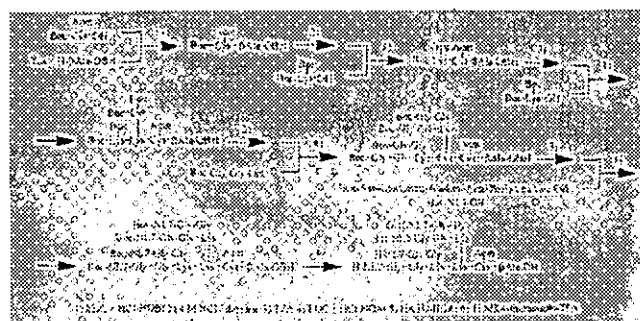
B. 研究方法

昨年度の成果より、エノラーゼの部分ペプチドが、ヒトに対する抗原性を持つ可能性が示唆されたため、同分子のペプチド抗原をさらに改良して設計することで、その反応性を高めることができるのではないか考え、右の図の4つの部分の内、GL16の一部のペプチドシーケンスを用いた MAPs (Multiple antigenic peptides) の作製を行い、その構造の解析を行った。

タンパクの合成は、fragment condensation および stepwise coupling を用いた solution-phase 法で行った。



MAPs 合成の過程は convergent procedure により、Lys-または Glu-を枝の core とする構造を取らせた。



作製したすべてのタンパクは、沈降クロマトグラフィーで精製し、融点を測定し、また NMR および mass spectroscopy で構造や分子量を測定することでその精度を確認した。

(倫理面への配慮)

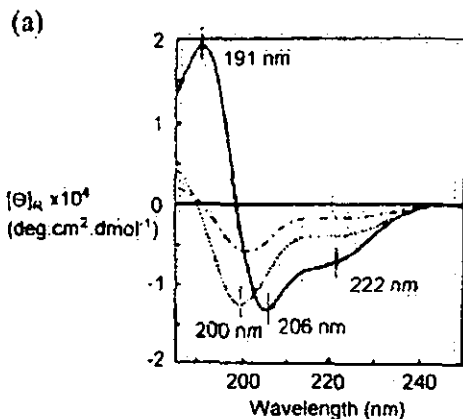
本研究においては、一部抗原性の解析にマヒドン大学医学部のマラリア患者血清を用いたが、検体の採取にあたっては、同大学の倫理規定に従って行った。

C. 研究結果

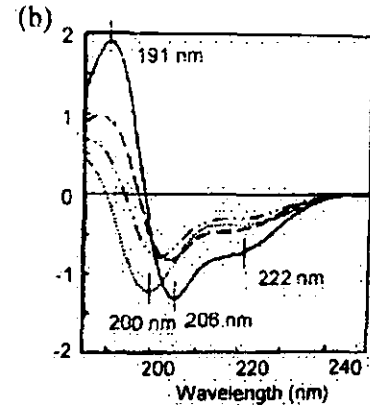
作製することができたペプチドのシエマティック構造は以下の 5 種で、(1)H-NL7-OH、(2)H-NL7-GG-OH、(3)-GlyGly-リンカー構造をもつ di-epitope、(4)Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs、(5)Glu 枝を持つ tetra-epitope MAPs である。

- (1) H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-OH
- (2) H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly-OH
- (3) H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly-Lys-βAla-OH
 $\begin{array}{l} \text{H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly} \\ \diagdown \end{array}$
- (4) H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly-Lys Acm
 $\begin{array}{l} \text{H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly-Lys} \\ \diagdown \end{array}$ Acm
 $\begin{array}{l} \text{H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly-Lys-Lys-Cys-βAla-OH} \\ \diagdown \end{array}$
 $\begin{array}{l} \text{H-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-GlyGly} \\ \diagdown \end{array}$
- (5) $\begin{array}{l} \text{-GlyGly-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-OH} \\ \diagdown \end{array}$
 $\begin{array}{l} \text{-Glu-GlyGly-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-OH} \\ \diagdown \end{array}$
 $\begin{array}{l} \text{H-βAla-Glu-Gly-Gly-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-OH} \\ \diagdown \end{array}$
 $\begin{array}{l} \text{-GlyGly-AsnGluAlaLeuAspLeuLeu-OH} \\ \diagdown \end{array}$

上記(1)で作製した H-NL7-OH に関して、まず CD spectroscopy を行ったところ、α-helix 構造を短いシーケンスでありながら巻いていることが判明した。(2)の-Gly-Gly- linker がついている方がより α-helix 構造が著明であった (Figure (b) に示す点線および・-線)。



(4)および(5)の MAPs に関しては、Glu-core は安定した構造を保たないことが了解され、一方 Lys-core は Figure (a)および(b)の実線部分で示されるように、安定な α-helix 構造をとっていることが判明した。



D. 考察

熱帯熱マラリア患者はマラリアの自然感染によって解糖系酵素エノラーゼに一定の抗体を産生することとなる。本研究において作製した Lys 枝を持つ tetra-epitope MAPs は安定な α-helix 構造をとることより、その抗原性を増すことが予想される。この MAPs を抗原にした ELISA を行い、タイのマラリア患者の血清との反応性を見たところ、他の抗原に比べて強い抗原性を示した (データは今回は示さない)。今後本手法を応用して、薬剤のターゲットとなるところの分子や、さらにはワクチン候補分子の MAPs を作製することで、それぞれの患者血清との反応性をナノレベルで詳細に検討してゆく必要がある。

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、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ナノレベルで把握する必要がある。今後重要エピトープの MAPs を利用して、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. 健康危険情報「なし」

G. 研究発表

Noi M, Ishiguro T, Oku H, Yamada K, Sato K, Kano S, Suzuki M, Katakai R: Solution-phase synthesis and structural analysis of multiple antigenic peptides having partial sequences of *Plasmodium falciparum* enolase, *In* Peptide Science 2002, Yamada T ed., The Japanese Peptide Society, Osaka, 2003

H. 知的所有権の出願・取得状況「なし」

アテロコラーゲン・ナノ粒子による DDS

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所 室長

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ることを意味する。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。

A. 研究目的

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応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案する必要がある。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-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。本研究で特に注目するのは、このアテロコラーゲンと遺伝子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点にあり、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研究目的である。

B. 研究方法

1. アテロコラーゲンの特徴

バイオマテリアルの一つであるアテロコラーゲンによって細胞や生体内に遺伝子医薬が導入可能であることが示されたのはプラスミド DNA ベクターが最初であるが、実際には細胞内や体内で不安定であると考えられていたアデノウイルスなどのウイルスベクターや、アンチセンス技術に関わるオリゴヌクレオチドや siRNA オリゴなどの体内徐放によるデリバリーにも応用可能であることが判明している。コラーゲンは皮膚真皮 (dermis) など結合組織を形成している繊維状蛋白質で、細胞の足場蛋白質として各組織、器官の形態保持に重要な役割を果たしている。コラーゲン分子の両末端にはコラーゲンの持つ抗原性の大部分を有するテロペプチドが付いており、ペプシンによる分解でテロペプチドだけが消化切断されたものがアテロコラーゲンである。アテロコラーゲンの医療材料としての特性は広く、コラーゲンやアテロコラーゲンは医用材料として、生分解性の縫合糸、止血剤、創傷被覆剤、皮膚陥没部修復用皮下注入剤などに汎用されている。

2. DDS としてのアテロコラーゲン

遺伝子治療を現実のものとするためには、生体内での急速な分解と失活に耐え、生体内の目的の細胞への的確に送り届ける DDS 技術が要求される。この点で遺伝子医薬

を生体由来の分解酵素から保護し、他の遺伝子導入方法や蛋白質を導入する方法と比べて、生体内で長期間にわたってコントロールリリースさせるアテロコラーゲンの諸性質は大きなアドバンテージとなる。このアテロコラーゲンのデリバリーの特長を生かして、1999年に我々が初めて遺伝子ベクターの生体内デリバリーとコントロールリリースを証明し、その後この技術を用いた動物疾患モデルを用いた実証検討も進んでいる。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、さらに標的的特異性を持たせることの可能な分子を組み込む技術が必要となる。

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. 研究結果

(1) アテロコラーゲンと DNA の混合比を変えることによる複合体形成の変化

アテロコラーゲンと DNA との相互作用は静電気的な結合であり、両者の混合比を調節することによって複合体の形状は大きく変化することが判明した。まずアテロコラーゲンの濃度を大きくすると（1%）複合体は繊維状の肉眼で観察可能な大きな形状であった。これに対して、低濃度のアテロコラーゲン（0.1%以下）では細胞に取り込まれやすいナノサイズの粒子状に成形することが可能であった。平均的な直径は100から300ナノメートルの粒子であり、クエン酸を含有する液体中では複合体同士の凝集は起こらなかった。さらにこれらのナノサイズの混合物をあらかじめ96穴のマルチプレート上に固定し、そこに細胞を播き込むと、細胞への遺伝子導入と発現が可能であったことから、子0レラの粒

子は細胞への取り込みに優れていることが明らかとなった。また細胞に対する増殖抑制や細胞死の誘導などの毒性は認められなかった。

(2) アテロコラーゲンと DNA の複合体の動物固体への投与

100-300ナノメートルの径を持つ GFP 発現プラスミド DNA 含有アテロコラーゲン複合体を、動物（マウス）の尾静脈から全身性に導入し、その分布を調べた。その結果、アテロコラーゲンのナノ粒子は脳を除く、肝臓、肺、腎臓などの幅広い臓器に分布し、さらに GFP の発現は肝臓で明らかに確認が可能であった。また複合体を大腿部の筋肉に投与したところ、投与部位での発現は少なくとも1週間は持続することが確認できた。

また投与された動物における毒性についても検討した。まずアテロコラーゲンと DNA の複合体の投与によってはマウスに体重の減少、発熱などの兆候は観察されなかった。さらに3日置きに尾静脈から採血し、GOT, GPT などの肝毒性の指標を検討した結果、数値は正常と変わりなかった。以上の事実から、アテロコラーゲンのナノ粒子は動物個体に対する毒性が少ないと判断できた。

(3) ナノ粒子の安定性

アテロコラーゲンと DNA の複合体が体液中でどの程度安定であるかは、遺伝子導入の成否を決定する上で大きな要素となる。今回は100-300ナノメートルの複合体を50%ウシ胎児血清を含む培養液中でインキュベートした後、DNA を回収し、アガロースゲル電気泳動によってその分解の程度を検討した。その結果、裸のプラスミド DNA は血清中で5分もすると分解されてしまうのに対して、アテロコラーゲン複合体では、60分以上に渡って安定に存在した。以上の結果より、アテロコラーゲンナノ粒子は遺伝子を生分解から防御する能力があり、生体の血液中でも安定に存在する可能性が示唆された。

D. 考察

1) 達成度について

我が国独自の材料と技術によってもたら

されたアテロコラーゲン・ナノ粒子による遺伝子デリバリーのコア技術の確立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

がんに対する遺伝子治療は、自殺遺伝子を用いた遺伝子治療、サイトカイン遺伝子などを用いて抗がん免疫を賦活化させる免疫遺伝子療法、骨髄保護療法、それにがんの生物学的異常を標的にする遺伝子治療、などが代表である。これらの方法のいずれにも共通するのが、潜在的な細胞障害性、全身性副作用の懸念であり、安全かつ効率的な遺伝子治療の達成のためには、治療用遺伝子をがん細胞に限局的に発現させる必要が国際的な緊急課題の一つである。そのためには、(a)ベクターの細胞選択性によるがん細胞特異的遺伝子導入、(b)導入された治療用遺伝子が、転写・翻訳のレベルでがん細胞特異的に発現する、などを達成する工夫が必要である。従来の方法では、これら二点を満たすようなウイルスベクターが改良されてはいるものの、正常細胞への感染の危険性や、ウイルスベクターそのものの毒性は依然として残されているほか、特異的プロモータの遺伝子発現能力が弱いため、十分な抗がん効果が得られていないのが実情である。

本研究では、これらのウイルスベクターによる遺伝子治療の欠点を補い、より効果的で安全な遺伝子治療技術の確立を目指す。そのために、非ウイルス導入方法として開発されてきたアテロコラーゲンによる遺伝子デリバリーシステムを採用し、がん細胞・組織特異的な遺伝子導入のための新技術の開発を実施することは学術的、社会的にも大きな責務である。本年度の成果から、アテロコラーゲン・遺伝子ベクターの複合体をナノサイズの粒子に製剤化する技術の確立が確かなものとなった。

3) 今後の展望について

次年度以降は、がん特異的に発現する細胞膜糖たんぱく質などに対する人工抗体やオリゴペプチドを、ナノ粒子表面に配列し、がん細胞への高効率のターゲティングを達成する。様々な条件検討などにより、標

的臓器特異的、がん特異的な標的遺伝子治療の基盤技術を確立する。

E. 結論

本年度の研究成果は、アテロコラーゲンと遺伝子複合体のナノ粒子化技術の確立の基礎になり研究成果であり、今後の標的遺伝子導入に向けての複合技術の開発に道が開けた。

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. Sano A, Maeda M, Nagahara S, Ochiya T, Honma K, Itoh H, Miyata T, Fujioka K. Related Articles, Atelocollagen for protein and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 55(12): 1651-1677, 2003.
2. Hirai K, Sasaki H, Sakamoto H, Takeshita F, Asano K, Kubota Y, Ochiya T, Terada M. Antisense oligodeoxynucleotide against HST-1/FGF-4 suppresses tumorigenicity of an orthotopic model for human germ cell tumor in nude mice. *J Gene Med.* 5(11): 951-957, 2003.

2. 学会発表

- 1) 落谷 孝広、Atelocollagen-based gene transfer technology. 第76回日本生化学会大会(シンポジウム) 2003.10.17
- 2) 落谷 孝広、アテロコラーゲン DDS による生体内での遺伝子発現制御、第3回遺伝子デリバリー研究会(招待講演) 2003.5.9
- 3) 落谷 孝広、Atelocollagen-mediated gene transfer of gene medicines. 第二回国際 New Biomedical Material 学会(招待講演)(英国・ウェールズ) 2003.4.5-8.

H. 知的所有権の出願・取得状況 特許出願

発明の名称：核酸導入促進剤
出願番号：特願 2001-186320
発明者：落谷 孝広、他
出願状況：国際出願 2003. 6.

生物・医療応用
遺伝子導入ベクターとしての架橋ミセルの評価

分担研究者 斯波 真理子 国立循環器病センター研究所 室長

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。

A. 研究目的

in vivo 遺伝子導入のためのベクターとして、1.DNAを*in vivo*で一定の時間、安定した粒子として存在させることができること、2.DNAを目的の臓器まで送付できること、3.目的の細胞内への取り込み機構を有すること、4.細胞に取り込まれてから、ライソゾームなどでの分解を回避できること、5.核内への移行が可能であること、6.遺伝子発現が可能であることなどが必要である。我々は、片岡らとの共同研究で、これらの条件を充たすベクターの開発を行っており、共重合体を用いたDNA複合体であるPICミセルが血中で安定であること、*in vitro* および *in vivo* で遺伝子発現が可能であることを既に報告した。本研究では、さらにPICミセルの遺伝子発現効率を上昇させるため、SS結合でPICミセルの内核を架橋したベクターを用いた。ミセルの内核をSS結合で架橋することにより(図1)、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ターンオーバースタディ、*in vitro* および *in vivo* に

おける遺伝子発現実験を行い、遺伝子導入ベクターとしての評価を行った。

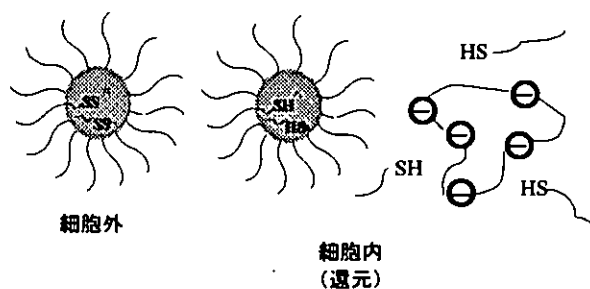


図1

B. 研究方法

1. *in vivo* ターンオーバースタディ

内核をSS結合で0%、4.6%、12.7%、28.2%架橋し、pGL3-Contを含んだPICミセルを用意した。マウス尾静脈よりそれぞれのSS結合を内核を持った架橋ミセルを投与、30分後の血液を採取し、凍結保存した。血液よりDNAを抽出後、電気泳動を行い、サザンブロッティングを行った。ルシフェラーゼ遺伝子をプローブとしてハイブリダ