

- Preparation and Application to On-Off Regulation of Insulin-Release, 40th IUPAC International Symposium on Macromolecules (MACRO 2004) Topic 5: Polymers for Advanced Applications, Paris, France, 2004. 7. 8. (招待講演)
- 11) Kazunori Kataoka, Multi-Functional Block Copolymer Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, Seminar at Max-Planck-Institute of Colloids and Interfaces Golm 14424 Potsdam, Germany, 2004. 7. 9. (招待講演)
 - 12) 片岡 一則, 高分子ミセルによる標的治療, 第51回高分子夏季大学, 東京都立大島セミナーハウス, 東京, 2004. 7. 12. (招待講演)
 - 13) 片岡一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子デリバリー, 第20回日本DDS学会, 京王プラザホテル, 東京, 2004. 7. 15. (招待講演)
 - 14) Kazunori Kataoka, Two-Dimensional Array Formation of Multi-Cellular Spheroids on Micro-Patterned Polymer Brush Surface, The 6th Asia Symposium on Biomedical Materials, Hongzhushan Hotel, Emei City, Chengdu, China, 2004. 7. 19. (招待講演)
 - 15) 片岡 一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリーー ナノテクノロジーが拓くフロンティアメディシンへ, ゲノムテクノロジー特別講演会, 大阪大学大学院薬学研究科特別講義室, 大阪, 2004. 7. 26. (招待講演)
 - 16) Kazunori Kataoka, Polymer Nano-micelles for Pinpoint Drug and Gene Delivery, 2004 Annual Meeting of CBI Society, Komaba Eminence, Japan, 2004. 7. 28. (招待講演)
 - 17) 片岡 一則, 高分子ナノミセルデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, みらいせらい展健康系イベントシンポジウム ドラッグ/遺伝子デリバリーシステム (DDS) とナノテクノロジー, 日本科学未来館, 東京, 2004. 8. 10. (招待講演)
 - 18) 片岡 一則, 高分子ナノミセルによる遺伝子・薬物デリバリー: 最近の話題, 遺伝子・デリバリー研究会夏期セミナー 2004, 登別温泉石水亭, 北海道, 2004. 8. 11. (招待講演)
 - 19) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles As Nanocarriers For Gene and Drug Delivery, Banff Centre, Alberta, Canada, 2004. 8. 25. (招待講演)
 - 20) Kazunori Kataoka, Polyion Complex Micelles Encapsulating Light Harvesting Ionic Dendrimer Porphyrins for Photodynamic Therapy, Gordon Research Conference Drug Carriers in Medicine & Biology, Big Sky Resort, Big Sky, MT, USA, 2004. 9. 6. (招待講演)
 - 21) Kazunori Kataoka, Supramolecular Assemblies for Intracellular Drug Delivery: Polymer micelles that are responsive to intracellular chemical signals, Xiangshan Science Conference on Functional Supramolecular Systems: Micro- and nano-structures as tools for materials science and biotechnology, Changchun, China, 2004. 9. 18. (招待講演)
 - 22) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Gene and Drug Delivery, France-Japan 6th Drug Delivery Symposium, Biarritz, France, 2004. 9. 22. (招待講演)
 - 23) 片岡 一則, 固形がんを標的とする高分子ナノミセル型 DDS, 第63回日本癌学会総会シンポジウム S08「新たながん化学療法の開拓へ向けて」, 福岡サンパレス, 福岡, 2004. 9. 29. (招待講演)
 - 24) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles As Nanocarriers For Gene and Drug Delivery, BioJapan 2004 Symposium, New Takanawa Prince Hotel, Tokyo, Japan, 2004. 9. 30. (招待講演)
 - 25) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles As Nanocarriers For Gene and Drug Delivery, Taiwan-Japan Advanced Biomaterials Symposium, Taiwan, 2004. 10. 4. (招待講演)
 - 26) 片岡 一則, 高分子ナノミセルによる薬

- 物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第3回界面科学アドバンスセミナー(日本油化学会), 神奈川大学, 横浜, 2004.10.10. (招待講演)
- 27) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles as Nanocarriers for Tumor-targeted Drug Delivery, 9th World Congress on Advances in Oncology and 7th International Symposium on Molecular Medicine, Creta Maris Hotel, Hersonissos, Crete, Greece, 2004.10.15. (招待講演)
- 28) Kazunori Kataoka, Smart Nanomaterials and Applications ~Block Copolymer Micelles As Nanocarriers For Gene and Drug Delivery~, 2004 Textile International Forum and Exhibition, The Grand Hotel, Taipei, Taiwan, 2004.10.22. (招待講演)
- 29) 片岡 一則, 肝臓細胞アレイの構築と機能, 平成16年度第一回細胞アレイ研究会, 新宿三井ビル3F NTT アドバンスドテクノロジー社, 東京, 2004.10.28. (招待講演)
- 30) 片岡 一則, 高分子ナノミセルによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第24回表面科学講演大会(表面科学会)研究部会セッション「ソフトナノテクノロジー」, 早稲田大学国際会議場, 東京, 2004.11.9. (招待講演)
- 31) 片岡 一則, 科学技術振興機構ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ(医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製)公開シンポジウム「ナノメディシン - ナノテクノロジーが拓く未来医療」, 国連大学3階ホール, 東京, 2004.11.10. (招待講演)
- 32) 片岡 一則, ピンポイント遺伝子・薬物デリバリーのためのナノデバイス設計, 国立身体障害者リハビリテーションセンター創立25周年記念シンポジウム, 全国社会福祉協議会・灘尾ホール, 東京, 2004.11.13. (招待講演)
- 33) 西山 伸宏・片岡 一則, 標的選択的遺伝子導入を実現する新規ナノDDSの創製, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2004(第11回つくばバイオマテリアル研究会), つくば国際会議場, つくば, 2004.11.15. (招待講演)
- 34) Kazunori Kataoka, Smart Polymeric Micelles As Nanocarriers For Gene and Drug Delivery -Challenge to Intracellular Nano-Medicine-, 4th Asian International Symposium on Biomaterials (AISB4) and 2nd International Symposium on Fusion of Nano- and Bio-Technologies (FNB2004), Tsukuba International Congress Hall, Japan, 2004.11.18. (招待講演)
- 35) 片岡 一則, ナノバイオの最前線'ドラッグデリバリー', 第10回大阪市立大学ナノサイエンス・ナノテクノロジーフォーラム, 大阪市立大学学術情報総合センター10F, 大阪, 2004.11.26. (招待講演)
- 36) 片岡 一則, 薬物・遺伝子ナノキャリアとしてのブロック共重合体ミセル ~高分子が先導するナノ医療システム実現に向けて~, 多元ナノ材料研究センターシンポジウム, 東北大学多元物質科学研究所 多元ナノ材料研究センター, 仙台, 2004.11.30. (招待講演)
- 37) 片岡 一則, 高分子ナノミセルデバイスによる薬物・遺伝子のピンポイント・デリバリー, 第14回アンチセンスシンポジウム, 東京工業大学フロンティア創造共同研究センター, 横浜, 2004.12.3. (招待講演)
- 38) 片岡 一則, ナノテクノロジーの医療とDDS ~ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計~, 第19回「大学と科学」公開シンポジウム「人体にやさしい医療材料」, 一橋記念講堂, 東京, 2004.12.4. (招待講演)
- 39) Kazunori Kataoka, International Symposium on Biomedical Systems Innovation, Takeda Conference Hall, The University of Tokyo, Japan, 2004.12.9. (招待講演)
- 40) 片岡 一則, 高分子ミセルによる薬物・遺伝子デリバリー, 第12回山形分子生物学セミナー, 山形大学医学部, 山形市,

- 2004.12.15. (招待講演)
- 41) 片岡 一則, ナノテクノロジーが拓く未来医療 ~ピンポイント診断・治療のためのナノデバイス設計~, 北陸先端科学技術大学院大学セミナー, 石川, 2005.1.14. (招待講演)

- 1) 片岡一則、位高啓史、福島重人、金山直樹、2本鎖オリゴ核酸を担持したポリイオンコンプレックスおよびその製造法とそれを含む医薬組成物、特願 2004-037322
- 2) 片岡一則、今井豊、鉄コロイドの製造方法及び鉄コロイド担持高分子ミセル、特願 2004-044395

H. 知的所有権の出願・取得状況

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 16 年度 班会議

平成 16(2004)年 12 月

国立国際医療センター研究所

B 棟地下 1 階 中会議室

平成 16 年度 QD 等 DDS 班会議

日時： 平成 16 年 12 月 27 日(月) 12 時 00 分～16 時 00 分

場所： 国立国際医療センター研究所 B 棟地下 1 階 中会議室

司会 山本健二(国際医療セ研究所・副所長)

12 時 00 分～12 時 30 分 (昼食・こちらで準備いたします)

12 時 30 分～12 時 45 分 はじめに 山本健二

12 時 45 分～13 時 00 分 片岡一則(東京大学大学院工学系研究科)

「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」

13 時 00 分～13 時 15 分 斯波真理子(国循・研究所バイオサイエンス部)

「高分子ナノ粒子による *in vitro* および *in vivo* の遺伝子導入」

13 時 15 分～13 時 30 分 落谷孝広(国立がんセンター研究所・がん転移研究室)

「アテロコラーゲンナノ粒子による siRNA の全身投与の検討」

13 時 30 分～13 時 45 分 近藤昭彦 (神戸大学工学部)

「ピンポイントドラッグデリバリーを目指したバイオナノ粒子の開発」

13 時 45 分～14 時 00 分 土肥多恵子 (国際医療セ研究所・消化器疾患研究部)

「QD を用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析」

14 時 00 分～14 時 15 分 (休憩)

14 時 15 分～14 時 30 分 名取泰博 (国際医療セ研究所・臨床薬理研究部)

「腎疾患治療に向けた DDS」

14 時 30 分～14 時 45 分 切替照雄 (国際医療セ研究所・感染/熱帯病研究部)

「量子ドットの感染症への応用」

14 時 45 分～15 時 00 分 狩野繁之 (国際医療セ研究所・適正技術開発・移転研究部)

「マラリアワクチン DDS に向けての基礎研究」

15 時 00 分～15 時 15 分 鈴木和男 (国立感染症研究所・生物活性物質部)

「QD 標識 MPO 抗体による血管炎の解析」

15 時 15 分～15 時 30 分 古谷昌弘 (セキスイ化学・開発研究所)

「ゲストタンパクを封入したシャペロニンの構造」

15 時 30 分～15 時 45 分 山本健二 (国際医療セ研究所・副所長)

「量子ドットによる DDS」

15 時 45 分～16 時 00 分 来年度に向けて 山本健二

国立国際医療センター研究所・副所長：山本健二

〒162-8655 新宿区戸山 1-21-1, Tel: 03-3202-7181 ext. 2856

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（東大院工・東大院医） kataoka@bmw.t.u-tokyo.ac.jp

遺伝子発現活性を高める高分子ミセル型遺伝子ベクターを構築するために、ブロック共重合体の精密合成、機能評価を推進した。まず、プロトン化度の異なる2つ以上のアミンを持つポリカチオンセグメントを用いることによって、①安定なコンプレックス形成機能と②効率的な細胞質内輸送のためのエンドソーム溶解機能という2つの機能を両立させたシステム構築を行った。これにより、高分子ミセルは従来のシステムと比較して100～1000倍の遺伝子発現活性を示すことが明らかとなった。

また、ミセル内核へのジスルフィド (SS) 架橋の導入により、生理的環境下での安定性の向上、細胞内での還元環境に応答した核酸分子のリリースコントロールが可能となった。この架橋導入ミセルでは、調製されたミセルを凍結乾燥した後に再溶解し遺伝子導入に用いても、全く機能が損なわれないことも確認された。これは、*in vivo* への使用に向けて、調製濃度を容易にコントロールできること、および将来のサンプル保存管理のしやすさにおいても、非常に重要なポイントと考えられた。実際、本ミセルをマウス眼底静脈より全身投与することによって、肝実質細胞に良好なレポーター遺伝子の発現を導くことに成功した。

さらに、ミセル外殻への標的指向性分子 (リガンド) の導入を進めた。ラクトースリガンド導入ミセルにより、初代培養株肝細胞への選択的な効率よい遺伝子導入が可能となった。また、RGDリガンド導入ミセルにより、ラット関節内滑膜への *in vivo* 遺伝子導入及びウサギ頸動脈バルーン擦過モデルにおける内膜への遺伝子導入も確認された。いずれも数日から数週という長期の遺伝子発現が観察され、ミセルの生理的環境下での安定性、DNAのコントロールされたリリースが有効に機能した結果と考えられた。

高分子ナノ粒子による *in vitro* および *in vivo* の遺伝子導入

国立循環器病センター研究所バイオサイエンス部 斯波真理子

東京大学大学院工学系研究科

片岡一則

[背景]我々は、循環器疾患に対する新しい遺伝子治療法として、高分子ナノ粒子を用いた遺伝子導入の試みを行っている。高分子ナノ粒子としては、ポリエチレングリコールとポリLリジンのブロック共重合体、さらに架橋を導入した架橋ミセルでの *in vitro* および *in vivo* 遺伝子導入を行い、発現効率を上昇させる条件検討を行っている。

[方法]架橋ミセルとして、5%、13%、28%、37%架橋を導入したものを作製した。*in vitro* 遺伝子導入は、Cos-1、血管内皮細胞、ヒト単球由来白血病細胞株(THP-1)細胞、HepG2 細胞を用い、リポーター遺伝子としてルシフェラーゼを用いた。高分子ナノ粒子をトランスフェクションさせ、1 日後に遺伝子発現効率として、ルシフェラーゼ活性測定を行った。*In vivo* 遺伝子導入は、気管内投与、上腸間膜静脈投与、頸静脈投与を行った。

[結果]Cos-1 細胞に対し、遺伝子導入を行ったところ、ポリLリジンの重合度で発現効率が変化していた。また、架橋ミセルでは、28%のもので最高の発現効率を示した。血管内皮細胞に対する遺伝子導入では、13%のもので最高の発現効率を示した。THP-1 細胞、HepG2 細胞でも、同様に、13%のもので最高の発現効率を示した。一方、気管内投与では、投与1 日後に13%、28%のもので、肺において有為な遺伝子の発現を認めた。上腸間膜静脈投与、および頸静脈投与では、遺伝子発現を認めなかった。

[考案]架橋ミセルにおいて、*in vitro* では血管内皮細胞、マクロファージなどふつうのベクターでは遺伝子導入が困難な細胞に対して、著明な遺伝子発現を認めた。また、気管内投与により、*in vivo* での遺伝子導入も可能であった。我々は、さらに *in vivo* で極端に著明な遺伝子発現を示すベクターの開発を行っている。

アテロコラーゲンナノ粒子による siRNA の全身投与の検討

落谷 孝広

国立がんセンター研究所

Small interfering RNA (siRNA)はその抑制作用の効率性と簡便性の高さから、医薬品や治療および予防法への開発が期待されている。siRNA を医薬品として使用するためには、デリバリー方法が重要であり、投与された siRNA が標的臓器(細胞)に輸送され、治療効果が得られるまで生体内で安定に存在し、その効果を持続するものでなければならない。我々はアテロコラーゲンを担体として siRNA のデリバリーシステムの開発を行ってきた。これまでの研究で局所においては siRNA の効果を持続させることを報告してきたが、今年度は、全身投与への適用を目的としてアテロコラーゲンナノ粒子による検討を行った。ルシフェラーゼを安定に発現する細胞である PC-3M-Luc 細胞は、マウスの心室内に注入して全身を循環させると、骨を含めた様々な臓器への転移能を示す。この転移モデルマウスに、ルシフェラーゼに対する siRNA/アテロコラーゲン複合体を尾静脈投与し、投与前と投与翌日の発光量を測定した結果、siRNA 単独投与に比べ siRNA/アテロコラーゲン複合体の投与でリンパ節や骨に転移した腫瘍の発光量を有意に抑制した。よって、siRNA/アテロコラーゲンナノ粒子は、siRNA を全身性にデリバリーすることが可能な優れた担体であることが示唆された。

関連する本年度の主な業績

- 1) Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. **Nucleic Acids Res.** (2004) 32(13):e109.
- 2) Honma K, Miyata T, and Ochiya T. Atelocollagen-based cell transfection array allows high-throughput screening of gene functions and drug discovery. **Current Drug Discovery Technologies**, in press.

ピンポイントドラッグデリバリーを目指したバイオナノ粒子の開発

近藤 昭彦
(神戸大工・応用化)

遺伝子治療並びにドラッグデリバリーの分野において、標的臓器のみへのデリバリー（ピンポイントデリバリー）が非常に重要な課題となっている。このことは副作用の低減といった点で患者の QOL の改善に大きな意味を持つと考えられる。我々はピンポイント遺伝子及び薬剤デリバリーを目指し、新規ベクターである B 型肝炎ウイルス表面抗原粒子に関する研究を行っている。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、粒子内に薬剤を封入し、静脈注射によってヒト肝細胞に安全かつピンポイントに導入できることが期待される。既に、この粒子を用いたヒト肝細胞へのターゲティングに成功している。そこで、より適用範囲を拡大するために、肝細胞以外のさまざまな細胞へも導入可能な粒子の開発について検討した。このために、今回は、ヒト肝細胞への認識部位を削除した欠失変異導入粒子を作成し、新たな特異性を付与するために上皮増殖因子 (EGF) を提示した粒子の作製を行った。

具体的には B 型肝炎ウイルスの L タンパク質を遺伝子改変し、3 種類の欠失変異導入タンパク質 ($\Delta 21-153$, $\Delta 33-153$, $\Delta 50-153$) 並びに、これらの欠失部位に EGF を挿入した EGF 提示タンパク質の発現プラスミドを構築した。L タンパク質の C 末端部位には、タンパク質薬剤のモデルとして緑色蛍光タンパク質 (GFP) を融合した。構築した遺伝子を動物細胞 Cos-7 に形質転換することで欠失変異導入粒子、EGF 提示粒子を作製した。GFP の融合した場合も、GFP を内部に包含する形で L 粒子は形成され、これにより、粒子は蛍光標識されて可視化可能となる。次に、得られた各種の欠失変異導入粒子および EGF 提示粒子をヒト肝癌細胞 NuE 及び EGF レセプターを過剰発現しているヒト上皮癌細胞 A431 に添加し、各粒子のトロピズムを調べた。その結果、50-153 アミノ酸残基を欠失させた粒子においては、肝細胞特異性が失われ、EGF 提示粒子はヒト上皮癌細胞 A431 に特異性を示すというように、明確にその特異性の改変が認められた。この結果は、EGF 提示粒子が上皮系細胞へのドラッグデリバリーに利用可能であることを示唆する。この様に、50-153 アミノ酸残基を欠損させた粒子に各種の目的細胞や臓器へホーミング可能なペプチドを挿入することで、各種標的へのピンポイントドラッグデリバリーが可能となると考えられる。

生物・医療応用
(QDを用いた *in vivo* 細胞トラフィックの解析)

分担研究者 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

協力研究者 星野昭芳

国立国際医療センター研究所医療生態学研究部 流動研究員

本研究の目的は、消化管炎症における消化管と他の臓器との細胞交通を解析することによる診断・治療のターゲットの探索である。今回はハプテンであるトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 大腸内投与により、炎症を誘導したときのマクロファージ系細胞の動きの解析を行った。ナイーブ C57BL/6Jマウスより採取した腹腔マクロファージならびに骨髄から誘導したマクロファージ様細胞を蛍光ナノ粒子QD655で標識した。標識細胞をマウスに腹腔または尾静脈投与し、標識細胞をマウスに腹腔または尾静脈投与し、同時に 2%TNBS in PBS:ethanol=1:1 (TNBS100 μ g/g weight)を大腸内に注入して大腸炎を誘導した。TNBSの投与後24時間後に大腸、脾臓、腸管膜リンパ節のQD標識細胞をFACSで検出した。また凍結切片を作成し腸管への集積を組織学的に検討した。この用量のTNBSでは深い潰瘍を形成するが、腹腔由来マクロファージ細胞は粘膜固有層内に浸潤することはなく、潰瘍穿孔部分を塞ぐように漿膜側に形成された細胞塊 (plaque) 部位に特異的に集積した。一方、骨髄由来マクロファージは粘膜固有層内にも分布していた。TNBS腸炎で粘膜固有層内に浸潤する細胞はCD11b^{int}, Gr-1^{dull}細胞でありことから、大腸壁内の細胞は、骨髄から動員されたものと考えられる。これらの結果から、腹腔内マクロファージは腸管炎症の漿膜側病変に特異的に関与していることが明らかとなった。

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)

慢性腎炎の治療にしばしばステロイド剤が使用される。特に、糸球体内での炎症反応が顕著な半月体性糸球体腎炎(臨床的には急速進行性糸球体腎炎)においては、大量のステロイド剤の点滴静注(ステロイドパルス療法)がしばしば行われる。しかし半月体性糸球体腎炎が比較的まれな疾患であり、未治療の場合には急速に腎機能が低下するために RCT 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。すなわち、半月体形成が顕著で尿蛋白が増加した腎炎惹起後7日目からメチルプレドニゾン(30 mg/kg/day)の連日投与を行うと、尿蛋白の増加や腎機能低下を抑制し、さらに半月体形成、糸球体への白血球浸潤、サイトカイン産生の抑制も観察された。また我々は、木村らによって開発された塩基性脂質 TRX-20 を添加した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リポソーム製剤は、通常のフリーのステロイド剤と比べて、強い治療効果を示すことを明らかにした。そこで今年度は、この TRX-20 リポソームという DDS 系におけるステロイド剤の治療効果発現のメカニズムについて調べた。

これまで報告したように、腎炎惹起後7日目より1週間に1回 3 mg/kg のリポソーム封入ステロイド剤を投与すると蛋白尿の増加や腎機能の低下を抑制し、組織学的には半月体形成を有意に抑制する。一方、等量のステロイド剤をそのまま投与しても臨床的及び組織学的に治療効果を示さない。しかし糸球体内の炎症の程度を調べるために、糸球体内の単球やリンパ球の数を測定したところ、リポソーム封入ステロイド剤治療群と未治療群の間に差はなかった。さらに糸球体内の炎症性サイトカイン mRNA レベルにも差はなく、リポソーム封入ステロイド剤の治療効果は、糸球体内の炎症の抑制ではないことが示唆された。

半月体の形成過程では、細胞の増加だけでなく細胞外マトリックスの増加も起き、細胞性半月体から線維性半月体へと変化していく。そこで糸球体内フィブロネクチン mRNA のレベルを調べたところ、未治療群と比べて、リポソーム封入ステロイド剤治療群で顕著な抑制が観察された。さらに線維化のメディエーターとして知られる Connective Tissue Growth Factor (CTGF) の mRNA レベルも有意に抑制されていた。これらの結果は、光顕レベルで観察された半月体形成の抑制の結果とよく一致した。

本研究で用いている動物モデルにおいて、CTGF はボーマン嚢上皮細胞が産生するとの報告がある。また半月体形成における細胞成分の増加には、炎症細胞の浸潤とともにボーマン嚢上皮細胞の増殖が重要であることが知られている。従って、上記の CTGF 産生抑制という結果は、ボーマン嚢上皮の増殖抑制の可能性を示唆すると考えられた。そこで同細胞のマーカーである PGP 9.5 の発現を mRNA 及びタンパク質レベルで調べたところ、リポソーム封入ステロイド剤治療群で顕著な抑制が観察された。

以上の結果から、本モデルにおけるリポソーム封入ステロイド剤の治療効果は、フリーのステロイド剤を大量に連日投与した場合は異なり、糸球体内への炎症細胞の浸潤やそれらの細胞による炎症性メディエーターの産生は抑制しないが、ボーマン嚢上皮細胞の増殖や、その後起きる細胞外マトリックスの蓄積を抑制することがわかった。

糸球体内の炎症反応が糸球体毛細血管壁の破壊を伴わなければ、炎症が血管内のみにとどまり、管外増殖性変化(すなわち半月体形成)には至らない。このような炎症であれば、不可逆的な糸球体の破壊はまぬがれることが期待される。半月体形成の分子機序には未だに不明な点が多く、リポソーム封入ステロイド剤の具体的な標的細胞や標的分子が何かは明らかではないが、同製剤で局所的に高濃度になったステロイド剤は、糸球体毛細血管壁の破壊の過程を抑制、あるいは一度壊れた毛細血管壁の修復に寄与して、疾患の進展を阻止することが示唆される。

量子ドットの感染症への応用

切替照雄(国立国際医療センター研究所感染症制御研究部)

tkirikae@ri.imcj.go.jp

臨床検査の分野の中では、生化学部門は自動化と機械化が進んでいる。一方、感染症診断部門、とりわけ細菌検査部門は自動化がほとんど進んでいない。これは、この分野では熟練した技師による細菌の分離培養という作業が必須と考えられていたからである。これまでの診断法では、いったん原因微生物を分離すると、その微生物の性状を繰り返し検査できるという利点がある。しかし、必ずしも原因微生物を分離できるとは限らない、複合感染を見落としやすい、診断までに通常数日間かかる、通常の診療ですべての感染症患者から原因微生物を分離培養する必要があるのか、など多くの問題点がある。このような点を考慮し、これまでの古典的な手法にかわる分離培養を必要としない感染症診断法の開発が望まれる。特に、培養に時間のかかる結核診断への応用が期待される。呼吸器症状を呈している患者の喀痰には複数の種類の病原体を含む微生物が存在する。それらすべてを迅速にできれば定量的に診断する方法が考えられる。また、薬剤耐性遺伝子の迅速診断法の開発も必須である。多色の蛍光を選択できるカンタムドットは、そのための有力な材料として使用できる。

Luminescent Quantum Dots for Multiplexed Diagnosis of Infectious Diseases

Teruo Kirikae, M.D., Ph.D.

Department of Infectious Diseases, Research Institute

International Medical Center of Japan

tkirikae@ri.imcj.go.jp

Automation and mechanization continue to process rapidly in the biochemical sections of clinical laboratories in hospitals and diagnostic centers. On the other hand, automation is not increasing in the microbiological sections, including bacteriological laboratories. The isolation of microorganisms by skilled microbiologists has been considered to be the first essential step to carry out microbiological diagnosis. Alternative diagnosis methods not having the isolation procedure should be developed. Samples such as sputum usually contain a number of species of microorganisms. In the developed methods, these organisms will be detected simultaneously, rapidly and quantitatively. Quantum dots with multi-luminescence will be a very useful tool for multiplexed diagnosis systems for infectious diseases.

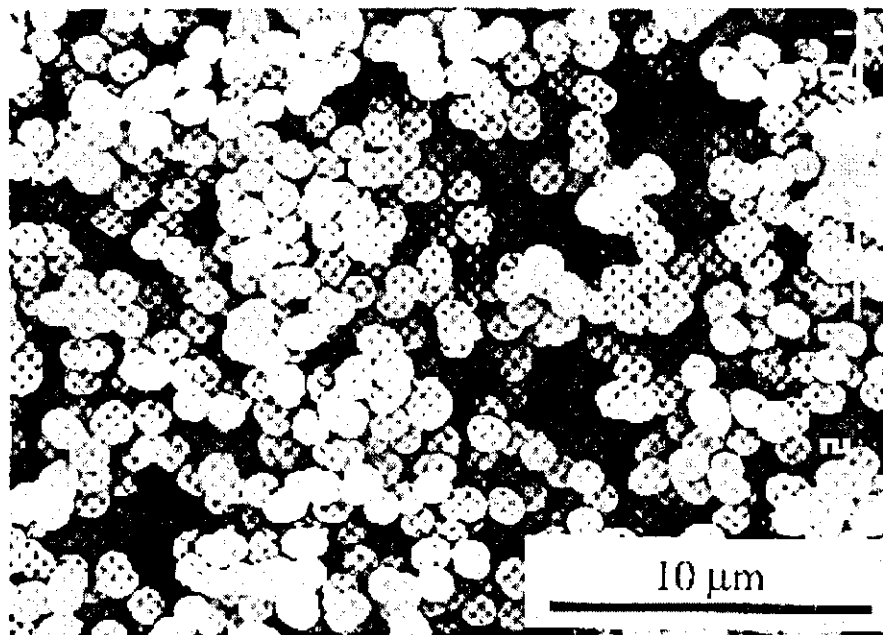
マalariaワクチン DDS に向けての基礎研究

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

研究要旨

われわれは、マalaria原虫のスポロゾイト表面抗原のタンデムリピート構造を炭素鎖にぶる下げた形の高分子材料を精製し、放射線重合を行うことでナノスフェアーを作成することに成功した。さらにはその粒状物にマalaria患者初期血清を反応させると、表面に抗原性を持つことが明らかとなった。そこで、マalaria原虫の赤内型ステージにおける解糖系の酵素エノラーゼの部分ペプチドを合成し、同様に炭素鎖にぶる下げた放射線重合を行ったところ、マイクロスフェアーを作成することが出来た。現在その精製を行っているが、検査診断薬として、さらにはワクチン DDS の材料としての有用性について報告する。



Quantum dot (Qdot)標識抗 MPO 抗体による血管炎の解析

鈴木和男

国立感染症研究所・生物活性物質部

ksuzuki@nih.go.jp

活性化好中球は血管炎の発症にかかわり、特に、好中球自己抗体 Myeloperoxidase(MPO)を抗原とした MPO-anti-neutrophil cytoplasmic autoantibody (MPO-ANCA)が病因・病態に深くかかわっている。一方、好中球を活性化するにともない、MPO-ANCA の抗原 MPO が表面に表出していることが明らかになっている。病因・病態を解明するには、MPO 抗原の表出の定量が鍵を握っている。しかし、定量的に測定するには、これまでの蛍光標識では、限界があり、ほとんど定量できなかつた。

そこで、mouse MPO に対する rabbit 抗体を Qdot で標識し、定量性を確保できるかを検討した。TNF-a、IL-1b、FMLP により好中球を刺激し QD-aMPO にて処理して細胞表面の MPO との反応を解析した。
【結果】いずれも MPO の細胞表面への表出が認められ、FITC, PE では見えない結合が観察できた。また、血管炎患者好中球では、陽性になることが認められた。また、腎炎・血管炎マウスにおいては、糸球体に顕著に観察された。

ゲスト蛋白を封入したシャペロニンの構造

積水化学工業 開発研究所 古谷昌弘

シャペロニンは、約 60kDa のサブユニットが 14~18 個集まった二層リング構造を有する直径約 15nm の中空ナノ粒子である。全ての生物に普遍的であり細胞質、ミトコンドリアでの蛋白質折り畳みの中心的役割を果たすと考えられて来た。一方で、結核菌、クラミジア、ヘリコバクター等の細菌は細胞表面に HSP60 (大腸菌 GroEL ホモログ) を提示しており、これが強い抗原性を示すことが従来から知られていた。近年では、CD14 や Toll-like receptor 2,4 が HSP60 の宿主受容体であり、その結合を介したサイトカインの放出が誘発されることがわかってきている(1,2)。これらの背景からシャペロニンリング内部にゲスト抗原を導入した構造体を作製すれば、従来技術では困難であった抗体開発のための抗原、あるいは新しいワクチン製剤として利用できる可能性が考えられた。

シャペロニンリングとゲスト蛋白の安定複合体を調製するためにシャペロニンサブユニットの連結体の末端にゲスト蛋白が続くリコンビナント融合蛋白を作製する戦略をとった。モデルシャペロニンとして古細菌シャペロニン (TCP; 8 回回転対称)、大腸菌 GroEL (7 回回転対称) を用いて検討した。TCP と GFP の融合体を作製したところ野生型と区別がつけにくい 2 層リング構造が電子顕微鏡で観察され、また平均画像の解析によって、GFP が TCP 内部に位置することが判明した(3)。GFP は緑色蛍光を発することから正しくフォールドされたことを示す。TCP の系では HBs 抗原、HCV コア抗原が、GroEL では 7 回膜貫通型受容体の合成が大腸菌発現系で確認できた。このことは大腸菌でリコンビナント作製が難しかった抗原もシャペロニンに格納されることで調製可能となったことを示す。これらの構造体の免疫応答を評価していく計画である。

1. Gobert, AP et al., J. Biol. Chem. 2004, 279 (1), 245-250
2. Osterloh, A. et al. J. Biol. Chem. 2004, 279 (46), 47906-47911
3. Furutani et al. Protein Sci. 2005, *in press*

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Kenji Yamamoto, Noriyoshi Manabe	Randomness and organization of the bio-nano-particles into the functional structure	Applied Mechnics, Science Council of Japan	Theoretical and Applied Mechanics Japan 53	Publication Committee of NCTAM	Tokyo	2004	111-114
加藤規弘	遺伝子とアンチエイジング (抗加齢) 医学：動脈硬化関連遺伝子	日本抗加齢医学会専門医・指導士認定委員会編	アンチアンチエイジング医学の基礎と臨床	Medical View	東京	2004	26-28
加藤規弘	遺伝子とアンチエイジング (抗加齢) 医学：その他の生活習慣病関連遺伝子	日本抗加齢医学会専門医・指導士認定委員会編	アンチアンチエイジング医学の基礎と臨床	Medical View	東京	2004	29-31
加藤規弘	オーダーメイド医療2. 合併症	熊谷裕生、小室一成、堀内正嗣、森下竜一 編	ファーマナビゲーター「ARB 編」	メディカルレビュー社	東京	2004	286-289
竹下文隆、落谷孝広	アテロコラーゲンをういた生体へのSIRNA デリバリー法の開発	多比良和誠	改訂 RNAi 実験プロトコル	羊土社	東京	2004	224-225

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	頁	出版年
Akiyoshi Hoshino, Kouki Fujioka, Taisuke Oku, Masakazu Suga, Yu F. Sasaki, Toshihiro Ohta, Masato Yasuhara, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto	Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification	Nano Letters	4(10)	2163-2169	2004
Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Nakamura S, Suga M, Yamaguchi Y, Suzuki K, Yasuhara M, Yamamoto K.	Quantum dots targeted to the assigned organelle in living cells	<i>Microbiol Immunol.</i>	48	985-994	2004
Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto	Application of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body	Biochemical and Biophysical Research Communications	314	46-53	2004
Amane Shiohara, Akiyoshi Hoshino, Ken-ichi Hanaki, Kazuo Suzuki, and Kenji Yamamoto	On the Cyto-Toxicity Caused by Quantum Dots	Microbiol. Immunol.	48(9)	669-675	2004
A. Aringazin A.K., Dahnovsky Yu., Krevchik V.D., Semenov M.B., Veremyev V.A., Ovchinnikov A. A., Yamamoto K.	Two-dimensional tunnel bifurcations with dissipation	Hadronic Journal	- v. 27, N 2	115-150	2004
Yayoi Otsuka, Ken-ichi Hanaki, Jizi Zhao, Ryuuji Otsuka, Kiminori Toyooka, Hiroshi Yoshikura, Tadatashi Kuratsuji, Kenji Yamamoto, Teruo Kirikae	Detection of Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin using Quantum Dot immuno-conjugates	Jpn. J. Infect. Dis.	57	183-184	2004
Asada M, Ohmi K, Delia D, Enosawa S, Suzuki S, Yuo A, Suzuki H, Mizutani S	Brap2 functions as a cytoplasmic retention protein for p21 during monocytic differentiation.	Mol Cell Biol	24	8236-43	2004
湯尾 明	ATRA による顆粒球のアポトーシスの分子機構	臨床免疫	41	148-152	2004
湯尾 明	NF- κ B 依存性リンパ球活性化におけるパラカスパーゼの役割	BIO clinica	19	1027-31	2004
Shigeyuki Kano, Mikio Kimura	Review -Trends in malaria cases in Japan	Acta Tropica	89(3)	271-278	2004
Nao Taguchi, Toshimitsu Hatabu, Haruyasu Yamaguchi, Mamoru Suzuki, Kumiko Sato and Shigeyuki Kano	Plasmodium falciparum: Selenium-induced cytotoxicity to Plasmodium falciparum	Experimental Parasitology	106	50-55	2004

<p>Kasinee Buchachart, Srivicha Krudsood, Mathieu Nacher, Duangrudee Chindanond, Piyathida Rungmatcha, Shigeyuki Kano and Somchai Looareesuwan</p>	<p>Evaluation of the KATTM-Quick Malaria Rapid Test for rapid diagnosis of falciparum malaria in Thailand</p>	<p>Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health</p>	<p>35(1)</p>	<p>35-37</p>	<p>2004</p>
<p>Varee Wongchotigul, Nirut Suwanna, Srivicha Krudsood, Duangrudee Chindanond, Shigeyuki Kano, Nobuaki Hanaoka, Yasumasa Akai, Yasunori Mackawa, Satoshi Nakayama, Somei Kojima and Somchai Looareesuwan</p>	<p>The use of flow cytometry as a diagnostic test for malaria parasites</p>	<p>Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health</p>	<p>35575-582</p>	<p>552-559</p>	<p>2004</p>
<p>K Na-Bangchang, S Krudsood, U Silachamroon, P Molunto, O Tasanor, K Chalermrut, N Tangpukdee, O Matangkasombut, S Kano and S Looareesuwan</p>	<p>The pharmacokinetics of oral dihydroartemisinin and artesunate in healthy Thai volunteers</p>	<p>Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health</p>	<p>35(3)</p>	<p>575-582</p>	<p>2004</p>

Yuko Katakai, Rachatawan Chiabchalar, Kanako Komaki-Yasuda, Shin-ichiro Kawazu, Pratap Singhasivanon, Srivicha Krudsood, Somchai Looareesuwan and Shigeyuki Kano	Application of real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis for detection and discrimination of malaria parasite species in Thai patients	Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health	35 (supple 2)	10-14	2004
Kazuhiko Yano, Kanako Komaki-Yasuda, Tamaki Kobayashi, Hiotshi Takemae, Kiyoshi Kita, Shigeyuki Kano and Shin-ichiro Kawazu	Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins of the human malaria parasite Plasmodium falciparum in the blood stage	Parasitology International	in print		
Toshimitsu Hatabu, Shin-ichiro Kawazu, Somei Kojima, Pratap Singhasivanon, Srivicha Krudsood, Somchai Looareesuwan and Shigeyuki Kano	A pilot field trial of an in vitro drug susceptibility test using the AnaeroPack malaria culture system on the Thai-Myanmar border	Tropical Medicine and Health	32(4)		2004 (in print)

Toshimitsu Hatabu, Tsuyoshi Takada, Nao Taguchi, Mamoru Suzuki, Kumiko Sato and Shigeyuki Kano	Potent plasmocidal activity of a heat-induced reformulation of deoxycholate-amphotericin B (Fungizone) against Plasmodium falciparum	Antimicrobial Agent and Chemotherapy			2004 (in print)
Shirai, Y., Hashimoto, M., Kato, R., Kawamura, Y., Kirikae, T., Yano, H., Takashima, J., Kirihara, Y., Saito, Y., Fujino, M.A., Dohi, T	Lipopolysaccharide induces CD25-positive, IL-10-producing lymphocytes without secretion of proinflammatory cytokines in the human colon: LowMD-2 mRNA expression in the colonic macrophages.	J. Clin. Immunol	24	42-52	2004
Fujino, T., Sekiguchi, J., Kawana, A., Konosaki, H., Nishimura, H., Saruta, K., Kudo, K., Kondo, T., Yazaki, Y., Kuratsuji, T. and Kirikae, T.	Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in a Tokyo Hospital in 2003	Jpn. J. Infect. Dis.	57	83-85	2004